

Mayra Cadorin Vidal

A predação de formigas por *Rhinoleucophenga* sp. nov. (Diptera, Drosophilidae) e seus efeitos no mutualismo entre formigas e *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae)

CAMPINAS

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

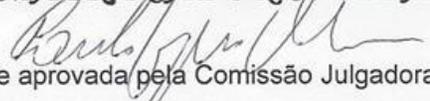
INSTITUTO DE BIOLOGIA

MAYRA CADORIN VIDAL

**A predação de formigas por *Rhinoleucophenga* sp. nov. (Diptera, Drosophilidae)
e seus efeitos no mutualismo entre formigas e *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae)**

Este exemplar corresponde à redação final
da Dissertação defendida pela candidata

MAYRA CADORIN VIDAL


e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biologia da UNICAMP para
obtenção do Título de Mestra em
Ecologia

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

Coorientador: Dr. Sebastian Felipe Sendoya Echeverry

CAMPINAS

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

V667p Vidal, Mayra Cadorin, 1989-
A predação de formigas por *Rhinoleucophenga* sp. nov (Diptera, Drosophilidae) e seus efeitos no mutualismo entre formigas e *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae) / Mayra Cadorin Vidal. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Paulo Sergio Moreira Carvalho de Oliveira.
Coorientador: Sebastian Felipe Sendoya Echeverry.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Mutualismo (Biologia). 2. Interação formiga-planta. 3. Cerrados. 4. Interações multitróficas (Ecologia). 5. Predação (Biologia). I. Oliveira, Paulo Sergio Moreira Carvalho de, 1957-. II. Sendoya Echeverry, Sebastian Felipe, 1980-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Ant predation bu *Rhinoleucophenga* sp. nov (Diptera, Drosophilidae) and its effect on the mutualism between ants and *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae)

Palavras-chave em inglês:

Mutualism (Biology)

Ant-plant interaction

Cerrados

Multitrophic interactions (Ecology)

Predation (Biology)

Área de concentração: Ecologia

Titulação: Mestra em Ecologia

Banca examinadora:

Paulo Sergio Moreira Carvalho De Oliveira [Orientador]

Thiago Gonçalves Souza

Anselmo Nogueira

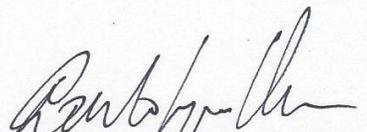
Data de defesa: 14-06-2013

Programa de Pós-Graduação: Ecologia

Campinas, 14 de junho de 2013

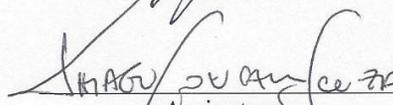
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Sergio Moreira Carvalho de Oliveira
(orientador)



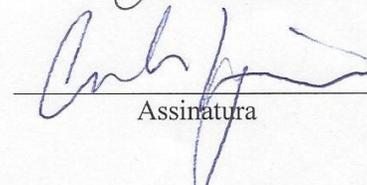
Assinatura

Dr. Thiago Gonçalves Souza



Assinatura

Dr. Anselmo Nogueira



Assinatura

Prof. Dr. Alexander Vicente Christianini

Assinatura

Prof. Dr. João Vasconcellos Neto

Assinatura

Dedico esse trabalho a minha família, que sempre esteve presente e me apoiou em toda jornada e o qual representa muito do que sou hoje. Em especial a minha avó que deixou saudades.

“Não há fatos eternos como não há verdades absolutas.”

Nietzsche

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma participaram e me ajudaram ao longo dessa jornada. Primeiramente a minha família, que sempre apoiou meu trabalho, se interessou e me acompanhou em campo algumas vezes para não me deixar ir sozinha. Agradeço ao meu pai especialmente, pelo esforço físico e intelectual ao me ajudar. Peço também desculpas a minha mãe pela constante preocupação.

Agradeço aos professores e pesquisadores que me ajudaram a fazer esse trabalho, ajuda que foi com certeza essencial: Dr. Patricia Thyssen (IB-UFPEl) pela ajuda com as larvas desde o início; Dr. Lucas Kaminski, pela várias dicas e pela ajuda na MEV; Dr. Carlos Vilela (IB-USP) pela ajuda com a identificação e descrição da mosca, e por sempre me receber tão bem; Dr. Massuo Kato e Dr. Lydia Yamaguchi (IQ-USP) pela ajuda com as análises químicas; Renato Capellari (FFCLRP-USP) e Dr. Arício Xavier por me ajudar também nesse processo de identificação da mosca; Dr. Rafael Oliveira pelas ideias e ajuda com os isótopos; Dr. Martin Pareja pelas sugestões estatísticas; e Dr. Gustavo Romero por sempre estar disposto a me ajudar, apesar dos desencontros. Agradeço também a todos os professores que participaram da minha educação acadêmica, apesar de não estarem diretamente ligados a minha dissertação, colaboraram enormemente no meu aprendizado e formação.

Agradeço aos meus orientadores Paulo S. Oliveira e Sebastian Sendoya que aceitaram me orientar com a maior boa vontade desde 2009. Agradeço ao Paulo por sempre estar disponível, falar o que eu precisava ouvir para crescer, me ajudar inúmeras vezes com meu projeto e minha carreira e ser um ótimo orientador, que será sempre um exemplo a seguir. Fico muito contente de ter tido todo seu apoio e confiança ao longo desses anos, além de contar com todo seu conhecimento científico na realização de meu projeto. Agradeço muito ao Sebastian por ter sempre paciência comigo, desde o

início, me ensinar quantas vezes fosse preciso, me acompanhar em campo, discutir filosofia, política, religião e ciência, pela companhia sempre muito agradável no laboratório e pela amizade que construímos ao longo de todos esses anos.

Agradeço aos membros da pré-banca, Dr. Anselmo Nogueira (IB-USP), Dr. Alexander Christianini (ICB-UFSCar) Dr. Rodrigo Cogni (University of Cambridge-UK), por corrigirem prontamente minha dissertação, pelas correções e sugestões muito frutíferas e bem vindas nesse processo. Aproveito para agradecer antecipadamente os membros da banca por aceitarem meu convite e pelas futuras sugestões.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Ecologia e Comportamento de Formigas (UNICAMP) que me proporcionaram alegria no meio dessa tensão diária. Vocês com certeza fizeram meu trabalho (e minha vida) muito mais gostoso ao longo desses anos. Aprendi que acordar todo dia para trabalhar num ambiente agradável é uma das melhores coisas que se pode conquistar, ainda mais considerando que nosso trabalho toma a maior parte de nosso tempo. Agradeço também os amigos da pós que proporcionaram descontrações e divertimentos no tempo livre e também companhia sempre muito agradável nos bandejões da vida. Também aos amigos do curso de campo de Picinguaba e de Itirapina, pela companhia muito agradável e divertida durante os meses de curso.

Agradeço aos muitos ajudantes de campo que tive nesse trabalho: Adilson, André, Andrea, César, Desirée, Dez, Ivan, Luisa, Marianne, Mauro, Michel, Rafael, Reverta, meu pai. Vocês com certeza fizeram dos meus campos mais tranquilos e divertidos! Agradeço também ao Maikon pelas conversas e discussões filosóficas nessa última etapa de campo.

Agradeço a todos os amigos da graduação e da vida: Lingueta, Germanna, Xica, Ju, Dori e Doug pela companhia desde a graduação, pelos jantares e pelas risadas sempre muito boas! Dani e Bianca pela companhia na nossa república que infelizmente se desfez, mas principalmente por continuarem

presentes da maneira como foi possível. Ao Reverta, por sempre se preocupar em saber como eu estava, apesar da distância. À Camila e minha irmã, amigadas que duram desde que nasci e que sei que sempre estarão presente. Amizades de verdade não mudam com o tempo.

Agradeço principalmente ao Rafael, pela companhia constante e sempre prazerosa. Você me mostrou que amar é querer estar presente nos momentos bons e ruins, buscando a felicidade mútua. Com você a vida é muito mais bela.

Por fim, agradeço ao Instituto Florestal de Itirapina e à Dona Isabel pelas estadias, COTEC e IBAMA por autorizarem minha pesquisa. Agradeço ao financiamento concedido pela FAPESP de bolsa de mestrado (2010/13619-0) e auxílio regular à pesquisa (2011/18580-8). À UNICAMP e ao seu curso de Pós-Graduação em Ecologia, bem como todos os professores e funcionários do Instituto de Biologia e Departamento de Biologia Animal. Agradeço especialmente aos professores que de alguma forma participaram de minha formação ao longo de minha vida. Espero que algum dia professores de todo o Brasil sejam mais valorizados pelo trabalho de formação intelectual e de caráter essencial que exercem.

ÍNDICE

Resumo	01
Abstract	02
Introdução geral.....	03
CAPÍTULO 1: A predação de formigas por <i>Rhinoleucophenga</i> sp. nov. (Diptera, Drosophilidae) em <i>Qualea grandiflora</i> (Vochysiaceae), uma planta com nectários extraflorais	16
Resumo	17
Abstract	18
Introdução	19
Métodos	22
Resultados	26
Discussão	30
Referências	36
Tabelas e Figuras	40
CAPÍTULO 2: A exploração do mutualismo entre formiga e <i>Qualea grandiflora</i> (Vochysiaceae) por <i>Rhinoleucophenga</i> sp. nov. (Diptera Drosophilidae,)	48
Resumo	49
Abstract	50
Introdução	51
Métodos	54
Resultados	62
Discussão	64
Referências	69
Tabela e Figuras	74
Conclusões gerais	85

RESUMO

Exploradores do mutualismo – indivíduos que utilizam recursos/serviços produzidos pelos mutualistas sem recompensá-lo – podem trazer sérios danos aos mutualistas explorados, principalmente quando acaba matando um dos parceiros mutualistas. Plantas portadoras de NEFs podem manter mutualismos com formigas visitantes, que defendem a planta contra insetos herbívoros. No cerrado de Itirapina (SP), encontramos larvas de uma nova espécie de díptero do gênero *Rhinoleucophenga* (Drosophilidae) que constroem abrigos de consistência pegajosa em cima dos NEFs de *Q. grandiflora*. Assim, larvas de *Rhinoleucophenga* podem interferir no mutualismo formiga-planta, agindo potencialmente como exploradora dessa interação. O presente estudo teve como objetivos principais investigar a história natural dessas larvas, principalmente aspectos do comportamento e interação com *Qualea* e formigas, e analisar seu possível efeito sobre o mutualismo formiga-*Q. grandiflora*. Durante observações de campo comprovamos que formigas e outros insetos visitantes dos NEFs podem ficar presos ao abrigo larval e servir de alimento para o díptero. Larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. ocorrem em 85% dos indivíduos de *Q. grandiflora*, principalmente na época chuvosa ocupando preferencialmente nectários ativos, perto do ápice e na face abaxial dos ramos. No levantamento da mirmecofauna visitante de *Q. grandiflora* encontramos 27 morfoespécies de formigas, sendo as duas mais frequentes *Camponotus crassus*, e uma espécie do gênero *Brachymyrmex*, as mesmas que foram mais comumente encontradas presas aos abrigos das larvas mirmecófagas. Vimos que as larvas expõem uma substância líquida na abertura de seu abrigo, que comprovamos possuir composição química muito similar a do néctar extrafloral de *Q. grandiflora*, o que sugere que as larvas utilizam o néctar da própria planta para atrair suas presas. Na presença de larvas de *Rhinoleucophenga*, menos formigas visitam as plantas e também por menos tempo. Esse forrageamento diferenciado resultou em menor ataque de formigas a cupins vivos (herbívoros simulados). Além disso, na presença das larvas mirmecófagas houve maior abundância de herbívoros mastigadores e maior área foliar removida por herbívoros. Podemos afirmar que as larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. utilizam o recurso da planta sem beneficiá-la. Além disso, as larvas do díptero também prejudicam a planta e suas formigas mutualísticas, uma vez que alimentando-se delas, aumentam a incidência de herbívoros e a herbivoria foliar na planta. Dessa forma, as larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. estão agindo como exploradoras e do mutualismo formiga-*Qualea grandiflora* e predadoras de topo, causando efeito cascata nesse sistema.

ABSTRACT

Exploiters of mutualism – individuals that use resources/services offered by mutualists giving nothing in return – can cause serious damages to mutualists, especially when it involves the death of one of the partners. Plants bearing EFNs usually maintain mutualism with aggressive ants, which defend the plant against herbivores. In a cerrado area at Itirapina (SP), we found a new dipteran species of the genus *Rhinoleucophenga* (Drosophilidae) whose larvae construct sticky shelters on top of active EFNs of *Q. grandiflora*. Field observations revealed that ants and others insects that visit the EFNs can get trapped at the sticky larval shelters, and are consumed by the larvae. We hypothesized that *Rhinoleucophenga* larvae could be interfering with the ant-*Qualea* mutualism, and thus be acting as an exploiter of this interaction. Here, we investigate the natural history of *Rhinoleucophenga* larvae, mainly its behavior and association with ants and *Qualea*, and their possible effect on the ant-*Qualea* mutualism. Larvae of *Rhinoleucophenga* sp. nov. occur in 85% of the individuals of *Qualea grandiflora* inspected at Itirapina. *Rhinoleucophenga* larvae occur mostly during the rainy season, mainly at the apex and abaxial surface of the branches. We found 27 ant species visiting *Qualea*. The two most frequent visiting species, *Brachymyrmex* sp. 1 and *Camponotus crassus*, were most common insects trapped at larval shelters. Chemical analyses revealed that *Rhinoleucophenga* larvae use *Qualea*'s extrafloral nectar to attract insect prey to their shelters. *Qualea* branches infested by ant-preying *Rhinoleucophenga* larvae had ant visitors for less time and in lower numbers than dipteran-free branches. This negative effect on ant foraging activity resulted in decreased levels of ant aggression to live termite-baits (i.e., simulated herbivores) on leaves of dipteran-infested compared to dipteran-free branches. Controlled field experiments demonstrated that branches hosting *Rhinoleucophenga* larvae had higher numbers of chewing herbivores and higher levels of foliar herbivory than dipteran-free branches. By using *Qualea*'s EFNs as larval shelters and as attractants to ant prey, larvae of *Rhinoleucophenga* sp. nov. negatively affect both the plant and ant visitors, with cascading effects ultimately resulting in increased herbivore damage to leaves. Thus we can conclude that ant-eating *Rhinoleucophenga* larvae are acting as exploiters of the mutualism between ants and *Q. grandiflora* and also as top predator, causing cascade effect on this system.

INTRODUÇÃO GERAL

Interações interespecíficas são de extrema importância para a estruturação de comunidades, já que podem definir a ocorrência e distribuição de espécies (Thompson 2005). Essas interações podem ser tanto antagonistas (predação, competição e parasitismo) como benéficas ou neutras (mutualismo, comensalismo). Mutualismo é entendido como sendo uma interação interespecífica entre indivíduos que leva a uma melhor adaptação para ambos os parceiros, havendo benefícios que superam os custos para cada indivíduo envolvido (Bronstein *et al.* 2006, Yu 2001). Geralmente, nessa interação um parceiro oferece para o outro algum tipo de serviço que ele não conseguiria obter por si mesmo, recebendo em troca uma recompensa (Bronstein 1994 a). Essas interações são diversificadas, indo desde obrigatórias e com uma história evolutiva muito antiga, até interações pouco especializadas, em que é mais difícil medir o benefício mútuo envolvido (Bronstein 1994 a).

Numa interação mutualística há troca de recursos e/ou serviços entre os participantes ou parceiros da interação. O oferecimento deste recursos/serviços tem um custo intrínseco para um dos participantes da interação, o qual deve ser recompensado pelo outro participante. Para ter um máximo de ganho de aptidão, um parceiro busca ter apenas benefício na interação e nenhum custo, ou seja, não é oferecido serviço ou recurso para o outro parceiro (Yu 2001). Entretanto, é preciso que um parceiro “A” ofereça um mínimo para garantir que seu parceiro “B” irá também oferecer algum benefício, pois se o custo de oferecer os recursos/serviços exceder o benefício recebido pode haver uma diminuição na aptidão do parceiro mutualista “A” (Bronstein 2001, Herre *et al.* 1999, Ferriere *et al.* 2002). Ambos os parceiros dessa interação buscam oferecer o mínimo possível e ganhar o máximo possível, garantindo que seu benefício líquido (aptidão) seja maior. Dessa forma, atualmente o mutualismo é compreendido como sendo uma exploração recíproca entre indivíduos mais do que como uma pura cooperação, em que

cada participante busca o máximo do benefício com o mínimo de custo possível (Bronstein 2001, Bronstein *et al.* 2006).

Ocorre exploração de um mutualismo quando uma espécie extrai recursos normalmente trocados numa interação, sem gerar benefícios em troca (Bronstein 2001). Assim, encontramos na natureza indivíduos que conseguem obter o máximo de benefício pessoal de seu parceiro, sem entretanto oferecer uma recompensa em troca. Esses indivíduos são conhecidos como exploradores, parasitas ou enganadores do mutualismo (Bronstein 2001, Yu 2001). Segundo Bronstein (2001), o termo mais correto a ser usado para se referir a esses indivíduos é exploradores do mutualismo, pois usando o termo “enganadores” pode se atribuir implicações de intencionalidade, enquanto que o termo “parasita” pode levar a expectativa de que parasitas de interações funcionam ecológica e evolutivamente como parasitas de indivíduos. Bronstein (2001) ainda divide as estratégias de exploração em: exploração como um comportamento da espécie (todos os indivíduos daquela espécie são exploradores), como comportamento dentro de espécies mutualistas (alguns indivíduos dentro de espécies mutualistas tem comportamento de explorador), ou como comportamento alternativo de um indivíduo (um mesmo indivíduo pode agir de forma mutualista ou exploradora conforme a situação).

Espécies exploradoras são muito comuns e podem causar danos severos a espécies mutualistas, podendo levar a morte e afetar tanto mutualismos facultativos quanto obrigatórios (Letourneau 1990, Letourneau & Dyer 1998, Bronstein 2001, Yu 2001). Encontramos espécies exploradoras em muitos tipos de mutualismo: orquídeas que não produzem néctar e mimetizam outras que produzem para atrair polinizadores (Dafni 1987); peixes limpadores que atacam também o tecido saudável de seu “cliente” (Poulin & Grutter 1996); formigas que consomem os recursos produzidos por plantas ou por insetos trofobiontes sem beneficiá-los em troca (Gaume & McKey 1999, Staton *et al.* 1999); e mesmo em alguns líquens há fungos que “escravizam” algas, utilizando os recursos oferecidos pelas algas sem

recompensá-las em troca (Richardson 1999).

Apesar dos prejuízos que espécies exploradoras podem causar a mutualistas, em alguns casos a associação entre mutualistas e exploradores do mutualismo pode ser estável ao longo do tempo evolutivo (Pellmyr *et al.* 1996). Em outros casos, entretanto, a presença do explorador pode desestabilizar o mutualismo e comprometer a persistência dessa interação no tempo evolutivo (Ferriere *et al.* 2002). O efeito final do explorador sobre o mutualismo depende de diversos fatores, tais como o tipo de mutualismo, o grau de especialização da interação mutualística, a competição entre mutualistas e exploradores, dentre outros (Ferriere *et al.* 2002, Morris *et al.* 2003, Bronstein 2001, Yu 2001, e referências incluídas). Além disso, o prejuízo causado pelo explorador sobre os mutualistas é tanto maior quanto maior for o custo para a produção e reposição do recurso explorado (Bronstein 2001). Assim, para que se possa inferir o quanto uma espécie exploradora pode afetar a persistência de um mutualismo, é necessário obter informações não apenas sobre os indivíduos envolvidos na interação, mas também sobre os efeitos do explorador no resultado final do mutualismo.

A exploração de mutualismos de proteção entre formigas e plantas

Boa parte do nosso conhecimento sobre mutualismos se deve aos trabalhos feitos com associações entre formigas e acácias na América Central, nos quais foram comprovados benefícios mútuos por Janzen (1966, 1967). Neste estudo, Janzen mostrou que *Acacia cornigera* (Mimosaceae) oferece abrigo e alimento à formiga *Pseudomyrmex ferruginea* (Pseudomyrmecinae) em troca de defesa contra inimigos naturais, sendo que uma espécie não sobrevive sem a outra. Desde então sistemas formiga-planta-herbívoros tem sido usados como modelos para o estudo de interações interespecíficas (veja Beattie 1985, Bronstein 1998, Heil 2008). Muitas espécies de plantas desenvolveram diferentes tipos de recursos alimentares para oferecer a formigas, tais como néctar extrafloral e corpúsculos

alimentícios, ou até mesmo locais próprios para nidificação de formigas na planta (Hölldobler & Wilson 1990, Rico-Gray & Oliveira 2007). A presença facultativa ou constante de formigas sobre as plantas pode trazer diversos benefícios a estas, tais como acumulação de nutrientes, dispersão de sementes, polinização, proteção contra herbívoros, patógenos e plantas competidoras (Janzen 1966, Horvitz & Schemske 1984, Beattie 1985, Rico-Gray & Oliveira 2007). Podemos encontrar mutualismos formiga-planta de caráter obrigatório, em que a formiga vive exclusivamente na planta e esta não sobrevive sem a formiga mutualista, e também de caráter facultativo, em que muitas formigas visitam plantas sem ter uma relação específica com nenhuma delas (veja Beattie 1985, Rico-Gray & Oliveira 2007). Mesmo em mutualismos formiga-planta facultativos já foi demonstrado que formigas visitantes podem ser importantes agentes contra a presença de herbívoros, e que este efeito protetor pode aumentar a aptidão da planta (Bentley 1977, Koptur 1992, Oliveira *et al.* 1999, Morris *et al.* 2007, Rosumek *et al.* 2009, Trager *et al.* 2010).

Embora mutualismos de proteção formiga-planta possam ser contexto-dependente, na grande maioria das vezes a visitação de formigas reduz a herbivoria nas plantas (Chamberlain & Holland 2009). Foi demonstrado que o efeito final da interação entre formigas e plantas de algumas espécies pode variar temporal e espacialmente, e também depender de fatores abióticos e bióticos (Barton 1986, Alonso 1998, Del-Claro 2004, Kersch & Fonseca 2005). Dentre os fatores abióticos, já foi demonstrado que a incidência de luz (Kersch & Fonseca 2005) e a disponibilidade de nutrientes (Folgarait & Davidson 1995) podem influenciar no efeito da interação formiga-planta. Já como fatores bióticos, a identidade e abundância de formigas e herbívoros podem ser os fatores mais determinantes do resultado da interação (Inouye & Taylor 1979, Oliveira *et al.* 1987, Del-Claro 2004, Sendoya *et al.* 2009). Além disso, deve-se considerar que a presença e/ou abundância de herbívoros também pode determinar se haverá ou não benefícios para a planta mediados por formigas (Bronstein 1994 b).

Janzen (1975) foi um dos primeiros a demonstrar a exploração de mutualismos para sistemas formiga-planta, envolvendo a formiga *Pseudomyrmex nigropilosa* e sua interação com acácias. Estas formigas utilizam o abrigo e o alimento das acácias e não as protegem contra inimigos naturais. Além disso, as colônias inquilinas tem um crescimento rápido que permite que elas se reproduzam antes das plantas hospedeiras morrerem devido à falta de proteção (Janzen 1975). Após o trabalho pioneiro de Janzen, outros estudos mostraram que formigas utilizam recursos oferecidos por plantas sem protegê-las em troca, sendo portanto consideradas exploradoras de mutualismos (Gaume & Mckey 1999, Bronstein 2001, Yu 2001, Raine *et al.* 2004).

Além de formigas, foram encontrados também outros artrópodes que se beneficiam tanto das plantas quanto das formigas nessa interação, podendo causar danos graves a ambos os parceiros mutualísticos. Por exemplo, no mutualismo entre formigas *Pheidole* (Myrmicinae) e plantas do gênero *Piper* (Piperaceae), larvas de besouro (*Tarsobaenus*) podem se alimentar do corpúsculo alimentar oferecido pela planta bem como da prole das formigas inquilinas, resultando no aumento da herbivoria na planta (Letourneau 1990). Lagartas mirmecófilas de *Trisbe irenea* (Riodinidae, Lepidoptera) beneficiam-se da proteção por formigas atendentes e alimentam-se de folhas e do néctar extrafloral produzido pela planta hospedeira (DeVries & Baker 1989). Também é conhecido o caso de *Bagheera kiplingi* (Salticidae), uma espécie de aranha cuja sua dieta é quase totalmente baseada em corpúsculos de Belt, produzidos por acácias para alimentar suas formigas mutualísticas (Meehan *et al.* 2009).

Sistema formiga-planta-herbívoro no cerrado

Nectários extraflorais (NEFs) são glândulas de néctar que não apresentam qualquer relação com o processo de polinização, mesmo quando ocorrem próximos a partes reprodutivas da planta (Bentley 1977). Estas glândulas podem ocorrer virtualmente em todas as estruturas vegetativas e reprodutivas de

plantas, sendo amplamente distribuídas em diversas espécies de arbustos e árvores do cerrado brasileiro (Oliveira & Leitão-Filho 1987, Oliveira & Oliveira-Filho 1991). Os dados disponíveis sobre distribuição taxonômica e abundância de NEFs em cerrados são numericamente superiores aos registrados para vários ambientes de regiões temperadas, corroborando a hipótese de Bentley (1977) de que estas glândulas são especialmente comuns na flora tropical (revisões em Koptur 1992, Oliveira & Freitas 2004, Rico-Gray & Oliveira 2007).

