

SEBASTIAN FELIPE SENDOYA ECHEVERRY

**“VARIÇÃO ESPACIAL EM SISTEMAS MULTI-TRÓFICOS:
PLANTAS HOSPEDEIRAS E DEFESA CONTRA FORMIGAS EM
LEPIDÓPTEROS”**

**CAMPINAS
2012**

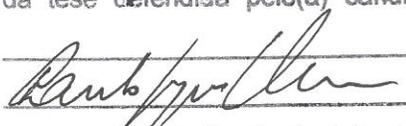
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



SEBASTIAN FELIPE SENDOYA ECHEVERRY

**“VARIÇÃO ESPACIAL EM SISTEMAS MULTI-TRÓFICOS: PLANTAS
HOSPEDEIRAS E DEFESA CONTRA FORMIGAS EM LEPIDÓPTEROS”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do título de Doutor em
Ecologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sergio Moreira Carvalho de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. André Victor Lucci Freitas

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Ec43v	<p>Sendoya Echeverry, Sebastian Felipe, 1980- Variação espacial em sistemas multi-tróficos: plantas hospedeiras e defesa contra formigas em lepidópteros / Sebastian Felipe Sendoya Echeverry. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador: Paulo Sergio Moreira Carvalho de Oliveira. Coorientador: André Victor Lucci Freitas. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Cerrados. 2. Nectários extraflorais. 3. Variação espacial. 4. Larva - Defesas. 5. Formiga. I. Oliveira, Paulo Sergio Moreira Carvalho de, 1957-. II. Freitas, André Victor Lucci, 1971-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p>
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Spatial variation in multi-trophic systems: host-plants and defense against ants in Lepidoptera

Palavras-chave em Inglês:

Cerrados

Extrafloral nectaries

Spatial variation

Larvae - Defenses

Ants

Área de concentração: Ecologia

Titulação: Doutor em Ecologia

Banca examinadora:

Paulo Sergio Moreira Carvalho de Oliveira [Orientador]

Lucas Augusto Kaminski

Sérvio Pontes Ribeiro

Martin Francisco Pareja

Paulo Inácio de Knecht López de Prado

Data da defesa: 27-08-2012

Programa de Pós Graduação: Ecologia

Campinas, 27 de Agosto de 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Sergio Moreira Carvalho de Oliveira

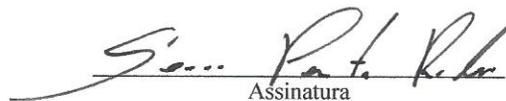


Assinatura

Prof. Dr. Alexander Vicente Christianini

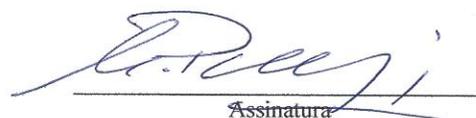
Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Pontes Ribeiro



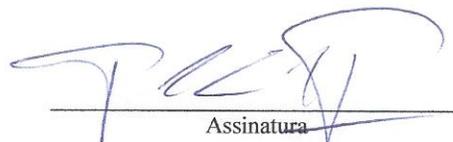
Assinatura

Prof. Dr. Martin Francisco Pareja



Assinatura

Prof. Dr. Paulo Inácio de Knecht López de Prado

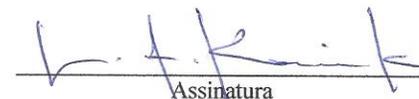


Assinatura

Prof. Dr. Rafael Silva Oliveira

Assinatura

Prof. Dr. Lucas Augusto Kaminski



Assinatura

Prof. Dr. Joao Vasconcellos Neto

Assinatura

Dedicado a minha sobrinha Manuela, quem chegou enquanto eu fazia esta tese. Quem sabe estas páginas um dia sirvam de inspiração para ela.

Dedicado também aos amigos que se foram durante este tempo (Diego e Sebastian), uma pequena homenagem pela marca que deixaram na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Este estudo assim como o processo inteiro do meu doutorado não poderia ter sido possível sem ajuda de muitas pessoas. Os frutos que este trabalho tem produzido até agora e os que possam vir depois se devem aos esforços de muitas pessoas. A lista é muito longa e já peço desculpas se alguma fica acidentalmente por fora.

Inicialmente quero agradecer a meu orientador o Prof. Paulo S. Oliveira. Ele me ofereceu sua amizade, sua confiança e seu exemplo como pessoa e pesquisador. Desde o mestrado ele abriu as portas de seu laboratório e de todo um mundo de conhecimento sobre as formigas e sobre o cerrado. O trabalho com ele tem me ajuda imensamente a crescer como pesquisador e a olhar para a natureza com clareza e entusiasmo. Sem sua excelente orientação este trabalho simplesmente não existiria. Quero agradecer também a meu co-orientador Prof. André L. Freitas, pelas inestimáveis contribuições ao planejamento e execução deste estudo. Quero agradecer especialmente pela sua amizade e seu grande interesse em me ajudar a melhorar cada dia tanto no âmbito profissional como pessoal.

Aos muitos amigos, colaboradores e ajudantes de campo que em acompanharam nas coletas de campo: Ao Adilson Moreira pela paciência e grande ajuda nas viagens para o cerrado com a “Toyota do Brown”; À Mayra Vidal que além de me ajudar no campo me ajudou com a criação das larvas no laboratório; Ao Helio Suarez Jr, quem também ajudou com a triagem do material biológico; A minha irmã Luana Sendoya que veio desde a Colômbia para me ajudar e descobrir o que é que no final faz um biólogo; Ao Daniel D. P. Silva, Lucas Kaminski, Pedro Maia, Gabriela Bieber, Celeste Diaz, Marcio Romero, Paulo D. Silva, Alexandra Bächtold, Cristiano Iserhard.

Aos pesquisadores que colaboraram diretamente nas etapas deste estudo, Fernando Fernandez, Jorge Y. Tamashiro, e Nico Blüethgen.

Ao Lucas (“Doutor”) Kaminski pela inestimável ajuda no planejamento do estudo e pela paciência cada vez que eu ia atrapalhar com perguntas. À Gabriela Bieber por suas grandes contribuições com ideias e correções. Ao Leonardo Re Jorge e ao Martin Pareja pelas numerosas ajudas nas análises e no texto. Às demais pessoas que ajudaram com ideias ou a corrigir e melhorar os relatórios e o presente manuscrito: Marcio Uehara, Danilo Ribeiro, Claudia Bottcher, Nadia Barbosa, Pedro da Pós, Daniel P Silva, Cristiano Iserhard.

Aos Membros da pré-banca, Rafael Oliveria, Lucas Kaninski e Alexander Christianini, pelas valiosas sugestões.

Ao Instituto Florestal, Instituto de Botânica de São Paulo, Fazenda Graúna e o Clube Caça e Pesca Itororó por permitir o acesso às áreas e as facilidades logísticas no campo. Da mesma Maneira aos funcionários de ditas instituições que facilitaram muito os trabalhos de campo, em especial a dona Isabel em Itirapina e dona Fatima em Assis. Ao Kleber Del Claro pela colaboração na parte logística em Uberlândia.

As agencias de financiamento, FAEPEX, e FAPESP (Processos: 07/59881-5 e 2008/54058-1). À Universidade Estadual de Campinas e especialmente ao programa de Pos-graduação em Ecologia. Aos diversos funcionários da Unicamp, muito especialmente à Celia pela sua notável eficiência e a gentileza ao me ajudar a sobreviver na burocracia da Unicamp.

Aos professores que tive a chance de conhecer, dentro e fora das salas de aula, neste período e que contribuíram significativamente na minha formação profissional: Thomas Lewinsohn, Gustavo Romero, Rafael Oliveira, José A. Diniz, Paulo Guimarães, Marília de Moraes Castro, João Vasconcellos, George Shepard, Jorge Tamashiro, Fernando Fernandez, Woodruff Benson.

Aos amigos e colegas de laboratório pela companhia e apoio: Henrique Silveira, Claudia Bottcher, Daniel, P Silva, Pedro da Pós, Danilo Muniz, Mayra Vidal, Paulo D. Silva, Mariane Ronque, Nadia Barbosa, Luisa Motta, Cesar Leitte, Marianne Azevedo, Ivan, Andrea e Fernanda. Em especial à Gabriela Bieber (Gabi) por compartilhar comigo uma boa parte do caminho no doutorado, por ser uma das pessoas mais corretas e justas que conheço e um exemplo para mim com profissional e muito especialmente por me aguentar e salvar minha vida durante aquela viagem por “terras bávaras”. Igualmente aos colegas do LABOR: Danilo Ribeiro, Daniela Rodriguez, Eduardo Barbosa, Noemy Pereira, Tatiane Alves, Ana Kristina Silva, Jessie Pereira e Cristiano Iserhard e Junia Yasmin.

A todos os colegas dos cafezinhos depois do almoço que me ajudaram a manter os níveis de cafeína altos e assim garantir a produção científica. Isto inclui todos os colegas dos laboratórios e especialmente a Janaina Cortinoz, Leonardo Jorge, Christini Caselli, Christiane Corrêa, Marcio Romero, Nili Betancour.

Aos numerosos amigos do futebol e que faziam da quinta feira o dia mais esperado da semana, sem o qual não teria mais estado físico nem sanidade Mental. Em especial: Lucas Kaminski, Rafael Costa, Carlos “fominha” Martins, Ricardo “Ricky” Mattos, Cristiano “Luvinha” Iserhard, João Aranha (“spider John”), Vinicius “Duartina”, Felipe Amarin, Adriano “Mandrake”, Danilo “foice” Ribeiro, Jessie “Pereira, Jefferson Bugoni, Guilherme Aguirre, Emilio “sem joelho” Garcia, Tiago “Diabetico” e Thiago Toyoyo.

Eu quero agradecer especialmente (apesar do alto risco de repetir) a todos os amigos que me acompanharam durante esses anos em Campinas e que fizeram e ainda farão parte da minha vida: Gabriela Bieber e Paulo D.Silva (meus pais adotivos), Adriana Salomão, Lucas Kaminski, Cora Caron, Janaina Cortinoz, Orestes Rebusa, Marcio Uehara, Kamila Massuda, Emilio Garcia, Helena Massuda Garcia, Claudia Bottcher, Alexander

Christianini, Henrique Silveira, Cristiano Iserhard, Ana Kristina Silva, Jessie Pereira, Nili Betancour, Eduin Muñoz, Carlos Z. Martins, Danilo Ribeiro, Leticia Garcia, Nadia Barbosa, Pedro da Pó, Daniel P. Silva, Micael Nagai, Julia Tolledo, Leonardo Jorge, Luciana Francini, Martin Pareja. Mariane Ronque, Nadia Barbosa, Mayra Vidal, Fabrizio Machado, Camila Vieira, Ana Zanguirólame, Thais Postáli, Rafael Ramos, Mauricio Fernandez, Gustavo Shimizu, Christini Caselli, Christiane Corrêa, Vinicius Brito. Também aos que me deram forças desde longe: David Campo, Mario Zapata, Johana Vargas, Hernan Bernal, Angela Guitierrez, Angela Ospina, Joaquin Carvajal, Luz A. Hernandez, Camilo Fagua, Natalia Atuesta.

Por último, mas não menos importante, agradeço com todo meu carinho a minha Família que tem aguentado minhas largas ausências na procura do caminho da ciência e tem acreditado em mim todos estes anos: minha Mãe Graciela Echeverry, Meu Pai Dario Sendoya e sua Esposa Adriana Borja Sendoya, meus irmãos Luana e Pablo Sendoya, Meus Tios e Tias em especial Minha Tia Angela “Totota”, e ao mais recente membro da tribo minha sobrinha Manuela Sendoya.

ÍNDICE

ABSTRACT	01
RESUMO	03
INTRODUÇÃO GERAL	05
Objetivos gerais	10
Áreas de estudo	11
CAPÍTULO I: <i>Relações entre formigas e a comunidade de larvas na vegetação de Cerrado</i>	17
Introdução	20
Materiais e métodos	22
Resultados	27
Discussão	37
CAPÍTULO II: <i>Características defensivas morfológicas e comportamentais contra predação por formigas em larvas de Lepidoptera do Cerrado</i>	47
Introdução	50
Materiais e métodos	53
Resultados	60
Discussão	76
CAPÍTULO III: <i>Foliage-dwelling ants on the Cerrado savanna: the effect of liquid food sources on community structure</i>	89
Introduction	92
Methods	96
Results	102
Discussion	112
Appendix	119
CONSIDERAÇÕES FINAIS	130

ABSTRACT

Ants are dominant organisms in tropical ecosystems such as Cerrado savanna. It is well known that most ants in forest canopy are highly dependent on liquid food sources derived from plants (such as extrafloral nectaries and secretions from honey-dew producing insects), being functionally considered as herbivores. The high abundance of those resources in Cerrado is an incentive for ants to visit the foliage, although, we still do not know how dependent the ant community is on those resources. While foraging on plants, some ants can behave as generalist predators, thereby, for some Cerrado plants it has been proved that ant presence may reduce infestation levels of phytophagous insects. In the present study we evaluated the importance of ants visitation for lepidopteran larvae, for both host plant use as well as for the defense strategies. In laboratory tests we showed that shelter construction was the more frequent and most efficient defense of Lepidoptera larvae to avoid ant attack. Other traits such as larval body size were important to predict ant attack, but its effect varied with ant species. Larvae may negatively respond to the presence of some aggressive ant groups and not be affected by innocuous ants, but this response may be affected by the specific defensive set of larvae. We also carried out field samplings of both lepidopteran larvae and foraging ants in four fragments of Cerrado (southeastern Brazil), and we found that the foraging intensity of ants had a negative effect on the probability of finding larvae on plants. We show here that interactions between ants and plants vary across space both in how ants use resources present on plants but also in how they affect herbivorous presence. Localities with higher ant density were also places with low larval abundance. The presence of liquid food resources on plants may be a factor mediating ant effects, and the groups of ants that better responded to those resources were also the ones with higher effect on caterpillar presence. However, ant response to liquid

food resources on plants are dependent on local conditions and vary across space. Which ants are present locally and the way that they use plant resources may affect host plant use by lepidopteran larvae, as well as the defensive sets that those larvae may present. This evidence suggest that the importance of the ant-plant mutualism in terms of benefits for both organisms is highly dependent on the characteristics of local communities and vary on space. As consequence, the outcome of ant-plant interaction and specifically the function of ants as plant body guards and the potential benefits for plants of herbivory reduction may highly in some communities and small or even null in others.

RESUMO

As formigas são organismos dominantes em muitos ecossistemas tropicais, dentre os quais se encontra o Cerrado. É sabido que no dossel de florestas tropicais a maioria das formigas é altamente dependente de alimentos líquidos derivados das plantas (como nectários extraflorais ou secreções de insetos produtores de exsudatos), sendo considerada funcionalmente como herbívora. A alta abundância destes recursos na folhagem do Cerrado é considerada um incentivo para visitação de formigas, entretanto, não sabemos qual é o grau de dependência da comunidade de formigas de Cerrado por estes recursos. Algumas formigas podem se comportar como predadores oportunistas enquanto forrageiam nas plantas, de forma que para algumas plantas de Cerrado foi comprovado que a presença das formigas pode afetar os níveis de infesta o de insetos fitófagos. Neste estudo avaliamos a influência das formigas sobre as larvas de lepidópteros que habitam a folhagem das plantas, tanto para os padrões de uso de hospedeiro como para as estratégias de defesa. Testes de laboratório mostraram que a constru o de abrigos foi a estratégia mais frequente e eficiente para evitar o ataque de formigas. Outras características como o tamanho da larva foram importantes para prever o ataque das formigas, mas seu efeito varia dependendo da espécie de formiga. Dependendo do conjunto de defesas presentes nas larvas os lepidópteros podem responder negativamente   presença de alguns grupos de formigas agressivas, ou não responder caso estejam interagindo com grupos de formigas menos agressivos ou inócuos. Realizamos também levantamentos de larvas e formigas em plantas de quatro fragmentos de Cerrado (no sudeste brasileiro) e encontramos que a quantidade de formigas forrageando numa planta tem um efeito negativo sobre a presença de larvas de lepidóptero. Da mesma forma, lugares com maior densidade de formigas foram também lugares com baixa abundância de larvas. A presença de recursos líquidos alimentícios nas

plantas pode ser um fator mediador deste efeito e os grupos de formigas que melhor respondem à presença destes recursos (*Camponotus* e *Pseudomyrmex*) foram também os que têm maiores efeitos negativos na presença de larvas. Neste estudo demonstramos que o papel das formigas como protetoras das plantas e por tanto a natureza da interação formiga-planta varia no espaço. Por um lado, a resposta das formigas à presença de recursos líquidos nas plantas pode ser dependente das condições locais e varia no espaço. Por outro lado, quais formigas estão presentes em cada lugar e a forma em que estas formigas usam os recursos das plantas pode afetar localmente o uso de plantas de Cerrado por larvas de lepidóptero, bem como as estratégias de defesa que ditas larvas podem apresentar. Desta forma, o resultado da interação entre formigas e plantas e especificamente os possíveis benefícios de redução de herbivoria para as plantas são também variáveis no espaço.

INTRODUÇÃO GERAL

Além da matriz de condições abióticas, os organismos estão imersos num grande número de variadas interações com outros seres vivos que determina o espaço multidimensional onde os organismos ocorrem e evoluem. A importância destas interações para a sobrevivência é tão grande que boa parte das características biológicas de uma espécie pode ser explicada, pelo menos em parte, pela forma como estes organismos se relacionam com outros ao longo do tempo evolutivo (DelClaro 2012). As interações que envolvem algum tipo de relação trófica figuram entre as mais importantes e mais estudadas. Os organismos dentro de uma comunidade formam redes tróficas que em parte determinam como a energia e os nutrientes fluem dentro do ecossistema. Neste contexto, as interações diretas ou indiretas envolvendo vários níveis tróficos (interações multitróficas) têm chamado a atenção, pois são peças chaves para entender o funcionamento tanto das comunidades naturais como de sistemas agrícolas ou florestais (Tschardt & Hawkins 2002; Dyer *et al.* 2010). Da mesma forma, compreender como se estabelecem e quais são os fatores que afetam as interações bióticas é fundamental para entender a estrutura e dinâmica tanto das populações como das comunidades de organismos (Price 2002; de Ruiter *et al.* 2005).

Interações formiga-planta:

As formigas estão entre os organismos mais abundantes na maioria dos ecossistemas tropicais, onde podem representar entre 10% e 15% da biomassa animal (Beattie & Hughes 2002). Como consequência desta abundância, as formigas interagem com um grande número de organismos e interferem em muitos processos ecossistêmicos.

As interações entre plantas e formigas podem ser tanto de caráter mutualista como antagonista (Rico-Gray & Oliveira 2007), mas na maioria dos casos, estão baseadas nas necessidades de obtenção de recursos pelas formigas. Por serem as plantas a base energética da maioria destes ecossistemas e a fonte fundamental de recursos das formigas, seja por consumo direto ou indireto (*e.g.* exsudatos de insetos trofobiontes), muitas das interações em que as formigas participam envolvem ou afetam plantas (Davidson *et al.* 2003; Blüthgen & Feldhaar 2010). Desta forma, as formigas podem interagir com as plantas enquanto estão a procura de recursos, podendo atuar as vezes como herbívoros, predadores de sementes, dispersores, polinizadores ou indiretamente como guarda-costas, entre outros (Rico-Gray & Oliveira 2007).

A dependência pelos recursos das plantas fica mais óbvia nas formigas que habitam diretamente a folhagem (Blüthgen *et al.* 2003; Davidson *et al.* 2004). Algumas espécies de formigas neste ambiente podem obter das plantas tanto matéria prima ou substrato para o estabelecimento dos ninhos, bem como recursos alimentares propriamente ditos (Blüthgen & Feldhaar 2010). Em alguns casos, estas interações podem ser específicas, como com as plantas mirmecófitas nas quais existem órgãos especializados chamados corpúsculos alimentares (“food bodies”) que são removidos pelas formigas inquilinas (Janzen 1966; Longino 1989). Outro exemplo são as formigas cortadeiras (Tribo Attini), estas podem usar diretamente os tecidos das plantas para cultivar fungos dos quais se alimentam (Weber 1972; Hölldobler & Wilson 2009). Há também formigas que podem ser atraídas por frutos na planta (Dutra *et al.* 2006). Entretanto, uma boa parte das espécies de formigas na folhagem procuram recursos alimentares líquidos, que podem ser diretamente obtidos das plantas em nectários extraflorais (Koptur 1992; Lundgren 2009), ou indiretamente através de insetos produtores de exsudatos, como alguns homópteros (Stadler & Dixon 2005) ou

larvas mimecófilas de lepidópteros (Fiedler 2001; Pierce *et al.* 2002). Enquanto as formigas forrageiam nas plantas podem também se comportar como predadoras oportunistas de outros insetos. Neste caso, a interação que estabelecem com as plantas pode ser considerada mutualística, uma vez que pode trazer benefícios tanto para as formigas (Lach *et al.* 2009; Byk & Del-Claro 2011) como para as plantas. O benefício para as plantas é dado através do efeito negativo que a presença das formigas pode ter nos níveis de infestação por herbívoros, que se traduz numa diminuição de perdas por herbivoria e, em muitos casos, no aumento da aptidão da planta (Heil & McKey 2003; veja exemplos em Rico-Gray & Oliveira 2007).

Contudo, em vários sistemas onde as formigas visitam ativamente as plantas, não tem sido encontrado efeito protetor pela presença de formigas. Por exemplo, apesar de algumas espécies de Pteridófitas apresentarem NEFs, na maioria dos casos, não foram registrados efeitos de proteção pelas formigas (Rashbrook *et al.* 1991, 1992). Existem diferentes hipóteses que tentam explicar esta ausência de proteção, entre elas a existência de defesas mais elaboradas nos herbívoros contra os efeitos das formigas (Lawton & Heads 1984). Porém, algumas evidências sugerem que variações na forma como as plantas interagem com as formigas podem ajudar a explicar a ausência de proteção nestas Pteridófitas (assim como em outras plantas) bem como entender porque os nectários extraflorais se mantiveram evolutivamente neste grupo. Desta forma, as formigas podem significar benefícios para as plantas somente em algumas etapas do desenvolvimento das folhas quando a produção de néctar é alta (Koptur *et al.* 1998) ou dependendo da identidade e abundância das formigas visitantes (Rashbrook *et al.* 1992).

O exemplo das Pteridófitas ilustra como interações entre formigas e plantas não são estáticas e a natureza do resultado para cada um dos organismos pode ser condicionado ao

contexto (Chamberlain & Holland 2009). As interações entre formigas e plantas podem variar ao longo do tempo, dentro do mesmo dia (Oliveira *et al.* 1999), sazonalmente (Alonso 1998; Diaz-Castelazo *et al.* 2004) ou entre anos diferentes (Rico-Gray & Castro 1996). Também podem variar no espaço latitudinal, altitudinal, geograficamente ou entre habitats (ver exemplos em Rico-Gray & Oliveira 2007). Estas variações podem explicar por que em alguns casos não é encontrada proteção pelas formigas e portanto ausência de benefícios para a planta. Este efeito protetor pode variar, por exemplo, dependendo das condições abióticas (Kersch & Fonseca 2005), identidade e agressividade das formigas visitantes (Mody & Linsenmair 2004) ou da capacidade relativa dos herbívoros de evitar ou sobreviver aos encontros com formigas (Freitas & Oliveira 1996; Sendoya *et al.* 2009).

Formigas e insetos herbívoros

O mutualismo estabelecido entre formigas e plantas é fundamentado no recurso oferecido pela planta e no papel das formigas como guarda-costas da planta. Isto quer dizer que a presença de formigas nas plantas (ou pelo menos de algumas delas) deve ter fortes efeitos na biologia de outros organismos habitando na interface entre formigas e plantas. Sabe-se, por exemplo, que a atividade de formigas arbóreas pode influenciar a composição da fauna de artrópodes sobre as árvores em florestas tropicais, e os possíveis efeitos destes sobre as plantas (Floren *et al.* 2002). Adicionalmente, a presença das formigas na vegetação e suas interações com insetos trofobiontes pode também ter efeitos indiretos na estrutura das comunidades do solo da floresta (Zhang *et al.* 2012).

A interface entre formigas e plantas pode representar um ambiente perigoso para os insetos herbívoros como as larvas de lepidópteros. Os hábitos alimentares de muitas destas larvas fazem com que se encontrem inseridas no cenário da interação formiga-planta. Desta

forma, a presença das formigas pode afetar o padrão de utilização de plantas pelos herbívoros, incluindo o grau de especialização, bem como as estratégias de defesa contra predadores (Dyer 1995; Coley *et al.* 2006; Sendoya *et al.* 2009). Neste cenário, as larvas de lepidópteros podem, em alguns casos, estabelecer uma relação mutualística com as formigas quando as formigas protegem larvas mirmecófilas contra outros predadores (DeVries 1991, Kaminski *et al.* 2009). Mas, na maioria das vezes estas interações são de tipo antagônico quando as formigas podem representar um risco à sobrevivência ou afetar negativamente o desempenho larval (Thompson 1988, Freitas & Oliveira 1996; Dutra *et al.* 2006). Este efeito pode ser amplificado pela presença de recursos alimentares nas plantas que funcionem como atrativos para formigas (Oliveira & Freitas 2004; Oliveira & DelClaro 2005; Ando & Ohgushi 2008).

As plantas do Cerrado do Brasil são ricas em recursos líquidos que as formigas aproveitam, visto que as formigas podem visitar ativamente um grande número de espécies de plantas do Cerrado (Oliveira & Freitas 2004). Para algumas espécies de lepidóptera do Cerrado como *Eunica bechina* (Nymphalidae) sabe-se que as formigas podem representar um fator adaptativo importante influenciando as populações tanto no uso de plantas hospedeiras como nas estratégias de defesa (Freitas & Oliveira 1992, 1996; Sendoya *et al.* 2009). Entretanto, não sabemos como estes efeitos podem se aplicar sobre as comunidades de lepidópteros do Cerrado como um todo. Assim, este estudo busca contribuir para o melhor entendimento dos efeitos das formigas sobre as larvas de lepidóptera do Cerrado na escala da comunidade e como estes efeitos variam espacialmente.

Objetivos gerais:

- 1) Estudar quais são os efeitos da presença de formigas sobre plantas de Cerrado na ocorrência de espécies de lepidópteros.
- 2) Avaliar se existem variações geográficas na forma em que larvas de lepidópteros usam as plantas de acordo com a presença de formigas e como isto pode ser mediado pela presença de recursos alimentares nas plantas.
- 3) Descrever as diferentes estratégias de defesa morfológica e comportamentais apresentadas pelas larvas de lepidóptera no Cerrado e avaliar sua eficiência contra formigas.
- 4) Comparar as características das assembleias de formigas que visitam plantas de Cerrado com e sem recursos alimentares líquidos.
- 5) Entender como variações na identidade das formigas e na estrutura das interações entre plantas e formigas mediadas pelos recursos alimentares pode afetar a presença de larvas de lepidópteros.

A tese está dividida em três capítulos. No **Capítulo 1** é avaliado qual é o efeito da visitação por formigas na presença de larvas de lepidóptero, discutindo como este efeito pode variar geograficamente em diferentes escalas e o papel dos recursos presentes nas plantas como mediadores. No **Capítulo 2** apresentamos as diferentes estratégias de defesa comportamental e morfológica das larvas no Cerrado, discutindo quais tipos de larva podem ser mais afetados pela presença de formigas. Neste capítulo apresentamos também experimentos em laboratório onde é avaliada a eficiência destas defesas contra o ataque de duas espécies de formigas abundantes no Cerrado. Finalmente, no **Capítulo 3** analisamos a estrutura das assembleias de formigas que visitam plantas de Cerrado, sendo comparado

entre plantas que apresentam recursos alimentares e plantas sem recursos. Em acréscimo, neste capítulo estudamos os padrões de especialização nas interações formiga-planta e como variações no uso das plantas pelas formigas pode afetar a presença das larvas de lepidóptero.

Áreas de Estudo

As coletas de campo foram realizadas em quatro áreas de cerrado correspondentes à fisionomia *sensu stricto*, a qual consiste principalmente de uma vegetação densa composta por pequenas árvores e arbustos dentro de uma matriz herbácea (Oliveira-Filho & Rater 2002). As coletas foram realizadas durante ao final da estação chuvosa de 2009, correspondente aos meses de janeiro-abril. Estas áreas incluem um fragmento de Cerrado dentro da fazenda “Graúna” perto da cidade de Itirapina (22°15'S, 47°47'O), um na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi Guaçu (22°15'S, 47°10'O), um na Estação Ecológica de Assis (22°35'S, 50°21'55"O), e outro na reserva do Clube de Caça e Pesca da cidade de Uberlândia-MG (18°59'S, 48°18'O) (Fig. 1).

As áreas foram escolhidas por apresentarem as maiores facilidades logísticas, assim como por apresentarem a maior variação possível nas distâncias entre as diferentes localidades (Tabela 1). Isto permitirá que a amostragem fosse a mais abrangente possível de forma que as áreas representassem satisfatoriamente as características do bioma do cerrado no sul da sua distribuição. O fragmento de Itirapina correspondia a uma reserva particular de 65 ha numa matriz predominante de cana. O local se encontrava a uma altitude de aproximadamente 815m, com uma precipitação média anual de 1501 mm (~2100 mm durante o ano de amostragem). A reserva Biológica em Mogi Guaçu tem uma extensão de 470 ha pertence ao Instituto Botânico de São Paulo e se encontra rodeada por uma matriz

principalmente florestal. O fragmento se encontra numa altitude de aproximadamente 621m com uma precipitação media anual de 1360 mm (~1200mm durante o ano de amostragem). O fragmento de Assis pertence ao Instituto florestal de São Paulo, e também se encontra rodeada por uma matriz principalmente florestal numa altitude de aproximadamente 530m. Tem uma extensão aproximada de 1600 ha e precipitação media anula de 1360 mm (~1780 mm durante o ano de amostragem). O fragmento de Uberlândia é uma reserva particular rodeada por uma matriz agrícola e urbana. O local tem com uma extensão aproximada de 400 ha e está localizado numa altitude aproximada de 845m. A precipitação media é de 1580 mm (~1620 mm durante o ano de amostragem). (dados climáticos obtidos das bases de dados do INMET 2012 e CIAGRO 2012 a partir de estações meteorológicas próximas às áreas de amostragem).

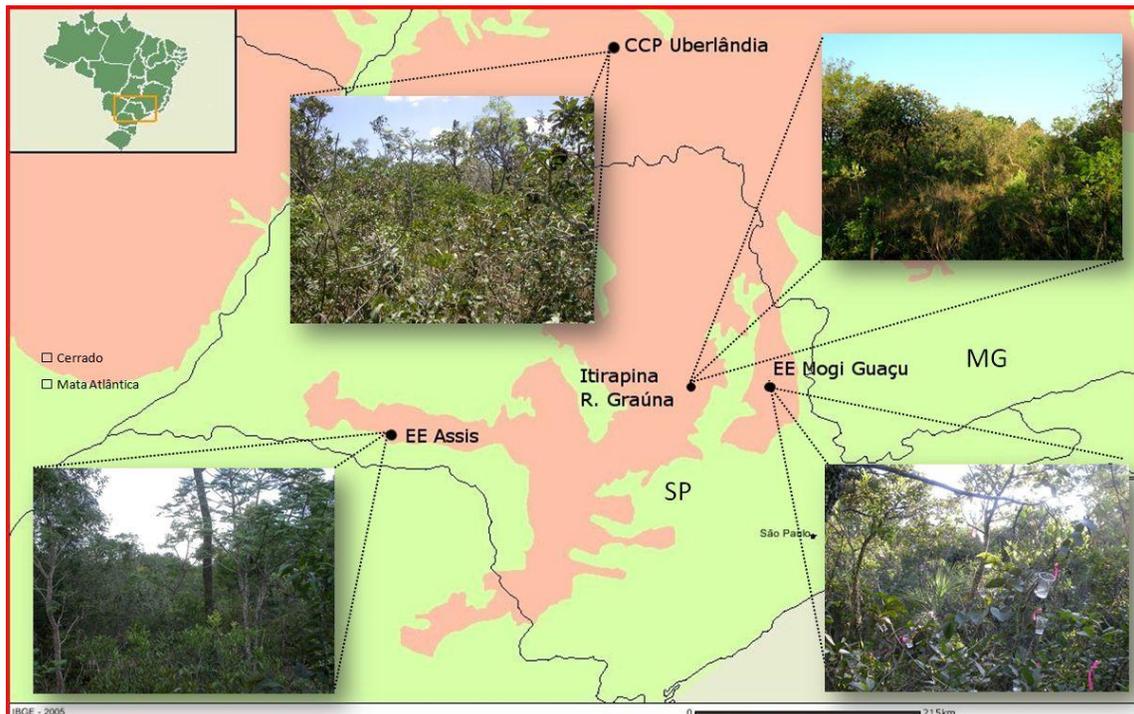


Fig. 1. Localização das áreas de estudo. A área avermelhada representa a distribuição potencial de cerrado. Cada quadro apresenta uma imagem mostrando a fisionomia característica da vegetação em cada área. (Fonte mapa base: IBGE 2005).

Tabela 1. Matriz de distâncias lineares (Km) aproximadas entre as diferentes reservas de cerrado escolhidas para o presente estudo.

Localidade	Itirapina	Mogi guaçu	Assis	Uberlândia
Itirapina				
Mogi guaçu	65			
Assis	271	336		
Uberlândia	371	385	460	

Referências Bibliográficas

- Alonso L.E. (1998). Spatial and temporal variation in the ant occupants of a facultative ant-plant. *Biotropica*, 30, 201-213.
- Ando Y. & Ohgushi T. (2008). Ant- and plant-mediated indirect effects induced by aphid colonization on herbivorous insects on tall goldenrod. *Population Ecology*, 50, 181-189.
- Beattie A.J. & Hughes L. (2002). Ant-plant Interactions. In: *Plant animal Interactions* (eds. Herrera CM & Pellmyr O). Blackwell Publishing, pp. 211-135.
- Blüthgen N. & Feldhaar H. (2010). Food and shelter: How resources influence ant ecology. In: *Ant ecology* (eds. Lach L, Parr C & Abbott KL). Oxford University Press New York, pp. 115-136.
- Blüthgen N., Gebauer G. & Fiedler K. (2003). Disentangling a rainforest food web using stable isotopes: dietary diversity in a species-rich ant community. *Oecologia*, 137, 426-435.
- Byk J. & Del-Claro K. (2011). Ant-plant interaction in the Neotropical savanna: direct beneficial effects of extrafloral nectar on ant colony fitness. *Population Ecology*, 53, 327-332.
- Chamberlain S.A. & Holland J.N. (2009). Quantitative synthesis of context dependency in ant-plant protection mutualisms. *Ecology*, 90, 2384-2392.
- CIAGRO- Centro integrado de informações agrometeorológicas. 2012. URL <http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline/> Acessado: 08 de julho de 2012.
- Coley P.D., Bateman M.L. & Kursar T.A. (2006). The effects of plant quality on caterpillar growth and defense against natural enemies. *Oikos*, 115, 219-228.
- Davidson D., Cook S. & Snelling R. (2004). Liquid-feeding performances of ants (Formicidae): ecological and evolutionary implications. *Oecologia*, 139, 255-266.
- Davidson D.W., Cook S.C., Snelling R.R. & Chua T.H. (2003). Explaining the abundance of ants in lowland tropical rainforest canopies. *Science*, 300, 969-972.
- de Ruiter P.C., Wolters V. & Moore J.C. (2005). Dynamic Food Webs. In: *Dynamic Food Webs: Multispecies assemblages, ecosystem development, and environmental change* (eds. De Ruiter PC, Wolters V & Moore JC). Academic Press Burlington, USA, pp. 3-9.
- DelClaro K. (2012). Origens e importancia das relações plantas-animais para a ecologia e conservação. In: *Ecologia das interações plantas-animais: uma abordagem ecologico-evolutiva* (eds. DelClaro K & Torezan-Silingardi HM). Technical Books Editora Rio de Janeiro, pp. 37-50.

- Diaz-Castelazo C., Rico-Gray V., Oliveira P.S. & Cuautle M. (2004). Extrafloral nectary-mediated ant-plant interactions in the coastal vegetation of Veracruz, Mexico: Richness, occurrence, seasonality, and ant foraging patterns. *Ecoscience*, 11, 472-481.
- Devries P.J. (1991). Mutualism between *Thisbe irenea* butterflies and ants, and the role of ant ecology in the evolution of larval-ant associations. *Biological Journal of the Linnean Society*, 43, 179-195.
- Dutra H.P., Freitas A.V.L. & Oliveira P.S. (2006). Dual ant attraction in the neotropical shrub *Urera baccifera* (Urticaceae): the role of ant visitation to pearl bodies and fruits in herbivore deterrence and leaf longevity. *Functional Ecology*, 20, 252-260.
- Dyer L.A. (1995). Tasty Generalists and Nasty Specialists - Antipredator Mechanisms in Tropical Lepidopteran Larvae. *Ecology*, 76, 1483-1496.
- Dyer L.A., Walla T.R., Greeney H.F., Stireman Iii J.O. & Hazen R.F. (2010). Diversity of Interactions: A Metric for Studies of Biodiversity. *Biotropica*, 42, 281-289.
- Fiedler K. (2001). Ants that associate with Lycaeninae butterfly larvae: diversity, ecology and biogeography. *Diversity and Distributions*, 7, 45-60.
- Floren A., Biun A. & Linsenmair K.E. (2002). Arboreal ants as key predators in tropical lowland rainforest trees. *Oecologia*, 131, 137-144.
- Freitas A.V.L. & Oliveira P.S. (1992). Biology and behavior of *Eunica bechina* (Lepidoptera: Nymphalidae) with special reference to larval defense against ant predation. *Journal of Research on Lepidoptera*, 31, 1-11.
- Freitas A.V.L. & Oliveira P.S. (1996). Ants as selective agents on herbivore biology: Effects on the behaviour of a non-myrmecophilous butterfly. *Journal of Animal Ecology*, 65, 205-210.
- Heil M. & McKey D. (2003). Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 34, 425-453.
- Hölldobler B. & Wilson E.O. (2009). *The superorganism : the beauty, elegance, and strangeness of insect societies*. 1st edn. W.W. Norton, New York.
- INMET- Instituto Nacional de Meteorologia. (2012). Clima. URL <http://www.inmet.gov.br/html/clima.php#>. Acessado: 08 de julho de 2012.
- Janzen D.H. (1966). Coevolution of Mutualism Between Ants and Acacias in Central America. *Evolution*, 20, 249-275.
- Kaminski L.A., Sendoya S.F., Freitas A.V.L. & Oliveira P.S. (2009). Ecologia comportamental na interface formiga-planta-herbívoros: interações Entre formigas e lepidópteros. *Oecologia Brasiliensis*, 13, 27-44.
- Kersch M.F. & Fonseca C.R. (2005). Abiotic factors and the conditional outcome of an ant-plant mutualism. *Ecology*, 86, 2117-2126.
- Koptur S. (1992). Extrafloral Nectary-mediated interactions Between Insects and plants. In: *Insect-Plant Interactions* (ed. Bernays E). CRC Press Boca Raton, pp. 81-129.
- Koptur S., Rico-Gray V. & Palacios-Rios M. (1998). Ant protection of the nectaried fern *Polypodium plebeium* in central Mexico. *American Journal of Botany*, 85, 736-739.
- Lach L., Hobbs R. & Majer J. (2009). Herbivory-induced extrafloral nectar increases native and invasive ant worker survival. *Population Ecology*, 51, 237-243.
- Lawton J.H. & Heads P.A. (1984). Bracken, Ants and Extrafloral Nectaries .1. The Components of the System. *Journal of Animal Ecology*, 53, 995-1014.

