

Predação de sementes em *Crotalaria pallida* (Leguminosae;  
Papilionoideae; Crotalariaeae): fatores dependentes de densidade e  
defesas bióticas e químicas



**Aluno:** Paulo Roberto Guimarães Junior

2003 329 873

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Paulo Roberto Guimarães Junior e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, para a obtenção do título de Mestre em Ecologia.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "José Roberto Trigo".

**Orientador:** José Roberto Trigo

Campinas  
Maio – 2003

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	UNICAMP G947P
V	EX
TOMBO BCI	55589
PROC.	16-12-2/03
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

CM00188619-1  
BIBID 300656

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Guimarães Júnior, Paulo Roberto

**G947p**

Predação de sementes em *Crotalaria pallida* (Leguminosae; Papilonoideae; Crotalarieae): fatores dependentes de densidade e defesas bióticas e químicas / Paulo Roberto Guimarães Junior. -- Campinas, SP:[s.n.], 2003.

Orientador: José Roberto Trigo  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia.

1.Predação. 2.Sementes. 3.Alcalóides. I. Trigo, José Roberto.  
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III.  
Título.

Campinas, 20 de maio de 2003.

Banca Examinadora:

Prof Dr. José Roberto Trigo (orientador)

*José Roberto Trigo*

Prof. Dr. Mauro Galetti Rodrigues

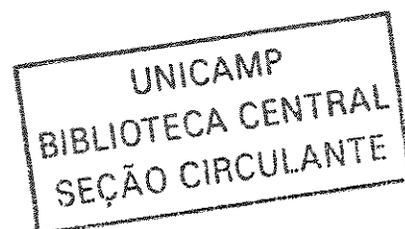
*Mauro Galetti Rodrigues*

Prof. Dr. Glauco Machado

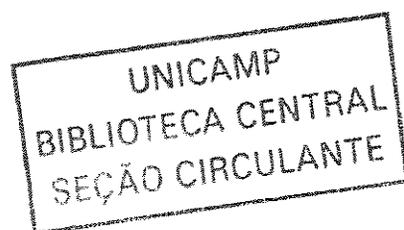
*Glauco Machado*

Prof. Dr. Sérgio Furtado dos Reis

\_\_\_\_\_



Esta tese é dedicada aos meus avôs e avós.  
Que algum dia eu possa estar a altura de honrá-  
los.

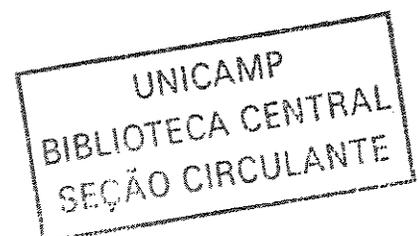


# ÍNDICE

Predação de sementes em *Crotalaria pallida* (Leguminosae; Papilionoideae; Crotalarieae): fatores dependentes de densidade e defesas bióticas e químicas

## Conteúdo

1. Agradecimentos	01
2. Introdução geral	03
3. Capítulo 1: Defesa biótica	07
4. Capítulo 2: Defesas após a dispersão	27
5. Capítulo 3: Dependência de densidade	53
6. Conclusões finais	73
7. Literatura citada	76



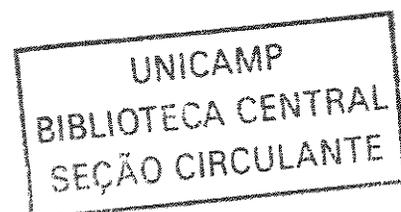
## AGRADECIMENTOS

Em muitos casos, uma dissertação é o esforço de um aluno que, ajudado por um orientador, finaliza sua pesquisa sozinho. Não é o caso do meu trabalho. Muitas pessoas me ajudaram a realizá-lo, desde o campo até discussões sobre o desenho experimental, os resultados e as conclusões. Entretanto, todo e qualquer absurdo escrito nesta dissertação é minha culpa. Aos meus amigos couberam apenas as sugestões e a ajuda.

Pai, Mãe, Mi e Kika, obrigado por me ajudarem sem entender o que o filho/irmão fazia. Vocês foram essenciais para a realização deste trabalho e espero que ele esteja a altura das horas gastas longe de vocês.

A Patricia, pela força, ajuda, amor e carinho dedicados. Não há nada que eu possa escrever que eu já não tenha dito pessoalmente. Apenas gostaria de agradecer por você ser minha luz. Te amo. E nos momentos difíceis, era só pensar em você que tudo ficava fácil. Obrigado por tudo. A Tia Inês, Tio Cláudio e a Pri por serem como uma segunda família para mim.

Aos meus amigos de fora da UNICAMP. Vocês foram essenciais para a minha sanidade mental: Mauro, Laísa, Fábio, Lê, Rômulo, Fabião, Fabrício, Cris, Tavo e Túlio, ao pessoal do Parthenon, do Regatinhas, e aos Ninjas-Árabes (em especial Fernandão, Paulão, Ricardo, Bruninho). À todos os meus parentes, em especial meus primos e prima, tios e tias, avós e avôs. Vocês não têm idéia de como foram importantes.



Aos grandes amigos da Biologia, em especial: Alu, Ana, Anders, André Dias, Baku, Bruno Bahiano, Glauco, Horácio, Humberto, Ju, Kubota, Lígia, Mário, Márcio, Rafaelzão, Rafaelzinho, Renato, Cíntia, Eric, Yu, Rodrigo Cogni, Rodrigo da Genética, Sérgio, Véio, Dudu e Vinão. A toda turma 97D e ao Grupo de Fenologia e Dispersão de Sementes da UNESP - Rio Claro. Aos Profs. André, Atílio, Carlão, Américo e Chico por me iniciarem na ciência. Ao Stuart e Patricia Fumaça por me iniciarem na ecologia e minha eterna dívida para com o Baku e o Glauco pelas conversas e ajuda durante toda a minha graduação e além.

A Cau, Maria Cláudia e Mari por toda ajuda. Ao pessoal do Lab: Alessandra, Andréia, Augusto, Breila, Flavinha, Hipólito, Lu, Marcão, Zikan, Paiva, Quincas, Tati, Vivi e Zé Carlos por me ajudarem com discussões, dicas e paciência. Aos professores W. W. Benson, Flávio M. dos Santos e Thomas Levinsohn pelas discussões na fase inicial de trabalho.

A Neil Gaiman, Tim Burton, Bob Kane & Bill Finger e Tim Flannery por me acompanharem nas madrugadas gastas pensando nos resultados. Ao The Cure, Joy Division, Ramones, Nirvana e New Order por animarem na tabulação de dados. Ao Calvin e ao Haroldo pela filosofia de vida.

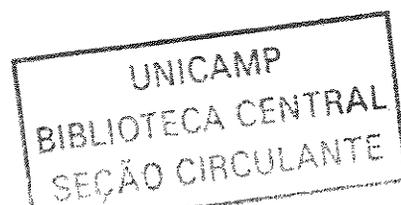
Aos professores Mauro Galetti, Marco Aurélio Pizo, Sérgio Furtado dos Reis, Stephen B. Vander Wall, Pedro Jordano e Jordi Bascompte por comentários, sugestões, discussões durante todo o desenvolvimento do trabalho e acima de tudo pela amizade. Obrigado a todos. A FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. José Roberto Trigo pela paciência, liberdade e orientação. Chefe, você foi essencial em muitas partes do trabalho e aprendi muitos nesses 3 anos no Lab. Obrigado pelo trabalho e sobretudo pela amizade e confiança.

## INTRODUÇÃO GERAL

### *Fatores que modulam a predação de sementes*

A predação de sementes é definida como a mortalidade de sementes causada por animais (Janzen 1971a). Como D. H. Janzen (1969, 1971b) sugere, a predação de sementes difere da herbivoria em diversos aspectos, especialmente porque predadores reduzem a prole das plantas, atuando diretamente sobre seu sucesso reprodutivo. Em algumas espécies vegetais, a predação por insetos e vertebrados pode eliminar praticamente todas as sementes produzidas em uma estação, alterando a distribuição espacial gerada pela chuva de sementes e influenciando a dinâmica populacional de diversas espécies de plantas (Janzen 1970, 1971a). Devido a atuação direta da predação de sementes sobre a prole das plantas e sua grande intensidade, espera-se que a seleção natural tenha favorecido a evolução de estratégias que visem minimizar o impacto da predação de sementes (Louda 1982). Além disso, esta interação influencia a ecologia dos predadores de sementes (Hulme & Hunt 1999) e, possivelmente, a estrutura das comunidades vegetais (Janzen 1970, Webb 1999). Diversos fatores foram sugeridos como moduladores da predação de sementes entre os quais estão mecanismos de defesa contra predadores, fungos e patógenos (Cipollini & Levey 1997a), heterogeneidade espacial na distribuição das sementes e/ou nos microhabitats (Howe & Smallwood 1982) e o escape das sementes mediado por mecanismos de dispersão (Janzen 1969, 1970).



Os eventos de predação de sementes podem ser divididos em dois tipos, de acordo com o momento em que ocorrem no ciclo de vida da planta. O primeiro tipo ocorre antes da semente ser dispersa pela planta-mãe e é comumente chamado de “predação pré-dispersão”. O segundo tipo de predação ocorre após a dispersão da planta-mãe e é conhecido como “predação pós-dispersão” (Janzen 1971a). Esses dois tipos variam com relação à especificidade dos predadores, às estratégias de defesa das plantas e à proporção de sementes que eliminam (Janzen 1970, 1971a,b, Howe & Smallwood 1982).

Diversos mecanismos de defesa contra predadores que atuam “pré-dispersão” foram sugeridos, entre os quais defesas químicas, morfológicas e bióticas (Janzen 1969,1970, Keeler 1981, 1985, Cipollini & Levey 1997a,b,c). Defesas químicas e morfológicas são responsáveis por deter grande parte dos predadores generalistas (Janzen 1969, Cipollini & Levey 1997a, 1998). Entretanto, os principais predadores que atuam antes da dispersão das sementes apresentam um maior grau de especificidade com a planta (Janzen 1971a). Em alguns casos os mecanismos de defesa química são ultrapassados e a substância química passa a ser usada como um recurso para proteção do próprio predador ou de sua prole (Dussourd *et al.* 1988).

Defesas bióticas, em grande parte associadas às formigas apresentam uma grande variabilidade intrínseca, uma vez que diversas espécies com morfologia, agressividade e tamanho diferentes podem participar da defesa. Esta heterogeneidade torna estes sistemas mais imprevisíveis que sistemas de defesa baseados em química ou morfologia (Law & Koptur 1986). Entretanto, poucos

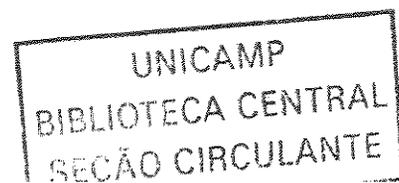
estudos enfocaram nas implicações da grande variação das defesas bióticas para a aptidão da planta.

Um outro fator importante atuando sobre a predação de sementes “pré-dispersão” é a heterogeneidade espacial do recurso. A predação de sementes “pré-dispersão” parece ser, em muitos casos, dependente de densidade, onde uma maior proporção de sementes é eliminada em densidades maiores (Janzen 1970). Na verdade, a importância da densidade como fator modulador da predação é um paradigma para estudos de dispersão e predação de sementes (Howe & Smallwood 1982). Entretanto, alguns trabalhos sugeriram que predadores e herbívoros podem responder à densidade de recursos em manchas de plantas e não em indivíduos (Garcia *et al.* 2001). Desta forma, é possível que a dependência de densidade seja dependente da escala espacial em que o fenômeno está atuando. Como fenômenos biológicos atuam em várias escalas (Levin 1992), são necessários estudos que investiguem como a dependência de densidade varia com a escala espacial de observação.

Por fim, um terceiro fator que pode influenciar na sobrevivência de sementes é a defesa contra predadores “pós-dispersão”. O escape através de eventos de dispersão é tido como um dos principais mecanismos de defesa contra predação de sementes (Janzen 1970). A Hipótese do Escape sugere que, ao ser dispersa para longe da planta-mãe, as chances de sobrevivência da semente são aumentadas porque a mortalidade causada por predadores é dependente da densidade e da distância da planta-mãe (Janzen 1970). Entretanto, densidade e distância estão correlacionadas negativamente de forma que são importantes os experimentos que visem testar qual destes fatores é, de fato, essencial (Howe &

Smallwood 1982). Outra defesa reconhecida como importante para a sobrevivência de sementes é a proteção através de substâncias químicas (Janzen *et al.* 1986). Estas substâncias são impalatáveis e/ou tóxicas e podem reduzir a predação de sementes por animais generalistas. Como predadores “pós-dispersão” são geralmente generalistas (Janzen 1971a), é possível que essas substâncias sejam importantes mecanismos de defesa contra predadores de sementes (Janzen *et al.* 1986, Guimarães *et al.* 2003) .

Os objetivos gerais desta dissertação foram investigar como estes três fatores (defesa biótica, heterogeneidade espacial e defesas “pós-dispersão”) podem influenciar na sobrevivência de sementes da leguminosa *Crotalaria pallida*. Em especial, procurou-se estudar aspectos relevantes para a variação na influência de cada um destes fatores. No Capítulo 1, foram estudadas as conseqüências da heterogeneidade natural em sistemas de defesa biótica, ao se investigar a importância da espécie de formiga (defensor) e do tipo de herbívoro para a proteção das vagens contra inimigos naturais. No Capítulo 2 foi investigada a importância da distância da planta-mãe, da densidade de sementes e da concentração de um alcalóide pirrolizidínico (substância presente em sementes de *Crotalaria*) na sobrevivência de sementes à predação causada por formigas, os principais predadores “pós-dispersão” na região de Campinas. Por fim, no Capítulo 3, foram investigados os efeitos da escala espacial sobre a sobrevivência dependente de densidade das vagens de *C. pallida* ao ataque das larvas da mariposa arctídea *Utetheisa ornatrix*, o principal predador “pré-dispersão” desta planta em Campinas (Ferro 2001).



## CAPÍTULO 1: DEFESA BIÓTICA

### FORMIGAS FORRAGEANDO EM NECTÁRIOS EXTRAFLORAIS DE *Crotalaria pallida* (LEGUMINOSAE, PAPILIONOIDEAE, CROTALARIEAE): PROTEÇÃO DAS VAGENS E VARIAÇÃO NAS INTERAÇÕES ENTRE FORMIGAS E HERBÍVOROS

#### INTRODUÇÃO

A mortalidade de sementes influencia diretamente o valor adaptativo da planta e, por este motivo, a seleção natural deve favorecer a evolução de mecanismos de defesa de sementes sempre que isto for possível (Janzen 1969, 1971a,b). Mecanismos de defesa contra predadores de sementes incluem características fenológicas, morfologia de frutos e sementes, defesas químicas e interações mutualísticas (Janzen 1969, 1971b, Cipollini & Levey 1997a). O último mecanismo refere-se a interações bióticas que aumentam a sobrevivência de sementes, como o escape de áreas com grande mortalidade mediado por animais (dispersão de sementes - Janzen 1970, Schupp 1992), e também ao ataque a predadores de sementes por formigas que visitam nectários extraflorais (Pickett & Clark 1979, Keeler 1981, 1985).

Os nectários extraflorais (NEFs) são glândulas produtoras de néctar, as quais não estão diretamente relacionadas com a polinização. Os NEFs ocorrem em muitas famílias de angiospermas e são visitados por uma grande diversidade de insetos, em sua maioria formigas (Elias 1983). A atividade das formigas em NEFs pode

aumentar o valor adaptativo da planta por: (1) reduzir a destruição de galhos e flores (Oliveira 1997), (2) reduzir a visitação de formigas às flores e assim aumentar o sucesso da polinização (Wagner & Key 2002), (3) aumentar a produção de frutos e sementes (Oliveira *et al.* 1999, Sobrinho *et al.* 2002), (4) reduzir a herbivoria foliar (Koptur 1979), e (5) reduzir a predação de sementes (Pickett & Clark 1979, Keeler 1981, 1985). Além disso, o forrageamento não-aleatório das formigas nas partes das plantas pode resultar em defesa diferencial entre os órgãos, existindo evidências de que formigas fornecem uma proteção mais efetiva para estruturas próximas aos NEFs (Cogni & Freitas 2002).

