



**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

"O PAPEL DA ASSOCIAÇÃO ENTRE FORMIGAS E NECTÁRIOS  
EXTRANUPCIAIS SOBRE O ÊXITO REPRODUTIVO DE  
*Tocoyena formosa* (Rubiaceae)"

**JULIANA VERÓNICA IZQUIERDO**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia, 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**  
**2016**



**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

"O PAPEL DA ASSOCIAÇÃO ENTRE FORMIGAS E NECTÁRIOS  
EXTRANUPCIAIS SOBRE O ÊXITO REPRODUTIVO DE  
*Tocoyena formosa* (Rubiaceae)"

**JULIANA VERÓNICA IZQUIERDO**

**PROF. Dr. FELIPE W. AMORIM**  
ORIENTADOR

**Dr. SANTIAGO BENITEZ-VIEYRA**  
CO-ORIENTADOR

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**  
**2016**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Izquierdo, Juliana Verónica.

O papel da associação entre formigas e nectários  
extranupciais sobre o êxito reprodutivo de *Tocoyena formosa*  
(Rubiaceae) / Juliana Verónica Izquierdo. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de  
Botucatu  
Orientador: Felipe Wanderley Amorim  
Capes: 20300000

1. Plantas melíferas. 2. Rubiácea. 3. Flores. 4. Néctar.  
5. Nectários. 6. Formiga.

Palavras-chave: Herviboria foliar; Interação mutualística  
defensiva; Néctar; Nectário pós-floral; *Tocoyena formosa*.

*A mis padres Jorge y Analía,  
y a mis abuelos Joaquín y Liria,  
por no dejarme bajar los brazos,  
por apoyarme en todas mis decisiones y ser mi puerto seguro.  
Gracias por enseñarme que todo nuevo día es una nueva oportunidad de superación y de ser feliz.*

## **Agradecimentos**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida durante o mestrado e pelo apoio financeiro no âmbito do Universal CNPq, processo: 484469/2013-14.

Ao Prof. Dr. Felipe W. Amorim pela orientação, discussões e conhecimentos transmitidos. Obrigada pela oportunidade de realizar o mestrado e a enorme paciência.

Ao Dr. Santiago Benitez-Vieyra pela coorientação, grande ajuda embora a distância e por me incentivar realizar pós-graduação fora do país, contudo o que significa.

Ao Prof. Dr. Leonardo Galetto pela colaboração com as análises químicas de néctar.

À Prof Silvia Rodrigues Machado pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Pesquisas em Anatomia Vegetal (LaPAV).

À Yve, pela ajuda com o trabalho de anatomia, principalmente pela paciência, conhecimentos e discussões. Obrigada por transmitir o amor pela anatomia vegetal.

Aos alunos do LEPI, Priscila, João, Leandro, Eduardo, Alan, Amanda, Caio pela convivência no laboratório, discussões e pela amizade. Principalmente a Priscila, João, Leandro e Eduardo pela ajuda no campo, sem vocês não ia conseguir.

Especialmente agradeço meus pais Jorge e Analía, e avós Joaquín e Liria pelo grande apoio na loucura de fazer mestrado longe de casa, pela confiança e por compreender a importância desta experiência.

À Priscila pela amizade, paciência e convivência no primeiro ano, o mais difícil para mim. À Maëla pela amizade e grande carinho. Muito obrigada as duas pelas conversas e loucuras compartilhadas, por me deixar ser parte das suas famílias.

À Lorena, Tayeme, Wand, Diana, Thais, Angélica, Fernanda, Camila e Talita obrigada pela amizade, conversas e momentos inesquecíveis, este ano não tivesse sido igual sem vocês. Camila e Talita obrigada também pela ótima convivência.

À Gio, Naty, Ary, Juli, Bianca, Flor e Day minhas queridas amigas que sempre me apoiaram e estiveram presentes nestes dois anos.

Emfin, a todas as pessoas que contribuíram e me acompanharam na realização do meu mestrado, muito obrigada!

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	3
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	7
<b>CAPÍTULO I Glândula multivalente: estrutura do nectário floral em diferentes estágios reprodutivos de <i>Tocoyena formosa</i> (Rubiaceae)</b> .....	9
<b>RESUMO</b> .....	10
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	12
<b>RESULTADOS</b> .....	14
<b>DISCUSSÃO</b> .....	17
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	22
<b>FIGURAS</b> .....	24
<b>CAPÍTULO II Formigas e nectários extranupciais em <i>Tocoyena formosa</i> (Rubiaceae) &gt; ecologia do néctare mutualismo defensivo</b> .....	32
<b>RESUMO</b> .....	33
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	34
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
<b>RESULTADOS</b> .....	40
<b>DISCUSÃO</b> .....	48
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	51
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	60
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	63

1 IZQUIERDO, J. V. **O PAPEL DA ASSOCIAÇÃO ENTRE FORMIGAS E NECTÁRIOS**  
2 **EXTRANUPCIAIS SOBRE O ÊXITO REPRODUTIVO DE *TOCOYENA FORMOSA***  
3 **(RUBIACEAE)**. 2017. 64p. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – INSTITUTO DE  
4 BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
5 MESQUITA FILHO”, BOTUCATU.

6  
7 **RESUMO.** As plantas oferecem recurso alimentar a muitas espécies animais através de  
8 diferentes estruturas. Dentre tais estruturas estão os nectários, que são glândulas  
9 multicelulares especializadas na produção e secreção de néctar. Estes nectários podem ocorrer  
10 tanto em partes reprodutivas como vegetativas, e podem ser florais ou extraflorais. Entretanto,  
11 também podem ser classificados quanto a sua função em relação com a polinização, sendo do  
12 tipo nupcial (quando sua função está relacionada à polinização) ou extranupcial (quando sua  
13 função está relacionada à defesa). *Tocoyena formosa* (Rubiaceae) é uma espécie comum do  
14 Cerrado, cujos nectários extraflorais são visitados por formigas. Entretanto, *T. formosa* tem  
15 um único nectário que desempenha funções multivalentes, podendo ser tanto nupcial, quanto  
16 extranupcial. Adicionalmente, a espécie também atrai formigas aos botões no início da fase de  
17 desenvolvimento cujas corolas são abortadas. Neste contexto, para melhor compreender a  
18 interação entre *T. formosa* e formigas, este trabalho teve como objetivos: a) caracterizar as  
19 estruturas das distintas fases do nectário da espécie e a composição química de seus açúcares;  
20 b) determinar se existe mudança estrutural e/ou química que seja correspondente com o papel  
21 ecológico de cada estágio; c) analisar a dinâmica de secreção do néctar em cada um dos  
22 estágios de atividade do nectário; e d) quantificar o investimento da planta no recurso para a  
23 atração de formigas e o efeito destas no êxito reprodutivo. Nossos resultados indicam que o  
24 nectário apresenta características de tecido secretor ativo durante todos os estágios, assim  
25 como a presença de cristais de oxalato de cálcio no tecido secretor e em outras partes do fruto  
26 que contribuem com a proteção contra herbívoros. Nós observamos que formigas diminuem  
27 significativamente o dano foliar causado por herbívoros, porém não tiveram efeito sobre a  
28 produção de sementes. Deste modo, *Tocoyena formosa* direcionaria os recursos obtidos na  
29 fotossíntese para a secreção do néctar através de uma única estrutura secretora, e assim  
30 protege as folhas e, indiretamente, os frutos e sementes em desenvolvimento. Destacamos que  
31 este trabalho descreve pela primeira vez a ocorrência de atividade de secreção de néctar em  
32 botões florais que perdem a corola de forma prematura, e aqui o denominamos de nectário  
33 pré-floral.

34  
35 **Palavras chaves:** anatomia, formigas, herbivoria foliar, mutualismo defensivo, nectário  
36 extranupcial

1 IZQUIERDO, J. V. **THE ROLE OF THE ASSOCIATION BETWEEN ANTS AND**  
2 **EXTRANUPTIAL NECTARIES ON THE FITNESS OF TOCOYENA FORMOSA**  
3 **(RUBIACEAE)**. 2017. 64p. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – INSTITUTO DE  
4 BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
5 MESQUITA FILHO”, BOTUCATU.

6  
7 **ABSTRACT.** Plants offer food resources to many animal species through different structures.  
8 Among such structures are the nectaries, which are multicellular glands specialized in nectar  
9 production and secretion. Nectaries can occur in both reproductive and vegetative parts, and  
10 depending on the location can be regarded as floral or extra-floral. However, they can also be  
11 classified according to their function in relation to pollination, being nuptial (when their  
12 function is related to pollination) or extranuptial (when their function is related to the  
13 defense). *Tocoyena formosa* (Rubiaceae) is a common species of the Cerrado vegetation,  
14 whose extrafloral nectaries are visited by ants. However, *T. formosa* has a single nectary that  
15 performs multivalent functions, which can be both nuptial and extranuptial. In addition, the  
16 species also attracts ants to the flower buds at the beginning of the development, whose  
17 corollas are prematurely aborted. In this context, to better understand the interaction between  
18 *T. formosa* and ants, the main goals of this study were: a) to characterize the nectary structure  
19 as well as the sugar chemical composition during the distinct stages of the organ; b) assess  
20 whether nectary structure and nectar sugar composition present changes which correspond to  
21 the ecological function of each stage of the nectary; c) analyze nectar secretion dynamics of  
22 each phase of the nectary; and d) quantify plant investment in the attraction of ants and the  
23 effectivity of ants in plant fitness. Our results indicate that the nectary presents characteristics  
24 of active secretory tissue during all stages, as well as the presence of calcium oxalate crystals  
25 in both secretory tissue and in other parts of the fruit, which may contribute to the fruit  
26 protection against herbivores. We observed that ants significantly reduced leaf damage caused  
27 by herbivores, but they had no effect on seed production. Hence, *Tocoyena formosa* direct the  
28 resources obtained in the photosynthesis towards the secretion of the nectar through a single  
29 secretory structure, and thus protect leaves against herbivores which indirectly may also  
30 benefit fruit and seed production. We highlight that our study describes for the first time the  
31 occurrence of nectar secretion activity in floral buds that lose the corolla prematurely, that we  
32 named here as pre-floral nectary.

33  
34  
35  
36 **Keywords:** anatomy, ants, defensive mutualism, extranuptial nectary, foliar herbivory

37

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

2  
3 Os nectários são estruturas secretoras multicelulares que secretam o néctar, *i.e.*, uma  
4 solução aquosa com elevado conteúdo de açúcar, e possibilitam a interação das plantas com  
5 diferentes animais que utilizam o néctar como importante recurso alimentar (Schmid, 1988;  
6 Pacini & Nicolson, 2007). Os nectários são classificados de acordo com a sua localização na  
7 planta, podendo ser de dois tipos: nectário floral (NF) ou nectário extrafloral (NEF). O  
8 nectário floral é encontrado nos verticilos florais, como cálice e corola, ao passo que o  
9 nectário extrafloral ocorre nas partes vegetativas da planta (Koptur, 2005). Os NEFs atraem  
10 insetos, particularmente formigas para proteção contra herbívoros (de folhas, frutos ou  
11 sementes), ainda que nem sempre sejam evidentes os benefícios de tal interação (Bentley,  
12 1977a; Baker *et al.*, 1978; O'Dowd & Catchpole, 1983; Freitas *et al.*, 2000; Koptur, 2005;  
13 Nepi, 2007; Pacini & Nicolson, 2007; Rico-Gray & Oliveira, 2007; Byk & Del-Claro, 2010;  
14 Alma *et al.*, 2015; Alves-Silva & Del-Claro, 2016). Utilizando a mesma perspectiva, Schmid  
15 (1988) classificou os nectários em reprodutivos (ocorrem nas partes reprodutivas das plantas)  
16 e extrareprodutivos (ocorrem nas partes vegetativas). Entretanto, Delpino (1868) classificou  
17 os nectários segundo a sua relação com a polinização e denominou aqueles nectários  
18 diretamente relacionados com a polinização de nupciais, e aqueles não relacionados com a  
19 polinização de extranupciais (Bernardello, 2007).

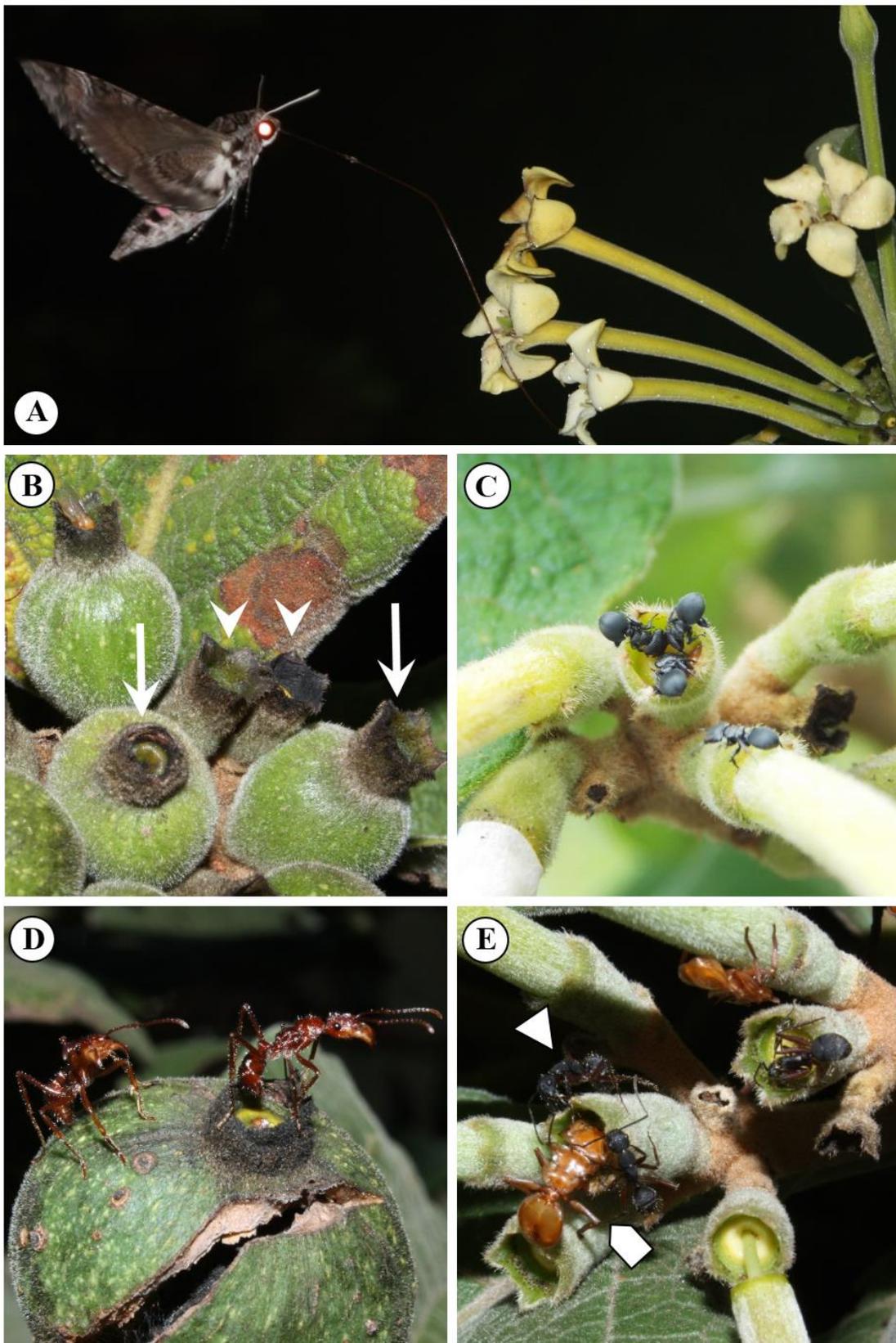
20 Entretanto, como o néctar produzido pelos dois tipos de nectários atrai diferentes tipos  
21 de animais, a sua quantidade e qualidade pode variar e também ser influenciado pelo ambiente  
22 (Koptur, 1994; Bernardello, 2007; Pacini & Nicolson, 2007). O néctar fornece principalmente  
23 água, açúcares (sacarose, glucose e frutose) e aminoácidos (Lanza *et al.*, 1993; Blüthgen &  
24 Fiedler, 2004; Koptur, 2005; Pacini & Nicolson, 2007; González-Teuber & Heil, 2009) aos  
25 visitantes.

26 *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlechtd.) K. Schum (Rubiaceae) está ente as 50  
27 espécies lenhosas mais comuns e amplamente distribuídas no Cerrado (Ratter *et al.*, 2003). A  
28 espécie é autoincompatível e, portanto, depende de polinizadores para a sua reprodução. Os  
29 polinizadores são mariposas da família Sphingidae, em particular aquelas espécies com  
30 aparelho bucal extremamente longo (> 6,0 cm). Esses insetos visitam as flores em busca do  
31 néctar que é produzido na base do tubo da corola (Fig. 1A). A inflorescência de *T. formosa* é  
32 do tipo dicásio de dicásio e as flores duram aproximadamente quatro dias e são protândricas.  
33 Na primeira noite quando a flor abre (fase masculina) o pólen é apresentado de forma  
34 secundária sobre os lóbulos estigmáticos que estão fechados (pseudoestame). A partir da  
35 segunda noite até a senescência da flor (fase feminina), os lóbulos estigmáticos abrem-se e

1 ficam receptivos (Oliveira *et al.*, 2004). Como todas as espécies pertencentes à família  
2 Rubiaceae, *T. formosa* possui ovário ínfero e o nectário encontra-se na parte superior, na base  
3 da corola rodeando a base do estilete (Bernardello, 2007; Delprete & Jardim, 2012).

4 Nas inflorescências de *T. formosa*, entretanto, nem todas as flores são visitadas ou  
5 efetivamente polinizadas. As flores que não foram visitadas, ou que não receberam pólen de  
6 outros indivíduos perdem a corola e o nectário continua ativo secretando néctar. Essa etapa  
7 constitui o estágio pós-floral, no qual o nectário assume uma função extranupcial (Fig. 1B, C).  
8 Já as flores que foram polinizadas com pólen de outros indivíduos, perdem a corola e o  
9 nectário permanece ativo acompanhando o desenvolvimento do fruto até seu amadurecimento.  
10 Neste caso, o nectário passa a constituir o estágio de atividade pericarpial (Fig. 1B, Santos &  
11 Del-Claro, 2001; Del-Claro *et al.*, 2013; Falcão *et al.*, 2014). Esses nectários florais que ainda  
12 continuam ativos depois da floração atraem diferentes espécies de formigas que estabelecem  
13 com *T. formosa* uma interação do tipo mutualismo defensivo (Fig. 1D, E). Este tipo de  
14 interação ocorre porque a planta oferece uma importante fonte de energia em troca de  
15 proteção tanto de folhas como de frutos e sementes (Bentley, 1977b; Koptur, 1992; Byk &  
16 Del-Claro, 2011). A interação formiga-NEFs está amplamente distribuída em zonas  
17 temperadas e tropicais (Koptur, 1992), o que inclui o Cerrado (Oliveira *et al.*, 1987; Oliveira  
18 & Leitão-Filho, 1987; Belchior *et al.*, 2016). Os NEFs têm grande importância na defesa das  
19 plantas contra diferentes tipos de herbívoros (Koptur, 1984; Oliveira *et al.*, 1987; Del-Claro *et*  
20 *al.*, 1996; Nascimento & Del-Claro, 2010; Del-Claro *et al.*, 2013; Belchior *et al.*, 2016).

21 Em *T. formosa*, contudo, ainda existe um outro estágio do nectário que também atrai  
22 formigas. Este deriva da abscisão prematura da corola durante a fase inicial de  
23 desenvolvimento dos botões florais, antes da abertura das primeiras flores na inflorescência.  
24 A presença destes nectários permite o recrutamento de formigas, que pode atuar na proteção  
25 de *T. formosa* contra herbívoros, já que sua aparição é anterior à floração (obs. pessoal).  
26 Mesmo assim, o papel ecológico deste tipo de nectário ainda é desconhecido.



1  
 2 **Figura 1. a)** Morfologia floral e polinizador de *Tocoyena formosa*. Note o longo do tubo floral correspondente  
 3 ao longo aparato bucal do visitante, a mariposa *Agrius cingulata* (Sphingidae). **b)** Nectários em estágio de  
 4 atividade pós-floral (cabeça de seta) e pericarpial (seta). **c)** Formigas *Cephalotes* sp. visitando nectário pós-floral.  
 5 **d)** *Ectatomma tuberculatum* visitando o nectário pericarpial no final de desenvolvimento do fruto. Note a  
 6 posição de ataque da formiga. **e)** *Camponotus* sp. (formiga de comportamento agressivo, triângulo) junto com  
 7 *Cephalotes* sp. (formiga não agressiva, pentágono) visitando os nectários pericarpiais no começo do  
 8 desenvolvimento do fruto.

1 Em nosso sistema de estudo a mesma estrutura secretora permanece ativa ao longo de  
2 toda a etapa reprodutiva da planta e atrai diferentes visitantes, com diferentes requerimentos  
3 nutricionais. Mariposas por exemplo, têm preferência por néctar rico/dominante em sacarose  
4 (Koptur, 1994; Wolff, 2006), já as formigas geralmente preferem néctar rico/dominante em  
5 hexose (Koptur, 1979; Tanowitz & Koehler, 1986; Koptur, 2005) e com alta quantidade de  
6 aminoácidos (Lanza, 1988; Lanza *et al.*, 1993; Koptur, 2005).

7 Neste contexto, para melhor entender o significado ecológico e evolutivo dos  
8 diferentes tipos de nectários presentes em *Tocoyena formosa*, nós realizamos uma abordagem  
9 ampla sobre a estrutura e funcionamento dos nectários da espécie. Os nossos principais  
10 objetivos foram:

- 11 a) Comparar as estruturas do nectário de *T. formosa* e a composição química do  
12 néctar em seus diferentes estágios;
- 13 b) Determinar se existe mudança estrutural e/ou química que seja correspondente  
14 com o papel ecológico de cada estágio do nectário;
- 15 c) Analisar a dinâmica de secreção de néctar em cada um dos estágios de atividade do  
16 nectário;
- 17 d) Por fim, quantificar o investimento da planta no recurso para a atração de formigas  
18 e o efeito destas em seu êxito reprodutivo em termos de sementes produzidas  
19 (êxito reprodutivo final) e redução do dano foliar.

20 Para isso, nosso trabalho encontra-se dividido em dois capítulos. No **Capítulo I**,  
21 descrevemos um novo tipo de nectário que ocorre em *T. formosa*, o qual denominamos de  
22 nectário pré-floral, além de também analisarmos os outros estágios de atividade do nectário,  
23 ou seja, as fases floral, pós-floral e pericarpial. Também realizamos testes histoquímicos para  
24 conhecer a natureza química das diferentes substâncias que compõem os tecidos, para  
25 finalmente comparar anatomicamente as estruturas. Já no **Capítulo II**, nós comparamos a  
26 dinâmica de secreção de néctar entre os diferentes estágios de atividade do nectário e a  
27 composição química do néctar para quantificar o investimento no recurso para atração das  
28 formigas, e também foram realizados experimentos de exclusão de formigas para testar se a  
29 presença/ausência delas pode influenciar na produção de sementes por fruto e na herbivoria  
30 foliar e, portanto, êxito reprodutivo da espécie.