Oliveira *et al.* (1987) iniciaram o estudo da associação mutualística de proteção entre formigas e plantas no cerrado, demonstrando que a presença de NEFs em *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae) é decisiva para atrair formigas protetoras. Estes autores demonstraram que os NEFs de *Q. grandiflora* atraem grande quantidade de formigas que são especialmente agressivas em relação à 'herbívoros simulados' experimentalmente colocados sobre as folhas das plantas (Oliveira *et al.* 1987). Como comprovação final da proteção de formigas à *Qualea grandiflora*, Costa *et al.* (1992) demonstraram que plantas sem formigas visitantes apresentam maior dano foliar.

Resultados semelhantes também foram encontrados para *Qualea multiflora*, em que plantas com formigas visitantes sofreram menos danos por herbívoros e produziram mais frutos do que plantas com formigas excluídas (Del-Claro *et al.* 1996). Recentemente, Nahas *et al.* (2012) demonstraram que formigas conjuntamente com aranhas diminuem o dano foliar por herbívoros em *Q. multiflora*, sendo que o maior efeito protetor é devido às formigas. Oliveira & Brandão (1991) também mostraram que os NEFs do pequiheiro do cerrado (*Caryocar brasiliense*, Caryocaraceae) atraem mais de 30 espécies de formigas em Itirapina (SP), reduzindo a infestação das plantas por quatro espécies de herbívoros (Oliveira 1997). Por fim, *Ouratea spectabilis* (Ochnaceae) e *Chaemecrista debilis* (Fabaceae) também são protegidas por formigas, sendo a área foliar removida por herbívoros menor na presença de formigas protetoras (Byk & Del-Claro 2006, Nascimento & Del-Claro 2010). Experimentos controlados recentes

em cerrado indicam que o intenso forrageamento de formigas sobre plantas pode ter efeitos marcantes na ecologia comportamental de insetos herbívoros neste tipo de vegetação (Oliveira *et al.* 2002, Sendoya *et al.* 2009, Kaminski *et al.* 2010).

Os resultados acima confirmam que NEFs são importantes promotores de atividade de formigas sobre plantas, permitindo a ocorrência de mutualismos facultativos cujo dano à planta é reduzido através do efeito supressor das formigas em relação aos herbívoros. No entanto, plantas portadoras de NEFs são visitadas também por formigas e outros insetos que podem não protegê-las, e nesse caso seriam considerados exploradores do mutualismo formiga-planta. Foi descrito recentemente o papel de uma formiga como exploradora do mutualismo facultativo entre formigas e plantas com NEFs: Byk & Del-Claro (2010) demonstraram que *Cephalotes pusillus*, uma formiga comumente encontrada no cerrado, não protege *Ouratea spectabilis*, se alimentando de seu néctar extrafloral e não atacando herbívoros. Sendoya *et al.* (2009) também demonstraram que as operárias inócuas de *Cephalotes pusillus* não são evitadas por borboletas que vão ovipor em *Caryocar brasiliense*, ao contrário do que ocorre quando *Camponotus crassus* e *C. rufipes* estão presentes. Formigas *Camponotus* são eficientes protetoras de plantas portadoras de nectários extraflorais no cerrado (Oliveira *et al.* 1987, Oliveira & Brandão 1991) e de hemípteros trofobiontes (Del-Claro & Oliveira 2000).

Sistema de estudo e objetivos

No cerrado de Itirapina (SP), encontramos larvas de uma espécie nova de díptero, *Rhinoleucophenga* (Drosophilidae), que se abriga nos nectários extraflorais de *Qualea grandiflora*. A presença dessas larvas bloqueia apenas parcialmente os NEFs de *Q. grandiflora* e não impede o acesso de formigas e outros insetos ao recurso. Assim, mesmo com a presença das larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov., muitos insetos continuam visitando os NEFs, em busca do líquido exposto pelas larvas na

abertura de seus abrigos. Sendo os abrigos de *Rhinoleucophenga* sp. nov. muito pegajosos, alguns insetos visitantes acabam aprisionados a eles, servindo de alimento às larvas. Dessa forma, *Rhinoleucophenga* sp. nov. explora o recurso oferecido pela planta e preda as formigas visitantes, podendo afetar o mutualismo formiga-*Qualea*.

Neste trabalho descrevemos pela primeira vez parte da biologia e história natural das larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. Apresentamos informações ecológicas sobre esta espécie de díptero, com o intuito de elucidar seus efeitos como possível explorador do mutualismo formiga-*Q. grandiflora*. Nossos objetivos são: 1) Descrever o comportamento e história natural de *Rhinoleucophenga* sp. nov. em *Q. grandiflora*; 2) Fazer o levantamento da mirmecofauna associada a *Q. grandiflora* e das presas utilizadas por *Rhinoleucophenga* sp. nov.; 3) Investigar de que modo a presença dessas larvas afeta o padrão de forrageamento de formigas na planta; 4) Investigar se o possível efeito dessas larvas sobre formigas visitantes pode afetar também os herbívoros e o nível de herbivoria na planta.

O trabalho está dividido em dois capítulos. No primeiro abordamos a história natural das larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov., bem como a mirmecofauna associada a *Qualea* e as presas utilizadas por *Rhinoleucophenga*. No segundo capítulo será abordado o efeito dessas larvas sobre o mutualismo e seu papel na interação multitrófica *Qualea*-formiga-herbívoro.

REFERÊNCIAS

- Alonso, L.E. 1998.** Spatial and temporal variation in the ant occupants of a facultative ant-plant. *Biotropica* 30 : 201-213.
- Barton, A.M. 1986.** Spatial variation in the effect of ants on an extrafloral nectary plant. *Ecology* 67: 495–504.
- Beattie, A.J. 1985.** The evolutionary ecology of ant-plant mutualism. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- Bentley, B.L. 1977.** Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards. *Annual Review on Ecology and Systematic* 8: 407-427.
- Bronstein, J.L. 1994. (a)** Our current understand of mutualism. *The Quarterly Review of Biology* 69: 31-51.
- Bronstein, J.L. 1994. (b)** Conditional outcomes in mutualism interactions. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 214-217.
- Bronstein, J.L. 1998.** The contribution of ant-plant protection to our understanding of mutualism. *Biotropica* 30: 150-161.
- Bronstein, J.L. 2001.** The exploitation of mutualisms. *Ecology Letters* 4: 277-287.
- Bronstein, J.L., Alarcón, R. & Geber, M. 2006.** The evolution of plant-insect mutualism. *New Phytologist* 172: 412-428.
- Byk, J. & Del-Claro, K. 2006.** Interações entre formigas e *Ouratea spectabilis* (Ochnaceae) na vegetação do Cerrado: variação temporal e efeito do fogo. *Revista Brasileira de Zoociências* 8: 211.
- 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.
- Costa, F.M.C.B., Oliveira-Filho, A.T & Oliveira, P.S. 1992.** The role of extrafloral nectaries in *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae) in limiting herbivory: an experiment of ant protection in cerrado vegetation. *Ecological Entomology* 17: 363-365.
- Dafni, A. 1984.** Mimicry and deception in pollination. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15: 259-278.
- Del-Claro, K., Berto, V. & Réu, W. 1996.** Effect of herbivore deterrence by ants on the fruit set of an extrafloral nectary plant, *Qualea multiflora* (Vochysiaceae). *Journal of Tropical Ecology* 12: 887-892.
- Del-Claro, K. & Oliveira, P.S. 2000.** Conditional outcomes in a neotropical treehopper-ant association: temporal and species-specific variation in ant protection and homopteran fecundity. *Oecologia* 124: 156-165.
- Del-Claro, K. 2004.** Multitrophic relationships, conditional mutualisms, and the study of interaction biodiversity in tropical savannas. *Neotropical Entomology* 33: 665-672.

- DeVries, P.J. & Baker, I. 1989.** Butterfly exploitation of an ant-plant mutualism: adding insult to herbivory. *Journal of New York Entomology Society* 97: 332-340.
- Ferriere, R., Bronstein, J.L., Rinaldi, S., Law, R. & Gauduchon, M. 2002.** Cheating and the evolutionary stability of mutualisms. *Proceedings of the Royal Society of London B* 269: 773-780.
- Folgarait, P.J. & Davidson, D.W. 1995.** Myrmecophytic *Cecropia*: antiherbivore defenses under different nutrient treatments. *Oecologia* 104: 189-206.
- Gaume, L. & McKey, D. 1999.** An ant-plant mutualism and its host-specific parasite: activity rhythms, young leaf patrolling, and effects on herbivores of two specialist plant-ants inhabiting the same myrmecophyte. *Oikos* 84: 130-144.
- Heil, M. 2008.** Indirect defense via tritrophic interactions. *New Phytologist* 178: 41-61.
- Herre, E.A., Knowlton, N., Mueller, U.G. & Rehner, R.A. 1999.** The evolution of mutualism: exploring the path between conflict and cooperation. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 49-53.
- Hölldobler, B. & Wilson, E.O. 1990.** The ants. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Mass, USA.
- Horvitz, C.C. & Schemske, D.W. 1984.** Effects of ants and an ant-tended herbivore on seed production of a neotropical herb. *Ecology* 65: 1369-1378.
- Inouye, D.W. & Taylor, O.R. 1979.** A temperate region plant-ant-seed predator system: consequences of extrafloral nectar secretion by *Helianthella quinquenervis*. *Ecology* 60: 1-7.
- Janzen, D.H. 1966.** Coevolution of mutualism between ants and *Acacia* in Central America. *Evolution* 20:249-275.
- Janzen, D.H. 1967.** Interaction of the bull's-horn acacia (*Acacia cornigera* L.) with an ant inhabitant (*Pseudomyrmex ferruginea* F. Smith) in Eastern Mexico. *University of Kansas Scientific Bulletin* 47: 315-558.
- Janzen, D.H. 1975.** *Pseudomyrmex nigropilosa*: a parasite of mutualism. *Science* 188: 936-937.
- Kaminski, L.A., Freitas, A.V.L., & Oliveira, P.S. 2010.** Interaction between mutualisms: ant-tended butterflies exploit enemy-free space provided by ant-treehopper associations. *American Naturalist* 176: 322-334.
- 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. Em: *Insect Plant Interactions*, vol.IV. Editado por Bernays, E. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Letourneau, D.K. 1990.** Code of ant-plant mutualism broken by parasite. *Science* 248: 215-217.
- Letourneau D.K. & Dyer A.L. 1998.** Density patterns of *Piper* ant-plants and associated arthropods: top-predator trophic cascades in a terrestrial system? *Biotropica* 30: 162-169.
- Meehan, C.J., Olson, E.J., Reudink, M.W., Kyser, T.K., & Curry, R.L. 2009.** Herbivory in a spider through exploitation of an ant-plant mutualism. *Current Biology* 19: 892-893.
- Morris, W.F., Bronstein, J.L. & Wilson, W.G. 2003.** Three-way coexistence in obligate mutualism-exploiter interactions: the potential role of competition. *The American Naturalist* 161: 860-875.
- Morris, W.F., Hufbauer, R.A., Agrawal, A.A., Bever, J.D., Borowicz, V.A., Gilbert, G.S., Maron, J.L., Mitchell, C.E., Parker, I.M., Power, A.G., Torchin, M.E. & Vázquez, D.P. 2007.** Direct and interactive effects of enemies and mutualists on plant performance: a meta-analysis. *Ecology* 88:1021-1029.
- Nahas, L., Gonzaga, M.O. & Del-Claro. 2012.** Emergent impacts of ant and spider interactions: herbivory reduction in a tropical savanna tree. *Biotropica* 44: 498-505.
- Nascimento, E.A. & Del-Claro, K. 2010.** Ant visitation to extrafloral nectaries decreases herbivory and increases fruit set in *Chamaecrista debilis* (Fabaceae) in a Neotropical savanna. *Flora* 205: 754-756.
- 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., Silva, A.F. & Martins, A.B. 1987.** Ant floraging in extrafloral nectaries of *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae) in cerrado vegetation: ants as potential anti-herbivore agents. *Oecologia* 74: 228-230.
- 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. & Brandão, C.R.F. 1991.** The ant community associated with extrafloral nectaries in Brazilian cerrados. Em: *Ant-Plant Interactions*. Editado por Cutler, D.F. & Huxley, C.R. Oxford University Press, Oxford.
- Oliveira, P.S. & Oliveira-Filho, A.T. 1991.** Distribution of extrafloral nectaries in the woody flora of tropical communities in western Brazil. Em: *Plant-Animal Interactions: Evolutionary Ecology in Tropical and Temperate Regions*. Editado por P.W. Price, T.M. Lewinsohn, G.W. Fernandes & W.W. Benson. John Wiley & Sons, New York.

- Oliveira, P.S., Rico-Gray, V., Díaz-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., Freitas, A.V.L. & Del-Claro, K. 2002.** Ant foraging on plant foliage: contrasting effects on the behavioral ecology of insect herbivores. Em: *The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna*. Editado por Oliveira, P.S. & Marquis R.J. Columbia University Press, NY.
- Oliveira, P.S. & Freitas A.V.L. 2004.** Ant-plant-herbivore interactions in the neotropical cerrado savanna. *Naturwissenschaften* 91: 557-570.
- Pellmyr, O., Leebens-Mack, J. & Huth, C. J. 1996.** Nonmutualistic yucca moths and their evolutionary consequences. *Nature* 380: 155–156.
- Poulin, R. & Grutter, A.S. 1996.** Cleaning symbioses: proximate and adaptive explanations. *Bioscience* 46:512-517.
- Raine, N.E., Gammans, N., Macfadyen, I.J., Scrivner, G.K. & Stone, G.N. 2004.** Guards and thieves: antagonistic interactions between two ant species coexisting on the same ant-plant. *Ecological Entomology* 29: 345-352.
- Richardson, D.H.S. 1999.** War in the world of lichens: parasitism and symbiosis as exemplified by lichens and lichenicolous fungi. *Mycological Research* 103: 641-650.
- Rico-Gray, V. & Oliveira, P.S. 2007.** *The ecology and evolution of ant-plant interactions*. The University of Chicago Press, Chicago, USA.
- Rosumek, F.B., Silveira, F.A.O., Neves, F.S., Barbosam N.P.U., Diniz, L., Oki, Y., Pezzini, F., Fernandes, G.W. & Cornelissen, T. 2009.** Ants on plants: a meta-analysis of the role of ants as plant biotic defenses. *Oecologia* 160: 537-549.
- Sendoya, S. F., A. V. L. Freitas, & P. S. Oliveira. 2009.** Egg-laying butterflies distinguish predaceous ants by sight. *American Naturalist* 174:134–140.
- Staton, M.L., Palmer, T.M., Young, T.P., Evans, A. & Turner, M.L. 1999.** Sterilization and canopy modification of a swollen thorn acacia tree by a plant-ant. *Nature* 401:578-581.
- Trager, M.D., Bhotika, S., Hostetles, J.A., Andrade, G.V., Rodriguez-Cabal, M.A., McKeon, S., Osenberg, C.W. & Bolker, B.M. 2010.** Benefits for plants in ant-plant protective mutualism: a meta-analysis. *Plos One* 5:1-9.

Thompson, J. N. 2005. The geographic mosaic of coevolution. The University of Chicago Press, Chicago, USA.

Yu, D.W. 2001. Parasites of mutualisms. *Biological Journal of the Linnean Society* 72: 529-546.

CAPÍTULO 1:

A predação de formigas por *Rhinoleucophenga* sp. nov. (Diptera, Drosophilidae) em *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae), uma planta com nectários extraflorais

Vidal, M.C.¹, Yamaguchi, L.F.², Kato, M.J.², Sendoya, S.F.¹, Oliveira, P.S.^{1*}

¹Laboratório de Ecologia e Comportamento de Formigas, Departamento de Biologia Animal, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

²Laboratório de Química de Produtos Naturais, Instituto de Química, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo-SP.

*e-mail para correspondência: ps@unicamp.br

RESUMO

Apesar do extenso conhecimento de drosofilídeos que se alimentam de fungos em frutas, principalmente devido aos estudos com *Drosophila melanogaster*, pouco se conhece sobre diferentes hábitos de outras espécies dessa família. Estudos apontam que existem espécies que são predadoras, comensalistas e até algumas parasitas. No cerrado de Itirapina (SP), encontramos uma nova espécie de *Rhinoleucophenga* cujas larvas constroem um abrigo pegajoso na abertura de nectários extraflorais (NEFs) de *Qualea grandiflora*, uma planta muito abundante no cerrado brasileiro. Entretanto, a presença desse abrigo sobre o nectário não impede o acesso de outros insetos a essa glândula, e as larvas se alimentam dos visitantes nectarívoros, especialmente formigas. Nesse trabalho buscamos conhecer mais sobre essa nova espécie de díptero, descrevendo sua história natural, comportamento e padrão de ocorrência nessas plantas. Investigamos também a mirmecofauna associada à planta e a frequência com que as formigas acabam presas ao abrigo dessas larvas. Larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. ocorrem principalmente no verão (estação chuvosa), quando NEFs estão ativos. Elas são muito abundantes, sendo encontradas em 85% das plantas e ocorrem principalmente na face abaxial e no ápice dos ramos, onde há mais nectários ativos e menor incidência solar. Por fim, vimos que essas larvas se alimentam de formigas e outros insetos que visitam os NEFs de *Q. grandiflora* e que acabam ficando presos aos abrigos das larvas. As formigas que mais comumente visitam a planta são também as presas mais consumidas (*Brachymyrmex* sp. 1 e *Camponotus crassus*) pelo díptero. Além disso, vimos que as larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. expõe o néctar extrafloral de *Qualea* na abertura de seu abrigo, possivelmente para a atração de suas presas. Sendo o NEF uma importante estrutura para defesa de plantas contra herbívoros por atrair formigas protetoras, a presença dessas larvas mirmecófagas pode estar potencialmente afetando a interação mutualística entre formigas e *Qualea grandiflora*.

ABSTRACT

Despite our broad knowledge of drosophilid flies whose larvae feed on fruit fungus, due mostly to the numerous studies on *Drosophila melanogaster*, little is known about the larval habits of the other genera in this dipteran family. Previous studies have shown that the Drosophilidae include species whose larvae are carnivorous, commensals, or parasitic. In an area of cerrado at Itirapina (SP), we found a new species of *Rhinoleucophenga* whose larvae build a sticky shelter on top of the extrafloral nectaries (EFNs) of *Qualea grandiflora*, a typical cerrado plant. Presence of larval shelters does not impede the access to the glands by nectar-feeding insects, which end up falling prey to *Rhinoleucophenga* larvae. Here we describe the natural history and behavior of *Rhinoleucophenga* sp. nov., including its infestation pattern in *Q. grandiflora*. We also assess the ant assemblage visiting *Qualea* shrubs for its EFN secretions, as well as the insects most commonly getting trapped at larval shelters.

Rhinoleucophenga larvae appear mainly in the rainy season, when EFNs are more productive; they occur on 85% of the *Qualea* plants at Itirapina and infest mostly the apex and abaxial surface of the branches. *Rhinoleucophenga* larvae feed on ants and other insects that visit the EFNs of *Qualea* and get trapped in their sticky shelters. We found 27 ant species visiting *Qualea*. The two most frequent visiting species, *Brachymyrmex* sp. 1 and *Camponotus crassus*, were most common insects trapped at larval shelters. Chemical analyses revealed that *Rhinoleucophenga* larvae use *Qualea*'s extrafloral nectar to attract insect prey to their shelters. Because EFNs are known to play an important role at attracting aggressive ants that in turn protect *Q. grandiflora* against herbivores, we hypothesize that the presence of ant-preying *Rhinoleucophenga* larvae could negatively affect the ant-*Qualea* mutualism.

INTRODUÇÃO

Larvas de dípteros ocorrem numa grande variedade de habitats e apresentam alta diversidade de comportamentos e morfologia, de acordo com as diferentes formas de vida encontradas nessa ordem (McAlpine *et al.* 1981). A família Drosophilidae (Diptera, subseção Acalyptratae) é conhecida amplamente pelo extenso uso em genética e evolução, principalmente devido à *Drosophila melanogaster*, que é provavelmente o inseto mais estudado do mundo. Drosophilidae possui cerca de 60 gêneros e 3000 espécies, sendo que a maioria (56%) pertence ao gênero *Drosophila* (Wheeler 1981). Essas moscas são popularmente conhecidas como moscas da fruta, devido ao fato das fêmeas de *Drosophila* e de alguns outros gêneros relacionados oviporem em frutas em fermentação, onde as larvas se alimentam de fungos e não da fruta em si (Wheeler 1981). Entretanto, os hábitos de outros gêneros de drosofilídeos permanecem pouco conhecidos, já que o método de coleta para esta família é principalmente através de iscas de frutas.

Ashburner (1981), em sua revisão sobre diferentes hábitos em Drosophilidae, relata a ocorrência de espécies predadoras, comensalistas, e até parasitas. Como comensalistas, são apresentadas *Lissocephala powelli*, *Drosophila carcinophila* e *D. endobranhia*, os quais são associados a caranguejos, alimentando-se de microorganismos que crescem nas brânquias e peças bucais. Duas espécies de *Cacoxenus* possuem associação com abelhas solitárias: as moscas ovipoem nas células de criação construídas pelas abelhas e se alimentam da reserva alimentar das células e possivelmente também predam as larvas das abelhas. Algumas espécies de *Acletoxenus*, *Pseudodiatata*, *Amiota*, *Gitona*, *Cacoxenus* e *Rhinoleucophenga* são prováveis predadoras de hemípteros. Espécies de *Cladochaeta* e *Leucophenga* possuem uma associação de inquilinismo com alguns hemípteros e se desenvolvem na secreção salivar dos hospedeiros (ver Thompson & Mohd-Saleh 1995). Larvas de uma espécie de *Titanochaeta* se alimentam de ovos de aranha, e *Hirtodrosophila* são predadoras de embriões

de sapos (ver Grimaldi 1994). Em *Scaptomyza* há espécies cujas larvas são minadoras e as fêmeas adultas se alimentam da seiva da planta, ao fazer buracos com seu ovipositor (Whiteman *et al.* 2012). Por fim, até mesmo algumas *Drosophila* possuem hábito diferente do usual, podendo ser predadoras de larvas de libélulas, de nematóceros ou até mesmo de girinos (ver Villa 1977). Mais recentemente, foi encontrado uma espécie de *Drosophila* que se alimenta de guano de morcegos (Tosi *et al.* 1990), e outra que se alimentam de pólen (Nicolson 1994). Em 2006 foi descrita uma nova espécie de *Colocasiomyia*, sendo praticamente o polinizador exclusivo de *Steudnera colocasiiifolia* (Araceae) (Takenaka *et al.* 2006).

O gênero *Rhinoleucophenga* (Drosophilidae)

Rhinoleucophenga é um gênero pouco estudado da subfamília Steganinae, tribo Gitonini e subtribo Acletoxenina (Grimaldi 1990). O gênero inclui 21 espécies, sendo que em 2009 duas novas espécies foram descritas no Brasil: *R. joaquina* e *R. capixabensis* (Schmitz *et al.* 2009, Culik & Ventura 2009), sendo essa última um possível predador de coccídeos de abacaxi. Um levantamento feito recentemente (Gottschalk *et al.* 2008) apontou no Brasil a ocorrência de 8 espécies adicionais às 2 espécies descritas em 2009, resultando em 10 espécies de *Rhinoleucophenga* registradas no país. Porém, pouco se conhece sobre os hábitos desse gênero, havendo apenas sugestões de que algumas espécies possuem larvas predadoras de membracídeos, tais como *R. brasiliensis*, *R. fluminensis*, *R. obesa*, *R. capixabensis*. Outras espécies vivem associadas a cactos e se alimentam de microorganismos, tais como *R. sonoita* e *R. americana* (Wheeler 1952, Ashburner 1981, Culik & Ventura 2009). Para a maioria, entretanto, existem muito poucos registros, sendo que para algumas apenas um exemplar é conhecido (C.R. Vilela, comunicação pessoal).

Neste estudo, encontramos uma espécie nova de *Rhinoleucophenga* no cerrado do sudeste brasileiro, sendo sua presença confirmada em pelo menos três localidades correspondentes aos municípios de Itirapina-SP, Mogi Guaçu-SP e Uberlândia-MG. As larvas passam todo o estágio larval dentro de abrigos pegajosos (Figura 1 d-f). Esses abrigos são construídos sobre os nectários extraflorais de *Qualea grandiflora* (Vohysiaceae), sem entretanto impedir a visita de insetos às glândulas. Os nectários extraflorais (NEFs) de *Q. grandiflora* continuam ativos mesmo após a obstrução deles pelos abrigos das larvas (Figura 1 f), sendo possível que as larvas consumam também o néctar. Os insetos que visitam NEFs, especialmente formigas, podem eventualmente acabarem presos aos abrigos pegajosos de *Rhinoleucophenga* sp. nov., servindo de alimento às larvas.