Os NEFs podem atrair muitas espécies de formigas e por isso o mutualismo mediado por estes órgãos entre plantas e formigas não é considerado especializado, e sim facultativo (Schemske 1982, Law & Koptur 1986). O nível de proteção para a planta depende de uma série de fatores como a composição de espécies de formigas que visitam os NEFs e o tipo de herbívoro que ataca a planta (Elias 1983, Oliveira *et al.* 1999). As espécies de formigas variam consideravelmente em suas características de história natural, tais como agressividade, horário de atividade, velocidade e eficiência de recrutamento, tamanho corporal e preferências alimentares (Hölldobler & Wilson 1990). Esta variação pode influenciar o resultado das interações entre formigas e herbívoros para o valor adaptativo da planta (Freitas & Oliveira 1996, Oliveira 1997).

A fauna de herbívoros que ataca a planta também é um fator importante para o resultado da interação, uma vez que as espécies que a compõe podem variar em diversas características tais como: conspicuidade, valor como recurso para as formigas, abundância, tecidos que atacam e mecanismos de defesa contra formigas

(Koptur 1984, Heads & Lawton 1985, Freitas & Oliveira 1996, Marquis 1992). Apesar disto, muitos estudos sobre a importância de NEFs para o valor adaptativo da planta foram conduzidos enfocando uma única espécie de herbívoro (Dejean *et al.* 2000), ou usando modelos como cupins (Oliveira *et al.* 1997).

*Crotalaria pallida* Ait. (Leguminosae, Papilionoideae, Crotalarieae) é uma planta daninha pantropical que se originou nos paleotrópicos (Polhill 1982). Os NEFs de *Crotalaria pallida* estão localizados na base de cada flor ou vagem (Figura 1) e estão ativos desde o início da antese até o final do amadurecimento das vagens. Este padrão sugere que os NEFs podem mediar um mecanismo de defesa biótico, visando proteger as estruturas reprodutivas (como em Keeler 1981). No sudeste do Brasil, o principal predador das sementes de *Crotalaria pallida* é a lagarta da mariposa *Utetheisa ornatrix* L. (Lepidoptera: Arctiidae) (Pease 1968, Ferro 2001), que ataca as vagens quando estas ainda não terminaram de amadurecer, consumindo suas sementes (Moore 1978). As larvas de *Utetheisa ornatrix* parecem não ser influenciadas pelos alcalóides pirrolizidínicos presentes nas sementes de *Crotalaria* (Sharma *et al.* 1965; Johnson *et al.* 1985; Mattocks, 1986); esses compostos são considerados como defesas efetivas contra herbívoros generalistas (Vandam *et al.* 1995), embora herbívoros especialistas os sequestram (Hartmann & Witte 1995). As larvas de *Utetheisa ornatrix* seqüestram esses alcalóides das sementes para sua própria defesa, transferindo-os para os adultos através do estágio de pupa, e também para a prole. Esses alcalóides também são utilizados pelos machos de *Utetheisa ornatrix* para a biossíntese de feromônios sexuais (Dussourd *et al.* 1988).

Observações preliminares sugerem que uma fauna diversificada de formigas visita os NEFs de *Crotalaria pallida* (Ferro 2001), entretanto a existência de variação

no resultado da interação entre formigas e herbívoros para a planta necessita ser investigada em detalhes. Neste capítulo, foram investigadas as seguintes questões sobre a interação entre formigas, *Crotalaria pallida* e *Utetheisa ornatrix*:

- (1) Que espécies de formigas visitam os NEFs de *Crotalaria pallida*? Existe diferença entre racemos e folhas na composição de espécies de formigas que os visitam?
- (2) Existe alguma diferença entre racemos e folhas quanto a defesa contra herbívoros por formigas?
- (3) Qual a importância relativa da espécie de formiga, da espécie de herbívoro e da interação entre os dois fatores para deter o herbívoro?

## **MATERIAIS & MÉTODOS**

### **1. Área de estudo**

O trabalho de campo foi desenvolvido entre janeiro e maio de 2002 em Campinas, estado de São Paulo, sudeste do Brasil (22°54'20"S, 47°03'39"W). Os experimentos e observações de campo foram realizados em dias ensolarados, entre 08:00 h e 11:30 h. A área de estudo é dominada pela *Brachiaria* sp. (Poaceae) e muitas plantas daninhas, incluindo algumas asteráceas e outras duas espécies de *Crotalaria* (*Crotalaria lanceolata* Mey e *Crotalaria incana* L.). *Crotalaria pallida* é a mais abundante das espécies do gênero na área de estudo, ocorrendo em manchas que vão de um indivíduo a centenas de indivíduos (Capítulo 3).

**2. *Que espécies de formigas visitam os NEFs de Crotalaria pallida? Existe diferença entre racemos e folhas na composição de espécies de formigas que os visitam?***

Trinta plantas foram aleatoriamente selecionadas para registrar: (1) as espécies de formigas que visitam os NEFs durante o período estudado (manhã), (2) o número de formigas (abundância) em racemos (locais com NEFs) e folhas (locais sem NEFs), e (3) o número de racemos e de folhas ocupados por cada espécie de formiga (frequência). Em cada planta ( $n = 30$ ), um racemo com vagens amadurecendo e uma folha foram aleatoriamente escolhidos para observação. Folhas e racemos foram observados simultaneamente por 15 segundos para registrar os itens acima citados. Após a observação, as formigas foram coletadas e preservadas em etanol 70% para identificação.

A frequência e abundância de indivíduos foram usadas para testar se há diferenças na distribuição da mirmecofauna entre racemos e folhas. O teste binomial contra o esperado de 1:1 (Zar 1999) foi usado para comparar as frequências de formigas nas duas partes da planta. A diferença em abundância dentro de cada par de observações (folha e racemo de uma mesma planta) foi analisada estatisticamente através de Teste t pareado, cuja significância foi testada através de aleatorização das observações (10000 permutações) (Manly 1997).

**3. *Existe alguma diferença entre racemos e folhas quanto a defesa contra herbívoros por formigas?***

A existência de diferenças na defesa contra herbívoros por formigas entre folhas e racemos foi investigada através de experimentos nos quais foram usados

como modelos de herbívoros operários vivos do cupim *Neocapritermes opacus* Hagen (Termitidae) que foram colados nas plantas pelo dorso com cola branca (Tenaz™) conforme em Freitas & Oliveira (1996).

Oitenta plantas, selecionadas ao acaso, foram marcadas na área de estudo e aleatoriamente divididas em quatro grupos experimentais (n = 20 indivíduos): (1) um operário de cupim colado no meio da vagem em amadurecimento (NEFs ativos) mais alta do racemo, (2) um operário de cupim colado na folha de um ramo a cerca de 10cm do NEF mais próximo, (3) um operário de cupim colado como no primeiro grupo experimental, mas com o pedicelo do racemo protegido por graxa (Tanglefoot™) para isolar as formigas, e (4) um operário de cupim colado de maneira similar ao segundo grupo experimental, mas com a base da folha protegida com graxa para isolar as formigas. Os dois últimos tratamentos eliminam a visita de formigas aos cupins mas não o efeito de aranhas e de visitantes voadores como vespas. Nos tratamentos protegidos contra formigas por graxa, possíveis pontes para as formigas, como folhas de outros ramos, foram cuidadosamente removidas. Após duas horas, as plantas foram vistoriadas e o número de cupins removidos foi registrado. As frequências de cupins removidos foram comparadas entre os grupos experimentais através do Teste Exato de Fisher (Zar 1999).

#### **4. Qual a importância relativa da espécie de formiga, da espécie de herbívoro e da interação entre os dois fatores para deter o herbívoro?**

Um experimento foi realizado para (1) investigar a existência de variação na defesa contra herbívoros entre as espécies de formigas, e (2) investigar a influência

de tipos de herbívoro na possível defesa propiciada pelos NEFs. Diferentes modelos de herbívoros foram colados em racemos que estavam sendo visitados exclusivamente por *Camponotus* sp.2 (Formicinae) ou *Ectatomma quadridens* Fabr. (Ponerinae). Um modelo de herbívoro foi colado na vagem em amadurecimento (NEFs ativos) mais alta, sendo usado apenas um racemo por planta. Quatro grupos experimentais, representando quatro tipos de modelos de herbívoros, foram usados:

(1) Larva viva de *Utetheisa ornatrix* em último estágio - um predador grande de sementes, móvel e supostamente impalatável.

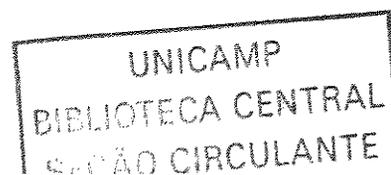
(2) Larva morta por congelamento de *Utetheisa ornatrix* em último estágio – um predador grande de sementes, imóvel e supostamente impalatável.

(3) Larva morta por congelamento de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera, Tenebrionidae), um modelo grande, imóvel e palatável.

(4) Operário vivo do cupim *Neocapritermes opacus*, um modelo pequeno, imóvel e palatável.

Em todos os grupos experimentais os modelos foram colados usando cola branca (Tenaz<sup>TM</sup>), a única exceção foi o primeiro grupo experimental, no qual o modelo (móvel) não foi colado à planta, mas apenas cuidadosamente colocado sobre a vagem.

Cada racemo foi monitorado até o primeiro ataque das formigas ou por 15 minutos de observação, caso nenhum ataque ocorresse. Observações de campo indicam que este tempo é suficiente para que as larvas de *Utetheisa ornatrix* perfurem e adentrem a uma vagem em amadurecimento. Uma vez dentro das vagens, as formigas não parecem ser mais capazes de atacá-las.



Uma ANOVA de dois fatores (Zar 1999) foi realizada para testar se o tempo até o primeiro ataque das formigas aos modelos tinha relação com (1) a espécie de formiga, (2) tipo de modelo de herbívoro, e (3) a interação entre estes dois fatores para a defesa contra herbívoros. O tempo até o primeiro ataque foi considerado como igual a 15 minutos, nos eventos em que o modelo não foi atacado. O ataque foi definido como a interação agonística (mediada pelas mandíbulas, ferrão ou glândulas acidoríparas) entre formigas e os modelos. Como os dados possuíam variâncias heterogêneas, eles foram transformados usando-se  $\log_{10}$  (veja Manly 1997). Os fatores significativos foram testados *a posteriori* através de um teste HSD de Tukey para identificar que tratamentos eram responsáveis pela significância (Zar 1999).

A existência de relação entre o número de operárias de formigas nos racemos e o tempo até o primeiro ataque foi testada através de uma correlação de Spearman (Zar 1999). Durante o estudo de campo, observações confirmaram que os racemos eram visitados pela mesma espécie de formiga durante vários dias consecutivos. Para testar o efeito da espécie de formiga para o ataque de vagens por *Utetheisa ornatrix*, a proporção de vagens atacadas em racemos visitados por *Camponotus* sp.2 e *Ectatomma quadridens* foi comparada através do teste t, após a transformação para arcoseno da raiz quadrada, cuja significância foi testada através de aleatorização das observações (10000 permutações).

## RESULTADOS

Dez espécies de formigas pertencentes a três sub-famílias diferentes foram registradas visitando *Crotalaria pallida* durante a amostragem. Nove espécies foram

registradas apenas em racemos e uma tanto em racemos quanto em folhas (Tabela 1). As formigas estavam presentes em vinte e oito racemos (94,0%), mas apenas em uma folha (3,0%) (teste binomial,  $P < 0,001$ ). Os racemos de *Crotalaria pallida* geralmente apresentavam uma espécie de formiga (96,5%), e somente um racemo (3,0%) apresentava simultaneamente duas espécies em seus nectários. O número médio de formigas por racemo foi maior que em folhas ( $p < 0,001$ ; teste t-pareado, 10000 permutações) (Figura 2). A espécie de formiga mais freqüente foi *Camponotus* sp.2 (n=10 plantas) e as mais abundantes foram *CreMATogaster* sp. (n=43 indivíduos), *Camponotus* sp.2 (n=37) e *Ectatomma quadridens* (n=19) (Tabela 1). Além das espécies registradas na amostragem, indivíduos de *Pseudomyrmex* sp. (Pseudomyrmecinae) foram observados eventualmente nos racemos durante o trabalho de campo.

Os cupins foram mais removidos em racemos do que nas folhas (n=19, Teste Exato de Fisher,  $p < 0,05$ ). Mais de 85,0% dos cupins colados nas vagens (n=20) foram removidos pelas formigas em 2h, mas apenas 26,0% dos cupins colados nas folhas foram removidos durante o mesmo intervalo. Nenhum cupim foi removido nos grupos experimentais onde as formigas foram isoladas pela aplicação de graxa. As espécies de formigas apresentaram diferenças comportamentais marcantes ao atacarem os cupins. As pequenas *Brachymyrmex* recrutaram uma grande quantidade de operárias (>10 indivíduos) e removeram pequenos pedaços dos cupins, enquanto formigas grandes como *Camponotus* spp. e *Ectatomma quadridens* raramente recrutaram e, em geral, removeram as presas inteiras solitariamente. Entretanto, mesmo estes dois gêneros possuíam táticas de ataque diferentes, enquanto *Ectatomma quadridens* sempre usava as mandíbulas para atacar o

modelo, *Camponotus* spp. combinavam o uso das mandíbulas com a secreção de ácido pelo acidóporo, localizado na extremidade posterior de abdômen.

O tempo até o primeiro ataque por formigas aos modelos foi significativamente influenciado por todos os fatores (Tabela 2). *Camponotus* sp.2, em geral, atacou mais rapidamente os modelos que *Ectatomma quadridens*, sendo grande parte desta diferença explicada pela lentidão ou mesmo ausência de ataques aos cupins por *E. quadridens* (Figura 3). *Tenebrio molitor* foi removido mais rapidamente do que os demais modelos. Além disso, *E. quadridens* atacou mais lentamente os modelos *Utetheisa oratrix* morta que *Tenebrio molitor* (Figura 3).

Não houve correlação entre o número de operárias no racemo e o tempo até o primeiro ataque (correlação de Spearman,  $p > 0,05$  para as duas espécies em todos os modelos). A proporção de vagens danificadas por *U. oratrix* não diferiu entre as duas espécies, sendo  $0,23 \pm 0,04$  para *E. quadridens* e  $0,24 \pm 0,06$  para *Camponotus* sp.2 (média  $\pm$  erro padrão,  $p = 0,414$ , teste t , 10000 permutações).

## DISCUSSÃO

### 1. **Abundância e proteção diferencial das partes das plantas**

*Crotalaria pallida* foi visitada por uma fauna diversificada de formigas, similar em riqueza (11 espécies) a outras plantas estudadas em ambientes neotropicais, como áreas sub-urbanas do sudeste do Brasil (Cogni *et al.* 2000), manguezais e restingas (Cogni & Freitas 2002), dunas de areias (Oliveira *et al.* 1999) e o chaco (Freitas *et al.* 2000). A riqueza, freqüência e abundância de espécies de formigas em *Crotalaria pallida* pode ser considerada alta, levando-se em conta que só se investigou os NEFs em um pequeno intervalo de tempo.

A abundância e frequência de formigas, no entanto, variou de forma marcante entre as partes da planta, sendo maior nos racemos que nas folhas. A existência de uma estrutura atrativa para as formigas (NEFs) na base das flores/vagens e a distância relativa de racemos e folhas aos NEFs podem ser consideradas a causa desta variação. O efeito da distância dos NEFs na defesa contra inimigos naturais parece ser um aspecto comum desses sistemas (Oliveira 1997).

A maior abundância e frequência de formigas nos racemos levou a uma maior defesa contra herbívoros e, possivelmente, a uma maior proteção das estruturas reprodutivas do que das estruturas foliares. A proteção de estruturas reprodutivas das plantas parece ser um padrão comum em estudos de NEFs (Keeler 1981, Del-Claro *et al.* 1996, Oliveira 1997) e é esperado, uma vez que sementes e flores são estruturas que estão mais diretamente relacionadas ao sucesso reprodutivo da planta do que as folhas (Janzen 1971b). Entretanto, as folhas também apresentaram uma remoção considerável (26,0%). A proteção de estruturas foliares também pode levar a um aumento do valor adaptativo da planta, como previamente demonstrado (Koptur 1979, Smiley 1985). Desta forma, estudos de longo prazo que investiguem o papel dos NEFs na defesa contra herbívoros que ataquem as folhas de *Crotalaria pallida* podem ajudar a entender se os NEFs estão atuando apenas como uma defesa anti-predador de sementes e qual a implicação da proteção dos diferentes órgãos para o valor adaptativo da planta (Oliveira *et al.* 1999).