31

## REFERÊNCIAS

- Alma, A.M., Pol, R.G., Pacheco, L.F., Vázquez, D.P. (2015) No Defensive Role of Ants throughout a Broad Latitudinal and Elevational Range of a Cactus. *Biotropica*.
- Alves-Silva, E., Del-Claro, K. (2016) On the inability of ants to protect their plant partners and the effect of herbivores on different stages of plant reproduction. *Austral Ecology*, **41**(3), 263-272.
- Baker, H.G., Opler, P.A., Baker, I. (1978) A comparison of the amino acid complements of floral and extrafloral nectars. *Botanical Gazette*, 322-332.
- Belchior, C., Sendoya, S.F., Del-Claro, K. (2016) Temporal Variation in the Abundance and Richness of Foliage-Dwelling Ants Mediated by Extrafloral Nectar. *PloS one*, **11**(7), e0158283.
- Bentley, B.L. (1977) Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 407-427.
- Bernardello, G. (2007) A systematic survey of floral nectaries. In *Nectaries and nectar*, Springer Netherlands, Springer: pp 19-128.
- Blüthgen, N., Fiedler, K. (2004) Preferences for sugars and amino acids and their conditionality in a diverse nectar-feeding ant community. *Journal of Animal Ecology*, **73**(1), 155-166.
- Byk, J., Del-Claro, K. (2010) Nectar-and pollen-gathering *Cephalotes* ants provide no protection against herbivory: a new manipulative experiment to test ant protective capabilities. *acta ethologica*, **13**(1), 33-38.
- Del-Claro, K., Berto, V., Réu, W. (1996) Effect of herbivore deterrence by ants on the fruit set of an extrafloral nectary plant, *Qualea multiflora* (Vochysiaceae). *Journal of Tropical Ecology*, **12**(06), 887-892.
- Del-Claro, K., Guillermo-Ferreira, R., Zardini, H., Almeida, E.M., Torezan-Silingardi, H.M. (2013) Ants visiting the post-floral secretions of pericarpial nectaries in *Palicourea rigida* (Rubiaceae) provide protection against leaf herbivores but not against seed parasites. *Sociobiology*, **60**(3), 217-221.
- Delprete, P.G., Jardim, J.G. (2012) Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: an overview about the current status and future challenges. *Rodriguésia*, **63**(1), 101-128.
- Falcão, J., Dáttilo, W., Izzo, T. (2014) Temporal variation in extrafloral nectar secretion in different ontogenic stages of the fruits of *Alibertia verrucosa* S. Moore (Rubiaceae) in a Neotropical savanna. *Journal of Plant Interactions*, **9**(1), 137-142.
- Freitas, L., Galetto, L., Bernardello, G., Paoli, A.A. (2000) Ant exclusion and reproduction of *Croton sarcopetalus* (Euphorbiaceae). *Flora (Jena)*, **195**(4), 398-402.
- González-Teuber, M., Heil, M. (2009) The Role of Extrafloral Nectar Amino Acids for the Preferences of Facultative and Obligate Ant Mutualists. *Journal of Chemical Ecology*, **35**(4), 459-468.
- Koptur, S. (1979) Facultative Mutualism between Weedy Vetches Bearing Extrafloral Nectaries and Weedy Ants in California. *American journal of botany*, **66**(9), 1016-1020.
- Koptur, S. (1984) Experimental evidence for defense of *Inga* (Mimosoideae) saplings by ants. *Ecology*, 1787-1793.
- Koptur, S. (1992) Extrafloral nectary-mediated interactions between insects and plants. *Insect Plant Interactions*, **4**, 81-129.
- Koptur, S. (1994) Floral and extrafloral nectars of Costa Rican *Inga* trees: a comparison of their constituents and composition. *Biotropica*, 276-284.
- Koptur, S. (2005) Nectar as fuel for plant protectors. In *Plant-provided food for carnivorous insects: a protective mutualism and its applications*. Cambridge University Press, Cambridge, UK: pp 75-108.

- 1 Lanza, J. (1988) Ant Preferences for Passiflora Nectar Mimics That Contain Amino Acids.  
2 Biotropica, **20**(4), 341-344.
- 3 Lanza, J., Vargo, E.L., Pulim, S., Chang, Y.Z. (1993) Preferences of the Fire Ants *Solenopsis*  
4 *invicta* and *S. geminata* (Hymenoptera: Formicidae) for Amino Acid and Sugar  
5 Components of Extrafloral Nectars. *Environmental Entomology*, **22**(2), 411-417.
- 6 Nascimento, E.A., Del-Claro, K. (2010) Ant visitation to extrafloral nectaries decreases  
7 herbivory and increases fruit set in *Chamaecrista debilis* (Fabaceae) in a Neotropical  
8 savanna. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, **205**(11), 754-  
9 756.
- 10 Nepi, M. (2007) Nectary structure and ultrastructure. In *Nectaries and nectar*, Springer  
11 Netherlands, Springer: pp 129-166.
- 12 Nicolson, S.W. (2007) Nectar consumers. In *Nectaries and Nectar* (S.W. Nicolson, M. Nepi &  
13 E. Pacini, eds), Springer Netherlands, Dordrecht: pp 289-342.
- 14 O'Dowd, D.J. and Catchpole, E. (1983) Ants and extrafloral nectaries: no evidence for plant  
15 protection in *Helichrysum* spp.—ant interactions. *Oecologia*, **59**(2-3), 191-200.
- 16 Oliveira, P., Da Silva, A., Martins, A. (1987) Ant foraging on extrafloral nectaries of *Qualea*  
17 *grandiflora* (Vochysiaceae) in cerrado vegetation: ants as potential antiherbivore  
18 agents. *Oecologia*, **74**(2), 228-230.
- 19 Oliveira, P.E., Gibbs, P.E., Barbosa, A.A. (2004) Moth pollination of woody species in the  
20 Cerrados of Central Brazil: a case of so much owed to so few? *Plant Systematics and*  
21 *Evolution*, **245**(1-2), 41-54.
- 22 Oliveira, P.S., Freitas, A.V. (2004) Ant–plant–herbivore interactions in the neotropical  
23 cerrado savanna. *Naturwissenschaften*, **91**(12), 557-570.
- 24 Oliveira, P.S., Leitao-Filho, H.F. (1987) Extrafloral nectaries: their taxonomic distribution  
25 and abundance in the woody flora of cerrado vegetation in Southeast Brazil.  
26 *Biotropica*, 140-148.
- 27 Pacini, E., Nepi, M. (2007) Nectar production and presentation. In *Nectaries and nectar*,  
28 Springer Netherlands, Springer: pp 167-214.
- 29 Pacini, E., Nicolson, S.W. (2007) Introduction. In *Nectaries and Nectar*, Springer  
30 Netherlands, Springer: pp 1-18.
- 31 Ratter, J., Bridgewater, S., Ribeiro, J. (2003) Analysis of the floristic composition of the  
32 Brazilian cerrado vegetation III: comparison of the woody vegetation of 376 areas.  
33 *Edinburgh Journal of Botany*, **60**(01), 57-109.
- 34 Rico-Gray, V., Oliveira, P.S. (2007) *The ecology and evolution of ant-plant interactions*  
35 University of Chicago Press.
- 36 Santos, J.C., Del-Claro, K. (2001) Interactions between ants, herbivores and extrafloral  
37 nectaries in *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlechtd.) K. Schum.(Rubiaceae) in  
38 Cerrado. *Revista Brasileira de Zoociências*, **3**(1), 35-44.
- 39 Schmid, R. (1988) Reproductive versus extra-reproductive nectaries—historical perspective  
40 and terminological recommendations. *The Botanical Review*, **54**(2), 179-227.
- 41 Tanowitz, B.D., Koehler, D.L. (1986) Carbohydrate Analysis of Floral and Extra-floral  
42 Nectars in Selected Taxa of *Sansevieria* (Agavaceae). *Annals of Botany*, **58**(4), 541-  
43 545.
- 44 Wolff, D. (2006) Nectar sugar composition and volumes of 47 species of Gentianales from a  
45 southern Ecuadorian montane forest. *Annals of Botany*, **97**(5), 767-777.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48

## CAPÍTULO I

### **Glândula multivalente: estrutura do nectário floral em diferentes estágios reprodutivos de *Tocoyena formosa* (Rubiaceae)**

**Juliana Verónica Izquierdo<sup>1</sup>, Yve Canaveze<sup>2</sup>, Silvia Rodrigues Machado<sup>2</sup>, Felipe W. Amorim<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brasil.

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

\*Capítulo em fase de preparação para a submissão para a *Plant Biology*.

## 1 RESUMO

2  
3 Os nectários são estruturas especializadas na secreção do néctar e podem ocorrer em  
4 estruturas vegetativas e reprodutivas. Podem estar associados à atração de agentes de defesa  
5 ou de polinizadores, sendo algumas vezes a mesma estrutura associada a estas duas funções,  
6 como reportado para algumas espécies de Rubiaceae. Nessa família, o nectário floral é em  
7 forma de disco e rodeia o estilete na porção superior do ovário e pode permanecer ativo  
8 secretando néctar após a queda da corola, estágio denominado pericarpial por encontrar-se no  
9 fruto em desenvolvimento. Em *Tocoyena formosa* (Rubiaceae) além desse estágio pericarpial  
10 de atividade do nectário, existe um outro estágio anterior à abertura das flores que se origina  
11 da queda prematura da corola em botões florais em fase inicial de desenvolvimento, e  
12 possuem morfologia diferenciada daqueles botões que se desenvolverão normalmente. Nosso  
13 objetivo foi investigar a estrutura e histoquímica do nectário nas fases floral, pós-floral e de  
14 desenvolvimento do fruto de *T. formosa*, buscando compreender como um mesmo nectário  
15 apresenta diferentes estágios de atividade e se há alteração na organização do nectário nesses  
16 estágios. Os diferentes estágios do nectário foram processados de acordo com técnicas usuais  
17 para análises anatômicas e histoquímicas. O nectário consiste de epiderme unisseriada  
18 recoberta por cutícula contínua e parênquima não vascularizado. No estágio pré-floral o  
19 nectário, mesmo produzindo néctar, apresenta tecidos não diferenciados. Nos estágios floral,  
20 pós-floral e pericarpiais há cutícula espessa, formação de flanges cuticulares e de epitélio  
21 cutícula e a formação de uma faixa de idioblastos. Estas características estão relacionadas à  
22 maturação dos tecidos do nectário que permanecem ativos por um longo período de atividade.  
23 Reportamos pela primeira vez a atividade de secreção do néctar de botões florais com  
24 abscisão prematura da corola antes da abertura das flores, aqui denominado de nectário pré-  
25 floral, o que proporciona informação importante sobre o processo de diferenciação,  
26 mecanismos de liberação do néctar e a influência da estrutura sobre a qualidade do néctar nos  
27 diferentes estágios do nectário.

28  
29  
30  
31  
32  
33 **Palavras Chaves:** estrutura, histoquímica, nectário floral, nectário pós-floral, nectário pré-  
34 floral, nectário pericarpial.

## 1 INTRODUÇÃO

2  
3 Nectários são estruturas secretoras que ocorrem na interface planta-ambiente. A  
4 solução aquosa secretada pelos nectários possuem um elevado conteúdo de açúcares, que são  
5 importante fonte de recursos para várias espécies animais e, portanto, estão diretamente  
6 relacionados à interação planta-animal. Existem diversos sistemas de classificação para os  
7 nectários, cada um considerando diferentes aspectos e perspectivas (Smichd, 1988,  
8 Bernardello, 2007). Entretanto, uma única classificação não abrange a diversidade estrutural,  
9 morfológica e funcional dessas glândulas (veja Bernardello, 2007). A classificação em  
10 reprodutivos e extrareprodutivos considera a localização dos nectários no corpo da planta  
11 (Schmid, 1988), de tal forma que os primeiros ocorrem em qualquer estrutura reprodutiva  
12 (inflorescências, brácteas, pedicelos, flores e frutos) e o segundo ocorre em órgãos  
13 vegetativos. Contudo, percebe-se que os nectários reprodutivos não estão necessariamente  
14 associados ao processo de reprodução das plantas. Por isso, a classificação proposta por  
15 Delpino (1868) considera sua relação com o processo de polinização, sendo os nectários  
16 diretamente relacionados à polinização classificados como nupciais, e aqueles não  
17 relacionados, como extranupciais. Para esta abordagem são necessárias evidências tanto  
18 experimentais, quanto observacionais (Schmid, 1988; Bernardello, 2007).

19 Em algumas espécies de Bromeliaceae, por exemplo, nectários com as funções nupcial  
20 e extranupcial ocorrem na flor (Galletto & Bernardello, 1992; Bennett *et al.*, 1994; Vesprini *et*  
21 *al.*, 2003). Enquanto espécies de Rubiaceae apresentam um mesmo nectário na flor que em  
22 diferentes estágios de atividade desempenha ambas as funções (Del-Claro *et al.*, 2013; Falcão  
23 *et al.*, 2014). O nectário no estágio floral atrai polinizadores enquanto a flor está em antese,  
24 porém, após a queda da corola continua secretando néctar durante o desenvolvimento dos  
25 frutos, estágio no qual o nectário se torna pericarpial, e tem como função a atração de  
26 formigas relacionadas à defesa de órgãos vegetativos e reprodutivos (Del-Claro *et al.*, 2013;  
27 Falcão *et al.*, 2014).

28 *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlechtd.) K. Schum (Rubiaceae) apresenta um  
29 nectário floral com função nupcial, que após a queda da corola desempenha função  
30 extranupcial (Santos & Del-Claro, 2001). Além destes estágios, existe um momento de  
31 atividade do nectário presente nas flores que é anterior à abertura das flores e atrai formigas  
32 para a inflorescência, não estando, portanto, relacionado à polinização. Este estágio se origina  
33 de botões florais em fase inicial de desenvolvimento que perdem a corola prematuramente.

34 A variação estrutural entre os tipos de nectário (Fahn, 1979; Fahn, 2000) e a  
35 caracterização em campo de seus períodos de atividade, bem como, sua relação com os

1 consumidores, frequentemente tem sido objeto de muitos estudos (Bentley, 1977, Nicolson,  
2 2007, Falcão *et al.* 2014, Nunes *et al.* 2015). Entretanto estudos comparativos sobre a  
3 estrutura de nectário com diferentes períodos de atividade são escassos (Stpiczyńska *et al.*,  
4 2012). Assim, para responder se existem alterações na organização da estrutura do nectário  
5 em suas diferentes fases de atividade, o nosso objetivo foi descrever o novo tipo de nectário  
6 observado em *T. formosa*, bem como analisar a estrutura e histoquímica em cada uma das  
7 fases observadas do nectário: pré-floral, floral, pós-floral e pericarpial.

## 9 MATERIAL E MÉTODOS

### 11 Área de estudo e caracterização da espécie

12 O estudo foi realizado durante o período reprodutivo da espécie nos anos de 2015 e  
13 2016 em uma área uma reserva privada de aproximadamente 224 ha (Fazenda “Palmeira da  
14 Serra”; 22° 48’ 50’’ S e 48° 44’ 40’’ O), situada no Município de Pratânia, São Paulo, Brasil.  
15 A vegetação predominante na área é o cerrado *stricto sensu* e o cerrado. O clima é tropical  
16 de altitude com chuvas no verão de até 239.5 mm em janeiro (temperatura média de 29,2 °C)  
17 e um inverno seco com chuvas até 37.5 mm em julho (temperatura média de 10°C)  
18 (CEPAGRI 2016).

19 *Tocoyena formosa* é uma Rubiaceae comum no Cerrado (Ratter *et al.*, 2003), e possui  
20 inflorescências do tipo dicásio de dicásio com flores protândricas com ovário ínfero, e na  
21 parte superior deste encontra-se o nectário rodeando a base do estilete (Delprete & Jardim,  
22 2012). As flores têm uma duração aproximada de quatro dias, sendo a primeira noite a fase  
23 masculina e os dias posteriores até a senescência, a fase feminina (Oliveira *et al.*, 2004). A  
24 espécie tem um porte predominantemente arbustivo, e os indivíduos na fase reprodutiva  
25 variam de entre 0,5m e 3m de altura. A etapa reprodutiva começa no mês de setembro/outubro  
26 com a aparição dos primeiros botões florais, e finaliza por volta de abril/maio com o final do  
27 período de frutificação, que é seguida por uma fase de queda das folhas (Silberbauer-  
28 Gottsberger *et al.*, 1992).

### 30 Análise da estrutura dos nectários

31 Nós analisamos os nectários pré-florais coletados em duas fases: antes e depois da  
32 abscisão da corola. Botões jovens na fase inicial de desenvolvimento podem ser diferenciados  
33 daqueles que darão origem aos nectários pré-florais através da morfologia do cálice, cujas  
34 sépalas encontram-se afastadas da corola (Fig. 1A), ao passo que aqueles botões que se  
35 desenvolverão normalmente em flores, o cálice encontra-se adpresso à corola (Fig. 1B). Nós

1 também analisamos a estrutura do nectário em botões florais normais, bem como em flores  
2 em antese, nectários pós-florais derivados de flores não polinizadas, e em nectários  
3 pericarpiais. Nesses últimos, analisamos o nectário em três fases distintas: frutos na fase  
4 inicial do desenvolvimento (3-4 semanas após a queda da corola, com diâmetros entre 0,5-1,0  
5 cm), na fase intermediária (5-7 semanas após a queda da corola, entre 1,5 e 2,0 cm de  
6 diâmetro), e na fase final de desenvolvimento (8-10 semanas após a queda da corola, frutos  
7 entre 2,5 e 3,0 cm de diâmetro).

8 Para a análise em microscopia de luz, as amostras foram fixadas em solução de  
9 formaldeído 4% e glutaraldeído 1% em tampão fosfato de sódio 0,2M, pH 7,2 (McDowell &  
10 Trump, 1976) ou FAA 50 (Johansen, 1940) por 48 horas, e posteriormente desidratadas em  
11 série etílica e embebidas em resina 2-hidroxi-etil-metacrilato (Leica Microsystems,  
12 Heidelberg, Germany). Seções transversais e longitudinais seriadas (5 µm de espessura)  
13 foram coradas com Azul de Toluidina 0,05%, pH 4,7 (O'Brien *et al.*, 1964) e montadas com  
14 resina sintética (Entellan, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Para a observação da presença  
15 de cristais nos distintos estágios do nectário, nós utilizamos um filtro de luz polarizada no  
16 microscópio de luz (Leica DMR) com câmera acoplada (Leica DFC425). Todas as análises e  
17 fotodocumentação dos espécimes foram realizadas usando microscópio de luz (Olympus  
18 BX41) com câmera acoplada (Olympus C7070).

19 Para análise histoquímica dos diferentes estágios do nectário utilizamos material  
20 fresco. Seções do material foram fixadas, embebidas em resina e tratadas com solução de  
21 vermelho de rutênio 0,02% (Jensen, 1962) para substâncias pécnicas. Também utilizamos  
22 reagente de Lugol para grãos de amido (Johansen, 1940), Fehling para açúcares redutores  
23 (Sass, 1951), Sudan IV para detecção de lipídios totais (Johansen, 1940), reagente de Nadi  
24 para óleos essenciais e oleoresinas (David & Carde, 1964), solução aquosa de cloreto férrico  
25 10% para compostos fenólicos gerais (Johansen, 1940), e solução de azul mercúrio de  
26 bromofenol para a detecção de proteínas totais (Mazia *et al.*, 1953). Para análise do conteúdo  
27 das células de agrupamento ou faixa de idioblastos localizados na periferia do nectário  
28 utilizamos reagente de Dragendorff para a detecção de alcaloides (Baerheim-Svendsen &  
29 Verpoorte, 1983). Para taninos utilizamos vanilina clorídrica (Mace & Howell, 1974). Após  
30 cada tratamento, as lâminas foram montadas solução aquosa de glicerina 1:1.

31  
32  
33  
34

## 1 **RESULTADOS**

### 3 **Estrutura dos estágios do nectário**

4 O disco nectarífero está localizado na porção superior do ovário rodeando a base do  
5 estilete e apresenta-se recoberto por secreção em nas fases floral, pós-floral e durante o  
6 desenvolvimento do fruto. O disco nectarífero consiste de uma cutícula contínua que recobre  
7 uma epiderme unisseriada, abaixo da qual há um parênquima não vascularizado. Cada estágio  
8 do nectário possui peculiaridades estruturais que são descritas a seguir.

9 *Nectário pré-floral nas fases anterior e posterior à queda da corola:* no nectário pré-  
10 floral na fase anterior à queda da corola é possível observar que o ápice das sépalas encontra-  
11 se afastado das pétalas (Fig. 2A). Em ambas as fases a epiderme unisseriada do nectário é  
12 recoberta por uma cutícula delgada (Fig. 2B). As células comuns são retangulares e  
13 apresentam citoplasma denso com núcleo volumoso, ocupando a porção central (Fig. 2B).  
14 Não foram observados estômatos. As células parenquimáticas apresentam formato  
15 isodiamétrico com disposição compacta, e o citoplasma é denso com o núcleo volumoso (Fig.  
16 2B). No parênquima ocorrem células com cristais de oxalato de cálcio pequenos e esparsos  
17 (Fig. 2C). Observamos que feixes vasculares, possivelmente oriundos dos feixes das pétalas  
18 ou estames, contendo predominantemente floema alcançam a periferia do nectário (Fig. 2D).

19 Após a abscisão da corola, o nectário está exposto e recoberto por secreção (Fig. 1C e  
20 D). Diferentemente do estágio anterior, as células epidérmicas e parenquimáticas são maiores  
21 e possuem vacúolos volumosos (Fig. 2E e F). As células epidérmicas apresentam paredes  
22 primárias delgadas recobertas por uma cutícula mais espessa (Fig. 2G), quando comparada  
23 com a fase anterior à queda da corola.

24 *Nectário floral em botão normal e de flores em antese:* no botão floral com  
25 desenvolvimento normal, o ápice das sépalas encontra-se adpresso às pétalas (Fig. 1A e C;  
26 3A). A estrutura do nectário é muito semelhante ao estágio pré-floral antes da abscisão da  
27 corola. Na epiderme, além das células comuns com paredes delgadas, foram observadas  
28 células-guarda (Fig. 3B). Agrupamentos de idioblastos com citoplasma denso, núcleo  
29 volumoso e conteúdo esverdeado, corado com Azul de Toluidina, foram observados  
30 adjacentes aos feixes vasculares que alcançam a periferia do nectário (Fig. 3A e D).

31 Durante o período da antese o nectário permanece recoberto por néctar. A cutícula é  
32 espessa e insinua-se entre as paredes anticlinais das células epidérmicas formando flanges  
33 (Fig. 4A e B). As células comuns da epiderme apresentam paredes mais espessas, quando  
34 comparadas com os estágios anteriores e ocorrem projeções da parede periclinal externa em  
35 direção à cutícula. Nessa fase foram observados estômatos com maior frequência. Nas regiões

1 das câmaras subestomáticas ocorreu formação de cutícula nas células subepidérmicas,  
2 formando um epitélio cuticular (Fig. 4C). As células parenquimáticas apresentaram paredes  
3 delgadas com disposição compacta, onde é possível observar divisões periclinais e anticlinais  
4 (Fig. 4A e B). Células numerosas contendo drusas ocorrem associadas aos feixes vasculares  
5 que circundam o parênquima nectarífero (Fig. 4A).

6 *Nectário pós-floral:* após a queda da corola de flores não polinizadas, os ovários  
7 permaneciam aderidos à planta por um período de pelo menos oito semanas, durante o qual o  
8 nectário com função pós-floral extranupcial seguia ativo e secretando néctar (Fig. 1E). Esse  
9 nectário apresentou características semelhantes ao nectário da flor em antese (Fig. 5A). Nesta  
10 fase, porém, destaca-se a ocorrência de uma cutícula espessa, bem como a formação de duas  
11 camadas de epitélio cuticular (Fig. 5B). Também ocorreram células epidérmicas com paredes  
12 espessas com projeções das periclinais externas em direção à cutícula, e com acúmulos de  
13 secreção na câmara subestomática (Fig. 5A, C e D). As células parenquimáticas  
14 subepidérmicas apresentaram disposição frouxa (Fig. 5A e C), e houve um aumento na  
15 abundância de drusas no parênquima nectarífero. Em particular, observamos a presença de  
16 uma faixa de idioblastos com vacúolos grandes e repletos de conteúdo esverdeado, resultante  
17 da coloração por Azul de Toluidina, e localizada no entorno do parênquima nectarífero  
18 acompanhando os feixes vasculares (Fig. 5A e E).

19 *Nectário pericarpial inicial, intermediário e final:* em flores efetivamente polinizadas,  
20 o nectário permaneceu intacto e funcional durante o desenvolvimento do fruto (Fig. 1E). Nas  
21 três fases de desenvolvimento dos frutos, o nectário apresenta uma estrutura semelhante ao  
22 estágio pós-floral (Fig. 6A). Durante o desenvolvimento do fruto, foi observado um  
23 afrouxamento gradual na distribuição das células do parênquima nectarífero. Essas células  
24 possuíam paredes primárias mais espessas, com diminuição no tamanho e na abundância das  
25 drusas, bem como a presença de grandes inclusões translúcidas no protoplasto (Fig. 6B). Já na  
26 faixa de idioblastos, os centrais apresentaram diminuição do tamanho, tornando-se mais  
27 abundantes (Fig. 6C).

### 29 **Análises histoquímica dos estágios do nectário**

30 A epiderme, que é recoberta por uma cutícula contínua em todos os estágios dos  
31 nectários, foi destacada com a reação para lipídios totais (Tabela 1). No nectário da flor em  
32 antese, na fase pós-floral e em todas as fases do pericarpial, além da cutícula recobrindo as  
33 células epidérmicas, observamos uma ou duas camadas de células parenquimáticas  
34 subepidérmicas recobertas por cutícula. O epitélio cuticular foi evidenciado pela reação com  
35 SUDAN IV (Fig. 4C) e pelo reagente de NADI (Fig. 5B). As paredes das células epidérmicas

1 e parenquimáticas do nectário nos diferentes estágios reagiram para substâncias pécticas,  
2 indicando que são paredes primárias de natureza pécto-celulósica (Tabela 1).