- Longino J.T. (1989). Geographic Variation and Community Structure in an Ant-Plant Mutualism: Azteca and Cecropia in Costa Rica. *Biotropica*, 21, 126-132.
- Lundgren J.G. (2009). *Relationships of Natural Enemies and Non-Prey Foods*. Springer Verlag, Berlin.
- Mody K. & Linsenmair K.E. (2004). Plant-attracted ants affect arthropod community structure but not necessarily herbivory. *Ecological Entomology*, 29, 217-225.
- Oliveira-Filho A.T. & Rater J.A. (2002). Vegetation Physiognomies and Woody Flora of the Cerrado Biome. In: *The Cerrados of Brazil* (eds. Oliveira PS & Marquis RJ). Columbia University Press New York, pp. 91-120.
- Oliveira P.S. & DelClaro K. (2005). Multitrophic interactions in a Neotropical savanna: ant-hemipteran systems, associated insect herbivores and a host plant. In: *Biotic Interactions in the Tropics* (eds. Burslem DFRP, Pinard MA & Hartley SA). Cambridge University Press Cambridge, pp. 414-438.
- Oliveira P.S. & Freitas A.V.L. (2004). Ant-plant-herbivore interactions in the neotropical Cerrado savanna. *Naturwissenschaften*, 91, 557-570.
- Oliveira P.S., Rico-Gray V., Diaz-Castelazo C. & Castillo-Guevara C. (1999). Interaction between ants, extrafloral nectaries and insect herbivores in Neotropical coastal sand dunes: herbivore deterrence by visiting ants increases fruit set in *Opuntia stricta* (Cactaceae). *Functional Ecology*, 13, 623-631.
- Pierce N.E., Braby M.F., Heath A., Lohman D.J., Mathew J., Rand D.B. & Travassos M.A. (2002). The ecology and evolution of ant association in the Lycaenidae (Lepidoptera). *Annual Review of Entomology*, 47, 733-771.
- Price P.W. (2002). Species interactions and the evolution of biodiversity. In: *Plant-Animal Interactions: An evolutionary approach* (eds. Herrera CM & Pellmyr O). Blackwell Science Oxford, UK, pp. 3-25.
- Rashbrook V.K., Compton S.G. & Lawton J.H. (1991). Bracken and ants: why is there no mutualism? In: *Ant-plant interactions* (eds. Huxley CR & Cutler DF). Oxford University Press New York, pp. 231-237.
- Rashbrook V.K., Compton S.G. & Lawton J.H. (1992). Ant-Herbivore Interactions - Reasons for the Absence of Benefits to A Fern with Foliar Nectaries. *Ecology*, 73, 2167-2174.
- Rico-Gray V. & Castro G. (1996). Effect of an ant-aphid interaction on the reproductive fitness of *Paullinia fuscescens* (Sapindaceae). *The Southwestern Naturalist*, 41, 434-440.
- Rico-Gray V. & Oliveira P.S. (2007). *The ecology and evolution of ant-plant interactions*. University of Chicago Press, Chicago.
- Sendoya S.F., Freitas A.V.L. & Oliveira P.S. (2009). Egg-Laying Butterflies Distinguish Predaceous Ants by Sight. *American Naturalist*, 174, 134-140.
- Stadler B. & Dixon A.F.G. (2005). Ecology and evolution of aphid-ant interactions. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 36, 345-372.
- Thompson J.N. (1988). Evolutionary Ecology of the Relationship Between Oviposition Preference and Performance of Offspring in Phytophagous Insects. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 47, 3-14.
- Tscharntke T. & Hawkins B.A. (2002). Multitrophic level interactions: an introduction. In: *Multitrophic level interactions* (eds. Tscharntke T & Hawkins BA). Cambridge University Press Cambridge, UK, pp. 1-7.

- Weber N.A. (1972). *Gardening ants, the attines*. American Philosophical Society, Philadelphia, 146p.
- Zhang S., Zhang Y. & Ma K. (2012). Disruption of Ant-Aphid Mutualism in Canopy Enhances the Abundance of Beetles on the Forest Floor. *Plos One*, 7, e35468.

CAPÍTULO 1:

**RELAÇÕES ENTRE FORMIGAS E A COMUNIDADE DE LARVAS DE
LEPIDÓPTEROS NA VEGETAÇÃO DE CERRADO**

Sebastian F. Sendoya¹, André V. L. Freitas² & Paulo S. Oliveira²

1. Programa de Pós graduação em Ecologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6109, 13083-970 Campinas São Paulo, Brasil.
2. Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6109, 13083-970 Campinas São Paulo, Brasil.

Resumo

Lepidópteros são importantes herbívoros da folhagem e as formigas podem representar um alto risco de predação para as larvas e afetar a forma em que usam as plantas hospedeiras. Vários estudos mostraram que a presença de formigas nas plantas pode diminuir os níveis de herbivoria e aumentar a aptidão das plantas. Entretanto, a agressividade e a dieta das diferentes espécies de formigas é variável e seu possível efeito nos herbívoros não é igual para todas as espécies. Desta forma, é esperado que a presença de larvas de lepidópteros varie entre plantas e locais de Cerrado de acordo com os níveis de visitação das formigas e também com a composição específica das assembleias forrageando nas plantas. Neste estudo foram amostradas as larvas de lepidópteros presentes em quatro localidades de Cerrado *sensu stricto* no sudeste do Brasil. Em cada local foram amostrados seis grupos de 50 plantas escolhidas ao redor de transectos separados entre si por pelo menos 100m. Em cada planta foram também conferidos a presença de nectários extraflorais e insetos trofobiontes, assim como amostradas as formigas visitantes, usando “pitfall” adaptados para amostragem arbórea. As localidades amostradas variaram tanto na composição como na abundância de formigas por planta. Encontramos que a quantidade local de larvas (1) é inversamente relacionada à abundância de formigas (média local) por planta, (2) é afetada negativamente pela presença de atrativos para formigas nas plantas (nectários extraflorais, hemípteros trofobiontes). Este efeito negativo, entretanto, (3) é dependente do uso que as formigas locais fazem de plantas com atrativos. Por outro lado, a ocorrência de larvas numa planta individual tem relação com a abundância de formigas na mesma planta, bem como em outras plantas hospedeiras potenciais da mesma espécie no mesmo local. Os resultados mostram que as características da assembleia de formigas determinam em parte o uso de plantas de Cerrado por larvas de lepidópteros. Assim, os lepidópteros podem

responder negativamente a alguns grupos de formigas agressivas, enquanto que para grupos menos agressivos ou inócuos pode não haver resposta.

Abstract

Several studies had shown that ant presence may reduce herbivore levels and increase plant fitness. Thus, ants may have a relevant effect on the way phytophagous insect use host plants. Lepidoptera are important herbivores on foliage and ants may represent a high risk for caterpillar survival. However, because ant aggressiveness and diet varies among ant species, their effect on herbivores is variable as well. We can, therefore, expect that the presence of caterpillars may vary between plants and places according with ant visitation levels, as well as with the composition of ant assemblages. In this study, we sampled lepidopteran larvae four Cerrado localities (southeastern Brazil). In each locality we sampled six groups of 50 plants. For each group we sampled plants sequentially along transects separated by 100m. We also sampled foliage-dwelling ants by using arboreal pitfall traps. Sampled localities varied both in ant species composition and in ant abundance per plant. We found (1) that larval abundance was negatively correlated with mean ant abundance per plant, (2) that the presence of ant attractants on plants had a negative effect on caterpillar abundance and, (3) that this effect depended on local ant abundance and on local preference by ants for plants with attractants. Larval presence on a given plant is related to ant abundance on the same plant, and to ant abundance on potential host plants at the same locality. We showed that the characteristics of ant assemblages determine host plant use by Lepidoptera. Thus Lepidoptera may respond negatively to some ant groups but not to innocuous or less aggressive groups. Those variable effects may determine the outcome of ant-plant interactions and then the local benefits for plants.

Introdução

As atividades de forrageamento de um grande número de espécies de formigas acontecem principalmente sobre na folhagem e dossel (Rico-Gray & Oliveira 2007). A preponderância desses insetos nas plantas está relacionada, principalmente, à existência de diferentes fontes previsíveis e renováveis de alimentos que podem ser muito importantes para as colônias de formigas (Davidson *et al.* 2003; Oliveira & Freitas 2004; Lach *et al.* 2009; Byk & Del-Claro 2011). Nectários extraflorais (NEFs) estão entre os recursos alimentares mais importantes que as formigas podem encontrar nas plantas do Cerrado. Estas glândulas estão presentes em 15,4 a 25,5 % das espécies lenhosas do Cerrado (Oliveira & Leitão-Filho 1987), e promovem a atividade das formigas na vegetação (Oliveira & Brandão 1991; Koptur & Bernays 1992; Schoereder *et al.* 2010). Outra fonte constante de alimento na vegetação do Cerrado são os exsudatos açucarados de hemípteros sugadores de seiva (Del-Claro & Oliveira 1999), os quais podem ser encontrados em cerca de 30% das plantas do Cerrado (Lopes 1995), e também as secreções nutritivas de larvas de borboletas mirmecófilas (e.g. Kaminski 2008). Os exsudatos líquidos dos nectários e dos insetos são tão atraentes para as formigas que estas podem ser encontradas visitando as plantas constantemente ao longo do dia e à noite (Oliveira & Brandão 1991; Del-Claro & Oliveira 1999). Porém, além de servirem como local de forrageamento, as plantas também podem prover locais adequados para o estabelecimento de colônias de formigas. Por exemplo, muitas espécies arbóreas de formigas utilizam as galerias deixadas por besouros no caule das plantas, ou galhas abandonadas, como locais para nidificação (Araujo *et al.* 1995; Edwards *et al.* 2009; Schoereder *et al.* 2010). Como a maioria das espécies de formigas aproveita não só a dieta líquida que provém das plantas, mas também presas animais, um dos mais importantes efeitos desta interação formiga-planta é a diminuição na

abundância e no dano produzido por diferentes tipos de herbívoros (Bentley 1976; Bronstein 1998; Oliveira & Freitas 2004). Tal diminuição nos níveis de herbivoria pode se traduzir em um aumento na aptidão da planta (revisado por Rico-Gray & Oliveira 2007).

A ordem Lepidoptera (borboletas e mariposas) é o segundo grupo mais diverso de insetos do planeta (Aguiar *et al.* 2009), e a maior parte das espécies é herbívora durante o estágio larval. Este grupo é altamente diversificado no Cerrado, mas a biologia dos estágios larvais da grande maioria ainda é desconhecida (Diniz & Morais 1997). Já que a alimentação é a prioridade das larvas, estas estão adaptadas para se alimentar a maior parte do tempo possível, de forma a maximizar o crescimento e o desenvolvimento (Salazar & Whitman 2001). Entretanto, enquanto se alimentam a vulnerabilidade das larvas à predadores e parasitoides pode ser bastante alta (Bernays 1997). Para as espécies de larvas mirmecófilas (Lycaenidae e Riodinidae), que atraem formigas com secreções nutritivas, o sistema de interação formiga-planta pode representar um espaço livre de inimigos devido à proteção conferida pelas formigas (Atsatt 1981, Stadler & Dixon 2008). Por outro lado, a constante presença de formigas patrulhando sobre as folhas pode também representar um cenário antagônico com riscos para a sobrevivência de outros tipos de larvas (não mirmecófilas) também encontradas nas plantas (Kaminski *et al.* 2009). De fato, as formigas que forrageiam na folhagem são um dos principais grupos de predadores de larvas de lepidópteros (Salazar & Whitmann 2001), afetando a presença ou sobrevivência destas nas plantas hospedeiras (ver exemplos em Rico-Gray & Oliveira 2007).

As formigas variam na sua distribuição na folhagem em diferentes escalas. Em pequena escala, sua presença pode ser consequência da distribuição heterogênea dos recursos no ambiente (Ribas & Schoereder 2002; Bluthgen & Stork 2007). Por exemplo, os recursos disponíveis na folhagem (*e.g.*, quantidade de néctar extrafloral secretado) podem

variar entre indivíduos de uma mesma espécie de planta (Heil *et al.* 2000; Rudgers & Strauss 2004), ou ao longo do tempo na comunidade como um todo (Rico-Gray 1993). Numa escala maior, a presença das formigas pode depender da composição específica da mirmecofauna numa região ou localidade, a qual é determinada por fatores históricos ou biogeográficos (Jeanne 1979). Por outro lado, o efeito das formigas na presença de herbívoros pode depender tanto da identidade como da abundância das formigas visitantes (Scheirs & De Bruyn 2002; Bruna *et al.* 2004), e formigas mais agressivas e dominantes tendem a ser mais efetivas na proteção da planta (Oliveira *et al.* 1987; Oliveira & Brandão 1991; Mody & Linsenmair 2004; Sendoya *et al.* 2009). Cada grupo ou espécie de formiga apresenta particularidades na composição da sua dieta, e algumas delas incluem uma maior quantidade de presas animais do que outras (Davidson *et al.* 2003). Desta forma, é esperado que formigas predadoras representem um perigo potencial maior para larvas de lepidópteros, e que as características da interação formiga-lagarta variem tanto temporal como espacialmente. Neste trabalho estudamos (1) como a visitação por formigas a plantas no Cerrado pode afetar a presença de larvas de lepidópteros nas mesmas, investigando ainda (2) se existe variação espacial neste efeito entre diferentes localidades, bem como entre plantas individuais. E finalmente, (3) analisamos como a presença de recursos atrativos para formigas nas plantas pode influenciar o efeito da visitação por formigas na presença de larvas.

Materiais e Métodos

Área de estudo

As coletas de campo foram realizadas em quatro áreas de Cerrado *sensu stricto* na parte sul da distribuição do ecossistema do Cerrado no sudeste do Brasil, correspondendo

aos Estados de São Paulo e Minas Gerais. Estas áreas incluem um fragmento de cerrado dentro da fazenda “Graúna” perto da cidade de Itirapina, a Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi Guaçu, a Estação Ecológica de Assis, e a reserva do Clube de Caça e Pesca da cidade de Uberlândia-MG (veja introdução geral para mais detalhes da areas).

Amostragem de larvas e de formigas

Em cada uma das localidades estudadas foram amostrados seis transectos (ou parcela retangular com 2m de lado e aproximadamente 30m de longitude). O primeiro transecto era colocados a de 150m de distancia da borda e os seguintes sequencialmente em direção ao interior do transecto separados entre si por 100 metros. A direção do transecto foi escolhida aleatoriamente, porém evitando regiões onde a fisionomia fosse muito diferente ou a densidade de vegetação muito alta para identificar as plantas individuais. Cada transecto foi estabelecido estendendo-se uma linha na vegetação e selecionando-se todas as plantas com uma altura entre 60 a 300 cm distando até um metro desta linha, em ambos os lados, até completar o total de 50 indivíduos. Cada planta foi marcada com um número único e foram feitas exsicatas de cada indivíduo, as quais foram identificadas por especialistas. Os transectos foram amostrados durante a estação chuvosa (janeiro-abril de 2009) época com maior crescimento da vegetação (Batalha & Martins 2004). Cada planta dentro do transecto foi cuidadosamente vasculhada à procura de lagartas, de forma que todos os seus galhos fossem analisados até um máximo de 10 minutos de inspeção. Somente foram consideradas neste trabalho larvas de lepidópteros não-mirmecófilas (sem órgãos especializados para atrair formigas; veja Stadler & Dixon 2008). Adicionalmente, foi medido o diâmetro do caule na altura do solo e registrada a presença de colônias de formigas (quando detectadas visualmente). Em cada planta individual foi registrada

visualmente a presença de atrativos para formigas, como nectários extraflorais (NEFs) ou insetos produtores de exsudato que fossem atendidos por formigas. A presença de NEFs na espécie de planta foi complementada com a consulta de listas taxonômicas disponíveis (Oliveira & Leitão-Filho 1987; Keeler 2008; Machado *et al.* 2008). As larvas coletadas foram fotografadas e levadas ao laboratório para sua criação até estágio adulto, quando então eram alfinetados para posterior identificação taxonômica.

Após finalizar a amostragem das larvas em cada transecto, foram usadas armadilhas do tipo “pitfall” adaptadas à amostragem em árvores (Modificado de Ribas *et al.* 2003) durante 24 horas para a coleta das formigas visitantes. Em cada planta foram colocadas duas armadilhas: uma com uma isca de mel (fonte de carboidrato) e outra com uma isca de sardinha (fonte de proteína). Posteriormente, em laboratório, as amostras foram transferidas para álcool 70% para preservação dos espécimes. As formigas foram então contadas e separadas para identificação taxonômica. Desta forma, em cada planta foi registrado o número de formigas capturadas, o número de espécies de formigas visitantes, assim como a abundância relativa de formigas por planta em relação ao total do transecto. O comportamento das formigas pode ser afetado pela proximidade do ninho (Hölldobler & Wilson 1990). Assim, nas plantas onde se encontra o ninho o efeito das formigas pode ser de defesa da colônia e não comportamento de forrageio. Para evitar misturar o efeito da atividade normal de forrageio das formigas sobre a folhagem com o comportamento de defesa de um ninho arbóreo, foram excluídas da análise as plantas onde a presença de ninhos de formigas foi confirmada. Possíveis diferenças na composição da mirmecofauna entre os locais foram avaliadas usando uma análise de ordenação “non-metric *multi-Dimensional scaling*” (MDS) e testadas através de uma análise de Manova de permutações

de um fator (Anderson 2001), usando para isto o pacote *vegan* para o programa R V.2.14.2 (R development Core Team (2011)).

Análise da abundância de formigas por planta

O efeito da abundância de formigas sobre as larvas de lepidópteros foi estudado em diferentes escalas. Inicialmente, foi estudada a relação entre a abundância de larvas e de formigas considerando o transecto como unidade amostral. De esta forma foi possível estudar os efeitos da comunidade local de formigas na presença de larvas. A proporção de plantas com larvas entre as localidades foi comparada com um teste de Kruskal-wallis. A abundância de formigas por planta foi comparada com um teste de variância e um teste de comparações múltiplas de Tukey. A relação entre a presença de larvas com as médias de abundância de formigas assim como com o diâmetro médio das plantas por transecto foi testado usando uma correlação de Spearman

Ao avaliar o número de formigas numa planta, é importante considerar quanto representa esta abundância em relação à abundância geral de formigas no mesmo transecto. Da mesma forma, para estudar o efeito da abundância de formigas na presença de larvas, é relevante considerar as diferenças na abundância de formigas entre aquelas plantas que fazem parte da dieta potencial da larva (*i.e.*, espécies hospedeiras que de fato a larva poderia usar), e não entre todas as plantas do transecto. Para considerar este efeito, a abundância de formigas nas plantas onde foi amostrada cada larva foi comparada de forma pareada com a abundância em outras plantas hospedeiras potenciais no mesmo transecto (*i.e.*, espécies de plantas daquela localidade onde aquela espécie de larva já havia sido registrada).

Modelos de presença de larvas

Numa segunda abordagem, o feito da presença de formigas foi estudado na escala das plantas individuais usando estas como unidade amostral. Neste caso foi utilizada a presença de larvas nas plantas como variável resposta e não o número delas para evitar que variações nas estratégias de oviposição dos diferentes lepidópteros mascarem possíveis efeitos da interação com formigas. A abordagem de modelos mistos generalizados foi utilizada para entender como a presença de larvas na escala de plantas individuais foi afetada pela localidade, bem como pela mirmecofauna visitando dita planta individual. Modelos mistos generalizados se fundamentam no uso de funções de ajuste e distribuições específicas (*i.e.* Binomial, Poisson), mas com a incorporação de variáveis aleatórias (Bolker *et al.* 2009). Este tipo de modelo foi o melhor para os nossos dados, tanto por que a presença de larvas nas plantas é uma variável do tipo presença-ausência (binária), mas também porque o próprio desenho amostral inclui o transecto como uma variável aleatória, que por sua vez se encontra aninhada nas localidades amostradas. Uma variável aleatória é aquela que está relacionada mais com a variação entre as unidades ou indivíduos estudados, do que diretamente com a variável resposta. As variáveis predictoras fixas foram: localidade (L), presença de atrativos para visitação por formigas (A), número de formigas (NF), e número de espécies de formigas por planta (SF). Adicionalmente, foram considerados os efeitos das intera o es do número de formigas por planta com a presença de atrativos e a localidade. Os modelos foram construídos usando o pacote lme4 para a linguagem R 2.12.9 (2011), usando a aproxima o de Laplace para a estimacão dos parâmetros, a distribuic o binomial e a fun o Logit. Foram construídos diferentes modelos com as combina o es possíveis entre as variáveis e intera o es consideradas. Para escolher o modelo que incluísse as variáveis que melhor explicam a presença de larvas nas plantas, foi usado, usando para

isto o pacote *Multi-model inference* (MuMIn) do software R 2.12.9 (2011). Este pacote considera cada combinação possível das variáveis como modelo predictor da variável resposta e calcula o ajuste de cada modelo através do valor de AICc (critério de Informação de Akaike corrigido) e ranquea os modelos do menor ao maior valor de AICc (Burnham & Anderson 2002; Johnson & Omland 2004; Bolker *et al.* 2009). O pacote calcula também a importância ponderada de cada modelo (W_i). Burnham & Anderson (2002) sugerem que os melhores modelos são aqueles menores valores de AICc. Modelos com $\Delta AICc < 2$ podem ser considerados equivalentes. Uma vez que vários modelos satisfaziam esse critério foi utilizada uma abordagem de média de modelos. Adicionalmente, o pacote calcula a importância média de cada variável para o conjunto de modelos construídos.

Resultados

Abundância de formigas e presença de larvas

A maior abundância de larvas foi registrada em Uberlândia e Itirapina, seguida por Mogi-Guaçu e Assis (Tabela 1), um padrão que se repete na proporção de plantas com larvas (Fig. 1a; teste de Kruskal-Wallis $H_{(3, N=24)} = 10.26, p = 0.016$), que é também maior em Uberlândia. A riqueza de larvas de lepidópteros não-mimecófilos apresentou a mesma tendência de variação entre locais. Foi encontrada uma diferença significativa no número de morfoespécies de larvas de lepidópteros por transecto entre as localidades (teste de Kruskal-Wallis: $H_{(3, N=24)} = 8.54, p = 0.036$), tendo seu maior valor em Uberlândia e o menor em Assis.

Foi amostrada uma maior quantidade de formigas na localidade de Mogi-Guaçu (7032 indivíduos), seguido por Assis (6774 indivíduos), Itirapina (5913 indivíduos) e Uberlândia (1415 indivíduos) (para informação detalhada ver Tabela 1). O número médio

de formigas por planta por transecto foi diferente entre as localidades (ANOVA, $F_{(df=3)} = 15,43$; $P < 0,001$), sendo menor para a localidade de Uberlândia intermediário para Itirapina e maior para as outras duas localidades (Fig. 1b). Por outro lado, a composição da mirmecofauna variou claramente entre as localidades estudadas (Fig. 2), com exceção de Mogi-Guaçu e Itirapina, cujos transectos na ordenação formam um grupo muito próximo. Entretanto, a composição da mirmecofauna nos transectos variou significativamente entre os grupos (teste PerMANOVA: $F_{(3)} = 4.669$, $P = 0,0001$), mas não dentro deles.

A abundância de larvas encontradas por transecto não esteve relacionado com a riqueza de espécies de plantas (Correlação de Spearman, $\rho = -0.26$, $P > 0.05$, $r^2 = 0.067$), nem com o diâmetro médio do caule das plantas no transecto (Correlação de Spearman, $\rho = -0.04$, $P > 0.05$, $r^2 = 0.001$). A riqueza de larvas também não apresentou relação com a riqueza de plantas (Correlação de Spearman, $\rho = -0.31$, $P > 0.05$, $r^2 = 0.122$). Entretanto, a abundância média de formigas por transecto esteve negativamente correlacionada com a abundância de larvas por transecto (Fig. 3). De forma geral a abundância de formigas foi menor em plantas onde foram amostradas larvas do que em plantas sem larvas (Fig. 4), mas considerando-se as localidades separadamente uma diferença significativa entre plantas com e sem larvas foi encontrada apenas na localidade de Mogi-Guaçu (Fig. 4). Considerando que a abundância de formigas varia muito de planta para planta, o efeito da abundância das formigas sobre a presença de larvas fica mais evidente ao comparar unicamente as plantas hospedeiras potenciais dentro de cada transecto para cada larva (Fig. 5). Neste caso, com exceção de Uberlândia o número de formigas em plantas com larvas foi sempre menor que nas hospedeiras potenciais.

O número médio de formigas em plantas com atrativos foi maior do que em plantas sem atrativos nas localidades de Uberlândia e Itirapina (Fig. 6a). A presença de atrativos

para formigas (NEFs, hemípteros trofobiontes) nas plantas teve também um efeito negativo na presença de larvas. Entretanto, considerando-se as localidades separadamente este efeito só se manteve em duas localidades (Itirapina e Uberlândia) onde a proporção de plantas com larvas foi significativamente menor nas plantas portadoras de atrativos (Fig. 6b).

A diferença na abundância de formigas entre plantas hospedeiras com larvas e hospedeiras potenciais foi detectada apenas para formigas das subfamílias Formicinae (teste de Wilcoxon, $p = 0.003$; Fig. 7) e Myrmicinae (teste de Wilcoxon, $p = 0.003$; Fig. 7), mas não para Dolichoderinae, Pseudomyrmecinae e para as poneromorfas (Ectatomminae, Heteroponerinae e Ponerinae) (Fig. 7).

Modelos para presença de larvas

A análise de modelos generalizados mistos indicou que a localidade em que a planta se encontra (L), a presença de atrativos para formigas (A), e a abundância de formigas (NF) são variáveis que explicam a presença de larvas numa planta particular, sendo estas as variáveis com maior importância relativa média dos modelos (Tabelas 2 e 3). De todos os modelos construídos durante as análises, seis apresentaram $\Delta AICc < 2$ (Tabela 2). Entretanto, a importância dos modelos em geral foi baixa (Tabela 2), pelo que o efeito relativo das variáveis pode ser mais bem entendido pelo efeito médio ponderado destas nos modelos (Burnham & Anderson 2002). Entretanto, o modelo com menor valor de AICc incluiu a localidade (L), a presença de atrativos (A), abundância de formigas (NF), e a interação desta última com a localidade (NF x L). Neste modelo, todas as variáveis apresentaram coeficientes negativos (Tabela 4). Estes resultados apontam à existência de um efeito negativo da abundância de formigas sobre a presença de larvas, que varia entre as localidades.

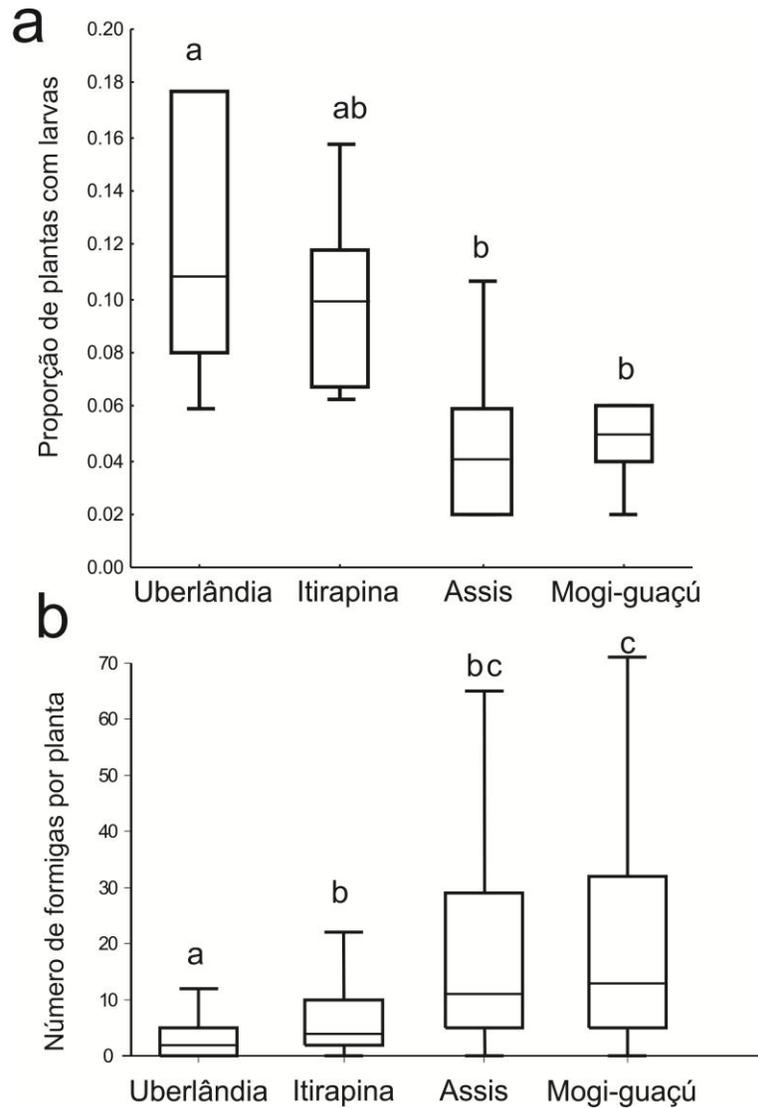


Fig. 1: (a) *Proporção de plantas de cada transecto onde foi encontrada pelo menos uma larva de lepidóptero em cada localidade. As proporções são calculadas pela divisão do número de plantas com larvas em cada transecto e o número total de plantas no respectivo transecto.* (b) *Número médio de formigas nas plantas de cada transecto. As linhas são as medianas, as caixas os quartis, e as barras a amplitude dos dados (sem incluir outliers). Letras acima das barras representam as relações entre os lugares segundo as de comparações múltiplas pelo teste de Kruskal-Wallis para proporção de larvas e o teste de Tukey para o número de formigas.*

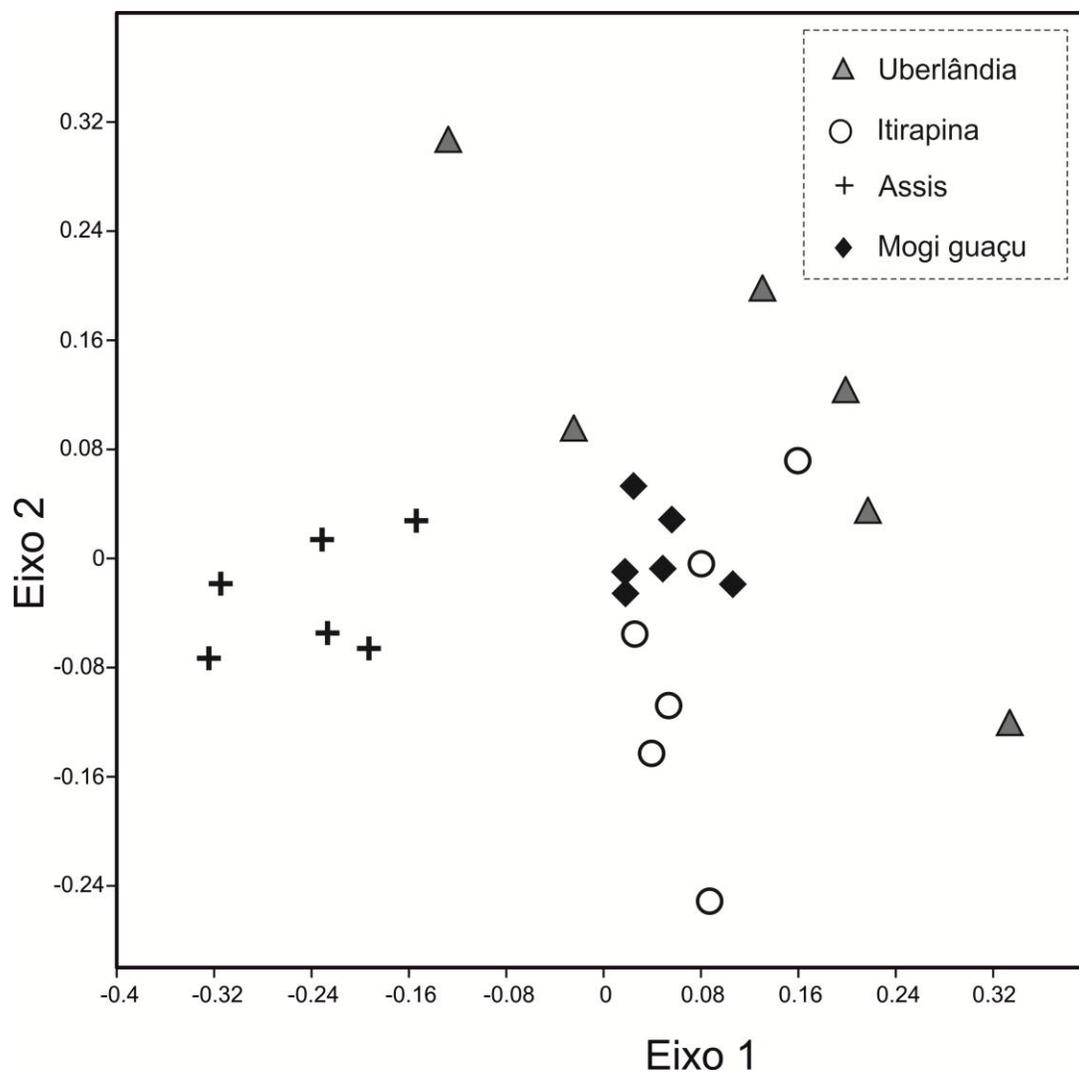


Fig. 2: *Análise de ordenação MDS (Multidimensional scaling) mostrando as diferenças na composição da mirmecofauna entre as localidades estudadas (Distância Morisita. Stress 0.191). Cada ponto representa um transecto, e estão separados pela localidade: Assis: cruz preta; Mogi-Guaçu: losango preto; Itirapina: circulo branco; Uberlândia: triangulo cinza. Todas as localidade foram significativamente diferentes entre elas segundo as comparações múltiplas do teste PerMANOVA (valores de P corrigidos pelo método Bonferroni)*

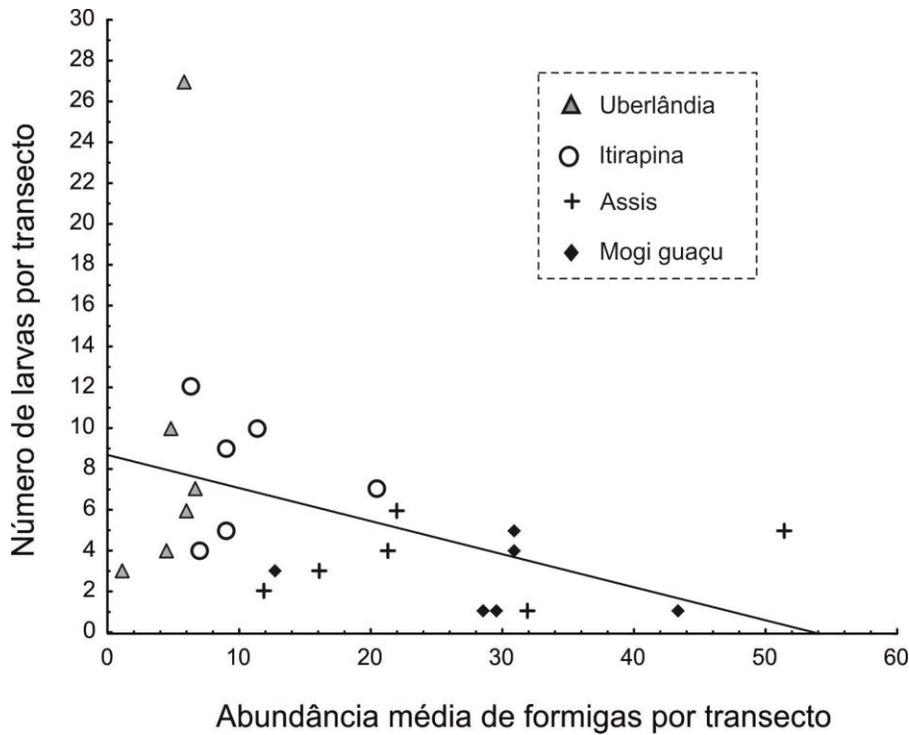


Fig.3: Relação entre a quantidade de larvas amostradas por transecto e a abundância média de formigas por planta em cada transecto. Correlação de Spearman, $\rho = -0.541$, $P < 0.001$, $r^2 = 0.293$).