## 2. ***O resultado depende da interação do modelo do herbívoro e da espécie de formiga***

Entre as formigas que visitam *Crotalaria pallida*, o gênero *Camponotus* foi o mais freqüente e abundante. A dominância de espécies de *Camponotus* em NEFs ou em pulgões produtores de soluções açucaradas já havia sido descrita no cerrado (Del-Claro & Oliveira 1993), na restinga (Cogni & Freitas 2002), em áreas suburbanas (Cogni *et al.* 2000), em vegetação pioneira (Orivel & Dejean 2002, Dejean 2000), em áreas semi-áridas (Rico-Gray *et al.* 1998), em dunas de areia (Oliveira *et al.* 1999) e em florestas (Federle *et al.* 1998b, Rico-Gray 1993). Formigas do gênero *Camponotus* são geralmente consideradas defensoras eficientes (Del-Claro & Oliveira 1993, Federle *et al.* 1998a, Del-Claro & Oliveira 1999) que protegem melhor seus parceiros mutualísticos do que outras espécies de formigas, como *Ectatomma* spp. (Del-Claro & Oliveira 1999). Neste estudo *Camponotus* sp.2 foi um predador mais eficiente que *Ectatomma quadridens* no ataque aos modelos de herbívoro. Entretanto esta diferença é dependente do tipo de modelo de herbívoro. De fato, *Camponotus* sp.2 foi mais eficiente que *Ectatomma quadridens* no ataque ao cupim *Neocapritermes opacus*, mas não para os demais modelos.

O uso de cupins como modelos de herbívoros é uma maneira comum de investigar padrões espaciais e comportamentais de forrageamento e, indiretamente, de estimar a defesa da planta contra herbívoros por formigas (Oliveira *et al.* 1987, Freitas & Oliveira 1996, Apple & Feener 2001, Dejean *et al.* 2001, Cogni & Freitas 2002). Os resultados aqui obtidos indicam que a evidência experimental de deturminar inimigos dos parceiros mutualísticos (remoção de modelos por formigas) está relacionada ao tipo de modelo usado no experimento e, conseqüentemente, à

espécie de predador de semente, à espécie de formiga e à interação entre os dois fatores. Esses resultados atentam para a necessidade de cuidado ao interpretar dados obtidos em experimentos de remoção de modelos de herbívoros por formigas e de como o resultado da interação pode ser dependente não só da espécie de formiga que visita a planta (Dejean *et al.* 2000), mas também do herbívoro que ela ataca.

As larvas de *Utetheisa ornatix*, o principal predador de sementes de *Crotalaria pallida* na área de estudo, são abundantes e atacam as estruturas reprodutivas desde o início do desenvolvimento da vagem e, mais raramente, flores, sendo possível observar larvas de todos os estádios nestes órgãos. A ausência de remoção dos cupins (modelos pequenos), sugere que as larvas mais jovens (similares aos cupins em tamanho) são provavelmente mais ignoradas ou não detectadas por *Ectatomma quadridens*, enquanto as larvas em final de desenvolvimento são atacadas de forma similar por *E. quadridens* e *Camponotus* sp.2.

As larvas de *Utetheisa ornatix* apresentam alcalóides pirrolizidínicos seqüestrados da planta ou transmitidos diretamente pelos pais (Dussourd *et al.* 1988). É possível que exista uma maior sensibilidade da defesa dada por *Ectatomma quadridens* às defesas químicas da larva do que *Camponotus* sp. 2, uma vez que a *Ectatomma quadridens* foi mais lenta que *Camponotus* sp. 2 para capturar as larvas mortas de *Utetheisa ornatix* e mais rápida para capturar a larva palatável de *Tenebrio molitor*. Esta sensibilidade pode estar relacionada à antenação da presa pelas formigas, antes do ataque ser realizado. *Camponotus* é um gênero com

espécies muito agressivas na proteção de recursos (Del-Claro & Oliveira 1999), sendo possivelmente não influenciadas pela defesa química.

A variação interespecífica na defesa de parceiros mutualísticos por formigas já foi registrada em outros sistemas (Del-Claro & Oliveira 1999, Dejean *et al.* 2000). Entretanto, é preciso ressaltar que os modelos mais próximos às situações reais de eventos de predação (larvas vivas de *Utetheisa ornatrix*) foram detidos de forma similar pelas duas espécies, e que nenhuma diferença foi encontrada entre racemos visitados por ambas quanto as proporções de vagens atacadas. Estes resultados ilustram a natureza difusa das interações mutualísticas entre plantas e formigas (Law & Koptur 1986) onde diversos fatores que potencialmente influenciam o resultado da interação variam (Oliveira 1997, Dejean 2000, Dejean *et al.* 2000), mas pouca ou nenhuma alteração pode ser detectada no valor adaptativo da planta (mas veja Oliveira *et al.* 1999).

Defesas bióticas podem ser vistas como um complemento às defesas químicas presentes no gênero *Crotalaria*. As sementes e outras partes de *Crotalaria pallida*, como muitas espécies do gênero (Polhill 1982), possuem alcalóides pirrolizidínicos (Ferro 2001), o que provavelmente reduz a predação pré-dispersão causada por insetos e vertebrados generalistas (Janzen 1971a, Cipollini & Levey 1997). Entretanto, espécies como o predador de sementes especialista *Utetheisa ornatrix* possuem mecanismos para seqüestrar esses alcalóides e usá-los para a sua própria proteção (Eisner *et al.* 2000). De fato, para populações naturais de *Crotalaria pallida* a predação de sementes parece estar positivamente correlacionada com a concentração de alcalóides presentes na planta (Moore 1978). Formigas forrageando perto das vagens criam um mecanismo de defesa adicional contra

predadores de sementes, removendo larvas de *Utetheisa ornatrix* antes que elas ataquem as vagens. Como a natureza das interações entre plantas portando NEFs e formigas é difusa (Law & Koptur 1986, Bronstein 1994), e formigas variam em sua abundância e agressividade, torna-se mais improvável a evolução de estratégias de “contra-ataque” por parte dos predadores de sementes contra este tipo de defesa, menos previsível em suas características do que outros tipos de defesa como a mecânica e a química (Law & Koptur 1986).

Tabela 1. Abundância e frequência de ocupação de racemos/folhas por formigas visitando NEFs de trinta indivíduos de *Crotalaria pallida*, em Campinas, sudeste do Brasil. Todas as formigas, exceto uma *Brachymyrmex* sp., foram registradas somente em racemos. O número entre parênteses indica a porcentagem. A espécie *Pseudomyrmex* sp. foi eventualmente observada nos racemos, porém não durante as amostragens.

Espécie de formiga	Abundância	Frequência
FORMICINAE		
<i>Brachymyrmex</i> sp.	9 (6,87)	4 (6,67)
<i>Camponotus</i> sp.1	2 (1,52)	1 (3,33)
<i>Camponotus</i> sp.2	37 (28,24)	10 (33,33)
<i>Camponotus</i> sp.3	6 (4,58)	4 (13,33)
<i>Camponotus</i> sp.4	5 (3,81)	4 (13,33)
<i>Camponotus</i> sp.5	3 (2,29)	1 (3,33)
<i>Camponotus</i> sp.6	6 (4,58)	1 (3,33)
<i>Paratrechina</i> sp.	1 (0,76)	1 (3,33)
MYRMICINAE		
<i>Crematogaster</i> sp.	43 (32,82)	1 (3,33)
PONERINAE		
<i>Ectatomma quadridens</i> Fabr.	19 (14,50)	3 (9,99)
PSEUDOMYRMECINAE		
<i>Pseudomyrmex</i> sp.	*	*

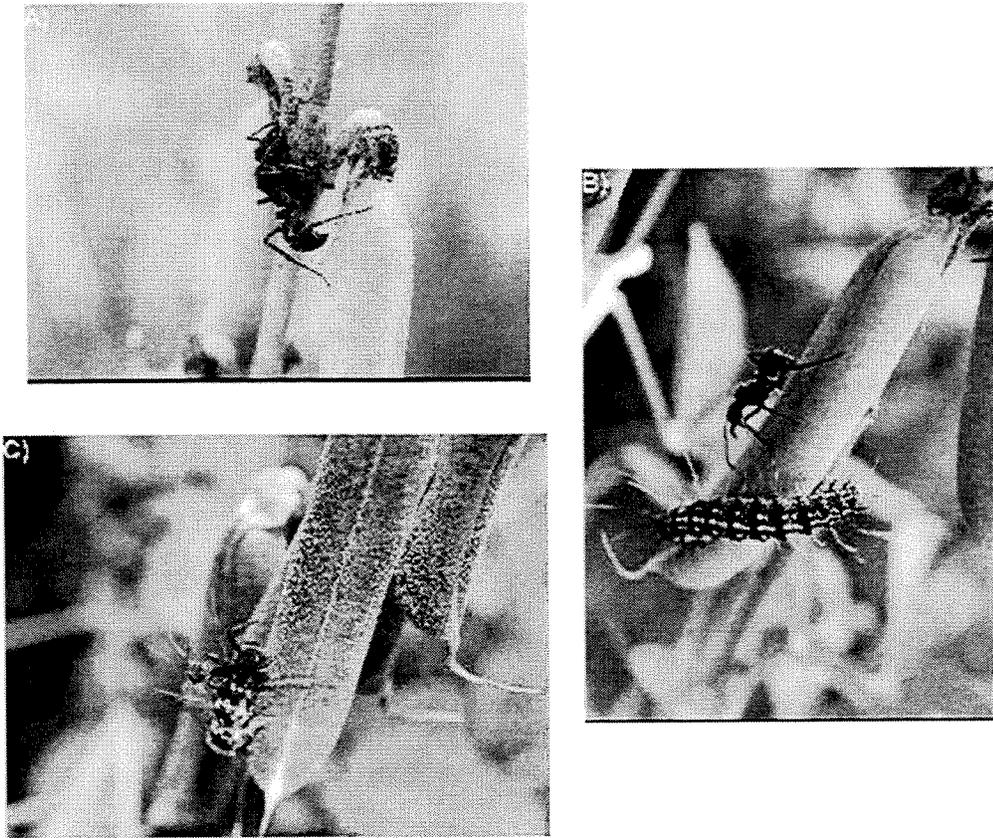


Figura 1. Defesa das vagens de *Crotalaria pallida* mediada pelas formigas contra lagartas. A) *Ectatomma quadridens* visitando nectário extrafloral; B) *E. quadridens* atacando uma larva de último estágio de *Utetheisa ornatrix*, o principal predador das sementes de *Crotalaria pallida* no Bairro Village, Campinas, SP. C) *Camponotus* sp.2 atacando uma larva pequena de *Utetheisa ornatrix*.

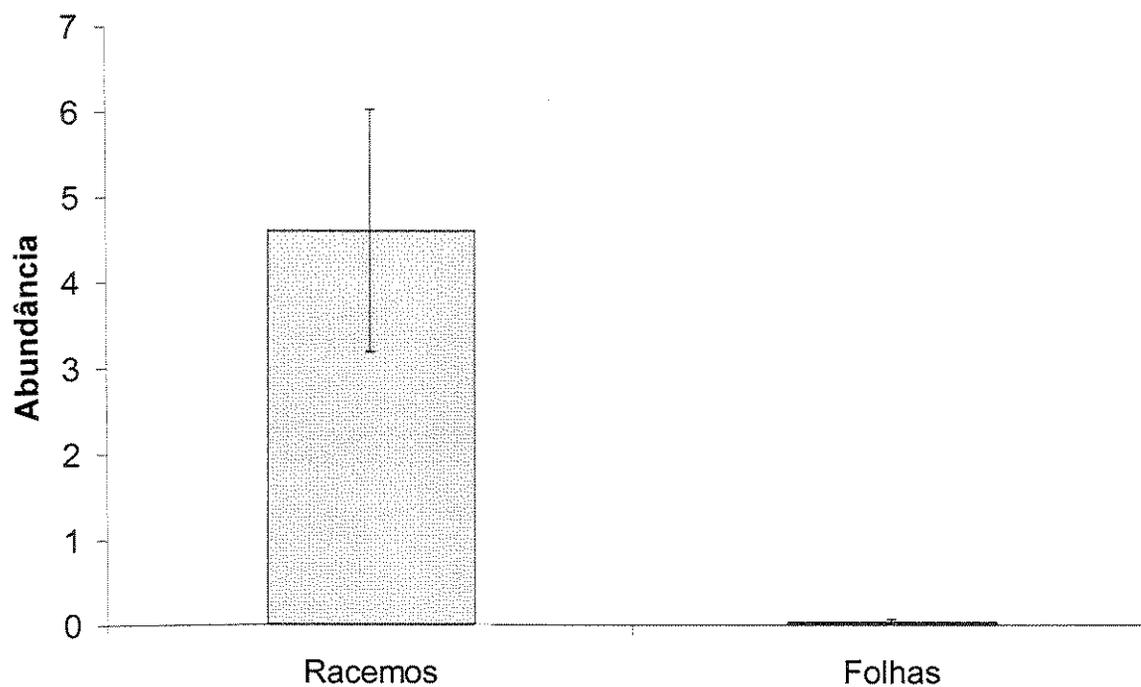


Figura 3. Abundância de formigas (média  $\pm$  erro padrão) em partes de *Crotalaria pallida* com NEFs (racemos) e sem NEFs (folhas).

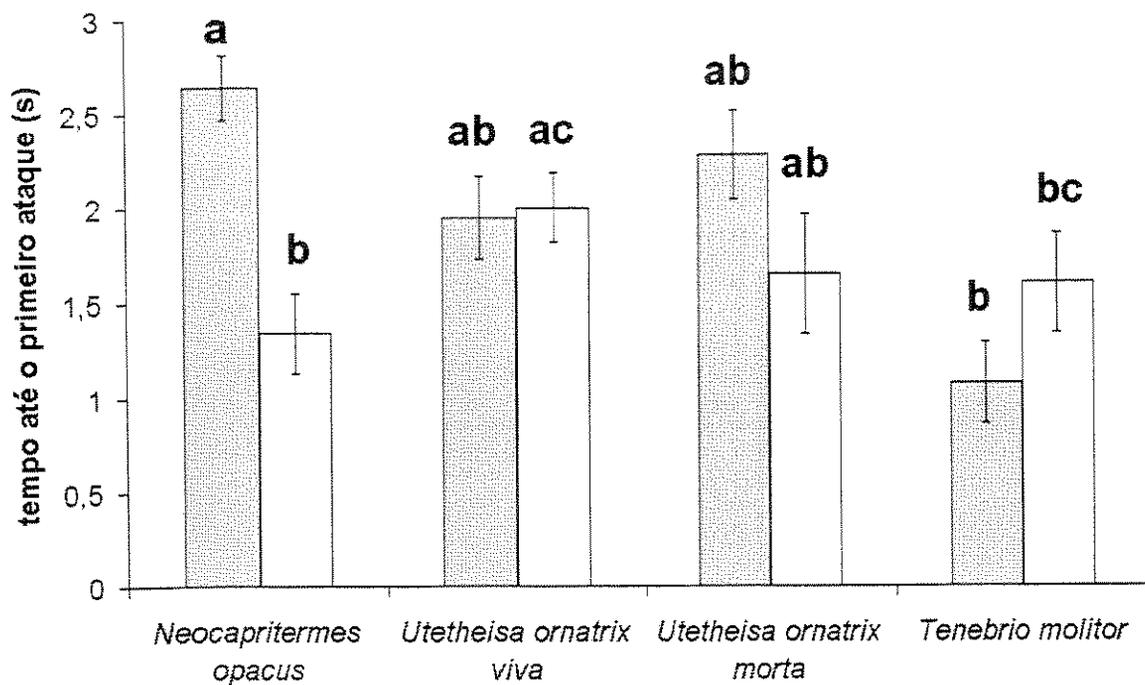


Figura 3. Tempo médio até o primeiro ataque ( $\pm$  erro padrão) em duas espécies de formigas quanto a defesa contra quatro diferentes modelos de herbívoros de racemos de *Crotalaria pallida*. Histogramas brancos = *Camponotus* sp. 2 e histogramas cinzas = *Ectatomma quadridens*. Letras iguais indicam ausência de diferença entre os tratamentos (ANOVA de dois fatores com teste *a posteriori* de Tukey - ver Tabela 2). Dados transformados em  $\log_{10}$ .

Tabela 2. ANOVA de dois fatores para os efeitos da espécie de formiga e do modelo de herbívoro na defesa contra predadores de sementes por formigas em racemos de *Crotalaria pallida*. A defesa contra herbívoros foi estimada através do tempo até o primeiro ataque ao modelo de herbívoro (em  $\log_{10}$ ).