3 Lipídios totais ocorreram no protoplasto das células epiteliais e parenquimáticas dos  
4 diferentes estágios do nectário (Tabela 1). No estágio pré-floral anterior à abscisão da corola  
5 ocorreram gotículas lipídicas esparsas, e na fase posterior a queda da corola, as gotas  
6 apresentaram dimensões maiores, especialmente no epitélio. No estágio floral antes da antese,  
7 ocorreram gotículas lipídicas localizadas na periferia do protoplasto das células epiteliais e  
8 parenquimáticas (Fig. 3C). Durante a antese e no estágio pós-floral, as gotas lipídicas  
9 apresentaram dimensões maiores e foram mais abundantes. As gotas lipídicas tornaram-se  
10 gradualmente mais esparsas durante o desenvolvimento do fruto.

11 A detecção de essências ou uma mistura de óleos essenciais e oleoresinas ocorreu no  
12 protoplasto das células epiteliais e parenquimáticas dos diferentes estágios do nectário, exceto  
13 no estágio pré-floral com corola (Tabela 1). No estágio pré-floral após a queda da corola,  
14 gotas esparsas exibiram coloração violeta após o tratamento com Reagente de NADI,  
15 indicando a presença de uma mistura de óleos essenciais e oleoresinas. No estágio floral antes  
16 da antese, numerosas gotículas foram coradas de azul após o tratamento com Reagente de  
17 NADI, o que indica a presença de essências. No estágio floral em antese, gotas esparsas  
18 reagiram para uma mistura de óleos essenciais e oleoresinas nas células epidérmicas. No  
19 estágio pós-floral, gotas numerosas reagiram para óleos essenciais e oleoresinas nas células  
20 epiteliais. Durante a diferenciação do fruto, gotas esparsas e inclusões no espaço  
21 periplasmático de células epidérmicas e parenquimáticas reagiram para óleos essenciais e  
22 oleoresinas.

23 Grãos de amido numerosos ocorreram distribuídos nas células epidérmicas e ao longo  
24 das camadas do parênquima no nectário dos botões com morfologia diferenciada do cálice.  
25 Após a queda do cálice, a abundância de grãos de amido diminui gradativamente em direção à  
26 epiderme (Tabela 1). No estágio de nectário floral antes da antese, grãos de amido ocorrem  
27 nas porções mais periféricas do parênquima nectarífero. Após a antese, não foram detectados  
28 grãos de amido nos tecidos do nectário e o protoplasto das células epidérmicas e  
29 parenquimáticas reagiu intensamente para açúcares redutores após o tratamento com Fehling  
30 (Tabela 1). No estágio pós-floral, a ocorrência de grãos de amido no parênquima foi escassa.  
31 Durante o desenvolvimento do fruto, houve uma gradual diminuição no tamanho e  
32 abundância dos grãos de amido. O vacúolo de células epidérmicas e parenquimáticas esparsas  
33 reagiu para compostos fenólicos no estágio de nectário pericarpial final (Tabela 1).

34 Além da análise histoquímica do nectário, buscamos verificar a natureza química do  
35 conteúdo dos idioblastos que formam um agrupamento ou uma faixa delimitando o

1 parênquima nectarífero nos diferentes estágios. O conteúdo destas células não reagiu para os  
2 tratamentos citados na Tabela 1. Adicionalmente, verificamos que o conteúdo destas células  
3 não equivale a alcalóides (Reagente de Dragendorff) ou taninos (vanilina clorídrica).

#### 4 **DISCUSSÃO**

5  
6 O disco nectarífero presente nas flores de *Tocoyena formosa* apresenta-se recoberto  
7 por secreção nos diferentes estágios florais e permanece intacto e funcional durante o  
8 desenvolvimento do fruto. A continuidade da atividade do nectário após a queda da corola é  
9 reportado para outras espécies de Rubiaceae (Santos & Del-Claro, 2001; Amorim & Oliveira  
10 2006, Del-Claro *et al.*, 2013; Falcão *et al.*, 2014). Esta continuidade da secreção no fruto pode  
11 representar uma economia energética com relação à produção de estruturas (*e.g.* novos  
12 nectários, esclerificação, idioblastos) envolvidas na proteção contra a predação de sementes  
13 (Keeler, 1981; Falcão *et al.*, 2014) ou a herbivoria foliar (Del-Claro *et al.*, 2013).

14 A atividade do nectário em botões florais com abscisão prematura da corola em *T.*  
15 *formosa* é reportada pela primeira vez neste estudo e, por conta de sua atividade anterior a  
16 abertura das flores, nós o denominamos de nectário pré-floral, que estão diretamente  
17 relacionados com a atração de formigas antes do desenvolvimento dos primeiros nectários  
18 pós-florais e pericarpiais. *Tocoyena formosa* é uma espécie caducifólia, e logo após a rebrota  
19 das primeiras folhas formam-se as gemas reprodutivas. A atividade do nectário pré-floral é  
20 concomitante à expansão e produção de novas folhas e flores, um período vulnerável da  
21 planta já que quando as estruturas reprodutivas e vegetativas estão tenras são especialmente  
22 atacadas por herbívoros.

23 Encontramos peculiaridades estruturais nos distintos estágios de atividade do nectário  
24 que podem influenciar na qualidade e volume de secreção liberada. O nectário pré-floral sem  
25 corola, quando há secreção em sua superfície, compartilha características com os estágios  
26 ainda não completamente diferenciados localizados no botão floral (pré-floral com corola e  
27 floral antes da antese), tais como: células epidérmicas e parenquimáticas com paredes  
28 delgadas, cutícula delgada, ausência de epitélio cuticular, idioblastos drusíferos esparsos com  
29 cristais de pequenas dimensões e ausência de faixa de idioblastos delimitando o parênquima  
30 nectarífero. As características juvenis dos tecidos que formam e rodeiam o nectário pré-floral  
31 de *T. formosa* nos fazem supor que o néctar assemelhe-se à seiva floemática, enquanto nos  
32 demais estágios (os quais possuem estrutura mais diferenciada), a composição do néctar deve  
33 ser menos semelhante. Na seiva floemática de *Ricinus comunis* (Euphorbiaceae), por  
34 exemplo, a sacarose é o único açúcar, enquanto, o néctar dos nectários extraflorais contém  
35 grande quantidade de frutose e glicose (Baker *et al.* 1978). Desse modo, é plausível supor que

1 sacarose ou frutose mais glicose devem predominar no exsudato produzido pelo nectário no  
2 estágio pré-floral e nos demais estágios, respectivamente.

3 O mecanismo de liberação do néctar parece ser distinto entre o estágio pré-floral e os  
4 demais em *T. formosa*. Nos estágios floral, pós-floral e pericarpiais encontramos estômatos e  
5 acúmulos de secreção na câmara subestomática. No entanto, não encontramos células-guarda  
6 na epiderme do nectário no estágio pré-floral, e algumas células comuns apresentam formato  
7 tortuoso e conteúdo pouco definido. Nos nectários das sépalas em duas espécies de  
8 *Helleborus* (Ranunculaceae) a liberação do néctar ocorre por lise das células epidérmicas  
9 (Vesprini *et al.* 1999), este pode ser o caso do nectário pré-floral em *T. formosa*.

10 No estágio de flor em antese, adicionalmente ao espessamento da cutícula, há  
11 deposição de material cuticular na região da câmara subestomática, e nos estágios pós-floral e  
12 pericarpiais ocorrem a deposição de material cuticular ao longo de em uma ou duas camadas  
13 de células subepidérmicas. Em ambas as situações, caracterizando o epitélio cuticular. Tal  
14 epitélio cuticular é um tecido protetor (Evert 2006), que geralmente se forma em órgãos mais  
15 velhos e que não apresentam crescimento secundário com formação de periderme (Calvin  
16 1970).

17 Durante o desenvolvimento da flor e do fruto, o nectário de *T. formosa* (que está  
18 presente desde as fases iniciais de botão floral) aumenta em tamanho para acompanhar o  
19 crescimento do órgão. Esta característica pode culminar na formação dos flanges cuticulares  
20 na epiderme do nectário a partir do estágio de flor em antese. No estágio floral observamos  
21 divisões periclinais e anticlinais nas células parenquimáticas, que contribuem para o aumento  
22 em volume da glândula. As células epidérmicas devem se dividir anticlinalmente para recobrir  
23 a circunferência do nectário. As células se estendem tangencialmente após a divisão e  
24 produzem uma nova parede. Já a parede original distende assumindo um formato arredondado  
25 ou se separando das paredes adjacentes. Em seguida, nessas porções “rasgadas” das paredes  
26 anticlinais ocorre a deposição de material cuticular formando a flange cuticular (veja Calvin  
27 1970).

28 As paredes das células epidérmicas e subepidérmicas apresentam alterações nos  
29 diferentes estágios do nectário de *T. formosa*. Especialmente nos estágios pós-floral e  
30 pericarpial inicial as paredes periclinais externas tornam-se espessas e apresentam projeções  
31 entre as paredes anticlinais e em direção da cutícula, indicando a atuação destas células na  
32 transferência de solutos a curtas distâncias. Além dos estômatos, nesses estágios do nectário  
33 de *T. formosa* essas células com projeções parecem participar da externalização do néctar.  
34 Nos nectários perigoniais, *i.e.*, nectários que se encontram nas pétalas, sépalas ou tepalas das  
35 flores de *Fritillaria meleagris* (Liliaceae), as células de transferência na epiderme e

1 parênquima subepidérmico apresentam projeções proeminentes em suas paredes periclinais.  
2 Tais projeções são responsáveis pela exportação (uma vez que estes nectários não apresentam  
3 estômatos) e pela da reabsorção do néctar (Stpiczyńska *et al.*, 2012). A presença de células  
4 com projeções epidérmicas e subepidérmicas indica a ocorrência de reabsorção do néctar em  
5 *T. formosa* durante os estágios pós-floral e pericarpial. Entretanto, apenas estudos sobre  
6 dinâmica da secreção (abordados no Capítulo II) podem elucidar esse padrão.

7 Cristais de oxalato apresentam um importante papel de proteção contra herbívoros  
8 (Franceschi & Nakata, 2005). Desse modo, o aumento de drusas no parênquima nectarífero e  
9 em outros tecidos do ovário durante o desenvolvimento da flor e fruto de *T. formosa* pode  
10 atuar como uma barreira mecânica contra o dano provocado por herbívoros nos óvulos e nas  
11 sementes, além de contribuir para que o nectário não seja consumido e continue secretando  
12 néctar.

13 A predominância de floema nos feixes vasculares que alcançam a periferia do  
14 parênquima nectarífero em *T. formosa* pode favorecer diretamente a qualidade da secreção,  
15 contribuindo para a maior concentração do néctar (Bernardello, 2007). Agrupamentos de  
16 idioblastos na periferia do parênquima nectarífero no estágio floral antes da antese originam  
17 uma faixa de idioblastos que delimita o nectário nos estágios subsequentes em *T. formosa*. Há  
18 registro de zona de tecido taninífero abaixo do tecido secretor no nectário de *Hiptagesericea*  
19 (Malphigiaceae – Subramanian *et al.*, 1990) e idioblastos taniníferos subjacentes à epiderme  
20 de elaióforos em *Krameriatriandra* (Krameriaceae – Vogel, 1974). A presença destas células  
21 tem sido associada à defesa do nectário contra herbívoros. Em *T. formosa* essa faixa de  
22 células não reagiu aos tratamentos histoquímicos aplicados, incluindo para detecção de  
23 compostos fenólicos gerais, taninos e alcalóides. Embora não tenhamos determinado o  
24 conteúdo vacuolar destes idioblastos, sugerimos que eles estejam associados ao fluxo ou  
25 efluxo do pré-néctar. A origem do néctar secretado é da seiva floemática (Fahn 1979, 2000),  
26 embora, em algumas espécies, o parênquima clorofiliano do próprio nectário possa contribuir  
27 com a produção de açúcares (Pacini *et al.* 2003). Os fatores que regem o fluxo preferencial do  
28 pré-néctar em direção às células secretoras ainda não estão claros (Fahn 2000). Porém, nós  
29 sugerimos que o conteúdo desses idioblastos deve alterar o potencial hídrico dessas células, e  
30 dessa forma favorecer a remoção do pré-néctar das células do floema. Conseqüentemente, por  
31 diferença no gradiente de concentração, o fluido perpassa para o parênquima nectarífero.  
32 Outra possibilidade é de que essa faixa atue como uma barreira para o efluxo do néctar.  
33 Vacúolos repletos de conteúdo aumentam a turgescência celular, diminuindo os espaços  
34 intercelulares. Desse modo, embora as paredes sejam primárias e permeáveis nestas células, o

1 possível efluxo do néctar via apoplasto seria dificultado. Estudos ultraestruturais seriam  
2 essenciais para o refinamento destas proposições.

3 No tecido nectarífero o pré-néctar é reabsorvido e modificado por atividade enzimática  
4 ou pelo processo de reabsorção (Fahn 2000). A presença de cutícula espessa, epitélio cuticular  
5 e faixa de idioblastos nos estágios floral, pós-floral e pericarpiais em *T. formosa* nos permite  
6 supor que o pré-néctar permanece por mais tempo nos tecidos parenquimáticos, portanto,  
7 tendo a possibilidade de ser mais alterado. Enquanto no estágio pré-floral, o pré-néctar  
8 proveniente da seiva floemática encontra menos barreiras para alcançar a superfície,  
9 suportando nossa hipótese da similaridade do néctar com a seiva floemática neste período de  
10 atividade do nectário.

11 A detecção de lipídios totais, óleos essenciais e oleoresinas nas células epidérmicas e  
12 parenquimáticas dos diferentes estágios do nectário em *T. formosa* indica que o néctar é  
13 composto por outras substâncias além de açúcares. Mucilagem, proteínas, aminoácidos,  
14 lipídios, alcalóides, entre outras substâncias foram reportados no néctar de diferentes espécies  
15 (Fahn 1979, 2000), e podem ter papel importante na interação planta-animal (Pacini *et al.*  
16 2003).

17 Os grãos de amido acumulados durante a fase de botão floral no parênquima e  
18 epiderme do nectário em *T. formosa* são hidrolisados e participam do néctar liberado.  
19 Entretanto, este é um recurso finito (Pacini *et al.* 2003). Notamos a depleção dos estoques de  
20 amido no estágio pré-floral sem corola, da flor em antese e pericarpiais, mas o nectário  
21 permanece recoberto por secreção por um longo período (aproximadamente 100 dias). Se os  
22 grãos de amido depositados no nectário são a principal fonte dos açúcares do néctar, é de se  
23 esperar que o néctar torne-se gradativamente menos concentrado nos estágios pós-floral e  
24 pericarpiais. Entretanto, se houver incremento de açúcares (via floema, fotossíntese no  
25 parênquima nectarífero ou reabsorção de néctar) deve haver a manutenção na concentração do  
26 néctar nos diferentes períodos de atividade. Estudos sobre dinâmica de secreção e de  
27 qualidade do néctar também são essenciais para elucidar esse aspecto.

28 A causa da queda prematura da corola de botões florais com morfologia diferenciada  
29 do cálice e, conseqüente atividade do nectário pré-floral merece estudos mais aprofundados.  
30 Uma possível causa da queda da corola seria o funcionamento inadequado ou número  
31 insuficiente dos coléteres presentes na face adaxial das sépalas de alguns botões florais em *T.*  
32 *formosa*. O exudato dos coléteres (mucilagem, resina ou uma mistura de ambos) pode  
33 proteger os meristemas das plantas contra desidratação (Mayer *et al.*, 2013). Plantas  
34 decafeinadas de café (Rubiaceae) não produzem alcalóides e apresentam abertura precoce de  
35 suas flores em decorrência da produção insuficiente de exudato pelos coléteres localizados

1 nas brácteas (Mayer *et al.*, 2013). Os coléteres nas estípulas de *T. formosa* produzem  
2 diferentes substâncias, como mucilagem, lipídios, alcalóides, substâncias fenólicas e proteínas  
3 (Tresmondi *et al.*, 2015). Dessa maneira, a alteração na qualidade da secreção poderia  
4 influenciar na queda da corola.

5 Outro fator relacionado à queda prematura da corola de alguns botões pode ser a  
6 seleção de flores na inflorescência. A inflorescência de *T. formosa* é congesta e as flores  
7 abertas são grandes (entre 6-15 cm de comprimento), portanto, há uma limitação espacial que  
8 poderia resultar na seleção de flores durante o desenvolvimento da inflorescência. Além disso,  
9 *T. formosa* possui inflorescência do tipo dicásio, portanto definida. As flores centrais são mais  
10 velhas e parecem apresentar desenvolvimento normal, enquanto os botões florais periféricos  
11 parecem senescer precocemente culminando na atividade pré-floral do nectário. Assim a  
12 posição das flores dentro da inflorescência também pode determinar a seleção.

13 Os distintos períodos de atividade do nectário reprodutivo em *T. formosa* o tornam  
14 uma estrutura secretora multivalente e sem dúvidas um modelo a ser compreendido em  
15 aspectos ultraestruturais, químicos e ecológicos. Nosso estudo estrutural detalhado elucidou  
16 aspectos importantes sobre o processo de diferenciação, mecanismos de liberação do néctar e  
17 a influência da estrutura sobre a qualidade do néctar nos diferentes estágios do nectário.