Insetos cujas larvas possuem pouca disponibilidade para alterar o local de desenvolvimento dependem de uma boa escolha de sítio de oviposição pela fêmea (por exemplo, na maioria dos lepidópteros - Silva-Brandão & Freitas 2012). Essa escolha de sítios para oviposição está intimamente relacionada com o desempenho e sobrevivência dos imaturos, dessa forma, garantir uma boa escolha pode ser essencial para a sobrevivência e fecundidade de sua prole (Thompson 1988, Awmach & Leather 2002). No caso de larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. essa escolha deve ser essencial para a sobrevivência das larvas, uma vez que após seu estabelecimento não saem do abrigo construído em cima dos NEFs e dependem da disponibilidade de formigas visitantes e de néctar extrafloral para seu desenvolvimento. Os NEFs de *Qualea grandiflora* são visitados por muitas espécies de formigas, que devido ao seu comportamento agressivo acabam protegendo a planta contra herbívoros (Oliveira *et al.* 1987, Costa *et al.* 1992). Essas plantas são constantemente visitadas por essas formigas, tanto de noite quanto de dia (Nahas & Del-Claro 2011). Além de formigas, outros artrópodes podem visitar os NEFs em busca de néctar para complementar sua dieta (Koptur 2005). Dessa forma, além de formigas, outros

insetos visitantes podem ficar presos aos abrigos das larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. e servirem de alimento a elas.

Nesse capítulo, além de descrevermos características morfológicas e da história natural de larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov., incluindo o comportamento de oviposição das fêmeas, buscamos descrever também os níveis de infestação larval em sua planta hospedeira (*Q. grandiflora*). Investigamos também a fauna de insetos capturados pelas larvas do díptero, bem como a mirmecofauna associada a *Q. grandiflora*. Finalmente, analisamos se as larvas utilizam o próprio néctar extrafloral da planta para atrair os insetos que ficam presos aos seus abrigos.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O trabalho de campo foi realizado numa área de cerrado da Fazenda Graúna, situada em Itirapina (SP), sudeste do Brasil (22° 15'S, 47° 49'W, 770 m altitude). A vegetação consiste de plantas rasteiras, arbustos e árvores, sendo considerado dentro da fisionomia cerrado *sensu stricto* (Oliveira-Filho & Ratter 2002). O clima da região é caracterizado como Cwa de Köppen (1948), ou seja, mesotérmico com inverno seco. A temperatura média anual é de 19,7°C, sendo a temperatura média do meses mais frios (Junho-Agosto) inferior a 18°C e a dos meses mais quentes (Novembro-Março) superior a 22°C (Dutra-Lutgens 2000). A precipitação média anual é de 1425 mm, porém o total de chuvas no mês mais seco não ultrapassa 30 mm (Dutra-Lutgens 2000). Há uma clara distinção de meses secos, de Maio a Setembro, e meses chuvosos de Outubro a Abril.

1. Características de *Rhinoleucophenga* sp. nov. e interação com *Qualea grandiflora*

Observações comportamentais de *Rhinoleucophenga* sp. nov.

O comportamento de oviposição de *Rhinoleucophenga* sp. nov. nos nectários extraflorais de *Q. grandiflora* foi descrito em campo de 27 de Outubro a 29 de Novembro de 2012. Para definir o horário de oviposição, as plantas foram observadas durante todo o dia e início da noite (a partir das 09 hs até 20 hs). Após observar uma fêmea ovipondo nos NEFs, esta era capturada usando uma rede entomológica. Além disso, uma armadilha Malaise foi montada próxima a indivíduos de *Q. grandiflora* de Abril de 2012 a Janeiro de 2013, no mínimo durante cinco dias por mês, totalizando 12 coletas.

Para a descrição da história natural das larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov., foram marcadas em diferentes plantas 20 larvas (uma em cada planta, totalizando também 20 plantas) em fase inicial de desenvolvimento. Cada larva foi observada por 10 minutos durante o dia. Nesse tempo foram anotadas as interações com formigas, os diferentes comportamentos das larvas, a presença de corpos presos aos abrigos, bem como o tamanho, coloração e número de aberturas dos abrigos. Essas observações foram feitas durante o dia em todas as semanas nos meses de Dezembro de 2009 a Março de 2010. As observações em campo totalizaram 30 horas, sendo nove séries de observações para cada larva.

Para a descrição da morfologia larval de *Rhinoleucophenga* sp. nov., foram coletadas larvas em diferentes fases de desenvolvimento em campo e armazenadas em etanol 70% para posteriormente serem fixadas em solução de Dietrich. A morfologia externa foi estudada usando microscópio eletrônico com câmara acoplada e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Estas observações foram feitas no Laboratório de Microscopia Eletrônica no Instituto de Biologia – Unicamp. As amostras destinadas à microscopia eletrônica de varredura foram preparadas com desidratação em ponto crítico com aparelho Bal-tec® - CPD 030, posterior montagem sobre fita dupla face em suportes metálicos, e metalização com ouro em um aparelho Bal-tec® – SCD 050. As micrografias foram efetuadas em um microscópio eletrônico de varredura JEOL® JSM-5800. Também montamos o esqueleto cefalofaríngeo de larvas de diferentes fases de desenvolvimento em lamina para observação e medição em microscópio ótico.

Infestação por *Rhinoleucophenga* sp. nov. em *Qualea grandiflora* e padrão de ocorrência nas plantas

Para analisar os níveis de infestações naturais e o padrão de ocorrência de *Rhinoleucophenga* em *Qualea grandiflora*, foram utilizadas plantas de altura entre 0,5 e 3,0 metros, divididas ao longo de oito transectos com cinco plantas em cada, totalizando 40 indivíduos. Os transectos estavam aproximadamente 50 metros distantes um do outro e as plantas usadas em cada transectos foram escolhidas de acordo com a ordem de encontro, dessa forma a distância dentro de cada transecto não foi homogênea. Para cada planta foi estimada a altura total, medido o diâmetro na altura do solo (DAS - tomado como a média de duas medições em direções opostas) e contado o número total de ramos e de larvas na planta. Em seguida, escolhemos cinco ramos aleatoriamente em cada planta onde contamos o número de nectários totais e de nectários ativos (i.e., sem fungos ou danos, e com coloração esverdeada), assim como o número de larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov.. Para cada larva encontrada nos cinco galhos selecionados, foi estimado o seu tamanho e registrado o local no ramo onde foi encontrada. Para estimar o tamanho da larva, foi feita a medição longitudinal do abrigo com paquímetro, já que ao longo de seu desenvolvimento as larvas vão aumentando o tamanho do abrigo (Figura 1 e,f; Figura 2). Para investigar o padrão de ocorrência das larvas ao longo dos ramos, comparamos o número destas entre as regiões basal, mediana e apical, bem como entre a face abaxial e adaxial dos ramos. A porcentagem de plantas com larvas de *Rhinoleucophenga* foi analisada comparativamente no inverno (Julho – Agosto) e no verão (Dezembro – Janeiro) de 2009 (n=40 plantas). Para essa análise e para comparar o número de larvas em cada região do ramo usamos teste de qui-quadrado no ambiente R versão 2.15.2 (R Core Team 2012), com a função `chisq.test`.

2. Interação entre *Rhinoleucophenga* sp. nov. e suas presas em *Qualea grandiflora*

A mirmecofauna associada a *Qualea grandiflora* e as presas consumidas por *Rhinoleucophenga* sp. nov.

Para identificar a mirmecofauna visitante das plantas de *Q. grandiflora*, foram escolhidas 30 plantas com altura de 0,5 a 2,0 m. Em cada planta foram feitas quatro amostragens das formigas, às 07:00 h, 13:00 h, 19:00 h e 01:00 h, registrando em cada horário as formigas visitantes. Cada planta foi observada durante cinco minutos para a amostragem. As amostragens foram feitas em Janeiro de 2010. As formigas coletadas foram identificadas e separadas em morfoespécies em laboratório, utilizando a chave de identificação de Fernández (2003).

Nos abrigos das larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. encontramos o exoesqueleto dos insetos aprisionados pelo díptero. A análise dos exoesqueletos possibilitou a identificação das presas. O espectro de presas consumidas por *Rhinoleucophenga* sp. nov. foi comparado a mirmecofauna associada a *Q. grandiflora* para avaliar a seletividade alimentar do díptero. Os cadáveres de presas foram coletados em abrigos larvais diferentes (n=78) e em plantas diferentes (n=40), iniciando em Novembro de 2009 até início de 2011.

Análise química do néctar extrafloral de *Q. grandiflora* e do líquido encontrado na abertura dos abrigos de *Rhinoleucophenga* sp. nov.

Durante as observações no campo, foi constatado que os NEFs continuam ativos mesmo após a ocupação por larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov.. Além disso, larvas do díptero eventualmente empurram uma substância líquida para a abertura de seus abrigos. Foi possível observar que as formigas, ao passarem pelos NEFs, tocam as aberturas dos abrigos (onde um líquido é depositado) com suas mandíbulas e antenas. Para comprovar a natureza desse líquido foram feitas análises de sua composição

química e do néctar extrafloral de *Qualea grandiflora*. O néctar extrafloral de *Q. grandiflora* foi coletado com capilares no início da manhã, para evitar que o mesmo evaporasse ou fosse consumido. As larvas foram observadas durante períodos de 20 minutos e assim que a gota era liberada na entrada do abrigo, esta era coletada com o capilar. As análises químicas foram realizadas no laboratório de Química de Produtos Naturais – IQ, USP. As substâncias foram analisadas com espectrofotômetro de massa (micrOTOF-Q II™ ESI-Qq-TOF) com injeção direta. Os parâmetros utilizados foram: voltagem capilar a 4500 Volts; gás de nebulização e secagem utilizado foi nitrogênio; fluxo do nebulizador a 0,4 bar; fluxo de gás de secagem a 4 litros por minuto; energia do quadro pólo 6 e⁻Volts; energia da célula de colisão 12 e⁻Volts; solvente usado foi água ao fluxo de 180 µl por minuto. Para a leitura da substância é preciso que esta esteja ionizada, sendo adicionado H⁺ ou Na⁺, ou retirado H⁺. A calibração foi feita com formiato de sódio. Esse aparelho mostra a massa molecular dos compostos presentes na amostra e através de sua massa molecular e padrão de fragmentação é possível inferir quais eram os compostos presentes. Se o néctar e o líquido utilizado pelas larvas possuem os mesmos compostos é possível inferir se a larva utiliza o próprio néctar da planta para atrair suas presas.

RESULTADOS

1. Características de *Rhinoleucophenga* sp. nov. e interação com *Qualea grandiflora*

Observações comportamentais de *Rhinoleucophenga* sp. nov.

Ao todo coletamos 14 exemplares de adultos de *Rhinoleucophenga* sp. nov., sendo 13 fêmeas e um macho, e conseguimos observar três oviposições. A oviposição por *Rhinoleucophenga* sp. nov. ocorreu no crepúsculo, principalmente entre final de Outubro e início de Dezembro. Os ovos foram postos próximos à abertura do nectário extrafloral de *Qualea grandiflora*, padrão também observado em *Qualea multiflora* e *Bauhinia rufa* (M.C. Vidal, observação pessoal). Durante o processo de oviposição,

as fêmeas voaram em torno dos ramos e visitam alguns NEFs, possivelmente também se alimentando de néctar, e ovipositam no nectário escolhido (Figura 1c). Outros nectários foram então visitados para oviposições adicionais. Observamos três fêmeas ovipositando (27 de Outubro de 2012, 28 e 29 de Novembro de 2012). As fêmeas ovipoem geralmente no crepúsculo, por volta das 19.00 hs. Geralmente sobrevoam alguns galhos das plantas antes de ovipor, podendo pousar e inspecionar o NEFs. A postura dos ovos dura cerca de cinco segundos. Todas as plantas em que ocorreu oviposição estavam sendo visitadas por formigas, principalmente *Camponotus crassus*, *Cephalotes pusillus*, *Pseudomyrmex gracilis* e *Crematogaster* sp. As fêmeas podem ovipor mais de uma vez na mesma planta.

Os ovos possuem coloração branca, com cerca de 1 mm (Figura 1c, d, f) e levam cerca de três dias para eclodirem. Após a eclosão, as larvas de primeiro estágio vão diretamente até a abertura do nectário extrafloral, onde começam a construir o seu abrigo (Figura 1 d). As larvas apresentam corpo cilíndrico, com a parte posterior ligeiramente truncada. O corpo das larvas apresenta 12 segmentos, sendo um cefálico, três torácicos e oito abdominais. Apresentam coloração esbranquiçada, ligeiramente amarelada e translúcida (Figura 1e). Não apresentam projeções externas no corpo. A larva de primeiro estágio tem aproximadamente 1,25 mm e apresenta o esqueleto cefalofaríngeo interiorizado (figuras 3 a, b). A larva de segundo estágio tem 2,2 mm e já apresenta o gancho bucal exteriorizado (Figura 3 c) e os espiráculos anteriores bem desenvolvidos, presentes apenas no primeiro segmento torácico. A abertura entre o corno ventral e o dorsal mede 0,19mm e comprimento 0,53mm na larva de segundo instar. A larva de terceiro estágio tem cerca de 5 mm, apresenta a região cefálica ligeiramente mais exteriorizada, também com os ganchos bucais exteriorizados e aparentes (Figura 3 d). O esqueleto cefalofaríngeo é relativamente maior no terceiro estágio, tendo uma abertura entre o corno ventral e o dorsal de 0,27mm e comprimento de 0,78mm.

Nos primeiros estágios o abrigo possui uma coloração clara, quase transparente (Figura 1 f; Figura 2 a). Cerca de 1 a 2 meses após a eclosão, mais próximo de Dezembro e Janeiro, os abrigos começam a ter uma cor mais escura, devido ao crescimento de um fungo que comumente é encontrado nos NEFs de *Q. grandiflora* (Figura 2). Observamos corpos de insetos presos aos abrigos das larvas de *Rhinoleucophenga*, e vimos que formigas são atraídas aos abrigos dessas larvas e eventualmente acabam presas aos abrigos (Figura 2). Logo no início do desenvolvimento, quando seus abrigos já estão construídos, as larvas já conseguem capturar presas, que ficam grudadas no abrigo (Figura 2a). Nessa fase, entretanto, as larvas e seus abrigos são muito pequenos e normalmente apenas formigas pequenas são aprisionadas.

As larvas parecem ajustar a abertura do abrigo e, devido à translucidez de alguns abrigos larvais, algumas larvas foram observadas se movimentando dentro do abrigo e empurrando um líquido para fora com a região cefálica. Vimos essa substância líquida, possivelmente o próprio néctar extrafloral de *Q. grandiflora*, sendo liberada em ambos os lados do abrigo. Os abrigos larvais tem consistência muito pegajosa, geralmente são claros (só escurecendo na presença de fungos), mais compridos do que largos, e quase que totalmente fechados, exceto por uma ou duas aberturas nas extremidades (Figura 1 e, f; Figura 2). Larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. não são predadoras ativas, uma vez que não saem de seu abrigo em busca de presas. Ao contrário, elas esperam pelos visitantes dos NEFs e os aprisionam pela abertura do abrigo larval. Formigas parecem interessadas pelas aberturas dos abrigos larvais onde há acúmulo de líquido empurrado pelas larvas, sendo que em algumas observações foi possível vê-las fazendo contato com seus aparelhos bucais nessas aberturas e retornando várias vezes ao mesmo local. Quando os insetos ficam grudados ao abrigo pegajoso, as larvas de *Rhinoleucophenga* aparentemente esperam a presa morrer ou parar de se movimentar para se alimentar do seu conteúdo interno. Ao se alimentar, a larva permanece no próprio abrigo. Ela projeta sua cabeça na abertura bucal da presa, ou faz

uma abertura no seu exoesqueleto, e consome o conteúdo do corpo da presa (Figura 2c). As interações com formigas variaram de 1 a mais de 10 segundos. Em 27,4% das observações (n=45) foi possível registrar corpos ou restos de artrópodes predados pelas larvas que ficaram presos aos abrigos (Figura 2). A grande maioria das larvas observadas estava em nectários ativos (82,9%) e a liberação da gota de líquido foi observada em 21,9% das vezes.

Infestação por *Rhinoleucophenga* sp. nov. em *Qualea grandiflora*

Encontramos maior nível de infestação pelo díptero (proporção de plantas com larvas) durante o verão do que no inverno (Tabela 1; $X^2=4,92$, $p=0,026$). Quanto à distribuição espacial dos dípteros nos ramos das plantas, foi encontrado 22 larvas no ápice dos ramos a mais do que no meio ou na base (Tabela 2; $X^2=67,58$, $p<0,001$) e quatro vezes mais larvas na face abaxial do que na face adaxial dos ramos (Tabela 2; $X^2=60,45$, $p<0,001$). Nas plantas amostradas no verão (n=40), em média cada ramo possuía 10,4 ($\pm 0,367$) NEFs ativos e 13,6 ($\pm 0,259$) NEFs totais. O número de NEF por ramo variou de 8 a 32. As plantas amostradas tinham em média 27,5 ($\pm 2,21$) ramos.

2. Interação entre *Rhinoleucophenga* sp. nov. e suas presas em *Qualea grandiflora*

Mirmecofauna associada a *Qualea grandiflora* e presas consumidas por *Rhinoleucophenga* sp. nov.

Foram encontradas 28 morfoespecies de formigas visitando as plantas de *Q. grandiflora*, incluindo principalmente formigas das subfamílias Formicinae, Myrmicinae e Pseudomyrmecinae. As plantas foram visitadas mais frequentemente pelas morfoespécies *Brachymyrmex* sp. 1 e *Camponotus crassus* (Figura 4). Por outro lado, as formigas encontradas em maior número nas plantas foram *Wasmannia* sp. 1 (em média 58 indivíduos). Houve variação nas espécies visitantes entre o dia e a noite

(Figura 5). Durante o dia, as espécies mais encontradas foram *Camponotus crassus* e *Pseudomyrmex gracilis*, ambas com mais de 30% de frequência. Já durante a noite, as mais frequentes foram *Camponotus* sp. 6 (27%), seguida de *Brachymyrmex* sp. 1 (24%).

Dentre os diferentes tipos de insetos aprisionados nos abrigos (n=78) de *Rhinoleucophenga* sp. nov., foram encontradas principalmente Formicidae (93,6%), mas também Diptera (3,84%), Coleoptera e Vespidae (1,28% cada) (Figura 6). A presa mais utilizada foi *Brachymyrmex*, sendo encontrada em 26,9% das vezes, seguida por *Camponotus crassus* (14,1%).

Análise química do néctar extrafloral de *Q. grandiflora* e do líquido encontrado na abertura dos abrigos de *Rhinoleucophenga* sp. nov.

O néctar extrafloral da planta hospedeira e o líquido encontrado na abertura dos abrigos larvais do díptero apresentaram padrões de massas moleculares muito similares (Figura 7). Os açúcares mais comumente encontrados nas amostras foram trehalose (306,106 m/z) e glicose (203,05 m/z). Outros açúcares em menor intensidade também foram encontrados nas amostras, porém não conseguimos a identificação desses compostos.

DISCUSSÃO

1. Características de *Rhinoleucophenga* sp. nov. e interações com *Qualea grandiflora*

Uma das dificuldades de se estudar drosofilídeos que não se alimentam de fungos em frutas é a coleta dos adultos (Gottschalk *et al.* 2008). Apesar de vários gêneros serem raramente vistos nas iscas de frutas, isto não implica que sejam raros na natureza, mas sim que o método de coleta pode não ser o mais adequado para os grupos fora da categoria de “moscas-de-fruta”. Como aqui mostrado, as larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov são muito abundantes em *Qualea grandiflora*, sendo encontradas em 85%

das plantas amostradas no cerrado de Itirapina (SP). Conhecer o estágio larval e sua história natural é de extrema importância para facilitar a coleta e identificação de espécies pouco conhecidas, já que através de observação do local de oviposição foi possível coletar e identificar uma nova espécie desse gênero. Entretanto, esse é o primeiro trabalho que trata de história natural e descrição larval em *Rhinoleucophenga*, o que demonstra o pouco que se conhece sobre esse gênero. Apesar de já haver sido proposto que outras espécies de *Rhinoleucophenga* sejam predadoras, isto ainda não foi demonstrado experimentalmente (ver Ashburner 1981 e Culik & Ventura 2009). Nossas observações mostraram que larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. se alimentam de insetos visitantes de NEFs de *Qualea grandiflora*, principalmente formigas, comprovando o hábito predatório peculiar dentro dessa família de dípteros.

Comparativamente foi encontrado maior número de larvas por transecto e por planta na estação quente/chuvosa, possivelmente devido às características mais propícias de crescimento das plantas de *Qualea* nesse período (Paulilo & Felipe 1992). No verão, que é a época quando a maior parte dos NEFs está ativa, encontramos mais larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov, indicando uma sincronia de seu hábito de vida com o da planta. No cerrado, onde há grande variação entre as estações, alguns insetos podem sincronizar seu ciclo com as das plantas em que estão associados (veja Silva & Oliveira 2010). As larvas de *Rhinoleucophenga* são encontradas principalmente no ápice dos ramos (onde há NEFs mais novos) e em nectários ativos de *Qualea*, mostrando a preferência por esse recurso. Por outro lado, a maior frequência das larvas na parte abaxial dos ramos pode ser devido ao fato desta região receber uma menor incidência de raios solares, diminuindo o risco de dessecação e/ou evaporação de néctar extrafloral. Em observações dos sítios de oviposição, vimos que talvez a presença de formigas seja um fator importante para a escolha do local de oviposição (veja Kaminski *et al.* 2010), uma vez que as três oviposições observadas no campo ocorreram em plantas com alta visitação por formigas.

Mostramos que as larvas de primeiro estágio, não possuem o esqueleto cefalofaríngeo exteriorizado. Dessa forma, nesta fase inicial, as larvas podem estar se alimentando de outro tipo de alimento que não presas, como o próprio néctar extrafloral. O formato dos ganchos bucais de dípteros está diretamente associado com a alimentação das larvas, sendo esperado encontrar ganchos afiados e pontudos em espécies predadoras, ganchos dentados em herbívoras e uma forte redução em espécies parasitas (Richardson & Davis 1977). Para drosofilídeos, os tipos de ganchos foram classificados de acordo com a presença e com os tipos de dentes nos ganchos bucais, sendo que o tipo mais simples é aquele que não possui dentes, encontrado principalmente em espécies que se alimentam de seiva (Okada 1963). Em *Rhinoleucophenga* sp. nov., encontramos ganchos pronunciados e pontudos, porém sem dentes. Essa espécie aparentemente possui característica mista de ganchos encontrados em dípteros carnívoros e em drosofilídeos que se alimentam de seiva. Este padrão é esperado, uma vez que as larvas se alimentam dos insetos visitantes dos NEFs e também aparentemente do próprio néctar.

2. Interação entre *Rhinoleucophenga* sp. nov. e suas presas em *Qualea grandiflora*

A composição da assembléia de formigas visitantes de *Q. grandiflora* é compatível com o que foi encontrado por Oliveira *et al.* (1987; veja também Nahas *et al.* 2012). Estes autores apontaram *Camponotus crassus*, *C. rufipes* e *C. blandus* como as espécies mais comuns em *Qualea grandiflora*, as que mais frequentemente atacaram iscas nas plantas. Formigas deste gênero são normalmente agressivas e eficientes mutualistas, sendo que alguns trabalhos já demonstraram que *Camponotus crassus* e *C. rufipes* são eficientes para expulsar herbívoros (Oliveira 1997, Sendoya *et al.* 2009, Byk & Del-Claro 2010). *Wasmannia* também foi um gênero abundante nas amostragens, porém só foi encontrado em seis plantas, das quais três continham mais de 100 indivíduos desse gênero. Devido a um recrutamento eficiente, estas formigas normalmente ocorrem em grande número nos NEFs. É possível que a alta

capacidade de recrutamento e a proximidade dos ninhos permitam que sejam eficientes em expulsar qualquer formiga visitante e dominem o recurso. Oliveira e Brandão (1991) relatam que formigas *Wasmannia* atacam eficientemente cupins vivos em *Caryocar brasiliense*, uma espécie de planta do cerrado que também possui NEFs. *Brachymyrmex* sp. 1 foi a espécie de formiga mais frequentemente encontrada em *Q. grandiflora*. Essa espécie é muito pequena, com cerca de 1 mm, e possivelmente não atua como uma boa mutualista, porém há poucos estudos sobre a ecologia desse gênero para afirmar o real efeito dessas formigas para a planta (mas veja Oliveira & Brandão 1991). Nossos resultados coincidem bastante bem com os do estudo mais recente com *Q. multiflora* (Nahas & Del Claro 2011), em que as espécies de formigas visitantes mais abundantes foram *Camponotus crassus*, *Cephalotes pusillus*, *Crematogaster* e *Brachymyrmex*.