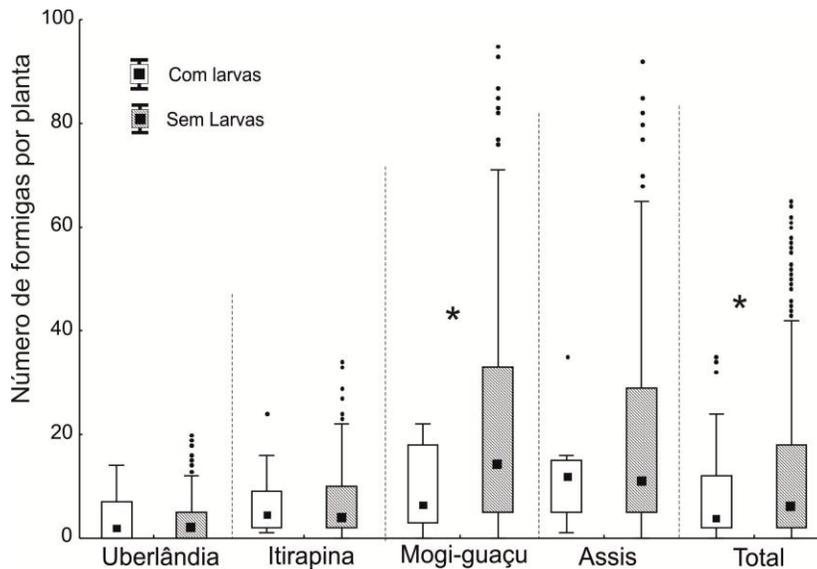


Fig.4: Comparação do número de formigas amostradas entre plantas onde pelo menos uma larva foi encontrada e plantas sem larvas, para cada localidade estudada. Quadrados pretos: Medianas; Caixas: 2º e 3º quartil; Barras: amplitude dos dados; Pontos pretos-“outliers”; * $P < 0.05$ (teste de Mann-Whitney). Uberlândia: $N = 270$; Itirapina: $N = 265$; Mogi-guaçu: $N = 256$; Assis: $N = 274$

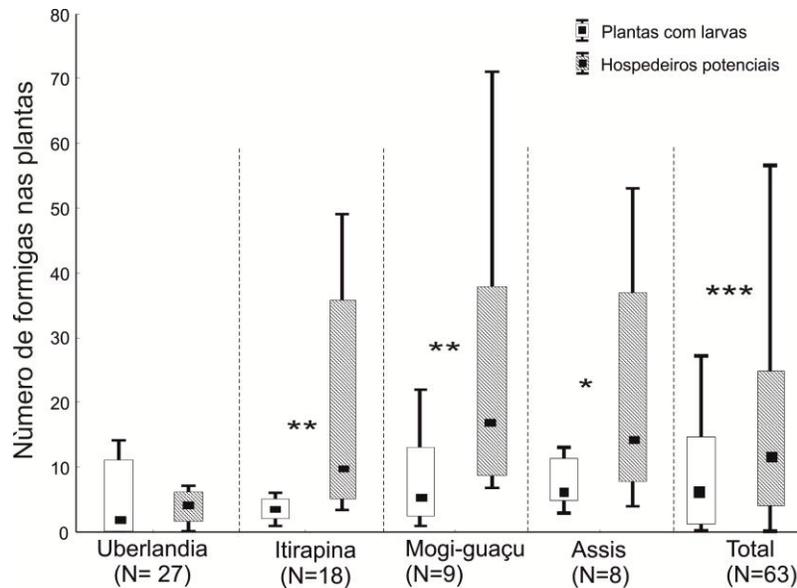


Fig.5: Comparação do número de formigas amostradas entre plantas onde uma larva foi encontrada, e plantas hospedeiras potenciais (sem larvas) vizinhas mais próximas; Quadrados pretos: Medianas; Caixas: 2º e 3º quartil; Barras: amplitude dos dados. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (teste Wilcoxon). Valores abaixo de cada localidade representam o número de pares usados em cada teste.

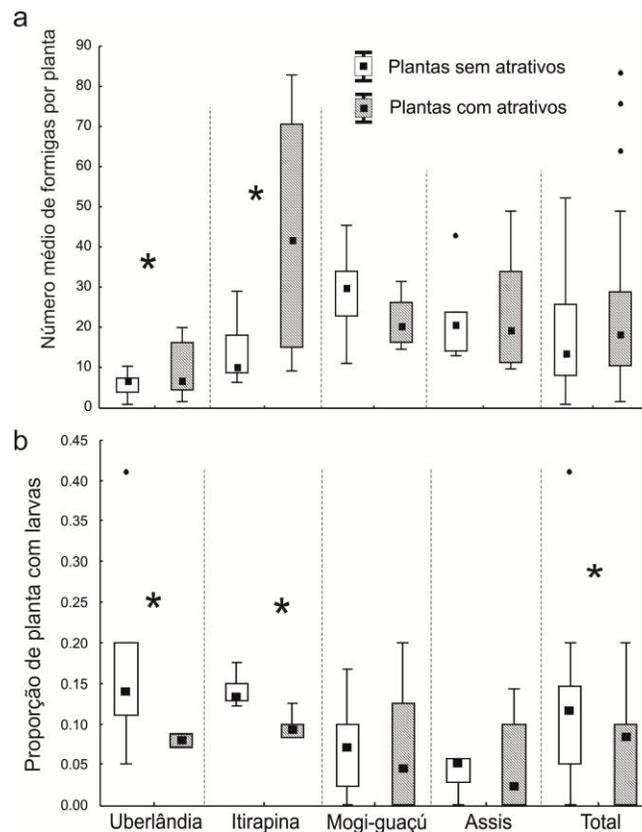


Fig. 6: Comparação entre plantas com atrativos para formigas e plantas sem atrativos. Os dois grupos de plantas foram comparados por: a) Número médio de formigas nas plantas

em cada transecto; b) Proporção de plantas com pelo menos uma larva amostrada para cada transecto. $P < 0.05$ para o teste pareado de Wilcoxon ($N = 6$ transecto por localidade); Quadrados pretos: Medianas; Caixas: 2º e 3º quartil; Barras: amplitude dos dados; Pontos pretos- “outliers”.

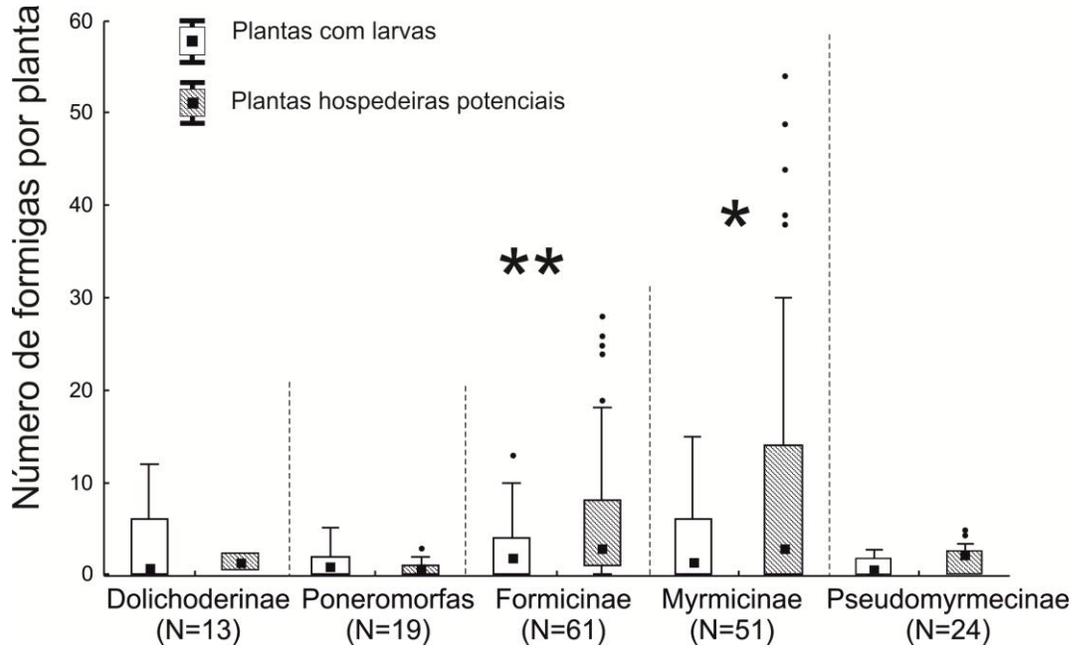


Fig. 7: Número de formigas encontradas nas plantas onde foram amostradas larvas, e nas plantas hospedeiras potenciais (vizinhas mais próximas), para os cinco grupos de formigas considerados (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ no teste pareado de Wilcoxon). Valores abaixo de cada subfamília representam o número de pares usados em cada test.

Tabela 1: Coleta de formigas em cada localidade estudada. O número de formigas por planta indica a média dos transectos de cada localidade (\pm desvio padrão). O valor indicado por um asterisco (*) representa o total de larvas de lepidóptera amostradas em cada localidade.

	Uberlândia			Itirapina			Mogi-Guaçu			Assis			Total		
	No. de espécies	Indivíduos por planta	Plantas ocupadas	No. de espécies	Indivíduos por planta	Plantas ocupadas	No. de espécies	Indivíduos por planta	Plantas ocupadas	No. de espécies	Indivíduos por planta	Plantas ocupadas	No. de espécies	Indivíduos por planta	Plantas ocupadas
Formicidae	40	6.97 (± 17.98)	68.86%	37	24.01 (± 69.30)	90.18%	47	27.46 (± 39.86)	96.48%	53	24.72 (± 38.43)	97.45%	78	20.05 (± 44.54)	88.12%
Dolichoderinae	3	10.12 (± 20.93)	3.66%	3	24.01 (± 52.30)	8.36%	2	28.26 (± 40.39)	3.51%	3	25.29 (± 38.86)	10.58%	4	22.61 (± 73.05)	6.58%
Formicinae	13	5 (± 6.05)	41.75%	15	58.04 (± 65.25)	74.90%	16	13.78 (± 13.29)	87.11%	17	3.34 (± 5.03)	81.39%	22	7.42 (± 13.45)	71.15%
Myrmicinae	16	5.5 (± 11.17)	34.06%	12	4.16 (± 4.70)	44.00%	17	9.69 (± 20.64)	80.08%	22	9.14 (± 10.21)	66.42%	37	22.67 (± 48.13)	55.84%
Pseudomyrmecinae	4	11.74 (± 24.04)	14.65%	4	29.92 (± 69.13)	18.91%	5	22.11 (± 30.19)	22.27%	5	23.96 (± 38.29)	26.28%	7	1.84 (± 3.60)	20.50%
Poneromorfas	4	1.3 (± 0.56)	7.69%	3	1.42 (± 0.85)	9.45%	7	2.84 (± 6.83)	16.02%	6	1.65 (± 1.28)	31.02%	8	1.55 (± 1.28)	16.04%
Larvas	37	60*	15.40%	31	55*	11.80%	17	26*	6.90%	18	20*	5.20%	50	162*	11.10%

Tabela 2: Resultados da seleção de modelos preditores da probabilidade de encontrar larvas em uma planta. Valores de $\Delta AICc$ e peso relativo de cada modelo (w_i) (Dado o alto número de modelos possíveis, são apresentados unicamente os modelos com $\Delta AICc < 2$). Variáveis: Localidade (L), atrativos (A), Abundância de formigas (NF), riqueza de formigas (SF).

Modelo	$\Delta AICc$	w_i
L + A + NF + LxNF	0	0.16
L + A	0.15	0.15
L + A + NF	0.84	0.1
L	1.67	0.07
L + A + NF + SF + LxNF	1.91	0.06
L +NF + LxNF	1.97	0.06

Tabela 3: Resultados da seleção de modelos preditores da probabilidade de encontrar larvas em uma planta. Importância média relativa de cada variável previsor nos modelos construídos (Σw_i).

Variável Previsora	Σw_i
Localidade de amostragem (L)	0,91
Presença de atrativos para formigas (A)	0,77
Número de formigas na planta (NF)	0,66
L x NF	0,38
Número de espécies de formigas (SF)	0,24
A x NF	0,13

Tabela 4: Resultados da seleção de modelos preditores da probabilidade de encontrar larvas em uma planta. Coeficientes médios estimados e erro padrão médio para cada variável previsor. Variáveis: Localidade (L), Abundância de formigas (NF).

Parâmetro	Coefficiente	Erro padrão
Intercepto	-1.751	0.307
Lugar (Assis)	-0.692	0.431
Lugar (Itirapina)	-0.116	0.369
Lugar (Mogi guaçu)	-0.578	0.511
Atrativos	-0.541	0.281
Número de formigas	-0.013	0.007
L (Assis) x NF	-0.018	0.011
L (Itirapina) x NF	-0.019	0.01
L (Mogi guaçu) x NF	-0.039	0.021

Discussão

Nossos resultados mostram que existe uma relação inversa entre a abundância de larvas e a abundância média das formigas nas duas escalas estudadas, regional (localidades) e local (transectos e plantas), de modo que locais com baixa quantidade de formigas nas plantas são também locais com alta quantidade de larvas. Na escala das plantas individuais, a probabilidade de encontrar uma larva de lepidóptero numa planta específica está influenciada pelo lugar em que esta planta se encontra, e negativamente afetada pela presença de atrativos para formigas. Secundariamente na escala de plantas individuais, a visitação pelas formigas (abundância de formigas encontradas na planta) também influenciou negativamente a presença de larvas, mas, este efeito pode depender do lugar de amostragem.

Presença de atrativos nas plantas

A presença de atrativos para formigas nas plantas foi um fator importante afetando a presença de larvas. Em geral as plantas com atrativos apresentaram menos larvas do que as plantas sem atrativos (Fig. 3b). O efeito dos atrativos nas larvas é mediado pela resposta relativa das formigas a ditos atrativos em cada lugar. Era esperado que as plantas com atrativos fossem mais visitadas por formigas, já que estas plantas podem representar áreas de forrageio com importantes recursos para as formigas de Cerrado. Este resultado, encontrado nas localidades de Uberlândia e Itirapina indica que, (pelo menos nestas áreas), a maior visitação por formigas pode representar um maior risco para insetos herbívoros na planta (Rico-Gray & Oliveira 2007), e isso poderia explicar em parte porque as larvas são menos encontradas nas plantas com atrativos. A presença destes atrativos poderia também

afetar negativamente a presença de larvas atraindo outros tipos de inimigos naturais, como parasitóides (Pemberton & Lee 1996). Entretanto, a correspondência entre a maior visitação por formigas e a menor quantidade de larvas em plantas com atrativos nos mesmos locais (Uberlândia e Itirapina) permite afirmar que nestes locais as formigas estão tendo uma influência neste padrão. Para as localidades de Mogi-Guaçu e Assis as diferenças entre plantas com e sem atrativos tanto na abundância de formigas (Fig. 6a) como de larvas (Fig. 6b) não são evidentes. Nestes dois locais a abundância e ocorrência das formigas são muito altas, o que pode afetar todas as plantas igualmente, levando a presença de atrativos não tenha um efeito claro sobre o uso das plantas por larvas de lepidópteros. Nestas localidades, portanto, o efeito das formigas sobre a presença de larvas foi independente da presença de atrativos.

Variações espaciais na presença de larvas e de formigas

O uso de plantas por lepidópteros e a ocorrência de larvas e o uso das plantas podem responder a alguns grupos de formigas especificamente (Sendoya *et al.* 2009). Formigas especializadas em forragear nas árvores ou que sejam mais agressivas podem representar um maior risco para as larvas, enquanto que outras espécies podem não ser agressivas contra herbívoros e não proteger a planta (Byk & Del-Claro 2010). Uma vez que a composição da mirmecofauna variou entre as áreas (Fig. 2), a identidade da fauna de formigas pode afetar a natureza da relação entre formigas e herbívoros e determinar o grau de proteção que elas exercem sobre a planta (Barton 1986; Floren *et al.* 2002; Bruna *et al.* 2004; Mody & Linsenmair 2004). Do mesmo modo, variações no grau de especialização na associação entre cada espécie de planta e de formiga podem determinar a eficiência da interação entre formigas e plantas (Fiala *et al.* 1994). Desta forma, é bastante plausível que

além dos efeitos da abundância de formigas, diferenças na composição da mirmecofauna possa explicar em parte as variações no efeito das formigas nos diferentes locais do nosso estudo. A subfamília Formicinae inclui várias espécies agressivas e adaptadas ao forrageamento nas árvores (e.g. *Camponotus* spp.; veja Davidson *et al.* 2003), e esta especialização ao ambiente arbóreo pode ser considerada um fator de ameaça para as larvas da maioria das espécies de lepidópteros, especialmente em plantas de Cerrado (Oliveira & Freitas 2004). A subfamília Myrmicinae é um dos grupos de formiga mais abundante nas árvores, e foi menos abundante nas plantas com de larvas do que em hospedeiras potenciais vizinhas da mesma espécie. Esta subfamília é rica em número de espécies e heterogênea quanto à morfologia e ecologia (Hölldobler & Wilson 1990). As Myrmicinae incluem alguns gêneros abundantes sobre plantas de Cerrado, e entre estes há formigas que não exercem efeitos sobre os herbívoros (por exemplo *Cephalotes*; Schoereder *et al.* 2010; Byk & Del-Claro 2010). Ao ser um grupo muito heterogêneo no comportamento e ecológica, a subfamília Myrmicinae evidencia a necessidade de realizar análises mais detalhadas ao nível de espécies ou gênero. Desta forma pode ser possível comparar o efeito de cada grupo sobre a presença de larvas com características específicas de história natural das formigas que indiquem a contribuição de cada grupo como possíveis predadoras de larvas.

Desta forma, o efeito das formigas sobre a presença de larvas pode estar condicionado por características da mirmecofauna, tais como a densidade das populações ou intensidade de uso de recursos provenientes das plantas. Entretanto, cada herbívoro pode responder de forma distinta à presença de formigas (Mody & Linsenmair 2004). Estudos mostram que as altas pressões de predação exercidas pelas formigas na folhagem podem influenciar fortemente a composição da fauna de herbívoros nas plantas de florestas tropicais (Floren *et al.* 2002; Mody & Linsenmair 2004). No Cerrado, as características

específicas da comunidade de formigas visitando as plantas (como agressividade ou abundância) podem determinar quais tipos de larvas podem usar as plantas em cada local. Diferentes estratégias larvais de defesa morfológica e comportamental podem evitar a predação por formigas na folhagem, permitindo que as larvas usem plantas visitadas por formigas (Freitas & Oliveira 1992; Dyer 1997; Machado & Freitas 2001; Gentry & Dyer 2002; Jones *et al.* 2002; Sugiura & Yamazaki 2006; Mega & de Araujo 2008; Sendoya *et al.* 2009; Bächtold *et al.* 2012). Entretanto, não todas as estratégias apresentadas pelas larvas são igualmente eficientes na defesa contra formigas (ver Capítulo 2). Assim, larvas que apresentem estratégias de defesa eficientes contra formigas podem usar plantas com alta quantidade de formigas visitantes (Freitas & Oliveira 1992, 1996; Sendoya *et al.* 2009). As relações entre as estratégias de defesa das larvas e a abundância das formigas ainda precisam ser estudadas, e poderiam ajudar a entender as diferenças no efeito das formigas entre as diferentes localidades do nosso estudo. Contudo, o nossos resultados mostram que a intensidade em que mirmecofuana local visita às plantas (e em especial alguns grupos dentro de Formicinae e Myrmicinae) pode determinar o efeito sobre a presença de herbívoros. Isto pode significar que o benefício da interação mutualística com formigas para as plantas pode estar também condicionado pela variação desta visitaçã, fazendo com que em alguns lugares este benefício seja reduzido ou não exista (veja Bronstein 1994, 1998).

Efeito negativo da presença de formigas sobre larvas de lepidópteros

A relação inversa entre abundância de formigas e de larvas encontrada aqui não indica necessariamente relação de causa e efeito. Na realidade isto poderia ser devido a algum outro fator que regule a abundância e diversidade de lepidópteros localmente. Brown

& Gifford (2002) afirma que os padrões de diversidade de lepidópteros do Cerrado em maior escala dependem principalmente do tipo de fisionomia da vegetação e de fatores climáticos. Variações na pluviosidade e nos períodos de seca podem, por exemplo, afetar a forma como as espécies de lepidópteros usam as plantas (Gutbrodt *et al.* 2011). Entretanto, todos os locais usados neste trabalho enquadram-se na fisionomia Cerrado *sensu stricto* (Oliveira-Filho & Ratter 2002) e possuem condições climáticas parecidas (INMET 2012). Adicionalmente, as variáveis da vegetação que consideramos neste estudo (número de espécies de plantas por transecto e diâmetro médio do caule das plantas) não apresentaram relação com a abundância de larvas. Pode-se pensar, então, que outras variáveis biológicas, tais como a presença de inimigos naturais, sejam importantes para entender as diferenças na abundância entre as áreas e o uso de plantas pelos lepidópteros. Em coincidência com esta afirmação, nossos resultados mostram que pelo menos um terço da variação na abundância local de larvas ($R^2 = 0.29$) pode ser explicada pela abundância de formigas nas plantas. A evidência levantada no presente estudo se enquadra no cenário esperado decorrente do efeito antagônico que as formigas exercem sobre herbívoros (Rico-Gray & Oliveira 2007), especificamente dentro do tipo de relação negativa que as formigas exercem sobre as larvas não-mirmecófilas (Sendoya *et al.* 2009; Kaminski *et al.* 2009).

Dois mecanismos não excludentes já descritos poderiam explicar a relação inversa entre abundância de formigas e presença de larvas encontrada neste estudo. Por um lado, a predação ou remoção de ovos ou larvas (especialmente em estágios iniciais) pode ser maior em plantas altamente visitadas por formigas, e desta forma levar a uma sobrevivência diferencial e uma diminuição na presença das larvas nas plantas onde as formigas forrageiam (e.g., Letourneau 1983; Barton 1986, Freitas & Oliveira 1996). Por outro lado, o risco associado a plantas altamente visitadas por formigas agressivas pode levar as fêmeas

adultas a evitar as mesmas durante o processo de seleção de planta hospedeira (Freitas & Oliveira 1996; Sendoya *et al.* 2009).

Apesar de já existirem diversos estudos experimentais específicos envolvendo a exclusão de formigas mostrando que a mortalidade larval é maior em plantas visitadas por formigas do que em plantas sem formigas (Smiley 1985; Sato & Higashi 1987; Freitas & Oliveira 1996; Machado & Freitas 2001, Dutra *et al.* 2006; ver revisão em Rico-Gray & Oliveira 2007), estudos mostrando esse efeito no nível da comunidade ainda são muito escassos. Floren *et al.* (2002) mostraram uma relação inversa entre a presença de larvas de lepidóptero e formigas na folhagem da floresta tropical da Malásia, e sugeriram que a alta pressão de predação por formigas era o principal fator responsável por esta relação. Recentemente, Singer *et al.* (2012) mostraram que a predação por aves insetívoras pode afetar o uso de plantas hospedeiras por lepidópteros no nível de comunidade. Nosso trabalho mostra pela primeira vez a relação inversa entre larvas e formigas no nível da comunidade para savanas tropicais em diferentes escalas, evidenciando uma variação espacial na magnitude deste efeito.

Literatura Citada:

- Aguiar A.P., dos Santos B.F., Couri M.S., Rafael J.A., Costa C., Ide S., Duarte M., Grazia J., Schwertner C.F., Freitas A.V.L. & Azevedo C.O. (2009). Insecta. In: *Estado da Arte e Perspectivas para a Zoologia no Brasil*. (eds. Rocha RM & Boeger WAP). Editora UFPR Curitiba, pp. 131-155.
- Anderson, M.J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, 26:32-46.
- Araujo L.M., Lara A.C.F. & Fernandes G.W. (1995). Utilization of *Apion* sp. (Coleoptera: Apionidae) galls by an ant community in southeast Brazil. *Tropical Zoology*, 8, 319-324.
- Atsatt P.R. (1981). Ant-Dependent Food Plant-Selection by the Mistletoe Butterfly *Ogyris-Amaryllis* (Lycaenidae). *Oecologia*, 48, 60-63.

- Bächtold A., Del-Claro K., Kaminski L.A., Freitas A.V.L. & Oliveira P.S. (2012). Natural history of an ant–plant–butterfly interaction in a Neotropical savanna. *Journal of Natural History*, 46, 943-954.
- Barton A.M. (1986). Spatial Variation in the Effect of Ants on An Extrafloral Nectary Plant. *Ecology*, 67, 495-504.
- Batalha M.A. & Martins F.R. (2004). Reproductive phenology of the Cerrado plant community in Emas National Park (central Brazil). *Australian Journal of Botany*, 52, 149-161.
- Bentley B.L. (1976). Plants Bearing Extrafloral Nectaries and the Associated Ant Community: Interhabitat Differences in the Reduction of Herbivore Damage. *Ecology*, 57, 815-820.
- Bernays E.A. (1997). Feeding by lepidopteran larvae is dangerous. *Ecological Entomology*, 22, 121-123.
- Bolker B.M., Brooks M.E., Clark C.J., Geange S.W., Poulsen J.R., Stevens M.H.H. & White J.S.S. (2009). Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 24, 127-135.
- Bronstein J.L. (1994). Conditional outcomes in mutualistic interactions. *Trends in Ecology and Evolution*, 9, 214-217.
- Bronstein J.L. (1998). The Contribution of Ant-Plant Protection Studies to Our Understanding of Mutualism 1. *Biotropica*, 30, 150-161.
- Brown K.S. & Gifford D.R. (2002). Lepidoptera in the Cerrado Landscape and the Conservation of Vegetation, Soil, and Topographical Mosaics. In: *The Cerrado of Brazil* (eds. Oliveira PS & Marquis RJ). Columbia University Press New York, pp. 201-222.
- Bruna E., Lapola D. & Vasconcelos H. (2004). Interspecific variation in the defensive responses of obligate plant-ants: experimental tests and consequences for herbivory. *Oecologia*, 138, 558-565.
- Burnham K.P. & Anderson D.R. (2002). *Model selection and multimodel inference : a practical information-theoretic approach*. 2nd edn. Springer, New York.
- 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, 33-38.
- 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.
- Bluthgen N. & Stork N.E. (2007). Ant mosaics in a tropical rainforest in Australia and elsewhere: A critical review. *Austral Ecology*, 32, 93-104.
- Davidson D.W., Cook S.C., Snelling R.R. & Chua T.H. (2003). Explaining the abundance of ants in lowland tropical rainforest canopies. *Science*, 300, 969-972.
- Del-Claro K. & Oliveira P.S. (1999). Ant-Homoptera interactions in a neotropical savanna: The honeydew-producing treehopper, *Guayaquila xiphias* (Membracidae), and its associated ant fauna on *Didymopanax vinosum* (Araliaceae). *Biotropica*, 31, 135-144.
- Dutra H.P., Freitas A.V.L. & Oliveira P.S. (2006). Dual ant attraction in the neotropical shrub *Urera baccifera* (Urticaceae): the role of ant visitation to pearl bodies and fruits in herbivore deterrence and leaf longevity. *Functional Ecology*, 20, 252-260.

- Dyer L.A. (1997). Effectiveness of caterpillar defenses against three species of invertebrate predators. *Journal of Research on Lepidoptera*, 34, 48-68.
- Edwards David P., Frederickson Megan E., Shepard Glenn H. & Yu Douglas W. (2009). A Plant Needs Ants like a Dog Needs Fleas: *Myrmelachista schumanni* Ants Gall Many Tree Species to Create Housing. *The American Naturalist*, 174, 734-740.
- Fiala B., Grunsky H., Maschwitz U. & Linsenmair K.E. (1994). Diversity of Ant-Plant Interactions - Protective Efficacy in *Macaranga* Species with Different Degrees of Ant Association. *Oecologia*, 97, 186-192.
- Floren A., Biun A. & Linsenmair K.E. (2002). Arboreal ants as key predators in tropical lowland rainforest trees. *Oecologia*, 131, 137-144.
- Freitas A.V.L. & Oliveira P.S. (1992). Biology and behavior of *Eunica bechina* (Lepidoptera: Nymphalidae) with special reference to larval defense against ant predation. *Journal of Research on Lepidoptera*, 31, 1-11.
- Freitas A.V.L. & Oliveira P.S. (1996). Ants as selective agents on herbivore biology: Effects on the behaviour of a non-myrmecophilous butterfly. *Journal of Animal Ecology*, 65, 205-210.
- Gentry G.L. & Dyer L.A. (2002). On the conditional, nature of neotropical caterpillar defenses against their natural enemies. *Ecology*, 83, 3108-3119.
- Gutbrodt B., Mody K. & Dorn S. (2011). Drought changes plant chemistry and causes contrasting responses in lepidopteran herbivores. *Oikos*, no-no.
- Heil M., Fiala B., Baumann B. & Linsenmair K.E. (2000). Temporal, spatial and biotic variations in extrafloral nectar secretion by *Macaranga tanarius*. *Functional Ecology*, 14, 749-757.
- Hölldobler, B. & Wilson E.O. 1990. The Ants. Springer, Berlin, 732 pp.
- INMET- Instituto Nacional de Meteorologia. (2012). Clima. URL <http://www.inmet.gov.br/html/clima.php#>. Acessado: 08 de março de 2012.
- Jeanne R.L. (1979). A latitudinal gradient in rates of ant predation. *Ecology*, 60, 1211-1224.
- Johnson J.B. & Omland K.S. (2004). Model selection in ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 19, 101-108.
- Jones M.T., Castellanos I. & Weiss M.R. (2002). Do leaf shelters always protect caterpillars from invertebrate predators? *Ecological Entomology*, 27, 753-757.
- Kaminski L.A. (2008). Polyphagy and Obligate Myrmecophily in the Butterfly *Hallynympha paucipuncta* (Lepidoptera: Riodinidae) in the Neotropical Cerrado Savanna. *Biotropica*, 40, 390-394.
- Kaminski L.A., Sendoya S.F., Freitas A.V.L. & Oliveira P.S. (2009). Ecologia comportamental na interface formiga-planta-herbívoro: interações Entre formigas e lepidópteros. *Oecologia Brasiliensis*, 13, 27-44.
- Keeler K.H. (2008). World list of angiosperms with extrafloral nectaries. URL <http://biosci-labs.unl.edu/Emeriti/keeler/extrafloral/Cover.htm>. Visitado em 5 novembro de 2011.
- Koptur S. & Bernays E. (1992). Extrafloral Nectary-mediated interactions Between Insects and plants. In: *Insect-Plant Interactions*. CRC Press Boca Raton, pp. 81-129.
- Lach L., Hobbs R. & Majer J. (2009). Herbivory-induced extrafloral nectar increases native and invasive ant worker survival. *Population Ecology*, 51, 237-243.
- Letourneau, D.K. (1983). Passive aggression: an alternative hypothesis for the Piper-Pheidole association. *Oecologia*, 60, 122-126.

- Lopes B.C. (1995). Treehoppers (Homoptera, Membracidae) in southeastern Brazil: use of host plants. *Revista Brasileira de Zoologia*, 12, 595-608.
- Machado G. & Freitas A.V.L. (2001). Larval defence against ant predation in the butterfly *Smyrna blomfieldia*. *Ecological Entomology*, 26, 436-439.
- Machado S.R., Morellato L.P.C., Sajo M.J. & Oliveira P.S. (2008). Morphological patterns of extrafloral nectaries in woody plant species of the Brazilian cerrado. *Plant Biology*, 10, 660-673.
- Mega N.O. & de Araujo A.M. (2008). Do caterpillars of *Dryas iulia alcionea* (Lepidoptera, Nymphalidae) show evidence of adaptive behaviour to avoid predation by ants? *Journal of Natural History*, 42, 129-137.
- Mody K. & Linsenmair K.E. (2004). Plant-attracted ants affect arthropod community structure but not necessarily herbivory. *Ecological Entomology*, 29, 217-225.
- Oliveira-Filho, A.T. & Ratter, J.A. (2002). Vegetation physiognomies and woody flora of the Cerrado biome. In: *The Cerrado of Brazil* (eds. Oliveira PS & Marquis RJ). Columbia University Press New York, pp.91-120.
- Oliveira P.S. & Brandão C.R.F. (1991). The ant community associated with extrafloral nectaries in the Brazilian Cerrados. In: *Ant - Plant interactions* (eds. Huxley CR & Cutler DF). Oxford University Press Oxford, England, pp. 198-212.
- Oliveira P.S. & Freitas A.V.L. (2004). Ant-plant-herbivore interactions in the neotropical Cerrado savanna. *Naturwissenschaften*, 91, 557-570.
- Oliveira P.S. & Leitão-Filho H.F. (1987). Extrafloral Nectaries - Their Taxonomic Distribution and Abundance in the Woody Flora of Cerrado Vegetation in Southeast Brazil. *Biotropica*, 19, 140-148.
- Oliveira, P.S., Silva, A.F. da & Martins, A.B. 1987. Ant foraging on extrafloral nectaries of *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae) in Cerrado vegetation: ants as potential antiherbivore agents. *Oecologia*, 74: 228-230.
- Pemberton R.W. & Lee J.H. (1996). The influence of extrafloral nectaries on parasitism of an insect herbivore. *American Journal of Botany*, 83, 1187-1194.
- R development Core Team (2011). R: A Language and Environment for Statistical Computing. In: (ed. Team RDC). R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria.
- Ribas C.R. & Schoereder J.H. (2002). Are all ant mosaics caused by competition? *Oecologia*, 131, 606-611.
- Ribas C.R., Schoereder J.H., Pic M. & Soares S.M. (2003). Tree heterogeneity, resource availability, and larger scale processes regulating arboreal ant species richness. *Austral Ecology*, 28, 305-314.
- Rico-Gray, V. (1993) Use of plant-derived food resources by ants in the dry tropical lowlands of Coastal Veracruz, Mexico. *Biotropica*, 25, 301-315
- Rico-Gray V. & Oliveira P.S. (2007). *The ecology and evolution of ant-plant interactions*. University of Chicago Press, Chicago.
- Rudgers J.A. & Strauss S.Y. (2004). A selection mosaic in the facultative mutualism between ants and wild cotton. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 271, 2481-2488.
- Salazar B.A. & Whitman D.W. (2001). Defensive tactics of caterpillars against predators and parasitoids. In: *Insects and plant defences dynamics* (ed. Ananthakrishnan TN). Science Publishers, Inc. Plymouth, UK, pp. 161-207.

- Sato H. & Higashi S. (1987). Bionomics of *Phyllonorycter* (Lepidoptera, Gracillariidae) on *Quercus*. II. Effects of Ants. *Ecological Research*, 2, 53-60.
- Scheirs J. & De Bruyn L. (2002). Integrating optimal foraging and optimal oviposition theory in plant-insect research. *Oikos*, 96, 187-191.
- Schoereder J.H., Sobrinho T.G., Madureira M.S., Ribas C.R. & Oliveira P.S. (2010). The arboreal ant community visiting extrafloral nectaries in the Neotropical Cerrado savanna. *Terrestrial Arthropod Reviews*, 3, 3-27.
- Sendoya S.F., Freitas A.V.L. & Oliveira P.S. (2009). Egg-Laying Butterflies Distinguish Predaceous Ants by Sight. *American Naturalist*, 174, 134-140.
- Singer M.S., Farkas T.E., Skorik C.M. & Mooney K.A. (2012). Tritrophic interactions at a community level: effects of host plant species quality on bird predation of caterpillars. *American Naturalist*, 179, 363-74.
- Smiley J.T. (1985). Heliconius Caterpillar Mortality During Establishment on Plants with and Without Attending Ants. *Ecology*, 66, 845-849.
- Stadler, B., & Dixon, A. F. G. 2008. Mutualism: ants and their insect partners. Cambridge University Press, Cambridge.
- Sugiura S. & Yamazaki K. (2006). The role of silk threads as lifelines for caterpillars: pattern and significance of lifeline-climbing behaviour. *Ecological Entomology*, 31, 52-57.

CAPÍTULO 2:

**CARACTERÍSTICAS DEFENSIVAS MORFOLÓGICAS E COMPORTAMENTAIS
CONTRA PREDACÃO POR FORMIGAS EM LARVAS DE LEPIDOPTERA DO
CERRADO**



Sebastian F. Sendoya¹, André V. L. Freitas² & Paulo S. Oliveira²

1. Programa de Pós graduação em Ecologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6109, 13083-970 Campinas São Paulo, Brasil.
2. Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6109, 13083-970 Campinas São Paulo, Brasil.

Resumo:

As larvas de Lepidoptera são um importante grupo de herbívoros que apresentam uma alta vulnerabilidade ao ataque por predadores generalistas, como as formigas. Formigas são organismos dominantes na folhagem de muitos ecossistemas e são conhecidas por reduzirem os níveis de infestação por insetos herbívoros. Assim, formigas podem influenciar a forma que insetos herbívoros usam as plantas, bem como suas estratégias de defesa. Neste trabalho investigamos a variedade e eficiência das estratégias de defesa de larvas de lepidópteros contra a predação por formigas. Amostramos larvas em diferentes localidades de Cerrado do sudeste do Brasil e identificamos suas estratégias de defesa. Adicionalmente, examinamos a eficiência destas estratégias de defesa, especificamente contra duas espécies de formigas muito abundantes na folhagem destas áreas (*Camponotus crassus* e *Camponotus renggeri*). Os testes foram feitos em plantas artificiais dentro de uma arena de forrageio, onde larvas de diferentes espécies de lepidópteros foram expostas a formigas forrageadoras de colônias ativas. Registramos as estratégias de defesa utilizadas, assim como a mortalidade das larvas após contato com as formigas. Encontramos que a construção de abrigos foi a estratégia mais frequente e eficiente para evitar o ataque de formigas. Em geral, o tamanho da larva é um bom previsor do ataque pelas formigas e da mortalidade das larvas, mas o efeito final pode depender da espécie de formiga utilizada. A previsibilidade de ataque por formigas é menor quando é considerada a presença de defesas morfológicas nas larvas, e a eficiência de defesa varia com a espécie de formiga. Larvas glabras que não constroem abrigos e larvas que fazem os abrigos unicamente de seda são os grupos mais vulneráveis à predação por formigas. Sugerimos então que a eficiência das defesas comportamentais e morfológicas de larvas de lepidópteros contra predação pode ser um fator importante no uso de plantas altamente visitadas por formigas. A eficiência destas

estratégias contra predação por formigas arborícolas pode ser crucial para determinar a sobrevivência das larvas e o uso de plantas hospedeiras no Cerrado.

Abstract

Lepidoptera is the second insect order in diversity and their larvae are among the most important herbivores in many ecosystems. Due to their relatively low mobility, caterpillars are vulnerable to natural enemies. Ants are dominant organisms in tropical ecosystems, acting as generalist predators and reducing infestation by herbivorous insects on foliage. Consequently, ants have a great influence on host-plant use and defensive strategies by immature Lepidoptera. Here, we investigate the effectiveness of caterpillar defense strategies against ant predation. We conducted a survey of caterpillars in different localities of 'Cerrado' savanna in Southeast Brazil. We also examined the efficacy of the caterpillars' defensive traits against predation by two common foliage-dwelling ant species of Cerrado (*Camponotus crassus* and *Camponotus renggeri*). In the laboratory, we set up a series of encounters between larvae of different lepidopteran species and foraging ants from captive colonies. Trials were performed on artificial host-plants inside a foraging arena. We recorded and described the behavioral responses of the larvae during encounters with ants, and how these were related with ant aggressiveness. We also recorded larval mortality after encounters. We found that shelter construction is a very common trait in caterpillars, and is also the most efficient strategy to avoid encounters with ant foragers on foliage. In general, caterpillar size is a good predictor of attack by ants and of larval mortality. The magnitude and direction of this effect, however, depends on the ant species. Larval morphological traits such as long setae and/or scoli are weak predictors of attack by ants, and their defensive efficacy varies with the ant species. Smooth-bodied caterpillars that do not build

shelters, and those constructing shelters made solely of silk, are the ones most vulnerable to ant attacks and tend to use plants with decreased levels of ant visitation. We suggest that the effectiveness of caterpillar behavioral and morphological defensive strategies may mediate the use of plants that are highly visited by ants. Thus the efficiency of the defensive sets against predation by foliage-dwelling ants can be a crucial factor determining caterpillar survival and host-plant use in the ant-rich Cerrado savanna.