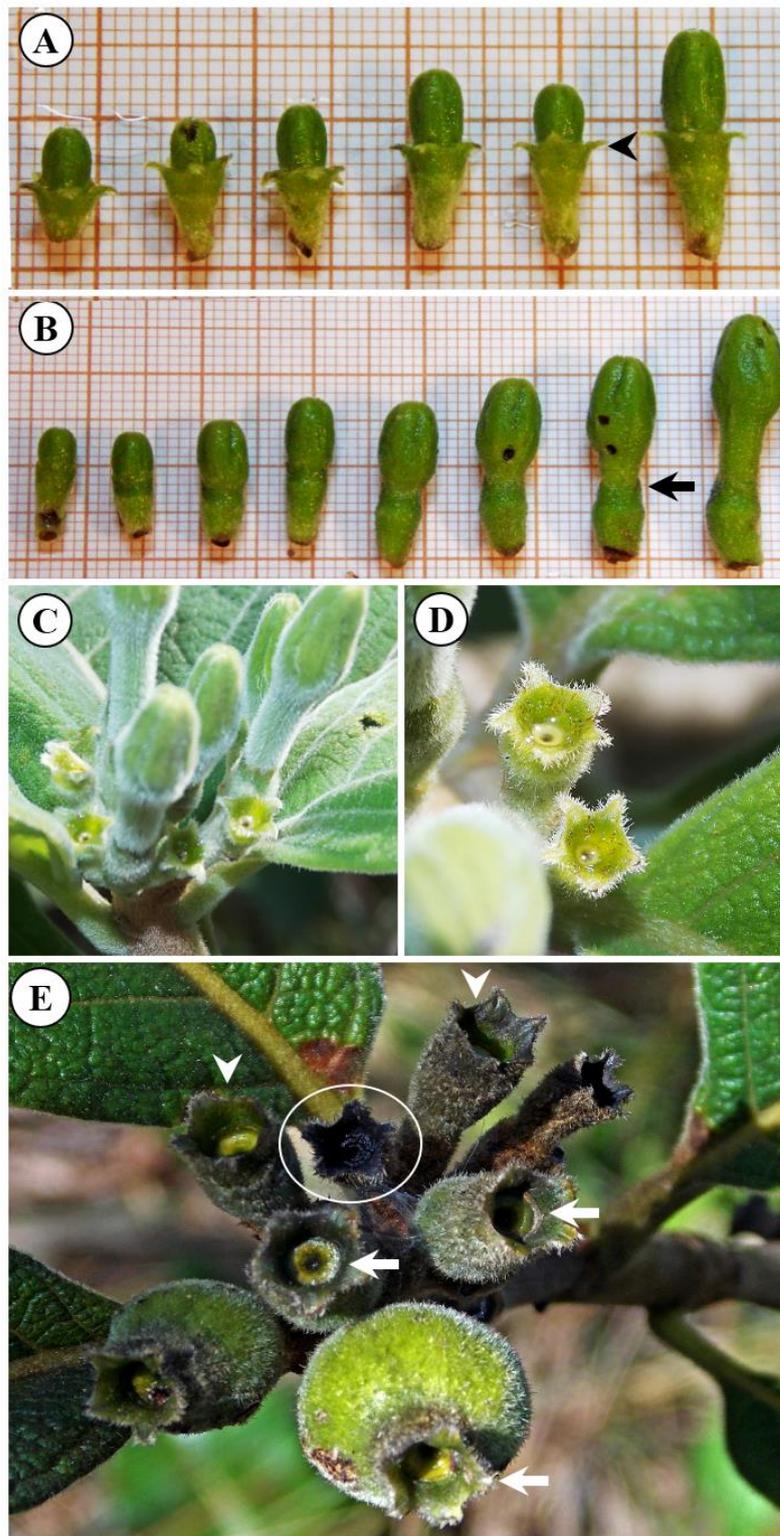
18

## 1 REFERÊNCIAS

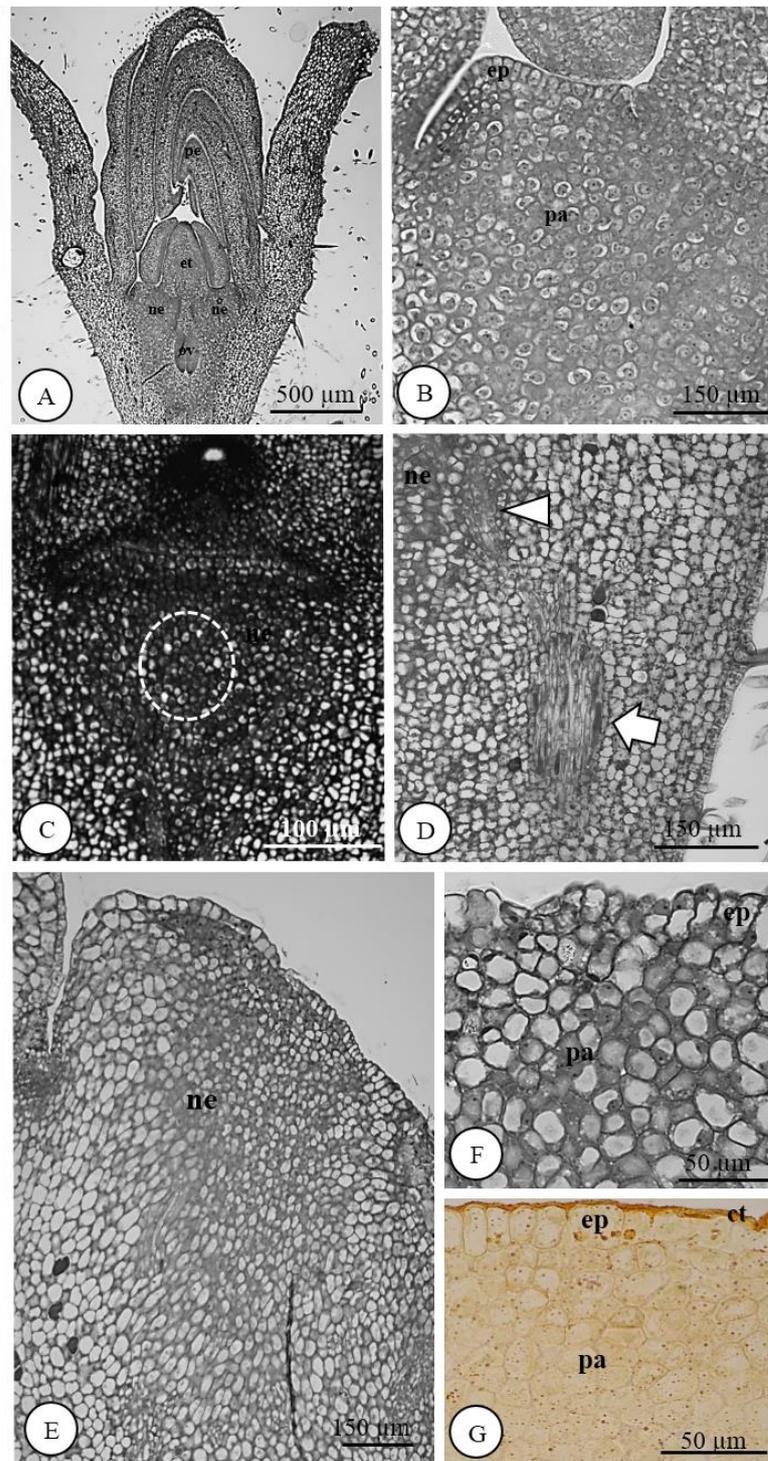
- 2
- 3 Amorim, F.W., Oliveira, P.E. (2006) Estrutura sexual e ecologia reprodutiva de *Amaioua*  
4 *guianensis* Aubl. (Rubiaceae), uma espécie dióica de formações florestais de cerrado.  
5 *Revista Brasileira de Botânica*, **29**(3), 353-362.
- 6 Amorim, F., Galetto, L., Sazima, M. (2013) Beyond the pollination syndrome: nectar ecology  
7 and the role of diurnal and nocturnal pollinators in the reproductive success of *Inga*  
8 *sessilis* (Fabaceae). *Plant Biology*, **15**(2), 317-327.
- 9 Baerheim-Svendsen, A., Verpoorte, R. (1983) *Chromatography of alkaloids* Elsevier  
10 Scientific Publishing Company, New York.
- 11 Baker, D.A., Hall, J.L., Thorpe, J.R. (1978) A study of the extrafloral nectaries of *ricinus*  
12 *communis*. *New Phytologist*, **81**(1), 129-137.
- 13 Bennett, A.T.D., Cuthill, I.C., Norris, K.J. (1994) Sexual Selection and the Mismeasure of  
14 Color. *The American Naturalist*, **144**(5), 848-860.
- 15 Bernardello, G. (2007) A systematic survey of floral nectaries. In *Nectaries and nectar*,  
16 Springer Netherlands, Springer: pp 19-128.
- 17 Castro Miguel, E., Gomes, V.M., De Oliveira, M., Da Cunha, M. (2006) Colleters in *Bathysa*  
18 *nicholsonii* K. Schum.(Rubiaceae): ultrastructure, secretion protein composition, and  
19 antifungal activity. *Plant Biology*, **8**(05), 715-722.
- 20 Calvin, C.L. (1970) Anatomy of the Aerial Epidermis of the Mistletoe, *Phoradendron*  
21 *flavescens*. *Botanical Gazette*, **131**(1), 62-74.
- 22 CEPAGRI, Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura.  
23 2015.Clima dos Municípios Paulistas. Disponível em  
24 <http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-dos-municipios-paulistas.html>  
25 Acesso julho 2016)
- 26 David, R., Carde, J. (1964) Histochemie-coloration differentielle des inclusions lipidiques et  
27 terpeniques des pseudophylles du pin maritime au moyen du reactif NADI. *Comptes*  
28 *rendus hebdomadaires des seances de l'academie des sciences*, **258**(4), 1338-&.
- 29 Del-Claro, K., Guillermo-Ferreira, R., Zardini, H., Almeida, E.M., Torezan-Silingardi, H.M.  
30 (2013) Ants visiting the post-floral secretions of pericarpial nectaries in *Palicourea*  
31 *rigida* (Rubiaceae) provide protection against leaf herbivores but not against seed  
32 parasites. *Sociobiology*, **60**(3), 217-221.
- 33 Delprete, P.G., Jardim, J.G. (2012) Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian  
34 Rubiaceae: an overview about the current status and future challenges. *Rodriguésia*,  
35 **63**(1), 101-128.
- 36 Evert, R.F. (2006) *Esau's plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their*  
37 *structure, function, and development* John Wiley & Sons.
- 38 Fahn, A. (1979) *Secretory tissues in plants*, London: Academic Press.
- 39 Fahn, A. (2000) Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research*,  
40 **31**, 37-75.
- 41 Falcão, J., Dáttilo, W., Izzo, T. (2014) Temporal variation in extrafloral nectar secretion in  
42 different ontogenic stages of the fruits of *Alibertia verrucosa* S. Moore (Rubiaceae) in  
43 a Neotropical savanna. *Journal of Plant Interactions*, **9**(1), 137-142.
- 44 Franceschi, V.R., Nakata, P.A. (2005) Calcium Oxalate in plants: Formation and Function.  
45 *Annual Review of Plant Biology*, **56**(1), 41-71.
- 46 Galetto, L., Bernardello, L.M. (1992) Extrafloral nectaries that attract ants in Bromeliaceae:  
47 structure and nectar composition. *Canadian Journal of Botany*, **70**(6), 1101-1106.
- 48 Jensen, W.A.W.A. (1962) *Botanical histochemistry: principles and practice*.
- 49 Johansen, D.A. (1940) *Plant microtechnique. Plant microtechnique*.
- 50 Keeler, K.H. (1981) Function of *Mentzelia nuda* (Loasaceae) postfloral nectaries in seed  
51 defense. *American journal of botany*, 295-299.

- 1 Mace, M., Howell, C. (1974) *Histochemistry and identification of condensed tannin precursors*  
2 *in roots of cotton seedlings* Can. J. Bot: pp.2423:2426.
- 3 Mayer, J.L.S., Carmello-Guerreiro, S.M., Mazzafera, P. (2013) A functional role for the  
4 collectors of coffee flowers. *AoB plants*, **5**.
- 5 Mazia, D., Brewer, P.A., Alfert, M. (1953) The cytochemical staining and measurement of  
6 protein with mercuric bromphenol blue. *Biological Bulletin*, **104**(1), 57-67.
- 7 McDowell, E., Trump, B. (1976) Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron  
8 microscopy. *Archives of pathology & laboratory medicine*, **100**(8), 405-414.
- 9 Nepi, M. (2007) Nectary structure and ultrastructure. In *Nectaries and nectar*, Springer  
10 Netherlands, Springer: pp 129-166.
- 11 Nicolson, S.W. (2007) Nectar consumers. In *Nectaries and Nectar* (S.W. Nicolson, M. Nepi &  
12 E. Pacini, eds), Springer Netherlands, Dordrecht: pp 289-342.
- 13 Nunes, C.E.P., Amorim, F.W., Mayer, J.L.S., Sazima, M. (2016) Pollination ecology of two  
14 species of *Elleanthus* (Orchidaceae): novel mechanisms and underlying adaptations to  
15 hummingbird pollination. *Plant Biology*, **18**(1), 15-25.
- 16 O'Brien, T.P., Feder, N., McCully, M.E. (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by  
17 toluidine blue O. *Protoplasma*, **59**(2), 368-373.
- 18 Oliveira, P.E., Gibbs, P.E., Barbosa, A.A. (2004) Moth pollination of woody species in the  
19 Cerrados of Central Brazil: a case of so much owed to so few? *Plant Systematics and*  
20 *Evolution*, **245**(1-2), 41-54.
- 21 Pacini, E., Nepi, M., Vesprini, L.J. (2003) Nectar biodiversity: a short review. *Plant*  
22 *Systematics and Evolution*, **238**(1), 7-21.
- 23 Ratter, J., Bridgewater, S., Ribeiro, J. (2003) Analysis of the floristic composition of the  
24 Brazilian cerrado vegetation III: comparison of the woody vegetation of 376 areas.  
25 *Edinburgh Journal of Botany*, **60**(01), 57-109.
- 26 Santos, J.C., Del-Claro, K. (2001) Interactions between ants, herbivores and extrafloral  
27 nectaries in *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum.(Rubiaceae) in  
28 Cerrado. *Revista Brasileira de Zoociências*, **3**(1), 35-44.
- 29 Sass, J.E. (1951) *Botanical microtechnique* Iowa State College Press, Ames, IA, USA.
- 30 Schmid, R. (1988) Reproductive versus extra-reproductive nectaries—historical perspective  
31 and terminological recommendations. *The Botanical Review*, **54**(2), 179-227.
- 32 Silberbauer-Gottsberger, I., Gottsberger, G., Ehrendorfer, F. (1992) Hybrid speciation and  
33 radiation in the neotropical woody genus *Tocoyena* (Rubiaceae). *Plant Systematics and*  
34 *Evolution*, **181**(3-4), 143-169.
- 35 Stpiczyńska, M., Nepi, M., Zych, M. (2012) Secretion and composition of nectar and the  
36 structure of perigonal nectaries in *Fritillaria meleagris* L. (Liliaceae). *Plant*  
37 *Systematics and Evolution*, **298**(5), 997-1013.
- 38 Subramanian, R.B., Arumugasamy, K., Inamdar, J.A. (1990) Studies in the secretory glands  
39 of *Hiptage sericea* (Malpighiaceae). *Nordic Journal of Botany*, **10**(1), 57-62.
- 40 Thomas, V. (1991) Structural, Functional and Phylogenetic Aspects of the Colleter. *Annals of*  
41 *Botany*, **68**(4), 287-305.
- 42 Tresmondi, F., Nogueira, A., Guimarães, E., Machado, S.R. (2015) Morphology, secretion  
43 composition, and ecological aspects of stipular collectors in Rubiaceae species from  
44 tropical forest and savanna. *The Science of Nature*, **102**(11), 1-15.
- 45 Vesprini, J.L., Nepi, M., Pacini, E. (1999) Nectary Structure, Nectar Secretion Patterns and  
46 Nectar Composition in Two *Helleborus* Species. *Plant biol (Stuttg)*, **1**(05), 560-568.
- 47 Vesprini, J.L., Galetto, L., Bernardello, G. (2003) The beneficial effect of ants on the  
48 reproductive success of *Dyckia floribunda* (Bromeliaceae), an extrafloral nectary  
49 plant. *Canadian Journal of Botany*, **81**(1), 24-27.
- 50 Vogel, S. (1974) Ölblumen und olsammelnde Bienen. *Trop. Subtrop. Pflwelt*, **7**, 1-267.
- 51

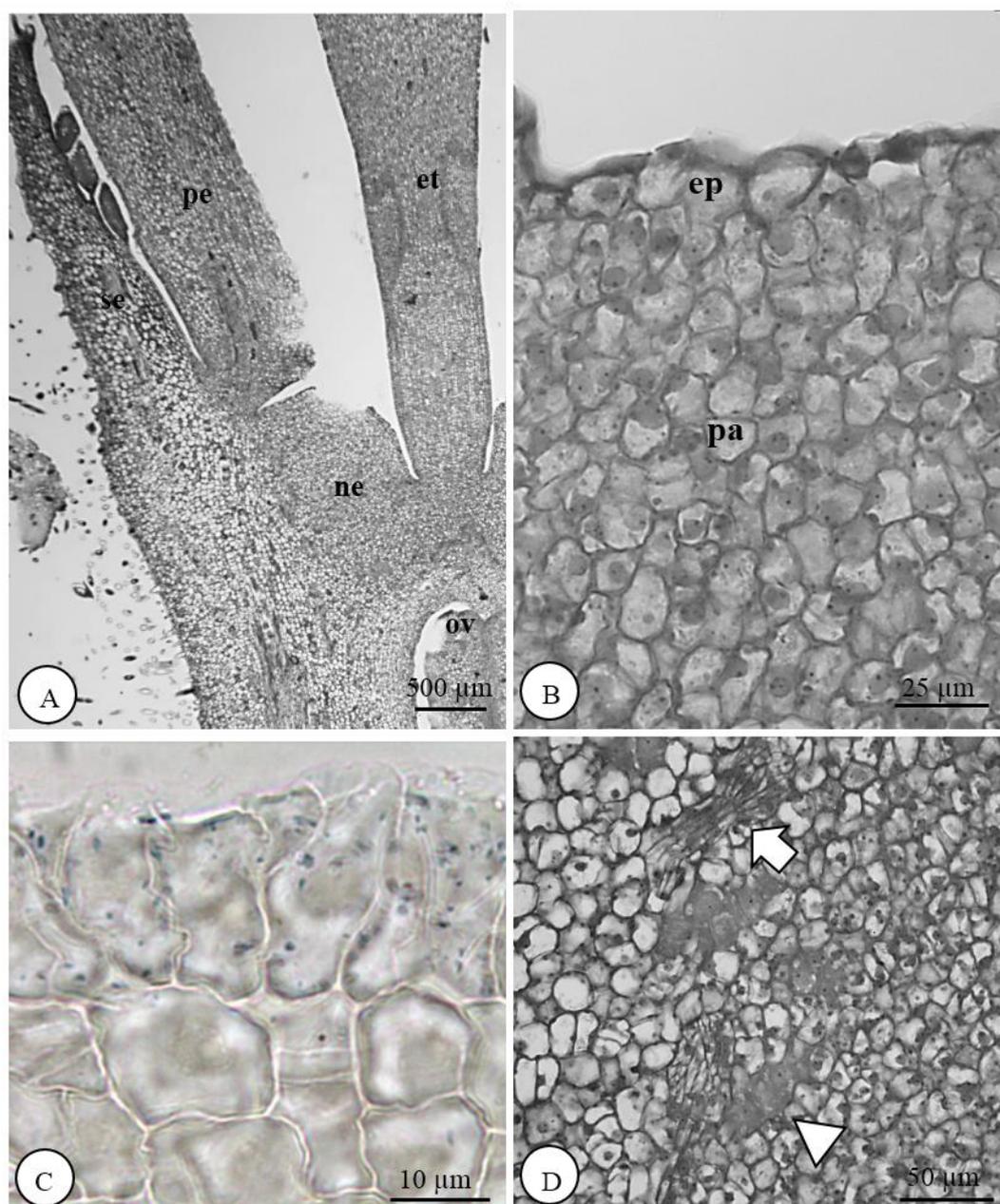
**FIGURAS  
E  
TABELAS**



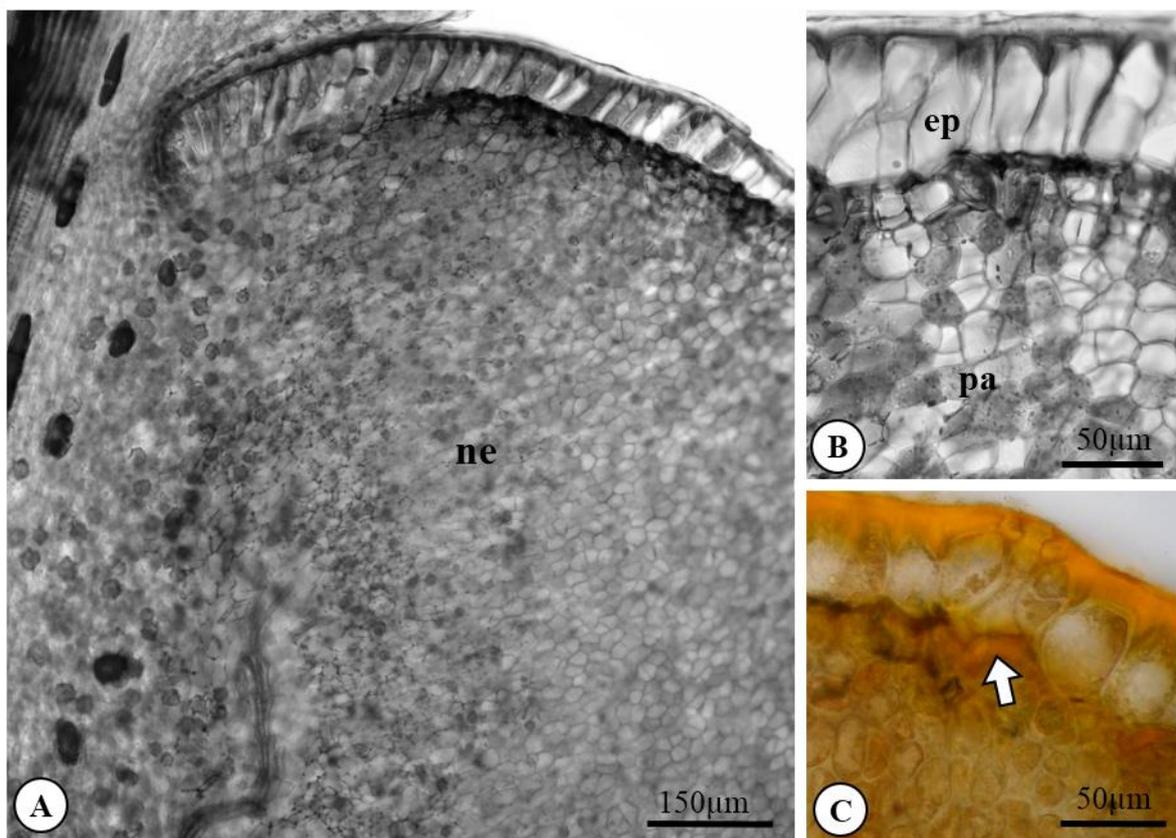
**Fig. 1.** Estágios do nectário de *Tocoyena formosa* (Rubiaceae). **A)** Botões florais com morfologia diferenciada do cálice, que desenvolverão atividade pré-floral. Observe as sépalas separadas da corola (cabeça de seta). **B)** Botões florais que se desenvolverão normalmente. Note as sépalas adpressas à corola (seta preta). **C)** Ramo floral com botões florais em desenvolvimento e com nectários pré-florais expostos após a queda da corola. Note nectário exposto com secreção recobrendo sua superfície. **D)** Nectário pré-floral exposto recoberto por néctar. **E)** Ramo floral com diferentes estágios do nectário. Observe nectários no estágio pós-floral (cabeça de seta branca) e o nectário ativo durante o desenvolvimento do fruto (setas brancas). Cabe destacar o nectário pré-floral já senescente (círculo).



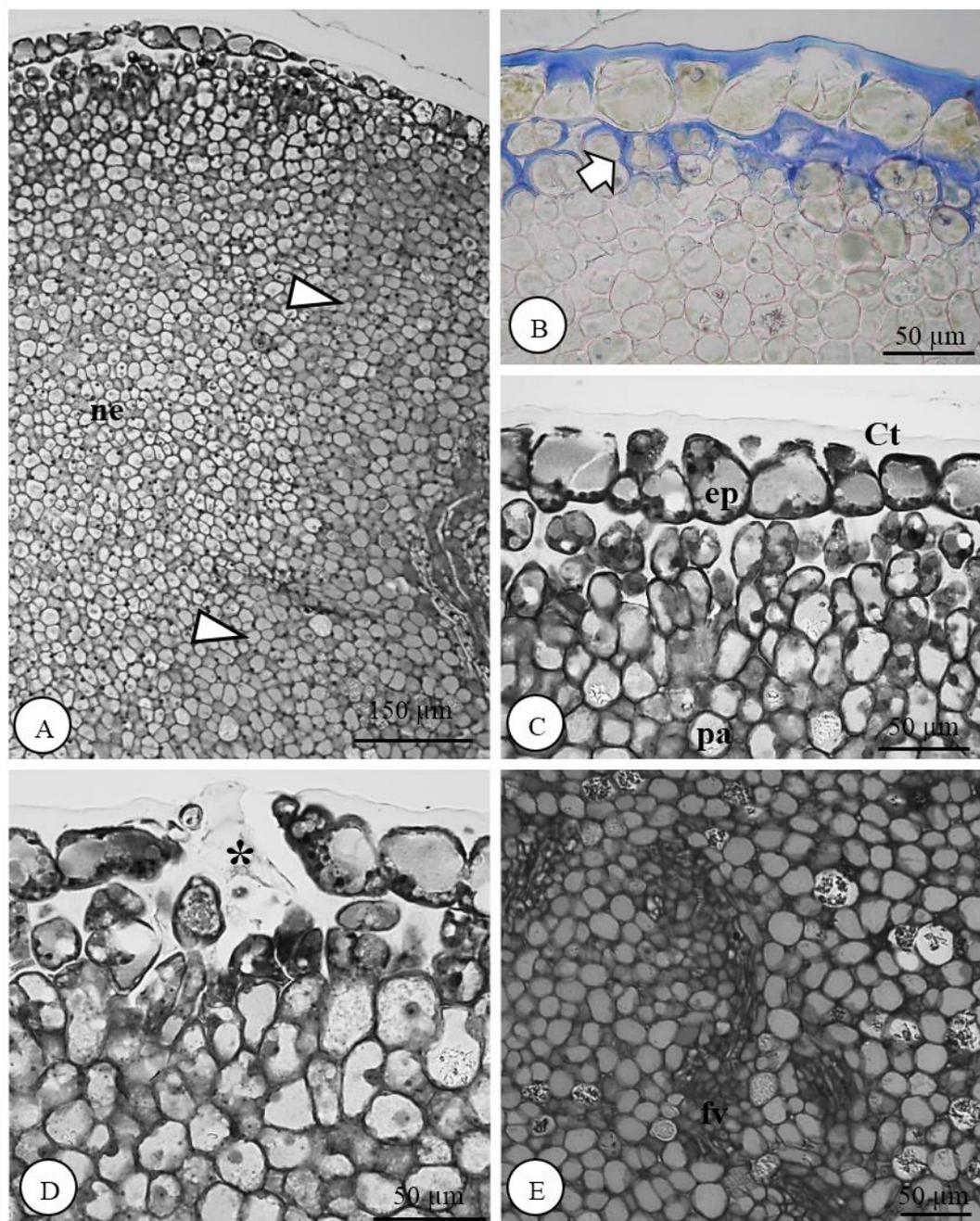
**Fig. 2.** Nectário pré-floral. **A-D.** Antes da queda da corola. **E-G.** Após queda da corola. **A)** Nectário (ne) na porção superior do ovário (ov), rodeando a base do estilete (et). Note a porção distal das sépalas (se) afastada das pétalas (pe). **B)** Disco do nectário composto por células epidérmicas (ep) retangulares com citoplasma denso e núcleo volumoso em posição central e células parenquimáticas (pa) isodiamétricas com citoplasma denso e núcleo volumoso. **C)** Nectário (ne) com células com pequenos cristais (círculo) de oxalato de cálcio. **D)** Feixes vasculares (cabeça de seta) na periferia do nectário (ne). **E)** Nectário (ne) exposto. **F)** Nectário composto por epiderme e parênquima. Observe que tanto as células epidérmicas quanto parenquimáticas apresentam sistema vacuolar desenvolvido. **G)** Nectário após o tratamento com Sudan IV. Note as paredes delgadas das células epidérmicas (ep) e parenquimáticas (pa) cutícula delgada e gotas lipídicas com grandes dimensões nas células epidérmicas.



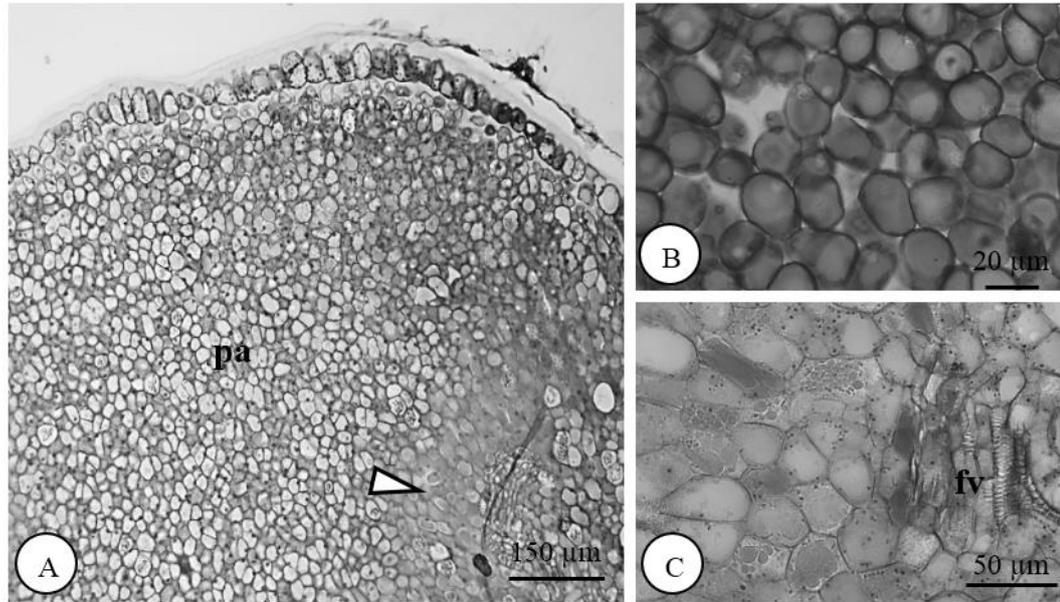
**Fig. 3.** Nectário do botão floral normal antes da antese **A)** Nectário (ne) na porção superior do ovário (ov). Observe a porção distal das sépalas (se) justapostas às pétalas (pe). **B)** Nectário composto por epiderme e parênquima. Observe a presença de células guarda além das células comuns na epiderme. **C)** Nectário após o tratamento com reagente de NADI. Note as gotículas lipídicas no protoplasto das células de epiderme. **D)** Feixes vasculares (seta), predominantemente compostos por floema e agrupamento de idioblastos (cabeça de seta) adjacentes aos feixes, com citoplasma denso e núcleo volumoso.



**Fig. 4.** Nectário floral em antese. **A)** Nectário (ne) com organização compacta das células parenquimáticas, feixes vasculares na periferia do nectário e inúmeros idioblastos drusíferos. **B)** Paredes periclinais externas espessas das células epidérmicas (ep) e disposição parênquima (pa). **C)** Nectário após tratamento com Sudan IV. Note cutícula espessa, epitélio cuticular (seta) na região da câmara subestomática e numerosas gotas lipídicas no protoplasto das células epidérmicas e parenquimáticas.