O mutualismo formiga-planta facultativo pode ser muito variável, sendo que algumas formigas visitantes podem utilizar o recurso oferecido pela planta sem beneficiá-la, como é o caso conhecido de *Cephalotes pusillus* (Byk & Del-Claro 2011). Além disso, essa interação também varia no tempo, uma vez que *Qualea grandiflora* geralmente não produz néctar extrafloral no período seco (Paulilo & Felipe 1992). Apesar de conhecermos muito pouco sobre o papel da maioria das formigas visitantes como mutualista nesse sistema, sabemos que a visitação dessas formigas em *Qualea grandiflora* acaba por proteger a planta contra herbívoros (Oliveira *et al.* 1987, Costa *et al.* 1992), seja diretamente através de ataque, como já visto no caso de formigas do gênero *Camponotus* e *Pseudomyrmex*, ou seja pelo efeito indireto da presença dessas formigas. Esse efeito provavelmente se dá principalmente pela presença de formigas do gênero *Camponotus*, que foram as formigas mais encontradas nesse trabalho (somando todas as espécies desse gênero) e no trabalho de Oliveira *et al.* (1987).

Uma vez que as formigas são os visitantes mais frequentes de NEFs (Rico-Gray & Oliveira 2007), sua disponibilidade como presas potenciais para as larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. é maior

do que a de outros grupos de insetos. As espécies de formigas mais frequentemente encontradas nos abrigos larvais de *Rhinoleucophenga* sp. nov. foram *Brachymyrmex* (26,9%) e *Camponotus crassus* (14,1%), coincidindo com as mais vistas nas plantas. Além disso, é necessário considerar que as larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. não saem de seus abrigos, e os tipos de presas que serão consumidas por elas dependem diretamente da chance dos diferentes tipos de insetos ficarem presos a seus abrigos. Dessa forma, seria de se esperar que visitantes mais frequentes teriam maior chance de ficarem presos e serem consumidos por *Rhinoleucophenga* sp. nov.

Por fim, a análise química do néctar extrafloral e da substância líquida utilizada pelas larvas de *Rhinoleucophenga* na atração de presas mostra que ambas apresentam padrão similar de açúcares, sendo glicose e trehalose os açúcares mais frequentemente encontrados nas amostras. Nas amostras do líquido utilizado pelas larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. houve maior intensidade de trehalose do que no néctar. Uma vez que trehalose é o açúcar mais comumente encontrado na hemolinfa de insetos (Hölldobler & Wilson 1990), é possível que a maior quantidade desse açúcar na abertura do abrigo larval do que no néctar seja oriundo das larvas. Através de nossa análise não podemos concluir se há alteração na concentração dos compostos e nem no volume de néctar produzido na presença dessas larvas. Porém, sendo a composição muito similar entre as amostras, é possível afirmar que as larvas de *Rhinoleucophenga* estejam usando diretamente o néctar extrafloral de *Q. grandiflora* para atrair as presas, não alterando essencialmente sua composição. Além disso, nossas observações de campo sugerem que as larvas utilizam o néctar do próprio nectário, que continua ativo mesmo após a construção do abrigo larval.

3. Considerações finais

Com esse estudo foi possível conhecer mais sobre a história natural desse díptero que ocorre em nectários extraflorais de *Qualea grandiflora*. Além de descobrirmos que esse díptero mirmecófago se trata de uma nova espécie de *Rhinoleucophenga*, foi possível pela primeira vez descrever o hábito e comportamento das larvas, assim como o comportamento de oviposição nesse gênero. Mostramos também que além de utilizar os NEFs da planta como abrigo, essas larvas utilizam o néctar extrafloral para atrair formigas e outros insetos visitantes, os quais servem de alimento para esse díptero predador. Formigas e plantas portadoras de NEFs podem manter uma relação mutualística, em que plantas oferecem recurso alimentar que atraem formigas agressivas, as quais protegem a planta contra inimigos naturais (revisões em Bentley 1977, Beattie 1985, Koptur 1992, Rico-Gray & Oliveira 2007). Já foi demonstrado experimentalmente que formigas forrageiam agressivamente sobre *Q. grandiflora* e *Q. multiflora*, resultando numa menor taxa de herbivoria foliar nestas plantas (Oliveira *et al.* 1987, Costa *et al.* 1992, Del-Claro *et al.* 1996, Nahas *et al.* 2012). Assim, a presença de larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. sobre *Qualea grandiflora* pode afetar a defesa oferecida por essas formigas às plantas. Nesse estudo levantamos a hipótese de que larvas de *Rhinoleucophenga*, atuando como exploradoras do mutualismo, podem afetar o mutualismo entre *Qualea* e formigas, abrindo um caminho inédito para o estudo dessa interação multitrófica, esta hipótese será tratado no próximo capítulo.

REFERÊNCIAS

- Ashburner, M. 1981.** Entomophagous and other bizarre Drosophilidae. Em: The Genetics and Biology of *Drosophila*, vol. 3a. Editado por Ashburner, M., Carson, H.L. & Thompson Jr., J.N. London, Academic Press.
- Awmack, C.S. & Leather, S.R. 2002.** Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Annual Review Entomology* 47: 817-844.
- Beattie, A.J. 1985.** The evolutionary ecology of ant-plant mutualism. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Bentley, B.L. 1977.** Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards. *Annual Review on Ecology and Systematic* 8: 407-427.
- Boege, K. & Marquis, R.J. 2006.** Plant quality and predation risk mediated by plant ontogeny: consequences for herbivores and plants. *Oikos* 115: 559-572.
- 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.
- Costa, F.M.C.B., Oliveira-Filho, A.T & Oliveira, P.S. 1992.** The role of extrafloral nectaries in *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae) in limiting herbivory: an experiment of ant protection in cerrado vegetation. *Ecological Entomology* 17: 363-365.
- Culik, M.P. & Ventura, J.A. 2009.** New species of *Rhinoleucophenga*, a potencial predator of pineapple mealybugs. *Pesquisa agropecuária brasileira* 44:417-420.
- Del-Claro, K., Berto, V. & Réu, W. 1996.** Effect of herbivore deterrence by ants on the fruit set of an extrafloral nectary plant, *Qualea multiflora* (Vochysiaceae). *Journal of Tropical Ecology* 12: 887-892.
- Dutra-Lutgens, H. 2000.** Caracterização ambiental e subsídios para o manejo da zona de amortecimento da Estação Experimental e Ecológica de Itirapina-SP. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Fernández, F. 2003.** Introducción a las hormigas de la región neotropical, sección IV. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt, Colombia.
- Grimaldi, D.A. 1990.** A phylogenetic, revised classification of genera in the Drosophilidae (Diptera). *Bulletin of the American Museum of Natural History* 197:1-139.
- Grimaldi, D.A. 1994.** Description and immature stages of *Hirtodrosophila batracida* sp. n. (Diptera:Drosophilidae), a predator of frog embryos. *Insect Systematic and Evolution* 25:129-136.

- Gottschalk, M.S., Hofmann, P.R.P. & Valente, V.L.S. 2008.** Diptera, Drosophilidae: historical occurrence in Brazil. Check list 4: 485-518.
- Hölldobler, B. & Wilson, E.O. 1990.** The ants. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Mass, USA.
- Kaminski, L.A., Freitas, A.V.L., & Oliveira, P.S. 2010.** Interaction between mutualisms: ant-tended butterflies exploit enemy-free space provided by ant-treehopper associations. American Naturalist 176: 322-334.
- Köppen, W. 1948.** Climatologia. Fundo de Cultura Econômica, Buenos Aires (Trad. de Guendriss du Klimakunde, 1923).
- Koptur, S. 1992** Extrafloral nectary-mediated interactions between insects and plants. Em: Insect Plant Interactions, vol.IV. Editado por Bernays, E. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Koptur, S. 2005.** Nectar as fuel for plant protectors. Em: Plant-provided food for carnivorous insects. Editado por Wäckers, F.L, van Rijn, P. C.J. & Bruin, J. Cambridge University Press.
- McAlpine, J.F., Peterson, B.V., Shewell, G.E., Teskey, H.J., Vocheroth, H.R. & Wood, D.M. 1981.** Cap. 1: Introdução. Em: Manual of Nearctic Diptera, volume 1. Canada Communication Publishing Group.
- Nakagawa, S. & Schielzeth, H. 2013.** A general and simple method for obtaining R^2 from generalized linear mixed-effects models. Methods in Ecology and Evolution 4: 133-142.
- Nahas, L. & Del-Claro, K. 2011.** Ant-plant interactions: absolute frequency as a better method to sample visiting ants in the extrafloral nectar-bearing plant *Qualea multiflora* (Vochysiaceae). Sociobiology 57:1-7.
- Nahas, L., Gonzaga, M.O. & Del-Claro. 2012.** Emergent impacts of ant and spider interactions: herbivory reduction in a Tropical Savanna tree. Biotropica 44: 498-505.
- Nicolson, S.W. 1994.** Pollen feeding in the eucalypt nectar fly, *Drosophila flavohirta*. Physiological Entomology 19:58-60.
- Okada, T., 1963.** Caenogenetic differentiation of mouth hooks in drosophilid larvae. Evolution 17:84-98.
- 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-Filho, A.T. & Ratter, J.A. 2002.** Vegetation physiognomies and woody flora of the cerrado biome. Em: The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna.

Editado por Oliveira, P.S. & Marquis, R.J. Columbia University Press, New York.

Oliveira, P.S., Silva, A.F. & Martins, A.B. 1987. Ant foraging in extrafloral nectaries of *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae) in cerrado vegetation: ants as potential anti-herbivore agents. *Oecologia* 74: 228-230.

Oliveira, P.S. & Brandão, C.R.F. 1991. The ant community associated with extrafloral nectaries in Brazilian cerrados. Em: *Ant-Plant Interactions*. Editado por Cutler, D.F. & Huxley, C.R. Oxford University Press, Oxford.

Paulilo, M.T. & Felipe, G.M. 1992. Crescimento de folhas de árvores de *Qualea grandiflora* Mart. *Revista Brasileira de Botânica* 15: 85-93.

R Core Team. 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

Richards, O.W. & Davis, R.G. 1977. Imm's general textbook of entomology. Chapman & Hall Ltd, Reino Unido. pp. 970- 977.

Rico-Gray, V. & Oliveira, P.S. 2007. The ecology and evolution of ant-plant interactions. The University of Chicago Press, Chicago, USA.

Schmitz H.J. Gottschalk, M.S. & Valente, V.L.S. 2009. *Rhinoleucophenga joaquina* sp. nov. (Diptera, Drosophilidae) from the neotropical region. *Neotropical Entomology* 38:786-790.

Sendoya, S. F., Freitas, A. V. L. & Oliveira, P. S.. 2009. Egg-laying butterflies distinguish predaceous ants by sight. *American Naturalist* 174:134–140.

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.

Silva-Brandão, K.L. & Freitas, A.V.L. 2012. Interação entre borboletas e plantas. Em *Ecologia das interações plantas-animais: uma abordagem ecológico-evolutiva*, organizadores K. Del-Claro e H. M. Torezan-Silingard. Editora Technical Books, Brasil.

Silva, D.P. & Oliveira, P.S. 2010. Field biology of *Edessa rufomarginata* (Hemiptera: Pentatomidae): Phenology, behavior, and patterns of host plant use. *Environmental Entomology* 39:1903-1910.

Takenaka, K. Yin, J-T., Wen, S-Y. & Toda, M.J. 2006. Pollination mutualism between a new species of the genus *Colocaiomyia* de Meijere (Diptera: Drosophilidae) and *Stuednera colocasiifolia* (Aracea) in Yunnan, China. *Entomological Science* 9: 79-91.

- 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.
- Thompson, V. & Mohd-Saleh, N. 1995.** Spittle maggots: studies on *Cladochaeta* fly larvae living in association with *Clastoptera* spittlebugs nymphs. *American Midland Naturalist* 134: 215-225.
- Tosi, D., Martins, M., Vilela, C.R. & Pereira M.A.Q.R. 1990.** On a new cave-dwelling species of bat-guano-breeding *Drosophila* closely related to *D. repleta* Wollaston (Diptera, Drosophilidae). *Revista Brasileira de Genética* 13:19-31.
- Villa, J. 1977.** A symbiotic relationship between frog (Amphibia, Anura, Centrolenidae) and fly larvae (Drosophilidae). *Journal of Herpetology* 11: 317-322.
- Wheeler, M.R. 1952.** XI. The Drosophilidae of the Nearctic region, exclusive of the genus *Drosophila*. Em: *Studies in the Genetics of Drosophila*. Editado por Patterson, J.T. University of Texas Publication, EUA.
- Wheeler, M.R. 1981.** Drosophilidae. Em: *Manual of Nearctic Diptera*, volume 2. Editado por McAlpine, J.F., Peterson, B.V., Shewell, G.E., Teskey, H.J., Vockeroth, J.R. & Wood, D.M. Canada Communication Publishing Group.
- Whiteman, N.K., Groen, S.C., Chevasco, D., Bear, A., Beckwith, N., Gregory, T.R., Denoux, C., Mammarella, N., Ausubel, F.M. & Pierce, N.E. 2011.** Mining the plant-herbivore interface with a leafmining *Drosophila* of *Arabidopsis*. *Molecular Ecology* 20:995-1014.

Tabela 1: Níveis de infestação de larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. em *Qualea grandiflora* (n=40) durante as estações de inverno e verão.

	Inverno	Verão
Larvas totais	40	134
Larvas vivas	2	134
Porcentagem de larvas vivas	5%	100%
Média de larvas totais por transecto	5,25	17
Média de larvas totais por planta	1	3,35
Porcentagem de plantas com larvas	45%	85%
Média de NEFs ativos por planta	1,35	50,8

Tabela 2: Número e proporção de larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. (n=134) encontradas em cada local dos ramos de *Qualea grandiflora* no período do verão.

	Local	Número de larvas	Porcentagem (%)
Face Abaxial	Ápice	65	48,51
	Meio	45	33,58
	Base	2	1,49
Face Adaxial	Ápice	13	9,70
	Meio	9	7,72
	Base	0	0

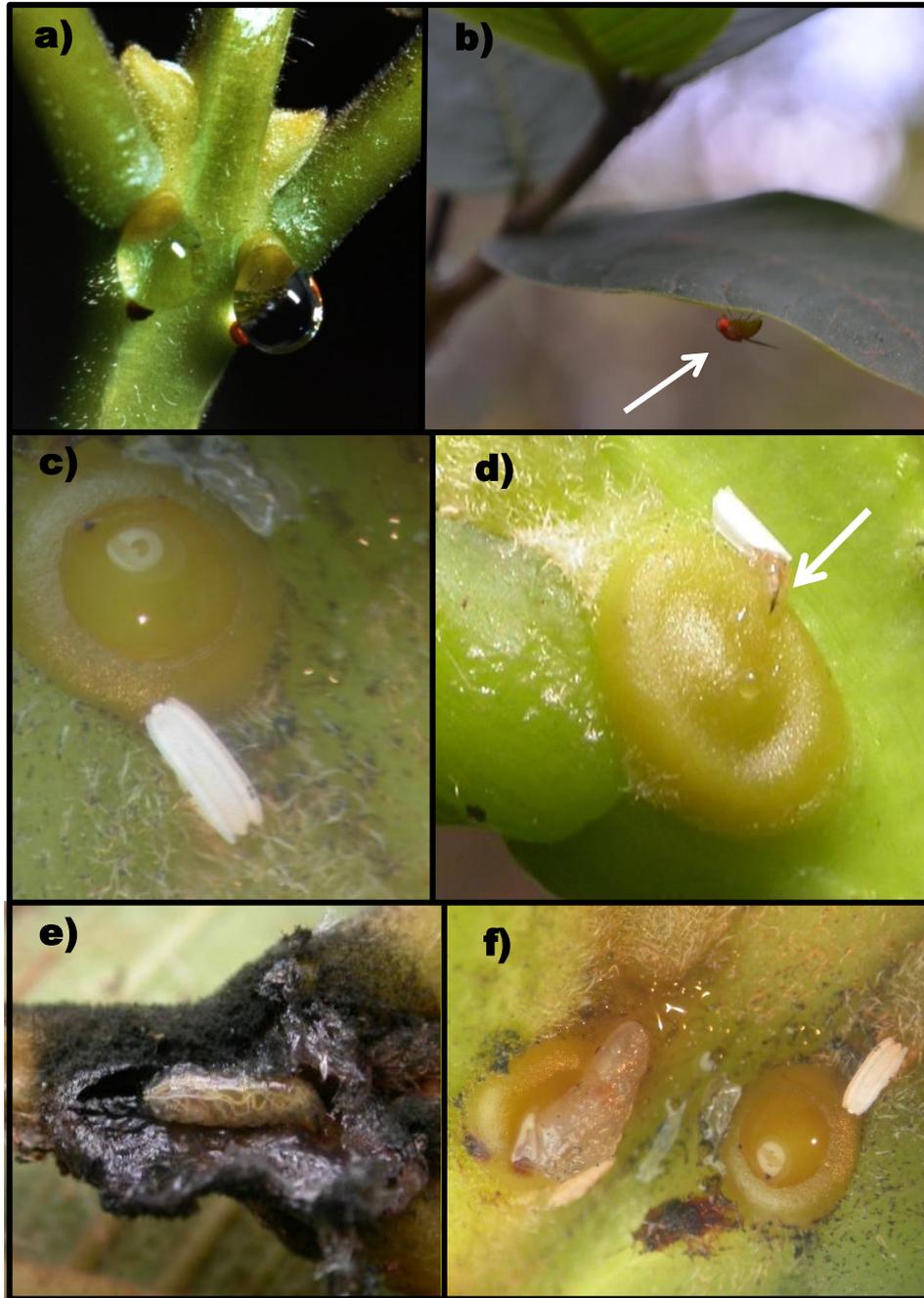


Figura 1: a) Nectários extraflorais de *Qualea grandiflora* com néctar acumulado; b) Fêmea de *Rhinoleucophenga* sp. nov. repousando numa folha de *Qualea grandiflora*; c) Ovo de *Rhinoleucophenga* sp. nov. em nectário extrafloral (NEF) de *Q. grandiflora*; d) Larva de *Rhinoleucophenga* sp. nov. logo após eclosão indo em direção a abertura do NEF de *Qualea*; e) Abrigo de *Rhinoleucophenga* sp. nov. aberto mostrando larva dentro; f) Larva em estágio inicial (esquerda) e ovo (direita) de *Rhinoleucophenga* sp. nov. em NEFs de *Q. grandiflora*.

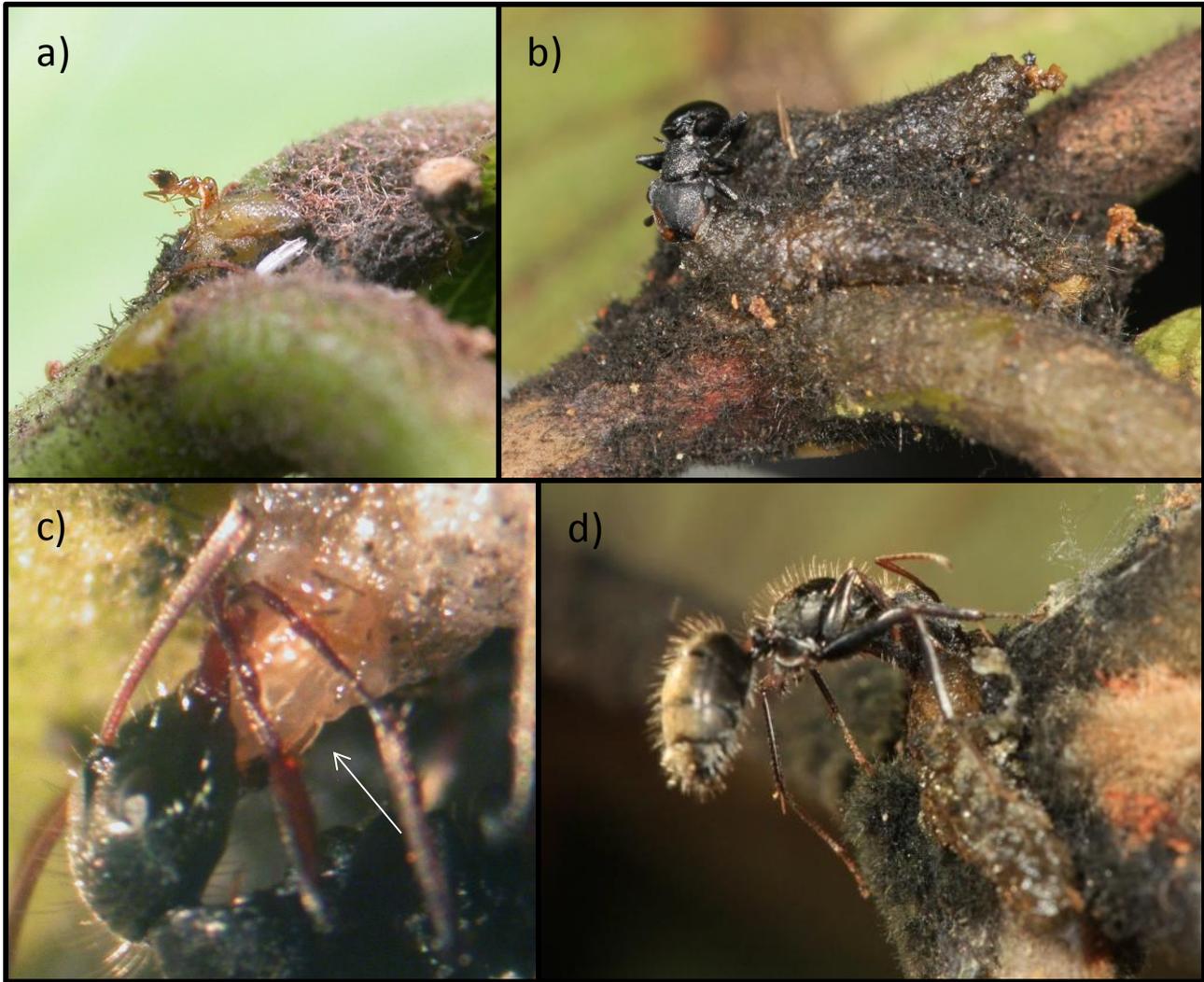


Figura 2: a) *Brachymyrmex* sp. presa ao abrigo de larva de *Rhinoleucophenga* sp. nov. em fase inicial de desenvolvimento; b) *Cephalotes pusillus* presa ao abrigo de *Rhinoleucophenga* sp. nov. (há dois abrigos de larvas ocupado o par de NEFs); c) Larva de *Rhinoleucophenga* (seta aponta região cefálica da larva) se alimentando do conteúdo interno de uma formigas do gênero *Camponotus* presa ao seu abrigo; d) *Camponotus crassus* presa ao abrigo de uma larva em fase final de desenvolvimento.

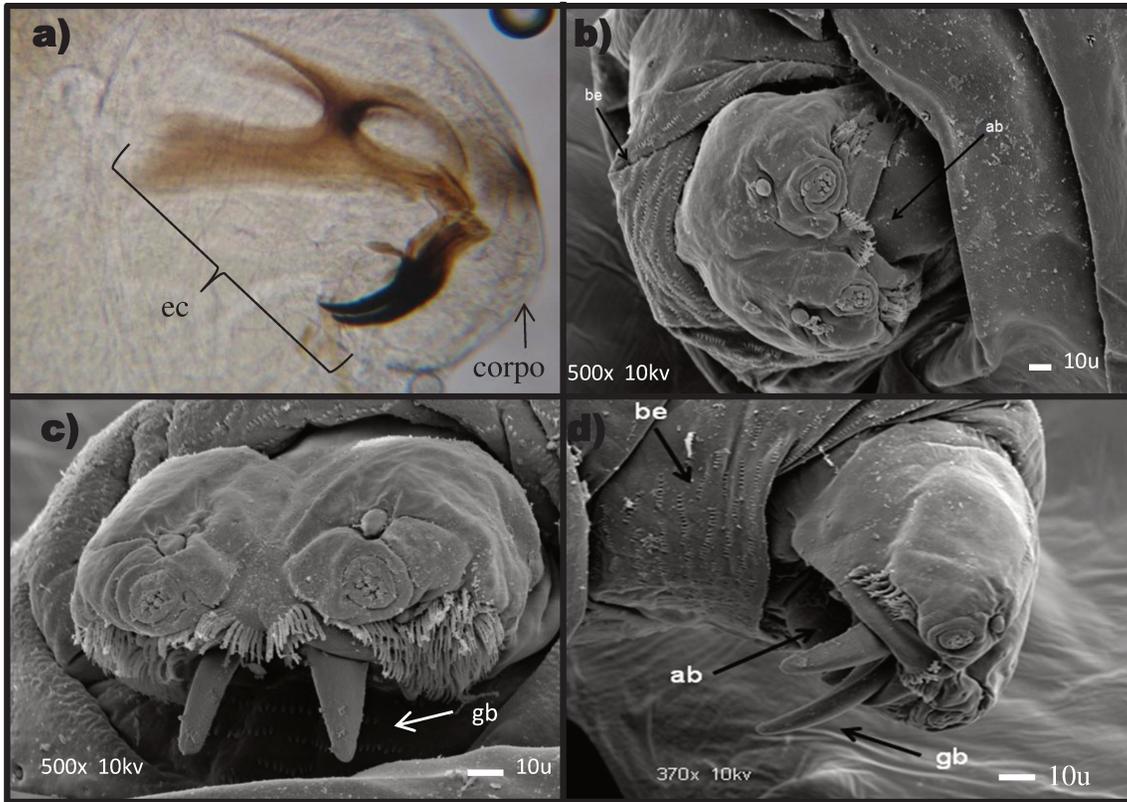


Figura 3: Imagens de microscopia óptica e de varredura de aparelho bucal de larvas de diferentes estágios de desenvolvimento de *Rhinoleucophenga* sp. nov.: a) Microscopia óptica em aumento de 400x mostrando esqueleto cefalofaríngeo de larva de primeiro estágio; b) Microscopia de varredura de larva de primeiro estágio mostrado a região cefálica; c) Microscopia de varredura de larva de segundo estágio mostrando região cefálica; d) Microscopia de varredura da região cefálica de larva de terceiro estágio. Legenda para detalhes da morfologia: esqueleto cefalofaríngeo (ec); banda de espinhos (be); abertura bucal (ab); gancho bucal (gb).