Introdução

A ordem Lepidoptera (borboletas e mariposas) é a segunda mais diversa de insetos no mundo (Salazar & Whitman 2001; Aguiar *et al.* 2009). Entretanto, a biologia da maior parte das espécies e suas interações com outros organismos é ainda desconhecida em vários ecossistemas tropicais, como por exemplo, o Cerrado (Diniz & Morais 1997). A maior parte das espécies de Lepidoptera é herbívora durante a fase larval, sendo a alimentação a principal atividade nesse período, de forma a maximizar o crescimento e o desenvolvimento (Salazar & Whitman 2001). Contudo, enquanto se alimentam, a vulnerabilidade das larvas a inimigos naturais pode ser bastante alta (Bernays 1997). Inimigos naturais tais como patógenos e parasitoides podem ser determinantes da sobrevivência das larvas, mas em alguns casos a predação pode ser a maior fonte de mortalidade (Feeny *et al.* 1985). De fato, larvas de Lepidoptera frequentemente apresentam diferentes estratégias de defesa (morfológicas, químicas ou comportamentais), que podem ter eficiência variável dependendo do inimigo natural considerado (Gentry & Dyer 2002; Sandre *et al.* 2007; Castellanos *et al.* 2011). Adicionalmente, em algumas espécies, várias defesas podem ser combinadas contra um mesmo tipo de inimigo (Castellanos *et al.* 2011).

A maior parte das interações entre larvas e formigas é de caráter antagônico, com exceção de larvas das famílias Lycaenidae e Riodinidae, que podem estabelecer interações mutualística (Price *et al.* 2002). A predação é uma das principais interações antagônicas (Bronstein 1994) que ocorrem entre larvas e formigas. De fato, juntamente com os pássaros, as formigas são consideradas os principais predadores de larvas de lepidópteros (Scoble 1995; Salazar & Whitman 2001; Remmel *et al.* 2011, Singer *et al.* 2012), atacando principalmente os estágios iniciais durante o estabelecimento da lagarta sobre a planta hospedeira. Estima-se que uma única colônia de *Formica rufa* (Formicinae) possa predação mais de 400.000 lagartas por ano (Adlung 1966). Diferentes estudos têm mostrado que a existência deste efeito antagônico pode reduzir as taxas de infestação de larvas de lepidóptero em plantas (ver exemplos em Rico-Gray & Oliveira 2007; Styrsky & Eubanks 2010; De-Silva *et al.* 2011).

A presença de predadores de hábitos generalistas, como as formigas, tem sido considerada uma pressão seletiva de grande importância na evolução dos padrões de uso de plantas hospedeiras por insetos fitófagos (Bernays & Graham 1988; Stamp 2001; Singer & Stireman 2003). As formigas que forrageiam na folhagem representam um dos principais predadores de larvas e podem ser importantes na evolução das adaptações defensivas em lepidópteros, bem como na seleção de plantas hospedeiras por estes insetos (Sendoya *et al.* 2009).

As estratégias de defesa contra predadores estão divididas em defesas primárias, nas quais o encontro com o predador é evitado, e defesas secundárias, que aumentam a chance do herbívoro sobreviver ao encontro com o predador (*i.e.* respostas comportamentais, morfológicas ou fisiológicas) (Gross 1993). As larvas de lepidópteros apresentam diferentes estratégias defensivas eficientes contra predação, que variam de construção de

abrigos a defesas comportamentais (Salazar & Whitman 2001). Dentre os tipos mais bem conhecidos e estudados de defesa estão os abrigos, geralmente construídos com material vegetal ou restos de fezes (Loeffler 1996b; Eubanks *et al.* 1997; Jones *et al.* 2002; Mega & Araujo 2008; Abarca & Boege 2011; Bächtold *et al.* 2012, Moraes *et al.* 2012). Alguns estudos mostraram que certos tipos de refúgios, tais como trampolins construídos com fezes nas margens das folhas podem diminuir a probabilidade de encontro com as formigas, e consequentemente a chance das lagartas serem predadas (Freitas & Oliveira 1992, 1996; Machado & Freitas 2001). Como defesas morfológicas externas, lagartas podem possuir cerdas, espinhos ou escolos desenvolvidos (Osborn & Jaffe 1998; Murphy *et al.* 2010), e em muitos casos exibem respostas comportamentais específicas associadas ao uso da cada uma destas estruturas (Castellanos *et al.* 2011). Por último, respostas comportamentais a encontros com formigas, como contorções fortes do corpo, mordidas e regurgitações também podem ser defesas eficientes (Smedley *et al.* 1993; Dyer 1995; Salazar & Whitman 2001; Sugiura & Yamazaki 2006). Outra defesa comportamental comum em lepidópteros é a de abandonar a planta hospedeira jogando-se diretamente no chão (Yamazaki 2010), ou pendurando-se por um fio de seda (Freitas & Oliveira 1992; Oliveira & Freitas 2004; Sugiura & Yamazaki 2006).

Assim, é esperado que larvas de lepidópteros vivendo em ecossistemas ricos em formigas, como o Cerrado (Oliveira *et al.* 2002), apresentem características que permitam evitar ou sobreviver ao ataque de formigas. Contudo, estudos que caracterizem o papel específico das formigas no uso de plantas hospedeiras por lepidópteros não-mirmecófilos e suas adaptações defensivas ainda são escassos (mas veja Dyer 1995, 1997) ou focam unicamente em casos particulares (Freitas & Oliveira 1996; Sendoya *et al.* 2009). Este estudo visa identificar e caracterizar quais são as estratégias defensivas morfológicas e

comportamentais mais comuns em larvas de Lepidoptera que usam plantas no Cerrado brasileiro. A eficiência destas defesas será avaliada em relação ao efeito de duas das espécies de formigas mais abundantes nessa vegetação.

Métodos

Coletas de campo

As larvas de lepidópteros foram coletadas em quatro fragmentos de Cerrado, correspondentes a fisionomia de Cerrado *sensu stricto* (Oliveira-Filho & Ratter 2002): três localizados nos estado de São Paulo (Itirapina, Mogi Guaçu e Assis) e um em Minas Gerais (Uberlândia) (veja mais detalhes sobre as áreas na introdução geral). Em cada localidade foram estabelecidos seis transectos separados entre si por no mínimo 100 m. Cada transecto foi definido estendendo-se uma linha na vegetação e selecionando as plantas distando até um metro desta linha, em ambos os lados. Somente plantas com uma altura entre 60 a 300 cm foram amostradas em cada transecto, até o máximo de 50 indivíduos/transecto. As amostragens foram realizadas durante a estação chuvosa (janeiro-abril). Cada planta dentro do transecto foi exaustivamente vasculhada à procura de lagartas, de forma que todos os seus galhos fossem inspecionados, num tempo máximo de 10 min. As larvas foram coletadas e levadas para o laboratório para criação até o estagio adulto. Adicionalmente, foi registrada a presença de nectários extraflorais (NEFs) e de insetos produtores de exsudato (hemípteros ou lepidópteros trofobiontes), ambos potencialmente utilizados como fonte de alimento por formigas e conhecidos por atraírem formigas às plantas (veja Rico-Gray & Oliveira 2007; Stadler & Dixon 2008).

Estas coletas permitiram realizar observações de história natural sobre os tipos de defesas morfológicas e comportamentais utilizados pelas lagartas no Cerrado, separando-as

em diferentes grupos de estratégias de defesa. Dependendo das características defensivas evidenciadas nas larvas encontradas (morfológicas e comportamentais) foram estabelecidos grupos de estratégia de defesa (Tabela 1, Fig. 2), os quais foram categorizados usando os critérios a seguir. Por um lado, foi considerada a construção de abrigos (Jones *et al.* 2002; Abarca & Boege 2011; Greeney *et al.* 2012), e grau de exposição da larva dentro deste abrigo. Também foi levada em conta a presença de fezes dentro do abrigo, o que poderia ser relevante para a detecção do herbívoro por inimigos naturais (Weiss 2003). Para as larvas que não constroem abrigos, foram usadas características de defesas morfológicas (cerdas, tubérculos ou escolos) para estabelecer grupos. Por último, larvas com hábitos gregários foram separadas em um grupo independente (Tabela 1).

Após finalizar a amostragem das larvas, armadilhas do tipo “pitfall”, adaptadas à amostragem em árvores (modificado de Ribas *et al.* 2003), foram instaladas e deixadas nas plantas durante 24 horas. Em cada planta foram colocadas duas armadilhas: uma com isca de mel (fonte de carboidrato) e outra com isca de sardinha (fonte de proteína). As formigas coletadas foram levadas ao laboratório para contagem e identificação. A coleta tanto de formigas como de larvas de lepidópteros permitiu relacionar diferentes tipos de defesas morfológicas e comportamentais com a visitação por formigas nas respectivas plantas. Entretanto, a abundância de formigas visitantes a um indivíduo (planta hospedeira) particular pode ser relevante para a presença de larvas unicamente quando comparadas com a abundância de formigas em outros indivíduos do mesmo local. Desta forma, foi realizada uma comparação pareada da abundância de formigas entre as plantas onde cada larva (de cada grupo defensivo) foi coletada e uma planta “hospedeira potencial”. Era considerada uma hospedeira potencial a planta da mesma espécie mais próxima que se encontra dentro do mesmo transecto.

Experimentos em laboratório

Experimentos em laboratório foram desenvolvidos para testar a eficiência das diferentes estratégias de defesa de larvas de lepidópteros contra a predação por formigas. Para isso foi feita uma coleta independente de larvas (N =129) nas plantas de Cerrado em Itirapina, SP (incluindo 45 morfoespecies). Neste caso, para cada larva foram registradas as estratégias de defesa que podiam ser vistas em campo, bem como um registro de comportamentos exibidos por cada larva ao toque com uma pinça em campo. Larvas e galhos das respectivas plantas hospedeiras foram transportados para o laboratório onde cada larva foi mantida com sua planta hospedeira, em uma caixa de criação. Todos os indivíduos foram mantidos nestas condições por pelo menos 24 horas antes dos experimentos de interação com formigas. Para esses experimentos, foram estabelecidos ninhos de duas das espécies de formigas dentre as mais comuns na vegetação do Cerrado (Oliveira & Brandão 1991; Schoereder *et al.* 2010): *Camponotus crassus* Mayr, 1862 e *Camponotus renggeri* Emery, 1894 (três ninhos de cada espécie, os quais não incluíam operárias de tamanho grande). Cada colônia foi acondicionada numa bandeja de criação (70 x 40 cm), e cada ninho consistiu de 3 a 5 tubos de ensaio (2 x 20 cm) contendo água presa ao fundo com algodão (veja Hölldobler & Wilson 1990). Cada bandeja foi conectada a uma arena de forrageio (40 x 25 cm) contendo um suporte de madeira de 20 cm de altura com duas hastes. Em cada haste foi colocado um tubo plástico do tipo “ependorf” com solução açucarada. Esta estrutura funcionava como uma “planta artificial” à qual as formigas tinham livre acesso (ver Fig. 1A-D). Os tubos ependorf funcionaram como nectários artificiais para estimular a visitação das formigas. As formigas foram habituadas a estas condições por um período de duas semanas antes do início dos experimentos.

Os experimentos foram feitos independentemente com larvas em ninhos de *C. crassus* (N = 64 testes) e em ninhos de *C. renggeri* (N = 65 testes), a fim de se investigar a função defensiva dos abrigos larvais em relação a formigas. Os experimentos foram divididos em três grupos. Experimento I: larvas que foram encontradas no campo desabrigadas (N= 52). Experimento II: larvas que foram encontradas no campo dentro de algum tipo de abrigo (N=71). Experimento III: larvas cujo abrigo natural foi aberto propositalmente a fim de expô-las à interação direta com formigas (N=71).

Para cada experimento, o galho contendo a larva era colocado no suporte e os registros eram iniciados assim que as formigas entrassem em contato com o galho (Fig. 1E). Para cada teste foi registrado se a larva era ignorada, atacada ou morta pelas formigas, bem como os respectivos comportamentos dos organismos envolvidos. A variável resposta dos testes foi “ataque” ou “ausência de ataque” à larva pelas formigas. Foi considerado “ataque” somente se uma formiga mordida alguma parte do corpo da larva. Cada experimento teve duração máxima de 10 min a partir do contato da primeira formiga com a larva, ou até a larva ser morta pela formiga. Larvas gregárias foram testadas em grupo, registrando-se o ataque a qualquer um dos membros da agregação. A morte ou não da larva ao final do experimento foi a segunda variável resposta. Tanto as larvas mortas diretamente na planta, como as mortas na bandeja, na base do galho, ou mortas somente depois de carregadas para o ninho, foram consideradas “mortas”. Para evitar o efeito de experiências prévias, as formigas que atacaram diretamente a lagarta eram removidas do ninho após o registro da interação e os testes numa mesma colônia eram intercalados por intervalos de pelo menos 2 horas. Após cada experimento as larvas eram removidas da arena, inclusive quando foram mortas ou carregadas pelas formigas. Fluidos ou secreções das larvas foram também removidos da arena. Uma vez que o nível de agressividade pode variar com o

estado nutricional da colônia (Ness *et al.* 2009), todas as colônias foram privadas do consumo de proteínas por 72 horas antes dos experimentos.

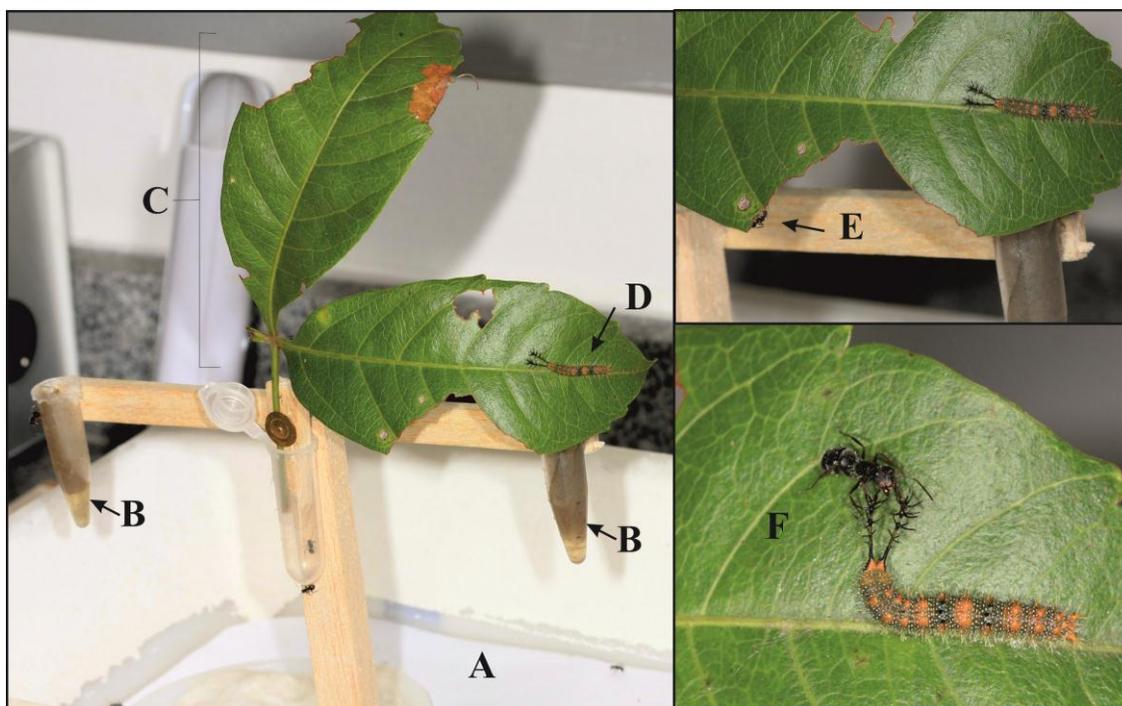


Fig. 1: *Aparato experimental para os testes de interação entre formigas e larvas. A: Bandeja de forrageio com suporte de árvore artificial; B: Nectários artificiais; C: Galho de planta hospedeira; D: Larva colocada para iniciar o experimento; E: Operária de C. crassus entrando em contato com galho e iniciando experimento; F: Operária de C. crassus interagindo com a larva estudada.*

Análise de dados

Para comparar a proporção de larvas com as diferentes defesas entre as localidades e entre plantas com ou sem defesas foram utilizados testes de G. A quantidade de formigas visitantes em plantas com larvas e em plantas consideradas hospedeiras potenciais (planta da mesma espécie mais próxima no transecto) foi comparada pareadamente, considerando um par uma planta hospedeira individual e a correspondente hospedeira potencial do mesmo transecto. Dista comparação foi feita com um teste de Wilcoxon.

Para cada experimento foi considerado se a larva era atacada e/ou morta pelas formigas. Para entender que condições explicavam melhor a probabilidade deste ataque

ocorrer foi feita uma análise de modelos generalizados (GLM). Este tipo de modelo se fundamenta no uso de funções de ajuste e distribuições específicas, neste caso a distribuição binomial, por se tratar de uma variável resposta de tipo binária (Logan 2010). Esta análise foi realizada em duas etapas, uma usando como variável resposta se houve ou não ataque pela formiga, e outra se houve morte da larva causada pela formiga. Na primeira parte (ataque da formiga), foram consideradas cinco variáveis predictoras: 1) a espécie de formiga utilizadas no experimento (F), 2) a presença de defesa morfológica externa na larva (larvas hirsutas com cerdas ou escolos, ou pelo contrario larvas glabras sem defesas morfológicas aparentes) (M), 3) presença de abrigo larval (A), 4) tamanho da larva (T), e 5) presença de NEFs na planta hospedeira (N). Os experimentos com larvas sem abrigos e larvas tiradas do abrigo foram tratados independentemente. Desta forma três grupos de modelos foram construídos: (1) todas as larvas sem manipulação (Experimento I+II), que incluía também como predictoras os efeitos das interações entre a espécie de formiga utilizada no experimento com o tamanho (F x T) e com a presença de defesas morfológicas (F x M) e a presença de NEFs (FxN) e por último a interação entre morfologia e tamanho (MxT); (2) Larvas encontradas sem abrigos (Experimento I), o qual não incluía a presença de abrigo como predictoras, mas incluía a interação da espécie de formiga com o tamanho (F x T) e com a presença de defesas morfológicas (F x M); (3) Larvas que foram expostas após a abertura de seus abrigos (Experimento III), neste caso além de não incluir nem o abrigo como variável foi excluída a variável defesa morfológica (estas larvas eram toda glabras) e foi adicionado a interação entre espécie de formiga e tamanho (FxT) .

Na segunda parte (morte da larva após ataque), as variáveis preditivas foram comportamentos exibidos pelas larvas frente ao encontro com a formiga, assim como o tamanho da larva (T) e a presença de defesas morfológicas no corpo (M). Um grande

número de comportamentos foi observado, mas foi possível dividi-los em nove categorias de forma a resumir adequadamente a resposta da larva, detalhadas a seguir: movimentar-se rapidamente pela planta ao encontro com a formiga (C); encolher-se e expor as estruturas de defesa morfológica como setas ou espinhos (X); ficar imóvel sem exibir comportamentos ou unicamente esconder-se em alguma parte da planta (E); bater fortemente na formiga com a cabeça ou outras estruturas como escolos (B); tecer fios de seda ao redor do seu próprio corpo ou no limbo da folha (T); debater-se ao contato com as formigas em movimentos fortes não direcionados (D); jogar-se da folha (J); ficar pendurada em fio de seda preso na borda de folha ou ramo (S); e regurgitar (R). Estes comportamentos podiam ser exibidos em qualquer momento após o contato com a formiga durante a duração do experimento, e uma mesma larva poderia exibir mais destes comportamentos. Cada comportamento foi incluído como um fator de resposta binária. Esta análise permitiu determinar quais comportamentos das larvas foram mais eficientes para evitar a morte por formigas. Dois grupos de modelos foram construídos: (1) larvas que não foram encontradas em abrigos (Experimento I), e (2) larvas que foram expostas após a abertura de seus abrigos (Experimento III). Os experimentos de larvas dentro do abrigo (Experimento II) não foram incluídos já que as larvas não exibiram nenhum comportamento evidente ao interagir com as formigas nestes testes. Para cada grupo de modelos foram incluídos unicamente os comportamentos apresentados pelo respectivo grupo de larvas.

Os modelos foram construídos utilizando a função *glm* para a linguagem R 2.12.9 (2011), usando a distribuição binomial e a função Logit. Foram construídos diferentes modelos com as combinações possíveis entre as variáveis e interações consideradas. Para escolher o modelo que incluísse as variáveis que melhor explicavam a presença de larvas nas plantas foi usado o critério de Informação de Akaike corrigido (AICc) como

mecanismo de seleção, usando para isto o pacote *Multi-model inference* (MuMIn) do software R 2.12.9 (2011). Este método considera as combinações possíveis das variáveis e calcula o ajuste de cada combinação como modelo previsor da variável resposta. O valor de AICc é calculado para cada modelo (Johnson & Omland 2004; Bolker *et al.* 2009).

Adicionalmente, o pacote calcula a importância média de cada variável para o conjunto de modelos construídos (Burnham & Anderson 2002). Dado o alto número de modelos possíveis em alguns casos, são apresentados unicamente os modelos com $\Delta AICc < 2$.

Resultados

As características das larvas de lepidópteros

A maioria das larvas (73,5%) encontrada no campo apresentou algum tipo de abrigo ou refúgio (Tabelas 1, 2), sendo que a proporção de larvas com e sem abrigos não mudou entre as localidades (Teste G_(g.l: 3)=1,731; $P=0,642$) nem entre plantas com ou sem atrativos para formigas (Teste G_(g.l: 1)=2,408; $P=0,127$).

A maior parte destes abrigos (78%) foi construída com uma mistura de seda e fezes da própria larva. A estrutura e arquitetura dos abrigos variaram bastante e apresentaram diferentes graus de complexidade (Fig. 2). Dentre as larvas que não foram encontradas em abrigos, 43,9% apresentaram o corpo liso, sem defesas morfológicas evidentes. As larvas restantes apresentaram defesas morfológicas, tais como cutícula grossa, camadas densas de setas finas ao redor do corpo, espinhos desenvolvidos na parte dorsal, ou escolos longos no dorso e cabeça (Fig. 2). Só uma pequena fração de larvas (1,8%) foi encontrada em agregações (Tabela 1). As proporções de larvas dos diferentes grupos de estratégias de defesa não diferiram entre as localidades estudadas (Teste G_(g.l: 21)=19,81; $P=0,533$).

Tabela 1: Caracterização dos grupos de larvas estabelecidos segundo as estratégias defensivas encontradas no campo. Grupos a-d incluem larvas com abrigo e grupos e-g larvas sem abrigo. A lista de famílias incluída não pretende ser exaustiva, unicamente inclui alguns dos grupos mais frequentes para cada categoria.

Grupo de larvas	Exemplos de Famílias incluídas	Caraterização	Porcentagem do total de larvas	Comportamentos no campo após estímulo com pinça
a	Elachistidae Gelechiidae Pyralidae	Larvas que constroem abrigos fechados compostos de duas folhas secas ou verdes (ou uma mesma dobrada), fortemente unidas por seda e fezes ao redor. A massa de fezes e seda dentro do abrigo de folhas pode formar uma estrutura cônica ao redor da larva deixando só uma abertura na extremidade anterior para a larva sair. (Fig. 2a)	37,3%	Movimentação rápida para fora do abrigo Debater-se ao contato em movimentos fortes não direcionados Regurgitar Jogar-se da folha Ficar imóvel ou esconder-se no fundo no abrigo Bater a pinça com a cabeça
b	Hesperidae Elachistidae Mimallonidae* Glyphipterididae*	Larvas com abrigos de folhas (principalmente verdes) fechadas ou dobradas unidas unicamente por seda, mas sem incluir fezes. Alguns deles eram compostos da união de diferentes folhas ou pela mesma folha dobrada (Fig. 2b).	14,2%	Movimentação rápida para fora do abrigo Debater-se ao contato, com movimentos fortes não direcionados Jogar-se da folha presa a fio de seda Ficar imóvel ou esconder-se no fundo do abrigo
c	Gelechiidae Tortricidae Oecophoridae* Pyralidae Mimallonidae*	Larvas que apresentam abrigos externos de seda e fezes sem proteção completa pela folha. Estruturas de seda e fezes unem partes de folhas ou ramos, mas não abrigam completamente a larva. Em alguns casos, estas estruturas tridimensionais são de seda, restos de vegetação e fezes ao redor de ramos, e em outros são formadas por uma rede fina de seda com fragmentos de fezes criando uma cobertura em cima da folha, com a larva descansando no centro (Fig. 2c).	16,6%	Movimentação rápida para fora do abrigo Debater-se ao contato em movimentos fortes não direcionados Jogar-se da folha com ou sem fio de seda Ficar imóvel ou esconder-se no fundo do no abrigo
d	Psychidae	Larvas que carregam seu próprio abrigo, feito com seda e restos vegetais, e que permitem certa mobilidade à larva (Fig. 2d).	5,6%	Debater-se ao contato em movimentos fortes não direcionados
e	Geometridae Noctuidae Notodontidae* Pieridae*	Larvas sem abrigos e sem defesas morfológicas aparentes. Encontradas normalmente nas bordas de galhos e folhas ou perto da nervura central, com diferentes graus de camuflagem visual (Fig. 2e).	8,9%	Movimentação rápida para outro lugar da folha Bater a pinça com a cabeça Jogar-se da folha em fio de seda
f	Apatelodidae * Arctiidae Lasiocampidae Limacodidae Megalopygidae Riodinidae †	Larvas com uma camada densa, mas curta, de cerdas ou setas ao redor do corpo. Em alguns casos pode ser unicamente engrossamentos curtos da cutícula (Fig 2f).	11,4%	Sem reação aparente Encolher-se e expor as estruturas de defesa morfológica Movimentação rápida para outro lugar da folha Bater a pinça com a cabeça Jogar-se da folha
g	Saturnidae Noctuidae Nymphalidae Notodontidae Sphingidae	Larvas com escolos ou espinhos bem desenvolvidos, principalmente na parte dorsal ou na cabeça (Fig. 2g).	2,9%	Sem reação aparente Encolher-se e expor as estruturas de defesa morfológica Bater a pinça com a cabeça ou escolos
h	Zygaenidae*	Larvas com comportamento gregário, algumas vezes dentro de abrigos agrupando várias folhas (Fig. 2h).	2,9%	Debater-se ao contato em movimentos fortes não direcionados Jogar-se da folha

* Larvas de estas famílias não fizeram parte dos experimentos de interação com formigas. † Inclui unicamente espécies não mirmecófilas.

Padrões de ocorrência de formigas e de larvas de lepidópteros

Somente três grupos de estratégias foram afetadas pela abundância de formigas na planta (Fig. 3): Larvas com abrigos de folhas fechadas com seda (Fig. 3b), com abrigos externos (Fig. 3c), e larvas glabras que não constroem abrigos (Fig. 3e). Para estes grupos foi encontrada uma menor quantidade de formigas visitantes em plantas com larvas em comparação com outras possíveis plantas hospedeiras potenciais do mesmo transecto.

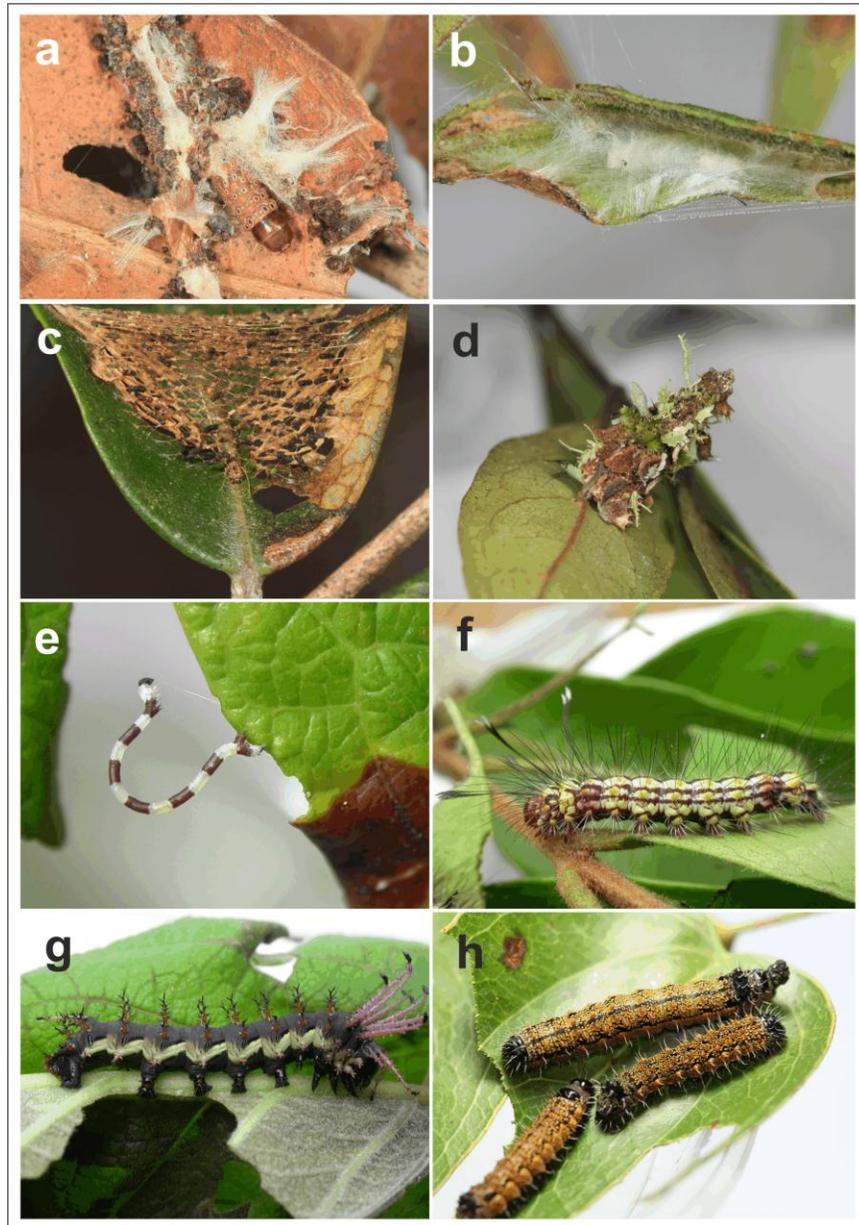


Fig. 2: *Diferentes tipos de estratégias de defesa observadas em larvas de lepidópteros no Cerrado. a) Larvas que constroem abrigos fechados (e.g. Elachistidae); b) Larvas com abrigos de folhas fechadas sem fezes (e.g. Gelechiidae); c) Larvas que apresentaram abrigos externos (e.g. Mimallonidae); d) Larvas que carregam seu próprio abrigo (e.g. Psychidae); e) Larvas de corpo liso (e.g. Geometridae); f) Larvas cobertas com cerdas (e.g. Saturnidae); g) Larvas com escolos grandes no corpo (e.g. Arctiidae); h) Larvas com comportamentos gregários.*

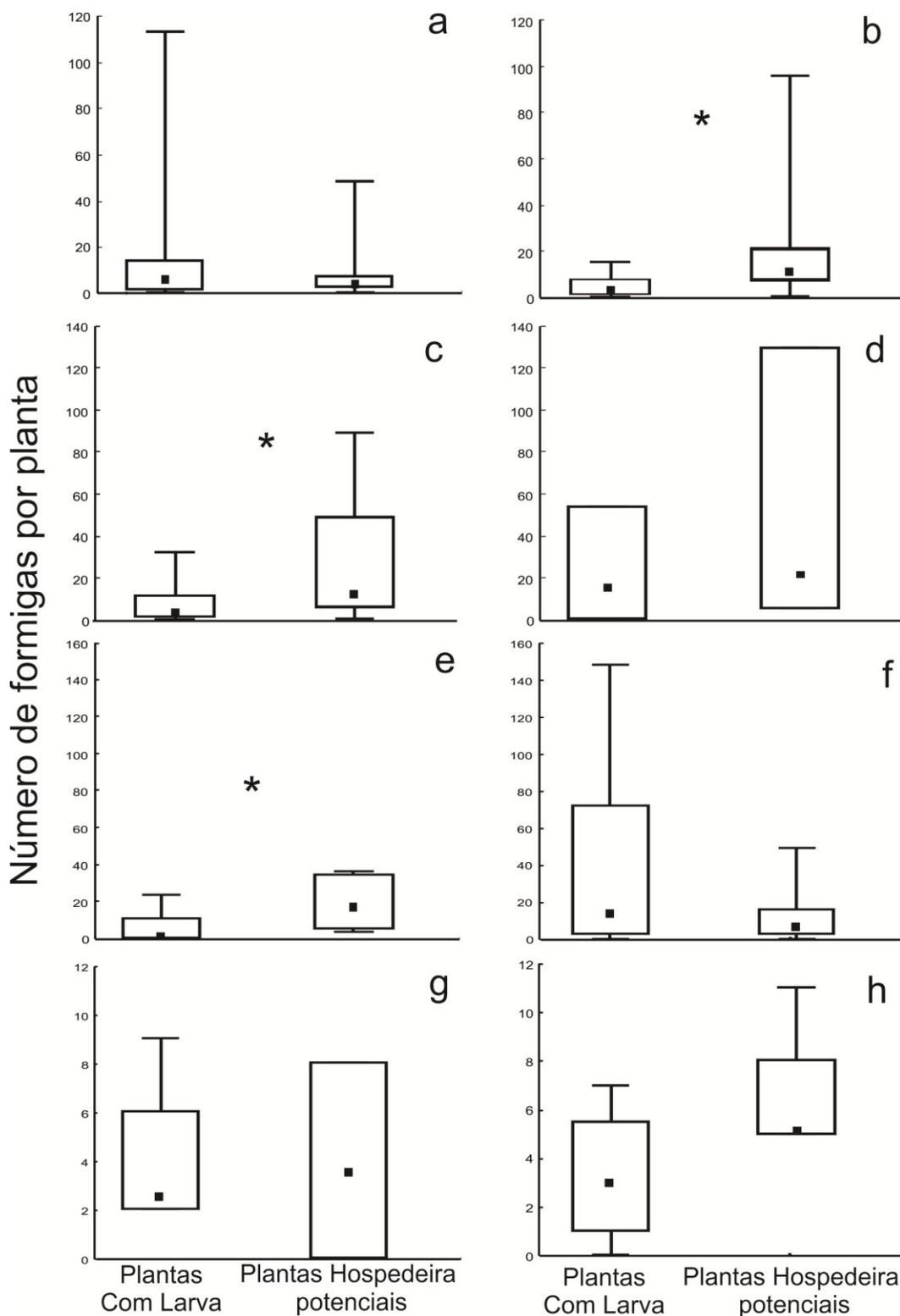


Fig.3: Número de formigas amostradas em plantas onde foram encontrados os diferentes grupos de larvas de lepidópteros no Cerrado, e em plantas hospedeiras potenciais dentro de cada transecto. a) Abrigos em folhas com seda e fezes (N=45); b) Abrigo construído em folhas usando unicamente seda (N=14); c) Larvas que apresentaram abrigos externos (N=16); d) Larvas que carregam seu próprio abrigo (N=3); e) larvas de corpo liso

($N=15$); f) *Larvas cobertas com cerdas* ($N=12$); g) *larvas com escolos grandes no corpo* ($N=5$); h) *larvas de vida gregária* ($N=3$). (*: teste de Wilcoxon $P<0.05$).

Experimentos em laboratório: Ataques às larvas por formigas

A análise de modelos generalizados para os experimentos realizados com todas as larvas (experimentos I + II), permitiu a escolha de um modelo (menor $\Delta AICc$) que inclui as seguintes variáveis: construção de abrigos (A), espécie de formigas testada (F), presença de NEFs na planta hospedeira (N), tamanho da larva (T), a interação entre espécie de formiga e tamanho da larva (F x T) e a interação entre espécie de formiga e NEFs (Tabela 3). Este resultado coincide com as variáveis de maior importância na média dos modelos construídos, indicando que essas variáveis são as mais importantes para entender a probabilidade de ataque das formigas a uma larva (Tabela 3). A construção de abrigos foi a estratégia mais eficiente para evitar o ataque das formigas. Isto se evidencia, por um lado, em que apenas três das larvas testadas dentro de abrigos (representando unicamente 2,9% dos testes com *C. crassus* e 1,4% dos testes com *C. renggeri*) foram atacadas e nenhuma delas foi morta (Fig. 4). Por outro lado, o coeficiente associado a esta variável tem um efeito claramente negativo na probabilidade de ataque pelas formigas (Tabela 4, experimento I+II). Ao considerar todos os experimentos onde as larvas foram diretamente expostas às formigas (Experimentos I +II), o tamanho das larvas teve um efeito negativo na probabilidade da larva ser atacada por formigas. Contudo, este efeito varia em intensidade de acordo com a espécie de formiga: *C. crassus* teve um efeito negativo forte e *C. renggeri* um leve efeito positivo (Fig. 5). Neste conjunto de experimentos o efeito da presença de nectários na planta hospedeira é negativo para o ataque de larvas, sendo que as larvas provenientes de plantas com NEFs foram mais atacadas que as provenientes de plantas sem NEFs. Este efeito é mais forte no para os experimentos com *C. renggeri* (Tabela 4).

Tabela 2: Número de larvas coletadas e suas características em cada localidade estudada. O número entre parênteses indica a quantidade de plantas onde foram coletadas larvas com cada característica.

	Uberlândia	Itirapina	Mogi Guaçu	Assis	Total
Larvas	57 (44)	55 (36)	23 (18)	20 (16)	155 (134)
Abrigos seda	9 (7)	6 (4)	7 (3)	3 (3)	25 (17)
Abrigo + fezes	29 (21)	38 (22)	12 (11)	10 (7)	89 (61)
Hirsutas	7 (6)	6 (5)	2 (2)	5 (4)	20 (17)
Glabras	8 (6)	4 (4)	2 (2)	2 (2)	16 (14)
Gregárias*	(4)	(1)	0	0	5 (5)

* larvas gregárias foram consideradas como uma única observação.