**Fig. 5.** Nectário pós-floral. **A)** Nectário (ne) com epiderme unisseriada contendo estômatos e parênquima nectarífero com numerosas camadas, sendo as mais superficiais de disposição mais frouxa que as camadas mais profundas. Observe faixa de idioblastos (ponta de seta) na periferia do nectário, acompanhando os feixes vasculares. **B)** Nectário após o tratamento com reagente de NADI. Note cutícula espessa e duas camadas de epitélio cuticular (seta) e reação positiva em gotas no protoplasto das células epidérmica e parenquimáticas. **C)** Células da epiderme (ep) com projeções em direção à cutícula espessa (ct). Células parenquimáticas subepidérmicas com disposição frouxa. **D)** Câmara subestomática com secreção (\*) acumulada. **E)** Faixa de idioblastos, com grandes vacúolos acompanhado de feixes vasculares (fv).



**Fig. 6.** Nectário pericarpial. **A.** Estágio inicial, **B, C.** Estágio final. **A)** Nectário com epiderme unisseriada e numerosas camadas de células parenquimáticas **B)** Parênquima nectarífero com disposição frouxa das células. **C)** Faixa de idioblastos. fv= feixes vasculares.

**Tabela 1.** Caracterização histoquímica dos diferentes estágios do nectário de *Tocoyena formosa*.

Reagente	Substância	Estágios do nectário							
		Pré-floral com corola	Pré-floral sem corola	Floral antes da antese	Floral em antese	Pós-floral	Pericarpial inicial	Pericarpial intermediário	Pericarpial final
Vermelho de rutênio	Substâncias pécnicas	PC-Ep; PC-Pa	PC-Ep; PC-Pa	PC-Ep; PC-Pa	PC-Ep; PC-Pa	PC-Ep; PC-Pa	PC-Ep; PC-Pa	PC-Ep; PC-Pa	PC-Ep; PC-Pa
Reagente de Lugol	Amido	Pt-Ep; Pt-Pa	Pt-Pa	Pt-Pa	–	Pt-Pa	Pt-Ep; Pt-Pa	Pt-Pa	–
Fehling	Açúcares redutores	NA	NA	NA	Pt-Ep; Pt-Pa	Pt-Ep; Pt-Pa	NA	NA	NA
Sudan IV	Lipídios totais	Ct; Pt-Ep; Pt-Pa	Ct; Pt-Ep; Pt-Pa	Ct; Pt-Ep; Pt-Pa	Ct; EC; Pt-Ep; Pt-Pa	Ct; EC; Pt-Ep; Pt-Pa	Ct; Pt-Ep; EC; Pt-Pa	Ct; EC; Pt-Ep; Pt-Pa	Ct; EC; Pt-Ep; Pt-Pa
Reagente de Nadi	*Essências ** Mistura de óleos essenciais e oleoresinas	–	**Pt-Ep; **Pt-Pa	*Pt-Ep; *Pt-Pa	**Pt-Ep	**Pt-Ep; **Pt-Pa	**Pt-Ep; **Pt-Pa	**Pt-Ep; **Pt-Pa	**Pt-Ep; **Pt-Pa
Cloreto férrico	Compostos fenólicos gerais	–	–	–	–	–	–	–	Pt-Ep; Pt-Pa
Azul mercúrio de Bromofenol	Proteínas	–	–	–	–	–	–	–	–

(Ct) cutícula; (EC) epitélio cuticular; (ES) espaço subcuticular; (Ep) células epiteliais; (PC) parede celular; (Pt) protoplasto; (Pa) células do parênquima nectarífero; (–) ausência de reação; (NA) dado não avaliado até o momento.

## CAPÍTULO II

### Formigas e nectários extranupciais em *Tocoyena formosa* (Rubiaceae): ecologia do néctar e mutualismo defensivo

**Juliana Verónica Izquierdo<sup>1</sup>, Santiago Benitez-Vieyra<sup>2</sup>, Leonardo Galetto<sup>2</sup>, Felipe W. Amorim<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brasil.

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

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

<sup>1</sup>Capítulo em fase de preparação a submissão para o *Biological Journal of the Linnean Society*.

## 1 RESUMO

2  
3 O mutualismo planta-formiga está amplamente distribuído nos trópicos e zonas temperadas  
4 podendo ser tanto obrigatório quanto facultativo. A maioria das relações facultativas ocorrem  
5 através de nectários extraflorais e estão frequentemente relacionadas com a proteção contra  
6 herbívoros foliares. Embora os nectários extraflorais ocorram comumente nas partes  
7 vegetativas das plantas, existem espécies de plantas que possuem o nectário nos frutos  
8 acompanhando o desenvolvimento, que possivelmente estão relacionados com a proteção  
9 contra predadores de sementes pré-dispersão. Este tipo de nectário é chamado de nectário  
10 pericarpial e é comum em espécies da família Rubiaceae. *Tocoyena formosa* é uma espécie  
11 comum no Cerrado, que além de possuir nectário no estágio pós-floral e pericarpial, possui o  
12 estágio de secreção pré-floral, *i.e.*, na fase de botão, o que permite recrutar formigas antes da  
13 abertura das flores quando as folhas estão tenras e são vulneráveis aos herbívoros. *Tocoyena*  
14 *formosa* oferece néctar tanto para os polinizadores como para as formigas através a produção  
15 de uma única glândula secretora. Neste sentido, os objetivos deste estudo foram: 1)  
16 caracterizar o padrão de secreção do néctar em cada um dos estágios do nectário, 2)  
17 caracterizar a composição química do néctar nos distintos estágios do nectário e testar se  
18 existem diferenças que se correspondam com cada estágio e 3) testar a efetividade das  
19 formigas na proteção de folhas, frutos e sementes contra a atividade de herbívoros. Foi  
20 estudada a dinâmica de secreção de néctar em períodos de 24h em cada um dos nectários e  
21 coletado néctar para sua posterior análise química e caracterizada a fauna de visitantes do  
22 nectário. Também foram estabelecidos experimentos de exclusão de formigas para testar a  
23 efetividade das formigas contra a atividade de herbívoros foliares e predadores de semente  
24 pré-dispersão. Os resultados mostram que *T. formosa* interage com diferentes espécies de  
25 formigas que visitam o nectário durante toda a etapa reprodutiva da planta, incluindo o  
26 nectário pré-floral. As formigas estabelecem um mutualismo defensivo, pois oferecem  
27 proteção contra os herbívoros foliares diminuindo a porcentagem de área foliar danificada.  
28 Entretanto, as formigas não ofereceram proteção dos frutos contra predadores de sementes.  
29 Todos os estágios que apresenta o nectário de *T. formosa*, incluído o pré-floral, reflete uma  
30 estratégia de investimento de energia para secretar néctar continuamente, e assim recrutar  
31 formigas para sua proteção, sem produzir novas estruturas para tal fim.

32  
33 **Palavras chaves:** formigas, herbivoria foliar, mutualismo defensivo, néctar, nectários  
34 extranupciais, *Tocoyena formosa*.

## 1 INTRODUÇÃO

2  
3 O mutualismo defensivo estabelecido entre formigas e plantas está amplamente  
4 distribuído ao longo dos trópicos e das zonas temperadas (Bronstein, 1998, Rosumek *et al.*,  
5 2009), sendo também bastante comum em áreas de deserto (Holland, Chamberlain & Horn,  
6 2010, Aranda-Rickert, Diez & Marazzi, 2014, Alma *et al.*, 2015, Dáttilo *et al.*, 2015). A  
7 interação mutualística entre formigas e plantas pode ser tanto obrigatória quanto facultativa.  
8 Em associações obrigatórias, a relação é mais específica (Jasen 1966, Vasconcelos, 1991,  
9 Yamahiro & Yamahiro, 2008), e nesse caso, além de oferecem alimento para as formigas  
10 (como néctar e corpúsculos müllerianos), as plantas também oferecem como recurso, áreas de  
11 nidificação (Janzen, 1966, Bronstein, Alarcón & Geber, 2006). Já em associações facultativas,  
12 existe baixa especificidade na interação e apenas o alimento é oferecido como recurso para as  
13 formigas de diferentes espécies (Koptur, 1979, Bronstein *et al.*, 2006). Dessa forma, o  
14 resultado da interação pode ser diretamente dependente da quantidade e da qualidade do  
15 recurso (Bronstein, 1998, Rosumek *et al.*, 2009).

16 A maioria das relações facultativas ocorre através de nectários extraflorais - NEFs  
17 (Elias & Gelband, 1975, Bentley, 1977b, Baker, Opler & Baker, 1978, Koptur, 1984, Del-  
18 Claro, Berto & Réu, 1996, Alves-Silva & Del-Claro, 2016a). Os NEFs estão mais  
19 frequentemente relacionados com a proteção da planta contra herbívoros foliares (Koptur,  
20 1984, Oliveira & Leitao-Filho, 1987, Del-Claro *et al.*, 1996, Koptur, 2005, Nascimento &  
21 Del-Claro, 2010, Del-Claro *et al.*, 2013). Estes nectários podem ter um padrão de secreção  
22 correspondente com as diferentes necessidades de proteção da planta (Bentley, 1977a,  
23 Bentley, 1977b, Gaffal, 2012, Aranda-Rickert *et al.*, 2014). Entretanto, a proteção só é eficaz  
24 quando formiga e herbívoro coocorrem tanto no tempo quanto no espaço (Alma *et al.*, 2015,  
25 Dáttilo *et al.*, 2015), sendo esta uma das principais premissas para que haja o mutualismo  
26 defensivo planta-formiga (Bentley, 1977b).

27 Embora os NEFs ocorram comumente em partes vegetativas (Baker *et al.*, 1978,  
28 Koptur, 2005, Evert, 2006, Bernardello, 2007), algumas plantas possuem nectários nos frutos  
29 que secretam néctar durante seu desenvolvimento (Elias & Prance, 1978, Keeler, 1981,  
30 Gracie, 1991, Freitas *et al.*, 2000, Diaz-Castelazo *et al.*, 2005, Paiva, 2009, Holland *et al.*,  
31 2010). Este tipo de nectário, por sua vez, estaria relacionado com a proteção contra  
32 predadores de sementes pré-dispersão (Keeler, 1981). O néctar oferecido pelos NEFs oferece  
33 carboidratos, assim como aminoácidos e outros compostos em menor quantidade (Lanza *et*  
34 *al.*, 1993, Blüthgen & Fiedler, 2004, Koptur, 2005, Pacini & Nepi, 2007, González-Teuber &  
35 Heil, 2009).

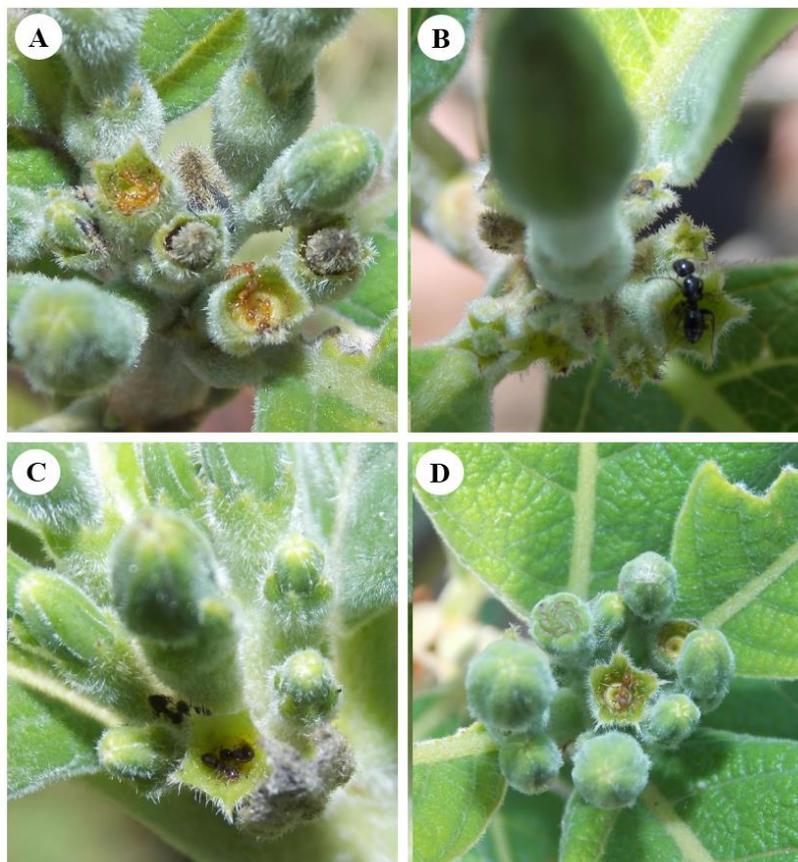
1 Espécies de plantas com NEFs estão amplamente distribuídas no Cerrado (Oliveira &  
2 Leitao-Filho, 1987), e estabelecem associações com uma grande diversidade de espécies de  
3 formigas, as quais oferecem proteção de folhas, frutos e sementes (Belchior, Sendoya & Del-  
4 Claro, 2016). Algumas espécies dentro da família Rubiaceae estabelecem esta interação  
5 através de nectários florais que continuam secretando néctar após a queda da corola e durante  
6 o desenvolvimento dos frutos, quando desempenham um papel extranupcial (Santos & Del-  
7 Claro, 2001, Amorim & Oliveira, 2006, Del-Claro *et al.*, 2013, Falcão, Dáttilo & Izzo, 2014).  
8 Tais nectários são denominados de nectários pericarpiais (veja Del-Claro *et al.* 2013)

9 *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlechtd.) K. Schum (Rubiaceae) interage com  
10 diferentes espécies de formigas depois da floração através de dois estágios diferentes do  
11 nectário floral, que continua secretando néctar após da queda da corola (veja Capítulo I). Nas  
12 flores que foram polinizadas, o nectário secreta néctar durante o desenvolvimento do fruto até  
13 seu amadurecimento, este estágio é chamado de nectário pericarpial (NP). Já nas flores que  
14 não foram polinizadas, o ovário permanece na inflorescência e o nectário floral continua  
15 secretando néctar, constituindo assim, o estágio de nectário pós-floral (NPósF). Além desses  
16 dois estágios do nectário floral, existe outro anterior, que é denominado de nectário pré-floral  
17 (NPréF, veja Capítulo I). Este nectário atrai formigas antes das primeiras flores da  
18 inflorescência abrirem (Figura 1). O papel ecológico deste estágio presente em *T. formosa*  
19 ainda é desconhecido e sua duração é bastante curta, uma vez que o nectário permanece ativo  
20 apenas até o início da antese das primeiras flores na inflorescência planta.

21 Neste sistema, a mesma glândula secretora desempenha distintos papéis oferecendo  
22 recursos tanto para os polinizadores, quanto para as formigas. Entretanto, esses dois grupos de  
23 visitantes podem ter preferências por néctar com qualidade distinta. Por exemplo, mariposas  
24 normalmente preferem néctar cujo açúcar predominante é a sacarose (Koptur, 1994, Wolff,  
25 2006), ao passo que formigas geralmente preferem néctar com predominância de hexoses em  
26 sua composição de açúcares (Koptur, 1979, Tanowitz & Koehler, 1986, Koptur, 2005), além  
27 de néctar elevada quantidade de aminoácidos (Lanza, 1988, Lanza et al., 1993, Koptur,  
28 2005).

29 Visto que em *Tocoyena formosa* utiliza-se da mesma glândula secretora para a atração  
30 de mutualistas com diferentes papéis (polinização e proteção), nós perguntamos se a  
31 composição química do néctar secretado nos distintos estágios do nectário difere entre si e  
32 correspondem às preferências de ambos os grupos de visitantes (esfingídeos e formigas).  
33 Também perguntamos se as formigas de fato exercem papel de proteção sobre as partes  
34 reprodutivas e vegetativas da planta. Nesse contexto, nosso estudo teve como objetivos 1)  
35 caracterizar o padrão de secreção do néctar em cada um dos estágios do nectário, 2)

1 caracterizar a composição química do néctar nos distintos estágios do nectário e testar se  
2 existem diferenças que se correspondam com o papel ecológico de cada estágio, e 3) testar a  
3 efetividade das formigas na proteção de folhas, frutos e sementes contra a atividade de  
4 herbívoros.



5  
6 **Figura 1.** Espécies de formigas que visitam os nectários pré-florais de *Tocoyena formosa*. **A-D)**  
7 Formigas do gênero *Brachymyrmex*, **B)** *Camponotus* sp., **C)** *Crematogaster goeldii*.

8

## 9 MATERIAL E MÉTODOS

10

### 11 Área de estudo e caracterização da espécie

12 O estudo foi realizado nos anos de 2015 e 2016 em uma área de Cerrado localizada na  
13 Fazenda “Palmeira da Serra” (22° 48’ 50’’ S e 48° 44’ 40’’ W), uma reserva privada de  
14 aproximadamente 224 ha, situada no Município de Pratânia, São Paulo, Brasil. A vegetação  
15 predominante na área é o cerrado *stricto sensu* e o cerradão. O clima é tropical de altitude  
16 com chuvas no verão de até 239.5 mm em janeiro (temperatura média de 29.2 °C,) e um  
17 inverno seco com chuvas até 37.5 mm em julho (temperatura média de 10.0 °C) (CEPAGRI  
18 2016).

19 *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlechtd.) K. Schum é uma Rubiaceae comum no  
20 Cerrado (Ratter, Bridgewater & Ribeiro, 2003), autoincompatível e depende de esfingídeos

1 com probóscide longa para se reproduzir (Oliveira & Freitas, 2004). Suas flores são  
2 protândricas com ovário ínfero, e na parte superior deste encontra-se o nectário rodeando a  
3 base do estilete (Bernardello, 2007, Delprete & Jardim, 2012). Na primeira noite, quando a  
4 flor se abre (fase masculina) o pólen é apresentado de forma secundária sobre os lóbulos  
5 estigmáticos que estão fechados (pseudoestame). A partir da segunda noite até a senescência  
6 (fase feminina), os lóbulos estigmáticos se abrem e permanecem receptivos até o fim da  
7 antese (Oliveira & Freitas, 2004). O período reprodutivo começa no mês de setembro/outubro  
8 com a aparição dos primeiros botões florais, e finaliza por volta dos meses de abril e maio  
9 com o final do período de frutificação, que é procedido pela perda das folhas durante a  
10 estação seca (Silberbauer-Gottsberger, Gottsberger & Ehrendorfer, 1992).

11

### 12 **Dinâmica de secreção do néctar e efeito das remoções**

13 Para a análise da dinâmica de secreção do néctar e do efeito das remoções sucessivas  
14 em cada estágio do nectário foram utilizados um total de 36 nectários para o estágio pós-floral  
15 (nectários pós-floral, NPósF), 70 nectários para o nectário pericarpial na fase inicial de  
16 desenvolvimento do fruto (entre 3-4 semanas após a queda da corola, nectário pericarpial fase  
17 inicial, NP1), 49 nectários para a fase intermediária de desenvolvimento do fruto (entre 5-7  
18 semanas após a queda da corola nectário pericarpial fase intermediária, NP2), e 33 nectários  
19 durante a fase final de desenvolvimento do fruto (entre 8-10 semanas após a queda da corola  
20 nectário pericarpial fase final, NP3). O volume do néctar foi mensurado usando  
21 microcapilares de vidro de 10µl (Drummond), e a concentração de açúcares foi medida com  
22 auxílio de um refratômetro manual (INSTRUTHERM, modelo RT-280, escala de medição 0 a  
23 90% Brix). A massa de açúcares foi quantificada de acordo com Galetto & Bernardello (2005)  
24 e expressada em miligramas de açúcar.

25 A dinâmica de secreção de néctar foi avaliada durante um período de 24h em  
26 intervalos de 4h em sete conjuntos de nectários isolados com sacos de organza de náilon.  
27 Cada conjunto de nectário continha nectários de diferentes plantas para incluir no estudo a  
28 variação interindividual na dinâmica de néctar. Em cada intervalo, o néctar foi removido  
29 completamente do nectário para a medição do volume e concentração, e recoberto novamente  
30 permitindo assim que o néctar se acumulasse novamente até a próxima medição. Cada  
31 medição seguinte foi realizada em um conjunto novo de nectários com a remedição de cada  
32 conjunto anterior sucessivamente até o final do experimento (veja detalhes em Galetto &  
33 Bernardello, 2005).

34 A resposta dos nectários às sucessivas remoções do néctar pelos visitantes foi avaliada  
35 através de múltiplas remoções experimentais do néctar que simulou a atividade das formigas.

1 Para isso, comparamos o total do néctar acumulado entre os nectários “visitados por  
2 formigas” (*i.e.*, nectários nos quais o néctar foi experimentalmente removido) e os nectários  
3 não visitados (controle). Como as remoções foram realizadas em sete conjuntos de nectário de  
4 quatro em quatro horas, o primeiro conjunto de nectários sofreu sete remoções, o segundo  
5 seis, e assim sucessivamente até o último conjunto, que foi utilizado como grupo controle, no  
6 qual o néctar só foi removido uma única vez permitindo sua máxima acumulação em um  
7 período de 24h (Galletto & Bernardello, 2005). Através desse experimento nós estimamos o  
8 investimento em produção de néctar pela planta após sua remoção pelas formigas que visitam  
9 os NEFs, e testamos se a planta produz uma maior quantidade de néctar em resposta a  
10 remoções sucessivas.

11 Para testar se existe diferença entre o volume de néctar secretado e a quantidade de  
12 açúcar produzida entre os diferentes estágios do nectário no fruto, analisamos os dados com o  
13 teste de Kruskal-Wallis e com o teste *a posteriori* de Dunn. Os mesmos testes foram  
14 utilizados para comparar se existe diferença na produção de néctar entre os horários, tanto  
15 para a dinâmica de secreção do néctar como para o efeito da remoção (Queiroz, Quirino &  
16 Machado, 2015).

17

### 18 **Análise da composição química do néctar**

19 Para analisar a composição química do néctar, nós coletamos o néctar de nove  
20 nectários em estágio NPréF, dois em estágio NP1, seis em estágio NP2, 16 em estágio NPósF  
21 e também de cinco flores (NF). Para a coleta utilizamos microcapilares de vidro de 10 $\mu$ l  
22 (Drummond) e armazenamos o néctar em papel de cromatografia Whatman n°1 (conforme  
23 Galletto & Bernardello, 2005). Após o armazenamento, as amostras foram dissolvidas em um  
24 volume conhecido de água destilada, e posteriormente foi realizada cromatografia em fase  
25 líquido-gasosa seguindo Galletto & Bernardello (2005) para identificar os açúcares que  
26 compõem o néctar.

27 A proporção sacarose/hexose foi calculada segundo Baker & Baker, 1973. A proporção  
28 foi calculada considerado sacarose / (glucose + frutose), no qual valores abaixo de 0,1  
29 indicaram um néctar rico em hexose, valores maiores que 1,0, néctar rico em sacarose, valores  
30 intermediários, entre 0,1 e 0,499, néctar hexose-dominante, e por fim, e valores maiores do  
31 que 0,5, néctar do tipo sacarose-dominante.

32

### 33 **Levantamento de visitantes de nectários de *Tocoyena formosa***

34 Durante os experimentos de dinâmica de secreção do néctar foram registradas as  
35 diferentes espécies de formiga visitantes dos nectários em seus distintos estágios. Tais

1 observações foram realizadas naqueles ramos não utilizados nas remoções de néctar. Nós  
2 coletamos as formigas visitantes (alguns indivíduos representantes de cada espécie) e fixamos  
3 em solução de etanol 70% para posterior identificação.

#### 5 **Papel das formigas sobre o êxito reprodutivo em *Tocoyena formosa***

6 Para testar se as formigas tinham um efeito no êxito reprodutivo de *T. formosa* através  
7 da proteção de folhas e frutos, nós realizamos um experimento de exclusão. Primeiro,  
8 selecionamos 42 plantas com flores previamente marcadas e aleatoriamente atribuímos-lhes  
9 um dos dois tratamentos: exclusão total do acesso de formigas às plantas (SF, 22 plantas) e  
10 tratamento controle, no qual as formigas tiveram acesso livre às plantas e nectários (CF, 20  
11 plantas). No tratamento SF, as plantas foram isoladas na base do tronco utilizando uma  
12 barreira de cola entomológica, que era renovada em intervalos de 15 dias até o fim do  
13 experimento. Para evitar que as formigas tivessem acesso à planta isolada através da  
14 vegetação adjacente, nós fizemos uma poda das plantas circundante de forma a isolar por  
15 completo a planta do experimento (Costa, Oliveira-Filho & Oliveira, 1992, Del-Claro *et al.*,  
16 1996, Nascimento & Del-Claro, 2010).