Fator	SQ	GL	MQ	F	P
Espécies de formigas	2,48	1	2,48	4,38	0,04
Modelos de herbívoros	6,72	3	2,24	3,95	0,01
Interação	10,95	3	3,65	6,43	<0,01
Erro	45,41	80	0,57	*	*

## **CAPÍTULO 2: DEFESAS APÓS A DISPERSÃO**

### **PREDAÇÃO PÓS-DISPERSÃO POR FORMIGAS EM *Crotalaria pallida* (LEGUMINOSAE, PAPILIONOIDEAE, CROTALARIEAE): O PAPEL DA DENSIDADE DE SEMENTES, DISTÂNCIA DA PLANTA-MÃE E DE COMPOSTOS SECUNDÁRIOS NA SOBREVIVÊNCIA DE SEMENTES**

#### **INTRODUÇÃO**

A predação por animais é uma das principais causas de mortalidade em sementes de plantas superiores (Janzen 1971a). Para algumas espécies vegetais a predação por insetos e vertebrados pode eliminar perto de 100% das sementes produzidas em uma estação (Francisco *et al.* 2003), tendo portanto conseqüências importantes para a dinâmica populacional das plantas (Janzen 1971a,b). Além disso, as interações entre predadores e sementes influenciam a ecologia dos predadores (Hulme & Hunt 1999) e, possivelmente, a estrutura das comunidades vegetais (Janzen 1970, Webb 1999, Harms *et al.* 2000). Diversos fatores foram sugeridos como moderadores das chances de sobrevivência de uma semente no solo, entre os quais pode-se mencionar a distância da planta-mãe, a densidade de sementes e a composição química da semente (Janzen 1970, 1971a, Henderson 1990).

Os predadores, por exemplo, tenderiam a se guiar pela presença da planta-mãe, causando uma mortalidade de sementes proporcionalmente maior próxima a esta (Janzen 1970). Além disso, alguns predadores são atraídos com maior

freqüência para locais com maiores densidades de sementes (Harms *et al.* 2000). Esta exploração diferencial pode gerar uma mortalidade proporcionalmente maior em áreas com grande densidade de sementes (Janzen 1970). Densidade de sementes e distância da planta-mãe são os principais fatores que seriam responsáveis pela seleção de mecanismos que permitam a fuga de sementes das proximidades da planta-mãe (A Hipótese do Escape – Janzen 1970). Entretanto poucos estudos experimentais foram realizados de forma a testar estes processos separadamente, uma vez que, em sistemas naturais, densidade e distância da planta-mãe estão negativamente correlacionadas (Howe & Smallwood 1982).

A composição química é outro fator tido como chave para a sobrevivência das sementes no solo (Janzen 1971, Henderson 1990, Cipollini & Levey 1997a, Guimarães *et al.* 2003). Como as sementes variam na sua composição química, é de se esperar que predadores generalistas escolham as sementes que permitam o maior ganho por unidade de massa (Janzen 1969). Sementes geralmente apresentam compostos secundários, que por sua impalatabilidade e/ou toxicidade, podem funcionar como defesas contra herbívoros, ao reduzirem o valor da semente como recurso (Janzen 1971, 1981, Cipollini & Levey 1997a). Diversos estudos sugerem que diferenças na predação de sementes por animais podem estar relacionadas com a concentração de compostos secundários nas sementes ou na polpa dos frutos (Janzen *et al.* 1981, 1986, Cipollini & Levey 1997a,b). Entretanto, poucos experimentos investigaram a influência dessas substâncias na interação entre animais e sementes (Knoch *et al.* 1993, Cipollini & Levey 1997c, Guimarães *et al.* 2003).

Este trabalho foi desenhado para investigar o papel (1) da densidade de sementes, (2) da distância da planta-mãe, e (3) da concentração de um composto secundário, o alcalóide pirrolizidínico integerrimina (Figura 1), na predação de sementes pós-dispersão. Como sistema modelo de estudo foi usado a interação entre sementes de *Crotalaria pallida* e seus predadores pós-dispersão em uma área de pastagens antrópicas em Campinas, Sudeste do Brasil. Os três fatores foram estudados tanto em uma mesma escala espacial (estações com 100 cm<sup>2</sup>) quanto temporal (24h), e por uma amplitude de, pelo menos, 3 ordens de grandeza. Desta forma é possível realizar uma análise comparativa da influência destes fatores na sobrevivência de sementes.

As perguntas que esse trabalho se propõe a responder são:

- (1) Qual a importância das formigas e vertebrados como predadores de sementes de *Crotalaria pallida*?
- (2) Quais as espécies de formigas que removem as sementes de *Crotalaria pallida*?
- (3) A sobrevivência de sementes de *Crotalaria pallida* é dependente da distância da planta-mãe?
- (4) A sobrevivência de sementes de *Crotalaria pallida* é dependente da densidade de sementes no local?
- (5) A concentração de integerrimina aumenta a sobrevivência de modelos de sementes?

## MATERIAL & MÉTODOS

### 1. *Organismo estudado*

*Crotalaria pallida* Ait. (Leguminosae, Papilionoideae, Crotalarieae) é uma planta semi-arbustiva, de origem paleotropical que se espalhou por toda a região tropical do mundo (Polhill 1982). No sudeste do Brasil, *Crotalaria pallida* ocorre em grandes agregações especialmente perto de estradas, em pastos e terrenos baldios. As sementes pesam por volta de 6,0 mg, são marrons e riniformes, sendo dispersas por autocoria. Assim como as demais partes da planta, as sementes contêm uma mistura de alcalóides pirrolizídicos (APs), compostos secundários comuns no gênero *Crotalaria* e em plantas de outras famílias como as Asteraceae e Boraginaceae (Hartmann & Witte 1995). Os dois APs mais abundantes nas sementes maduras de *Crotalaria pallida* são, em ordem de abundância, usaramina e integerrimina (Figura 1), ambos com estruturas muito similares. Usaramina apresenta configuração Z na dupla ligação dos C15-C20 e uma hidroxila na posição C-18 quando comparada com integerrimina (Hartmann & Witte 1995). Além da presença de APs, a planta possui nectários extra-florais próximos às estruturas reprodutivas que podem estar associados à proteção contra predadores de sementes (ver Capítulo 1).

### 2. *Área de Estudo*

O estudo foi realizado entre os meses de outubro e dezembro de 2002 no Bairro Village, em Campinas, Estado de São Paulo, sudeste do Brasil (22°54'20"S, 47°03'39"W). A vegetação local pode ser descrita como pastos de origem

antrópica (“terrenos baldios”) dominados por *Brachiaria* sp. (Poaceae) e com grandes manchas de *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae), além de algumas asteráceas e três espécies de *Crotalaria*. *Crotalaria pallida* é a espécie mais abundante no local (Ferro 2001). Na área existem algumas espécies de predadores de sementes pós-dispersão, tais como a rolinha (*Zenaida auriculata*, Columbiformes, Columbidae), a galinha (*Gallus gallus*, Galliformes, Phasianidae), ratos (*Rattus* sp., Rodentia, Muridae) e formigas da sub-família Myrmecinae.

### **3. Remoção de sementes é igual a predação de sementes?**

Em muitos estudos sobre predação de sementes, a remoção de sementes que não possuem polpa carnosa (recurso) é igualada a predação (como em Guimarães & Cogni 2002). Entretanto, isto não é necessariamente verdade (Levey & Byrne 1993). De fato, animais estocadores que consomem sementes, como roedores e formigas, podem eventualmente atuar como dispersores, uma vez que sementes estocadas podem germinar (Vanderwall 1990). Além disso, muitas sementes podem ser dispersas por perda durante a remoção pelo predador (Buckley 1982, van der Pijl 1982).

Neste capítulo, a remoção de sementes foi igualada a predação de sementes por três motivos. Em primeiro lugar, ausência de recurso da semente sugere que qualquer interação entre sementes e animais seja negativa para a planta, com o animal visando o consumo da semente. Em segundo lugar, a grande densidade de ninhos de formigas (potenciais predadores) na área sugere que a distância de remoção das sementes coletadas até o ninho é pequena, o que, em teoria, reduz a chance de dispersão acidental. Em terceiro lugar,

eventuais efeitos positivos para a planta causados pela estocagem de alimento por predadores podem ser considerados efeitos colaterais da predação de sementes e merecem ser estudados futuramente como fatores que perturbam as previsões aqui encontradas.

#### **4. Qual a importância das formigas e vertebrados como predadores de sementes de Crotalaria pallida?**

Para verificar a importância de invertebrados (em especial, formigas) na predação de sementes de *Crotalaria pallida* foi realizado um experimento usando dois tratamentos. O primeiro tratamento, aberto a qualquer predador de sementes, consistia de 20 sementes de *Crotalaria pallida* recolhidas de vagens maduras na área de estudo colocadas no solo, enquanto o segundo grupo, aberto apenas para invertebrados, era similar, a não ser pela presença de um disco de plástico apoiado sobre três cliques (sustentando o disco a cerca de 2 cm do solo), o qual excluía vertebrados. Estações onde o disco de plástico se encontrasse virado ou longe do ponto original foram descartadas da análise devido à provável intervenção de vertebrados (Wolff & Debussche 1999). Foram colocadas 10 estações de cada grupo experimental de forma intercalada pela área de estudo. Cada estação distava 10m da vizinha mais próxima. O número de sementes restantes foi contado após 24h. A diferença entre os dois grupos experimentais foi testada através do teste t cuja significância foi verificada por procedimentos de aleatorização (Manly 1997).

**5. Qual é a fauna de formigas que remove as sementes de Crotalaria pallida?**

Para identificar quais espécies de formigas interagem com *Crotalaria pallida* foram feitas coletas em dois horários distintos (08:00h e 19:30h). Em cada período foram montadas 30 estações de coleta, cada uma com 15 – 30 sementes maduras de *Crotalaria pallida*. Cada estação distava 10 m uma da outra e foi vistoriada três vezes por 30 s com intervalos de 30 min entre as vistorias. As formigas foram coletadas e identificadas.

**6. A sobrevivência de sementes de Crotalaria pallida é dependente da distância da planta-mãe?**

Para verificar a importância da distância da planta-mãe na predação de sementes por formigas foram montadas 35 estações na área de estudo. Cada estação foi montada com 20 sementes e foi protegida contra a presença de vertebrados, conforme descrito no primeiro experimento. As estações foram posicionadas a diferentes distâncias do indivíduo reprodutivo mais próximo (0 m; 0,1 m; 0,5 m; 1 m; 3 m; 6 m; e 10 m). Os indivíduos de *Crotalaria pallida* escolhidos para este experimento não possuíam vagens abertas (sementes recentemente dispersas) a fim de reduzir as variações naturais na densidade de sementes. A distância e a direção em relação à planta mais próxima foram determinadas através de sorteio. Cada planta usada no experimento recebeu (através de sorteio) uma estação e foi usada uma única vez. Cada distância foi replicada 5 vezes. Após 24 h, foi contado o número de sementes que não foram removidas. O efeito da distância na sobrevivência de sementes foi testado através

de uma regressão linear simples (Zar 1999). As variáveis foram log-transformadas  $\log_{10}(x+1)$ .

**7. A sobrevivência de sementes de Crotalaria pallida é dependente da densidade de sementes no local?**

Para verificar qual a importância da densidade de sementes para a predação por formigas foram colocadas 70 estações pela área de estudo. Em cada estação foi colocada uma das dez densidades de sementes arbitrariamente definidas (1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 70, 100 sementes/100 cm<sup>2</sup>). As estações estavam com a proteção contra vertebrados e foram dispostas a pelo menos 10 m de distância uma das outras. Após 24 h, foi contado o número de sementes não-removidas.

Para testar se ocorre efeito dependente de densidade, os dados foram ajustados à função  $y=ax^b$ . O ajuste foi realizado usando uma regressão linear simples através da transformação dos dados em  $\log_{10}$  (segundo Harms *et al.* 2000)

$$\log(y+1) = b * \log(x+1) + \log a$$

Neste caso o coeficiente angular ( $b$ ) representa a taxa em que o número de sementes sobreviventes varia com o número de sementes original e  $a$  é uma constante. Caso  $b = 1$  então não há efeito dependente de densidade e as sementes são predadas de forma proporcional em relação à densidade inicial (Figura 2 e 3). O coeficiente angular foi testado através de um teste t pareado entre número de sementes sobreviventes observado no experimento e esperado

caso  $b = 1$ . Os valores esperados foram calculados através da equação de regressão obtida entre densidade de sementes e número de sementes sobreviventes, substituindo apenas o valor de  $b$ . Os resíduos desta regressão foram testados contra a densidade original em  $\log_{10}(x+1)$  através de uma regressão linear simples para investigar se existe variação no  $b$  dependente da densidade, ou seja, variação na taxa de variação da sobrevivência de sementes.

#### **8. A concentração de integerrimina aumenta a sobrevivência das sementes ?**

Para verificar qual a importância da concentração de APs para a sobrevivência de sementes frente à predação por formigas foi usado como modelo de semente palatável o arroz (*Oryza sativa* L., Poaceae) e o AP integerrimina.

A integerrimina foi isolada de *Senecio brasiliensis* (Senecioneae, Asteraceae) usando a metodologia descrita em Trigo *et al.* (1996). A substância foi aplicada em quatro diferentes concentrações em sementes de arroz usando uma micropipeta com precisão de 1 $\mu$ l da seguinte forma: 5 $\mu$ l da solução eram aplicados cuidadosamente de um lado do grão de arroz. O grão era seco em corrente fraca de ar. Após a secagem, o grão era cuidadosamente virado e mais 5 $\mu$ l eram aplicados no lado oposto. Os grãos foram armazenados a -20°C e retirados 30 min antes da montagem dos experimentos.

O experimento foi realizado com quatro diferentes tratamentos: (1) o solvente (MeOH), (2) a concentração de alcalóides totais encontrada na semente madura de *Crotalaria pallida* (30.6 $\mu$ /g, baseado em Ferro 2001), (3) 10x a concentração e (4) 100 x a concentração. Os grãos de arroz foram colocados em

estações na área de estudo (20 grãos por estação, todos com a mesma concentração).

Cada estação era protegida contra vertebrados como nos experimentos anteriores e estava disposta à cerca de 10m de distância da estação mais próxima. Cada tratamento foi replicado 20 vezes. Após 24 h, foi contado o número de sementes não-removidas. A importância da concentração de integerrimina para a sobrevivência de sementes foi testada através de uma regressão linear simples (Zar 1999). As variáveis foram transformadas usando o  $\log_{10}(x+1)$ .

## RESULTADOS

Após 24 h, não foi detectada diferença significativa entre as estações abertas a todos os predadores e as que interagiram apenas com invertebrados (teste t, 10000 iterações,  $p=0,367$ ). De fato, nenhuma estação protegida apresentou evidência de ataque por vertebrados. Entre os invertebrados foram observadas apenas três espécies de formigas (duas espécies *Pheidole* e uma espécie de *Acromyrmex*), todas da subfamília Mirmecinae interagindo com as sementes de *Crotalaria pallida* (Tabela 1). Estas formigas eram capazes de remover as sementes solitariamente ou com ajuda de outras (1-3) operárias. Após a estação ser localizada, as formigas removiam rapidamente quase todas as sementes.

Nos experimentos de distância da planta-mãe não foi detectada nenhuma relação entre este fator e a sobrevivência de sementes ( $F=1,18$ ;  $p=0,29$  - Figura 4). No experimento de densidade, a regressão entre este fator e número de

sementes foi significativa ( $F=28,44$ ;  $p<0,0001$ ;  $R^2=0,325$ ; Figura 5A). Foi detectado efeito dependente de densidade inverso, ou seja uma redução na proporção de sementes restantes com o aumento da densidade original (teste t pareado,  $t=-5,21$ ;  $p<0,0001$ ). A análise dos resíduos da regressão não detectou nenhuma tendência de variação no efeito dependente de densidade ( $F=0,06$ ,  $p=0,94$ ) sugerindo que o efeito de dependência de densidade é constante pela amplitude analisada do fenômeno (Figura 5B).

No experimento de defesa química, a concentração de Integerrimina esteve positivamente relacionada com a sobrevivência das sementes ( $F=8,45$ ;  $p=0,005$ ;  $R^2=0,108$ ), demonstrando que a substância pode ter ação defensiva e que esta ação é dependente da concentração (Figura 6).