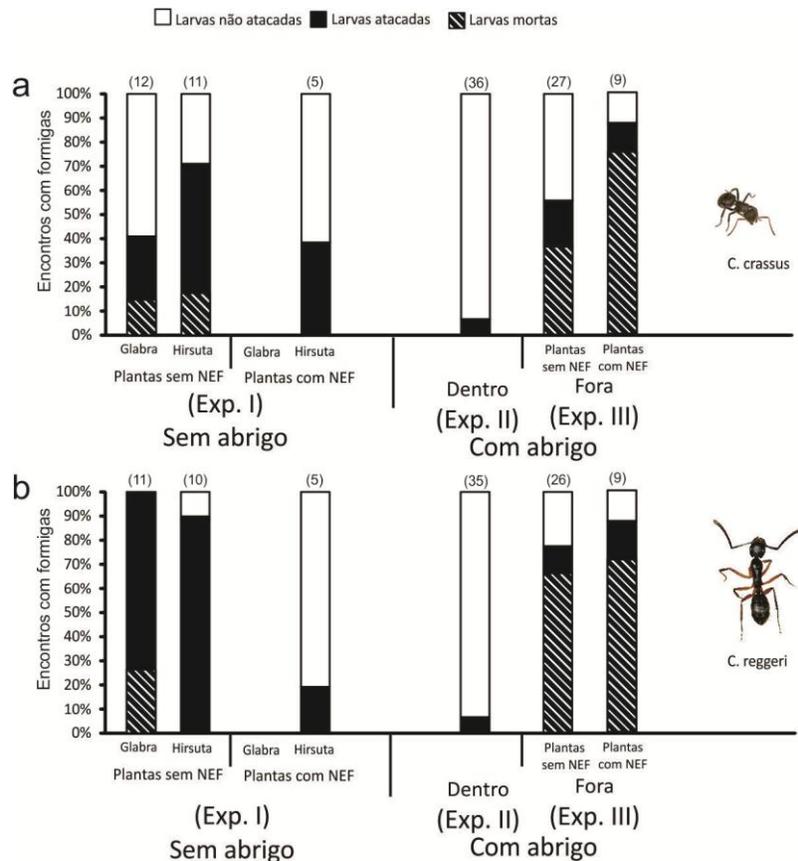


Fig. 4: Frequências de ataques por formigas (barras pretas) a diferentes larvas testadas em encontros controlados em laboratório e suas consequências (mortalidade). a) Testes com *Camponotus crassus*, e b) testes com *Camponotus reggeri*. Barras listradas indicam a quantidade de vezes que um ataque acabou na morte da larva. Para detalhe das análises ver tabela 4. NEF: nectários extraflorais. As larvas foram divididas em hirsuta (presentando alguma defesa morfológica) e glabras (sem defesa morfológica aparente).

Ao considerar os modelos apenas com as larvas que não constroem abrigos (Experimento I), as variáveis mais importantes foram: 1) a presença de nectários (N), 2) a espécie de formiga (F), 3) a presença de defesas morfológicas (M), e 4) a interação entre estas duas últimas variáveis (F x M; Tabela 3). A proporção de larvas atacadas neste caso foi muito maior do que em larvas que possuem abrigos, sendo 51,7% atacadas por *C. crassus* e 81,4% por *C. renggeri*. Neste caso, a presença de defesas morfológicas pode afetar o ataque por formigas, mas tem efeito diferente dependendo do tipo de formiga (tabela 4). Dentre as larvas glabras (sem defesas morfológicas), 100% foram atacadas por *C. renggeri*, enquanto apenas 33,3% foram atacadas por *C. crassus*, mas o tamanho da larva não teve um efeito importante. Contudo, larvas com defesas morfológicas foram atacadas em proporções semelhantes pelas duas formigas (64,7% para *C. crassus* e 68,7% para *C. renggeri*; Fig 4). Por outro lado, larvas encontradas (no campo) em plantas com nectários extraflorais foram menos atacadas pelas formigas em comparação às larvas encontradas em plantas sem nectários (Fig. 4). Este resultado foi especialmente forte no caso de ataques por *C. renggeri*. As larvas que foram encontradas em plantas com NEFs e dentro de algum abrigo (N = 20) não foram atacadas. Adicionalmente, todas as larvas que foram encontradas em plantas com NEFs sem abrigos apresentavam algum tipo de defesa morfológica (larvas hirsutas).

Nos experimentos onde os abrigos foram abertos e as larvas removidas (Experimento III), o ataque foi influenciado principalmente pela espécie de formiga, a presença de NEFs e o tamanho da larva (Tabela 3). As larvas foram em geral mais frequentemente atacadas por *C. renggeri* (74,2%) do que por *C. crassus* (48,6%), mas a probabilidade de ataque variou com o tamanho da larva. Os valores do coeficiente da interação Tamanho x Formiga no modelo (Tabela 4) indicam que a probabilidade de ataque

diminuiu rapidamente com *C. crassus* e aumentou com *C. renggeri*, seguindo o padrão do modelo com o total das larvas (Fig. 6).

Tabela 3: Resultados da seleção de modelos previsores da probabilidade de ataque por formigas a larvas com e sem abrigo. Valores de $\Delta AICc$ e peso relativo de cada modelo (w_i) (apresentados apenas modelos com $\Delta AICc$ menor que 2). Foram utilizadas as seguintes variáveis predictoras: presença de abrigo (A), espécie de formiga usada (F), presença de nectários extraflorais na planta hospedeira (N), defesa morfológica (M), tamanho da larva (T) e algumas interações.

Grupo de teste	Modelo	$\Delta AICc$	w_i
Total de larvas (Exp. I+II)	A+F+N+T+FxN+FxT	0	0,35
	A+F+N+T+FxN+FxT+M+MxT	0,48	0,28
	A+F+N+T+FxN+FxT+M	1,97	0,13
Larvas sem abrigo (Exp. I)	F+N+M+FxM	0	0,35
	F+N+M+FxM+T	1,32	0,18
	F+N+M+FxM+T+FxT	1,47	0,17
Larvas abrigo aberto (Exp. III)	F+N+T+TxF	0	0,56
	F+T+TxF	0,47	0,44

Tabela 4: Resultados da seleção de modelos previsores da probabilidade de ataque por formigas a larvas com e sem abrigo. Importância média relativa de cada variável previsora nos modelos construídos (Σw_i), coeficientes médios estimados e erro padrão médio para cada variável previsora. As variáveis com maior importância média estão em negrito.

Variável previsora	Σw_i	Coeficiente	Erro padrão
Total de larvas (Exp. I+II)			
Intercepto		2.27	7.11
Abrigo (A)	1	-4.69	1.24
Formigas/C. renggeri (F)	1	-0.68	7.28
Nectários (N)	1	-0.216	0.918
Defesa Morfológica (M)	0.5	-0.825	7.67
Tamanho (T)	0.9	-0.896	0.26
F x N	1	-4.35	16.6
F x M	0.09	-0.051	0.0656
F x T	0.85	1.26	0.437
M x T	0.37	0.472	0.331
Larvas sem abrigo (Exp. I)			
Intercepto		0.413	0.997
Formiga/C. renggeri (F)	1	13.3	1380
Nectários (N)	1	-2.36	0.91
Defesa Morfológica (M)	0.76	1.22	1.06
Tamanho (T)	0.49	-0.216	0.305
F x M	0.71	-13.1	1380
F X T	0.24	0.23	0.41
Larvas abrigo aberto (Exp. III)			
Intercepto		3.86	1.52
Formiga/ C. renggeri (F)	1	-5.3	1.89
Nectários (N)	0,56	0.73	0.89
Tamanho (T)	1	-2.81	1.17
F X T	1	5.53	1.67

Experimentos em laboratório: Comportamento larval e mortalidade

Apesar de larvas que não constroem abrigos terem sido mais frequentemente atacadas pelas formigas, a mortalidade total foi baixa (12,96% das larvas testadas; Fig. 4).

Nenhuma larva desse grupo encontrada em plantas com NEFs foi morta. Os

comportamentos mais característicos destas larvas em encontros com as formigas foram (em ordem de maior para menor frequência): 1) a movimentação rápida; 2) a exposição de defesa morfológica; e 3) jogar-se da folha (Tabela 5). Outro comportamento característico, especialmente em larvas glabras, foi o de bater na formiga agressora com alguma parte do corpo (geralmente a cabeça). Este comportamento esteve algumas vezes associado a uma posição específica na folha, consistindo em manter a parte anterior do corpo separada da folha (segurando-se na folha unicamente pela parte posterior). Entretanto, nenhum dos comportamentos encontrados parece estar associado com a probabilidade de a larva sobreviver ao ataque. Dentre as variáveis consideradas, a que apresenta maior influência na mortalidade, é o tamanho (T) da larva (Tabela 6). Isto indica claramente que à medida que a larva cresce a probabilidade de morrer no encontro diminui. A presença de defesas morfológicas teve uma importância secundária, mas o suficiente para ser incluída no modelo com menor valor de AICc (Tabelas 6 e 7). A presença destas defesas é associada negativamente à probabilidade da larva ser morta pelas formigas. Por exemplo, todas as larvas com defesas morfológicas sobreviveram aos encontros com *C. renggeri* (Fig 4).

Em relação às larvas que constroem abrigos, nenhuma das poucas larvas atacadas foi morta no Experimento II (Fig. 4). Entretanto ao abrir o abrigo e expor a larva ao contato com as formigas (Experimento III), a mortalidade aumentou substancialmente (53,62% das larvas). Os comportamentos característicos destas larvas ao encontro com as formigas incluíram: movimentos rápidos e fortes debatendo-se para escapar do ataque da formiga, jogar-se da planta ao menor contato, e muitas vezes ficar pendurada em fio de seda (Tabela 5). Em alguns casos, as larvas começavam a reconstruir o abrigo tecendo fios de seda ao redor, o que dificultaria ser encontrada novamente pelas formigas, ou então ficavam imóveis perto das nervuras da folha. Regurgitar foi um comportamento observado

exclusivamente neste tipo de larva. A análise de modelos generalizados indicou que os comportamentos que melhor explicam a probabilidade de ser morta pelas formigas são o de jogar-se da planta e ficar pendurada de um fio de seda (Tabela 6). Entretanto, o efeito destas duas variáveis na mortalidade é inverso, sendo mais frequentemente mortas as larvas que só se jogaram da folha e menos frequentemente mortas aquelas ficavam penduradas do fio de seda o fio de seda. O modelo de menor AICc incluiu também duas variáveis de importância menor que são: a espécie de formiga usada no experimento e o comportamento de ficar imóvel ao contato com a formiga. Estas duas variáveis tiveram um efeito positivo na mortalidade (Tabela 6 e 7).

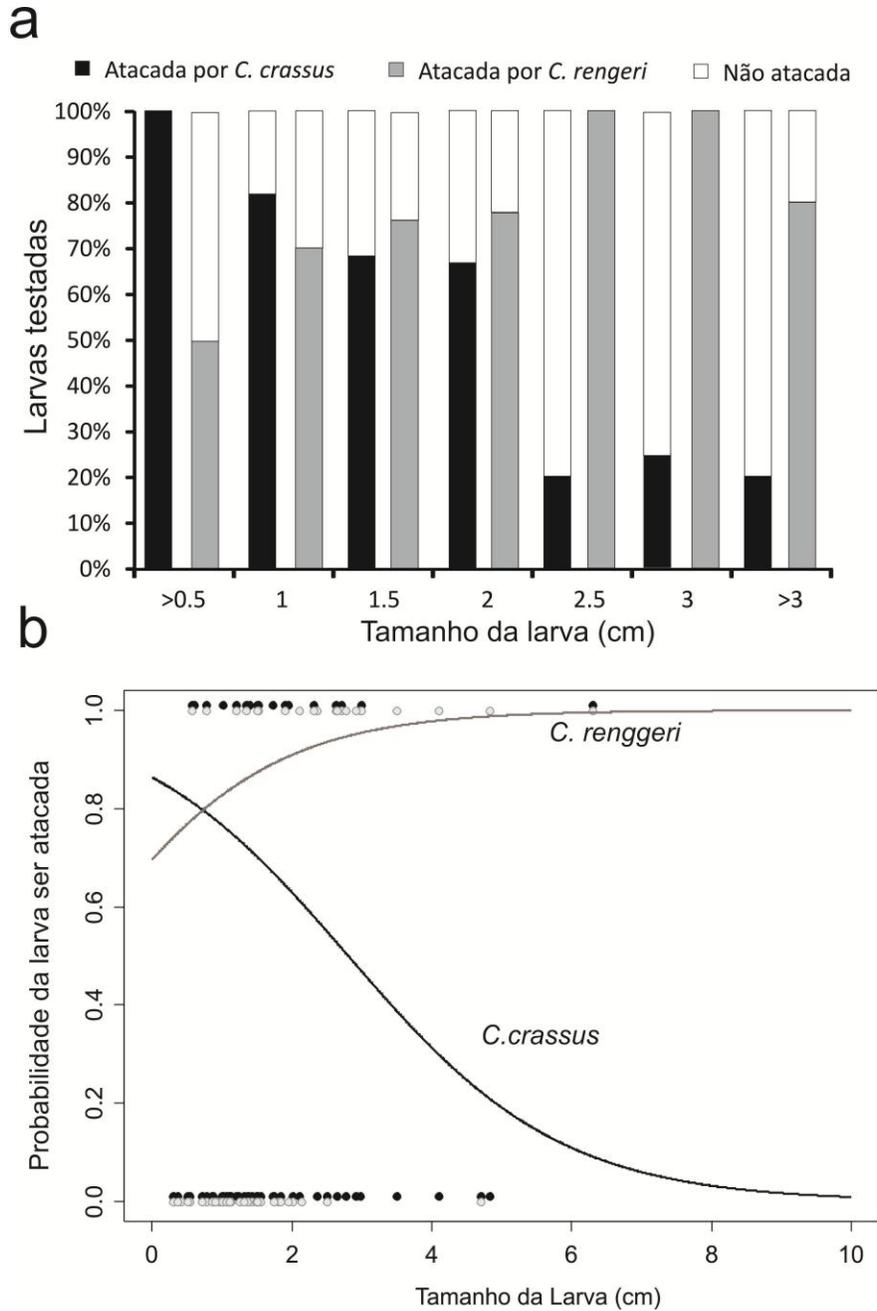


Figura 5: Relação entre tamanho da larva testada (divididas em categorias de 0.5cm de amplitude) e o ataque pelas duas espécies de formigas para todas as larvas analisadas (Larvas sem abrigo e larvas com abrigo – não inclui experimento III). a) Porcentagem de larvas atacadas por *C. crassus* (barras pretas) e *C. renggeri* (barra cinzas) em diferentes categorias de tamanho. b) Relação entre o tamanho da larva e a probabilidade da larva ser atacada por cada espécie de formiga, calculada a partir da media dos modelos construídos com o conjunto de experimentos I+II. Pontos pretos para *C. crassus* e cinzas para *c. renggeri*. As linhas representam os modelos preditivos para cada formiga construídos a partir dos coeficientes médios apresentados na Tabela 4.

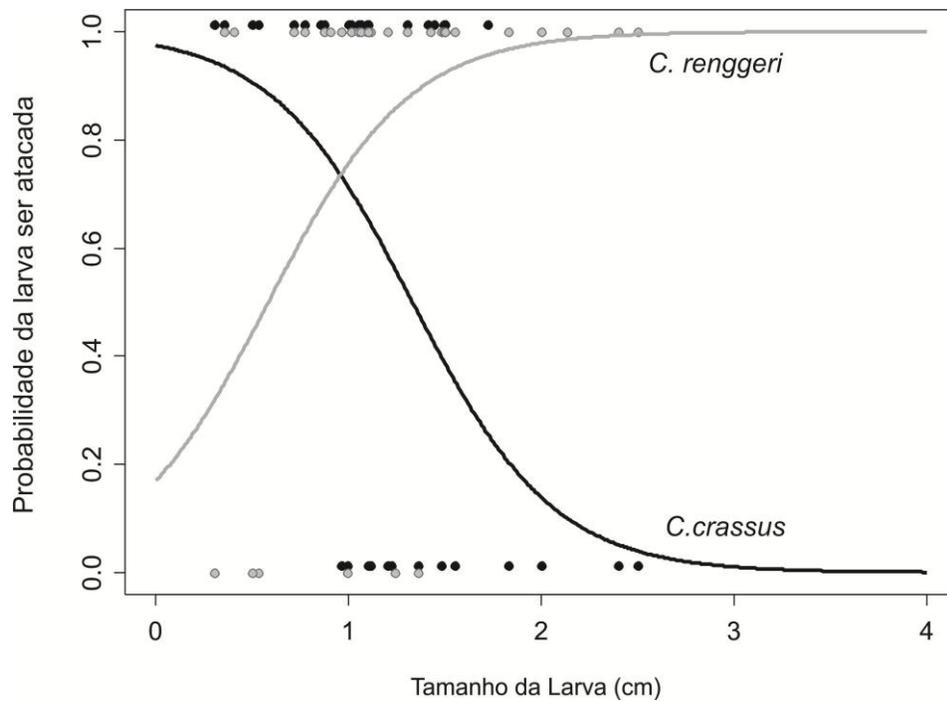


Fig 6: Relação entre o tamanho das larvas testadas retiradas do abrigo (Experimento III) e a probabilidade da larva ser atacada por cada espécie de formiga, calculada a partir da média dos modelos construídos. Pontos pretos para *C. crassus* e cinzas para *C. renggeri*. As linhas representam os modelos preditivos para cada formiga construídos a partir dos coeficientes médios apresentados na tabela 4.

Tabela 5: Número de larvas dos diferentes grupos (com ou sem defesa) e respectivas categorias de respostas comportamentais a encontros com formigas. A proporção de larvas que exibiram cada comportamento está representada pela porcentagem entre parênteses (uma larva podia apresentar vários comportamentos). **Larvas construtoras de abrigos (a-d):** a) Abrigos em folhas vivas ou secas dobradas, construídos com seda e fezes da própria larva; b) Abrigo construído em folhas verdes dobradas usando unicamente seda; c) Abrigos externos construídos com seda e fezes e sustentados em diferentes lugares da vegetação; d) Abrigo de seda e fragmentos vegetais, carregado pela larva ao se movimentar. **Larvas sem abrigos (e-h):** e) Larvas de corpo liso; f) Larvas cobertas com cerdas; g) Larvas com escolos grandes no corpo; h) Larvas de vida gregária. A última coluna indica a mortalidade total apresentada pelas larvas que apresentaram cada comportamento.

		Tipo de larva								Total	Mortalidade Total
		a [‡]	b [‡]	c [‡]	d [‡]	e	f	g	h		
No. de larvas usadas		25	16	22	6	21	15	18	3	126	
Categoria de comportamento	Bater com o corpo (B)	0	0	0	0	12 (57.14%)	2 (13.33%)	9 (50%)	0	23 (18.25%)	4.34%
	Expor defesas morfológicas (Em)	0	0	0	0	0	5 (33.33%)	12 (66.67%)	0	17 (13.49%)	5.88%
	Ficar imóvel (E)	0	3 (18.75%)	7 (31.81%)	0	0	3 (20%)	4 (22.22%)	0	17 (13.49%)	47.05%
	Movimentação rápida (C)	6 (24%)	1 (6.25%)	4 (18.18%)	0	5 (23.81%)	10 (66.67%)	8 (44.44%)	0	34 (26.9%)	23.50%
	Jogar-se da folha (J)	13 (52%)	13 (81.25%)	16 (72.73%)	0	11 (52.38%)	5 (33.33%)	4 (22.22%)	3 (100%)	65 (26.98%)	49.23%
	Regurgitar (R)	4 (16%)	4 (25%)	4 (18%)	0	0	0	0	3 (100%)	15 (26.98%)	46.66%
	Debater-se (D)	25 (100%)	14 (87.5%)	22 (100%)	4 (66.67%)	1 (4.76%)	0	2 (11.11%)	3 (100%)	71 (56.34%)	52.11%
	Fio de seda (S)	6 (24%)	7 (43.75%)	10 (45.45%)	0	5 (23.81%)	0	2 (11.11%)	0	30 (26.98%)	36.66%
	Tecer (X)	7 (28%)	1 (6.25%)	9 (40.91%)	0	0	2 (13.33%)	0	0	19 (15.07%)	42.10%
<i>C. crassus</i>	Atacadas	0 (72.7%)*	0 (62.5%)*	16.7% (66.67%)*	0 (66.67%)*	27.30%	50%	77.80%	0		
	Mortas	(63.60%)*	(37.50%)*	(41.70%)*	(66.60%)*	0%	12.50%	11.10%	0		
<i>C. renggeri</i>	Atacadas	0 (63.6%)*	0 (100%)*	9.1% (81.8%)*	0 (66.6%)*	100%	57.10%	77.80%	0		
	Mortas	(45.50%)*	(77.70%)*	(81.80%)*	(66.60%)*	60%	0.00%	11.10%	0		

* Valores fora de parênteses indicam a porcentagem de larvas atacadas estando com abrigo (experimento II) e valores dentro do parêntese a porcentagem de larvas atacadas ou mortas ao ser retiradas do abrigo (experimento III).

‡ Os resultados apresentados para estes grupos de larvas correspondem aos comportamentos apresentados ao ser as larvas retiradas do abrigo.

Tabela 6: Resultados da seleção de modelos preditores da probabilidade de morte de larvas com e sem abrigo por formigas. Valores de $\Delta AICc$ e peso relativo de cada modelo (w_i) (apresentados apenas modelos com $\Delta AICc$ menor que 2). Foram utilizadas as seguintes variáveis previsoras: tamanho da larva (T), presença de defesa morfológica (M), movimentação rápida da larva pelo galho (C), jogar-se da folha (J), ficar imóvel (E), bater na formiga com o corpo ou cabeça (B), fio de seda (S), expor defesas morfológicas (Em), espécie de Formiga (F).

Grupo de teste	Modelo	$\Delta AICc$	w_i
Larvas sem abrigo (Experimento 1)	M+T	0	0.07
	C+M+T	1.42	0.03
	C+E+T	1.96	0.03
	B+M+T	1.98	0.03
Larvas com o abrigo aberto (Experimento III)	E+S+F+J	0	0.06
	S+F+J	0.31	0.05
	E+S+J	0.89	0.04
	S+J	1.07	0.03
	S+F+J+R	1.45	0.03
	E+S+F+J+R	1.67	0.02

Tabela 7: Resultados da seleção de modelos preditores da probabilidade de morte de larvas com e sem abrigo por formigas. Importância média relativa de cada variável previsoras nos modelos construídos (Σw_i), coeficientes médios estimados e erro padrão médio para cada variável previsoras.

Variável previsoras	Σw_i	Coefficiente	Erro padrão
Larvas sem abrigo (Experimento 1)			
Intercepto		5,279	3,009
Tamanho (T)	1	-3.901	1.572
Defesa morfológica (M)	0,52	-2.619	1,892
Movimentação rápida (C)	0,44	-2,251	1,906
Jogar-se da folha (J)	0,3	1,095	1,936
Ficar imóvel (E)	0,3	-1,345	2,940
Bater com o corpo (B)	0,27	-0,964	1,662
Fio de seda (S)	0,26	-0.571	1.945
Expor defesas morfológicas (Em)	0,27	-0,756	1,954
Formiga/ <i>C. renggeri</i> (F)	0,23	0,157	1,264
Larvas abrigo aberto (Experimento III)			
Intercepto		-0.043	0,899
Fio de seda (S)	0,95	-2,078	0,821
Jogar-se da folha (J)	0,84	1,634	0,731
Formiga/ <i>C. renggeri</i> (F)	0,56	0,893	0,539
Ficar imóvel (E)	0,51	1,255	0,851
Regurgitar (R)	0,33	-0,633	0,677
Tecer (X)	0,27	-0,391	0,623
Debater-se (D)	0,26	-0,587	1,285
Tamanho (T)	0,25	-0,058	0,571
Movimentação rápida (C)	0,24	-0,123	0,769

Discussão

Além de ter uma influência negativa na presença de larvas de lepidópteros nas plantas de Cerrado, nossos resultados mostram que as interações antagônicas com formigas podem influenciar de maneira diferente os diversos tipos de larvas (*i.e.* que apresentam diferentes estratégias de defesa) que usam plantas com alta visitação por formigas. Tanto as larvas glabras, sem abrigos, quanto dois tipos de larvas com abrigo (larvas com abrigos de

folhas e seda fechados, e larvas com abrigos externos) são afetadas negativamente pela presença de formigas. Nestes três casos, as larvas utilizam plantas com menos formigas que outras hospedeiras potenciais (Fig. 3). Isto pode indicar que a quantidade de formigas numa planta específica pode afetar a presença das larvas com estas características. Isto coincide com o encontrado por Ito & Higashi (1991), quem estudando larvas que usam plantas de uma espécie de *Quercus* (Fagaceae) no Japão, mostraram que o efeito das formigas pode ser dependente da forma de vida das larvas. Certos grupos de larvas, como aquelas sem abrigos e sem defesas morfológicas, são mais vulneráveis e apresentam estratégias de defesa menos eficientes. Isso explicaria por que estão presentes apenas em plantas com baixa visitação por formigas. É possível que a escolha da planta hospedeira pela fêmea adulta destas espécies de lepidópteros seja afetada pela presença de formigas (e.g. Sendoya *et al.* 2009), como também estas larvas podem ter uma sobrevivência menor em plantas com alta quantidade de formigas pelo menos em alguma parte de seu ciclo de vida (Dutra *et al.* 2006).

Outra linha de evidência relacionada com a presença de NEFs mostra como a visitação de formigas na planta hospedeira pode afetar o uso das plantas pelas larvas. Ter como planta hospedeira uma planta com NEFs influenciou negativamente a probabilidade de ataque pelas formigas (Tabela 4), indicando que larvas encontradas nestas plantas são em geral menos atacadas e mortas pelas formigas (Fig. 4). A presença de NEFs em plantas é um conhecido atrativo para formigas, aumentando a visitação dessas em plantas de Cerrado e outros ecossistemas (Diaz-Castelazo *et al.* 2004; Rico-Gray & Oliveira 2007; Schoereder *et al.* 2010), afetando negativamente a presença de herbívoros (Oliveira 1997; Rico-Gray & Oliveira 2007). Desta forma, plantas com NEFs representariam um tipo de hospedeiro com maior risco associado, o que favoreceria sua utilização por larvas com um

conjunto de defesas eficiente, como a construção de refúgios (Freitas & Oliveira 1996) ou camuflagem química (Portugal & Trigo 2005). Isto explicaria a alta resistência das larvas encontradas nestas plantas ao ataque por formigas. É importante ressaltar que todas as larvas usadas para os experimentos e encontradas em plantas com NEFs e apresentaram defesas morfológicas ou abrigos (Fig. 4) o que poderia indicar que apresentar defesas morfológicas é importante em larvas que usam plantas com NEFs. Contudo, os censos de campo indicam que larvas glabras podem ocasionalmente usar plantas com NEFs, a ausência deste tipo de larvas nos experimentos pode ser a causante do efeito de interação entre estas variáveis.

A presença de abrigos representou uma defesa altamente eficiente contra o ataque de formigas. Construir abrigos pode gerar benefícios, tais como manter condições micro ambientais adequadas e garantir o contato direto com a planta (Loeffler 1996a). Contudo, a principal vantagem descrita é a defesa contra inimigos naturais (Jones *et al.* 2002; Abarca & Boege 2011; Greeney *et al.* 2012). A construção de abrigos pode facilitar para algumas espécies de larvas a utilização de plantas altamente visitadas por formigas no Cerrado (e.g. Bächtold *et al.* 2012), e também em plantas mirmecófitas especializadas em alojar ninhos de formigas específicas (e.g. Eubanks *et al.* 1997). Sabe-se que larvas com abrigos fechados podem apresentar uma maior sobrevivência em condições de visitação por formigas baixa ou ausente (Ito & Higashi 1991). No entanto, nossos experimentos mostraram que as larvas são altamente vulneráveis ao ataque e morte pelas formigas quando estão fora do abrigo, e em alguns casos as larvas podem ser atacadas inclusive dentro do abrigo. Adicionalmente, as larvas podem ficar vulneráveis ao ataque das formigas durante as atividades de construção ou ampliação do abrigo, especialmente no caso de abrigo externo (Freitas & Oliveira 1996).

Embora as duas espécies de formigas utilizadas nos experimentos, *Camponotus crassus* e *C. renggeri*, se mostraram agressivas contra as larvas a intensidade da agressividade e a mortalidade infligida às larvas foram maiores para *C. renggeri* (Tabela 5; Fig 4). Portanto, o efeito de formigas na sobrevivência de larvas de lepidópteros varia com a espécie de formiga que visita a planta hospedeira. A composição específica da mirmecofauna visitando a planta pode determinar os efeitos na sobrevivência das larvas, bem como o padrão de seleção das plantas pelos lepidópteros adultos (Mody & Linsenmair 2004; Sendoya *et al.* 2009). Por outro lado, as larvas não são afetadas da mesma forma pelas formigas, e o efeito da interação pode depender das características de história natural das espécies envolvidas. Por exemplo, a presença de defesas morfológicas externas pode diminuir a predação, mas a magnitude do efeito pode depender do tipo de predador. *Camponotus renggeri* atacou com maior frequência larvas sem abrigos do que *C. crassus* (especialmente aquelas sem defesas morfológicas), mas foi menos eficiente para matar larvas com defesas morfológicas.

Sabe-se que defesas químicas no corpo da larva como, por exemplo, a acumulação de substâncias secundárias sequestradas da planta tem um papel importante para evitar a mortalidade por formigas (Dyer 1995; Dyer & Bowers 1996). A presença de defesas químicas pode estar relacionada com o grau de especialização das larvas (Greeney *et al.* 2012), mas não necessariamente com a presença de defesas do tipo comportamental ou morfológico. Portanto, é possível que a presença de defesa química seja responsável pela ausência de ataque por formigas a algumas larvas em nossos experimentos. Esta possibilidade, não considerada nas análises, poderia diluir possíveis diferenças na eficiência das características larvais consideradas neste estudo. Apesar disto, nossos resultados mostram que, no caso das larvas que não constroem abrigos, o tamanho da larva e

secundariamente a presença de defesas morfológicas, são características determinantes para a sobrevivência ao ataque por formigas.

O tamanho da larva, de modo geral, foi uma variável afetando negativamente a probabilidade da larva ser atacada ou morta pelas formigas. Rimmel *et al.* (2011) encontraram que na maioria dos casos de predação devido a artrópodes existe uma dependência negativa do tamanho da presa, sendo que a partir de certo tamanho as principais fontes de predação são organismos vertebrados. Por exemplo, Freitas & Oliveira (1996) estudaram a interação das larvas de *Eunica bechina* Talbot (Nymphalidae) com as formigas que visitam os nectários extraflorais da planta hospedeira *Caryocar brasiliense* e mostraram que a predação pelas formigas diminuía com o tamanho da larva. Por outro lado, o tamanho pode também afetar o tipo de resposta do inseto fitófago à presença do predador. Como por exemplo, larvas maiores, podem apresentar respostas defensivas somente quando a ameaça do predador é alta (Thaler & Griffin 2008). Larvas pequenas (principalmente as glabras ou em estágios iniciais, sem defesas morfológicas desenvolvidas), sem a proteção de abrigos, foram o grupo mais vulnerável ao ataque das formigas, o que explica o fato de estarem usando plantas onde a visitação de formigas é baixa (Fig. 3e). Consequentemente, é provável que estas larvas invistam em crescimento rápido em estágios iniciais passando menos tempo expostas ou em defesas químicas como a camuflagem (Akino *et al.* 2008; Portugal & Trigo 2005). O tamanho em si pode ser considerado uma defesa, podendo agir tanto primariamente (para evitar o ataque) como secundariamente (para sobreviver ao ataque) (Freitas & Oliveira 1992; 1996; Bächtold *et al.* 2012).

Para as larvas que vivem dentro de abrigos, as defesas comportamentais são importantes apenas quando a larva fica exposta (fora do abrigo). A presença de defesas morfológicas, neste caso, foi praticamente nula (exceto algumas poucas cerdas finas

provavelmente com função sensorial). Portanto, uma vez fora do abrigo a larva deve responder ativamente ao ataque das formigas. Neste caso, o tamanho é um bom previsor da probabilidade de ser atacada pela formiga, mas não revela se o ataque acabará em morte da larva. As larvas que se jogaram da folha ficando penduradas por um fio de seda foram as que tiveram a melhor chance de sobreviver após o experimento. Jogar-se da folha ou ramo é uma das estratégias de defesa secundárias mais comuns em insetos (Gross 1993).

Entretanto esta defesa é eficiente apenas se a larva consegue manter a conexão com a planta hospedeira através de um fio de seda (Oliveira & Freitas 2004; Sugiura & Yamazaki 2006).

As larvas que não mantiveram esta conexão conseguiam fugir do ataque inicial, mas ficavam expostas ao serem encontradas por outras formigas forrageando na bandeja. Em condições naturais, se jogar da planta e cair ao solo pode representar a sobrevivência imediata da larva. Entretanto, este comportamento pode também significar um alto risco para a larva, pois em plantas altamente visitadas por formigas a probabilidade de encontrar outras formigas (ou outros predadores de solo) no solo adjacente à planta hospedeira também pode ser alta (Yamazaki 2010).

Dyer (1997) encontrou que a probabilidade de ataque por formigas *Paraponera clavata* é comparativamente menos afetada pelo tamanho das larvas em relação a outros predadores. Os autores argumentam que a capacidade de recrutamento das formigas faz com que possam lidar com presas de grande porte. Contrariamente, e apesar de *C. crassus* e *C. renggeri* terem uma alta capacidade de recrutamento (Oliveira & Brandão 1991), nossos dados mostram que o tamanho da larva é altamente relevante, porém dependente da espécie de formiga em interação. O tamanho da larva em nosso estudo afetou de forma oposta cada espécie de formiga. No caso de *C. crassus* (com corpo de tamanho pequeno a médio; 6-7mm de comprimento), as formigas atacaram com maior frequência as larvas pequenas,

enquanto que as larvas maiores foram mais atacadas por *C. renggeri* (uma formiga de tamanho grande; 12-13mm comprimento). O tamanho da larva em relação ao tamanho do predador (Stamp 1984; Martin & Nordlund 1989) pode afetar a probabilidade de ela ser encontrada pelo predador (Sandre *et al.* 2007), a facilidade deste em lidar com a presa (Freitas & Oliveira 1996), ou mesmo a probabilidade do predador atacar a larva (Dyer 1997). Desta forma, formigas maiores podem ser mais bem capacitadas para lidar com larvas maiores, que seriam melhor manipuladas e subjugadas pelas operárias caçadoras. Por outro lado, larvas muito pequenas podem ser ignoradas por não representarem uma recompensa energética suficiente, ou simplesmente por estarem fora da escala sensitiva da formiga. Formigas menores como *C. crassus* podem estar mais bem capacitadas para encontrar e preda larvas pequenas. Além disto, larvas muito grandes podem representar um risco muito alto de injúria e pode afetar o comportamento de ataque das operárias (Schatz *et al.* 1997). O tamanho da larva é obviamente relacionado ao estágio de desenvolvimento das larvas, o qual foi variável nos nossos experimentos. Tem sido proposta a existência de um “*trade-off*” entre o tempo de desenvolvimento e o tamanho final da larva (Greeney *et al.* 2012). Desta forma, a identidade das formigas visitando a planta hospedeira pode determinar quais serão os efeitos em larvas com diferentes estratégias de crescimento e desenvolvimento, favorecendo em alguns casos larvas pequenas de crescimento rápido e em outros casos larvas maiores de crescimento lento.

Nossos resultados indicam que os diferentes tipos de larvas se apresentam mais ou menos nas mesmas proporções entre as diferentes localidades. Considerando que a abundância média de formigas nas plantas variou entre os diferentes áreas estudadas (Capítulo 1), isto estaria indicando provavelmente não existe correspondência espacial entre as proporções de larvas dos diferentes tipos e a abundância de formigas. As espécies

de lepidópteros que estão presentes em uma região podem depender de restrições climáticas e/ou históricas (Brown & Gifford 2002), e não necessariamente das interações interespecíficas. É necessário considerar que as diferentes espécies de formigas não apresentam necessariamente o mesmo risco para larvas. Análises mais detalhadas da composição e história natural da mirmecofauna presente em uma dada localidade e como ela varia espacial e temporalmente seriam necessárias para entender possíveis efeitos no nível local.

Neste estudo mostramos a existência de claros efeitos de interações com formigas no uso de plantas hospedeiras por larvas de lepidópteros, na escala de plantas individuais. O conjunto de defesas das larvas, e especificamente a eficiência delas para a defesa contra formigas, pode ser determinante para a sobrevivência de uma larva numa dada planta. Estas defesas larvais são especialmente relevantes no ambiente do Cerrado, onde plantas com atrativos açucarados são particularmente comuns, e a visitação por formigas é correspondentemente alta.

Literatura citada

- Abarca M. & Boege K. (2011). Fitness costs and benefits of shelter building and leaf trenching behaviour in a pyralid caterpillar. *Ecological Entomology*, no-no.
- Adlung K.G. (1966). A critical evaluation of the European research on use of red wood ants (*Formica rufa* group) for the protection of forests against harmful insects. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 67, 167-189.
- Aguiar A.P., dos Santos B.F., Couri M.S., Rafael J.A., Costa C., Ide S., Duarte M., Grazia J., Schwertner C.F., Freitas A.V.L. & Azevedo C.O. (2009). Insecta. In: *Estado da Arte e Perspectivas para a Zoologia no Brasil*. (eds. Rocha RM & Boeger WAP). Editora UFPR Curitiba, pp. 131-155.
- Akino T., Nakamura K. & Wakamura S. (2004). Diet-induced chemical phytomimesis by twig-like caterpillars of *Biston robustum* Butler (Lepidoptera : Geometridae). *Chemoecology*, 14, 165-174.
- Bächtold A., Del-Claro K., Kaminski L.A., Freitas A.V.L. & Oliveira P.S. (2012). Natural history of an ant–plant–butterfly interaction in a Neotropical savanna. *Journal of Natural History*, 46, 943-954.