17 Para avaliar o efeito das formigas na herbivoria foliar nos dois tratamentos foram  
18 coletadas folhas de ramos vegetativos (sem nectários) e de ramos reprodutivos (com  
19 nectários). Nós medimos a herbivoria foliar no início do experimento, que se deu no final de  
20 novembro no período inicial da floração, e no final do experimento no mês de março, quando  
21 os frutos já estavam desenvolvidos, porém ainda verdes. Nós coletamos três folhas  
22 completamente expandidas de três ramos vegetativos (sem nectários) e cinco ramos  
23 reprodutivos (com nectários) em diferentes alturas (ramos mais altos, em posição  
24 intermediária e mais baixos) de cada planta na fase inicial do experimento. Na fase final, nós  
25 coletamos cinco folhas por ramo, provenientes de três ramos vegetativos e três reprodutivos.  
26 Para isso utilizamos a mesma metodologia de coleta da fase inicial.

27 Para quantificar a porcentagem de área foliar danificada, as folhas foram digitalizadas  
28 utilizando um escâner (HP Scanjet G2710) com uma escala de referência. E seguida  
29 utilizamos o programa Sigma Scan Pro 5 para aferir a área foliar total removida por  
30 herbívoros. Para isso, consideramos a área danificada tanto por herbívoros mastigadores,  
31 quanto por herbívoros sugadores que danificavam as folhas deixando-as com manchas  
32 escuras, o que caracterizava áreas foliares fotossinteticamente inativas. Para testar se a  
33 presença de formigas foi efetiva na proteção das folhas realizamos o teste de Mann-Whitney  
34 para comparar os tratamentos CF e SF, tanto na fase inicial como na fase final do  
35 experimento. Adicionalmente, nós também testamos se os danos foliares diferiam entre si em

1 ramos com e sem nectários, tanto na presença, quanto na ausência de formigas. Para isso  
2 utilizamos um modelo linear generalizado misto, no qual os tratamentos (com e sem  
3 formigas) foram considerados como fatores fixos, cada planta como fator aleatório e o  
4 percentual de área foliar danificada como variável resposta.

5 Finalmente, para avaliar o efeito das formigas na proteção de frutos e sementes, nós  
6 quantificamos a produção total de frutos e coletamos entre 1 e 10 frutos por indivíduo de cada  
7 uma das 42 plantas. Foram coletados frutos completamente desenvolvidos em fase de pré-  
8 maturação. Os frutos foram acondicionados individualmente em potes plásticos para o  
9 acompanhamento da emergência de insetos predadores de sementes na fase pré-dispersão.  
10 Primeiro, nós calculamos a proporção de frutos formados em relação à quantidade de flores  
11 produzidas ao início da floração. Logo foi realizado um teste de Mann-Whitney para  
12 comparar se a presença de formigas influenciou na frutificação final das plantas. Também  
13 quantificamos o número de sementes produzidas por frutos para cada tratamento, e  
14 calculamos o número médio de sementes desenvolvidas por fruto. Em seguida foi realizado  
15 um teste de Mann-Whitney para comparar a produção de sementes em frutos provenientes de  
16 plantas com e sem formigas. Por fim, também quantificamos o número de insetos predadores  
17 de sementes que emergiram de cada fruto, e para testar a efetividade das formigas contra a  
18 atividade de tais insetos realizamos um teste de Mann-Whitney. Todos os insetos emergentes  
19 foram coletados e fixados em solução de etanol 70% para posterior identificação no menor  
20 nível taxonômico possível.

## 22 **RESULTADOS**

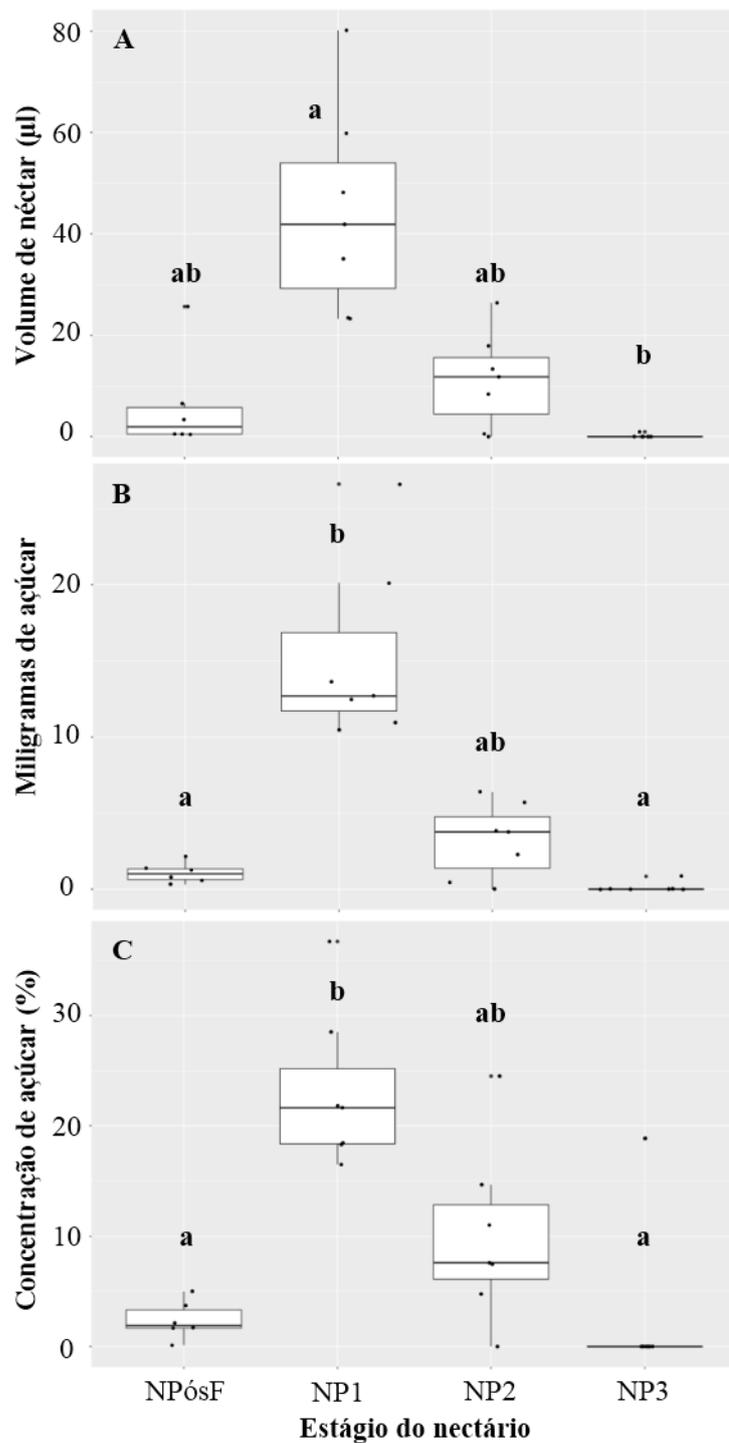
### 24 **Néctar: dinâmica de secreção, efeito das remoções e composição química**

25 O único nectário presente em *T. formosa* encontrou-se ativo por um período de mais  
26 de três meses durante todo o desenvolvimento dos frutos (final de dezembro até março). Os  
27 nectários pós-florais (provenientes de flores não polinizadas) também permaneceram ativos  
28 durante esse período e o padrão de secreção do néctar foi variável entre as diferentes fases  
29 (Fig. 2). O estágio com maior produção de néctar foi o nectário pericarpial na fase inicial  
30 (NP1), o qual produziu no total  $106.9 \pm 5.29$   $\mu$ l de néctar, com concentração média de  $22 \pm$   
31  $15,34$  %, que totalizou  $358.38 \pm 20.54$  mg de açúcar ao longo de 24h (Fig. 2). Quando os  
32 frutos já estavam maduros, a secreção do NP3 foi quase nula, coincidindo com a baixa  
33 quantidade de nectários ativos, baixa atividade de formigas e com período de pré-maturação  
34 dos frutos (Fig. 2 e 3).

1           No estágio pós-floral (NPósF) a secreção de néctar e produção de açúcar cessou às  
2 14h00, e na medição seguinte começou a secretar novamente. De qualquer forma, não houve  
3 diferença entre a secreção nos diferentes horários desse estágio ( $H= 12,62$ ,  $p=0,0271$ , Fig.3  
4 A). Já na fase inicial do nectário pericarpial (NP1), a secreção foi significativamente maior no  
5 começo da noite ( $H= 12.72$ ,  $p= 0.0478$ , Fig. 3B). Na fase intermediária do nectário (NP2), a  
6 secreção foi homogénea ao longo do dia ( $H= 5,72$ ,  $p= 0,4547$ , Fig. 3C). A produção de néctar  
7 foi muito baixa, ou mesmo nula na fase final de desenvolvimento do fruto ( $H= 1,066$ ,  $p=$   
8  $0,983$ , Fig. 3D). A remoção do néctar não afetou sua produção total em nenhum dos estágios  
9 dos nectários (Material Suplementar).

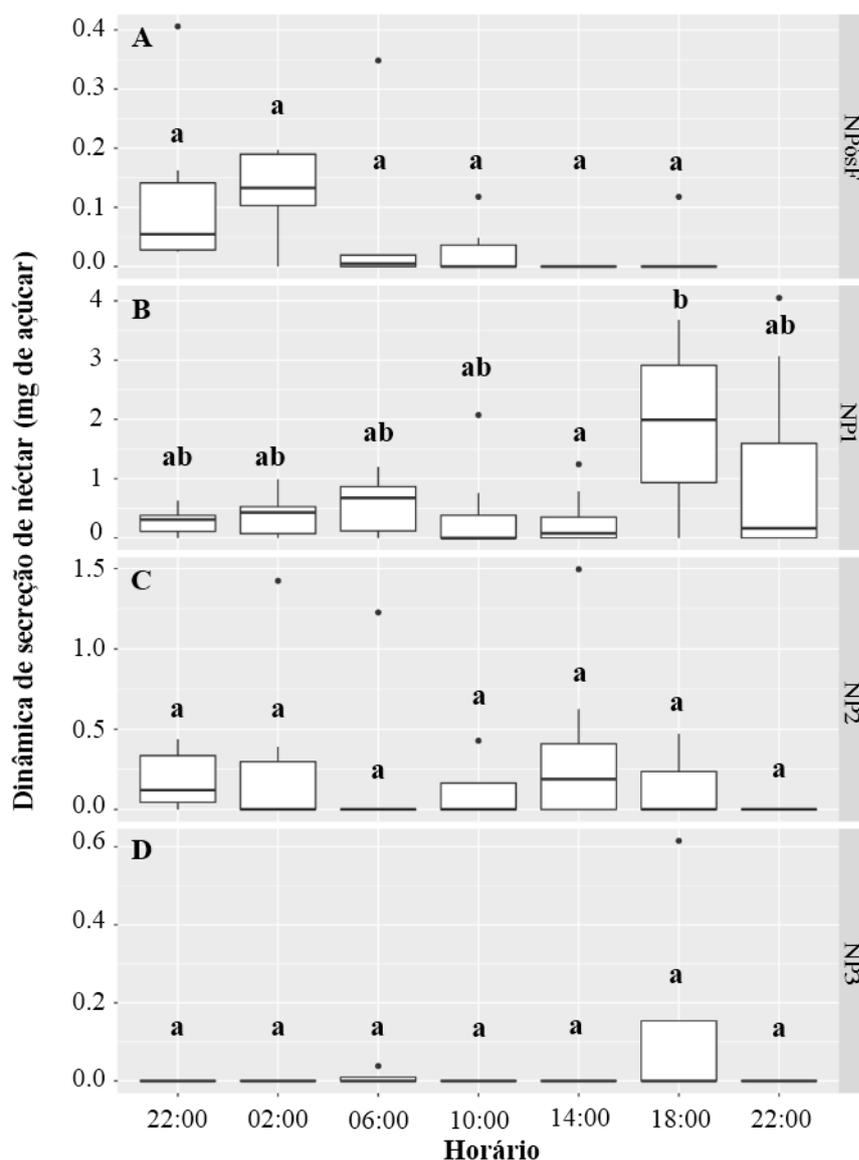
10           A composição química dos açúcares do néctar não variou entre os distintos estágios do  
11 nectário. Todos os estágios possuem sacarose como o principal tipo de açúcar produzido,  
12 sendo todos os nectários classificados como sacarose-rico, com exceção do NP2 que pode ser  
13 considerado como sacarose-dominante (Tabela 1).

14



1

2 **Figura 2.** Características do néctar em cada estágio do néctário de *Tocoyena formosa*. **A)** Volume de  
 3 néctar, **B)** Miligramas de açúcar do néctar, **C)** Concentração de açúcar. NPósF = Néctário pós-floral,  
 4 NP1 = Néctário pericarpial em fase inicial, NP2 = Néctário pericarpial em fase intermediária e NP3 =  
 5 Néctário pericarpial em fase final de desenvolvimento do fruto. Volume e miligrama de açúcar do  
 6 néctar estão representados pela variação da produção total por estágio de néctário, e a concentração  
 7 está representada pela variação da média da produção de néctar. Letras iguais por cima do boxplot,  
 8 representam grupos estatisticamente iguais.  
 9



**Figura 3.** Variação da secreção de néctar acumulado de *Tocoyena formosa* num período de 24h. **a)** Nectário pós-floral, NPósF. **b)** Nectário pericarpial em fase inicial, NP1. **c)** Nectário pericarpial em fase intermediária, NP2. **D)** Nectário pericarpial em fase final de desenvolvimento do fruto, NP3. Letras iguais por cima do boxplot, representam grupos estatisticamente iguais.

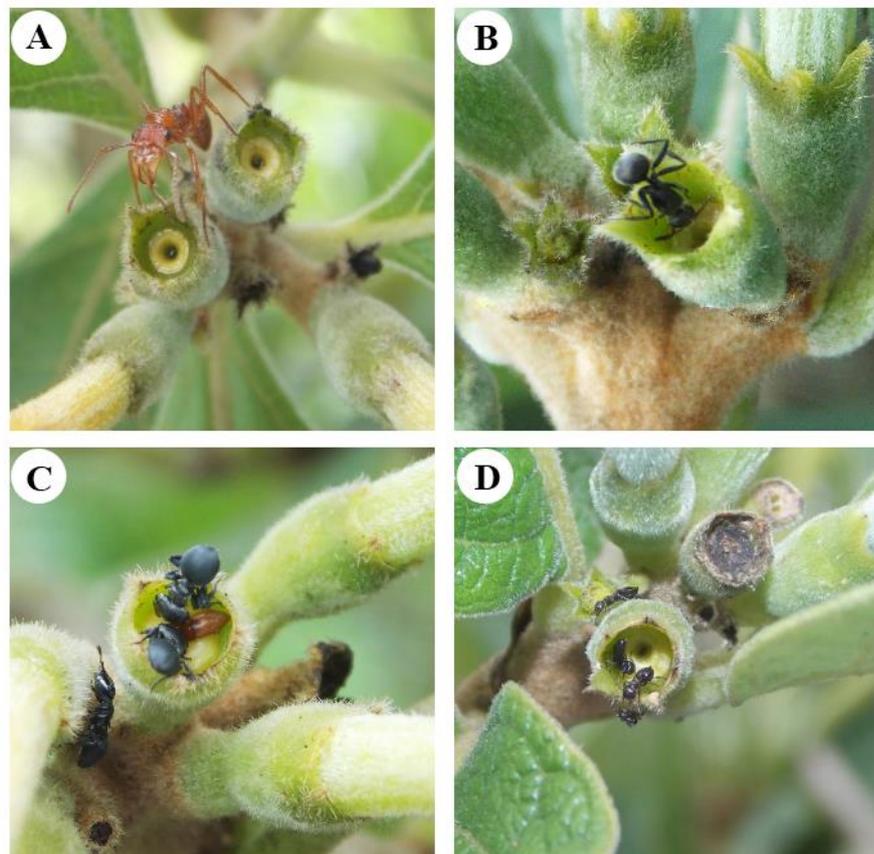
**Tabela 1.** Composição de açúcar do néctar dos diferentes estágios do nectário de *Tocoyena formosa*. Classificação segundo Baker & Baker (1973). SD = néctar sacarose dominante, SR = néctar rico em sacarose.

Tipo de nectário <sup>1</sup>	Composição de açúcar			Proporção	
	Glucose (%)	Fructose (%)	Sacarose (%)	$S/(F + G)$	Tipo
<b>NPréF</b>	15,65	12,88	71,48	2,51	SR
<b>NF</b>	8,57	7,18	84,25	5,35	SR
<b>NPósF</b>	12,19	13,17	74,64	2,94	SR
<b>NP1</b>	17,73	23,86	58,41	1,40	SR
<b>NP2</b>	20,33	31,51	48,17	0,93	SD

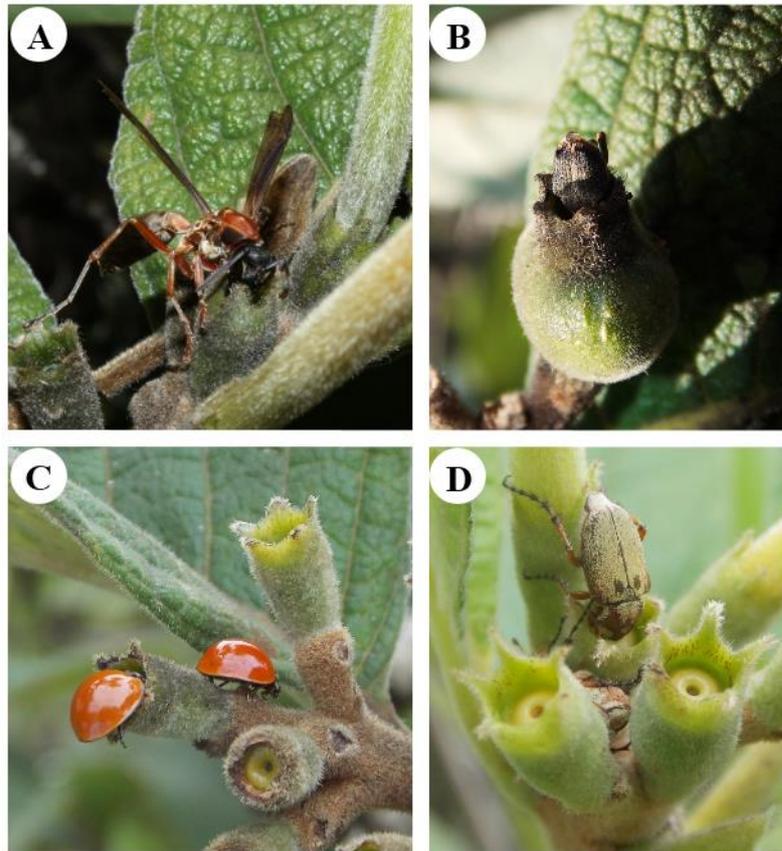
<sup>1</sup>. Nesta análise não foi incluído o último estágio do nectário pela baixa quantidade de secreção de néctar, própria do nectário.

1 **Levantamento das formigas associadas aos nectários.**

2 Foram identificadas 10 espécies de formigas pertencentes a sete gêneros visitando os  
3 diferentes estágios dos nectários de *T. formosa*. Seguindo a ordem de importância baseada em  
4 suas frequências relativas nas plantas, a espécies de formigas observadas foram:  
5 *Crematogaster goeldii* (Forel, 1903), *Ectatomma tuberculatum* (Olivier, 1972), *Camponotus*  
6 *crassus* (Mayr, 1862), *Brachymyrmex* sp. aff., *Cephalotes* sp., *Neoponera villosa* (Fabricius,  
7 1804), *Pseudomyrmex gracilis* (Fabricius, 1804), *Camponotus renggeri* (Emery, 1894),  
8 *Camponotus rufipes* (Fabricius, 1775) e *Pseudomyrmex filiformis* (Fabricius, 1804) (Fig. 4).  
9 Eventualmente, também registramos a visita da vespa *Polistes* sp., além de três espécies de  
10 Coleoptera, dentre os quais encontra-se *Hemicolpus abdominalis* (Hustache, 1938), que  
11 representa o principal predador de sementes em desenvolvimento de *T. formosa* (Fig. 5).  
12



13 **Figura 4.** Principais espécies de formigas visitantes dos nectários de *Tocoyena formosa*. **A)**  
14 *Ectatomma tuberculatum*; **B)** *Camponotus crassus*; **C)** *Cephalotes* sp.. Note que; junto as formigas há  
15 um pequeno besouro da família Nitidulidae também consumindo néctar; e **D)** *Crematogaster goeldii*.  
16  
17



1 **Figura 5.** Vespa e besouros visitantes dos nectários de *Tocoyena formosa*. **A)** Vespa do gênero  
 2 *Polistes*; **B)** *Hemicolpus abdominalis* (Curculionidae), **C)** *Cycloneda* sp. (Coccinellidae); e **D)**  
 3 *Macroductylus* sp. (Scarabaeidae, Melolonthinae).  
 4  
 5

### 6 **Papel das formigas sobre o êxito reprodutivo de *Tocoyena formosa***

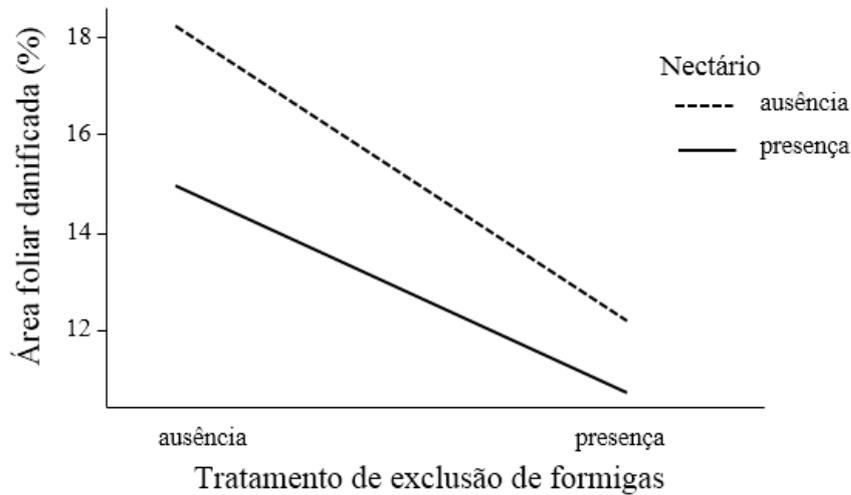
7 Não houve diferença na área foliar danificada entre o tratamento controle (presença de  
 8 formigas,  $7,39 \pm 12,10 \text{ mm}^2$ ) e de exclusão (sem formigas,  $6,701 \pm 10,56 \text{ mm}^2$ ;  $W= 913$ ,  $p=$   
 9  $0,5476$ ) no início do experimento. Contudo, ao final do experimento detectamos um aumento  
 10 significativo ( $W= 1016$ ,  $p= 0,01685$ ) nos danos foliares causados por herbívoros em plantas  
 11 sem formigas a ( $16,38 \pm 13,86 \text{ mm}^2$ ) em relação ao tratamento controle ( $11,43 \pm 12,16 \text{ mm}^2$ ).  
 12 A herbivoria foi afetada tanto pela presença de formigas na planta, quanto pela presença de  
 13 nectários nos ramos, entretanto não observamos interação entre ambos os dois fatores (Tabela  
 14 2; Fig. 5).  
 15  
 16  
 17  
 18  
 19  
 20

1 **Tabela 2.** Resultado dos contrastes do modelo linear generalizado misto do percentual de área  
 2 foliar danificada ao final do tratamento de exclusão de formigas em *Tocoyena formosa*.