## DISCUSSÃO

A predação de sementes por formigas é comum em áreas desérticas ou pastagens secas (Holldobler & Wilson 1990, Hulme 2002), onde consomem, principalmente, sementes de gramíneas, além de muitas outras espécies de plantas (Buckley 1982). As formigas coletoras de sementes são um problema agrônômico sério e, apesar de apenas uma pequena parte das sementes disponíveis serem coletadas (em geral  $<5\%$ ), algumas espécies em particular podem perder grande parte de sua produção devido ao consumo por formigas, sugerindo que a predação por formigas é um fator regulador importante para a dinâmica reprodutiva das plantas (Ashton 1979, Buckley 1982, Crist *et al.* 1992, Levey & Byrne 1993, Brown & Human 1997, Wilby & Shachak 2000). Nos

neotrópicos, no entanto, faltam informações sobre a relevância de formigas como predadoras de sementes em ambientes abertos.

Na área de estudo, as formigas, em especial uma espécie do gênero *Pheidole*, removeram rapidamente (em menos que 24h) grandes quantidades de sementes. *Pheidole* é um dos principais gêneros de formigas coletoras de sementes em diversos ambientes, interagindo com várias espécies de plantas (Andersen 1982, Gross *et al.* 1991, Levey & Byrne 1993, Guimarães & Cogni 2002; para uma revisão veja Hölldobler & Wilson 1990), porém preferencialmente gramíneas (Buckley 1982, Gross *et al.* 1991). Aqui, foi demonstrado que a remoção de sementes de *Crotalaria pallida* não parece estar relacionada à distância de indivíduos reprodutivos, mas sim à densidade de sementes no solo e a concentração de alcalóides na semente.

A distância de um indivíduo reprodutivo não influenciou na remoção das sementes provavelmente porque formigas como *Pheidole* e *Acromyrmex* são coletores generalistas (Hölldobler & Wilson 1990, Leal & Oliveira 1998) e este tipo de forrageador parece responder à densidade do recurso e não a referências espaciais como a presença de uma árvore de uma determinada espécie para localizar sementes (Janzen 1970). Em teoria, a presença de nectários extra-florais em *Crotalaria pallida* poderia atrair estas forrageadoras para próximo da planta-mãe. Entretanto, *Pheidole* e *Acromyrmex* nunca foram observadas nestas estruturas, geralmente dominadas por espécies do gênero *Camponotus* (Capítulo 1), que não foram observadas predando sementes. Esta diferença está relacionada à ecologia alimentar destas formigas, sendo *Camponotus* uma formiga onívora que comumente consome substâncias líquidas como néctar (Rico-Gray *et*

al. 1998, Oliveira *et al.* 1999, Dejean 2000, Cogni & Freitas 2002), enquanto *Acromyrmex* coleta matéria vegetal (incluindo sementes) para o cultivo de fungos para sua alimentação (Leal & Oliveira 1998, Wetterer *et al.* 2001), e as espécies de *Pheidole* estudadas são coletoras de sementes (Andersen 1982, Gross *et al.* 1991). Desta forma, as formigas relacionadas à proteção das vagens nas plantas não são as mesmas que predam suas sementes, o que, em princípio, libera *Crotalaria pallida* do balanço comum em interações mutualísticas onde as mesmas características estão associadas a atração de parceiros mutualistas e inimigos naturais (Herrera 1986, Cipollini & Levey 1997c). Entretanto, é importante notar que formigas coletoras como as *Pheidole* eventualmente acabam por dispersar sementes (Levey & Byrne 1993), o que pode gerar um balanço similar nas interações após a dispersão primária. A importância das formigas como dispersoras secundárias de sementes de *Crotalaria pallida* ainda permanece inexplorada.

A relação de dependência de densidade inversa observada para sobrevivência de sementes é esperada em interações entre estas e seus predadores (Janzen 1970, 1971). Entretanto, quando a densidade atinge valores extremos, os predadores são saciados e a relação esperada passa a ser positiva, sendo a sobrevivência proporcionalmente maior em áreas com maior densidade (Janzen 1971). As evidências a favor da dependência de densidade na sobrevivência de plantas são controversas (Howe & Smallwood 1982, mas veja Harms *et al.* 2000), sendo necessário um melhor entendimento de como a densidade de sementes pode influenciar o comportamento dos predadores. Neste trabalho, a densidade variou em três ordens de grandeza, atingindo concentrações

extremamente altas (1 semente/cm<sup>2</sup>) e, mesmo nesses casos, a sobrevivência de sementes decaiu com a densidade seguindo uma taxa constante. Este efeito dependente de densidade amplo e invariante pode estar relacionado a, pelo menos, três fatores.

1. A dificuldade de localização de pontos com baixas densidades por predadores pode ter gerado o escape das sementes na escala temporal observada. A semente de *Crotalaria pallida* é pequena e pouco conspícua no solo, características usualmente associadas a dificuldade de localização por parte de predadores, principalmente em baixas densidades (revisto por Janzen 1971).

2. Formigas da família Myrmecinae recrutam grande número de operárias que exploram continuamente o recurso localizado (Hölldobler & Wilson 1990, Hughes & Westoby 1992). Esta estratégia de forrageamento, aliada ao pequeno tamanho da semente, que é facilmente removida por poucas operárias, sugere que uma vez localizado um agregado, as formigas são capazes de eliminá-lo quase completamente. Alguns estudos indicam que o recrutamento de formigas é influenciado, entre outros fatores, pela concentração do recurso (revisto em Holldobler & Wilson 1990). Por exemplo, Hughes & Westoby (1992) verificaram que uma espécie australiana do gênero *Pheidole* remove mais rapidamente sementes em agregados do que isoladas, um padrão possivelmente associado a sua estratégia de forrageamento em grupo. É provável que mesmo as grandes concentrações de sementes usadas neste trabalho não sejam suficientes para gerar um efeito de saciação do ninho de formigas.

3. As escalas espacial e temporal escolhidas podem ter influenciado os padrões observados. A escala temporal usada no experimento permitiu a

detecção de diferenças na sobrevivência de sementes entre as densidades. É possível que, para intervalos de tempo menores, efeitos aleatórios na localização das estações poderiam mascarar os efeitos dependentes de densidade. Ou ainda, que em intervalos de tempo maiores, diferenças na probabilidade de localização entre estações com baixa e alta densidade de semente diminuam fazendo com que o efeito desapareça (Fox 2001).

A influência da escala espacial no padrão observado está na origem da própria definição de densidade, uma vez que a densidade é uma razão entre uma quantidade e uma unidade de espaço. Entretanto, é necessário limitar a escala espacial que será usada para o cálculo da densidade (mas veja Capítulo 3 para uma alternativa à seleção arbitrária). Neste trabalho optou-se por utilizar 100 cm<sup>2</sup> como a escala espacial para os cálculos da densidade. Como consequência, mesmo densidades altas de sementes podem ter sido facilmente removidas pelos ninhos de *Pheidole*. O uso de escalas maiores (~10.000 cm<sup>2</sup>) poderia gerar saciação (*sensu* Janzen 1971) dos ninhos locais mesmo com densidades similares. Diversos estudos demonstraram que a escala espacial pode influenciar o comportamento de formigas coletoras (Gordon 1993, Crist & Wiens 1994). Entretanto, estes estudos enfocaram questões relacionadas a estrutura de habitat. Desta forma, sugere-se que estudos experimentais, que investiguem como o simples aumento da escala espacial influencia a dependência, de densidade podem ser extremamente interessantes para a compreensão das interações entre formigas e sementes.

Por fim, a presença de substâncias do metabolismo secundário é geralmente associada à defesa química contra herbívoros (Cipollini & Levey 1998)

ou às restrições evolutivas (Erlén & Eriksson 1998). As espécies do gênero *Crotalaria* possuem alcalóides pirrolizidínicos em muitas partes da planta, sendo que as concentrações mais altas se encontram nas sementes (Moore 1978, Polhill 1982, Ferro 2001). Sementes verdes de *Crotalaria pallida* possuem cerca de dez vezes mais alcalóides que as sementes maduras (Ferro 2001), o que poderia sugerir que a concentração de alcalóides estaria relacionada a defesa contra predadores pré-dispersão (Cipollini & Levey 1997c). Entretanto, Moore (1978) demonstrou que a predação pré-dispersão em *Crotalaria pallida* está positivamente correlacionada com a concentração de alcalóides na semente, padrão observado em sistemas onde predadores pré-dispersão especializados ultrapassaram a barreira da defesa química das plantas e utilizam os compostos secundários para a sua própria defesa, um padrão geralmente observado em insetos fitófagos (Whittaker & Feeny 1971).

O papel destas substâncias contra inimigos naturais das sementes e frutos ainda é pouco conhecido e controverso (Cipollini & Levey 1998, Erlén & Eriksson 1998), apesar de haver alguma evidência de que formigas coletoras selecionem sementes não-tóxicas, como certas gramíneas (Buckley 1982, Gross *et al.* 1991). Knoch *et al.* (1993) demonstraram que sementes infectadas com o fungo *Acremonium coenophialum*, produtor de alcalóide, eram coletadas por formigas *Pogonomyrmex rugosus*, mas eram posteriormente descartadas nas lixeiras da colônia mais freqüentemente que sementes sem fungos. Resultado similar foi encontrado para outros sistemas onde predadores podem eventualmente atuar como dispersores (Guimarães *et al.* 2003). Desta forma, alcalóides podem reduzir

a predação e aumentar a deposição de sementes em micro-sítios adequados (*sensu* Wenny 2001).

Neste estudo, foi demonstrado que (1) a integerrimina encontrada nas sementes maduras de *Crotalaria pallida* pode ter atividade contra a remoção por seus principais predadores pós-dispersão e (2) que esta atividade é dependente da concentração da substância. Desta forma, a integerrimina reduz a predação de sementes sem gerar os benefícios da eventual dispersão secundária por formigas, resultado similar ao encontrado com outras formigas (Knoch *et al.* 1993). O gênero *Crotalaria* apresenta grande variação intra e interespecífica na concentração e composição de APs (Ferro 2001). Alguns estudos sugerem que predadores podem atuar como forças seletivas sobre a concentração de substâncias do metabolismo secundário de suas presas (Silva & Trigo 2002). Estudos que investiguem como a variação natural na concentração de APs pode estar relacionada à sobrevivência de sementes após a dispersão primária e ao balanço entre a redução da predação e da dispersão secundária por formigas são necessários para uma melhor compreensão das interações entre formigas e sementes.

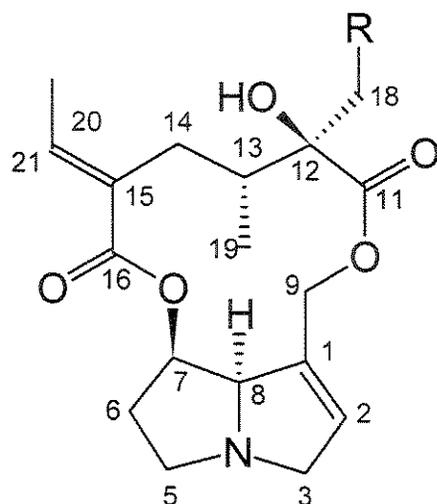
A predação de sementes pós-dispersão é um fenômeno que pode ter marcantes implicações para a biologia reprodutiva das plantas (Harms *et al.* 2000). Entretanto, a compreensão da influência das características das sementes e de seus predadores nestas interações ainda é pequena (Howe & Smallwood 1982). Este estudo representa um passo para uma melhor compreensão sobre como fatores que tradicionalmente são tidos como moduladores da predação pós-dispersão se comportam através de uma grande amplitude de valores (pelo menos

três ordens de grandeza). Entretanto, para um maior entendimento de como se organizam as relações entre sementes e seus predadores serão necessários estudos experimentais que investiguem (1) como as escalas temporais e espaciais influenciam nos padrões observados e (2) como a interação de fatores, como densidade e defesa química, influencia a sobrevivência das sementes.

Tabela 1. Frequência de formigas coletoras das sementes de *Crotalaria pallida* no Village, Campinas, São Paulo capturadas nas estações de coleta em diferentes períodos do dia. Trinta estações de amostragem por período.

Espécies	Período	
	Dia (8:00h)	Noite (19:30h)
<i>Pheidole</i> sp. 1	14	0
<i>Pheidole</i> sp.2	3	3
<i>Acromyrmex</i> sp.	2	1

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE



Integerrimina, E, R=H  
Usaramina, E, R=OH

Figura 1. Alcalóides pirrolizidínicos em sementes maduras de *Crotalaria pallida*.

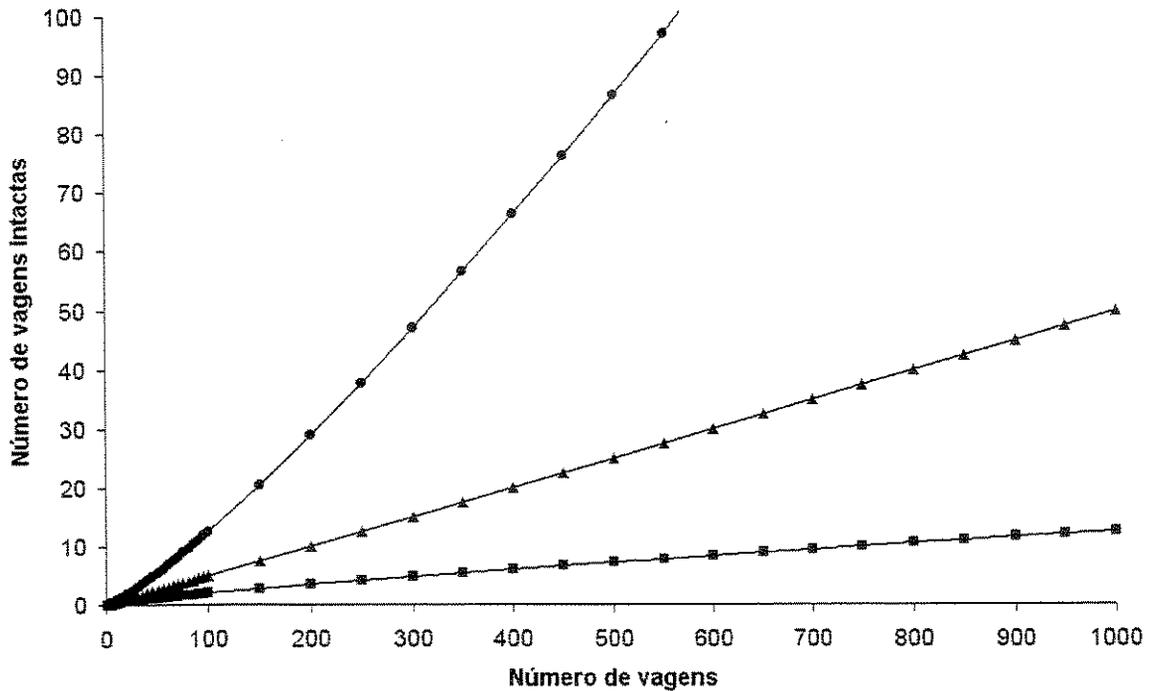


Figura 2. Exemplo teórico de três possíveis respostas a densidade da sobrevivência de vagens. Triângulos representam ausência de dependência de densidade, a sobrevivência é proporcional ao número de vagens. Quadrados representam dependência de densidade inversa, onde a proporção de vagens sobreviventes decai com a densidade. Círculos exemplificam dependência de densidade positiva, onde a proporção de vagens sobreviventes aumenta com a densidade.