- Bernays E. & Graham M. (1988). On the Evolution of Host Specificity in Phytophagous Arthropods. *Ecology*, 69, 886-892.
- Bernays E.A. (1997). Feeding by lepidopteran larvae is dangerous. *Ecological Entomology*, 22, 121-123.
- Bolker B.M., Brooks M.E., Clark C.J., Geange S.W., Poulsen J.R., Stevens M.H.H. & White J.S.S. (2009). Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 24, 127-135.
- Bronstein J.L. (1994). Our Current Understanding of Mutualism. *Quarterly Review of Biology*, 69, 31-51.
- Brown K.S. & Gifford D.R. (2002). Lepidoptera in the Cerrado Landscape and the Conservation of Vegetation, Soil, and Topographical Mosaics. In: *The Cerrado of Brazil* (eds. Oliveira PS & Marquis RJ). Columbia University Press New York, pp. 201-222.
- Burnham K.P. & Anderson D.R. (2002). *Model selection and multimodel inference : a practical information-theoretic approach*. 2nd edn. Springer, New York.
- Castellanos I., Barbosa P., Zuria I., Tammaru T. & Christman M.C. (2011). Contact with caterpillar hairs triggers predator-specific defensive responses. *Behavioral Ecology*.
- De-Silva D.L., VÁSquez A.S. & Mallet J. (2011). Selection for enemy-free space: eggs placed away from the host plant increase survival of a neotropical ithomiine butterfly. *Ecological Entomology*, 36, 667-672.
- Diaz-Castelazo C., Rico-Gray V., Oliveira P.S. & Cuautle M. (2004). Extrafloral nectary-mediated ant-plant interactions in the coastal vegetation of Veracruz, Mexico: Richness, occurrence, seasonality, and ant foraging patterns. *Ecoscience*, 11, 472-481.
- Diniz I. & Morais H. (1997). Lepidopteran caterpillar fauna of Cerrado host plants. *Biodiversity and Conservation*, 6, 817-836.
- Dutra H.P., Freitas A.V.L. & Oliveira P.S. (2006). Dual ant attraction in the neotropical shrub *Urera baccifera* (Urticaceae): the role of ant visitation to pearl bodies and fruits in herbivore deterrence and leaf longevity. *Functional Ecology*, 20, 252-260.
- Dyer L.A. (1995). Tasty Generalists and Nasty Specialists - Antipredator Mechanisms in Tropical Lepidopteran Larvae. *Ecology*, 76, 1483-1496.
- Dyer L.A. (1997). Effectiveness of caterpillar defenses against three species of invertebrate predators. *Journal of Research on Lepidoptera*, 34, 48-68.
- Dyer L.A. & Bowers M.D. (1996). The importance of sequestered iridoid glycosides as a defense against an ant predator. *Journal of Chemical Ecology*, 22, 1527-1539.
- Eubanks M.D., Nesci K.A., Petersen M.K., Liu Z. & Sanchez A.B. (1997). The exploitation of an ant-defended host plant by a shelter-building herbivore. *Oecologia*, 109, 454-460.
- Feeny P., Blau W.S. & Kareiva P.M. (1985). Larval Growth and Survivorship of the Black Swallowtail Butterfly in Central New-York. *Ecological Monographs*, 55, 167-187.
- Freitas A.V.L. & Oliveira P.S. (1992). Biology and behavior of *Eunica bechina* (Lepidoptera: Nymphalidae) with special reference to larval defense against ant predation. *Journal of Research on Lepidoptera*, 31, 1-11.
- Freitas A.V.L. & Oliveira P.S. (1996). Ants as selective agents on herbivore biology: Effects on the behaviour of a non-myrmecophilous butterfly. *Journal of Animal Ecology*, 65, 205-210.

- Gentry G.L. & Dyer L.A. (2002). On the conditional nature of neotropical caterpillar defenses against their natural enemies. *Ecology*, 83, 3108-3119.
- Greeney H., Dyer L. & Smilanich A. (2012). Feeding by lepidopteran larvae is dangerous: A review of caterpillars' chemical. *Invertebrate Survival Journal*, 9.
- Gross P. (1993). Insect Behavioral and Morphological Defenses Against Parasitoids. *Annual Review of Entomology*, 38, 251-273.
- Hölldobler, B. & Wilson E. O. (1990): The Ants. Springer, Berlin, 732 pp.
- Ito F. & Higashi S. (1991). Variance of Ant Effects on the Different Life Forms of Moth Caterpillars. *Journal of Animal Ecology*, 60, 327-334.
- Johnson J.B. & Omland K.S. (2004). Model selection in ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 19, 101-108.
- Jones M.T., Castellanos I. & Weiss M.R. (2002). Do leaf shelters always protect caterpillars from invertebrate predators? *Ecological Entomology*, 27, 753-757.
- Kaminski L.A., Sendoya S.F., Freitas A.V.L. & Oliveira P.S. (2009). Ecologia comportamental na interface formiga-planta-herbívoro: interações Entre formigas e lepidópteros. *Oecologia Brasiliensis*, 13, 27-44.
- Loeffler C.C. (1996a). Adaptive trade-offs of leaf folding in *Dichomeris* caterpillars on goldenrods. *Ecological Entomology*, 21, 34-40.
- Loeffler C.C. (1996b). Caterpillar leaf folding as a defense against predation and dislodgment: staged encounters using *Dichomeius* (Gelechiidae) larvae on goldenrods. *Journal of the Lepidopterists' Society*, 50, 245-260.
- Logan M. (2010). *Biostatistical design and analysis using R : a practical guide*. Wiley-Blackwell, Chichester, UK ; Hoboken, NJ.
- Machado G. & Freitas A.V.L. (2001). Larval defence against ant predation in the butterfly *Smyrna blomfieldia*. *Ecological Entomology*, 26, 436-439.
- Martin W.R. & Nordlund D.A. (1989). Ovipositional Behavior of the Parasitoid *Palexorista-Laxa* (Diptera, Tachinidae) on *Heliothis-Zea* (Lepidoptera, Noctuidae) Larvae. *J Entomol Sci*, 24, 460-464.
- Mega N.O. & de Araujo A.M. (2008). Do caterpillars of *Dryas iulia alcionea* (Lepidoptera, Nymphalidae) show evidence of adaptive behaviour to avoid predation by ants? *Journal of Natural History*, 42, 129-137.
- Mody K. & Linsenmair K.E. (2004). Plant-attracted ants affect arthropod community structure but not necessarily herbivory. *Ecological Entomology*, 29, 217-225.
- Moraes, A., Greeney H. F., Oliveira, P.S., Barbosa E. P., & Freitas, A. V. L. (2012). Morphology and behavior of the early stages of the skipper *Urbanus esmeraldus* on an ant-visited host plant, *Urera baccifera*. *Journal of Insect Science* (in press).
- Murphy S.M., Leahy S.M., Williams L.S. & Lill J.T. (2010). Stinging spines protect slug caterpillars (Limacodidae) from multiple generalist predators. *Behavioral Ecology*, 21, 153-160.
- Ness J.H., Morris W.F. & Bronstein J.L. (2009). For ant-protected plants, the best defense is a hungry offense. *Ecology*, 90, 2823-2831.
- Oliveira-Filho, A.T. & Ratter, J.A. (2002). Vegetation physiognomies and woody flora of the Cerrado biome. In: *The Cerrado of Brazil* (eds. Oliveira PS & Marquis RJ). Columbia University Press New York, pp.91-120.
- Oliveira P.S. (1997). The ecological function of extrafloral nectaries: Herbivore deterrence by visiting ants and reproductive output in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae). *Functional Ecology*, 11, 323-330.

- Oliveira P.S. & Freitas A.V.L. (2004). Ant-plant-herbivore interactions in the neotropical Cerrado savanna. *Naturwissenschaften*, 91, 557-570.
- Oliveira P.S., Freitas A.V.L., Del-Claro K. & Marquis R.J. (2002). Ant Foraging on Plant Foliage: Contrasting Effects on the behavioral Ecology of Insects Herbivores. In: *The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna*. Columbia University Press New York, pp. 287-305.
- Osborn F. & Jaffe K. (1998). Chemical Ecology of the Defense of Two Nymphalid Butterfly Larvae Against Ants. *Journal of Chemical Ecology*, 24, 1173-1186.
- Price P.W. (2002). Species interactions and the evolution of biodiversity. In: *Plant-Animal Interactions: An evolutionary approach* (eds. Herrera CM & Pellmyr O). Blackwell Science Oxford, UK, pp. 3-25
- Portugal A.H.A. & Trigo J.R. (2005). Similarity of cuticular lipids between a caterpillar and its host plant: A way to make prey undetectable for predatory ants? *Journal of Chemical Ecology*, 31, 2551-2561.
- Rico-Gray V. & Oliveira P.S. (2007). *The ecology and evolution of ant-plant interactions*. University of Chicago Press, Chicago.
- Rommel T., Davison J. & Tammaru T. (2011). Quantifying predation on folivorous insect larvae: the perspective of life-history evolution. *Biological Journal of the Linnean Society*, 104, 1-18.
- Ribas C.R., Schoereder J.H., Pic M. & Soares S.M. (2003). Tree heterogeneity, resource availability, and larger scale processes regulating arboreal ant species richness. *Austral Ecology*, 28, 305-314.
- Salazar B.A. & Whitman D.W. (2001). Defensive tactics of caterpillars against predators and parasitoids. In: *Insects and plant defences dynamics* (ed. Ananthakrishnan TN). Science Publishers, Inc. Plymouth, UK, pp. 161-207.
- Sandre S.L., Tammaru T. & Mand T. (2007). Size-dependent colouration in larvae of *Orgyia antiqua* (Lepidoptera : Lymantriidae): A trade-off between warning effect and detectability? *Eur J Entomol*, 104, 745-752.
- Schatz B., Lachaud J.-P. & Beugnon G. (1997). Graded recruitment and hunting strategies linked to prey weight and size in the ponerine ant *Ectatomma ruidum*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 40, 337-349.
- Schoereder J.H., Sobrinho T.G., Madureira M.S., Ribas C.R. & Oliveira P.S. (2010). The arboreal ant community visiting extrafloral nectaries in the Neotropical Cerrado savanna. *Terrestrial Arthropod Reviews*, 3, 3-27.
- Scoble M.J. (1995). *The Lepidopteraform, function, and diversity*. Oxford University Press, Oxford.
- Sendoya S.F., Freitas A.V.L. & Oliveira P.S. (2009). Egg-Laying Butterflies Distinguish Predaceous Ants by Sight. *American Naturalist*, 174, 134-140.
- Singer M.S. & Stireman J.O. (2003). Does anti-parasitoid defense explain host-plant selection by a polyphagous caterpillar? *Oikos*, 100, 554-562.
- Singer M.S., Farkas T.E., Skorik C.M. & Mooney K.A. (2012). Tritrophic interactions at a community level: effects of host plant species quality on bird predation of caterpillars. *American Naturalist*, 179, 363-74.
- Smedley S.R., Ehrhard E. & Eisner T. (1993). Defensive regurgitation by a noctuid moth larva (*Litoprosopus futilis*). *Psyche*, 100, 209-222.
- Stadler, B., & Dixon, A. F. G. 2008. Mutualism: ants and their insect partners. Cambridge University Press, Cambridge.

- Stamp N.E. (1984). Interactions of parasitoids and checkerspot caterpillars *Euphydryas* spp.(Nymphalidae). *Journal of Research on the Lepidoptera*, 23, 2-18.
- Stamp N. (2001). Enemy-free space via host plant chemistry and dispersion: assessing the influence of tri-trophic interactions. *Oecologia*, 128, 153-163.
- Styrsky J.D. & Eubanks M.D. (2010). A facultative mutualism between aphids and an invasive ant increases plant reproduction. *Ecological Entomology*, 35, 190-199.
- Sugiura S. & Yamazaki K. (2006). The role of silk threads as lifelines for caterpillars: pattern and significance of lifeline-climbing behaviour. *Ecological Entomology*, 31, 52-57.
- Thaler J.S. & Griffin C.A.M. (2008). Relative importance of consumptive and non-consumptive effects of predators on prey and plant damage: the influence of herbivore ontogeny. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 128, 34-40.
- Weiss M.R. (2003). Good housekeeping: why do shelter-dwelling caterpillars fling their frass? *Ecology Letters*, 6, 361-370.
- Yamazaki K. (2010). Parachuting behavior and predation by ants in the nettle caterpillar, *Scopelodes contracta*. *J Insect Sci*, 10, 1:10.

CAPÍTULO 3:

FOLIAGE-DWELING ANTS ON THE CERRADO SAVANNA: THE EFFECT OF LIQUID FOOD SOURCES ON COMMUNITY STRUCTURE

Sebastian F. Sendoya¹, André V. L. Freitas², Jorge Y. Tamashiro³, Fernando Fernandez⁴, Nico Blüthgen⁵ & Paulo S. Oliveira²

1. Programa de Pós graduação em Ecologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6109, 13083-970 Campinas São Paulo, Brasil.
2. Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6109, 13083-970 Campinas São Paulo, Brasil.
3. Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6109, 13.083-970
4. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Instituto de Ciencias Naturales. AA. 7495, Bogotá DC, Colombia.
5. Technische Universität Darmstadt, Fachbereich Biologie. Schnittspahnstraße 10 64287 Darmstadt. Germany

Abstract:

Ants are chief components of the arthropod fauna of tropical ecosystems, including the Cerrado savanna. Their dominance can be explained by their capability to use liquid food sources on plants such as extrafloral nectar and secretions from honeydew-producing insects. The extensive use of these resources characterizes most arboreal ants as herbivores. Considering this, we may expect that the presence of liquid sources may determine the distribution of ants in space and shape the patterns of specialization of ant-plant interactions. Here, we compared plants with and without the presence of liquid food sources, studying differences in the structure of ant assemblages, (ant visitation intensity and characteristics of ant-plant interaction networks) that may be affecting herbivorous presence. We sampled ants visiting plants in four localities of Cerrado savanna in southeastern Brazil by using arboreal pitfall traps. On each plant we registered the presence of Lepidoptera larvae in order to determine how the visitation of different ant groups may affect the presence of those herbivores. We found that there were no differences in ant species composition or richness between plants with or without liquid food sources. However, some ant genera (*Camponotus* and *Pseudomyrmex*) visited more intensely plants with liquid food sources, but this difference was conditioned to the sampling location. In the localities where those ants visited more intensely plants with attractors, those plants with attractors were more specialized in their interactions with ants. Furthermore, Lepidoptera larvae were found on those localities where found on plants with fewer workers of *Camponotus* and *Pseudomyrmex*. Thereby, the response of ants to liquid sources may be dependent on local conditions and identity of species of ant assemblages. Variations in the presence and behavior of certain ant groups may also determine a spatial variation on the

outcome of ant-plant interactions, allowing benefits for plants advantages for plants only in certain conditions.

Resumo

Formigas são o componente principal da fauna de artrópodes de muitos ecossistemas tropicais como o Cerrado. A sua dominância pode ser explicada em parte pela sua capacidade de usar fontes líquidas de alimento na folhagem, como nectários extraflorais ou exsudatos de insetos. O uso extensivo destes recursos caracteriza como herbívoros a maioria das formigas que forrageia na folhagem. Desta forma, podemos esperar que a presença de fontes líquidas de alimento afete a distribuição das formigas no espaço e determine os padrões de especialização nas interações formiga-planta. Neste estudo, comparamos plantas com e sem fontes de recursos líquidos, estudando variações na estrutura das assembléias de formigas visitantes, (intensidade da visitação por formigas, e nas características das redes de interações formiga-planta) que possam estar afetando a presença de herbívoros. Amostramos as formigas que visitam as plantas de quatro localidades de Cerrado usando armadilhas do tipo “pitfall” adaptadas para amostragem arbórea. Em cada planta registramos também a presença de larvas de Lepidoptera para estabelecer se a visitação de diferentes grupos de formigas podia afetar a presença dos herbívoros. Encontramos que não existem diferenças na composição ou riqueza de formigas entre plantas com e sem fontes de recursos líquidos. Entretanto, alguns gêneros (*Camponotus* e *Pseudomyrmex*) visitaram mais intensamente as plantas com recursos líquidos, mas esta diferença na visitação foi dependente da localidade de amostragem. Nas localidades onde as formigas visitaram as plantas com atrativos mais frequentemente, estas plantas com atrativos foram um pouco mais especializadas nas suas interações com

formigas do que plantas sem atrativos. Adicionalmente, as larvas de lepidópteros nessas localidades foram encontradas em plantas com menos operárias de *Camponotus* e *Pseudomyrmex* quando comparadas a plantas não infestadas. Desta forma a resposta das formigas à presença de recursos líquidos nas plantas pode ser dependente das condições locais. Variações na presença e no comportamento de alguns grupos de formigas pode também determinar que o resultado da interação entre formigas e plantas seja variável no espaço. Assim os benefícios fornecidos pelas formigas de redução de herbivoria ocorrem apenas sob certas circunstâncias.

Introduction

Ants comprise the most important component of the arthropod fauna on the foliage of tropical ecosystems. Indeed it has been estimated that, among arthropods, ants account for 86% of the biomass and 94% of the individuals living in the canopy of tropical forests (Majer 1990; Tobin *et al.* 1991). Foliage-dwelling ant species are represented both by ants specialized on foraging and living on trees and ground dwelling species that also forage on leaves (Blüthgen *et al.* 2000; Davidson *et al.* 2003). However, most ant species are considered dependent of ground habitats and ant species richness on foliage is comparatively moderate (Hölldobler & Wilson 1990; Rico-Gray & Oliveira 2007). The dominance of ants on foliage may be explained by both their eusocial mode of life and by the existence of specific adaptations to this habitat, involving nesting and foraging behaviors (Hölldobler & Wilson 1990, Yanoviak & Kaspari 2000). Many ants are adapted to construct their nest on plants or even inside cavities or galleries left by stem-boring beetles or gall-makers (Fernandes *et al.* 1989; Araujo *et al.* 1995). Arboreal species are able

to survive in conditions of low humidity and strong winds up in the canopy and at the same time remain close to their preferred food resources. Traditionally, most ground-dwelling ants have been considered opportunistic predators (even several groups are considered highly specialized predators) that feed mainly on small invertebrates (Kaspari *et al.* 2000). However, recently it has been demonstrated that most canopy-dwelling ants (especially the dominant species) are dependent on plant-derived liquid food sources, which makes them more similar to herbivores than to predators explaining how they can reach such high abundances (Blüthgen *et al.* 2003; Davidson *et al.* 2003).

The use of liquid sources is also related to the ability of several arboreal ants to establish close trophobiotic relationships not only with plants but with exudate-producing herbivores as well. Plants of several tropical ecosystems frequently possess glands that produce sweet secretions such as extrafloral nectaries (EFNs) that have been described for over 90 families (Koptur 1992). Ants are the most frequent consumers of extrafloral nectar and, although most ant species may use this resource opportunistically (Rico-Gray & Oliveira 2007; Blüthgen & Feldhaar 2010), specialized predators have also been reported to visit EFNs (Blüthgen & Fiedler 2004b). Furthermore, many ant species can also use honeydew from sap-feeding hemipterans or secretions from lepidopteran larvae, which they protect from natural enemies (Pierce *et al.* 2002; Stadler & Dixon 2005) and sometimes indirectly also protect the host plant (Messina 1981; Oliveira & Del-Claro 2005). Typically, liquid food sources are scattered on vegetation and ants attracted by them may patrol the plants while searching for food, expelling competitors, or even hunting for animal prey (Oliveira *et al.* 1999; Rico-Gray & Oliveira 2007). Due to their aggressive behavior, the presence of ants on leaves typically has negative effects on populations of herbivores and as

a result may disrupt herbivory (Bentley 1977, Heil & McKey 2003; Rico-Gray & Oliveira 2007; Chamberlain & Holland 2009).

Cerrado is a savanna-like ecosystem that in its original distribution occupied almost two million square kilometers in the central region of Brazil (Oliveira & Marquis 2002). This ecosystem is specially rich in food sources for foliage dwelling ants – close to 25% of plant species present EFNs (Oliveira & Leitão-Filho 1987) and up to 30% may present honey-dew producing insects (Lopes 1995). The availability of these liquid resources stimulates visitation by many ant species on plants (Oliveira & Brandão 1991; Oliveira & Freitas 2004) and may decrease herbivore presence (Oliveira 1997; Del-Claro & Oliveira 1999). For this reason, we can expect that ant assemblages visiting plants will show some degree of dependency on liquid resources, as shown for tropical forest ant assemblages (Davidson *et al.* 2003). However, we still know little about how resource availability may influence coexistence of arboreal ants and hence the composition of ant assemblages (Blüthgen & Feldhaar 2010).

The foraging activities of ants may provide benefits to plant fitness both directly in plants with extrafloral nectaries (Bentley 1977, Bronstein 1998; Chamberlain & Holland 2009; Rosumek *et al.* 2009), or indirectly via tending/patrolling activities at honeydew-secreting insects (Messina 1981; Heil *et al.* 2001; Oliveira & Del-Claro 2005). From the plant perspective, the mutualistic interaction with ants would only be advantageous if visiting ants provide a net decrease in the negative effects of herbivores (Rico-Gray & Oliveira 2007; Ness *et al.* 2010). However, because several factors may affect the outcome of ant-plant interactions (Bronstein 1994, 1998), in some cases no ant-derived protection has been demonstrated for plants offering food rewards (O'Dowd & Catchpole 1983, Kawano *et al.* 1999, Schoereder *et al.* 2010, Nogueira *et al.* 2011). The identity and

aggressiveness of visiting ants is one of the main factors affecting actual effects of ants on herbivores (Mody & Linsenmair 2004; Sendoya *et al.* 2009). However, other factors has been pointed as explanations for the lack of protection by ants in some instances, such as phylogenetic inertia, abiotic restrictions, interhabitat or temporal variation in herbivore activity, and their adaptation to circumvent ant predation (Heads & Lawton 1985; Koptur 1992; Freitas & Oliveira 1996; Heil *et al.* 2001, Kersch & Fonseca 2005, Nogueira *et al.* 2011).

How ants make use of plant-derived resources, and how this use varies geographically, should indicate how strong the interactions between plants and ants are in Cerrado. There is evidence that many Cerrado ants opportunistically use liquid food sources, and in some cases ant visitors do not act as plant bodyguards (Oliveira & Freitas 2004; Byk & Del-Claro 2010). Thus, we may expect that ant-plant mutualistic interactions vary spatially according with the local community of ant visitors, with patterns of herbivore activity, and with local conditions (Bronstein 1994, 1998). Moreover, if plant-derived resources are considered solely as an additional food source for ants, then ant-plant mutualistic interactions may be highly asymmetric (Schoereder *et al.* 2010). Indeed, it has been proposed that ants may respond to liquid food sources on plants only when these are abundant (Diaz-Castelazo *et al.* 2004; Schoereder *et al.* 2010). If this is the case, we may expect specialization levels of foraging ants to be low (e.g. Blüthgen *et al.* 2007). Notwithstanding, patterns of specialization in ant-plant interactions in Cerrado should be higher for plants possessing liquid food rewards than for plants lacking ant attractants.

Although it is still unknown how much Cerrado ants are dependent on plant-derived liquid food sources, and if this may affect the whole community, we expect that at least

certain ant groups would respond strongly to plant- and insect-derived exudates (hereafter ant attractants) (see Blüthgen *et al.* 2003; Davidson *et al.* 2003). If this is true, many ants would show preference for plants with liquid food sources, and ant assemblages at these plants should differ from those visiting plants without ant attractants. These differences should be reflected on the structure and composition of the ant community, which may in turn mediate how ants affect herbivores on specific plants or at specific habitats.

This study investigates how the presence of ant attractants shapes the structure of the ant assemblages visiting Cerrado plants, and especially how these effects vary among Cerrado sites. Specifically, we (1) test if the presence of attractants increases ant richness or ant visitation on plants, (2) study how the presence of ant attractants affects the composition and identity of visiting ants, and (3) determine if the presence of attractants affects ant-plant interactions patterns in Cerrado by increasing plant specialization. Finally, (4) we investigate if the ant genera which are more affected by the presence of ant attractants on plants, can also affect the presence of herbivores on plants.

Methods

Field collections

Field collections were carried out during the wet season (between February and April of 2009) at four Cerrado localities in southeastern Brazil, near the cities of Itirapina, Mogi Guaçu, Assis (São Paulo State), and Uberlândia (Minas Gerais State). The physiognomy of the vegetation of all sampled sites consisted of a dense cover of trees and shrubs corresponding to the Cerrado *sensu stricto* (Oliveira-Filho & Rater 2002). In each locality we sampled 50 plants in each of 6 transects (trees and shrubs between 60-330 cm

tall). Visiting ants were sampled with arboreal pitfall traps, kept exposed in the field for 24 h. We placed two pitfall traps per plant, one baited with sardine and one with honey. For each plant, we also registered: height, stem diameter at soil level, and the presence of EFNs and honeydew-producing insects. EFNs were detected by direct observation in the field as well as by comparison with descriptions and available plant lists (Oliveira & Leitão-Filho 1987; Machado *et al.* 2008). Plants where we found evidence of established ant nests were not included in the surveys. Ant and plant specimens were brought to the lab for identification.

To evaluate the effects of visiting ants on herbivore presence we quantified the abundance of exophagous larvae of Lepidoptera. Prior to ant sampling, each plant was carefully inspected for the occurrence of larvae during 10 min (see also Chapter 1). These insects are very important herbivores in tropical ecosystems (Aguiar *et al.* 2009), and their feeding behavior and low mobility make them likely to interact with ants on leaves (Freitas & Oliveira 1996; Kaminski *et al.* 2009).

We divided the sampled species in two groups: plants with and without ant attractants (EFNs or exudate-producing insects). We investigated the community structure of visiting ants by comparing their abundance, species richness, and composition between plant groups and among Cerrado sites.

Ant richness

Although sampling efforts were equivalent among sites, there were more plant species and individuals without liquid food sources than with ant attractants. Because the frequency of occurrence of individuals differed for the two plant groups, sampling effort was not the same for plant categories (unbalanced sampling for the two plant groups), and

data on ant species richness could not be directly compared. In order to address this problem we constructed curves using the method of rarefaction by individuals following Krebs (1989) and using the software PAST (Hammer *et al.* 2001). In our case, instead of individuals we used the number of times an ant species was found on individual plants. Rarefaction curves were used to compare ant species richness between plant groups within and among localities.

Ant visitation levels

We compared ant abundance (considered as the total number of individual workers sampled on each plant) between plants with and without attractants to evaluate if the intensity of ant visitation varies between these plant categories. We used a mixed model ANOVA method on Statistica 8.0 software (Statsoft Inc 2007). The design included two fixed factors, (sampling locality, presence of attractants), and the sampling transect (nested within locality) as random factors. To determine if the differences found in this test were concentrated, we carried out one *a posteriori* Fisher test to evaluate the differences of effect of ant attractants between single localities. For the multiple comparisons tests we corrected *P* values using the method of false discovery rate (FDR- Benjamini & Hochberg 1995).

For comparing visitation by the most important ant genera between plants with and without ant attractants, we included only genera that were found at least on 30 plants (considering the whole sampling effort). This analysis was performed at two levels, which reflect different information about ant abundance in the system. First, we compared how many plants in each group were used by the ant genera. In order to do this, we performed a multiple logistic regression considering the presence or absence of ant attractants in each plant as the response variable, and the presence or absence of each genus and its interaction

with sampling locality as predicting variables. Again, FDR method was used to correct P values. Second, we compared how many workers in each genus were found on the two groups of plants. In this case, our objective was to test if once ants are present on a plant the intensity of their visitation differs between plant groups. For this reason, we performed two factorial ANOVAs using the data on abundance per individual plant of each ant genus but including only plants where at least one worker of the genus was found. Each ANOVA test included plant groups and sampling locations as factors. This method was performed on Statistica 8.0 software (Statsoft Inc 2007).

Ant assemblages' composition

To address ant species composition, the two plant groups were surveyed at the transect level. We carried out six replicates for each plant group at each locality (12 ant assemblages: 6 for plants with ant attractants and 6 for plants without attractants). We counted the number of individual plants where each ant species was found on of each plant group (irrespective of the number of workers). In order to address the difference of sampling size between plant groups, we developed a re-sampling approach. This method consisted of randomly re-sampling 1000 times (with replacement) every transect of each plant group, using the transect with the smallest sample size in each locality as reference for the sample size. Then, we calculated 1000 matrices of similarity between transects of both plant groups (hence, 12 points for each locality) using the Morisita index (see Magurran 2004), and calculated a mean similarity matrix (by calculating the mean similarity for each pair inside the matrices). With this mean matrix we performed an ordination analysis with non-metric Multidimensional scaling (NMDS). To test if the ant assemblages were actually forming clear groups, we pooled all the data from the four localities together and used a

two-way permutation Manova test, including both presence of ant attractants and locality as factors and using a similarity matrix with the index of Morisita. All analyses were performed using Vegan package for the software R 2.14.2 (R development Core Team (2011)).

Networks analysis

We also studied how the ant-plant interaction networks were structured and if there were differences in their properties associated with the presence of ant attractants. To do this, we constructed bipartite networks of ant visitation to plants. We constructed two networks for each locality, one for plants with ant attractants and other for plants without attractants. Then we constructed a third network for each locality pooling the two partial ones. In the pooled networks we put together both plants with or without attractants, splitting plant species in two when the same species presented individuals with and without honeydew-producing Hemiptera (ant attractants). We calculated some metrics for each network, such as Connectance (realized proportion of possible links), C-score (number of checkerboard combinations across all higher trophic level species), Niche overlap (mean similarity in interaction patterns between species of the same trophic level), Nestedness (maximum differences in the number of links among the species measured by weighted NODF (WNODF) - Almeida-Neto & Ulrich 2011), network specialization (using H_2' -Blüthgen *et al.* 2006), and Specialization asymmetry (see Dormann *et al.* 2009 for more details on each metric). We compared H_2' and WNODF values with those expected for random networks by constructing null models. We used the null model proposed by Vásquez (2007), which allows us to construct random networks maintaining similar connectance and marginal totals. This comparison allows us to establish if the values of complementary specialization would be dependent on the dimension of the networks. The

next step was to study the patterns of specialization within the pooled networks for each locality. We hypothesized that if the ants (or at least a group of ant species) have preferences for visiting plants with attractants, this group of plants may present higher values of specialization. This should be true if plants with attractants interact with some groups of ants more frequently than expected by their abundance. The values of specialization were estimated using the standardized specialization index d' for each species (Blüthgen *et al.* 2006). The d' index is derived from Kulback-Leibler distance (as is Shannon's diversity index), and calculates how strongly a species deviates from a random sampling of their available interacting partners. We compared the d' values of between plant categories among localities using a two-factor ANOVA. All network analyses were performed using software R 2.14.2 (R development Core Team 2011) and the R-package Bipartite (Dormann *et al.* 2008; Dormann *et al.* 2009).

Effect of ants on lepidopteran larvae

We compared the number of workers of each ant genus visiting plants with and without larvae to investigate which of the ant genera could be affecting the presence of lepidopteran larvae on plants. However, not all ants present in transects may be relevant to understand ant effect on the presence of larvae. What should be important are the ants present on the plants that each larvae may actually use, or in other words, on plants that may serve as potential hosts. For this reason, we only compared the number of ants in plants with larvae with the number of ants in non-infested host plants (*i.e.* plants of the same species in the same transect). These comparisons were performed with paired Wilcoxon test, including for each ant genus only plants in transects where the genus was found at least on one plant. P values were again corrected using FDR.

Results

The number of sampled ants species was higher at Assis (52 spp.) and Mogi Guaçu (47 spp.), and lower at Uberlândia (40 spp.) and Itirapina (37 spp.). Based on the rarefaction curves (Fig 1a) only Itirapina presented a different richness, being lower than the other three sites. In all the localities we found more species of ants on plants without attractants than in plants with attractants (Table 3). However, rarefaction curves showed that within sites, there is no difference in richness between plants with or without ant attractants (Fig 1b-e). It means that difference in ant richness is due only to differences in sampling effort between plant groups.

The MDS ordination showed no differences between ant assemblages composition on plants with and without ant attractants (Fig 2a-d). The two-way permutation Manova confirmed these results, indicating that ant assemblages are grouped according to locality, irrespective of the presence of ant attractants on plants (Table 1).

Concerning ant visitation, we found that none of the ant genera were more frequently found on plant with than in plants without ant attractants, irrespective of the locality sampled (Table A1). The mixed model ANOVA showed that both locality and ant attractor affected ant visitation, and also that there was an interaction between those two factors (Table 2). This means that ants are visiting plants with ant attractor more intensively only in certain localities, while in others there is no difference. Plants with ant attractors are more intensively visited by ants both in Itirapina and Uberlândia but not in Assis or Mogi Guaçu (Fig 3). We also found that both *Camponotus* and *Pseudomyrmex* are the ant genera likely accounting for the difference in visitation intensity, since both genera presented higher abundances on plants with attractants (Table A2), with variation among localities.

This means that even if *Camponotus* and *Pseudomyrmex* did not have a preference to visit plants with ant attractants, once they climb onto such plants they have increased numbers of ant foragers than on plants without ant attractants. In the case of *Camponotus*, the intensity of visitation to plants with attractants was higher for the localities of Uberlândia and Itirapina (Fig 4a), whereas for *Pseudomyrmex* the greatest visitation level occurred in Mogi Guaçu (Fig 4b).

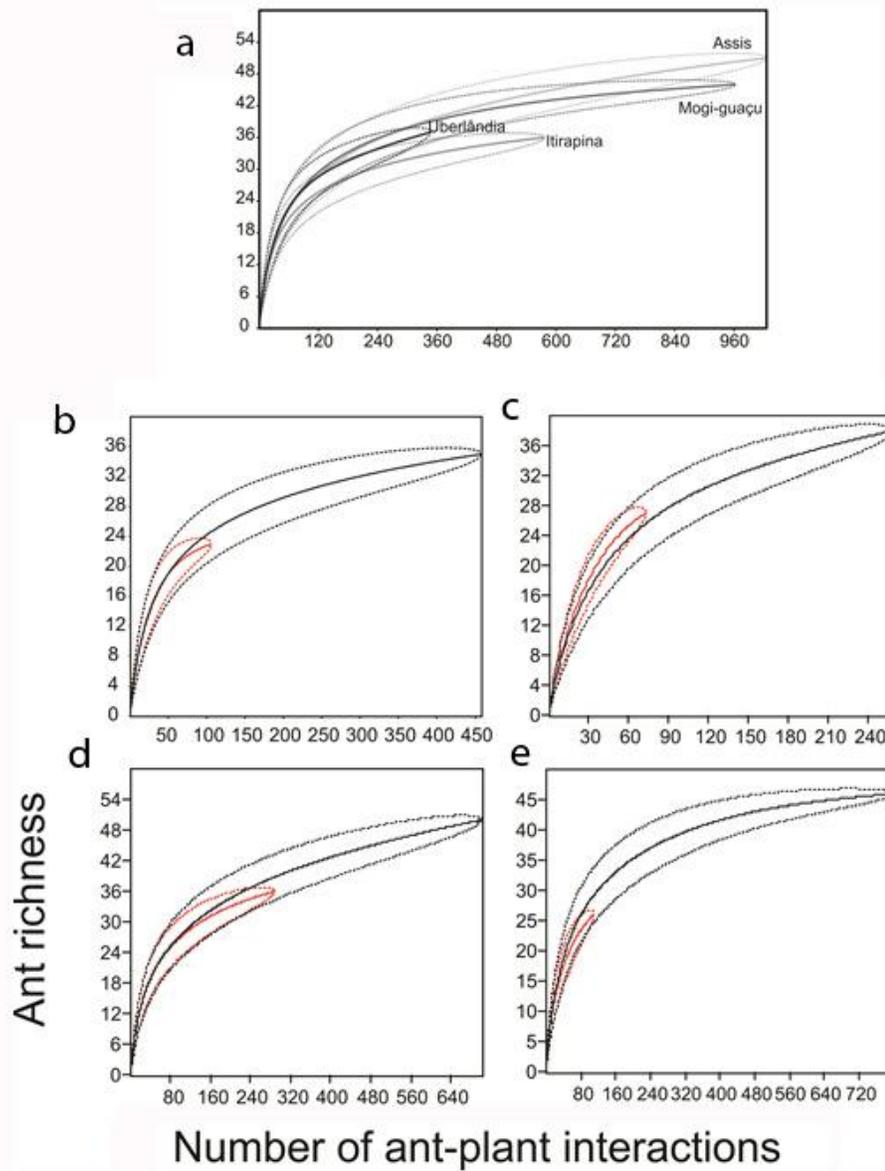


Fig 1: Rarefaction curves of richness of ant species visiting plants with ant attractants (EFNs or exudate-producing insects - red line) and plants without attractants (black line). Dot lines represent 95% confidence intervals. Localities: a) Itirapina; b) Uberlândia; c) Assis; d) Mogi Guaçu. e) Comparison among localities.

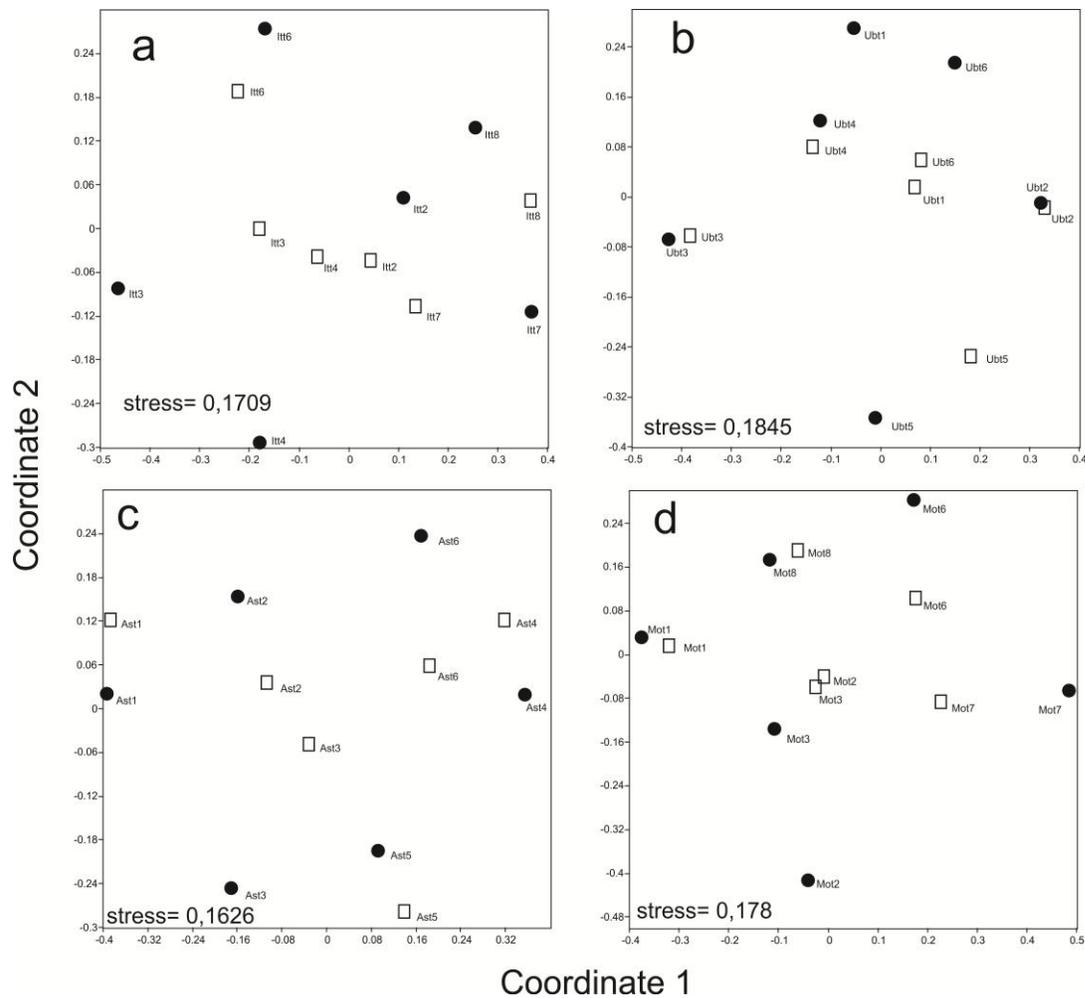


Fig. 2: NMDS ordination showing similarity on the composition of ant assemblages visiting groups of plants with ant attractants (EFNs or exudate-producing insects - black dots) and without attractants (white boxes) within each transect. The dot names indicate the transect where each plant group belongs. Localities: a) Itirapina; b) Uberlândia; c) Assis; d) Mogi Guaçu.