	Área foliar danificada (%)		
	Gl	F	p
Formiga	1029	-5,4911	0,0025
Nectário	39	-2,4540	0,0332
Formiga*Nectário	1029	1,6825	0,2876

3

4

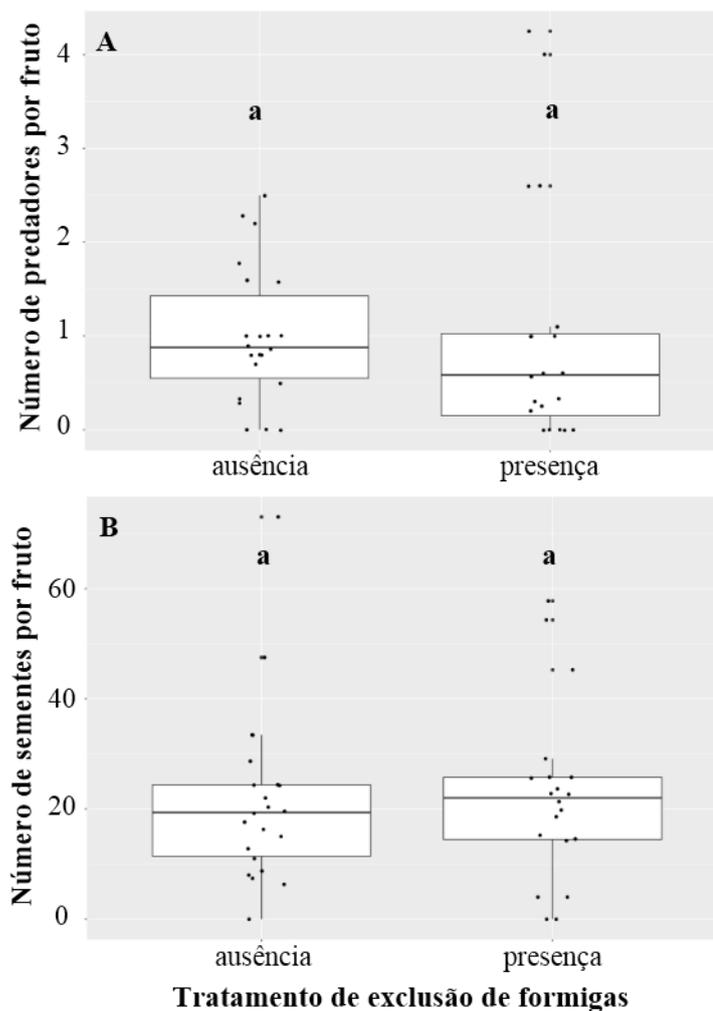


5

6 **Figura 5.** Relação entre tratamento de exclusão de formigas, presença de nectários e porcentagem de  
 7 área foliar danificada.

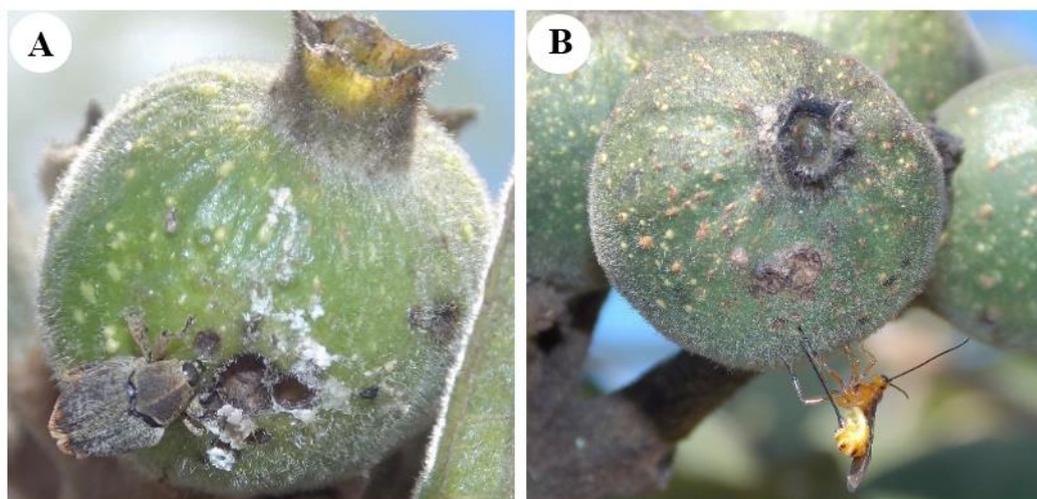
8

9 A presença das formigas não afetou a proporção de frutos formados por plantas  
 10 (presença de formigas:  $0,1623 \pm 0,1131$  frutos por planta, ausência de formigas:  $0,2091 \pm$   
 11  $0,1175$  frutos por planta,  $W= 231$ ,  $p= 0,2157$ ), nem na quantidade de predadores de sementes  
 12 que emergiram dos frutos (presença de formigas:  $1,02 \pm 1,30$  predadores; ausência de  
 13 formigas:  $0,99 \pm 0,72$ ;  $W=254$   $p=0,4$ ; Fig. 6A), tampouco no número médio de sementes  
 14 produzidas por fruto (presença de formigas:  $22,23 \pm 15,81$ , ausência de formigas:  $21,51 \pm$   
 15  $15,74$ ; Fig. 6B).



**Figura 6.** Efeito das formigas no número de predadores por frutos (A) e número médio de sementes produzidas por fruto (B). Letras iguais por cima do boxplot, representam grupos estatisticamente iguais.

Os predadores de sementes que emergiram dos frutos maduros (n=244) pertenceram as ordens Coleoptera, Hymenoptera, Lepidoptera e Diptera. Os predadores mais frequentes foram *Hemicolpus abdominalis* (Hustache, 1938) (Curculionidae: Coleoptera), que emergiu em 52.87% do total de frutos coletados (Fig. 7A), e uma espécie de vespa da família Braconidae, que esteve presente em 32.38% dos frutos (Fig. 7B). Não houve diferença entre os tratamentos na quantidade de curculionídeos que emergiram por fruto (presença de formigas:  $0,6352 \pm 0,9558$  curculionídeos, sem formigas:  $0,5238 \pm 0,4943$  curculionídeos,  $W= 233$ ,  $p= 0,75$ ). Embora mariposas tenham sido menos frequentes que os demais predadores, elas causaram tanto dano quanto os curculionídeos, já que os frutos nos quais esses predadores estavam presentes apresentaram menor quantidade de sementes.



1  
2 **Figura 7.** Principais predadores de sementes pré-dispersão encontrados em *Tocoyna*  
3 *formosa*. **A)** *Hemicolpus abdominalis*, **B)** Vespa da família Braconidae. Note que em ambas  
4 as imagens, os adultos encontram-se ovipondo nos frutos.  
5

## 6 **DISCUSÃO**

7  
8 *Tocoyna formosa* possui nectários extraflorais associados ao ovário, os quais  
9 oferecem néctar ao longo de todo período reprodutivo da espécie, o que lhe permite recrutar  
10 diferentes espécies de formigas e assim estabelecer um mutualismo defensivo (Del-Claro *et*  
11 *al.*, 2013, Falcão *et al.*, 2014). A presença dos nectários pré-florais permite atrair formigas  
12 desde o início da etapa reprodutiva, coincidindo com o momento de crescimento das novas  
13 folhas e botões.

14 A variação do volume e concentração encontrada em todos os estágios é característica  
15 de néctar que está exposto ao ambiente, e assim, pode sofrer influência da temperatura e  
16 umidade circundantes (Koptur, 1994, Gaffal, 2012). Entretanto, pode-se observar que durante  
17 o início do desenvolvimento do fruto (NP1) ocorre a maior produção de néctar, que  
18 corresponde com sua fase de maior vulnerabilidade. Tal como observado em estudos  
19 anteriores (*e.g.*, Falcão *et al.* 2014; Jones & Koptur 2015), possivelmente ocorre um  
20 investimento diferencial de energia para a proteção dos frutos em fase inicial de  
21 desenvolvimento, assegurando a presença de formigas neste estágio (Bentley, 1977b).  
22 Também observamos uma diminuição na secreção de néctar na medida que o fruto avançava  
23 o desenvolvimento. A secreção foi quase nula em frutos na fase de pré-maturação e dispersão,  
24 o que também levou a uma redução ou mesmo ausência na taxa de visita das formigas. Estas  
25 mudanças no padrão de secreção por parte dos nectários, também foi encontrada em *Alibertia*  
26 *verrucosa* (Rubiaceae) (Falcão *et al.*, 2014), e essa redução gradual na secreção pode estar  
27 relacionada ao fato das formigas poderem influenciar negativamente no consumo dos frutos  
28 diminuindo a taxa de visitação dos dispersores (veja Dáttilo *et al.* 2016).

1 Manter o nectário pós-floral ativo, pode ser importante naqueles ramos cuja maioria  
2 das flores não foi polinizada eficientemente, logo teria menor atratividade para as formigas.  
3 Nesse caso, os nectários pós-florais seriam um complemento para a atração de formigas por  
4 um tempo mais prolongado, e a possível reabsorção neste estágio do nectário possibilitar a  
5 reciclagem de metabolitos utilizados na secreção de néctar nas horas de menor atividade das  
6 formigas.

7 Não existe mudança no tipo de açúcar que compõe o néctar entre as fases floral e os  
8 estágios pós-florais, ainda que nesses estágios o néctar esteja exposto ao ambiente e à  
9 hidrólise da sacarose (Koptur, 1994). Isso demonstra que o néctar atrativo para as formigas  
10 pode ser composto tanto por sacarose ou hexoses. Entretanto, essa atratividade depende  
11 principalmente da mistura do açúcar com diferentes aminoácidos existindo preferência de  
12 néctar com aminoácidos sobre o néctar composto unicamente por açúcar (Smith *et al.*, 1990,  
13 Lanza *et al.*, 1993, Blüthgen & Fiedler, 2004, González-Teuber & Heil, 2009, Grasso *et al.*,  
14 2015).

15 Plantas podem investir aproximadamente 10% da energia obtida através da  
16 fotossíntese para a sua reprodução (Mooney, 1972). Isso significa que uma perda de 10% da  
17 área total de folha pode afetar sua reprodução, já que os recursos para tal fim começam a  
18 diminuir proporcionalmente. Nossos resultados mostram que mesmo em plantas com  
19 formigas, aqueles ramos que não oferecem recurso (ramos vegetativos) sofrem um maior dano  
20 foliar que aqueles ramos com nectários. Visto que os ramos funcionam como módulos  
21 independentes na planta, isso evidencia importância da proteção das folhas pertencentes aos  
22 ramos com frutos em desenvolvimento. As formigas levaram a uma diminuição de 2% a 7%  
23 dos danos infligidos às folhas pelos herbívoros, o que demonstra que o conjunto das diferentes  
24 espécies de formigas atua eficientemente na proteção das folhas (Elias & Gelband, 1975,  
25 Rosumek *et al.*, 2009, Nascimento & Del-Claro, 2010, Del-Claro *et al.*, 2013). Embora exista  
26 diferença na herbivoria foliar entre os tratamentos, por que plantas sem formigas tem menor  
27 dano foliar em ramos com nectários? Provavelmente, isso se deva a presença de predadores  
28 alados, como *Polistes* sp., que podem acessar os nectários de plantas isoladas de formigas. De  
29 fato, outros estudos têm demonstrado que vespas visitantes de NEFs podem ser efetivas na  
30 proteção de plantas contra herbívoros (Alves-Silva *et al.*, 2013, Alves-Silva & Del-Claro,  
31 2016b).

32 Entretanto, tal como observado em outros estudos com *T. formosa*, as formigas não  
33 ofereceram proteção contra os predadores de sementes (Santos & Del-Claro 2001, Veiga,  
34 2016). O mesmo também é observado para outra espécie de Rubiaceae (Del-Claro *et al.*,  
35 2013) e para a Bromeliaceae *Dyckia floribunda* (Vesprini, Galetto & Bernardello, 2003).

1 Porém, em outros casos, como observado em *Bixa orellana* (Bixaceae), formigas podem ser  
2 bastante eficientes e aumentarem a produção de sementes por frutos (Bentley, 1977b).

3 No caso de *T. formosa*, a ausência de efetividade das formigas contra os predadores de  
4 sementes pode ser devido à segregação espacial entre formigas e predadores na utilização dos  
5 frutos. O fato das formigas estarem predominante sobre os nectários na porção superior do  
6 fruto, os principais predadores de sementes fazem a ovoposição na porção basal. No caso de  
7 espécies que possuem nectários ao longo de todo o pericarpo do fruto, o que obriga as  
8 formigas a patrulharem no fruto como um todo, *e.g.*, *Erythrina speciosa* (Fabaceae) e  
9 *Crescentia* sp. (Bignoneaceae), a presença de formigas afeta sobremaneira o sucesso  
10 reprodutivo das plantas aumentando a produção de frutos e sementes (Elias & Prance, 1978,  
11 Paiva, 2009). Porém, o fato de *Tocoyena formosa* utilizar-se de um mesmo órgão para  
12 cumprir distintas funções, representa uma estratégia muito eficaz, que se não tem um efeito  
13 direto sobre a produção de sementes, certamente deve afetar o êxito reprodutivo final  
14 possibilitado que a planta tenha maior área fotossinteticamente ativa, que possibilita a produção  
15 de mais frutos ou sementes com maior vigor. Estudos futuros devem considerar o efeito das  
16 formigas também no vigor das sementes, visto que plantas com menor dano foliar podem  
17 investir mais na formação das sementes, melhorando características como sua biomassa.

18

## REFERENCIAS

- Alma, AM, Pol, RG, Pacheco, LF, Vázquez, DP. 2015.** No Defensive Role of Ants throughout a Broad Latitudinal and Elevational Range of a Cactus. *Biotropica*.
- Alves-Silva, E, Del-Claro, K. 2016a.** On the inability of ants to protect their plant partners and the effect of herbivores on different stages of plant reproduction. *Austral Ecology* **41**: 263-272.
- Alves-Silva, E, Del-Claro, K. 2016b.** Wasps are better plant-guards than ants in the extrafloral nectaried shrub *Ouratea spectabilis* (Ochnaceae). *Sociobiology* **63**: 705-711.
- Alves-Silva, E, Barônio, GJ, Torezan-Silingardi, HM, Del-Claro, K. 2013.** Foraging behavior of *Brachygastra lecheguana* (Hymenoptera: Vespidae) on *Banisteriopsis malifolia* (Malpighiaceae): Extrafloral nectar consumption and herbivore predation in a tending ant system. *Entomological Science* **16**: 162-169.
- Amorim, FW, Oliveira, PE. 2006.** Estrutura sexual e ecologia reprodutiva de *Amaioua guianensis* Aubl.(Rubiaceae), uma espécie dióica de formações florestais de cerrado. *Revista Brasileira de Botânica* **29**: 353-362.
- Aranda-Rickert, A, Diez, P, Marazzi, B. 2014.** Extrafloral nectar fuels ant life in deserts. *AoB plants* **6**: plu068.
- Baker, H, Baker, I. 1973.** Amino-acids in nectar and their evolutionary significance.
- Baker, HG, Opler, PA, Baker, I. 1978.** A comparison of the amino acid complements of floral and extrafloral nectars. *Botanical Gazette*: 322-332.
- Belchior, C, Sendoya, SF, Del-Claro, K. 2016.** Temporal Variation in the Abundance and Richness of Foliage-Dwelling Ants Mediated by Extrafloral Nectar. *PloS one* **11**: e0158283.
- Bentley, BL. 1977a.** Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards. *Annual Review of Ecology and Systematics*: 407-427.
- Bentley, BL. 1977b.** The Protective Function of Ants Visiting the Extrafloral Nectaries of *Bixa Orellana* (Bixaceae). *Journal of Ecology* **65**: 27-38.
- Bernardello, G. 2007.** A systematic survey of floral nectaries. *Nectaries and nectar*. Springer: Springer Netherlands.
- Blüthgen, N, Fiedler, K. 2004.** Preferences for sugars and amino acids and their conditionality in a diverse nectar-feeding ant community. *Journal of Animal Ecology* **73**: 155-166.
- Bronstein, JL. 1998.** The Contribution of Ant-Plant Protection Studies to Our Understanding of Mutualism1. *Biotropica* **30**: 150-161.
- Bronstein, JL, Alarcón, R, Geber, M. 2006.** The evolution of plant–insect mutualisms. *New Phytologist* **172**: 412-428.
- 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.
- CEPAGRI, Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura. 2015.** Clima dos Municípios Paulistas. Disponível em <http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-dos-municipios-paulistas.html> Acesso julho 2016)
- CEPAGRI, Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura. 2015.** Clima dos Municípios Paulistas. Disponível em <http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-dos-municipios-paulistas.html> Acesso julho 2016)
- Costa, FMCB, Oliveira-Filho, AT, Oliveira, PS. 1992.** The role of extrafloral nectaries in *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae) in limiting herbivory: an experiment of ant protection in cerrado vegetation. *Ecological Entomology* **17**: 363-365.
- Dáttilo, W, Aguirre, A, Flores-Flores, R, Fagundes, R, Lange, D, García-Chávez, J, Del-Claro, K, Rico-Gray, V. 2015.** Secretory activity of extrafloral nectaries shaping multitrophic ant-plant-herbivore interactions in an arid environment. *Journal of arid environments* **114**: 104-109.

- 1 **Dáttilo, W, Aguirre, A, De la Torre, PL, Kaminski, LA, García-Chávez, J, Rico-Gray, V.**  
2 **2016.** Trait-mediated indirect interactions of ant shape on the attack of caterpillars and fruits.  
3 *Biology Letters* **12**.
- 4 **Del-Claro, K, Berto, V, Réu, W. 1996.** Effect of herbivore deterrence by ants on the fruit set  
5 of an extrafloral nectary plant, *Qualea multiflora* (Vochysiaceae). *Journal of Tropical Ecology*  
6 **12**: 887-892.
- 7 **Del-Claro, K, Guillermo-Ferreira, R, Zardini, H, Almeida, EM, Torezan-Silingardi,**  
8 **HM. 2013.** Ants visiting the post-floral secretions of pericarpial nectaries in *Palicourea rigida*  
9 (*Rubiaceae*) provide protection against leaf herbivores but not against seed parasites.  
10 *Sociobiology* **60**: 217-221.
- 11 **Delprete, PG, Jardim, JG. 2012.** Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian  
12 *Rubiaceae*: an overview about the current status and future challenges. *Rodriguésia* **63**: 101-  
13 128.
- 14 **Diaz-Castelazo, C, Rico-Gray, V, Ortega, F, Angeles, G. 2005.** Morphological and  
15 secretory characterization of extrafloral nectaries in plants of coastal Veracruz, Mexico.  
16 *Annals of Botany* **96**: 1175-1189.
- 17 **Elias, TS, Gelband, H. 1975.** Nectar: Its Production and Functions in Trumpet Creeper.  
18 *Science* **189**: 289-291.
- 19 **Elias, TS, Prance, GT. 1978.** Nectaries on the fruit of *Crescentia* and other *Bignoniaceae*.  
20 *Brittonia* **30**: 175-181.
- 21 **Evert, RF 2006.** *Esau's plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their*  
22 *structure, function, and development*: John Wiley & Sons.
- 23 **Falcão, J, Dáttilo, W, Izzo, T. 2014.** Temporal variation in extrafloral nectar secretion in  
24 different ontogenic stages of the fruits of *Alibertia verrucosa* S. Moore (*Rubiaceae*) in a  
25 Neotropical savanna. *Journal of Plant Interactions* **9**: 137-142.
- 26 **Freitas, L, Galetto, L, Bernardello, G, Paoli, AA. 2000.** Ant exclusion and reproduction of  
27 *Croton sarcopetalus* (*Euphorbiaceae*). *Flora (Jena)* **195**: 398-402.
- 28 **Gaffal, KP. 2012.** How common is the ability of extrafloral nectaries to produce nectar  
29 droplets, to secrete nectar during the night and to store starch? *Plant Biology* **14**: 691-695.
- 30 **Galetto, L, Bernardello, G. 2005.** Rewards in flowers: Nectar. *Practical Pollination Biology*  
31 (*A. Dafni, PG Kevan & BC Husband, eds.*). *Enviroquest, Ltd. Cambridge, Ontario*.
- 32 **González-Teuber M, Heil M. 2009.** The Role of Extrafloral Nectar Amino Acids for the  
33 Preferences of Facultative and Obligate Ant Mutualists. *Journal of Chemical Ecology* **35**:  
34 459-468.
- 35 **Gracie, C. 1991.** Observation of Dual Function of Nectaries in *Ruellia radicans* (Nees)  
36 Lindau (*Acanthaceae*). *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **118**: 188-190.
- 37 **Grasso, D, Pandolfi, C, Bazihizina, N, Nocentini, D, Nepi, M, Mancuso, S. 2015.**  
38 Extrafloral-nectar based partner manipulation in plant-ant relationship. *AoB plants*: plv002.
- 39 **Holland, J, Chamberlain, S, Horn, K. 2010.** Temporal variation in extrafloral nectar  
40 secretion by reproductive tissues of the senita cactus, *Pachycereus schottii* (*Cactaceae*), in the  
41 Sonoran Desert of Mexico. *Journal of arid environments* **74**: 712-714.
- 42 **Janzen, DH. 1966.** Coevolution of Mutualism Between Ants and Acacias in Central America.  
43 *Evolution* **20**: 249-275.
- 44 **Jones, IM, Koptur, S. 2015.** Dynamic extrafloral nectar production: The timing of leaf  
45 damage affects the defensive response in *Senna mexicana* var. *chapmanii* (*Fabaceae*).  
46 *American journal of botany* **102**: 58-66.
- 47 **Keeler, KH. 1981.** Function of *Mentzelia nuda* (*Loasaceae*) postfloral nectaries in seed  
48 defense. *American journal of botany*: 295-299.
- 49 **Koptur, S. 1979.** Facultative Mutualism between Weedy Vetches Bearing Extrafloral  
50 Nectaries and Weedy Ants in California. *American journal of botany* **66**: 1016-1020.
- 51 **Koptur, S. 1984.** Experimental evidence for defense of *Inga* (*Mimosoideae*) saplings by ants.  
52 *Ecology*: 1787-1793.

- 1 **Koptur, S. 1994.** Floral and extrafloral nectars of Costa Rican Inga trees: a comparison of  
2 their constituents and composition. *Biotropica*: 276-284.
- 3 **Koptur, S. 2005.** Nectar as fuel for plant protectors. *Plant-provided food for carnivorous*  
4 *insects: a protective mutualism and its applications*. Cambridge University Press, Cambridge,  
5 UK. Felix L. Wäckers, Paul C. J. van Rijn and Jan Bruin ed.
- 6 **Lanza, J. 1988.** Ant Preferences for Passiflora Nectar Mimics That Contain Amino Acids.  
7 *Biotropica* **20**: 341-344.
- 8 **Lanza, J, Vargo, EL, Pulim, S, Chang, YZ. 1993.** Preferences of the Fire Ants *Solenopsis*  
9 *invicta* and *S. geminata* (Hymenoptera: Formicidae) for Amino Acid and Sugar Components  
10 of Extrafloral Nectars. *Environmental Entomology* **22**: 411-417.
- 11 **Mooney, HA. 1972.** The Carbon Balance of Plants. *Annual Review of Ecology and*  
12 *Systematics* **3**: 315-346.
- 13 **Nascimento, EA, Del-Claro, K. 2010.** Ant visitation to extrafloral nectaries decreases  
14 herbivory and increases fruit set in *Chamaecrista debilis* (Fabaceae) in a Neotropical savanna.  
15 *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **205**: 754-756.
- 16 **Oliveira, PS, Freitas, AV. 2004.** Ant–plant–herbivore interactions in the neotropical cerrado  
17 savanna. *Naturwissenschaften* **91**: 557-570.
- 18 **Oliveira, PS, Leitao-Filho, HF. 1987.** Extrafloral nectaries: their taxonomic distribution and  
19 abundance in the woody flora of cerrado vegetation in Southeast Brazil. *Biotropica*: 140-148.
- 20 **Pacini, E, Nepi, M. 2007.** Nectar production and presentation. *Nectaries and nectar*.  
21 Springer: Springer Netherlands.
- 22 **Paiva, EAS. 2009.** Ultrastructure and post-floral secretion of the pericarpial nectaries of  
23 *Erythrina speciosa* (Fabaceae). *Annals of Botany*.
- 24 **Queiroz, JA, Quirino, ZG, Machado, IC. 2015.** Floral traits driving reproductive isolation  
25 of two co-flowering taxa that share vertebrate pollinators. *AoB plants* **7**: plv127.
- 26 **Ratter, J, Bridgewater, S, Ribeiro, J. 2003.** Analysis of the floristic composition of the  
27 Brazilian cerrado vegetation III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. *Edinburgh*  
28 *Journal of Botany* **60**: 57-109.
- 29 **Rosumek, FB, Silveira, FA, Neves, FdS, Barbosa, NPdU, Diniz, L, Oki, Y, Pezzini, F,**  
30 **Fernandes, GW, Cornelissen, T. 2009.** Ants on plants: a meta-analysis of the role of ants as  
31 plant biotic defenses. *Oecologia* **160**: 537-549.
- 32 **Santos, JC, Del-Claro, K. 2001.** Interactions between ants, herbivores and extrafloral  
33 nectaries in *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlechtd.) K. Schum.(Rubiaceae) in Cerrado.  
34 *Revista Brasileira de Zoociências* **3**: 35-44.
- 35 **Silberbauer-Gottsberger, I, Gottsberger, G, Ehrendorfer, F. 1992.** Hybrid speciation and  
36 radiation in the neotropical woody genus *Tocoyena* (Rubiaceae). *Plant Systematics and*  
37 *Evolution* **181**: 143-169.
- 38 **Smith, LL, Lanza, J, Smith, GC. 1990.** Amino Acid Concentrations in Extrafloral Nectar of  
39 *Impatiens Sultani* Increase after Simulated Herbivory. *Ecology* **71**: 107-115.
- 40 **Tanowitz, BD, Koehler, DL. 1986.** Carbohydrate Analysis of Floral and Extra-floral Nectars  
41 in Selected Taxa of *Sansevieria* (Agavaceae). *Annals of Botany* **58**: 541-545.
- 42 **Vasconcelos HL. 1991.** Mutualism between *Maieta guianensis* Aubl., a myrmecophytic  
43 melastome, and one of its ant inhabitants: ant protection against insect herbivores. *Oecologia*  
44 **87**: 295-298.
- 45 **Veiga PA. 2016.** Interações multitróficas: O efeito de formigas, besouros e mariposas sobre a  
46 reprodução e a morfologia floral de *Tocoyena formosa* (Rubiaceae). Unpublished Master,  
47 UNESP, Campus Botucatu.
- 48 **Vesprini, JL, Galetto, L, Bernardello, G. 2003.** The beneficial effect of ants on the  
49 reproductive success of *Dyckia floribunda* (Bromeliaceae), an extrafloral nectary plant.  
50 *Canadian Journal of Botany* **81**: 24-27.
- 51 **Wolff, D. 2006.** Nectar sugar composition and volumes of 47 species of Gentianales from a  
52 southern Ecuadorian montane forest. *Annals of Botany* **97**: 767-777.