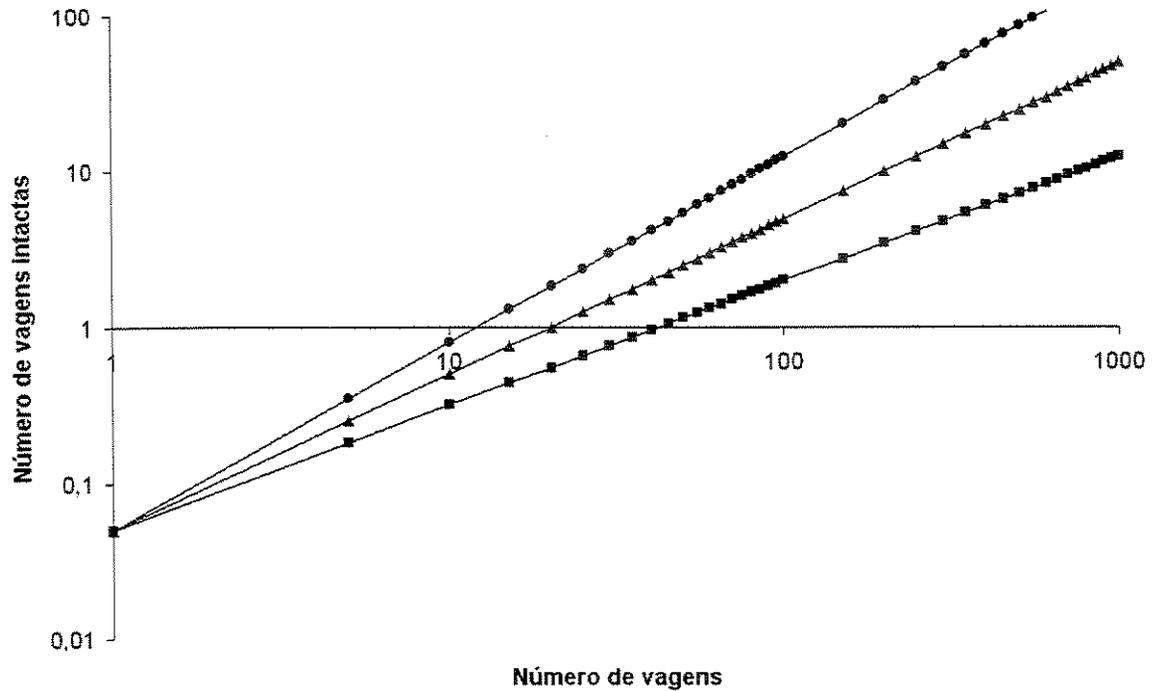


Figura 3. Exemplo teórico da figura 2 com os eixos em  $\log_{10}$ . O coeficiente angular da reta em um gráfico log-log passa a estimar a taxa de variação (veja texto para mais detalhes). Triângulos representam ausência de dependência de densidade ( $b = 1$ ). Quadrados representam dependência de densidade inversa, onde a proporção de vagens sobreviventes decai com a densidade ( $b < 1$ ;  $b = 0,8$ ). Círculos exemplificam dependência de densidade positiva, onde a proporção de vagens sobreviventes aumenta com a densidade ( $b > 1$ ;  $b = 1,2$ ).

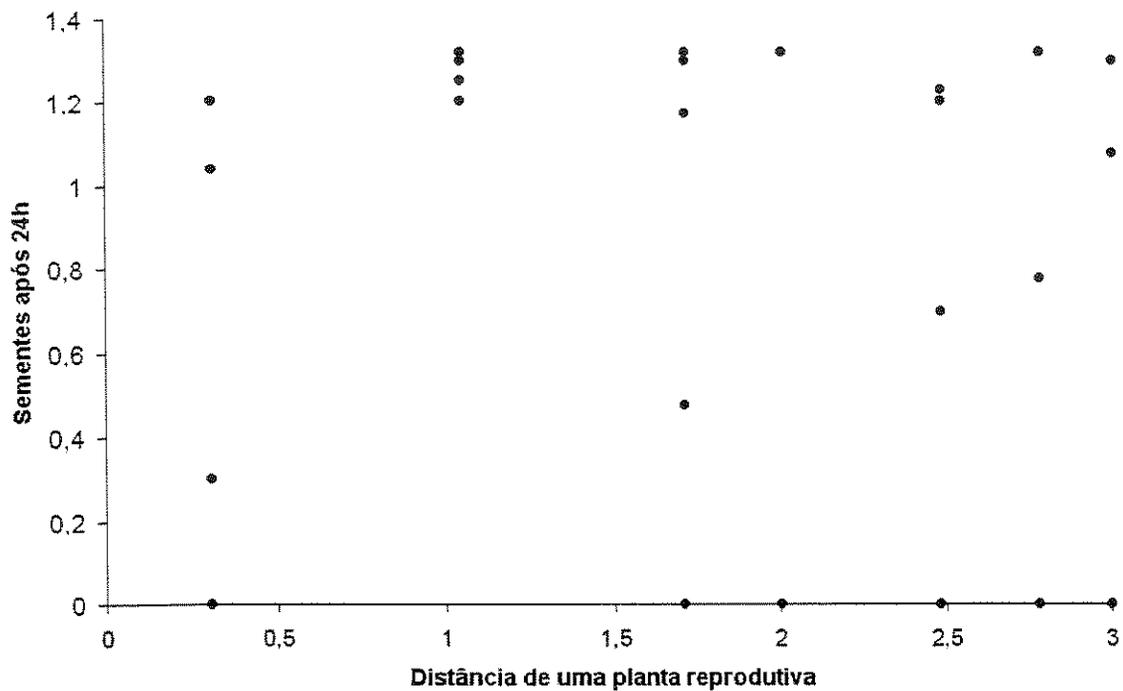


Figura 4. Relação entre sobrevivência das sementes após 24h e distância de um indivíduo reprodutivo de *Crotalaria pallida*. Estações inicialmente possuíam 20 sementes. Dados transformados em  $\log_{10}(x+1)$

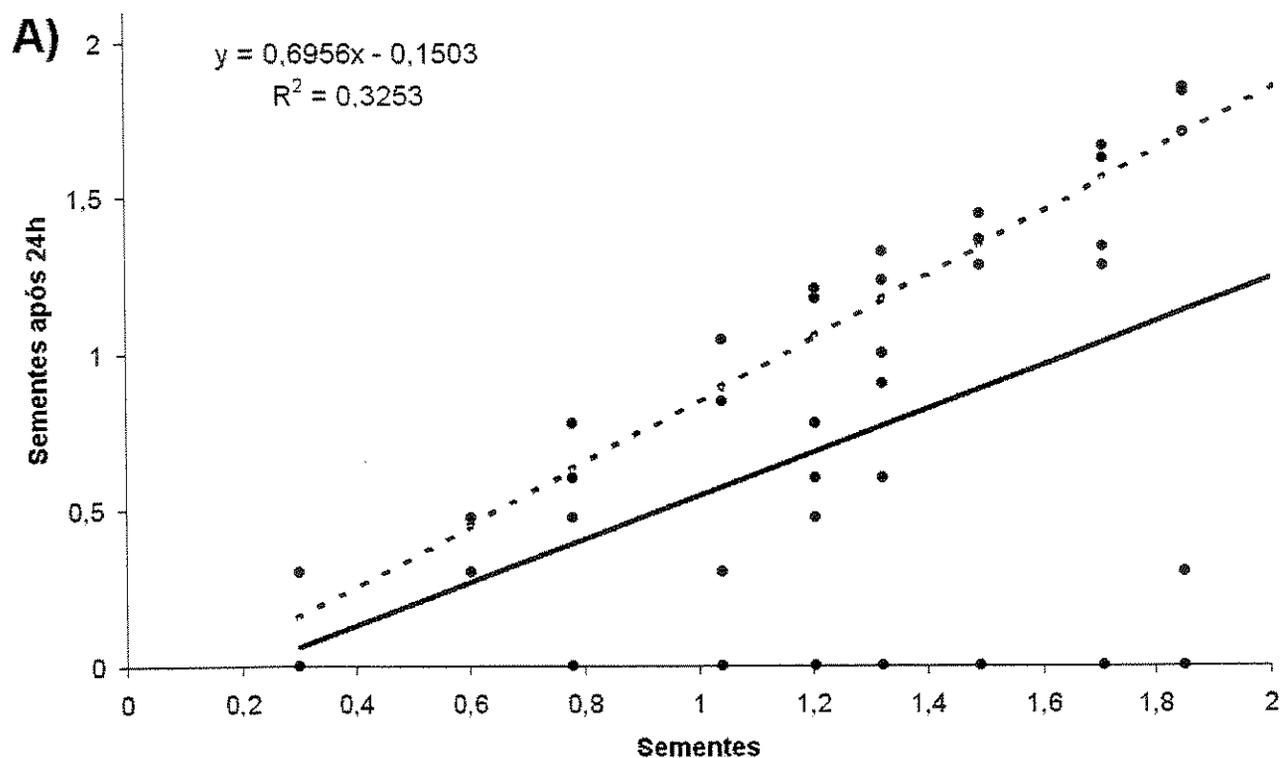


Figura 5. Dependência de densidade (DD) na sobrevivência de sementes de *Crotalaria pallida*. (A) Relação entre a sobrevivência de sementes e o número de sementes inicial. A reta pontilhada indica o esperado em ausência de DD. A reta contínua é a melhor ajustada aos dados. Dados transformados em  $\log_{10}(x+1)$ .

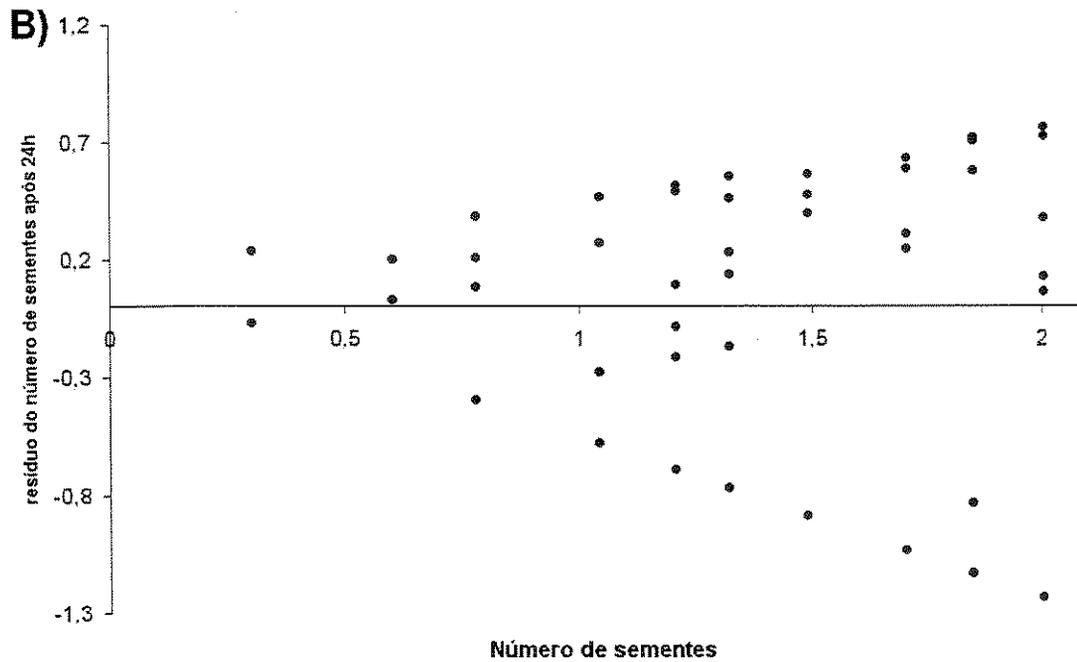


Figura 5. Dependência de densidade (DD) na sobrevivência de sementes de *Crotalaria pallida*. (B) relação entre o resíduo da regressão da Figura 3A e a densidade. Dados transformados em  $\log_{10}(x+1)$ .

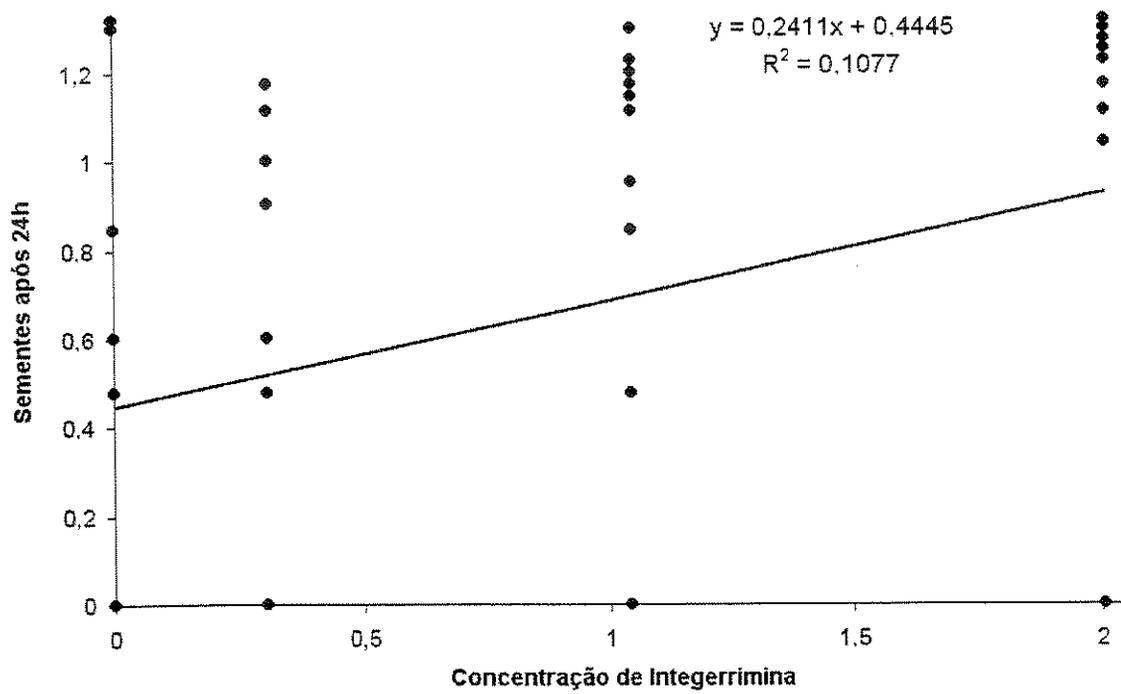


Figura 6. Sobrevivência das sementes de *Oryza sativa* (Poaceae) tratadas com diferentes concentrações de integerrimina. Estações possuíam inicialmente 20 grãos. Dados transformados em  $\log_{10}(x+1)$ .

## CAPÍTULO 3: DEPENDÊNCIA DE DENSIDADE

### SOBREVIVÊNCIA DE VAGENS DEPENDENTE DE DENSIDADE EM *CROTALARIA PALLIDA* (LEGUMINOSAE, PAPILIONOIDEAE, CROTALARIEAE) : UM PADRÃO DEPENDENTE DA ESCALA ESPACIAL

#### INTRODUÇÃO

A dependência de densidade é definida como a variação na taxa de ocorrência de um evento como mortalidade, natalidade ou predação, em função da variação da densidade de indivíduos (Begon *et al.* 1990). Efeitos dependentes de densidade (DD) ocorrem em diversos fenômenos ecológicos, sendo considerados um dos aspectos-chave da ecologia de populações (Roughgarden 1996). Em estudos de ecologia vegetal, a dependência de densidade tem sido considerada um dos principais fatores que moldam a sobrevivência de sementes e plântulas, tendo implicações para estruturação demográfica e genética das populações vegetais (Maelzer 1970, Solow & Steele 1990, Cintra 1997, Fragoso 1997, Peres *et al.* 1997, Harms *et al.* 2000).

A sobrevivência de sementes a predadores pode apresentar três comportamentos distintos relacionados à densidade: (1) independência da densidade, ou seja, a sobrevivência é apenas proporcional ao número de sementes do local, (2) dependência de densidade inversa: a probabilidade de sobrevivência *per capita* diminui com o aumento da densidade de sementes (Janzen 1970), e (3) dependência de densidade positiva: a sobrevivência *per capita* aumenta com o aumento da densidade (Janzen 1971a).

O efeito DD inverso tem sido considerado um dos principais fatores atuando sobre a evolução das estratégias de dispersão de sementes em plantas tropicais (Janzen 1971a,b, Schupp 1992, Cintra 1997, Fragoso 1997, Peres *et al.* 1997), enquanto o efeito DD positivo tem sido associado ao aparecimento de padrões de frutificação em massa, que podem ser mecanismos que promovem a saciação dos predadores (*sensu* Janzen 1971a), gerando uma maior sobrevivência de sementes (Janzen 1971a, Ballardie & Whelan 1986, Kelly 1994, Vander Wall 2002). Ambos os tipos de efeitos DD podem ser centrais para a estrutura espacial das populações e da comunidade vegetal (Janzen 1970, 1971a, Harms *et al.* 2000, Vander Wall 2002).

Densidade é, por definição, uma razão entre uma quantidade de recurso e uma unidade de espaço. Na maior parte dos estudos de predação de sementes, a escala em que o fenômeno é estudado é determinada pelo pesquisador, geralmente através de seus conhecimentos de história natural do sistema (por exemplo em Peres *et al.* 1997). Este tipo de procedimento é usual em estudos de ecologia e é uma limitação necessária para a realização de experimentos ou observações (Capítulo 2). Todavia, fenômenos ecológicos se organizam em uma grande amplitude de escalas espaciais e temporais (Levin 1992, Kemp *et al.* 2001) e a predação de sementes não foge à regra (Fragoso 1997).