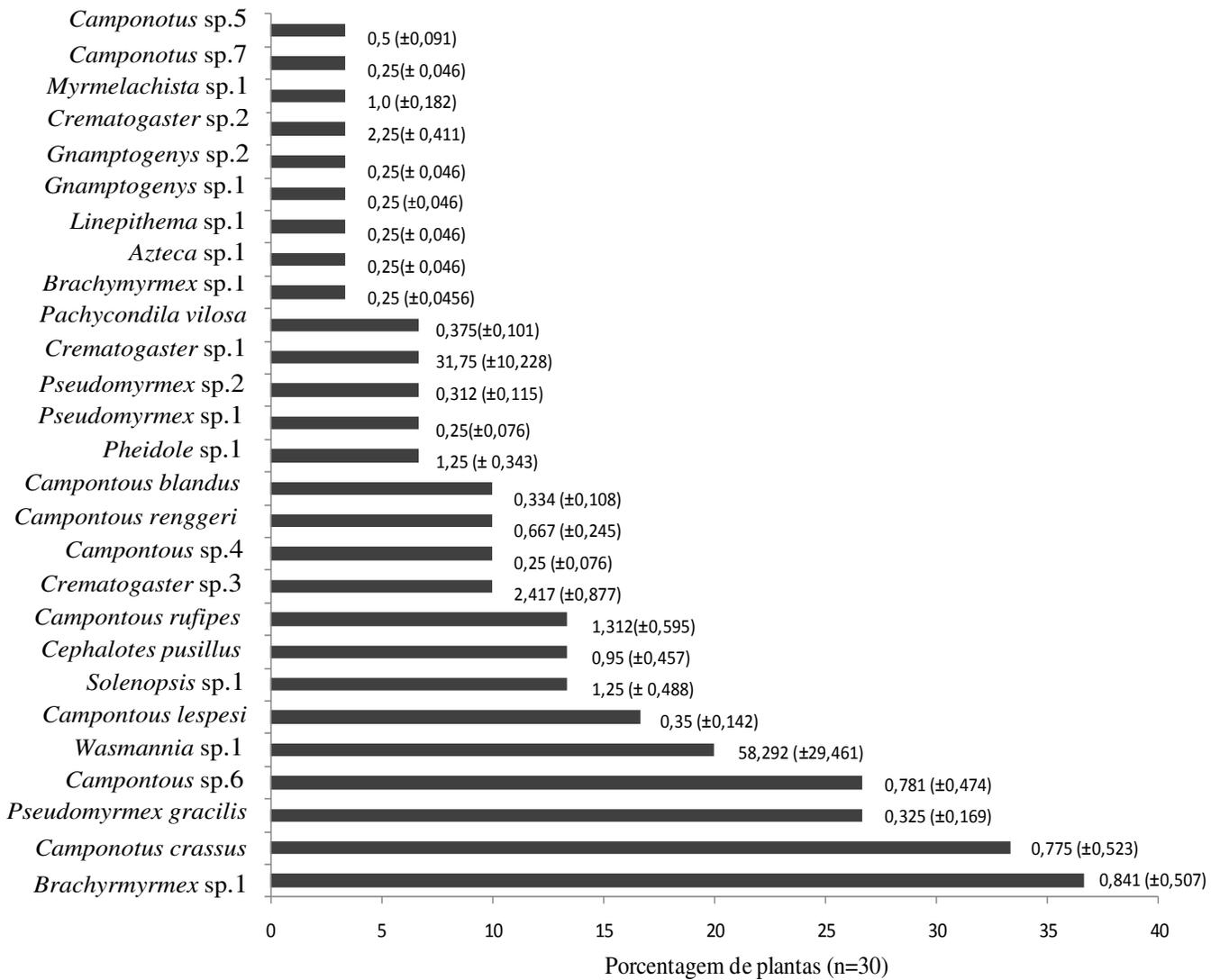


Figura 4: Porcentagem de plantas de *Qualea grandiflora* (n=30) em que foi encontrada cada espécie de formigas nos quatro horários de coleta (07.00, 13.00, 19.00 e 01.00 hs). Valores ao lado de cada barra representam o número médio de formigas encontradas nas plantas e o desvio padrão (entre parênteses).

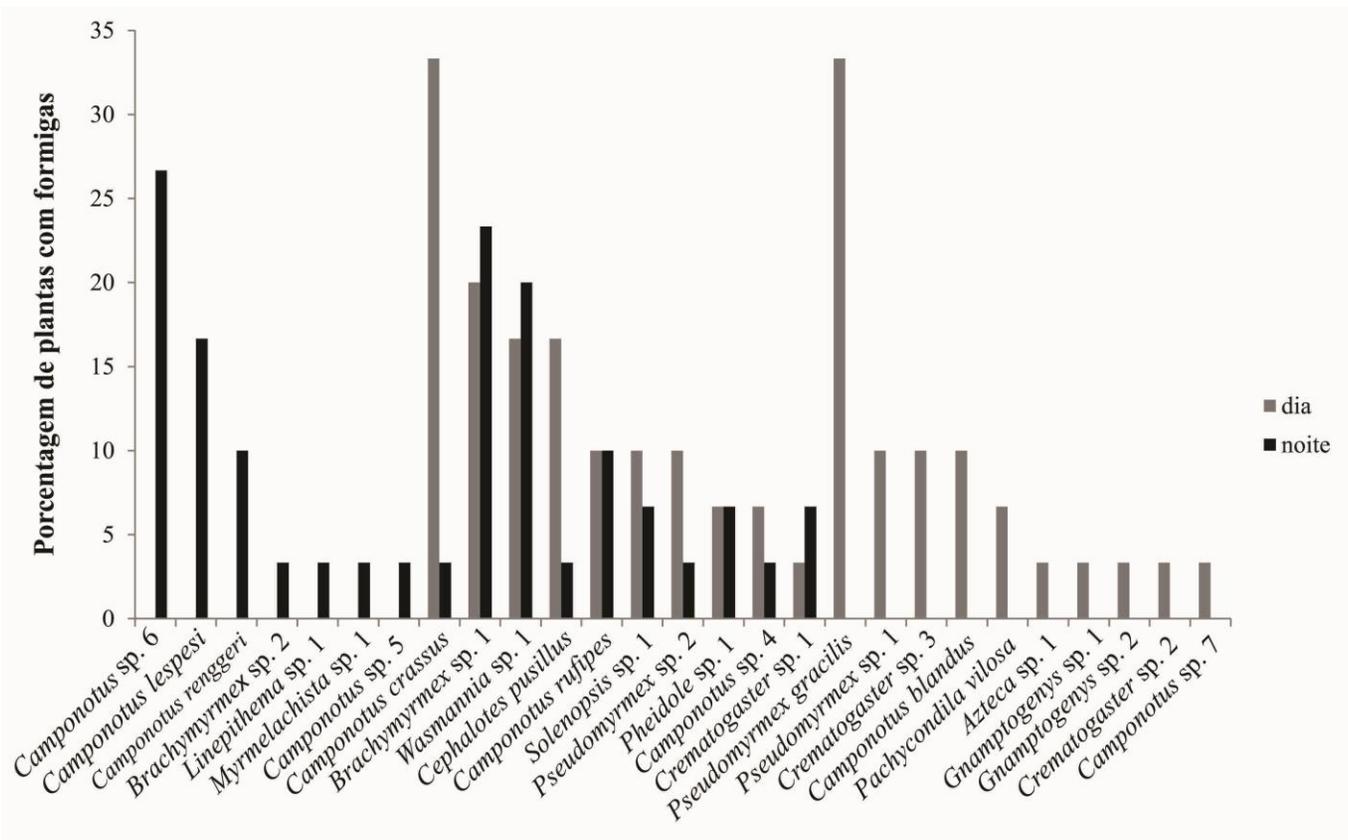


Figura 5: Porcentagem de plantas de *Q. gradiflora* (n=30) em que cada espécie de formiga foi coletada tanto durante os períodos diurno (07.00 hs e 13.00 hs) e noturno (19.00 e 01.00 h).

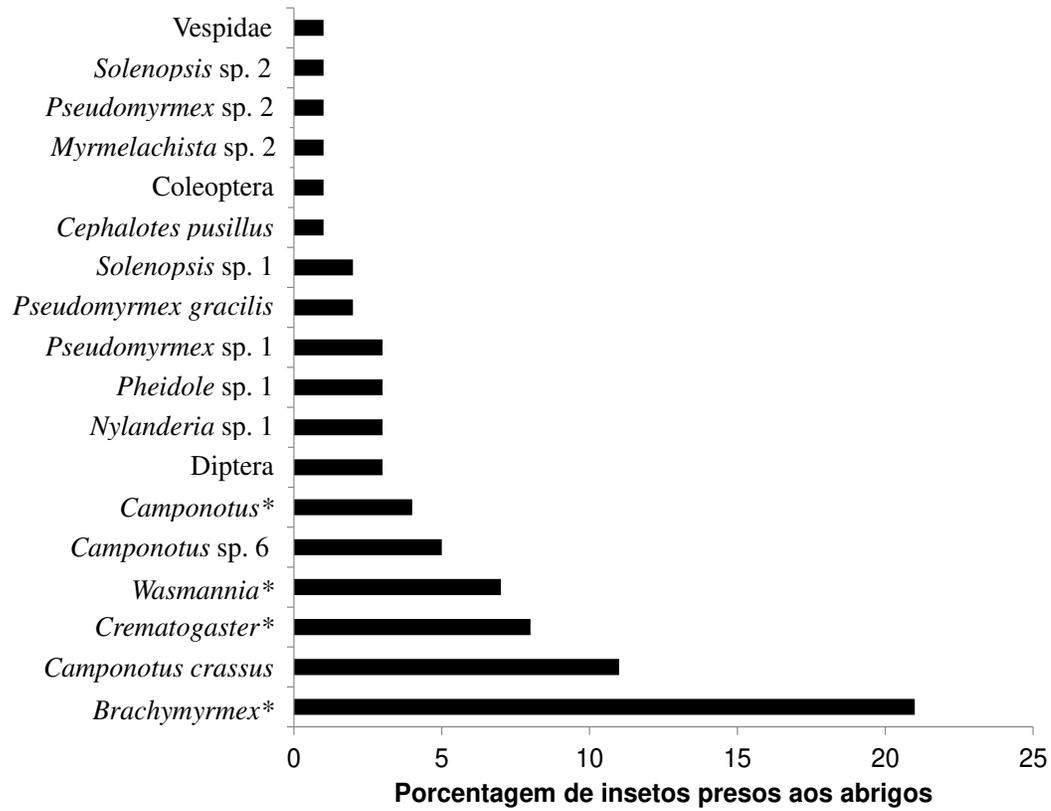


Figura 6: Porcentagem de diferentes insetos (n=78) encontradas presos aos abrigos de *Rhinoleucophenga* sp. nov.

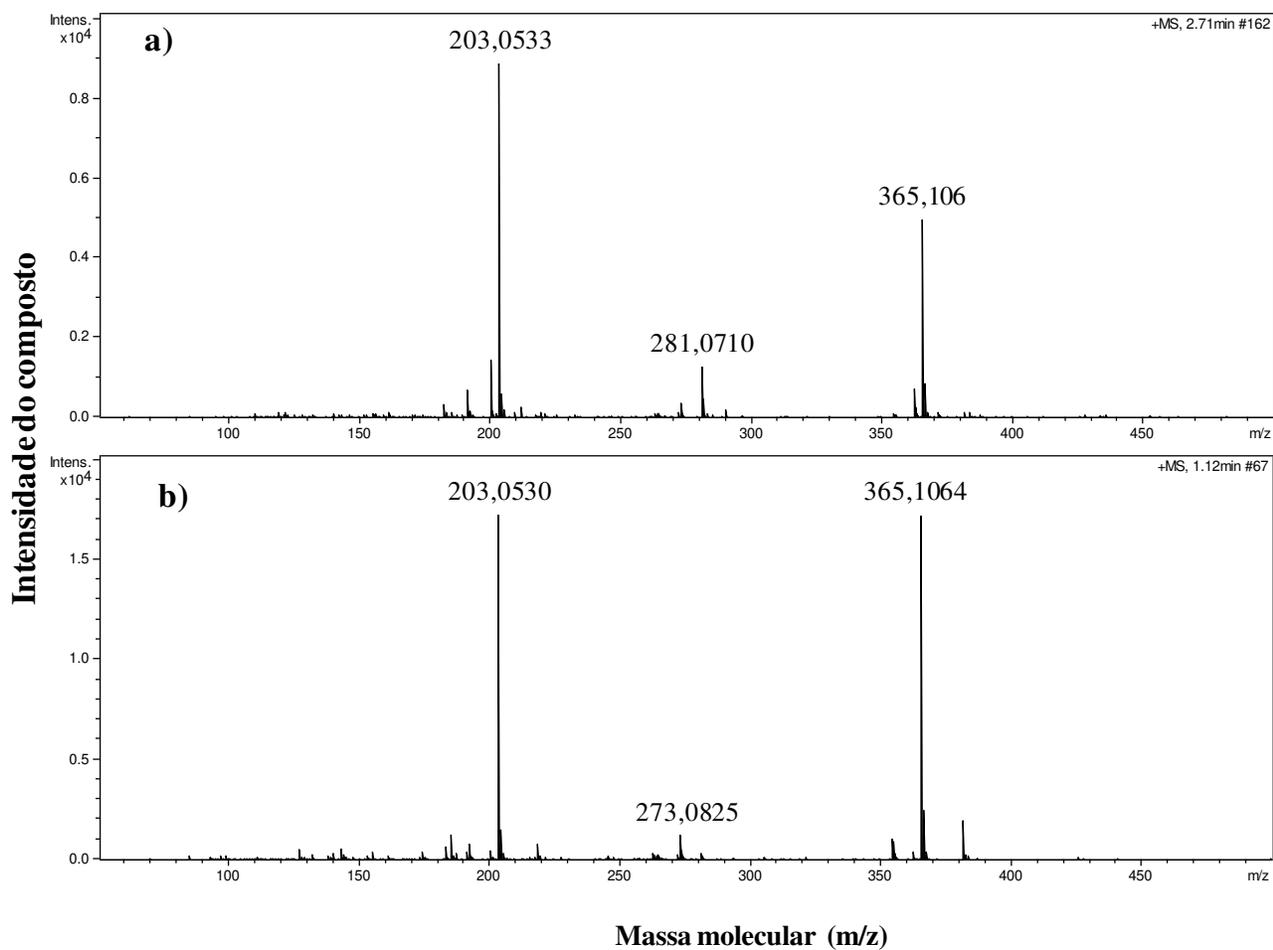


Figura 7: Amostras de néctar extrafloral de *Qualea grandiflora* (a) e de líquido utilizado pelas larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. (b) analisadas através de espectrofotometria de massa. Números acima dos picos representam valores de massa molecular (m/z) dos elementos com maiores intensidades na amostra.

CAPÍTULO 2:

A exploração do mutualismo entre formigas e *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae) por *Rhinoleucophenga* sp. nov. (Diptera, Drosophilidae)

Vidal, M.C.¹, Sendoya, S.F.¹ & Oliveira, P.S.^{1*}

¹Laboratório de Ecologia e Comportamento de Formigas, Departamento de Biologia Animal, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

*e-mail para correspondência: ps@unicamp.br

RESUMO

Plantas podem manter mutualismos com formigas, em que oferecem recurso alimentar e/ou abrigo em troca da proteção contra inimigos naturais. Nectários extraflorais (NEFs) são glândulas produtoras de néctar amplamente encontradas em plantas que mantêm mutualismo com formigas. *Qualea grandiflora* é uma planta muito comum no cerrado de Itirapina (SP) que possui pares de NEFs na base de seus pecíolos, atraindo grande variedade de formigas cuja visitação pode protegê-la contra herbívoros. Encontramos uma nova espécie de *Rhinoleucophenga* (Drosophilidae), cujas larvas constroem seus abrigos em cima das aberturas dos NEFs de *Qualea*, sem, entretanto, impedir o acesso de outros insetos a esse recurso. Uma vez que as larvas do díptero predam as formigas visitantes de *Qualea* e utilizam o néctar produzido pela planta, *Rhinoleucophenga* sp. nov. pode estar agindo tanto como exploradora do mutualismo *Qualea*-formiga como predador de topo nesse sistema. Assim, como predadoras de formigas, podem não são afetar a dinâmica de suas presas, mas também dos herbívoros que suas presas estariam expulsando da planta, e conseqüentemente também afetaria a própria planta. Dentro desse contexto, neste capítulo analisamos se a presença dessas larvas tem um efeito sobre a visita o e patrulhamento das folhas de *Qualea* pelas formigas e se há um efeito indireto na abundância de herbívoros e no nível de herbivoria em plantas infestadas por *Rhinoleucophenga* sp. nov. Encontramos que em ramos com larvas de *Rhinoleucophenga* houve menor número de formigas visitantes, com as formigas permanecendo nos ramos por menos tempo. Além disso, formigas também atacam menos cupins vivos (herbívoros simulados) sobre as folhas de ramos infestados pelas larvas. Nossos dados experimentais indicaram que o forrageamento menos constante de formigas sobre as folhas de ramos com larvas está associado a uma maior abundância de herbívoros mastigadores e maior área foliar removida por estes. Assim, há um efeito positivo indireto dessas larvas mirmecófagas sobre os herbívoros mastigadores de *Qualea*. Esse efeito, entretanto, não foi observado para herbívoros sugadores e para artrópodes predadores encontrados em *Qualea*. Dessa forma, além de larvas de *Rhinoleucophenga* estarem explorando o recurso alimentar produzido pela planta nessa associa o mutualística, também causa afetos negativos as formigas e as plantas. Podemos concluir que larvas de *Rhinoleucophenga* estão agindo como exploradoras e predador de topo no mutualismo formiga-*Qualea grandiflora*.

ABSTRACT

Plants can maintain mutualism with ants, in which the plant offers food and/or shelter for ants in exchange of protection against natural enemies. Extrafloral nectaries (EFNs) are nectar-producing glands broadly found on plants and that are highly attractive to mutualistic ant visitors that protect the plant against herbivores. *Qualea grandiflora* is a typical cerrado plant that bears paired EFNs at the base of its petioles, attracting many species of visiting ants that act as anti-herbivore agents. In a cerrado area at Itirapina (SP), we found a new dipteran species in the genus *Rhinoleucophenga* (Drosophilidae) whose larvae construct sticky shelters on top of active EFNs of *Q. grandiflora*. The presence of these shelters does not block the access of others insects to the EFN. Field observations revealed that ants and others insects that visit the EFNs can get trapped at the sticky larval shelters, and are consumed by the larvae. Here, we hypothesized that *Rhinoleucophenga* larvae could be interfering with the ant-*Qualea* mutualism, and thus be acting as an exploiter and top predator on this interaction. Thus, as an ant predator, those larvae can not only affect the dynamics of its prey, but also of the herbivores that would be expelled by ants and this effect could cascade to the plant. We examined if there is any effect of the presence of ant-preying dipteran larvae on the foraging activity of ants and if this effect can influence herbivore numbers and herbivory levels on plants. *Qualea* branches infested by ant-preying *Rhinoleucophenga* larvae had ant visitors for less time and in lower numbers than dipteran-free branches. This negative effect on ant foraging activity resulted in decreased levels of ant aggression to live termite-baits (i.e., simulated herbivores) on leaves of dipteran-infested compared to dipteran-free branches. Controlled field experiments demonstrated that branches hosting *Rhinoleucophenga* larvae had higher numbers of chewing herbivores and higher levels of foliar herbivory than dipteran-free branches. By using *Qualea*'s EFNs as larval shelters and as attractants to ant prey, larvae of *Rhinoleucophenga* sp. nov. negatively affect both the plant and ant visitors, with cascading effects ultimately resulting in increased herbivore damage to leaves. Thus we can conclude that ant-eating *Rhinoleucophenga* larvae are acting as exploiters of the mutualism between ants and *Q. grandiflora*.

INTRODUÇÃO

Formigas são extremamente abundantes, perfazendo em muitos habitats a maior porção da fauna de artrópodes encontrada na vegetação (Hölldobler & Wilson 1990). Formigas interagem com plantas de diversas maneiras, sendo a interação mais conhecida e amplamente estudada aquela envolvendo o mutualismo de proteção entre formigas e plantas (Beattie 1985). Nesta interação há um benefício alimentar para as formigas, que por sua vez reduzem os danos produzidos por herbívoros e beneficiam a reprodução da planta (Bronstein *et al.* 2006, Rico-Gray & Oliveira 2007). Entretanto, essa proteção exercida pelas formigas pode variar, dependendo da agressividade das formigas visitantes (Inouye & Taylor 1979, Oliveira *et al.* 1987, Oliveira & Freitas 2004), da capacidade dos herbívoros escaparem da predação ou injúria por formigas (Koptur 1984, Heads & Lawton 1985, Freitas & Oliveira 1996, Sendoya *et al.* 2009), da intensidade de herbivoria (Koptur 1992), da época da interação (Tilman 1978), bem como do tipo de habitat (Barton 1986, Cogni *et al.* 2003, Díaz-Castelazo *et al.* 2004, Trager *et al.* 2009). Os custos para insetos que se alimentem em plantas defendidas por formigas podem ser inúmeros, incluindo redução da sobrevivência e fecundidade devido ao ataque por formigas ou estresse (Tilman 1978, Stephenson 1982, Horvitz & Schemske 1984, Heil 2008, Rosumek *et al.* 2009). O recurso oferecido pelas plantas nesse mutualismo também pode variar, tanto em natureza e quantidade como na qualidade (Bentley 1977, Koptur 2005, Heil 2011). Além disso, o mutualismo entre formigas e plantas vai desde interações facultativas até o mutualismo estritamente obrigatório, em que as espécies envolvidas dificilmente sobrevivem quando isoladas (Bronstein 1998). No caso das mirmecófitas é oferecido um local para nidificação e um ou mais recursos alimentares, como nectários extraflorais e corpúsculos alimentares, ricos em lipídeos, proteínas e açúcares. Já no mutualismo facultativo entre formigas e plantas o recurso que é oferecido pelas plantas na maioria das vezes é néctar extrafloral (revisões em Beattie 1985, Hölldobler & Wilson 1990, Koptur 1992, 2005, Rico-Gray & Oliveira 2007).

Nectários extraflorais (NEFs) são glândulas produtoras de néctar não relacionadas com a polinização, mas que podem também ser encontradas perto de estruturas reprodutivas das plantas (Bentley 1977). Os NEFs são muito variáveis em estrutura e localização e são encontrados em 21% das famílias de plantas e em até 36% das Angiospermas, sendo um caráter que surgiu e desapareceu muitas vezes ao longo da história evolutiva de plantas (Weber & Keeler 2012). No cerrado, plantas com NEFs constituem cerca de 25% das espécies e podem chegar a 31% dos indivíduos lenhosos de uma dada área (Oliveira & Leitão-Filho 1987, Oliveira & Oliveira-Filho 1991). Por ter um importante conteúdo de açúcares, e secundariamente lipídeos e aminoácidos, o néctar extrafloral atrai uma grande quantidade de insetos (Bentley 1977). Na maioria dos casos, as formigas são os principais visitantes destes órgãos, podendo tratá-los como parte integrante de seu território e comportar-se agressivamente contra outros insetos que se alimentam na planta (Rico-Gray & Oliveira 2007 e referências incluídas).

Algumas espécies são consideradas exploradoras de interações mutualísticas e podem causar danos severos a espécies mutualistas, podendo até matá-las (Letourneau 1990, Bronstein 2001). Além de serem muito numerosas e taxonomicamente diversificadas, espécies exploradoras podem afetar tanto mutualismos facultativos quanto obrigatórios (Bronstein 2001, Yu 2001). No caso de mutualismos formiga-planta, pode haver algumas espécies de formigas que utilizam o recurso oferecido pela planta, sem defendê-la, sendo assim consideradas exploradoras (Janzen 1975, Bronstein 2001, Yu 2001, Raine *et al.* 2004). Outros animais, entretanto, também podem explorar mutualismos formiga-planta. Por exemplo, no mutualismo entre formigas *Pheidole* e plantas do gênero *Piper* (Piperaceae), larvas de besouro (*Tarsobaenus*) podem se alimentar do corpúsculo alimentar oferecido pela planta bem como da prole das formigas moradoras, resultando no aumento da herbivoria na planta (Letourneau 1990). Lagartas mirmecófilas de *Trisbe irenea* (Riodinidae, Lepidoptera) beneficiam-se da proteção por formigas atendentes e alimentam-se de folhas e de néctar extrafloral produzido pela planta hospedeira

(DeVries & Baker 1989). Também é conhecido o caso de *Bagheera kiplingi* (Salticidae), uma espécie de aranha cuja sua dieta é quase totalmente baseada em corpúsculos de Belt, produzidos por Acácias para alimentar suas formigas mutualísticas (Meehan *et al.* 2009).