Table 1: Results of the permutation Manova test comparing the effects of the presence of ant attractants on plants (EFNs or exudate-producing insects) and of sampling locality (Itirapina, Uberlândia, Assis and Mogi Guaçu) on ant species composition.

Factor	Df	Sum of Squares	F	R ²	P
Attractors	1	0.001	0.318	0.004	0.961
Sampling locality	3	0.083	14.264	0.505	<0.0001
Attractors X Locality	3	0.003	0.556	0.020	0.980
Residuals	40	0.077	0.472		
Total	47	0.163			

Table 2: Results of the linear mixed model comparing the levels of ant visitation (ant abundance) to individual plants in relation to sampling locality (Itirapina, Uberlândia, Assis, and Mogi Guaçu), and the presence of ant attractants (and its interaction). Here we considered the sampling transect (nested in the locality) as a random variable.

Factor	Effect type	SS	Df	F	p
Intercept	Fixed	262816.3	1	85.609	0.000
Locality	Fixed	40937.3	3	4.3974	0.014
Attractors	Fixed	6494.7	1	7.105	0.008
Locality*Attractors	Fixed	8421.4	3	3.071	0.027
Transects(Locality)	Random	74899.8	20	4.096	0.000
Error		932436.2	1068		

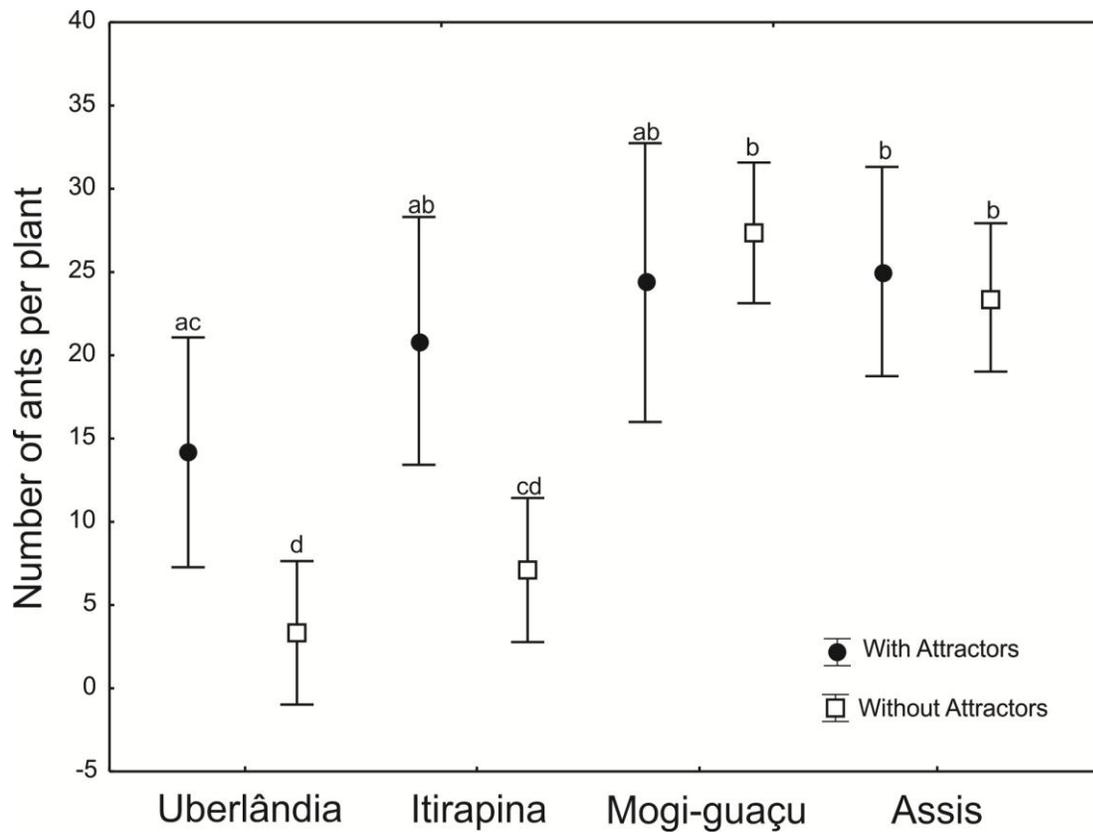
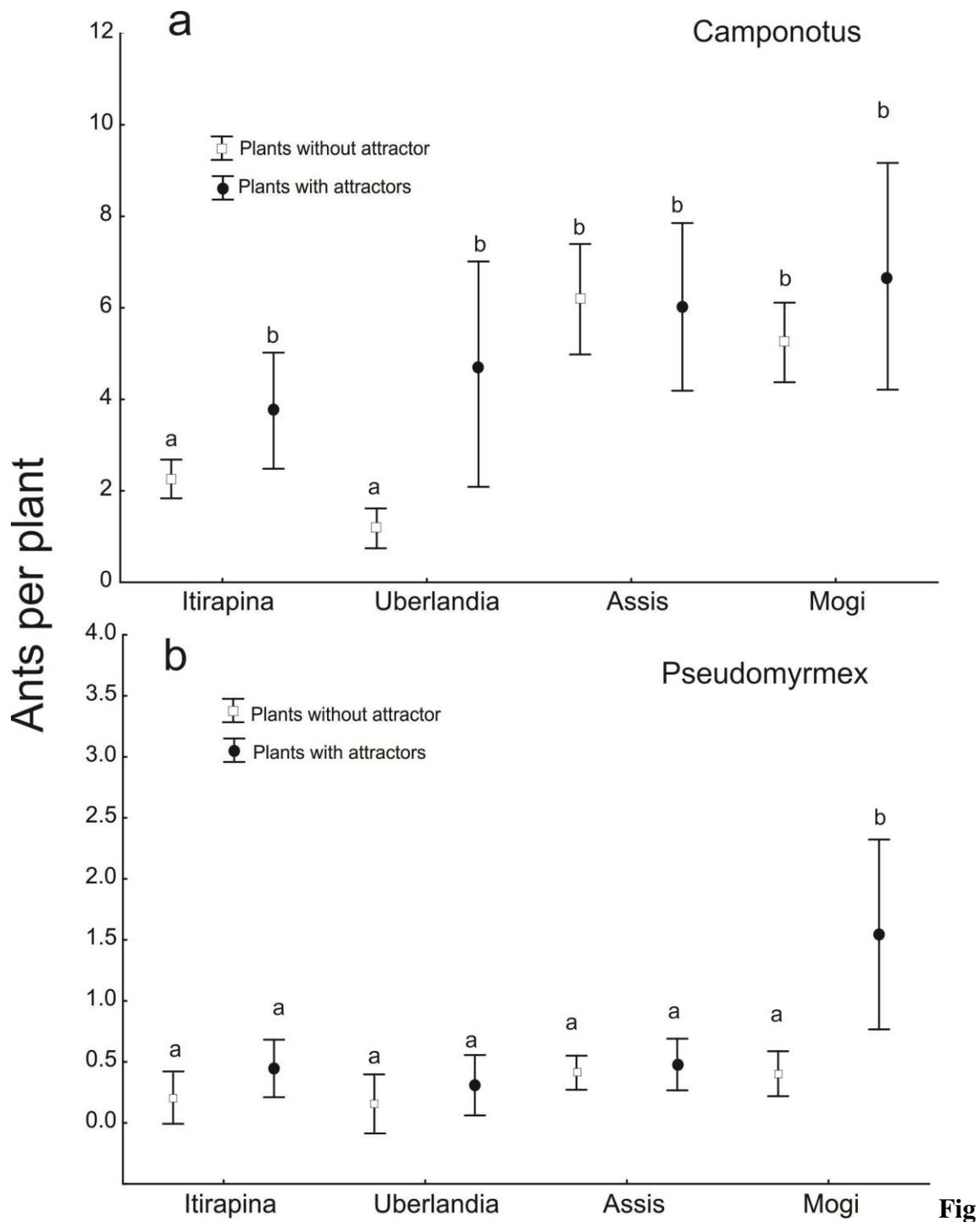


Fig 3: Comparison of the number of ants sampled on plants with and without attractants (EFNs or exudate-producing insects) on each of the sampling localities. Bars indicate confidence intervals (95%) around means. Categories not sharing letters above the bars indicate that they belong to groups significantly different according to a Post-Hoc test of Fisher- LSD ($P < 0.05$).



4: Intensity of ant visitation (number of ants per plant) for *Camponotus* (a) and *Pseudomyrmex* (b) for plants with attractants (EFNs or exudate-producing insects- black dots) and plants without attractants (white boxes). Symbols indicate the mean for each category whereas whiskers show the 95% confidence intervals. Categories not sharing the same letter above the bar indicate that they belong to groups significantly different according to a Post Hoc test of Fisher- LSD ($P < 0.05$).

Network analyses

Because there are more plant species without attractants, in general ant-plant interaction networks with this group of plants were bigger (Table 3). However, the sizes of networks were similar among localities (Fig. A1 to A4). In Itirapina we observed the lowest number of ant species and the highest of plant species. All networks presented medium levels of C-score, however those values were slightly higher in Uberlândia and Itirapina, indicating higher levels of disaggregation of ant species with respect to the plants they are visiting. In the same way, niche overlap of ants was very low in those localities, indicating that in general ants are not sharing the same plant species for foraging. The values of nestedness measured by WNODF were rather low (Table 3), with two localities, Assis and Mogi Guaçu, presenting values slightly higher. The only networks that presented higher WNODF values than expected by null models were the complete network and the network of plants without attractors in Mogi Guaçu.

All networks presented low values of connectance as well as low specialization (low values of $H2'$ -Table 3). Nevertheless, in Assis and Mogi Guaçu the $H2'$ values are even lower than expected by null models. Those results may suggest that both in Assis and Mogi Guaçu ants are visiting more plants species (therefore being more generalist) than expected by their frequencies. The specialization asymmetry values were near zero, indicating that there are no big differences in specialization between trophic levels. The asymmetry values were slightly higher in complete networks of Uberlândia and Itirapina. This may be reflecting the fact that this metric is highly influenced by web asymmetry (Bluthgen *et al.* 2007), and those localities have almost twice as many plants species than ant species. The analysis of specialization at the species level (values of d' index) showed that there were

effects of both locality (Two way factorial Anova: $F_{(df=3)} = 16,79$; $P < 0,001$) and ant attractors presence (Two factorial Anova: $F_{(df=1)} = 4,1$; $P = 0,044$) but not of the interaction (Two factorial Anova: $F_{(df=3)} = 2,03$; $P = 0,109$). Using a Post Hoc test of Fisher we compared all categories to determine where those differences were concentrated. Plants with attractors had higher levels of specialization than plants without attractors both in Itirapina and Uberlândia (Fig 5).

Table 3: Metrics calculated for networks of interaction between ants and plants. Each column represents a bipartite network of ants visiting plants on different localities of Cerrado. For each locality networks of plants with and without attractants were constructed separately, and a total network of both groups of plants together. The * indicates those H_2' values which were lower than expected by the null model. The # indicates networks with WNODF values higher than the null model.

LOCALITY	ITIRAPINA			UBERLÂNDIA			MOGI-GUAÇU			ASSIS		
	With Attractants	Without Attractants	Total	With Attractants	Without Attractants	Total	With Attractants	Without Attractants	Total	With Attractants	Without Attractants	Total
Number of ant species	28	35	37	29	35	38	26	45	45	40	49	52
Number of plants	32	55	87	33	35	69	19	51	70	23	39	63
Connectance	0.148	0.155	0.134	0.124	0.147	0.114	0.206	0.200	0.178	0.215	0.185	0.168
Weighted NODF	7.540	18.192 [#]	14.952	4.255	11.142	7.478	20.963	27.353 [#]	26.498 [#]	27.283	24.360	25.172
C-score	0.662	0.629	0.658	0.722	0.644	0.701	0.415	0.423	0.431	0.431	0.510	0.529
Ants-Niche overlap	0.155	0.161	0.135	0.155	0.147	0.116	0.386	0.278	0.260	0.293	0.213	0.188
Plants –Niche overlap	0.202	0.295	0.256	0.149	0.262	0.194	0.366	0.433	0.412	0.299	0.339	0.318
Specialisation asymmetry	0.009	0.079	0.148	-0.031	-0.007	0.106	-0.156	0.000	0.041	-0.103	-0.056	0.025
H_2'	0.156	0.151	0.152	0.082	0.153	0.130	0.119*	0.108*	0.105*	0.119*	0.130	0.118*

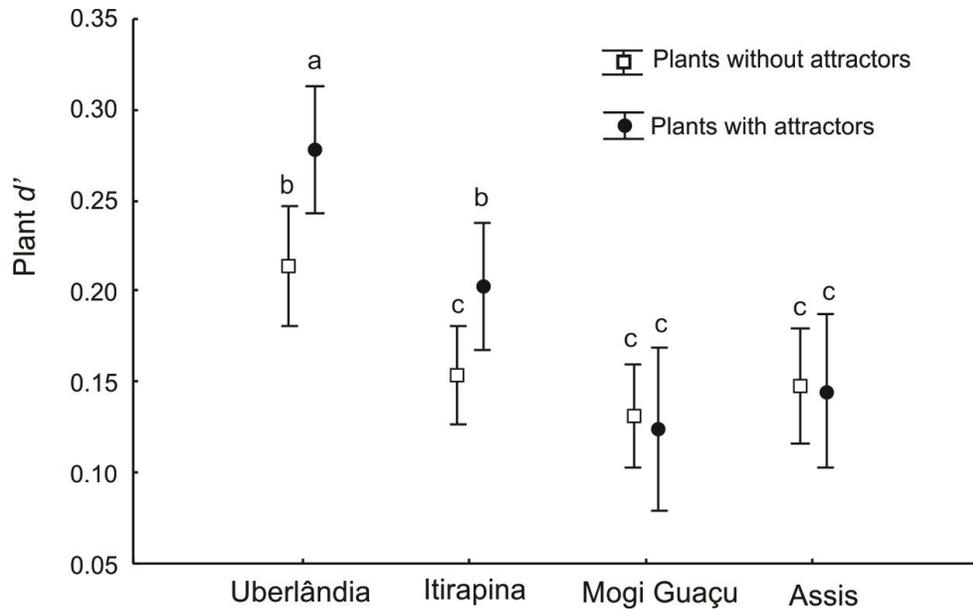


Fig 5: Values of standardized specialization index (d') for plants with and without ant attractants (EFNs or exudate-producing insects) in four localities. Bars indicate confidence intervals (95%) around means. Categories not sharing the same letter above the bar indicates that they belong to groups significantly different based on a Post Hoc Fisher-LSD test ($P < 0.05$).

Effect of ants on lepidopteran larvae

The number of ants was in general lower on plants with larvae than on plants of the same species (*i.e.* potential host) in the same transect (see chapter 1) without larvae.

However, at the generic level (Fig 6) we detected a clear pattern of low ant visitation in plants with larvae only for the genera *Camponotus* and *Pseudomyrmex* (Wilcoxon test: $Z=2.58$; $P= 0,044$). Also, we found weak tendencies for two other genera, *Cephalotes* and *Wasmannia* (Wilcoxon test: $Z=2.16$; $P= 0,068$).

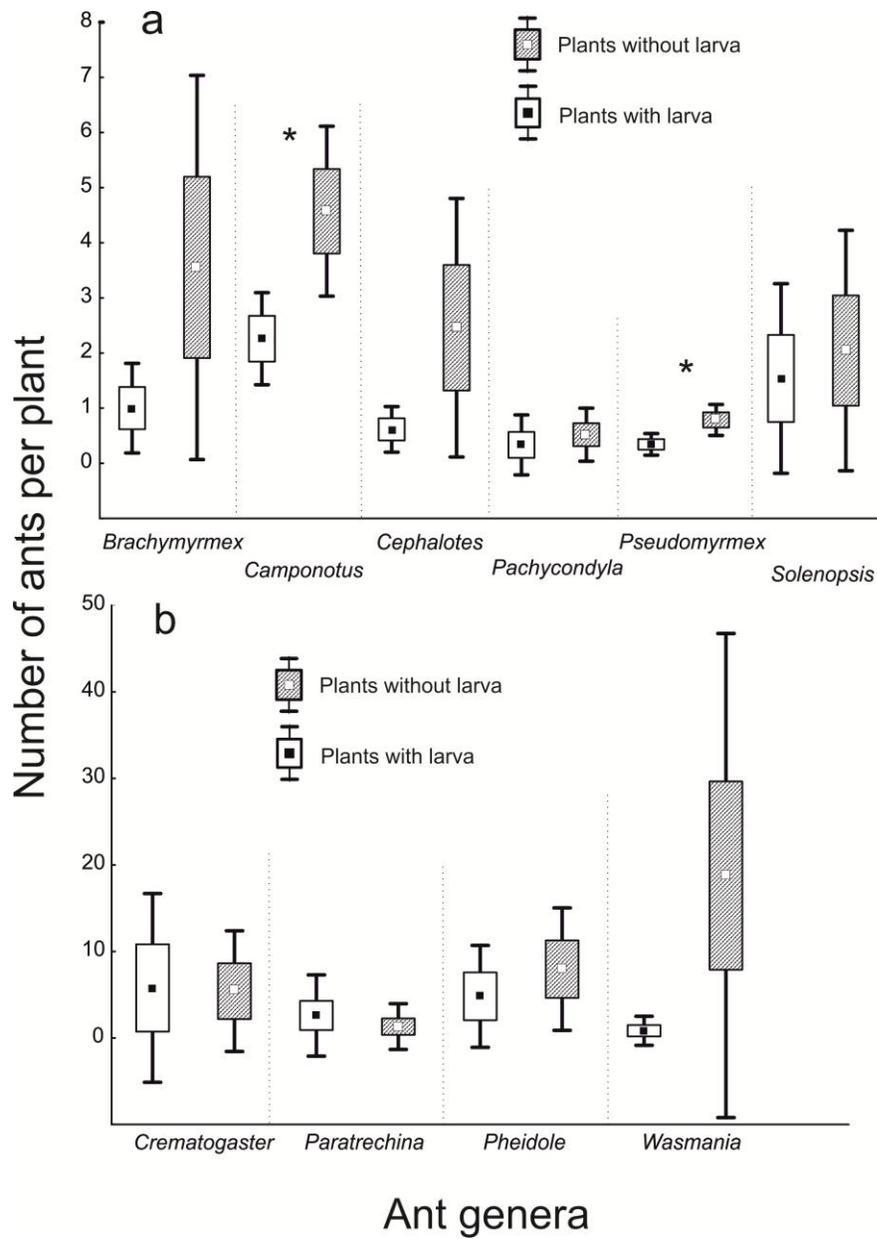


Figure 6: Ant visitation (number of ants per plant) on plants with and without larvae. The plants without larvae refer to potential hosts of each caterpillar in the same transect. Points are means, boxes are standard errors and whiskers are 95% confidence intervals. The * indicate $P < 0,05$ based on Wilcoxon paired test (using FRD correction).

Discussion

Our results show that the presence of ant attractants (EFNs or exudate-producing insects) on plants is not promoting differences in the richness (when discounting abundance effect) or composition of ant assemblages. Indeed, all ant genera visit both groups of plants with equivalent frequencies (Table A1), according only with their local availability. However, there are differences in the intensity of ant visitation by the ant genera *Camponotus* and *Pseudomyrmex* that varies among localities. Ant foraging preferences apparently do not affect patterns of ant distribution in space, but instead they affect how intense are the visitation to the plants.

It is known that ants are not homogeneously distributed in space. In some systems it has been proposed that the existence of dominance relationships between ant species may generate patterns of aggregation in space, forming what is called “ant mosaics” (Leston 1973; Ribas & Schoereder 2004). Thus, competition (or competitive exclusion) has been pointed out as the determinant factor for the patterns of spatial distribution (Ribas & Schoereder 2004, Blüthgen & Stork 2007). For this reason, we would expect that dominant ants would be repelling subdominant ants (or weak competitors) from plants with abundant resources, creating patterns of aggregation of species and preference of dominant ant groups for resource-rich plants. However, some authors affirm that resource distribution should be even more important (Ribas & Schoereder 2002; Blüthgen & Stork 2007), and that mosaic patterns have not been found among ants in Cerrado (Ribas & Schoereder 2004). Moreover, some studies have shown that richness of the community of Cerrado ants may be affected by the diversity, density (Ribas *et al.* 2003), or size (Powell *et al.* 2011) of Cerrado plants but not by other characteristics of the vegetation such as architecture, bark thickness or EFN presence (Schoereder *et al.* 2010). While studying the arboreal ant fauna

of the Cerrado reserve at Paraopeba (Minas Gerais State), Schoereder *et al.* (2010) found that neither ant richness nor composition of ant assemblages were affected by the presence of EFNs on plants. They suggest that ant-plant interactions are highly facultative and that the seasonality of extrafloral nectar production may be responsible for the lack of specialized interaction between plants and ants. Our results corroborate their findings by indicating that most ant species are indeed visiting plants irrespective of the presence of liquid resources. Contrary to what has been found in other habitats (Blüthgen & Fiedler 2004a), our evidence may suggest that neither interactions of dominance nor competition for resources between ant species nor the distribution of liquid resource would have a strong influence on the distribution and structure of ant community on Cerrado foliage.

However, the lack of differentiation in the composition of ant assemblages according to the presence of liquid resources may be due to various factors. There is some evidence that Cerrado ants may be segregated along the day rather than between plants (Oliveira & Brandão 1991; Oliveira *et al.* 1995; Del-Claro & Oliveira 1999). In this sense, ant distribution on Cerrado plants could be affected by competitive exclusion (which may cause ants to segregate in space) than by niche differentiation (ants are able to share plants but may use them in different ways). Furthermore, not only the presence of resources may be important but also their abundance on specific plants, their nutritional quality (Sanders *et al.* 2007), or even their spatiotemporal stability (Blüthgen & Fiedler 2004a; Blüthgen & Stork 2007). The availability of nesting sites may also determine that the presence of some ant species on certain plants, independent of the presence of food resources. For instance, many Cerrado ants nest in hollowed out plant cavities left by boring beetles or gall makers (Araujo *et al.* 1995). Even considering that we did not include in our sampling plants housing ant colonies, the presence of ant foragers on one plant can be also affected by the

presence of ant nests on neighboring plants. Moreover, the connectivity among plants or their spatial distribution relative to ant nests can be relevant to understand ant visitation (Powell *et al.* 2011). A given plant can be highly visited by ants if it functions as a bridge between a plant housing an ant colony and/or a plant offering food resources (see Schemske 1982). Therefore, competitive exclusion of ants may be detected only between individual plants in a very small spatial scale, where certain ants may monopolize specific important plants, either because their value as nest site or because there are especially rich on resource. More studies on nest distribution and plant use by ants on small spatial scales are needed before we can properly understand patterns of ant foraging on Cerrado foliage.

Available studies on ant-plant networks focus only on systems where ants are directly using EFNs, or systems of specialized myrmecophytes (plants adapted to house ant colonies) (Fonseca & Ganade 1996; Guimaraes *et al.* 2006; Blüthgen *et al.* 2007; Guimaraes *et al.* 2007; Díaz-Castelazo *et al.* 2010). Here, we studied how ants interact with plants offering liquid rewards, when compared with a contrasting system of plants lacking food resources. We were expecting increased levels of specialization on the systems with ant attractants, because some ant species may be drawn to monopolize resource rich plants. However, the low levels of specialization found in all networks of our study match those observed for ant-plant interaction systems mediated by EFNs, as well as other highly facultative systems (Blüthgen *et al.* 2007). This pattern may be explained by the highly opportunistic feeding behavior of most ants, and also by the low structural plasticity of nectar sources (Blüthgen & Fiedler 2004a; Blüthgen *et al.* 2007).

This framework would lead us to think that ants are mostly generalists and that the patterns of foraging and plant visitation by ant assemblages are not dependent on the presence of liquid rewards. However, our results also suggest that there is spatial variation

on network structure indicating that ant-plant interactions can be affected by local conditions. At least for two of the studied localities (Itirapina and Uberlândia), there is evidence of lower nestedness and lack of aggregation of ant species with respect to the plants they are visiting. In Itirapina and Uberlândia, species-level specialization (d') was also higher for plants with attractants. In these two localities, ants are less frequently co-occurring on plants, and plants are being visited by some ants in proportion a little higher than expected by the relative abundances of plant groups (with and without ant attractants). These differences suggest some conditional effect of attractants on the structure of ant-plant interactions. It is possible that the relative importance of liquid sources (or their attractiveness to ant assemblages) is not the same for all localities, such that general ant response to plant-derived liquid resources may present inter-habitat variation.

Indeed, in Itirapina and Uberlândia, ants (especially in the genus *Camponotus*) presented higher levels of visitation (number of workers) to plants with attractants. This genus includes the most common species visiting plants with EFNs (Oliveira *et al.* 1987; Oliveira & Brandão 1991; Oliveira & Freitas 2004; Sendoya *et al.* 2009), presenting high levels of specialization to use arboreal habitats and to feed on plant and insect exudates (Davidson 1997). It is still an issue to determine which are the actual factors driving this conditional effect of attractants on ant visitation in Cerrado, but we suggest that local ant abundance (or richness) as well as local abundance and quality of liquid food sources may be good candidates. This may explain why *Camponotus* species presented high visitation to plants with attractants at Cerrado sites of lower ant richness and abundance (see chapter 1).

We still do not know how much dependency the different ant species have on liquid resources, nor the actual trophic position of them in Cerrado vegetation. Nectar (or other liquid sources of food) should be important for fueling the ant community in the long term,

even if not for a particular species (Oliveira *et al.* 1999; Diaz-Castelazo *et al.* 2004). There are conflicting reports regarding the actual advantages of nectar to arboreal ants. In some cases EFNs may not produce clear advantages for ant survival (Lach *et al.* 2009), but for *Cephalotes pusillus* colonies, a diet including extrafloral nectar may present clear benefits on fitness (Byk & Del-Claro 2011). It is possible that not all ants benefit equally from using liquid food, which may explain why some ant groups in our study responded less to liquid sources than others.

Although some specificity in ant-diaspores interactions has been shown (Christianini *et al.* 2012), evidence suggests that most interactions between plants and visiting ants are highly facultative, presenting clear patterns of temporal and spatial variation on different scales (see examples in Rico-Gray & Oliveira 2007). Some of the factors involved in this variation are the richness of interacting plants and habitat heterogeneity (Rico-Gray *et al.* 1998). Consequently, the protection that ants may provide to its host plants varies among habitats (Cogni *et al.* 2003), or depend on the characteristics of ant assemblages and efficiency of specific visiting ants as bodyguards (Ness 2003; Mody & Linsenmair 2004; Sendoya *et al.* 2009). Our results indicate that two ant genera, *Camponotus* and *Pseudomyrmex*, are responsible for the existence of spatial variation of ant visitation intensity to plants with liquid resources, and suggest that this might affect their potential anti-herbivore effect at different localities. Ant abundance on one plant may affect the presence of lepidopteran larvae on it, but this effect varies among localities and is affected by the presence of ant attractants (see chapter 1). In the localities where we found an effect of ant attractants on the presence of larvae (Itirapina and Uberlândia - see chapter 1), we also found that visitation by *Camponotus* and *Pseudomyrmex* ants varied among plants with and without attractants. In addition, in the same localities (Itirapina and

Uberlândia) the abundance of *Camponotus* and *Pseudomyrmex* was lower on plants with larvae compared to other potential neighboring host plants. Indeed, some of the species of *Camponotus* have been reported as efficient bodyguards for some Cerrado plants (Oliveira & Freitas 2004), being highly aggressive towards butterfly larvae when encountering them on foliage (Sendoya *et al.* 2009). However, we have to point out that the efficiency of ants as bodyguards may also depend on the defense strategies presented by herbivores. Many Cerrado caterpillars present efficient defense mechanisms that allow them to avoid or survive ant attacks on plants highly visited by ants (Freitas & Oliveira 1992, 1996; Sendoya *et al.* 2009; see also chapter 2). It is possible that in the two localities with high ant abundance and no differentiation in the use of plant categories (Mogi Guaçu and Assis), lepidopteran larvae present efficient sets of defense against most local ants.

In summary, we have shown that even if the general structure of visiting ant assemblages is rather homogeneous among plants with different resources, there are still small differences in ant visitation and patterns of specialization that may vary across small geographic scales. Some ant groups (*Camponotus* and *Pseudomyrmex*) are responding to the availability of liquid food sources by increasing visitation intensity, although this response is dependent on local conditions. The variation of the response by these ant groups may determine a conditional outcome of the benefit of ant-plant interactions to plants, since herbivores are using plants less visited by ants (see Bronstein 1994, 1998; Rico-Gray & Oliveira 2007). There are potential implications of this pattern for the evolution of ant-plant facultative mutualisms mediated by liquid rewards. The benefits for plants may be dependent on the specific composition of local ant assemblages, as well as on how ants locally depend on these liquid food resources. It is still necessary to clarify which is the actual level of dependency of ant species on plant-derived resources in Cerrado vegetation

by gathering specific data about ant resource use or trophic position (for example with more behavioral studies or by using stable isotope analyses). Also, it is necessary to study how much flexibility different ant species may have on their diet under different conditions. Indeed, the variability in the strength of ant-plant interactions, across ant groups and among Cerrado sites, should be taken into account in future studies addressing the conditions under which possession of ant-attracting sugar glands (EFNs), or even ant-trophobiont associations, can render fitness benefits to Cerrado plants.

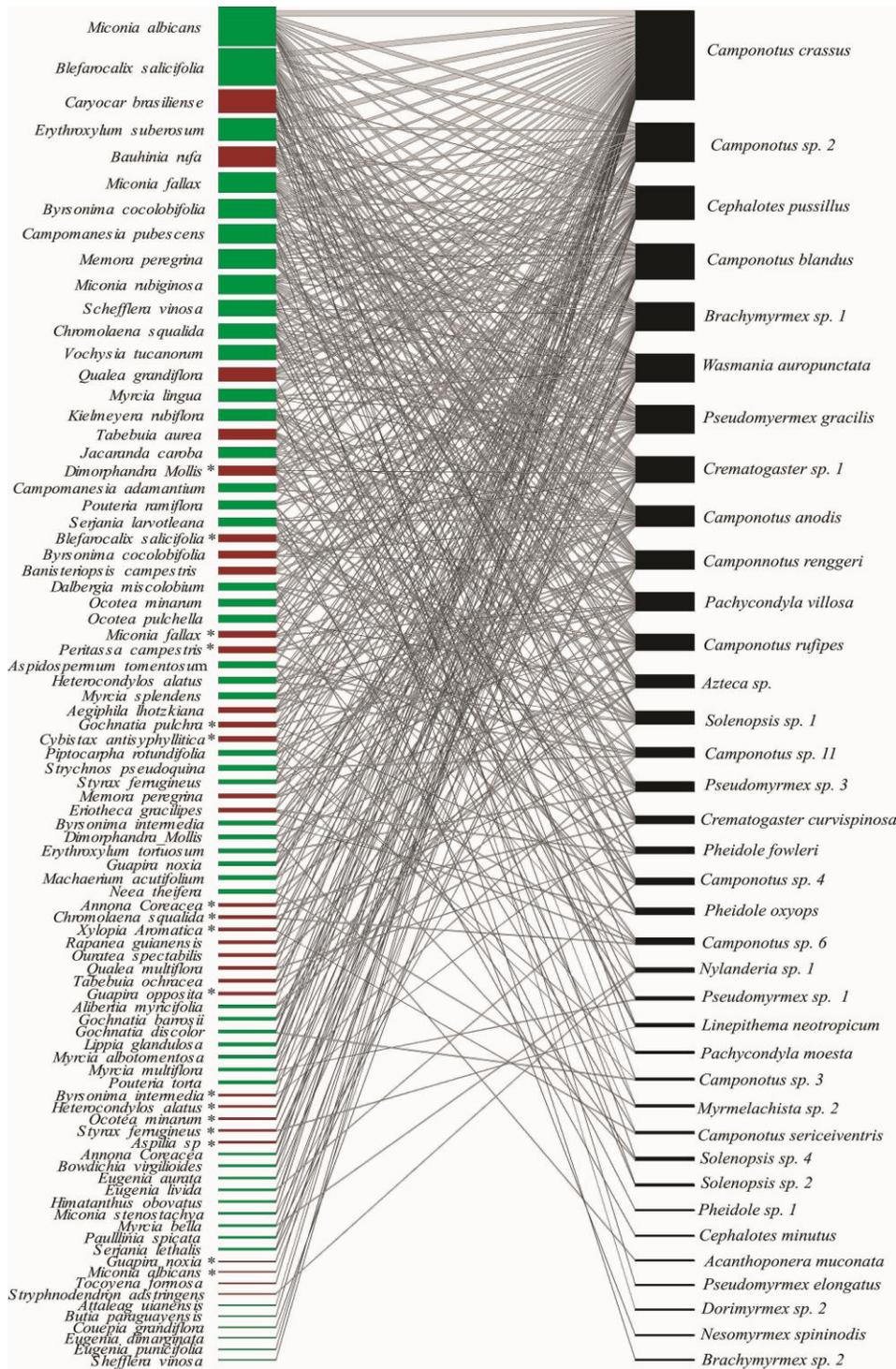
Appendix

Table A1: Results of the multiple logistic regressions between the presence of ant attractants on plants and the presence of several ant genera. This model includes all genera which were found on more than 30 plant individuals, and their interactions with sampling locality. Significant effects indicate which genera visited more frequently plants with and without attractants. The * indicates *P* values corrected for multiple comparisons using false discovery rate method (FDR).

Effect	Coefficient	Df	Waldstatistic	<i>P</i> *	Frequency on plants with attractors	Frequency on plants without attractors
Intercept	-0.98095	1	36.49836	>0.0001	290*	782*
<i>Brachymyrmex</i>	0.238	1	1.097	0.721	42 (14.48%)	102 (13.04%)
<i>Camponotus</i>	-0.090	1	0.293	0.746	194 (66.90%)	529 (67.65%)
<i>Cephalotes</i>	0.249	1	1.399	0.694	68 (23.45%)	206 (26.34%)
<i>Crematogaster</i>	-0.093	1	0.164	0.794	56 (19.3%)	157 (20.0%)
<i>Pachycondyla</i>	-0.273	1	0.444	0.746	14 (4.82%)	53 (6.77%)
<i>Paratrechina</i>	-4.361	1	0.000	0.996	20 (6.89%)	39 (4.98%)
<i>Pheidole</i>	0.115	1	0.260	0.746	47 (16.21%)	132 (16.88%)
<i>Pseudomyrmex</i>	0.317	1	3.087	0.434	70 (24.14%)	148 (18.93%)
<i>Solenopsis</i>	-0.239	1	0.551	0.746	17 (5.86%)	54 (6.90%)
<i>Wasmania</i>	0.647	1	3.663	0.408	25 (8.62%)	37 (4.73%)
Locality* <i>Pachycondyla</i>		3	0.935	0.896		
Locality* <i>Paratrechina</i>		3	1.838	0.746		
Locality* <i>Pheidole</i>		3	4.087	0.694		
Locality* <i>Pseudomyrmex</i>		3	2.139	0.746		
Locality* <i>Solenopsis</i>		3	2.786	0.746		
Locality* <i>Wasmania</i>		3	0.775	0.896		
Locality* <i>Brachymyrmex</i>		3	2.087	0.746		
Locality* <i>Camponotus</i>		3	10.418	0.169		
Locality* <i>Cephalotes</i>		3	4.593	0.694		
Locality* <i>Crematogaster</i>		3	3.084	0.746		
Locality		3	4.982	0.694		

Table A2: Results of the two factorial analyses of variance comparing the abundance (number of ants per plant) of each ant genus when present in plants with or without ant attractants, and their interaction with sampling locality. This model includes all genera which were found on more than 30 individual plants. The* symbol indicates *P* values corrected for multiple comparisons using false discovery rate method (FDR).