- 1 **Yamashiro A, Yamashiro T. 2008.** Utilization on extrafloral nectaries and fruit domatia of
- 2 *Canavalia lineata* and *C. cathartica* (Leguminosae) by ants. *Arthropod-Plant Interactions* **2**: 1-
- 3 8.

**Tabela 1.** Efeito de remoção do néctar sobre a produção total de néctar em nectários pós-florais (NPósF) em *Tocoyena formosa*.

Grupo de flores	Horário de amostragem						Quantidade total produzida
	22h00	02h00	06h00	10h00	14h00	18h00	
<b>6</b>							
mg	0.12 ± 0.15	0.04 ± 0.02	0.03±0.04	0.03 ± 0.05	0	0	1.36 ± 0.61
µl	2.97 ± 3.61	1.18 ± 0.66	1.22 ± 1.17	1.00 ± 1.65	0	0	37.85 ± 15.43
%	4 ± 0.89	1.51 ± 0.41	2.00 ± 0.63	1.25 ± 1.50	0	0	
<b>5</b>							
mg		0.12 ± 0.08	0.08 ± 0.08	0.03 ± 0.06	0.07 ± 0.18	0.03 ± 0.07	0.59 ± 0.11
µl		1.86 ± 1.43	1.43 ± 1.64	0.25 ± 0.43	0.18 ± 0.45	0.07 ± 0.18	14.68 ± 1.83
%		4.4 ± 2.31	5.00 ± 4.34	4.33 ± 7.51	5.83 ± 14.29	5.83 ± 14.29	
<b>4</b>							
mg			0.07 ± 0.15	0.01 ± 0.02	0	0.03 ± 0.07	0.31 ± 0.21
µl			1.34 ± 2.70	0.15 ± 0.24	0	0.27 ± 0.65	6.35 ± 3.78
%			2.00 ± 2.35	2.17 ± 3.49	0	2.67 ± 6.53	
<b>3</b>							
mg				0.03 ± 0.05	0	0.03 ± 0.08	2.15 ± 0.36
µl				0.52 ± 0.84	0	0.04 ± 0.11	27.50 ± 3.93
%				1.67 ± 2.66	0	9.50 ± 23.27	
<b>2</b>							
mg					0	0.02 ± 0.04	1.26 ± 0.45
µl					0	0.09 ± 0.21	17.43 ± 5.76
%					0	2.83 ± 6.94	
<b>1</b>							
mg						0.02 ± 0.05	0.76 ± 0.12
µl						0.07 ± 0.18	10.01 ± 1.41
%						4.17 ± 10.21	

\*Os dados representam: média ± DS da quantidade de açúcar (mg), do volume (µl) e da concentração (% massa/massa) produzido por grupo de nectário (n= 6 nectários em cada horário).

**Tabela 2.** Efeito de remoção do néctar sobre a produção total de néctar em nectários pericarpiais iniciais (NP1) em *Tocoyena formosa*.

Grupo de flores	Horário de amostragem							Quantidade total produzida
	22h00	02h00	06h00	10h00	14h00	18h00	22h00	
<b>7</b>								
mg	0.27 ± 0.22	0.36 ± 0.32	0.13 ± 0.11	0.08 ± 0.23	0.14 ± 0.17	0.44 ± 0.37	0.32 ± 0.28	12.46 ± 1.21
µl	1.27 ± 1	2.09 ± 1.33	1.36 ± 1.14	0.09 ± 0.27	0.21 ± 0.24	0.71 ± 0.68	1.13 ± 0.92	48.18 ± 3.52
%	14.44 ± 8.75	12 ± 7.78	7.50 ± 4.25	7.22 ± 21.67	28.33 ± 33.83	37.80 ± 27.40	18.20 ± 13.16	
<b>6</b>								
mg		0.41 ± 0.36	0.27 ± 0.24	0.14 ± 0.19	0.28 ± 0.36	0.49 ± 0.63	0.44 ± 0.42	20.13 ± 1.95
µl		2.56 ± 1.96	2.07 ± 1.97	0.42 ± 0.78	0.37 ± 0.49	0.96 ± 1.32	1.63 ± 1.66	80.16 ± 6.74
%		10.50 ± 7.92	7.56 ± 5.90	16.80 ± 24.50	30.10 ± 32.12	29.60 ± 26.45	15.10 ± 13.35	
<b>5</b>								
mg			0.52 ± 0.44	0.03 ± 0.09	0.20 ± 0.25	0.45 ± 0.35	0.42 ± 0.33	13.61 ± 1.02
µl			4.29 ± 3.23	0.03 ± 0.11	0.24 ± 0.29	0.72 ± 0.57	1.49 ± 1.05	59.84 ± 4.02
%			10.11 ± 6.90	6.70 ± 21.19	32.20 ± 33.99	41.50 ± 25.78	22.10 ± 12.51	
<b>4</b>								
mg				0.38 ± 0.68	0.14 ± 0.28	0.47 ± 0.50	0.57 ± 0.52	12.70 ± 1.65
µl				1.21 ± 2.55	0.18 ± 0.32	1 ± 1.05	1.80 ± 1.22	35.08 ± 4.15
%				15.89 ± 21.32	16.13 ± 29.86	27.89 ± 23.36	20.38 ± 10.86	
<b>3</b>								
mg					0.28 ± 0.42	0.41 ± 0.50	0.40 ± 0.38	10.94 ± 1.20
µl					0.33 ± 0.48	0.71 ± 0.83	1.29 ± 0.97	23.27 ± 2.13
%					32.30 ± 34.07	31.90 ± 24.09	21.30 ± 12.95	
<b>2</b>								
mg						1.85 ± 1.29	0.81 ± 1.34	26.63 ± 1.67
µl						2.44 ± 1.76	1.75 ± 2.42	41.88 ± 2.77
%						52.40 ± 19.64	21 ± 17.64	
<b>1</b>								
mg							1.04 ± 1.48	10.44 ± 1.48
µl							2.34 ± 3.11	23.44 ± 3.11
%							18.30 ± 21.63	

\*Os dados representam: média ± DS da quantidade de açúcar (mg), do volume (µl) e da concentração (% massa/massa) produzido por grupo de nectário (n=10 nectários em cada horário).

**Tabela 3.** Efeito de remoção do néctar sobre a produção total de néctar em nectários pericarpias intermediários (NP2) em *Tocoyena formosa*.

Grupo de flores	Horário de amostragem							Quantidade total produzida
	22h00	02h00	06h00	10h00	14h00	18h00	22h00	
<b>7</b>								
mg	0.19 ± 0.18	0.20 ± 0.22	0.12 ± 0.16	0.16 ± 0.22	0.15 ± 0.26	0.55 ± 0.73	0.27 ± 0.16	5.69 ± 1.26
µl	1.29 ± 1.03	1.69 ± 1.63	1.09 ± 1.53	0.57 ± 0.93	0.19 ± 0.32	1.23 ± 1.38	1.45 ± 0.68	26.39 ± 3.17
%	9.29 ± 7.43	7.14 ± 5.43	4.57 ± 5.71	13.30 ± 22.32	20.58 ± 31.91	23.60 ± 29.11	17 ± 5.70	
<b>6</b>								
mg		0.29 ± 0.52	0.14 ± 0.22	0.22 ± 0.49	0.05 ± 0.12	0.26 ± 0.37	0.39 ± 0.76	3.76 ± 1.57
µl		2.26 ± 4.59	1.07 ± 1.83	1.29 ± 2.87	0.10 ± 0.15	0.29 ± 0.43	1.24 ± 2.26	17.90 ± 7.68
%		7.86 ± 11.68	3.50 ± 5.50	3.20 ± 7.16	10.17 ± 24.90	28.71 ± 35.85	7.71 ± 13.38	
<b>5</b>								
mg			0.18 ± 0.46	0	0.19 ± 0.34	0.58 ± 0.84	0.08 ± 0.15	3.83 ± 2.21
µl			1.10 ± 2.92	0	0.28 ± 0.52	1.17 ± 1.70	0.53 ± 0.85	13.34 ± 7.70
%			2.14 ± 5.67	0	15.8 ± 27.21	20.67 ± 22.69	5 ± 6.81	
<b>4</b>								
mg				0.12 ± 0.19	0	0.20 ± 0.41	0.26 ± 0.39	2.30 ± 1.15
µl				0.49 ± 0.76	0	0.51 ± 1.03	1.09 ± 1.82	8.39 ± 4.19
%				8.80 ± 12	0	10.83 ± 16.86	13.71 ± 13.44	
<b>3</b>								
mg					0.36 ± 0.55	0.41 ± 0.49	0.14 ± 0.28	6.38 ± 1.12
µl					0.41 ± 0.64	0.67 ± 0.82	0.6 ± 1.08	11.79 ± 2.10
%					36.86 ± 34.52	30.71 ± 30.82	5.93 ± 10.49	
<b>2</b>								
mg						0.16 ± 0.27	0	0.47 ± 0.27
µl						0.18 ± 0.31	0	0.54 ± 0.31
%						22 ± 38.11	0	
<b>1</b>								
mg							0	0
µl							0	0
%							0	

\*Os dados representam: média  $\pm$  DS da quantidade de açúcar (mg), do volume ( $\mu$ l) e da concentração (% massa/massa) produzido por grupo de nectário (n=7 nectários em cada horário).

**Tabela 4.** Efeito de remoção do néctar sobre a produção total de néctar em nectários pericarpiais finais (NP3) em *Tocoyena formosa*.

Grupo de flores	Horário de amostragem						Quantidade total produzida	
	22h00	02h00	06h00	10h00	14h00	18h00		22h00
<b>7</b>								
mg	0	0.01 ± 0.02	0.13 ± 0.27	0	0	0.14 ± 0.2	0	0.84
µl	0	0.11 ± 0.24	0.14 ± 0.29	0	0.08 ± 0.19	0.19 ± 0.27	0	0.94
%	0	1.40 ± 3.13	17.25 ± 34.50	0	0	23.80 ± 32.68	0	
<b>6</b>								
mg		0	0	0	0	0	0	0
µl		0	0	0	0	0	0	0
%		0	0	0	0	0	0	
<b>5</b>								
mg			0.01 ± 0.02	0	0	0	0	0
µl			0.18 ± 0.28	0	0.06 ± 0.13	0	0	0
%			1.50 ± 3	0	0	0	0	
<b>4</b>								
mg				0	0	0	0	0
µl				0	0	0	0	0
%				0	0	0	0	
<b>3</b>								
mg					0	0	0	0
µl					0	0	0	0
%					0	0	0	
<b>2</b>								
mg						0.15 ± 0.31	4.67 ± 8.08	0
µl						0.22 ± 0.33	1.04 ± 1.80	0
%						15.75 ± 31.50	0.15 ± 0.27	
<b>1</b>								
mg							0	0
µl							0	0
%							0	

\*Os dados representam: média ± DS da quantidade de açúcar (mg), do volume (µl) e da concentração (% massa/massa) produzido por grupo de nectário (n= 5 nectários em cada horário).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em regiões tropicais e temperadas é comum encontrar diferentes espécies de plantas interagindo com formigas através de interações do tipo mutualismo de defesa (Bronstein, 1998; Rosumek *et al.*, 2009). Essa interação é mediada principalmente pela ocorrência de nectários extraflorais (Elias & Gelband, 1975, Bentley, 1977b, Baker, Opler & Baker, 1978, Koptur, 1984, Del-Claro *et al.*, 1996, Alves-Silva & Del-Claro, 2016a). No Cerrado o mutualismo formiga-planta está amplamente distribuído (Oliveira & Leitao-Filho, 1987), e ocorre principalmente para a proteção de folhas, frutos e sementes em desenvolvimento (Belchior *et al.*, 2016). Nesse trabalho nós realizamos uma abordagem ampla sobre o biologia e ecologia do nectário extraflorais de *Tocoyena formosa* em seus distintos estágios, e contribuimos com a descrição de um tipo de nectário ainda não conhecido, o nectário pré-floral.

No **capítulo I** demonstramos anatomicamente que o nectário presente em *T. formosa* durante toda a etapa reprodutiva possui características de um tecido secretor funcional, e que sofre modificações estruturais que acompanham cada um dos estágios, sendo, portanto, um órgão multivalente. A presença de um órgão multifuncional também poderia estar relacionada com a economia de energia na produção de novas estruturas relacionadas à produção de néctar e ao mutualismo defensivo contra atividade de herbívoros (Keeler, 1981). As modificações ocorrem em todos os componentes do nectário: a cutícula sofre espessamento quando o nectário fica exposto ao ambiente e é acompanhado pela deposição de material cuticular nas camadas do parênquima subjacente à epiderme formando um epitélio cuticular, que é uma característica de nectários expostos ao ambiente (Evert, 2006). Também encontramos a formação de falanges cuticulares que acompanharam o crescimento do nectário durante a expansão do fruto. Na epiderme secretora dos estágios floral, pós-floral e pericarpial existem estômatos encarregados da externalização do néctar e também células com projeções da parede, o que permite supor que o néctar pode ser reabsorvido (Stpiczyńska *et al.*, 2012). Entretanto o nectário pré-floral não apresenta tais estômatos, o que levaria pensar numa secreção por lise celular (Vesprini *et al.* 1999). O nectário encontra-se rodeado por feixes vasculares compostos predominantemente por floema, o que permite sugerir que grande quantidade de açúcares que compõem o néctar, o que pôde ser corroborado nas análises do Capítulo 2. Os testes histoquímicos mostram que além de açúcares, o néctar pode ser constituído por outras substâncias como lipídios, alcaloides, proteínas que podem influenciar na interação da planta com os visitantes do nectário (Fahn 1979, 2000; Pacini *et al.* 2003). Também observamos que ao longo do desenvolvimento do fruto ocorre o aumento da quantidade de cristais de oxalato de cálcio, tanto no disco nectarífero como no tecido do fruto, que contribuiria como barreira mecânica contra os predadores de sementes como também para que o nectário não seja danificado, e assim continuar secretando néctar ao longo do desenvolvimento do fruto (Franceschi & Nakata, 2005).

No **Capítulo 2**, pela primeira vez analisamos a dinâmica secreção do néctar nos distintos estágios dos nectários de uma planta considerando efeito das remoções sucessivas. O padrão de secreção é similar ao observado em estudo prévios em outras espécies (Bentley, 1977a, Bentley, 1977b, Gaffal, 2012, Aranda-Rickert et al., 2014), o qual corresponde com maior atividade dos nectários durante a fase inicial de desenvolvimento do fruto. Essa fase é crítica para o sucesso reprodutivo da planta, visto que é período mais vulnerável de desenvolvimento. Por outro lado, houve uma diminuição substancial da secreção de néctar no período no qual o fruto estava completamente desenvolvido, porém precedente à maturação e dispersão. A planta, portanto, investe energia na produção de néctar, e conseqüente atração de formigas durante todo o período de desenvolvimento do fruto (Falcão *et al.* 2014; Jones & Koptur 2015). Porém deixa de produzir o néctar quando os frutos estão maduros de forma a não interferir no processo de consumo do fruto e dispersão de sementes (Dáttilo *et al.*, 2016). Assim como observado em vários estudos anteriores em outras espécies, a associação de *T. formosa* com formigas é bastante eficiente contra a atividade de herbívoros foliares (Elias & Gelband, 1975, Rosumek *et al.*, 2009, Nascimento & Del-Claro, 2010, Del-Claro *et al.*, 2013,). Entretanto, as formigas não são efetivas na proteção das sementes contra a atividade de predadores. Possivelmente, isso ocorre pela separação espacial de utilização do fruto entre formigas e predadores (Bentley, 1977b, Alma *et al.*, 2015).

Ainda que não tenha havido mudança na composição química dos açúcares presentes no néctar entre os distintos estágios dos nectários, análises adicionais (ora em curso) são necessárias para avaliar se existem mudanças em relação quantidade e composição de aminoácidos presentes no néctar de *T. formosa*, o que refletiria o investimento na proteção das folhas, que estão diretamente relacionadas com a quantidade de fotoassimilados que serão utilizados para desenvolvimento dos frutos, assim como para realizar os diferentes processos necessários para a sobrevivência da planta (Mooney, 1972).

A presença dos nectários pré-florais, que são descritos pela primeira vez nesse estudo, sugere que a formigas têm um papel muito importante desde o início da fase reprodutiva, quando a planta está rebrotando e as folhas estão na fase mais vulnerável do desenvolvimento. A queda prematura da corola do botão em fase inicial de desenvolvimento, que dá origem a este nectário, possivelmente é causada pelo mau funcionamento ou baixa quantidade de coléteres na face adaxial das sépalas, ou mesmo pela posição que o botão floral ocupa no dicásio de dicásio, que levaria a uma restrição espacial que limita o crescimento e desenvolvimentos dos botões adjacentes.

Portanto, o presente estudo reúne aspectos anatômicos e ecológicos que permitem compreender melhor a interação mutualística planta-formiga no Cerrado, particularmente a interação facultativa entre *Tocoyena formosa* e diferentes espécies de formigas, o que sugere que

pressões seletivas contra a atividade de herbívoros podem originar estruturas, tais como o nectário pré-floral e o nectário multivalente, que vão além daquelas convencionalmente conhecidas.

## REFERÊNCIAS

- Alma, A.M., Pol, R.G., Pacheco, L.F., Vázquez, D.P. (2015) No Defensive Role of Ants throughout a Broad Latitudinal and Elevational Range of a Cactus. *Biotropica*.
- Alves-Silva, E., Del-Claro, K. (2016a) On the inability of ants to protect their plant partners and the effect of herbivores on different stages of plant reproduction. *Austral Ecology*, **41**(3), 263-272.
- Alves-Silva, E., Del-Claro, K. (2016b) Wasps are better plant-guards than ants in the extrafloral nectaried shrub *Ouratea spectabilis* (Ochnaceae). *Sociobiology*, **63**(1), 705-711.
- Alves-Silva, E., Barônio, G.J., Torezan-Silingardi, H.M., Del-Claro, K. (2013) Foraging behavior of *Brachygastra lecheguana* (Hymenoptera: Vespidae) on *Banisteriopsis malifolia* (Malpighiaceae): Extrafloral nectar consumption and herbivore predation in a tending ant system. *Entomological Science*, **16**(2), 162-169.
- Aranda-Rickert, A., Diez, P., Marazzi, B. (2014) Extrafloral nectar fuels ant life in deserts. *AoB plants*, **6**, plu068.
- Baker, H.G., Opler, P.A., Baker, I. (1978) A comparison of the amino acid complements of floral and extrafloral nectars. *Botanical Gazette*, 322-332.
- Belchior, C., Sendoya, S.F., Del-Claro, K. (2016) Temporal Variation in the Abundance and Richness of Foliage-Dwelling Ants Mediated by Extrafloral Nectar. *PloS one*, **11**(7), e0158283.
- Bentley, B.L. (1977a) Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 407-427.
- Bentley, B.L. (1977b) The Protective Function of Ants Visiting the Extrafloral Nectaries of *Bixa Orellana* (Bixaceae). *Journal of Ecology*, **65**(1), 27-38.
- Bronstein, J.L. (1998) The Contribution of Ant-Plant Protection Studies to Our Understanding of Mutualism1. *Biotropica*, **30**(2), 150-161.
- Dáttilo, W., Aguirre, A., De la Torre, P.L., Kaminski, L.A., García-Chávez, J., Rico-Gray, V. (2016) Trait-mediated indirect interactions of ant shape on the attack of caterpillars and fruits. *Biology Letters*, **12**(8).
- Del-Claro, K., Berto, V., Réu, W. (1996) Effect of herbivore deterrence by ants on the fruit set of an extrafloral nectary plant, *Qualea multiflora* (Vochysiaceae). *Journal of Tropical Ecology*, **12**(06), 887-892.
- Del-Claro, K., Guillermo-Ferreira, R., Zardini, H., Almeida, E.M., Torezan-Silingardi, H.M. (2013) Ants visiting the post-floral secretions of pericarpial nectaries in *Palicourea rigida* (Rubiaceae) provide protection against leaf herbivores but not against seed parasites. *Sociobiology*, **60**(3), 217-221.
- Elias, T.S., Gelband, H. (1975) Nectar: Its Production and Functions in Trumpet Creeper. *Science*, **189**(4199), 289-291.
- Evert, R.F. (2006) *Esau's plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development* John Wiley & Sons.
- Fahn, A. (1979) *Secretory tissues in plants*, London: Academic Press.
- Fahn, A. (2000) Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research*, **31**, 37-75.
- Falcão, J., Dáttilo, W., Izzo, T. (2014) Temporal variation in extrafloral nectar secretion in different ontogenic stages of the fruits of *Alibertia verrucosa* S. Moore (Rubiaceae) in a Neotropical savanna. *Journal of Plant Interactions*, **9**(1), 137-142.
- Franceschi, V.R., Nakata, P.A. (2005) Calcium Oxalate in plants: Formation and Function. *Annual Review of Plant Biology*, **56**(1), 41-71.
- Gaffal, K.P. (2012) How common is the ability of extrafloral nectaries to produce nectar droplets, to secrete nectar during the night and to store starch? *Plant Biology*, **14**(5), 691-695.

- Jones, I.M., Koptur, S. (2015) Dynamic extrafloral nectar production: The timing of leaf damage affects the defensive response in *Senna mexicana* var. *chapmanii* (Fabaceae). *American journal of botany*, **102**(1), 58-66.
- Keeler, K.H. (1981) Function of *Mentzelia nuda* (Loasaceae) postfloral nectaries in seed defense. *American journal of botany*, 295-299.
- Koptur, S. (1984) Experimental evidence for defense of *Inga* (Mimosoideae) saplings by ants. *Ecology*, 1787-1793.
- Mooney, H.A. (1972) The Carbon Balance of Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **3**, 315-346.
- 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**(11), 754-756.
- Oliveira, P.S., Leitao-Filho, H.F. (1987) Extrafloral nectaries: their taxonomic distribution and abundance in the woody flora of cerrado vegetation in Southeast Brazil. *Biotropica*, 140-148.
- Pacini, E., Nepi, M., Vesprini, L.J. (2003) Nectar biodiversity: a short review. *Plant Systematics and Evolution*, **238**(1), 7-21.
- Rosumek, F.B., Silveira, F.A., Neves, F.d.S., Barbosa, N.P.d.U., Diniz, L., Oki, Y., Pezzini, F., Fernandes, G.W., Cornelissen, T. (2009) Ants on plants: a meta-analysis of the role of ants as plant biotic defenses. *Oecologia*, **160**(3), 537-549.
- Santos, J.C., Del-Claro, K. (2001) Interactions between ants, herbivores and extrafloral nectaries in *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlechtd.) K. Schum.(Rubiaceae) in Cerrado. *Revista Brasileira de Zoociências*, **3**(1), 35-44.
- Stpiczyńska, M., Nepi, M., Zych, M. (2012) Secretion and composition of nectar and the structure of perigonal nectaries in *Fritillaria meleagris* L. (Liliaceae). *Plant Systematics and Evolution*, **298**(5), 997-1013.
- Vesprini, J.L., Nepi, M., Pacini, E. (1999) Nectary Structure, Nectar Secretion Patterns and Nectar Composition in Two *Helleborus* Species. *Plant biol (Stuttg)*, **1**(05), 560-568.