A interação entre formigas e *Qualea grandiflora* no cerrado

Qualea grandiflora Mart. (Vochysiaceae) é uma planta típica do cerrado, com alta abundância no sudeste do Brasil (Gibbs *et al.* 1983). Essa espécie tem NEFs pareados ao longo dos galhos, próximos às inserções das folhas (Figura 1a), sendo intensamente visitada por formigas (Oliveira & Brandão 1991). Estudos com *Q. grandiflora* demonstram que a presença de NEFs atrai mais formigas visitantes a essa planta do que a plantas vizinhas sem glândulas, resultando em maior patrulhamento agressivo pelas formigas sobre *Q. grandiflora* (Oliveira *et al.* 1987). Experimentos envolvendo a exclusão de formigas comprovaram o papel protetor destas contra insetos herbívoros (Costa *et al.* 1992). Em *Qualea multiflora*, que também possui nectários extraflorais, foi demonstrado que formigas atraídas aos NEFs reduzem eficientemente a taxa de herbivoria e, conseqüentemente, aumentam a produção de frutos pelas plantas (Del-Claro *et al.* 1996). Recentemente foi demonstrado que a riqueza e abundância de herbívoros em *Q. multiflora* também diminuem com a presença de formigas visitantes (Nahas *et al.* 2012).

Durante observações de campo no cerrado de Itirapina (SP) encontramos larvas de uma espécie de mosca do gênero *Rhinoleucophenga* (Diptera: Drosophilidae) que constrói seu abrigo em cima dos NEFs de *Q. grandiflora*. Esse abrigo é alongado (podendo chegar até cerca de 1,0 cm), quase totalmente fechado e de textura pegajosa (Figura 1b). A construção desse abrigo obstrui parcialmente o nectário, mas não impede que as formigas visitantes se alimentem do néctar extrafloral. As larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. se alimentam dos insetos que visitam o nectário e que eventualmente ficam aprisionados em seu abrigo pegajoso (Capítulo 1; Figura 1c, d). As larvas predadoras abrem o

exoesqueleto das presas com seu aparelho bucal e se alimentam do conteúdo interno das presas (Figura 1c; ver capítulo 1).

Em última instância, o mutualismo de proteção formiga-planta pode ser considerado também como um caso de cascata trófica, em que o efeito negativo do predador (formigas) sobre os herbívoros acaba indiretamente beneficiando a planta (Schmitz et al. 2004). Assim, a presença de um explorador do mutualismo que também é predador de formigas pode afetar negativamente a planta mutualística, uma vez que estaria reduzindo a presença das formigas protetoras e aumentando o número de herbívoros (e.g. Letourneau & Dyer 1998). Como *Rhinoleucophenga* sp. nov. se alimenta das formigas visitantes utilizando o NEF para construção de seus abrigos e atração de suas presas, é possível que as larvas deste díptero estejam atuando como exploradoras do mutualismo entre formigas e *Q. grandiflora*. Além disso, a presença dessas larvas poderia afetar o forrageamento das formigas na planta, deixando-a mais suscetível ao ataque de herbívoros. Neste capítulo, estudamos as larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. e seus possíveis efeitos diretos e indiretos nos níveis tróficos envolvidos no mutualismo entre formigas e *Qualea grandiflora* (veja fluxograma abaixo – Figura 2). Especificamente fizemos as seguintes perguntas: 1) A presença das larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. reduz o patrulhamento por formigas forrageadoras na folhagem? 2) Em caso afirmativo, isto resulta numa menor vulnerabilidade dos herbívoros (i.e., cupins vivos como herbívoros simulados) e ataque por formigas nesses ramos em comparação com ramos sem larvas? 3) Ramos com larvas mirmecófagas por potencialmente serem menos patrulhados por formigas teriam maior incidência de herbívoros? 4) Esse efeito resulta num maior nível de herbivoria foliar nos ramos com larvas mirmecófagas?

MATERIAL E MÉTODOS

Área de Estudo

O trabalho de campo foi realizado numa área de cerrado da Fazenda Graúna, situada em Itirapina (SP), sudeste do Brasil (22° 15'S, 47° 49'W, 770 m altitude). A vegetação consiste de plantas rasteiras, arbustos e árvores, sendo considerado dentro da fisionomia cerrado *sensu stricto* (Oliveira-Filho & Ratter 2002). O clima da região é caracterizado como Cwa de Köppen (1948), ou seja, mesotérmico com inverno seco. A temperatura média anual é de 19,7°C, sendo que a temperatura média do meses mais frios (Junho-Agosto) é inferior a 18°C e a dos meses mais quentes (Novembro-Março) é superior a 22°C. A precipitação média anual é de 1425 mm, sendo que o total de chuvas no mês mais seco não ultrapassa 30 mm (Dutra-Lutgens 2000). Há uma clara distinção de meses secos, de Maio a Setembro, e meses chuvosos de Outubro a Abril.

Efeito da presença de larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. na visitação por formigas a *Qualea grandiflora*

Experimento 1

Para investigar se a presença de larvas de *Rhinoleucophenga* afeta o tempo de visitação de formigas a *Q. grandiflora*, conduzimos um experimento pareado em Abril de 2011, época em que larvas estão na última fase larval e que corresponde ao final da época chuvosa. Foram marcadas 20 plantas de 0,5 a 2,0 m de altura, havendo pelo menos um ramo infestado por larvas de *Rhinoleucophenga*. Escolhemos as plantas de acordo com a presença de um ramo que tivesse três ou mais larvas nos NEFs (ramo controle). Tendo escolhido a planta com o ramo controle, escolhemos o ramo tratamento dessa planta, sendo que nesse as larvas foram removidas ou naturalmente já estavam ausentes. O ramo

tratamento foi escolhido de acordo com características similares ao ramo controle, tanto com relação ao número de nós, NEFs e folhas quanto de facilidade do acesso de formigas. Os outros ramos não pertencentes ao experimento foram removidos, ou isolados com Tanglefoot® para impedir o acesso de formigas. O tempo em que as formigas permaneciam em cada tipo de ramo era anotado assim que iniciávamos o experimento, finalizando em 10 minutos. Usamos o número total de minutos em que houve formigas em cada ramo como nossa variável resposta. Para analisar se houve diferença no tempo de visitação pelas formigas na presença ou ausência de larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. utilizamos teste t pareado realizado no ambiente R 2.15.2 (R Core Team 2012).

Experimento 2

Para investigar se a presença de larvas mirmecófagas influencia também na quantidade de formigas visitantes, fizemos um experimento entre Novembro de 2012 e Fevereiro de 2013. Foram marcadas 32 plantas com altura entre 0,5 e 2,0 m de acordo com a presença de formigas mutualísticas na planta e com pelo menos um ramo com presença de larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov.. Escolhemos principalmente plantas que eram visitadas por formigas do gênero *Camponotus*, pois esse gênero é conhecido por ser um bom mutualista para plantas do cerrado (Oliveira *et al.* 1987, Sendoya *et al.* 2009), e como queríamos ver o efeito dessa larva mirmecófaga no mutualismo entre *Qualea*-formigas, era necessário que houvesse proteção da planta pelas formigas. O experimento foi realizado de forma pareada, marcando em cada planta dois ramos: um ramo onde as larvas e ovos de *Rhinoleucophenga* sp. nov. eram previamente removidos (tratamento) e outro ramo onde a presença de larvas foi mantida (controle), similar ao método utilizado no experimento 1. Os ramos experimentais tinham entre 12 e 16 NEFs no total e o número de larvas nos ramos controle variou de 2 a 9. Apesar de buscarmos controlar a quantidade de NEFs nos pares de ramos, o número de formigas visitantes pode variar de acordo com o número de NEFs disponíveis, mesmo se a variação for pequena (Nogueira *et al.* 2012). Dessa forma

incluímos o número de NEFs totais por ramo em nossas análises, indicado pelo número de nós (local de inserção das folhas) em cada ramo experimental, sendo que cada nó possui quatro NEFs. Os outros ramos não pertencentes ao experimento foram removidos, ou isolados com Tanglefoot® para impedir o acesso de formigas, duas semanas antes de iniciarmos as contagens. Os ramos experimentais foram selecionados de forma a serem os mais similares possíveis entre eles, tanto com relação à altura e acessibilidade de formigas na planta, quanto de quantidade de folhas e de NEFs ativos. Os registros das formigas foram feitos em intervalos de cerca de 10 dias começando duas semanas depois da montagem do experimento em Novembro de 2012. Os registros foram feitos em três intervalos de horários ao longo do dia, das 09.00 às 12.00 hs, das 14.00 às 17.00 hs e das 20.00 às 23.30 hs, buscando abranger as diferentes espécies que podem visitar as plantas durante o dia e a noite. Durante 10 minutos de observação anotávamos todas as formigas que visitavam cada ramo experimental. Uma vez que os dados eram pareados e repetidos nas mesmas plantas ao longo do tempo, escolhemos fazer a análise com modelo misto generalizado (Generalized linear mixed models – GLMM). Este tipo de análise permite inclusão tanto de efeitos fixos quanto aleatórios, dessa forma permitindo evitar efeito de pseudo-replicação ao considerar o pareamento em cada planta nos efeitos aleatórios (Crawley 2009). O modelo foi feito no ambiente R versão 2.15.2 (R Core Team 2012). Uma vez que nossos dados foram obtidos a partir de contagens, não é possível assumir uma distribuição normal do erro e se ajustam melhor a uma distribuição de Poisson (não houve *overdispersion*). Para nosso grupo de modelos, iniciamos com a variável resposta sendo o número de formigas, o efeito fixo de interesse foi o tratamento do ramo (com ou sem larvas) e o número de nós no ramo, já o efeito aleatório foi o tratamento aninhado a planta e sua repetição ao longo das semanas. Para escolher o melhor modelo explicativo de nossos dados, começamos com o modelo completo (com todas as variáveis preditivas e interações entre elas) e comparamos progressivamente com modelos mais simplificados seguindo Crawley (2009). Os termos

foram considerados sequencialmente, removendo termos do modelo mais complexo conforme o maior valor de significância do teste estatístico. Os modelos foram comparados usando testes de máxima verossimilhança, e aceitando a remoção do termo se esta não causou uma diminuição significativa na verossimilhança do modelo. Os termos de menor ordem (variável individual) foram considerados apenas se os termos correspondentes de ordem superior não estivessem presentes (interação de uma variável com outra). O valor do teste de máxima verossimilhança foi considerado apropriado para nossos dados uma vez que as amostras eram numerosas e o cálculo do grau de liberdade para o teste de Wald é problemático (Bolker *et al.* 2009). Para os modelos utilizamos a função lmer do pacote lme4 (Bates *et al.* 2012).

Efeito da presença de larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. sobre a vulnerabilidade de cupins ao ataque por formigas

Experimento 3

Para esse experimento utilizamos as mesmas 20 plantas do Experimento 1 no qual contamos o tempo de permanência das formigas nas plantas de *Q. grandiflora*, sendo feito simultaneamente (Abril 2011) e considerando também os mesmos ramos controle e tratamento. O comportamento agressivo das formigas foi avaliado usando operários vivos de cupim (*Armitermes* sp.) como iscas para formigas nos pares de ramos experimentais. Cupins vivos já foram utilizados anteriormente para avaliar o comportamento de formigas em *Q. grandiflora* (ver Oliveira *et al.* 1987). Dois cupins foram colocados nas folhas do ápice de cada ramo, totalizando 40 iscas para cada classe de ramos experimentais (com e sem larvas de *Rhinoleucophenga*). Os cupins foram colados pelo dorso na parte basal de cada folha. As formigas não foram atraídas ou repelidas pela cola utilizada (Super Cola Colapel®). O experimento começava 30 segundos após os cupins serem colados e durante 10 minutos contávamos os ataques por

formigas aos cupins. Consideramos que houve agressão aos cupins por formigas quando elas atacavam qualquer um dos dois cupins de cada ramo (mordidas foram consideradas como ataques, não sendo necessária a retirada completa do cupim), sendo o número de ramos onde houve ataque por formigas a variável resposta (caso os cupins fossem removidos pelas formigas, o experimento era interrompido). Para analisar se houve diferença nos ataques aos cupins pelas formigas na presença de larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov., utilizamos teste G realizado no programa BioEstat 5.3® (Ayres *et al.* 2007).

Relação entre presença de larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. e abundância de artrópodes em *Qualea grandiflora*

Experimento 4

Esse experimento foi realizado nas mesmas plantas e ao mesmo tempo do Experimento 2 (número de formigas visitantes, de Novembro de 2012 a Fevereiro de 2013), para determinar se o efeito da presença das larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. sobre o forrageamento de formigas interfere também na presença de outros artrópodes em *Q. grandiflora*. Foram considerados os mesmos ramos controle (com larvas) e tratamento (sem larvas). Prévio ao início dos experimentos todos os artrópodes presentes nas plantas foram removidos e identificados (alguns espécimes serviram como referência para identificação ao longo do experimento). Os registros dos artrópodes foram feitos simultaneamente ao registro das formigas, também em intervalos de cerca de 10 dias, em três intervalos de horários ao longo do dia (das 09.00 às 12.00 hs, das 14.00 às 17.00 hs e das 20.00 às 23.30 hs). Um mesmo artrópode individual contado de dia, não era contado novamente de noite, evitando que nossos dados fossem superestimados. Nesses casos, não contávamos principalmente indivíduos fixos, que tínhamos certeza que era o mesmo de dia e de noite, no caso os artrópodes fixos como aranhas de teia, cochonilhas e ninfas de hemípteros. Cada planta foi inspecionada por 10 minutos, anotando o número de todos os

artrópodes presentes. Uma vez que o efeito de formigas para cada classe de artrópodes pode variar (Nahas *et al.* 2012), os artrópodes registrados foram categorizados em 3 classes: mastigadores, sugadores e predadores (galhadores, parasitóides e minadores estavam em quantidades muito baixas). Para essa categorização utilizamos como referência os artrópodes que foram identificados no início do experimento, e para aqueles que não sabíamos a identidade coletamos um exemplar em outra planta fora do experimento para posterior identificação em laboratório. Incluímos também nesses modelos a variável referente ao número de NEFs no ramo, uma vez que pode ter efeito direto sobre as formigas (Nogueira *et al.* 2012) e indireto da proteção das formigas contra herbívoros na planta.

Para analisar se houve diferença no número de artrópodes de diferentes tipos em ramos controle e tratamento, usamos modelo misto generalizado (Generalized linear mixed models – GLMM) no ambiente R 2.15.2 (R Core Team 2012). Uma vez que nossos dados foram obtidos a partir de contagens, não foi possível assumir uma distribuição normal do erro, se ajustando melhor a uma distribuição de erros em Poisson (não houve *overdispersion*). Fizemos três grupos de modelos de GLMM, um para cada variável resposta considerada como o número de artrópodes de cada classe. Para todos os grupos de modelos iniciamos com os efeitos fixos sendo o tratamento do ramo (com ou sem larvas) e o número de nós por ramo, e como efeito aleatório o tratamento aninhado na planta (par experimental) e sua repetição ao longo das semanas. Seguimos o mesmo procedimento que o experimento 2 para seleção dos modelos (valor de p obtido através da comparação de valores de máxima verossimilhança de cada modelo). Para os modelos utilizamos a função lmer do pacote lme4 (Bates *et al.* 2012).

Relação entre presença de larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. e herbivoria foliar em *Qualea grandiflora*

Experimento 5

Para avaliar se a presença das larvas altera indiretamente o nível de herbivoria na planta, registramos a área foliar removida mensalmente nas mesmas plantas dos Experimentos 2 e 4 (abundância de formigas e artrópodes visitantes, Novembro de 2012 a Fevereiro de 2013), porém utilizamos 25 das 32 plantas, buscando usar apenas as plantas experimentais iniciadas no mesmo período. Foram considerados os mesmos ramos controle (com larvas) e tratamento (sem larvas). A área foliar removida por herbívoros foi medida para cada uma das folhas de cada ramo experimental, a intervalos de um mês entre cada medida a partir do início do experimento em Novembro de 2012 (totalizando quatro medidas). Para isto foram tiradas fotos individualmente de todas as folhas de cada ramo experimental com câmera Nikon D5100®, utilizando folha transparente milimetrada de fundo para ser utilizada como escala. As fotos foram então analisadas usando o programa Image J® (Rasband 1997-2012), através do qual foi possível medir a área foliar presente em cada caso e a área consumida por herbívoros (herbivoria causada por insetos sugadores não é considerada neste método, já que não produz dano aparente). Com esse programa conseguimos delimitar a região que desejamos obter a área. Para medir a área foliar que havia sido removida na borda das folhas (que pode influenciar no formato da folha), utilizamos o padrão foliar da espécie como referência para a delimitação da área a ser medida. No início do experimento (Novembro) não havia diferença na área de herbivoria de ramos com e sem larvas (Teste Wilcoxon: $Z_{24,1}=0,973$, $P=0,3304$) e nem na área foliar dos ramos experimentais ($Z_{24,1}=1,2$, $P=0,2301$).

Fizemos também modelo misto generalizado (GLMM) para analisar se houve diferença na área foliar removida por herbívoros na presença de larvas de *Rhinoleucophenga*. Nesse modelo, utilizamos a distribuição dos erros em Gamma. Como variável resposta utilizamos a soma da área foliar removida por herbivoria de todas as folhas de cada ramo experimental dividido pela soma das áreas foliares totais de cada ramo. Desta forma a área total de herbivoria foi calculada para cada ramo em cada intervalo de

tempo, totalizando três medidas de herbivoria (Dezembro, Janeiro e Fevereiro). Neste modelo foi considerado como fator fixo a área de herbivoria por grupo experimental (controle e tratamento) e como fator aleatório o tratamento aninhado às plantas ao longo dos meses (de Dezembro a Fevereiro). Esta análise foi feita no ambiente R 2.15.2 (R Core Team 2012), seguindo protocolo em Crawley (2009). Para esse modelo utilizamos a função `glmmadmb` do pacote `glmmADMB` (Skaug *et al.* 2013).

RESULTADOS

Efeito da presença de larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. na visitação por formigas a *Qualea grandiflora*

Com o Experimento 1, foi constatado que as formigas que visitam *Q. grandiflora* permanecem menos tempo nos ramos infestados por larvas de *Rhinoleucophenga* do que nos ramos sem *Rhinoleucophenga* (Figura 3; $t_{19,1}=2,6$, $P=0,017$), sendo que nos ramos sem larvas as formigas permaneceram em média mais do que o dobro do tempo do que nos ramos com larvas.

No Experimento 2, ao longo das 8 amostragens foram registradas 986 formigas, sendo 639 no ramo sem larvas e 347 no com larvas (Tabela 1). O modelo mais parcimonioso selecionado para explicar a variação do número de formigas foi aquele que inclui apenas a variável tratamento (presença de larvas) (Tabela 2). As estimativas deste modelo indicam que em ramos sem larvas foi registrada uma maior quantidade de formigas do que em ramos com larvas mirmecófagas (Tabela 2, Figura 4).

Efeito da presença de larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. sobre o ataque de formigas a cupins vivos

O ataque de formigas a cupins vivos foi menor nos ramos infestados por *Rhinoleucophenga* do que sem larvas de *Rhinoleucophenga* (Figura 5; $G_{19,1}=7,10$, $P<0,01$). Na presença de larvas houve três ramos cujos cupins foram atacados, enquanto que na ausência dessas larvas houve 12 ramos com cupins atacados por formigas (20 ramos em cada tipo experimental).

Relação entre presença de larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. e abundância de artrópodes em *Qualea grandiflora*

Dentre os insetos mastigadores amostrados (Tabela 1) os dois mais abundantes foram besouros da família Chrysomelidae (27,5% dos indivíduos) e lagartas *Compsolechia* (Lepidoptera, Gelechiidae) (18,4%). Dentre os sugadores, os dois mais abundantes foram cochonilhas (Hemiptera) representando 51,4% dos insetos observados, seguidas de 20,5% de Cicadellidae (Hemiptera). Aranhas (Aracnida) representaram 92,9% dos artrópodes predadores.

O modelo mais parcimonioso para a classe de herbívoros mastigadores foi aquele que incluiu apenas a variável tratamento (presença de larvas) (Tabela 2). A classe de herbívoros mastigadores ocorreu com maior abundância nos ramos infestados por larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. do que em ramos sem larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. (Tabela 2, Figura 6). Para herbívoros sugadores e artrópodes predadores o modelo selecionado foi o modelo nulo, sendo que nenhuma variável preditora incluída influenciou no número desses artrópodes (Tabela 2).

Relação entre presença de larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. e herbivoria foliar em *Qualea grandiflora*

Encontramos maior proporção de área foliar removida por herbívoros em ramos infestados por larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. do que em ramos sem larvas (Figura 7; $Z_{30,1}=2.09$, $P=0.037$). Nos

meses expostos a herbivoria, ramos com larvas tiveram em média 1,25 vezes maior proporção de herbivoria do que nos ramos sem larvas (média de 0,022 e 0,017 respectivamente).

DISCUSSÃO

Nossos dados mostram que a presença de larvas de *Rhinoleucophenga* predadoras de formigas visitantes de *Q. grandiflora* diminui o número de formigas forrageadoras e o tempo que essas permaneçam nas plantas, ocasionando em menos ataques por formigas a cupins (herbívoros simulados) na folhagem. Esse efeito sobre o forrageamento e ataque por formigas também influenciou os herbívoros encontrados em *Qualea grandiflora*, uma vez que em ramos com larvas houve maior abundância de herbívoros mastigadores. Por fim, esse maior número de herbívoros mastigadores ocasionou em maior dano foliar na presença de larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. Oliveira *et al.* (1987) demonstraram que formigas atacam com maior frequência herbívoros simulados (cupins) em *Qualea grandiflora* do que em plantas vizinhas sem nectários extraflorais, e Costa *et al.* (1992) demonstraram também que há menor dano por herbivoria em árvores de *Q. grandiflora* com visitação por formigas do que quando essas são excluídas. Del Claro *et al.* (1996) além de demonstrarem efeitos similares em *Qualea multiflora*, também mostraram uma maior produção de frutos na presença de formigas devido à redução na herbivoria. Recentemente, Nahas *et al.* (2012) demonstraram para *Q. multiflora* um efeito cascata na presença de formigas e aranhas, que estariam agindo como predadores de topo nessa interação. No presente estudo, demonstramos que a proteção de formigas contra herbívoros em *Q. grandiflora* pode ser afetada pela presença de um predador de topo (larvas de *Rhinoleucophenga*), que se alimenta das formigas e outros insetos visitantes, causando um efeito cascata positivo sobre herbívoros e consequentemente sobre o dano destes à planta.

Apesar desse efeito positivo na abundância de herbívoros mastigadores, não encontramos efeito sobre predadores nem herbívoros sugadores na presença de *Rhinoleucophenga* sp. nov. No caso de predadores (na grande maioria aranhas), é possível que esses artrópodes não sejam afetados pelas formigas visitantes de *Q. grandiflora*. É possível ainda que alguns destes predadores, como as aranhas, também se alimentem das formigas (Letourneau & Dyer 1998, Izzo & Vasconcelos 2005). Além disso, interação entre formigas e outros predadores pode ser muito variável, dependendo da identidade e da atividade de forrageamento de ambos (Nahan *et al.* 2012). Já com relação aos herbívoros sugadores, composto principalmente por cochonilhas e cicadelídeos, a ausência de efeito pode ser devido à produção de exsudados e associação com formigas (Stadler & Dixon 2008). Observamos em algumas plantas, formigas atendendo essas cochonilhas que se encontravam em grande quantidade nos ramos. A associação desses hemípteros com formigas pode ter efeito positivo ou neutro tanto para a planta como para os próprios hemípteros, dependendo principalmente se as formigas estão protegendo esses herbívoros contra seus inimigos naturais (Stadler & Dixon 2008). Nesse caso, aparentemente o efeito foi neutro, já que não encontramos variação na abundância dessa classe de herbívoros na presença de larvas mirmecófagas. Também não encontramos efeito do número de NEFs (indicado pelo número de nós) na abundância de artrópodes nas plantas. Como buscamos escolher pares com números semelhantes de NEFs, a baixa variação desse número parece não ter influenciado na atratividade de formigas aos ramos. O efeito do número de NEFs na visitação de formigas depende também do sistema de estudo (Nogueira *et al.* 2012). Além disso, a intensidade de visitação de formigas numa planta pode não ser determinada pela quantidade de NEFs totais, mas sim pelo número dos NEFs que estariam ativos.