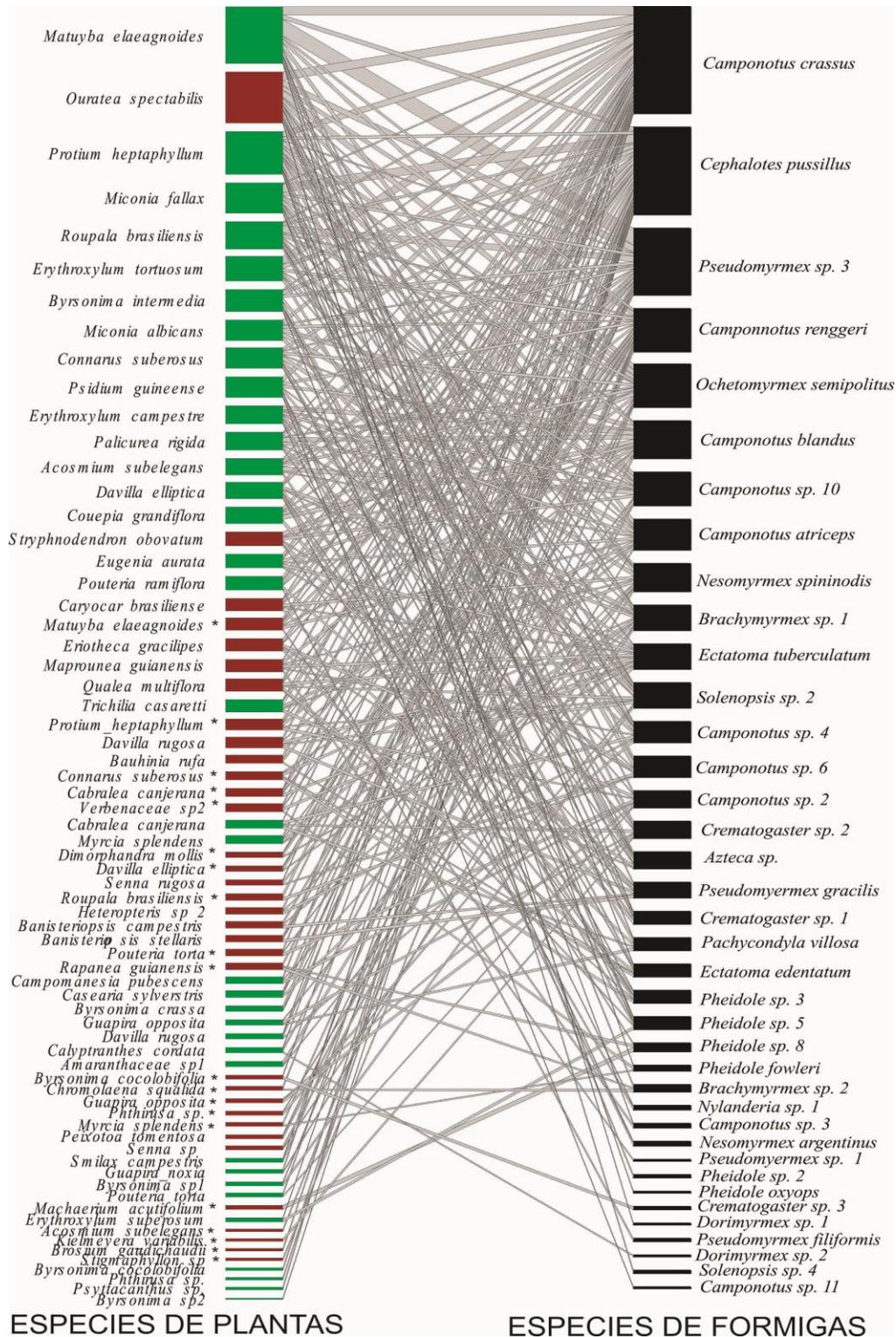
Genera	Effect	df	F value	<i>P</i>	Mean abundance in plants without attractots (±SD)	Mean abundance in plants with attractots (±SD)
<i>Brachymyrmex</i>	Intercept	1	49.270	>0.001		
	Locality	3	1.617	0.443	4.098	3.690
	Atractors	1	0.259	0.815	(± 5.662)	(± 4.640)
	Locality*Atractors	3	0.953	0.752		
	Error	136				
<i>Camponotus</i>	Intercept	1	336.8	>0.001		
	Locality	3	4.311	0.013*	5.416	7.784
	Atractors	1	14.97	0.001*	(± 6.438)	(± 11.73)
	Locality*Atractors	3	3.526	0.037*		
	Error	715				
<i>Cephalotes</i>	Intercept	1	54.88	>0.001		
	Locality	3	4.428	0.013*	6.961	7.500
	Atractors	1	0.340	0.800	(± 9.257)	(± 10.03)
	Locality*Atractors	3	0.507	0.828		
	Error	266				
<i>Crematogaster</i>	Intercept	1	31.63	>0.001		
	Locality	3	0.446	0.843	24.045	24.071
	Atractors	1	0.173	0.828	(± 40.77)	(± 37.78)
	Locality*Atractors	3	0.926	0.752		
	Error	205				
<i>Pachycondyla</i>	Intercept	1	224.7	>0.001		
	Locality	2	0.732	0.760	1.132	1.071
	Atractors	1	0.095	0.843	(± 0.394)	(± 0.267)
	Locality*Atractors	2	0.046	0.954		
	Error	56				
<i>Paratrechina</i>	Intercept	1	9.241	0.012		
	Locality	2	0.545	0.805	2.846	7.700
	Atractors	1	0.647	0.752	(± 3.808)	(± 10.48)
	Locality*Atractors	2	0.809	0.752		
	Error	51				
<i>Pheidole</i>	Intercept	1	26.354	>0.001		
	Locality	3	0.500	0.828	17.909	22.319
	Atractors	1	0.469	0.760	(± 41.02)	(± 44.81)
	Locality*Atractors	3	0.885	0.752		
	Error	171				
<i>Pseudomyrmex</i>	Intercept	1	74.919	0.000		
	Locality	3	7.208	0.001*	1.534	2.543
	Atractors	1	8.973	0.011*	(± 1.513)	(± 5.994)
	Locality*Atractors	3	5.448	0.005*		
	Error	210				
<i>Solenopsis</i>	Intercept	1	8.940	0.012		
	Locality	3	0.416	0.843	15.241	15.765
	Atractors	1	0.029	0.935	(± 31.03)	(± 34.71)
	Locality*Atractors	3	1.126	0.727		
	Error	63				
<i>Wasmania</i>	Intercept	1	1.192	0.622		
	Locality	3	0.765	0.769	27.378	35.920
	Atractors	1	0.008	0.953	(± 86.81)	(± 114.6)
	Locality*Atractors	3	0.173	0.953		
	Error	54				



ESPECIES DE PLANTAS

ESPECIES DE FORMIGAS

Fig. A1: Bipartite network of interaction between plants and visiting ants in the locality of ITIRAPINA. Boxes represent the species of either plants or ants. Gray lines joining boxes represent an ant species visiting a plant. The width of grey lines is proportional to the number of registered interactions between the species. Height of boxes represents the number of interaction registered for that species. Plants with ant attractors are indicated by red boxes and plants without ant attractors with green boxes. * indicates plants without EFNs (or with inactive EFNs) that presented honey dew insects.



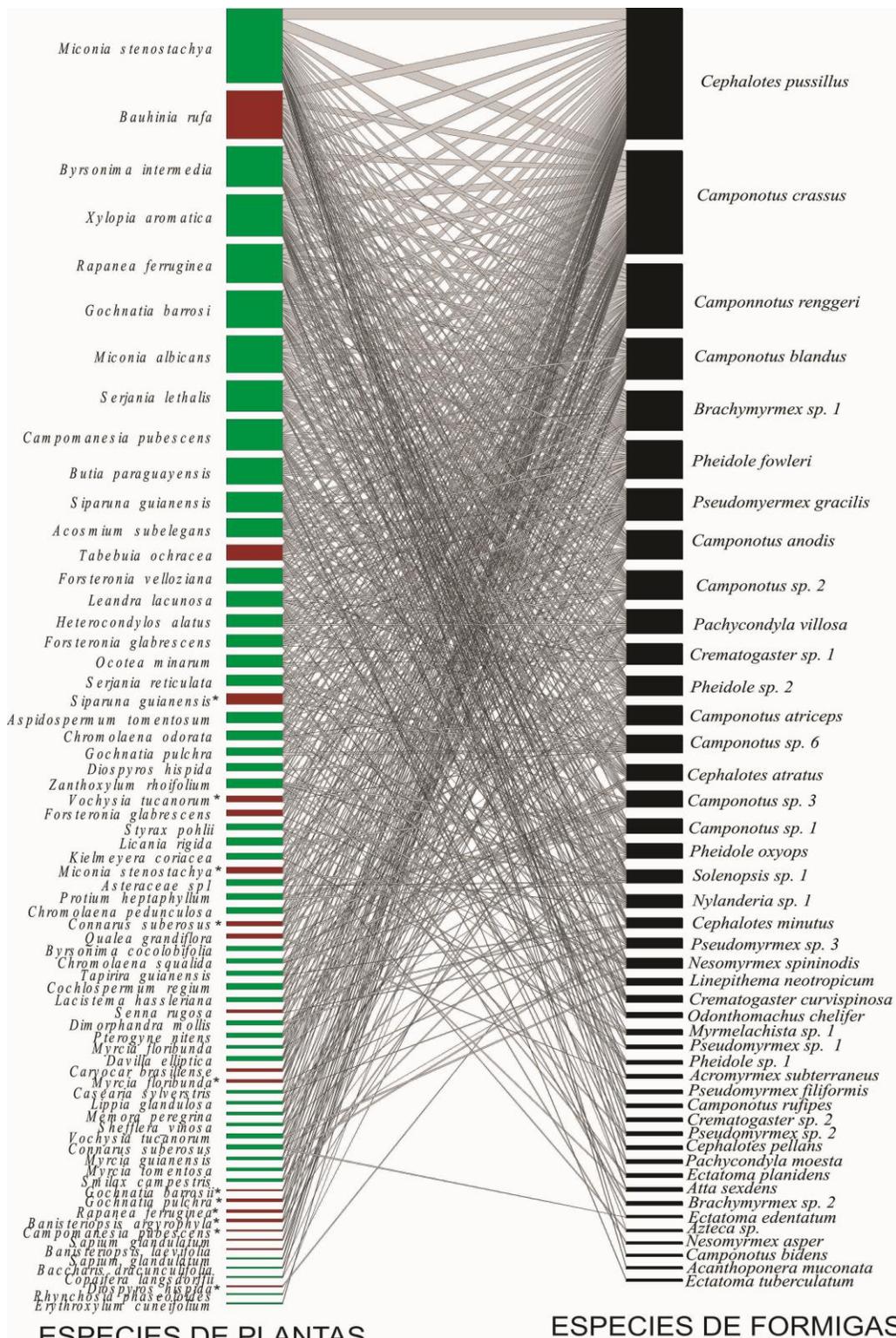


Fig. A3: Bipartite network of interaction between plants and visiting ants in the locality of MOGI GUAÇU. Boxes represent the species of either plants or ants. Gray lines joining boxes represent an ant species visiting a plant. The width of grey lines is proportional to the number of registered interactions between the species. Height of boxes represents the number of interaction registered for that species. Plants with ant attractors are indicated by red boxes and plants without ant attractors with green boxes. * indicates plants without EFNs (or with inactive EFNs) that presented honey dew insects.

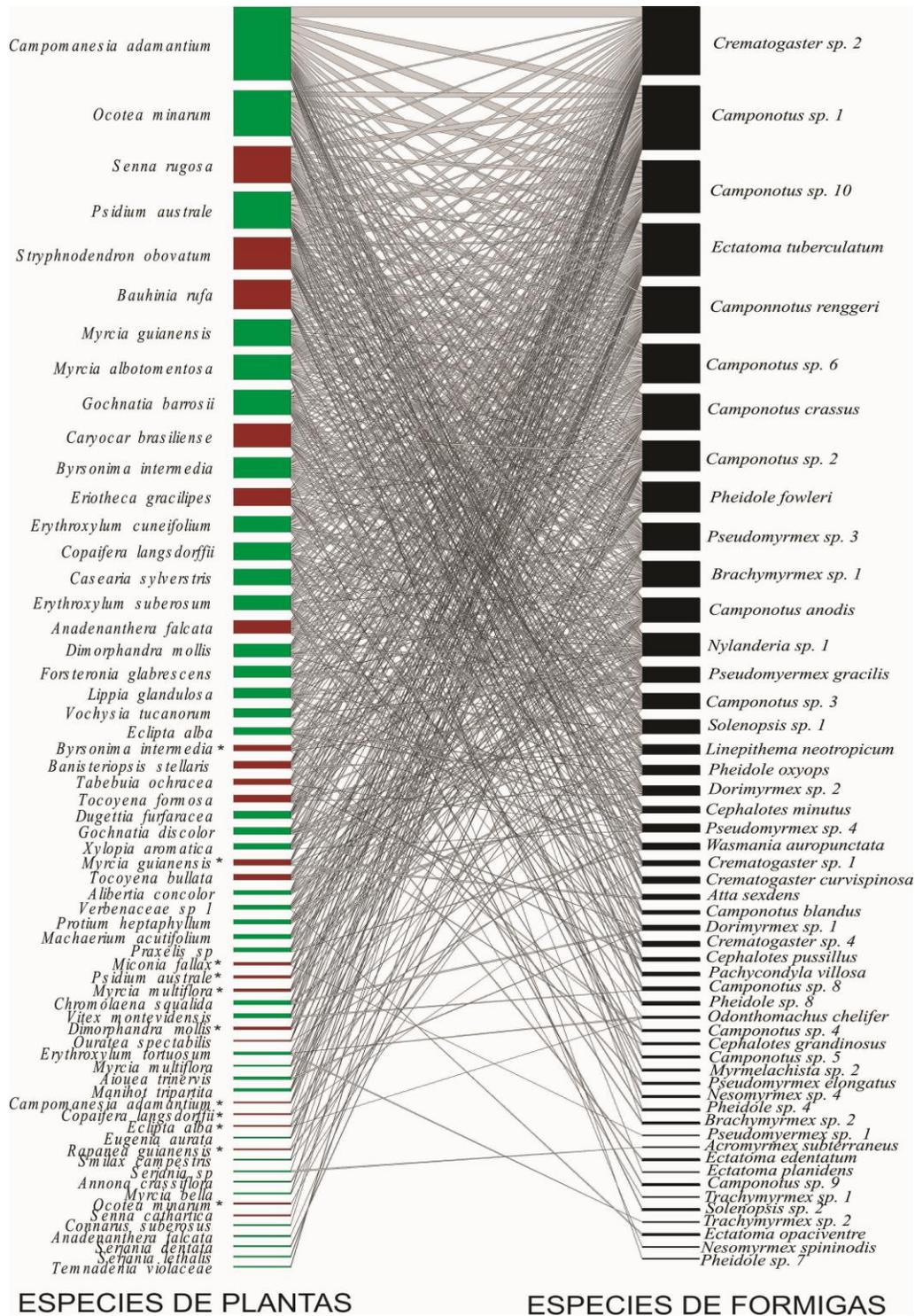


Fig. A4: Bipartite network of interaction between plants and visiting ants in the locality of ASSIS. Boxes represent the species of either plants or ants. Gray lines joining boxes represent an ant species visiting a plant. The width of grey lines is proportional to the number of registered interactions between the species. Height of boxes represents the number of interaction registered for that species. Plants with ant attractors are indicated by red boxes and plants without ant attractors with green boxes.* indicates plants without EFNs (or with inactive EFNs) that presented honey dew insects.

Cited literature

- Aguiar A.P., dos Santos B.F., Couri M.S., Rafael J.A., Costa C., Ide S., Duarte M., Grazia J., Schwertner C.F., Freitas A.V.L. & Azevedo C.O. (2009). Insecta. In: *Estado da Arte e Perspectivas para a Zoologia no Brasil*. (eds. Rocha RM & Boeger WAP). Editora UFPR Curitiba, pp. 131-155.
- Almeida-Neto M. & Ulrich W. (2011). A straightforward computational approach for measuring nestedness using quantitative matrices. *Environmental Modelling & Software*, 26, 173-178.
- Araujo L.M., Lara A.C.F. & Fernandes G.W. (1995). Utilization of *Apion* sp. (Coleoptera: Apionidae) galls by an ant community in southeast Brazil. *Tropical Zoology*, 8, 319-324.
- Benjamini Y. & Hochberg Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society B Met*, 57, 289-300.
- Bentley B.L. (1977). Extra-Floral Nectaries and Protection by Pugnacious Bodyguards. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 8, 407-427.
- Blüthgen N. & Feldhaar H. (2010). Food and shelter: How resources influence ant ecology. In: *Ant ecology* (eds. Lach L, Parr C & Abbott KL). Oxford University Press New York, pp. 115-136.
- Blüthgen N. & Fiedler K. (2004a). Competition for composition: Lessons from nectar-feeding ant communities. *Ecology*, 85, 1479-1485.
- Blüthgen N. & Fiedler K. (2004b). Preferences for sugars and amino acids and their conditionality in a diverse nectar-feeding ant community. *Journal of Animal Ecology*, 73, 155-166.
- Blüthgen N., Gebauer G. & Fiedler K. (2003). Disentangling a rainforest food web using stable isotopes: dietary diversity in a species-rich ant community. *Oecologia*, 137, 426-435.
- Blüthgen N., Menzel & Bluthgen N. (2006). Measuring specialization in species interaction networks. *BMC Ecology*, 6, 9-9.
- Blüthgen N., Menzel F., Hovestadt T., Fiala B. & Bluthgen N. (2007). Specialization, constraints, and conflicting interests in mutualistic networks. *Current Biology*, 17, 341-346.
- Blüthgen N. & Stork N.E. (2007). Ant mosaics in a tropical rainforest in Australia and elsewhere: A critical review. *Austral Ecology*, 32, 93-104.
- Blüthgen N., Verhaagh M., Goitia W., Jaffe K., Morawetz W. & Barthlott W. (2000). How plants shape the ant community in the Amazonian rainforest canopy: the key role of extrafloral nectaries and homopteran honeydew. *Oecologia*, 125, 229-240.
- Bronstein J.L. (1994). Our Current Understanding of Mutualism. *Quarterly Review of Biology*, 69, 31-51.
- Bronstein J.L. (1998). The Contribution of Ant-Plant Protection Studies to Our Understanding of Mutualism 1. *Biotropica*, 30, 150-161.
- 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, 33-38.

- Byk J. & Del-Claro K. (2011). Ant–plant interaction in the Neotropical savanna: direct beneficial effects of extrafloral nectar on ant colony fitness. *Population Ecology*, 53, 327-332.
- Chamberlain S.A. & Holland J.N. (2009). Quantitative synthesis of context dependency in ant-plant protection mutualisms. *Ecology*, 90, 2384-2392.
- Christianini A.V., Mayhe-Nunes A.J. & Oliveira P.S. (2012). Exploitation of Fallen Diaspores by Ants: Are there Ant-Plant Partner Choices? *Biotropica*, 44, 360-367.
- Cogni R., Freitas A.V.L. & Oliveira P.S. (2003). Interhabitat differences in ant activity on plant foliage: ants at extrafloral nectaries of *Hibiscus pernambucensis* in sandy and mangrove forests. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 107, 125-131.
- Davidson D.W. (1997). The role of resource imbalances in the evolutionary ecology of tropical arboreal ants. *Biological Journal of the Linnean Society*, 61, 153-181.
- Davidson D.W., Cook S.C., Snelling R.R. & Chua T.H. (2003). Explaining the abundance of ants in lowland tropical rainforest canopies. *Science*, 300, 969-972.
- Del-Claro K. & Oliveira P.S. (1999). Ant-Homoptera interactions in a neotropical savanna: The honeydew-producing treehopper, *Guayaquila xiphias* (Membracidae), and its associated ant fauna on *Didymopanax vinosum* (Araliaceae). *Biotropica*, 31, 135-144.
- Del-Claro K. & Oliveira P.S. (2000). Conditional outcomes in a neotropical treehopper-ant association: temporal and species-specific variation in ant protection and homopteran fecundity. *Oecologia*, 124, 156-165.
- DelClaro K., Berto V. & Reu 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, 887-892.
- Díaz-Castelazo C., Guimarães P.R., Jordano P., Marquis R.J., Rico-Grey V. & Thompson J.N. (2010). Changes of a mutualistic network over time: reanalysis over a 10-year period. *Ecology*, 91(3): 793-801.
- Diaz-Castelazo C., Rico-Gray V., Oliveira P.S. & Cuautle M. (2004). Extrafloral nectary-mediated ant-plant interactions in the coastal vegetation of Veracruz, Mexico: Richness, occurrence, seasonality, and ant foraging patterns. *Ecoscience*, 11, 472-481.
- Dormann C.F., Fründ J., Bluthgen N. & Gruber B. (2009). Indices, graphs and null models: analysing bipartite ecological networks. *The Open Ecology Journal*, 2, 7-24.
- Dormann C.F., Gruber B. & Fründ J. (2008). Introducing the bipartite package: analysing ecological networks. *R News*, 8, 8-11.
- Fernandes G.W., Boecklen W.J., Martins R.P. & Castro A.G. (1989). Ants associated with a Coleopterous leaf-Bud Gall on *Xylopia aromatica* (Annonaceae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 91, 81-87.
- Fonseca C.R. & Ganade G. (1996). Asymmetries, Compartments and Null Interactions in an Amazonian Ant-Plant Community. *Journal of Animal Ecology*, 65, 339-347.
- Freitas A.V.L. & Oliveira P.S. (1996). Ants as selective agents on herbivore biology: Effects on the behaviour of a non-myrmecophilous butterfly. *Journal of Animal Ecology*, 65, 205-210.
- Guimaraes P.R., Rico-Gray V., dos Reis S.F. & Thompson J.N. (2006). Asymmetries in specialization in ant-plant mutualistic networks. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 273, 2041-2047.

- Guimaraes P.R., Rico-Gray V., Oliveira P.S., Izzo T.J., dos Reis S.F. & Thompson J.N. (2007). Interaction intimacy affects structure and coevolutionary dynamics in mutualistic networks. *Current Biology*, 17, 1797-1803.
- Hammer Ø., Harper D.A.T. & Ryan P.D. (2001). Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 1, 9.
- Heads P.A. & Lawton J.H. (1985). Bracken, Ants and Extrafloral Nectaries .3. How Insect Herbivores Avoid Ant Predation. *Ecological Entomology*, 10, 29-42.
- Heil M., Fiala B., Maschwitz U. & Linsenmair K.E. (2001). On benefits of indirect defence: short- and long-term studies of antiherbivore protection via mutualistic ants. *Oecologia*, 126, 395-403.
- Heil M. & McKey D. (2003). Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 34, 425-453.
- Hölldobler B. & Wilson E.O. (1990). *The ants*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Kaminski L.A., Sendoya S.F., Freitas A.V.L. & Oliveira P.S. (2009). Ecologia comportamental na interface formiga-planta-herbívoros: interações Entre formigas e lepidópteros. *Oecologia Brasiliensis*, 13, 27-44.
- Kaspari M., Agosti D., Majer D., Alonso J.D. & Schultz T.R. (2000). A primer on ant ecology. In: *Ants: standard methods for measuring and monitoring biodiversity*. Smithsonian Institution Press Washington D.C., pp. 9-24.
- Kawano S., Azuma H., Ito M. & Suzuki K. (1999). Extrafloral nectaries and chemical signals of *Fallopia japonica* and *Fallopia sachalinensis* (Polygonaceae), and their roles as defense systems against insect herbivory. *Plant Species Biology*, 14, 167-178.
- Kersch M.F. & Fonseca C.R. (2005). Abiotic factors and the conditional outcome of an ant-plant mutualism. *Ecology*, 86, 2117-2126.
- Koptur S. (1992). Extrafloral Nectary-mediated interactions Between Insects and plants. In: *Insect-Plant Interactions* (ed. Bernays E). CRC Press Boca Raton, pp. 81-129.
- Krebs C.J. (1989). *Ecological methodology*. Harper & Row, New York.
- Lach L., Hobbs R. & Majer J. (2009). Herbivory-induced extrafloral nectar increases native and invasive ant worker survival. *Population Ecology*, 51, 237-243.
- Leston D. (1973). The Ant Mosaic - Tropical Tree Crops and the Limiting of Pests and Diseases. *Tropical Pest Management*, 19, 311-341.
- Lopes B.C. (1995). Treehoppers (Homoptera, Membracidae) in southeastern Brazil: use of host plants. *Revista Brasileira de Zoologia*, 12, 595-608.
- Machado S.R., Morellato L.P.C., Sajo M.J. & Oliveira P.S. (2008). Morphological patterns of extrafloral nectaries in woody plant species of the Brazilian Cerrado. *Plant Biology* 10(5): 660-673.
- Magurran A.E. (2004). *Measuring biological diversity*. Blackwell Pub., Malden, MA ; Oxford.
- Majer J.D. (1990). The Abundance and Diversity of Arboreal Ants in Northern Australia. *Biotropica*, 22, 191-199.
- Messina F.J. (1981). Plant-Protection as a Consequence of an Ant-Membracid Mutualism - Interactions on Goldenrod (*Solidago* sp.). *Ecology*, 62, 1433-1440.
- Mody K. & Linsenmair K.E. (2004). Plant-attracted ants affect arthropod community structure but not necessarily herbivory. *Ecological Entomology*, 29, 217-225.

- Ness J.H. (2003). Contrasting exotic *Solenopsis invicta* and native *Forelius pruinosus* ants as mutualists with *Catalpa bignonioides*, a native plant. *Ecological Entomology*, 28, 247-251.
- Ness J.H., Mooney K.A. & Lach L. (2010). Ants as mutualists. In: *Ant ecology* (eds. Lach L, Parr C & Abbott KL). Oxford University Press New York, pp. 97-114.
- Nogueira A., Guimarães E., Machado S. & Lohmann L. (2011). Do extrafloral nectaries present a defensive role against herbivores in two species of the family Bignoniaceae in a Neotropical savannas? *Plant Ecology*, 213(2): 289-301
- O'Dowd D.J. & Catchpole E.A. (1983). Ants and Extrafloral Nectaries - No Evidence for Plant-Protection in *Helichrysum* Spp Ant Interactions. *Oecologia*, 59, 191-200.
- Oliveira-Filho A.T. & Rater J.A. (2002). Vegetation Physiognomies and Woody Flora of the Cerrado Biome. In: *The Cerrados of Brazil* (eds. Oliveira PS & Marquis RJ). Columbia University Press New York, pp. 91-120.
- Oliveira P.S. (1997). The ecological function of extrafloral nectaries: Herbivore deterrence by visiting ants and reproductive output in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae). *Functional Ecology*, 11, 323-330.
- Oliveira P.S. & Brandão C.R.F. (1991). The ant community associated with extrafloral nectaries in the Brazilian Cerrados. In: *Ant - Plant interactions* (eds. Huxley CR & Cutler DF). Oxford University Press Oxford, England, pp. 198-212.
- Oliveira P.S. & DelClaro K. (2005). Multitrophic interactions in a Neotropical savanna: ant-hemipteran systems, associated insect herbivores and a host plant. In: *Biotic Interactions in the Tropics* (eds. Burslem DFRP, Pinard MA & Hartley SA). Cambridge University Press Cambridge, pp. 414-438.
- Oliveira P.S. & Freitas A.V.L. (2004). Ant-plant-herbivore interactions in the neotropical Cerrado savanna. *Naturwissenschaften*, 91, 557-570.
- Oliveira P., Klitzke C. & Vieira E. (1995). The ant fauna associated with the extrafloral nectaries of *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae) in an area of Cerrado vegetation in Central Brazil. *Entomologist's Monthly Magazine*, 131, 77-82.
- Oliveira P.S. & Leitão-Filho H.F. (1987). Extrafloral Nectaries - Their Taxonomic Distribution and Abundance in the Woody Flora of Cerrado Vegetation in Southeast Brazil. *Biotropica*, 19, 140-148.
- Oliveira P.S. & Marquis R.J. (2002). *The Cerrados of Brazil : ecology and natural history of a neotropical savanna*. Columbia University Press, New York.
- Oliveira P.S., Rico-Gray V., az-Castelazo C. & Castillo-Guevara C. (1999). Interaction between ants, extrafloral nectaries and insect herbivores in Neotropical coastal sand dunes: herbivore deterrence by visiting ants increases fruit set in *Opuntia stricta* (Cactaceae). *Functional Ecology*, 13, 623-631.
- Oliveira P.S. & Leitão-Filho H.F. (1987). Extrafloral Nectaries - Their Taxonomic Distribution and Abundance in the Woody Flora of Cerrado Vegetation in Southeast Brazil. *Biotropica*, 19, 140-148.
- Pierce N.E., Braby M.F., Heath A., Lohman D.J., Mathew J., Rand D.B. & Travassos M.A. (2002). The ecology and evolution of ant association in the Lycaenidae (Lepidoptera). *Annual Review of Entomology*, 47, 733-771.
- Powell S., Costa A.N., Lopes C.T. & Vasconcelos H.L. (2011). Canopy connectivity and the availability of diverse nesting resources affect species coexistence in arboreal ants. *Journal of Animal Ecology*, 80, 352-360.

- R development Core Team (2011). R: A Language and Environment for Statistical Computing. In: (ed. Team RDC). R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria.
- Ribas C.R. & Schoereder J.H. (2002). Are all ant mosaics caused by competition? *Oecologia*, 131, 606-611.
- Ribas C.R. & Schoereder J.H. (2004). Determining factors of arboreal ant mosaics in Cerrado vegetation (Hymenoptera : Formicidae). *Sociobiology*, 44, 49-68.
- Ribas C.R., Schoereder J.H., Pic M. & Soares S.M. (2003). Tree heterogeneity, resource availability, and larger scale processes regulating arboreal ant species richness. *Austral Ecology*, 28, 305-314.
- Rico-Gray V. & Oliveira P.S. (2007). *The ecology and evolution of ant-plant interactions*. University of Chicago Press, Chicago.
- Rico-Gray V., Palacios-Rios M., Garcia-Franco J.G. & Mackay W.P. (1998). Richness and seasonal variation of ant-plant associations mediated by plant-derived food resources in the semiarid Zapotitlan Valley, Mexico. *American Midland Naturalist*, 140, 21-26.
- Rosumek F., Silveira F., de S. Neves F., de U. Barbosa N., Diniz L., Oki Y., Pezzini F., Fernandes G. & Cornelissen T. (2009). Ants on plants: a meta-analysis of the role of ants as plant biotic defenses. *Oecologia*, 160, 537-549.
- Sanders N.J., Crutsinger G.M., Dunn R.R., Majer J.D. & Delabie J.H.C. (2007). An Ant Mosaic Revisited: Dominant Ant Species Disassemble Arboreal Ant Communities but Co-Occur Randomly. *Biotropica*, 39, 422-427.
- Schemske D.W. (1982). Ecological Correlates of A Neotropical Mutualism - Ant Assemblages at *Costus* Extrafloral Nectaries. *Ecology*, 63, 932-941.
- Schoereder J.H., Sobrinho T.G., Madureira M.S., Ribas C.R. & Oliveira P.S. (2010). The arboreal ant community visiting extrafloral nectaries in the Neotropical Cerrado savanna. *Terrestrial Arthropod Reviews*, 3, 3-27.
- Sendoya S.F., Freitas A.V.L. & Oliveira P.S. (2009). Egg-Laying Butterflies Distinguish Predaceous Ants by Sight. *American Naturalist*, 174, 134-140.
- Stadler B. & Dixon A.F.G. (2005). Ecology and evolution of aphid-ant interactions. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 36, 345-372.
- StatSoft, Inc. (2007). STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com.
- Tobin J.E., Huxley C.R. & Cutler D.F. (1991). A neotropical rainforest canopy, ant community: some ecological considerations. In: *Ant-Plant Interactions*. Oxford University Press Oxford, pp. 536-538.
- Vázquez D.P., Melián C.J., Williams N.M., Blüthgen N., Krasnov B.R. & Poulin R. (2007). Species abundance and asymmetric interaction strength in ecological networks. *Oikos*, 116, 1120-1127.
- Yanoviak S.P. & Kaspari M. (2000). Community structure and the habitat templet: ants in the tropical forest canopy and litter. *Oikos*, 89, 259-266.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados neste trabalho contribuem para uma melhor compreensão de quais são os efeitos da visitação de formigas sobre as espécies de Lepidoptera que utilizam plantas do cerrado como hospedeiras. Especificamente agora sabe-se que:

- 1) A presença de larvas de Lepidoptera em plantas do cerrado está relacionada negativamente com os níveis de visitação local das formigas.
- 2) Quanto maior o número de formigas que visitam uma determinada planta, menor a probabilidade de encontrar uma larva nesta hospedeira.
- 3) A construção de abrigos é a defesa mais eficiente das larvas contra o ataque das formigas.
- 4) O conjunto de defesas morfológicas e comportamentais apresentado por cada larva é importante para entender em que condições a visitação de formigas afeta ou não a presença de larvas.
- 5) O tamanho das larvas é uma variável importante para prever o possível ataque por formigas. Entretanto, este efeito varia com as espécies de formigas e pode estar condicionado à relação de tamanho formiga-larva.
- 6) O efeito da visitação de formigas sobre as larvas varia no espaço, enquanto em algumas localidades as formigas exercem um efeito claramente negativo, em outras não há efeito.
- 7) A presença de recursos alimentícios líquidos na planta não afeta a composição da assembleia de formigas visitantes. Entretanto, estes recursos podem afetar

localmente os padrões de especialização das interações formiga-planta e a intensidade da visitação de certos grupos de formigas.

- 8) A variação espacial do efeito das formigas nas larvas está condicionada através da resposta específica dos diferentes grupos de formigas à presença de recursos alimentícios nas plantas.

Sabe-se que as interações biológicas são muito variáveis. Numa mesma espécie a natureza e intensidade de uma interação com outra espécie pode mudar tanto ao longo do desenvolvimento do indivíduo, quanto no espaço entre as diferentes populações. Adicionalmente, entender como as interações variam espacialmente em níveis de avaliação superiores às populações pode determinar a dinâmica dos processos co-evolutivos (Thompson 2005). Por este motivo, os padrões de variação das interações entre formigas e plantas mostrados neste trabalho auxiliam na compreensão e entendimento de como tais interações surgiram e como elas se mantêm ao longo do tempo (Rico-Gray & Oliveira 2007).

Uma interação é considerada mutualística quando há resultado positivo para ambos os organismos envolvidos (Bronstein 1994). Do ponto de vista da planta este resultado envolve o balanço entre os custos (produção de néctar ou os recursos extraídos pelos insetos trofobiontes) e os benefícios (proteção contra herbivoria pela presença de formigas) para a manutenção dessa interação. Chamberlain & Holland (2009), através da avaliação de uma meta-análise bastante abrangente, mostraram que na maioria dos sistemas de interação formiga-planta estudados os efeitos das formigas são positivos ou neutros. Os resultados deste trabalho coincidem com esta ideia, mostrando também que no que se refere à presença de herbívoros, como as larvas de lepidóptero, o resultado da interação entre

formigas e plantas (medido nos possíveis benefícios para planta) não são fixos, mas variam no espaço. A combinação entre as características dos herbívoros atuando localmente sobre a planta e a identidade e níveis de visitação das formigas podem determinar em que situações o efeito seria positivo ou neutro. Para o caso específico das larvas de lepidópteros, as formigas do cerrado que parecem ter efeitos sobre o uso das plantas pertencem aos gêneros *Camponotus* e *Pseudomyrmex*. A visitação por outras formigas, como as *Cephalotes*, pode ter efeitos neutros ou inclusive negativos sobre as plantas (Byk & Del-Claro 2010), de tal forma que algumas destas formigas podem estar atuando como exploradoras do mutualismo. Entretanto, outros grupos de formigas podem ter efeitos diferentes sobre outros tipos de herbívoros, pelo qual seu papel como possíveis mutualistas não pode ser descartado.

Para entender o significado adaptativo do investimento em recursos para formigas (como NEFs) para uma espécie de planta particular outros fatores também devem ser considerados. Entre eles, fatores abióticos que podem alterar o investimento da planta em recursos para a atração das formigas (Kersch & Fonseca 2005) ou restrições filogenéticas (Nogueira *et al.* 2011) das espécies de plantas que afetem se uma planta pode ou não apresentar nectários e por tanto oferecer recursos para as formigas. Desta forma, é necessário ainda tentar compreender como os fatores supracitados afetam a resposta das comunidades locais de formigas à presença destes recursos e como os herbívoros associados às plantas respondem a elas. Isto evidencia também a necessidade de se estudar qual é a amplitude do nicho alimentar dos grupos chaves de formigas, o grau em que este nicho pode ser flexível entre diferentes ambientes e como isto pode estar definido por restrições filogenéticas.

A eficiência das defesas contra o ataque das formigas mostrada aqui indica que certos tipos de larvas podem ter maiores vantagens na utilização de plantas altamente visitadas por formigas. Entretanto, as defesas presentes nas larvas podem também estar condicionadas a efeitos combinados de vários inimigos naturais vertebrados e parasitóides (Greeney *et al.* 2012). Desta forma, é necessário estudar ainda como os efeitos combinados dos diferentes inimigos naturais podem atuar em cada contexto particular.

A construção de abrigos é uma estratégia eficiente contra formigas e amplamente utilizada por larvas do cerrado para defesa, mas é necessário entender que a alta presença desta defesa no cerrado pode ser afetada por restrições filogenéticas (Tullberg & Hunter 1996). Os resultados desta tese também sugerem que certos tipos de abrigos podem ser mais afetados pela presença de formigas do que outros. Para entender melhor o porquê desta diferença, é importante estudar a vulnerabilidade das larvas de cada grupo às formigas durante as diferentes etapas de crescimento da larva e construção do abrigo.

Os resultados deste trabalho aliado a estudos pregressos (Freitas & Oliveira 1996; Sendoya *et al.* 2009) sugerem que a presença das formigas pode estar alterando os padrões de uso de plantas hospedeiras pelos lepidópteros do cerrado. Considerando que os efeitos de predadores generalistas (formigas) podem modificar os padrões de especialização dos herbívoros (Bernays & Graham 1988), é preciso ainda avaliar detalhadamente como as formigas podem favorecer a especialização de alguns grupos e se isto pode ser afetado pelos tipos de defesa das larvas.

Referencia bibliográficas

Bernays E. & Graham M. (1988). On the Evolution of Host Specificity in Phytophagous Arthropods. *Ecology*, 69, 886-892.

- Bronstein J.L. (1994). Our Current Understanding of Mutualism. *Quarterly Review of Biology*, 69, 31-51.
- 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, 33-38.
- Chamberlain S.A. & Holland J.N. (2009). Quantitative synthesis of context dependency in ant-plant protection mutualisms. *Ecology*, 90, 2384-2392.
- Freitas A.V.L. & Oliveira P.S. (1996). Ants as selective agents on herbivore biology: Effects on the behaviour of a non-myrmecophilous butterfly. *Journal of Animal Ecology*, 65, 205-210.
- Greeney H., Dyer L. & Smilanich A. (2012). Feeding by lepidopteran larvae is dangerous: A review of caterpillars' chemical. *Invertebrate Survival Journal*, 9.
- Kersch M.F. & Fonseca C.R. (2005). Abiotic factors and the conditional outcome of an ant-plant mutualism. *Ecology*, 86, 2117-2126.
- Nogueira A., Guimarães E., Machado S. & Lohmann L. (2011). Do extrafloral nectaries present a defensive role against herbivores in two species of the family Bignoniaceae in a Neotropical savannas? *Plant Ecol*, 1-13.
- Rico-Gray V. & Oliveira P.S. (2007). *The ecology and evolution of ant-plant interactions*. University of Chicago Press, Chicago.
- Sendoya S.F., Freitas A.V.L. & Oliveira P.S. (2009). Egg-Laying Butterflies Distinguish Predaceous Ants by Sight. *American Naturalist*, 174, 134-140.
- Thompson J.N. (2005). *The geographic mosaic of coevolution*. University of Chicago Press, Chicago.
- Tullberg B.S. & Hunter A.F. (1996). Evolution of larval gregariousness in relation to repellent defences and warning coloration in tree-feeding Macrolepidoptera: A phylogenetic analysis based on independent contrasts. *Biological Journal of the Linnean Society*, 57, 253-276.