Em muitos casos, a proporção de sementes predadas em um indivíduo pode ser determinada pelas características da vizinhança desta planta, ao invés de por aspectos intrínsecos ao próprio indivíduo. Por exemplo, Garcia *et al.* (2001) sugerem que para *Junipepus communis* as interações entre frugívoros e frutos dependem mais das características populacionais do que das próprias

plantas. De fato, mecanismos que podem estar associados à saciação de predadores como a frutificação em massa são em muitos casos fenômenos populacionais, onde muitos indivíduos frutificam simultaneamente (Janzen 1971, Kelly 1994, Vander Wall 2002). Nestes casos, a observação da predação de sementes em escalas espaciais mais amplas será mais informativa sobre esta interação, uma vez que o resultado das interações entre animais e plantas depende mais de aspectos da população (Curran & Leighton 2000, Garcia *et al.* 2001).

Neste capítulo foi investigado se a sobrevivência das vagens de *Crotalaria pallida* (Leguminosae, Papilionoideae, Crotalarieae) ao ataque de seu principal consumidor, a larva da mariposa *Utetheisa ornatrix* (Arctiidae), está relacionada à densidade de vagens no local e à escala espacial estudada. Espera-se que a proporção de vagens sobreviventes decaia com a densidade, não importando a escala, caso (1) o predador ataque preferencialmente áreas com maior densidade e (2) não haja saciação de predador. Além disso, caso *Utetheisa ornatrix* responda preferencialmente à quantidade de vagens em indivíduos de *Crotalaria pallida*, espera-se que a variação na relação entre número e sobrevivência de vagens intactas aumente com a escala de observação.

As perguntas que tentou-se responder foram:

- (1) Qual a proporção de vagens atacadas? Existe variação de acordo com o estado de maturação?
- (2) Existe efeito DD na sobrevivência das vagens a ataques de *Utetheisa ornatrix*?

- (3) O efeito DD é modificado com a escala em que se define a unidade de recurso?
- (4) A modificação nos efeitos DD está relacionada ao aumento na quantidade de recurso por mancha?
- (5) A variação na relação entre número e sobrevivência de vagens está correlacionada com a escala espacial?

## **MATERIAIS & MÉTODOS**

### **1. Área de Estudo**

A coleta foi realizada entre os meses de fevereiro e março de 2002 no bairro Village, em Campinas, Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil (22°54'20"S, 47°03'39"W). A vegetação local pode ser descrita como pastos de origem antrópica ("terrenos baldios") dominados pela gramínea *Brachiaria* sp. (Poaceae) e com grandes manchas de *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae), algumas asteráceas e três espécies de *Crotalaria*. *Crotalaria pallida* é a espécie do gênero mais abundante no local (Ferro 2001). Na área, a larva da mariposa *Utetheisa ornatrix* é o principal predador de sementes pré-dispersão desta planta (Figura 1). *Utetheisa ornatrix* é responsável por quase 100% dos ataques a vagens (Ferro 2001, Guimarães, observação pessoal).

### **2. Crotalaria pallida**

*Crotalaria pallida* Ait. é uma leguminosa, semi-arbustiva de origem paleotropical que se espalhou por toda a região do globo (Polhill 1982), sendo

considerada uma das principais plantas daninhas do país (Fonseca *et al.* em preparo). No sudeste do Brasil, *Crotalaria pallida* ocorre perto de estradas, pastos e terrenos baldios, às vezes em agregações de diversos tamanhos. Suas vagens medem de 40-50 mm, e são estreitas e cilíndricas, quando imatura é densa, pubescente e verde, enquanto a madura é glabra e de coloração castanha (Polhill, 1982). As sementes são dispersas por autocoria (*sensu* van der Pijl 1982), através da rápida explosão da vagem e lançamento das sementes. As vagens estão organizadas em racemos ( $4,07 \pm 4,77$  vagens por racemo,  $n = 433$ ). Um indivíduo reprodutivo possui de um à 50 racemos, com média em  $5,01 \pm 5,14$  racemos ( $n = 433$ ) (Figura 1). Na base das estruturas reprodutivas existem nectários extraflorais que ficam ativos até o amadurecimento das vagens e podem funcionar como um mecanismo defensivo contra predadores de sementes (Capítulo 1).

### 3. Utetheisa oratrix

*Utetheisa oratrix* L. (Lepidoptera: Arctiidae) é uma mariposa aposemática comum em áreas perturbadas, com distribuição por todas as Américas (Pease 1968). As fêmeas colocam ovos em agrupamentos nas folhas de sua planta hospedeira (Sharma *et al.* 1965, Johnson *et al.* 1985, Mattocks 1986). As larvas de *Utetheisa oratrix* utilizam como alimento as plantas do gênero *Crotalaria*, ricas em alcalóides pirrolizidínicos (APs) (Sharma *et al.* 1965, Johnson *et al.* 1985, Mattocks 1986), usando estes compostos como defesa (Eisner *et al.* 2000). Além disso, as lagartas consomem preferencialmente as sementes verdes da planta (Johnson *et al.* 1985), o que as tornam importantes predadores de sementes do

gênero *Crotalaria* (Moore 1978). As larvas atacam folhas e as estruturas reprodutivas como botões florais, flores e, principalmente, vagens quando elas ainda não se tornaram maduras (vagens verdes). Há evidências de que as larvas de *Utetheisa oratrix* possam ser atacadas por fomigas que visitam os nectários extraflorais de algumas plantas do gênero, como *Crotalaria pallida* (Capítulo 1, Ferro 2001)

#### **4. Qual a proporção de vagens atacadas? Existe variação de acordo com o estado de maturação?**

Entre fevereiro e março de 2002, todos os racemos de todos os indivíduos em uma área de 600 x 600 m foram coletados em um curto período de tempo (~30 dias). A coleta foi realizada da seguinte forma: (1) os indivíduos foram mapeados, e (2) os racemos foram cuidadosamente ensacados e cortados. Os racemos foram mantidos em refrigeradores à -20°C e retirados apenas para a triagem do material. Em cada racemo, foram quantificados o número total de vagens e o número de vagens intactas. Vagens intactas foram definidas como vagens que não apresentavam as marcas externas características do ataque por *Utetheisa oratrix* (Figura 2). Cada vagem foi classificada quanto ao estado de maturação (verde ou maduro).

O estado de maturação da vagem (verde ou maduro) está relacionado com o tempo de existência da estrutura reprodutiva e, conseqüentemente, a chance dela ser atacada por um predador. Além disso, vagens maduras não são atacadas por *Utetheisa oratrix* de forma que a sobrevivência de vagens nesta fenofase pode ser considerada como a proporção de vagens que, de fato,

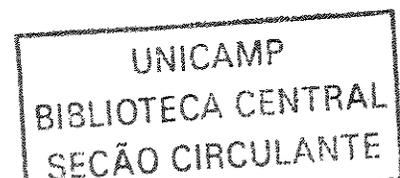
sobrevivem ao ataque de *Utetheisa ornatrix*. Por este motivo, a proporção de vagens atacadas e todas as análises subsequentes (efeito DD e efeito de escala espacial) foram feitas considerando separadamente os dois estados fenológicos da vagem.

### 5. Existe efeito DD na sobrevivência das vagens a ataques de *Utetheisa ornatrix*?

Para testar se ocorre efeito dependente de densidade sobre a sobrevivência de vagens, o número de vagens intactas foi relacionado ao número de vagens da mancha através da função  $y=ax^b$ . O ajuste foi realizado usando uma regressão linear simples em dados transformados em logaritmos naturais:

$$\log(y+1) = b*\log(x+1) + \log a$$

Neste caso o coeficiente angular,  $b$ , representa a taxa em que o número de vagens intactas varia com o número total de vagens (Harms *et al.* 2000),  $a$  é uma constante  $x$  é o número de vagens e  $y$  é o número de vagens intactas. Caso  $b = 1$  então não há efeito dependente de densidade e as vagens são atacadas por *Utetheisa ornatrix* de forma proporcional a sua densidade. O coeficiente angular foi testado através de um teste t pareado entre número de vagens intactas observado e o esperado em caso  $b = 1$ . Os valores esperados foram calculados através da substituição do  $b$  observado por  $b = 1$  na regressão entre número e sobrevivência de vagens



**6. O efeito DD é modificado com a escala em que se define a unidade de recurso?**

Neste trabalho, mancha foi definida como uma rede formada por indivíduos reprodutivos, ou seja, indivíduos com pelo menos um racemo em flor. Um indivíduo está conectado à mancha caso ele esteja a uma distância  $< k$  de qualquer indivíduo da mancha. Neste caso  $k$  é um parâmetro que informa sobre a escala espacial no qual se está investigando os efeitos DD. Por exemplo, quando  $k = 0\text{m}$ , cada planta é considerada uma mancha independente de recurso e, quando  $k = 16\text{m}$  plantas espalhadas a até 16m distância entre si são consideradas como pertencentes a uma mesma mancha. Desta forma as manchas podem ser vistas como redes formadas por plantas conectadas pela proximidade no espaço ( $k$ ). Usando a definição de mancha descrita acima, as análises de DD no número de vagens intactas foram realizadas para diferentes valores de  $k$  (0m; 1m; 2m; 4m; 8m; 16m). Para testar se há alguma tendência de variação entre o  $b$  e  $k$  foi usada uma Correlação de Pearson por permutação (Manly 1997).

**7. A modificação nos efeitos DD está relacionada ao aumento na quantidade de recurso por mancha?**

Os valores maiores de  $k$  estão correlacionados (1) com um maior número de vagens verdes e maduras por mancha e (2) com um número maior de plantas por mancha. Para testar se os efeitos de escala observados poderiam estar correlacionados aos efeitos numéricos destes dois fatores, a relação entre esses

fatores e os valores de  $b$  (um estimador do efeito DD) foi testada através da correlação de Pearson por permutação (Manly 1997).

#### **8. A variação na relação entre número e sobrevivência de vagens está correlacionada com a escala espacial?**

A escala espacial pode afetar a variação em torno da relação entre o número de vagens e o número de vagens não-atacadas. Espera-se que, na escala mais informativa para a compreensão de como o número de vagens determina o número de vagens intactas, a variação ao entorno desta relação seja menor. Para testar se existe alguma tendência linear de mudança desta variação de acordo com a escala, a correlação do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) da regressão descrita acima foi correlacionado ao  $k$  através da Correlação de Pearson por permutação (Manly 1997)

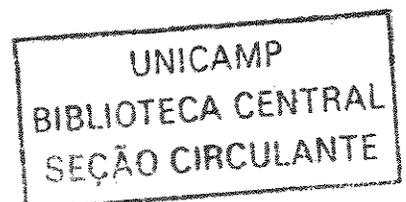
### **RESULTADOS**

O número de vagens atacadas por plantas variou de 0 – 100%. A proporção de vagens atacadas foi de 16,9 % ( $n = 572$  plantas, totalizando 9345 vagens). As regressões entre número e sobrevivência de vagens foram altamente significativas e efeitos DD fracos, porém significativos, foram detectados para a maioria das escalas investigadas, tanto para vagens verdes quanto para vagens maduras (Figura 3). As vagens verdes apresentaram uma inversão de efeito DD com o aumento de  $k$  (Figura 3). Para valores baixos de  $k$  a sobrevivência per capita foi maior nas manchas com mais vagens, entretanto para valores altos de  $k$

a sobrevivência foi menor em manchas com mais vagens (Figura 3). Vagens maduras, por outro lado, apresentaram uma sobrevivência *per capita* maior em manchas com mais vagens, independente da escala (Figura 3). Os efeitos DD observados em vagens verdes não apresentaram uma tendência linear de mudança em relação ao  $k$  (Correlação de Pearson por aleatorização,  $r = -0,099$ ,  $p=0,446$ , 10000 permutações), sendo um resultado similar obtido para vagens maduras (Correlação de Pearson por aleatorização,  $r = 0,873$ ,  $p = 0,095$ , 10000 permutações).

As mudanças de DD observadas em relação ao  $k$  não estiveram correlacionadas com variáveis que descrevem a quantidade de recurso (Correlação de Pearson por aleatorização,  $p > 0,05$  para as duas variáveis nas duas fenofases, 10000 permutações), sugerindo que os efeitos de escala observados não estão relacionados ao aumento da quantidade absoluta de recursos por mancha relacionada ao aumento da escala.

A variância ao entorno da reta ajustada para a relação entre número e sobrevivência de vagens tendeu a aumentar conforme a escala apenas para vagens maduras (correlação de Pearson por permutação, 10000 iterações,  $r = 0,822$ ,  $p = 0,033$ , Figura 4), sendo que a tendência oposta foi detectada para vagens verdes (correlação de Pearson por aleatorização, 10000 permutação,  $r = -0,873$ ,  $p = 0,006$ , Figura 5).



## DISCUSSÃO

Efeitos DD são, em geral, pressupostos e raramente testados em estudos de predação de sementes (Howe & Smallwood 1982). De fato, poucos trabalhos demonstraram que estes efeitos existem e que influenciam na sobrevivência das sementes (mas veja Harms *et al.* 2000, Capítulo 2), ou consideraram as escalas espaciais onde estes efeitos DD operam (Schupp 1992). Neste estudo, foram detectados fracos, porém significativos, efeitos DD para a sobrevivência das vagens em plantas de *Crotalaria pallida* aos ataques de seu principal predador (*Utetheisa ornatix*). Entretanto, estes efeitos foram dependentes da escala espacial.

As vagens verdes apresentaram uma inversão no efeito DD de acordo com a escala, pois enquanto plantas com maior fecundidade apresentaram maior sobrevivência para vagens verdes, sugerindo saciação do predador (Janzen 1971a), grandes manchas estruturadas por  $4 < k < 16$  m de distância apresentaram menor sobrevivência, sugerindo que o ataque de predadores é direcionado a pontos com maior número de vagens (Janzen 1970). Esta inversão observada com o aumento da escala pode indicar que (1) as mariposas selecionam manchas de recurso em uma escala espacial maior para ovipor e/ou que as manchas maiores apresentam um número proporcionalmente maior de mariposas e lagartas e (2) existem fatores atuando a micro-escala para limitar o dano causado pelos predadores.

A maior variação na relação entre número e sobrevivência de vagens verdes observada em escalas menores é uma evidência de que os principais

processos responsáveis pela organização das interações entre *Utetheisa ornatrix* e vagens verdes de *Crotalaria pallida* são aqueles que ocorrem em macro-escala. Evidências de que características populacionais sejam mais importantes do que a dos indivíduos já foram demonstrados para frugívoros vertebrados (Garcia *et al.* 2001). Aqui, foi demonstrado que isto também é válido para a exploração de recurso por um predador invertebrado especialista e que os efeitos DD variam de forma linear com o aumento da escala.

As vagens maduras, por outro lado, apresentaram sempre uma maior sobrevivência a densidades maiores. Este padrão pode estar relacionado a saciação da população de predadores e parece não responder ao aumento da escala. Desta forma, não importando a escala espacial em que os efeitos DD são estudados, vagens maduras sobrevivem proporcionalmente mais quando estão em locais mais densos (Janzen 1971a). Além disso, a relação entre número e sobrevivência de vagens maduras parecem estar sendo determinada em escalas menores, sugerindo que os mecanismos que atuam em micro-escala passam a ser mais importantes que os mecanismos que estão atuando em macro-escala conforme as vagens amadurecem. Estas diferenças em relação ao que ocorre com as vagens verdes sugere que em escalas espaciais maiores, manchas menores são apenas exploradas mais devagar que manchas maiores. Todavia, o resultado da interação com *Utetheisa ornatrix* é qualitativamente independente da escala espacial, se medido pelo tipo de dependência de densidade observada na sobrevivência de vagens maduras intactas e que podem ser efetivamente dispersas.

A escala espacial usada para definir o que é uma mancha influencia a estrutura de variáveis geralmente associadas a predação de sementes, como número de vagens e a densidade de vagens por planta. Este tipo de efeito é um dos principais responsáveis sobre efeitos de escala (Kemp *et al.* 2001). Entretanto, a variação observada nos estimadores de DD para a sobrevivência de vagens verdes e vagens maduras não está relacionada linearmente com estas características, indicando que a dependência da escala espacial para os efeitos DD não é apenas uma questão numérica. Desta forma, é importante tentar descrever quais possíveis mecanismos atuam nas diferentes escalas de forma a influenciar os padrões observados (Levin 1992, Schupp 1992).