Exploradores do mutualismo são indivíduos que utilizam o recurso e/ou serviço oferecido na interação mutualística sem dar nada em troca (Bronstein 2001, Yu 2001). *Rhinoleucophenga* sp. nov está agindo como explorador do mutualismo formigas-*Qualea* uma vez que utiliza o néctar extrafloral de

Qualea grandiflora para consumo próprio e atração de presas (Capítulo 01), mas não a defende em troca. Além de ser exploradora do mutualismo formigas-*Qualea*, está agindo também como predador de topo, ao se alimentar de formigas e outros insetos visitantes da planta. Predadores que se alimentam de membros do mutualismo podem afetar também a associação mutualística, por exemplo nos mutualismos de polinização envolvendo abelhas que evitam visitar flores ocupadas por aranhas, reduzindo a aptidão das plantas (Dukas 2001, Gonçalves-Souza *et al.* 2008). Nosso estudo é similar ao caso descoberto por Letourneau (1990), em que um besouro (*Tarsobaenus*, Cleridae) predador de formigas mutualísticas se alimenta também dos corpos perolados oferecidos pela planta no mutualismo *Pheidole-Piper*. Além do besouro preda formigas visitantes e se alimentar do recurso oferecido, a presença desse predador tem um efeito “top-down” sobre a comunidade de artrópodes associada à *Piper*, diminuindo o número de formigas, aumentando o número de herbívoros na planta e diminuindo também a ocorrência de *Piper* na região em que ocorre (Letourneau & Dyer 1998). Assim como nesse caso, as larvas de *Rhinoleucophenga* estão agindo tanto como um predador de topo como explorador do mutualismo formigas-*Qualea*, tendo efeito cascata negativo para ambos os parceiros mutualísticos (veja Bronstein 2001).

O efeito predatório de *Rhinoleucophenga* pode variar para cada espécie de formiga, sendo que indivíduos menores, como do gênero *Brachymyrmex*, podem estar mais suscetíveis a ficarem presos aos abrigos do que indivíduos maiores. *Camponotus*, por exemplo, sendo formigas maiores possivelmente só servem de presas para larvas grandes (Capítulo 1, M.C. Vidal observações pessoais). Como nem todas as formigas visitantes acabam presas ao abrigo, o efeito das larvas de *Rhinoleucophenga* no forrageamento de formigas pode ser indireto. Ramos com larvas podem ser evitados principalmente por dois motivos: ter acesso prejudicado ao recurso oferecido pela planta, e/ou ser um local de perigo para formigas visitantes. Formigas podem diminuir ou cessar o forrageamento em regiões que oferecem

perigo, alterando sua atividade para locais mais seguros (Nonacs 1990). Foi demonstrado que *Pogonomyrmex* para completamente sua atividade de forrageamento na presença de aranhas, apesar da baixa taxa de predação (MacKey 1982). Considerando o caso de *Rhinoleucophenga* sp. nov., sendo a taxa de predação também baixa, esse efeito na diminuição do forrageamento por formigas pode ser devido a ramos com larvas de *Rhinoleucophenga* apresentarem risco para as formigas.

Alguns fatores podem mediar a percepção de perigo pelas formigas em alguns ramos, fazendo com que elas os evitem. A presença de cadáveres de formigas grudados ao abrigo pode funcionar como um indicativo de perigo potencial, diminuindo o acesso de formigas ao recurso (Nonacs & Dill 1988), assim como ocorre com abelhas (Dukas 2001). Além disso, formigas que eventualmente acabam presas ao abrigo podem liberar pistas químicas, sinalizando perigo (Wilson 1965, Hölldobler & Wilson 1990). Devemos considerar também que nem todos os indivíduos que ficam grudados acabam servindo de alimento as larvas, alguns eventualmente conseguem escapar dessa armadilha (M.C. Vidal, observações pessoais). Esses que escapam podem aprender que naquele local há perigo e não retornarem mais, podendo inclusive avisar outros membros da colônia (Nonacs 1990). Além desses riscos de mortalidade impostos pelas larvas, a presença delas pode estar também dificultando o acesso dos visitantes ao néctar extrafloral. Apesar da glândula continuar ativa após a instalação das larvas e essas continuarem expondo o néctar na abertura de seus abrigos, o recurso não fica completamente exposto e sua concentração pode estar alterada (Capítulo 1). Dessa forma, locais com larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. poderiam representar perigo e menor qualidade do recurso alimentar, diminuindo o forrageamento de formigas a esse local (Nonacs & Dill 1988, Nonacs 1990).

Espécies exploradoras podem ocasionar um efeito negativo na persistência do mutualismo, já que utilizam o recurso oferecido nessa interação sem oferecer nenhum benefício em troca, podendo ocasionar em redução da aptidão dos parceiros mutualísticos (Bronstein 2001). Entretanto, o efeito dos

exploradores sobre a estabilidade do mutualismo e sobre seus parceiros pode variar de acordo com diversos fatores, podendo ser extremamente negativo em algumas interações e neutro em outras (Bronstein 2001, Ferriere *et al.* 2002, Morris *et al.* 2003). No caso do mutualismo facultativo formiga-planta, por exemplo, muitas vezes não há redução de aptidão para plantas quando exploradas por formigas não-mutualísticas (i.e., pouco agressivas a herbívoros), além disto, o custo de produção de néctar extrafloral geralmente é baixo (Bronstein 2001). Porém, os exploradores mais custosos para o mutualismo podem ser aqueles que acabam matando um dos parceiros do mutualismo. Dessa forma, no caso do explorador *Rhinoleucophenga* sp. nov., o efeito sobre o mutualismo formiga-*Qualea grandiflora* é relevante, uma vez que o díptero preda formigas mutualísticas agressivas, como *Camponotus* spp. (Oliveira *et al.* 1987, Sendoya *et al.* 2009), consequentemente reduzindo o patrulhamento das folhas e a proteção contra herbívoros na planta.

Entretanto, o efeito positivo da redução de herbivoria por formigas não necessariamente resulta em efeito positivo para o desempenho reprodutivo das plantas (Oliveira 1997, Trager *et al.* 2011, Chamberlain & Holland 2009). Isso pode ocorrer por diversos fatores, como no caso em que formigas defendem a planta contra herbívoros foliares e não contra herbívoros florais, ou quando formigas acabam por afugentar possíveis polinizadores (Trager *et al.* 2011). Considerando que a evolução e manutenção do mutualismo são dependentes da vantagem na aptidão obtida nessa interação pelos membros envolvidos, a inferência sobre a persistência dessa interação baseando-se apenas no efeito do mutualismo formiga-planta sobre a herbivoria pode ser superficial. Não havendo efeito sobre o desempenho da planta, a presença de um explorador pode não ter grande efeito sobre a persistência do mutualismo. É possível que a presença de formigas influencie positivamente a reprodução de *Qualea grandiflora* assim como demonstrado para *Qualea multiflora* (Del Claro *et al.* 1996). Entretanto, para plantas ainda pequena ou em desenvolvimento é provável que os benefícios anti-herbivoria decorrentes

da interação com formigas sejam apenas na proteção de órgãos vegetativos (veja Oliveira 1997, Heil *et al.* 2001).

Além do efeito do explorador *Rhinoleucophenga* sobre as plantas, devemos considerar também o efeito do díptero nas formigas. Com relação a formigas, sendo insetos eusociais, o benefício deve ser medido em relação à aptidão da colônia (Hölldobler & Wilson 1990). Poucos estudos demonstram o real efeito de NEFs para colônias de formigas, e apenas inferem que deve haver benefício devido ao recurso alimentar obtido (Cushman & Beattie 1991, mas veja Lach *et al.* 2009, Byk & Del-Claro 2011, Lanan & Bronstein 2013). O efeito do explorador mirmecófago *Rhinoleucophenga* sp. nov. sobre as colônias de formigas pode variar, dependendo de quantas formigas de uma mesma colônia estaria sendo afetada por esse predador e do tamanho de suas colônias. Já que o mutualismo formiga-*Qualea* é de caráter facultativo, formigas de diferentes colônias podem visitar uma mesma planta, sendo mais difícil mensurar o real efeito do explorador sobre as colônias dessas visitantes (Cushman & Beattie 1991).

Em conclusão, nossos dados experimentais confirmam que larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. atuam como predadoras de topo e exploradoras do mutualismo entre *Qualea grandiflora* e formigas. O díptero utiliza o recurso oferecido pela planta (nectário extrafloral) para a construção do abrigo larval, e como meio para interagir e capturar formigas que visitam a planta em busca de alimento e são posteriormente consumidas. A predação pelas larvas do díptero afeta significativamente o patrulhamento das formigas visitantes às folhas da planta, resultando num aumento do número de herbívoros mastigadores e conseqüente acréscimo de dano foliar. Nosso estudo ilustra a complexidade das interações formiga-planta-herbívoro em cerrado, revelando como uma espécie exploradora de um recurso pode afetar significativamente os vários efeitos diretos e indiretos de um sistema multitrófico, alterando substancialmente o resultado final de uma associação mutualística formiga-planta.

REFERÊNCIAS

- Ayres, M., Ayres Júnior, M., Ayres, D.L. & Santos, A.A. 2007. BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Ong Mamiraua. Belém, PA.
- Barton, A.M. 1986. Spatial variation in the effect of ants on an extrafloral nectary plant. *Ecology* 67: 495–504.
- Bates, D., Maechler, M. & Bolker B. 2012. lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4 classes. R package version 0.999999-0. <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>
- Beattie, A.J. 1985. The evolutionary ecology of ant-plant mutualism. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Bentley, B.L. 1977. Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards. *Annual Review on Ecology and Systematic* 8: 407-427.
- 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 and Evolution* 24:127-135.
- Bronstein, J.L. 1998. The contribution of ant-plant protection to our understanding of mutualism. *Biotropica* 30: 150-161.
- Bronstein, J.L. 2001. The exploitation of mutualisms. *Ecology Letters* 4: 277-287.
- Bronstein, J.L., Alarcón, R. & Geber, M. 2006. The evolution of plant-insect mutualism. *New Phytologist* 172: 412-428.
- Byk, J. & Del-Claro, K. 2011. Ant-plant interaction in the neotropical savanna: direct beneficial effects of extrafloral nectar on ant colony fitness. *Population Ecology* 53: 327-332.
- Chamberlain, S.A. & Holland, J.N. 2009. Quantitative synthesis of context dependency in ant-plant protection mutualisms. *Ecology* 90:2384-2392.
- Cogni, R., Freitas, A.V.L. & Oliveira, P.S. 2003. Interhabitat differences in ant activity on plant foliage: ants at extrafloral nectarines of *Hibiscus pernambucensis* in sandy and mangrove forests. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 107: 125–131.
- Costa, F.M.C.B., Oliveira-Filho, A.T & Oliveira, P.S. 1992. The role of extrafloral nectaries in *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae) in limiting herbivory: an experiment of ant protection in cerrado vegetation. *Ecological Entomology* 17: 363-365.
- Crawley, M.J. 2009. The R Book. Wiley Press, Inglaterra.

- Cushman, J.H. & Beattie, A.J. 1991.** Mutualism: assessing the benefits to hosts and visitors. *Trends in Ecology and Evolution* 6: 193-195.
- Del Claro, K., Berto, V. & Réu, W. 1996.** Effect of herbivore deterrence by ants on the fruit set of an extrafloral nectary plant, *Qualea multiflora* (Vochysiaceae). *Journal of Tropical Ecology* 12: 887-892.
- DeVries, P.J. & Baker, I. 1989.** Butterfly exploitation of an ant-plant mutualism: adding insult to herbivory. *Journal of New York Entomology Society* 97: 332-340.
- Díaz-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.
- Dukas, R. 2001.** Effects of perceived danger on flower choice by bees. *Ecology Letters* 4: 327-333.
- Dutra-Lutgens, H. 2000.** Caracterização ambiental e subsídios para o manejo da zona de amortecimento da Estação Experimental e Ecológica de Itirapina-SP. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Ferriere, R., Bronstein, J.L., Rinaldi, S., Law, R. & Gauduchon, M. 2002.** Cheating and the evolutionary stability of mutualisms. *Proceedings of the Royal Society of London B* 269: 773-780.
- Freitas, A.V.L. & Oliveira, P.S. 1996.** Ants as selective agents on herbivore biology: effects on behavior of a non-myrmecophilous butterfly. *Journal of Animal Ecology* 65: 205-210
- Gibbs, P.E., Leitão-Filho, H.F. & Shepherd, G.J. 1983.** Floristic composition and community structure in an area of cerrado in SE Brazil. *Flora* 173: 433-449.
- Gonçalves-Souza, T., Omena, P.M., Souza, J.C. & Romero, G.Q. 2008.** Trait-mediated effects on flowers: artificial spiders deceive pollinators and decrease plant fitness. *Ecology* 89: 2407-2413.
- Heads, P.A. & Lawton, J.H. 1985.** Bracken, ants and extrafloral nectaries. III. 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 defense: short- and long-term studies of antiherbivore protection via mutualistic ants. *Oecologia* 126: 395-403.
- Heil, M. 2008.** Indirect defense via tritrophic interactions. *New Phytologist* 178: 41-61.
- Heil, M. 2011.** Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends in Plant Science* 16:190-200.

- Hölldobler, B. & Wilson, E.O. 1990.** The Ants. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Mass, USA.
- Horvitz, C.C. & Schemske, D.W. 1984.** Effects of ants and an ant-tended herbivore on seed production of a neotropical herb. *Ecology* 65: 1369-1378.
- Inouye, D.W. & Taylor, O.R. 1979.** A temperate region plant-ant-seed predator system: consequences of extrafloral nectar secretion by *Helianthella quinquenervis*. *Ecology* 60: 1-7.
- Izzo TJ & Vasconcelos HL, 2005.** Ants and plant size shape the structure of the arthropod community of *Hirtella myrmecophila*, an Amazonian ant-plant. *Ecological Entomology* 30: 650-656.
- Janzen, D.H. 1975.** *Pseudomyrmex nigropilosa*: a parasite of a mutualism. *Science* 188: 936-937.
- Köppen, W. 1948.** *Climatologia*. Fondo de Cultura Económica, Buenos Aires (Trad. de Guendriiss du Klimakunde, 1923).
- Koptur, S. 1984.** Experimental evidence for defense of *Inga* (Mimosoideae) saplings by ants. *Ecology* 65: 1787–1793.
- Koptur, S. 1992** Extrafloral nectary-mediated interactions between insects and plants. Em: *Insect Plant Interactions*, vol.IV. Editado por Bernays, E. CRC Press, Boca Raton, EUA.
- Koptur, S. 2005.** Nectar as fuel for plant protectors. Em: *Plant-provided food for carnivorous insects*. Editado por Wäckers, F.L, van Rijn, P. C.J. & Bruin, J. Cambridge University Press.
- Lach, L. Hobbs, E.R. & Majer, E.J.D. 2009.** Herbivory-induced extrafloral nectar increases native and invasive ant worker survival. *Population Ecology* 51: 237-243.
- Lanan, M.C. & Bronstein, J.L. 2013.** An ant's-eye view of an ant-plant protection mutualism. *Oecologia*: 1-12.
- Letourneau, D.K. 1990.** Code of ant-plant mutualism broken by parasite. *Science* 248: 215-217.
- Letourneau D.K. & Dyer A.L. 1998.** Density patterns of *Piper* ant-plants and associated arthropods: top-predator trophic cascades in a terrestrial system? *Biotropica* 30: 162-169.
- MacKey, W.P. 1982.** The effect of predation of western widow spiders (Araneae: Theridiidae) on harvester ants (Hymenoptera: Formicidae). *Oecologia* 53: 406-411.
- Meehan, C.J., Olson, E.J., Reudink, M.W., Kyser, T.K., & Curry, R.L. 2009.** Herbivory in a spider through exploitation of an ant-plant mutualism. *Current Biology* 19: 892-893.

- Morris, W.F., Bronstein, J.L. & Wilson, W.G. 2003.** Three-way coexistence in obligate mutualism-exploiter interactions: the potential role of competition. *The American Naturalist* 161: 860-875.
- Nahas, L., Gonzaga, M.O. & Del-Claro. 2012.** Emergent impacts of ant and spider interactions: herbivory reduction in a tropical savanna tree. *Biotropica* 44: 498-505.
- Nogueira, A., Guimarães, E., Machado, S.R. & Lohmann, L.G. 2012.** Do extrafloral nectaries present a defensive role against herbivores in two species of the family Bignoniaceae in neotropical savannas? *Plant Ecology* 213: 289-301.
- Nonacs, P. 1990.** Death in the distance: mortality risk as information for foraging ants. *Behavior* 112: 23-35.
- Nonacs, P. & Dill, L.M. 1988.** Foraging response of the ant *Lasius pallitarsis* to food sources with associated mortality risk. *Insectes Sociaux* 35: 293-303.
- Oliveira-Filho, A.T. & Ratter, J.A. 2002.** Vegetation physiognomies and woody flora of the cerrado biome. Em: *The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna*. Editado por Oliveira, P.S. & Marquis, R.J.. Columbia University Press, New York.
- Oliveira, P.S. 1997.** The ecological function of extrafloral nectaries: herbivore deterrence by visiting ants and reproductive output in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae). *Functional Ecology* 11: 323-330.
- Oliveira, P.S. & Leitão-Filho, H.F. 1987.** Extrafloral nectaries: Their taxonomic distribution and abundance in the woody flora of cerrado vegetation in Southeast Brazil. *Biotropica* 19: 140-148.
- Oliveira, P.S., Silva, A.F. & Martins, A.B. 1987.** Ant foraging in extrafloral nectaries of *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae) in cerrado vegetation: ants as potential anti-herbivore agents. *Oecologia* 74: 228-230.
- Oliveira, P.S. & Brandão, C.R.F. 1991.** The ant community associated with extrafloral nectaries in Brazilian cerrados. Em: *Ant-Plant Interactions*. Editado por Cutler, D.F. & Huxley, C.R. Oxford University Press, Oxford.
- Oliveira, P.S. & Oliveira-Filho, A.T. 1991.** Distribution of extrafloral nectaries in the woody flora of tropical communities in Western Brazil. Em: *Plant-Animal Interactions: Evolutionary Ecology in Tropical and Temperate Regions*. Editado por Price, P.W., Lewinsohn, T.M., Fernandes G.W. & Benson W.W. John Wiley & Sons, New York.
- Oliveira, P.S. & Freitas A.V.L. 2004.** Ant-plant-herbivore interactions in the neotropical cerrado savanna. *Naturwissenschaften* 91: 557-570.

- Raine, N.E., Gammans, N., Macfadyen, I.J., Scrivner, G.K. & Stone, G.N. 2004.** Guards and thieves: antagonistic interactions between two ant species coexisting on the same ant-plant. *Ecological Entomology* 29: 345-352.
- Rasband, W.S. 1997-2012.** ImageJ. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, URL <http://imagej.nih.gov/ij/>
- R Core Team. 2012.** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>
- Rico-Gray, V. & Oliveira, P.S. 2007.** The ecology and evolution of ant-plant interactions. The University of Chicago Press, Chicago, USA.
- Rosumek, F.B., Silveira, F.A.O., Neves, F.S., Barbosam N.P.U., Diniz, L., Oki, Y., Pezzini, F., Fernandes, G.W. & Cornelissen, T. 2009.** Ants on plants: a meta-analysis of the role of ants as plant biotic defenses. *Oecologia* 160: 537-549.
- Schmitz, O.J., Krivan, V. & Ovadia, O. 2004.** Trophic cascades: the primacy of trait-mediated indirect interactions. *Ecology Letters* 7, 153-163.
- Sendoya, S. F., Freitas, A. V. L. & Oliveira, P. S. 2009.** Egg-laying butterflies distinguish predaceous ants by sight. *American Naturalist* 174:134–140.
- Skaug, H., Fournier, D., Nielsen, A., Magnusson, A. & Bolker, B. 2013.** Generalized linear mixed modelis using AD model builder. R package version 0.7.4.
- Stadler, B. & Dixon, T. 2008.** Mutualism: ants and their insect partners. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Stephenson, A.G. 1982.** The role of the extrafloral nectaries of *Catalpa speciosa* in limiting herbivory and increasing fruit production. *Ecology* 63: 663-669.
- Tilman, D. 1978.** Cherries, ants and tent caterpillars: timing of nectar production in relation to susceptibility of caterpillars to ant predation. *Ecology* 59: 686–692.
- Trager, M.D., Bhotika, S., Hostetles, J.A., Andrade, G.V., Rodriguez-Cabal, M.A., McKeon, S., Osenberg, C.W. & Bolker, B.M. 2010.** Benefits for plants in ant-plant protective mutualism: a meta-analysis. *Plos One* 5:1-9.
- Weber, M.G. & Keeler, K.H. 2012.** The phylogeny distribution of extrafloral nectaries in plants. *Annals of Botany*: 1-11.
- Wilson, E.O. 1965.** Chemical communication in the social insects. *Science* 149: 1064-1071.
- Yu, D.W. 2001.** Parasites of mutualisms. *Biological Journal of the Linnean Society* 72: 529-546.

Tabela 1: Número de indivíduos de cada classe de artrópode encontrado nos experimentos 2 e 4 nas 8 amostragens (n=462 medidas, 231 em cada ramo experimental).

	Média por ramo (± Erro Padrão)	Média por ramo com larva (± E.P.)	Média por ramo sem larva (± E.P.)	Total
Formigas	1,926 (±0,211)	1,355 (±0,22)	2,496 (±0,214)	986
Predadores	1,002 (±0,049)	0,957 (±0,085)	1,047 (±0,097)	513
Sugadores	5,129 (±0,384)	5,621 (±0,178)	4,637 (±0,189)	2626
Mastigadores	0,666 (±0,044)	0,762 (±0,126)	0,570 (±0,121)	341

Tabela 2: Resultado da seleção de modelos preditores da quantidade de artrópodes visitantes de *Qualea grandiflora* de acordo com a presença de *Rhinoleucophenga* sp. nov. nos ramos. Foram utilizadas as seguintes variáveis predictoras: Ramos com larvas – tratamento (T) e número de nós no ramo (Nós). As interações ou variáveis foram removidas do modelo de acordo com os maiores valores de significância dos testes estatísticos. O símbolo de divisão (:) mostra a interação entre as variáveis. Valores do coeficiente foram estimados apenas para variáveis que foram mantidas nos modelos mais parcimoniosos. Valores de *P* menores que 0,05 estão marcados com asterisco (*).

Grupo de teste	Interações e/ou variáveis	Coefficiente (±Erro Padrão)	Valor de X ²	Valor de <i>P</i>	Efeito removido?
Formigas	Intercepto	0,273 (±0,169)			
	T:Nós	-	0.427	0.513	Sim
	Nós	-	1.208	0.271	Sim
	T	-0,473 (±0,214)	4.322	0.037*	Não
Mastigadores	Intercepto	0,719 (±0,139)			
	T:Nós	-	0.934	0.334	Sim
	Nós	-	1.171	0.279	Sim
	T	0,271 (±0,121)	4.366	0.037*	Não
Sugadores	Intercepto	0,888 (±0,124)			
	T:Nós	-	0.006	0.94	Sim
	T	-	8x10 ⁻⁴	0.98	Sim
	Nós	-	1.922	0.166	Sim
Predadores	Intercepto	-0,066 (±0,078)			
	T:Nós	-	0.290	0.590	Sim
	Nós	-	0.199	0.655	Sim
	T	-	1.182	0.277	Sim

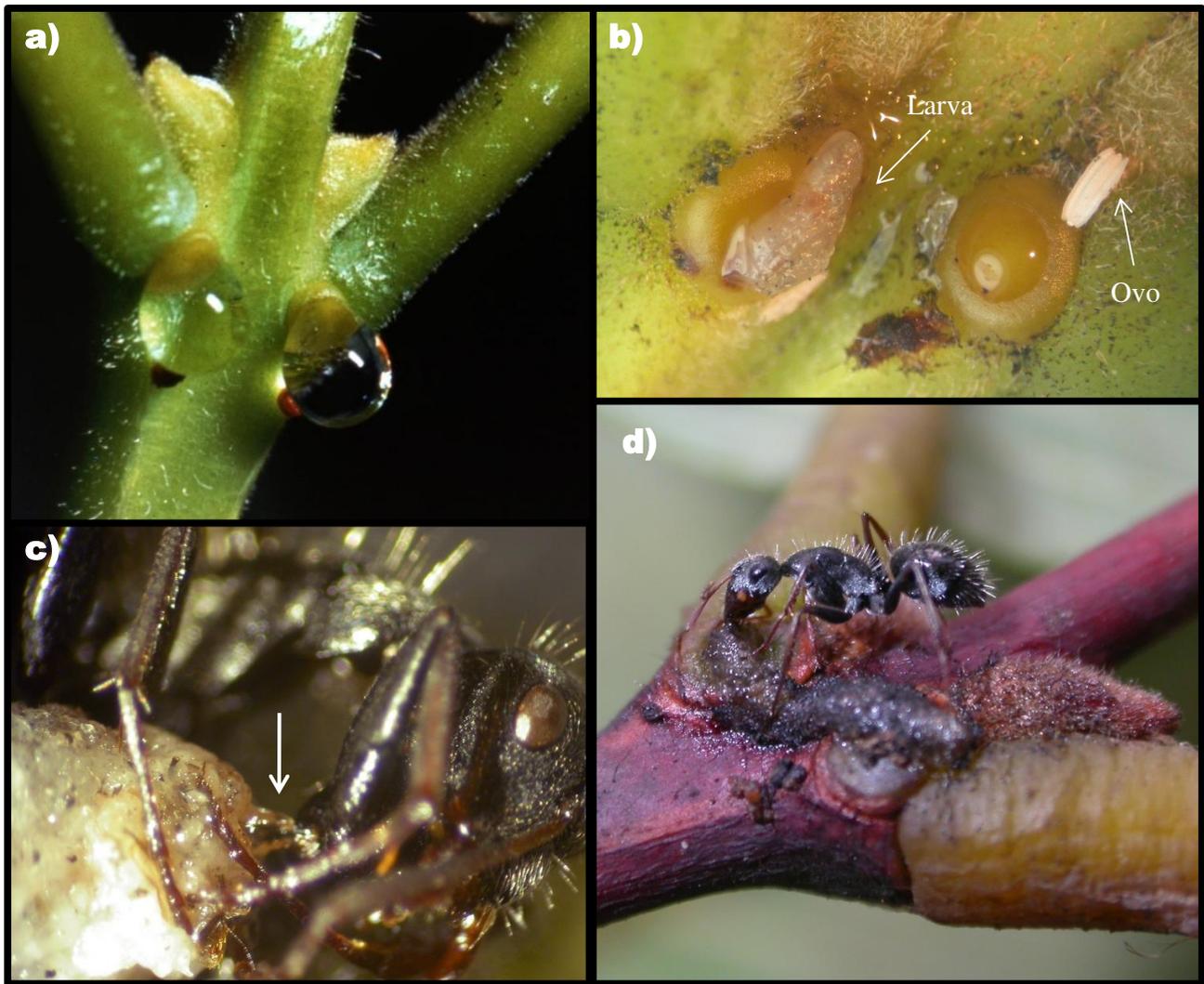


Figura 1: a) Par de nectários extraflorais de *Qualea grandiflora* com secreção de néctar; b) Ovo e larva de *Rhinoleucophenga* sp. nov em nectários extraflorais de *Q. grandiflora*; c) *Rhinoleucophenga* sp. nov se alimentando de conteúdo interno de *Camponotus*, a seta indica a região cefalofaríngea da larva para fora de seu abrigo; d) *Camponotus crassus* presa ao abrigo de *Rhinoleucophenga* sp. nov, o qual está ocupando os dois nectários da *Qualea*.

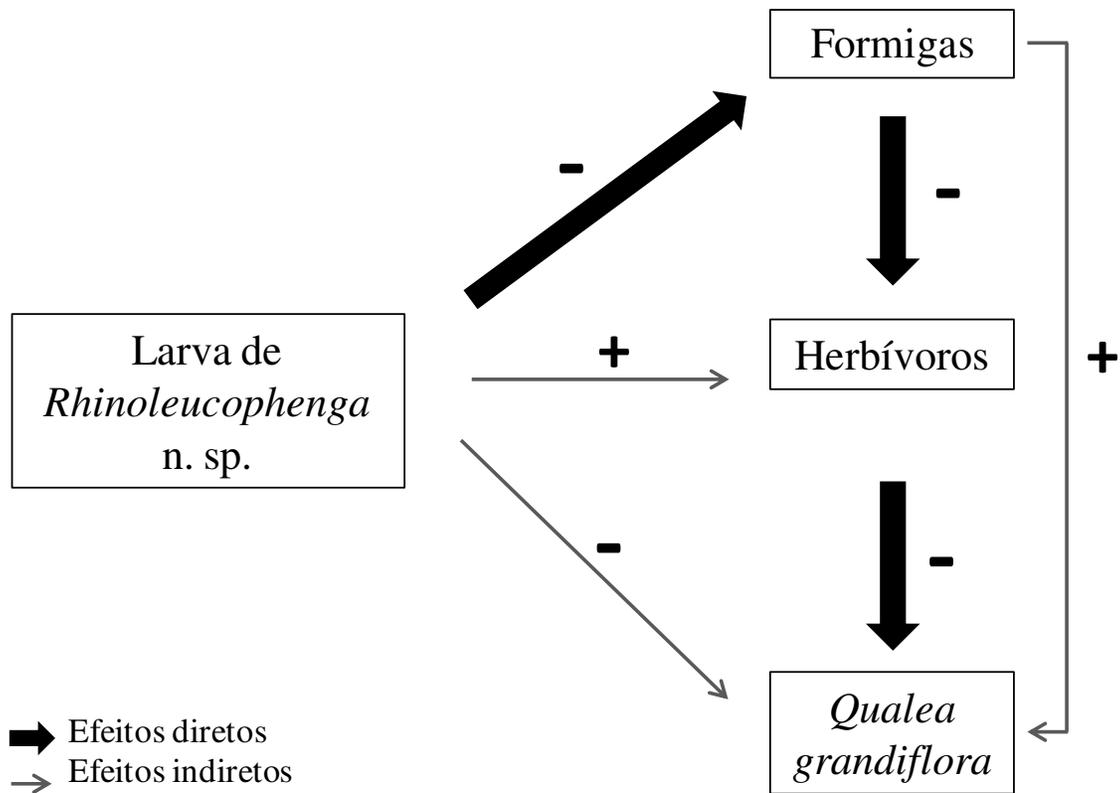


Figura 2: Fluxograma dos efeitos diretos e indiretos de larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. sobre o sistema formigas-*Qualea grandiflora* em que estão inseridas. Flexas mais escuras indicam efeitos diretos e flechas mais claras efeitos indiretos. Sinal positivo (+) indica efeitos positivos no outro nível trófico, enquanto que sinal negativo (-) indica efeitos negativos.

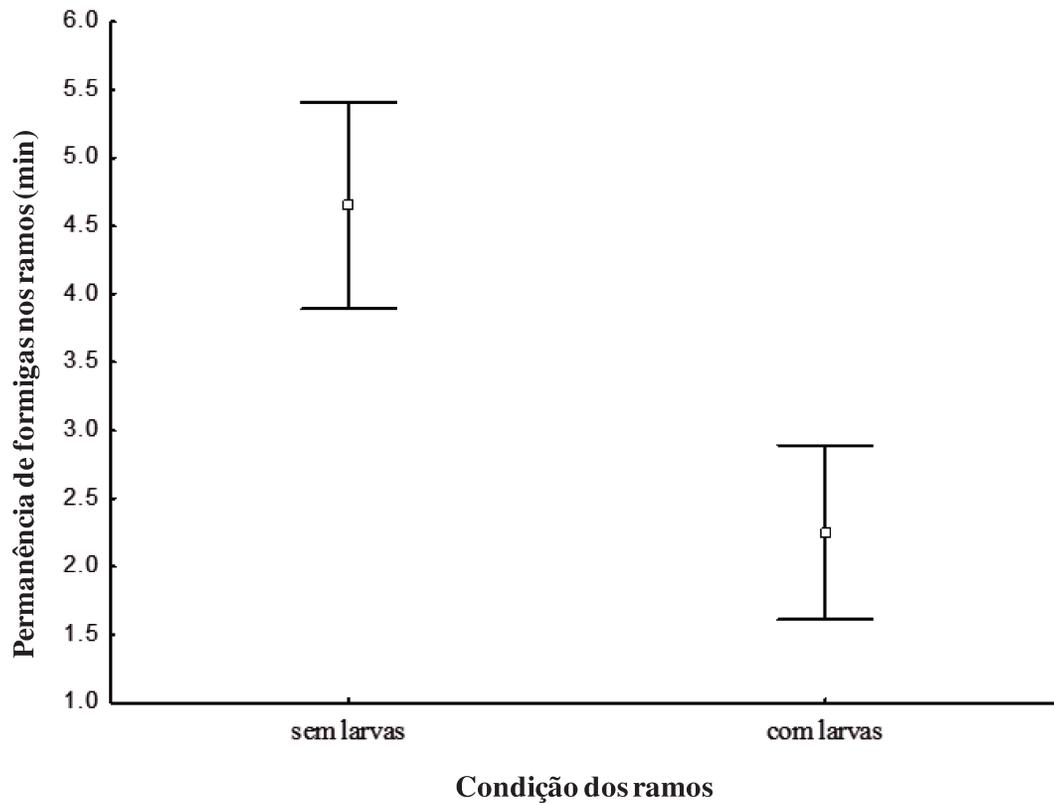


Figura 3: Permanência de formigas em ramos (20 por tratamento, totalizando 40 ramos) de *Qualea grandiflora* com larvas (controle) e sem larvas (tratamento) de *Rhinoleucophenga* sp. nov. Os pontos centrais indicam a média e barras representam o erro padrão. Valor do teste estatístico: $t_{19,1}=2,6$, $P=0,017$.

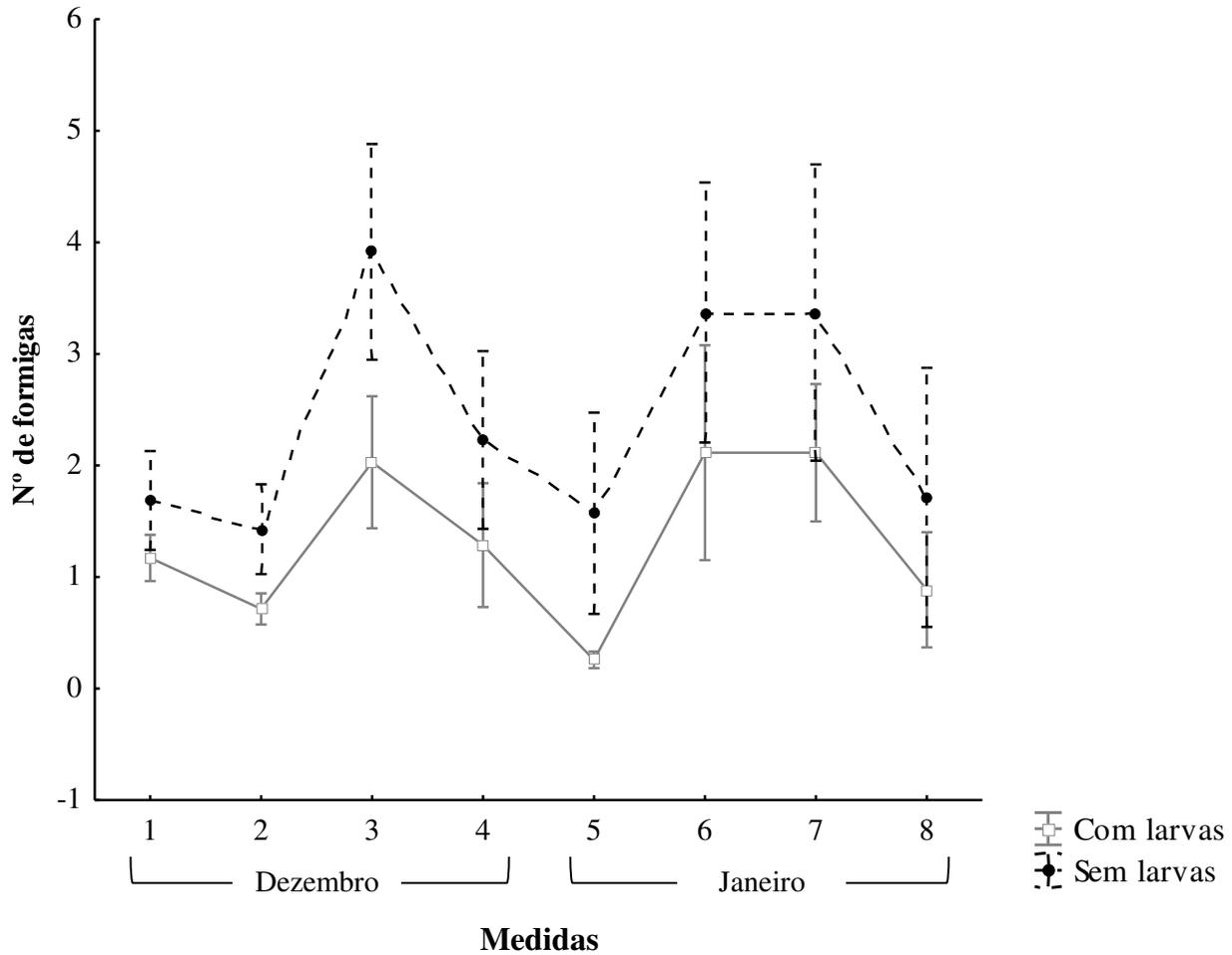


Figura 4: Número de formigas observadas em ramos de *Qualea grandiflora* com larvas (linha contínua) e sem larvas (linha pontilhada) de *Rhinoleucophenga* sp. nov. entre os meses de Dezembro de 2012 e Janeiro de 2013. Os pontos centrais indicam a média e as barras o erro padrão. Os censos nas plantas foram realizados em intervalos de aproximadamente 10 dias (Data das medidas 1 = 01/12/2012; 2 = 13/12/2012; 3 = 19/12/2012; 4 = 26/12/2012; 5 = 07/01/2013; 6 = 16/01/2013; 7 = 23/01/2013; 8 = 01/02/2012).

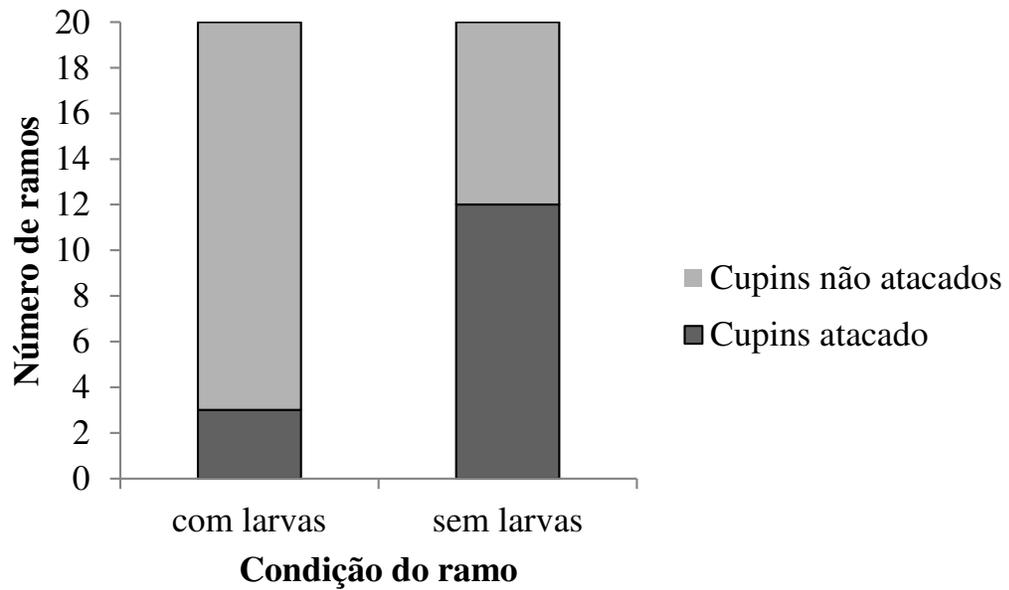


Figura 5: Agressividade de formigas a cupins vivos sobre ramos pareados de *Qualea grandiflora* com larvas (controle) e em ramos sem larvas (tratamento) de *Rhinoleucophenga* sp. nov. Cada ramo experimental continha um par de cupins. Valor do teste estatístico: $G_{19,1}=7,10$, $P<0,01$.

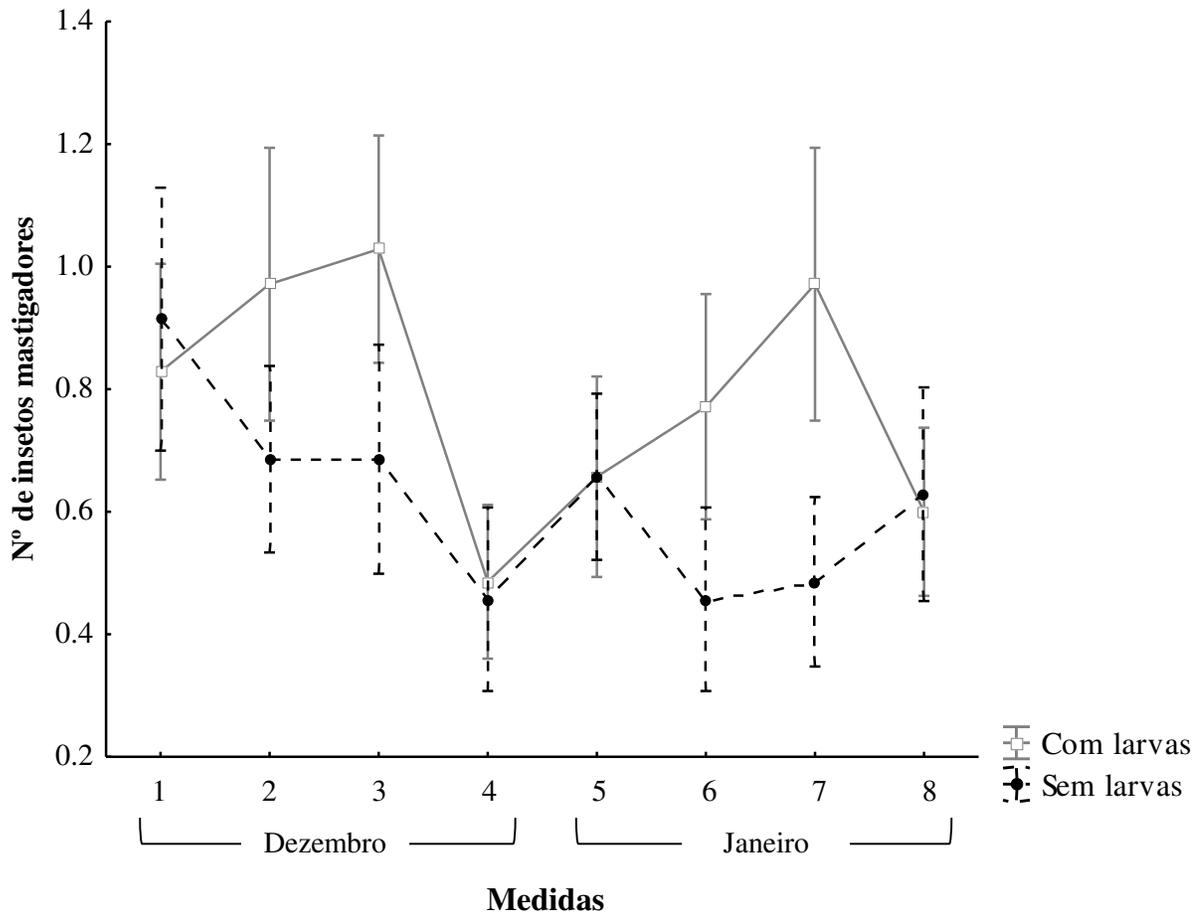


Figura 6: Número de herbívoros mastigadores observados em ramos de *Qualea grandiflora* com larvas (linha contínua) e sem larvas (linha pontilhada) de *Rhinoleucophenga* sp. nov. entre os meses de Dezembro de 2012 e Janeiro de 2013. Os pontos centrais indicam a média e as barras o erro padrão. Os censos nas plantas foram realizados em intervalos de aproximadamente 10 dias. (Data das medidas 1 = 01/12/2012; 2 = 13/12/2012; 3 = 19/12/2012; 4 = 26/12/2012; 5 = 07/01/2013; 6 = 16/01/2013; 7 = 23/01/2013; 8 = 01/02/2012).

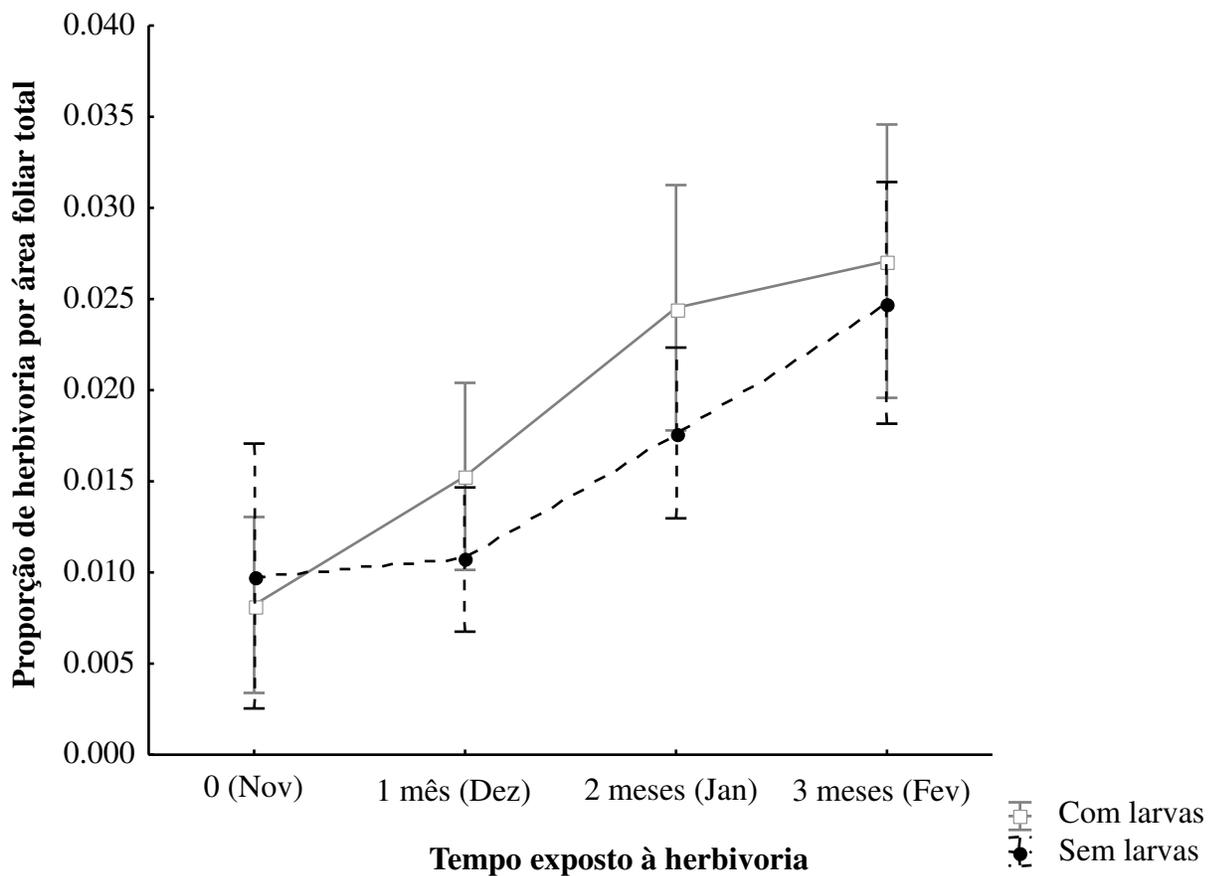


Figura 7: Proporção de área foliar removida por insetos mastigadores em ramos de *Qualea grandiflora* com larvas (linha contínua) e sem larvas (linha pontilhada) de *Rhinoleucophenga* entre os meses de Novembro de 2012 (início do experimento) e Fevereiro de 2013. Os pontos centrais indicam a média e as barras o erro padrão.

CONCLUSÕES GERAIS

1. Larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. são muito abundantes no cerrado, ocupando 85% dos indivíduos de *Qualea grandiflora*. Essas larvas ocorrem principalmente em nectários ativos, onde constroem seu abrigo, utilizando-os também para capturar suas presas. Encontramos mais e maiores larvas em plantas com menor número de ramos (menor tamanho), porém a presença dessas larvas nas plantas não está relacionada com a quantidade de nectários ativos na planta.
2. Larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. abrigam-se nos NEFs de *Qualea grandiflora* e se alimentam de formigas e outros insetos visitantes da planta. As larvas de *Rhinoleucophenga* utilizam o próprio néctar extrafloral de *Qualea* para atrair as formigas visitantes da planta, que acabam aprisionadas aos abrigos das larvas, servindo de alimento a elas.
3. As principais formigas visitantes de *Q. grandiflora* foram *Brachymyrmex* sp.1 e *Camponotus crassus*, também as mais comumente consumidas por larvas de *Rhinoleucophenga* sp. nov. Essas larvas mirmecófagas aparentemente não escolhem suas presas, sendo dependentes da probabilidade dessas serem aprisionadas nos seus abrigos.
4. O tempo de visitação e o número de formigas forrageadoras sobre *Q. grandiflora* é reduzido na presença das larvas mirmecófagas. Esse efeito negativo das larvas sobre o forrageamento de formigas resulta em menos ataque a cupins (herbívoros simulados) por formigas sobre as folhas de *Q. grandiflora*.
5. O efeito de *Rhinoleucophenga* sp. nov. sobre as formigas se reflete indireta e negativamente sobre a planta, uma vez que na presença das larvas mirmecófagas há maior abundância de herbívoros mastigadores e maior área de dano foliar do que na ausência do díptero predador.
6. *Rhinoleucophenga* sp. nov. está agindo como explorador do mutualismo formiga-*Qualea grandiflora*, afetando ambos os mutualistas.