Um possível mecanismo para a saciação de predador observado nas escalas menores é a predação de larvas por formigas. Durante o estudo foi possível observar lagartas desde o primeiro estágio nas vagens de *Crotalaria pallida*. Entretanto, a exploração de estruturas reprodutivas é arriscada, uma vez que formigas patrulham os racemos de *Crotalaria pallida* atraídas pelos nectários extraflorais que se encontram nas bases das flores e vagens (Capítulo 1). As formigas são importantes predadores de larvas de lepidópteros (Freitas & Oliveira 1996, Oliveira 1997) e, por este motivo, podem limitar o número de vagens atacadas por *Utetheisa ornatrix* em uma planta. Entretanto, esta proteção só influenciará a sobrevivência *per capita* das vagens se a defesa promovida pelas formigas também for dependente da densidade.

A mariposa diurna *Utetheisa ornatrix* coloca os ovos nas plantas e as lagartas, após saírem dos ovos, consomem folhas, flores e, principalmente sementes dentro de vagens verdes (Ferro 2001, Moore 1978a,b). Os lepidópteros

respondem à presença de ovos de co-específicos como uma forma de evitar competição intra-específica (Vasconcellos-Neto & Monteiro 1993), o que pode limitar o número máximo de larvas em uma planta. Nestes casos, a estratégia de oviposição do predador poderia estar gerando uma limitação do número de herbívoros no local, sendo este um possível processo para explicar o efeito dependente de densidade positivo observado em escalas menores. Este mesmo mecanismo operando em micro-escala pode ser parcialmente responsável pela exploração maior (ou mais rápida) de manchas maiores (padrão observado em macro-escala), pois caso (1) a resposta gerada pela presença de ovos de co-específicos seja a procura de plantas a grande distância do indivíduo com oviposição e (2) a probabilidade de uma fêmea adulta localizar uma mancha seja dependente da densidade de recurso, espera-se que manchas maiores sejam preferencialmente atacadas.

O estudo de quais processos intrínsecos (variação na densidade de lagartas, estratégias de ovoposição) e extrínsecos (mecanismos de defesa da planta) à população de predadores pré-dispersão que estão modulando a sobrevivência dependente de densidade de estruturas reprodutivas é essencial para uma melhor compreensão da evolução e organização das interações entre predadores e sementes. Entretanto, pouco se sabe sobre como os padrões de dependência de densidade variam com as escalas espacial, temporal e organizacional das interações animal-planta e entender como se dá essa passagem de informação dos processos operando em diferentes escalas é um dos problemas centrais da ecologia (Levin 1992). Este trabalho é uma pequena contribuição neste sentido, ao descrever a variação observada nos efeitos DD em

função da escala espacial e ao propor que mecanismos operando em micro-escala, como as estratégias de oviposição, podem explicar os padrões observados.



Figura 1. Variação nas plantas de *Crotalaria pallida* quanto ao número de vagens no Bairro Village, Campinas, SP. As plantas produzem vagens desde o início de seu desenvolvimento, gerando com isso uma enorme variação no número de vagens produzidos por plantas. A amplitude no número de vagens varia de poucas vagens (A) até centenas delas (B).

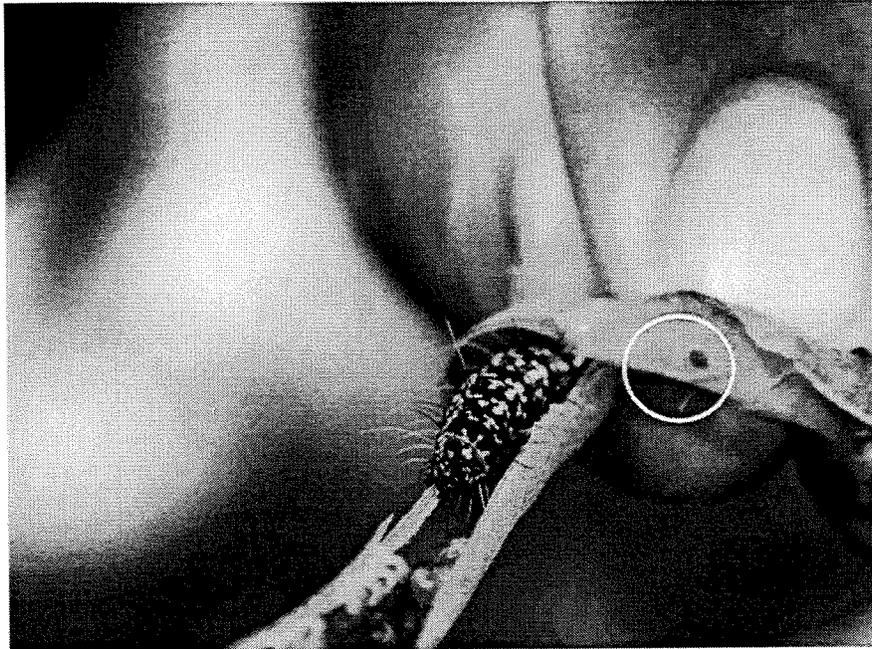


Figura 2. Larva de *Utetheisa ornatrix* L. dentro de uma vagem de *Crotalaria pallida* Ait.. Vagem aberta para permitir visualização. O círculo branco indica o orifício feito pela larva para entrar ou sair da vagem e que permite saber se uma vagem foi atacada ou não.

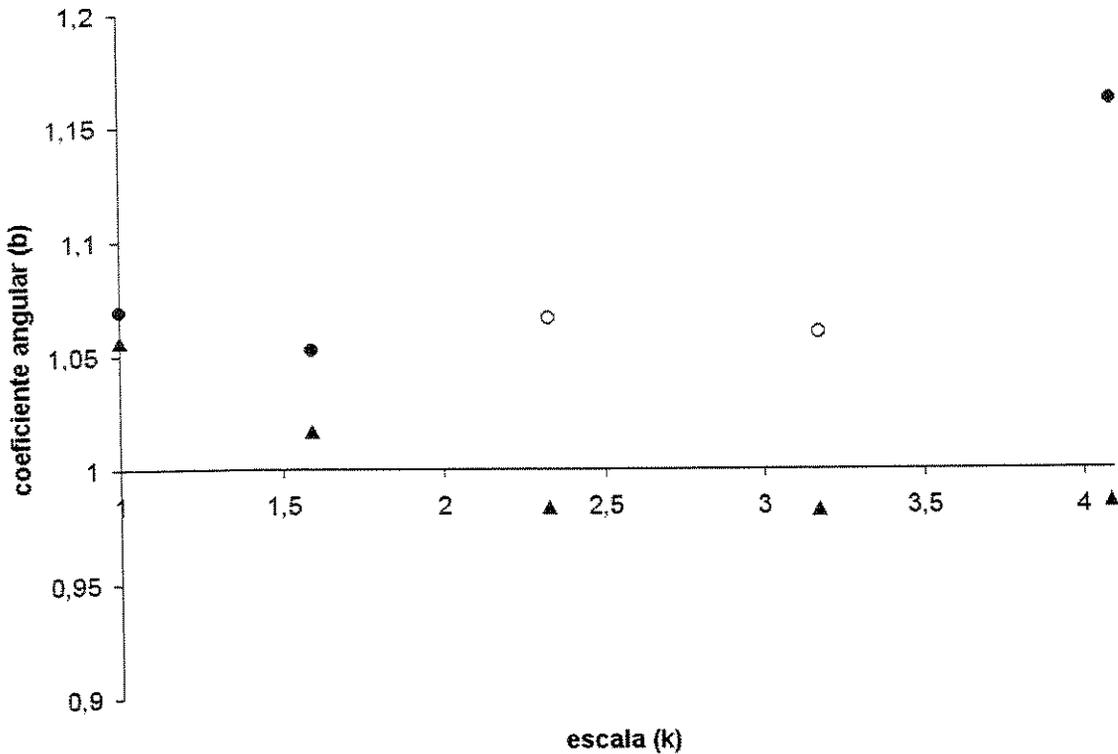


Figura 3. Relação entre  $b$  (estimador de efeitos dependentes de densidade) e  $k$  (escala espacial usada para definir manchas de plantas) para a sobrevivência de vagens verdes e maduras de *Crotalaria pallida* aos ataques da larva de mariposa *Utetheisa ornatrix*, no bairro Village, Campinas. São Paulo. Triângulos indicam vagens verdes e círculos indicam vagens maduras. Símbolos cheios indicam efeitos de dependência de densidade ( $b \neq 1$ , veja texto para maiores detalhes) e símbolos abertos indicam proporcionalidade.

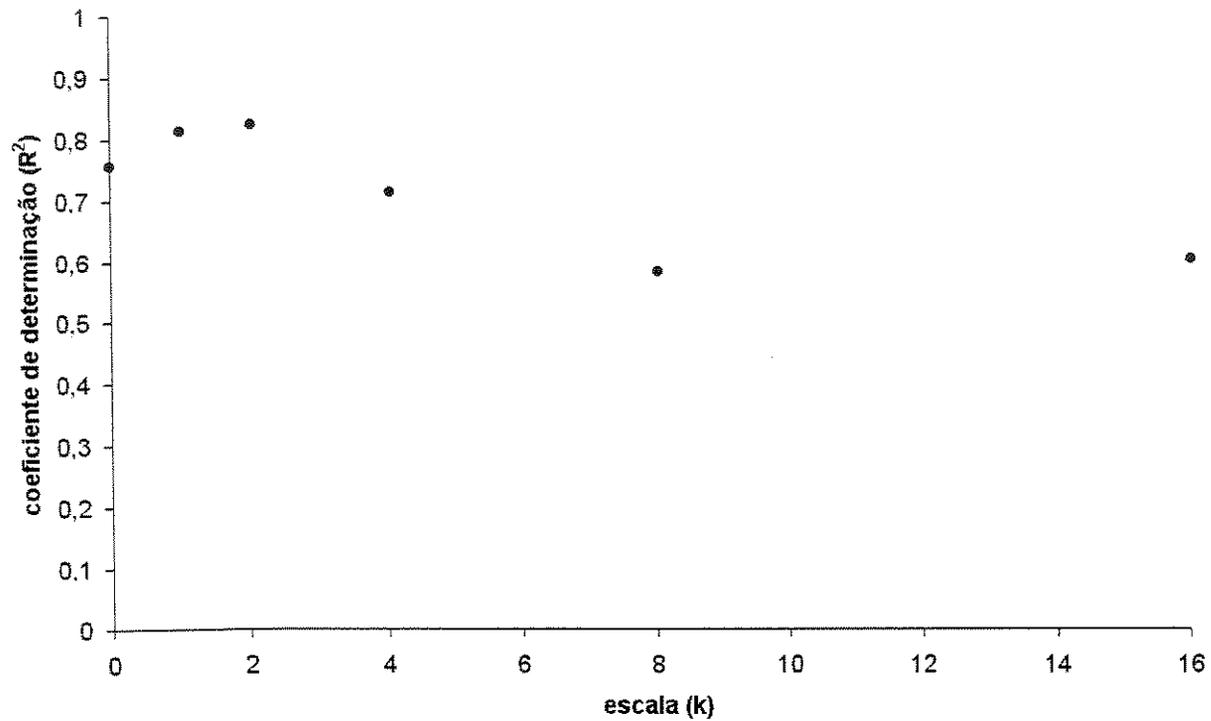


Figura 4. Relação entre a escala ( $k$ ) e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) das regressões lineares entre número e sobrevivência de vagens maduras em plantas de *Crotalaria pallida* no bairro Village, Campinas. São Paulo (veja texto para maiores detalhes).

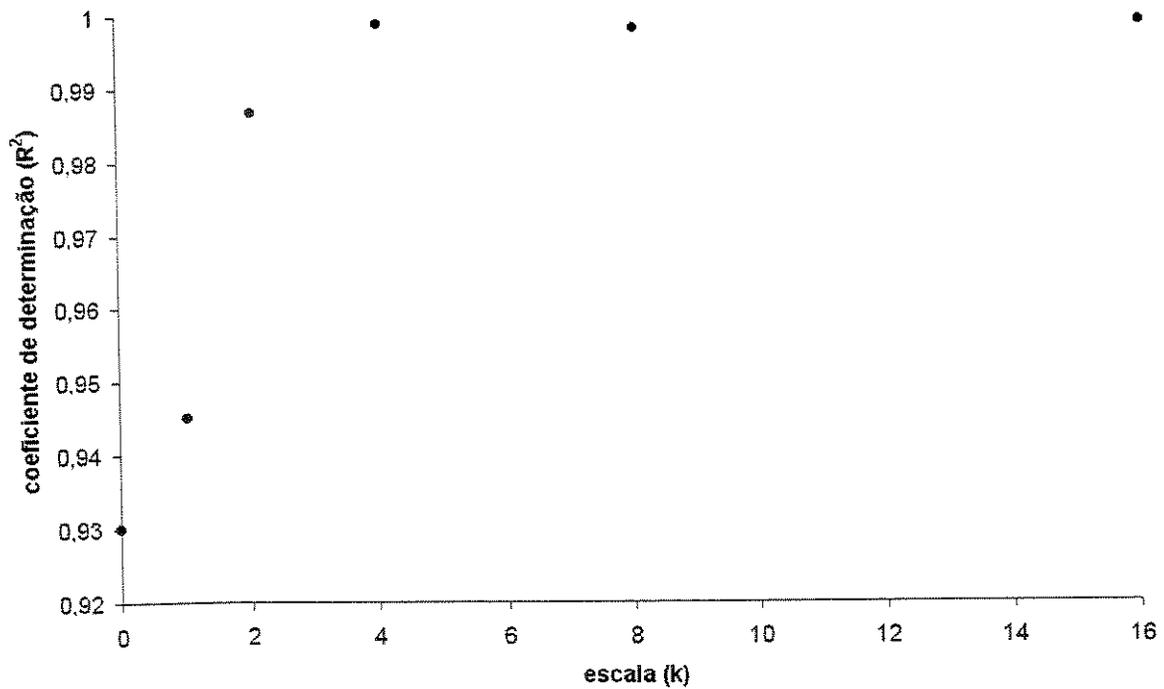


Figura 5. Relação entre a escala ( $k$ ) e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) das regressões lineares entre número e sobrevivência de vagens verdes em plantas de *Crotalaria pallida* no bairro Village, Campinas. São Paulo (veja texto para maiores detalhes).

## CONCLUSÕES FINAIS

### Capítulo 1.

1. Nectários extra-florais de *Crotalaria pallida* atraem uma diversa fauna de formigas, em especial do gênero *Camponotus*. Entretanto, as formigas não se distribuem de forma aleatória pela planta, sendo mais freqüentes nos racemos. Esta maior freqüência gera uma maior proteção, medida pela remoção de modelos de herbívoros, para as vagens do que para as folhas.
2. A eficiência desta proteção, no entanto, varia com o tipo de herbívoro, com a espécie de formiga e com a interação dos dois fatores. Todavia, a proporção de vagens atacadas pelo predador de sementes *U. ornatrix* foi similar entre as duas espécies de formigas estudadas, sugerindo que a variação demonstrada na eficiência da defesa não possui implicações perceptíveis para a sobrevivência das sementes da planta.
3. Apenas estudos experimentais que investiguem as implicações da proteção das vagens à sobrevivência de sementes viáveis de *C. pallida* permitirão entender as implicações dos nectários extra-florais para a aptidão da planta.

### Capítulo 2.

1. A predação de sementes de *Crotalaria pallida* após o evento de dispersão é basicamente realizada por formigas da subfamília Myrmicinae, sugerindo que

vertebrados não são predadores importantes para a sobrevivência de sementes desta espécie.

2. As formigas que coletam as sementes, no entanto, não são as mesmas que visitam as plantas, o que evita qualquer balanço para planta entre as interações positivas com formigas que visitam os nectários extra-florais e protegem as vagens e as interações negativas que ocorrem entre sementes e formigas após a dispersão.
3. A sobrevivência das sementes foi negativamente influenciada pela densidade de sementes no local e positivamente influenciada pela concentração do alcalóide pirrolizidínico Itegerrimina. A distância da planta-mãe não foi um fator relevante. Estes resultados sugerem que as formigas são predadores de sementes generalistas e que a dispersão de sementes e a proteção através de compostos secundários podem aumentar o sucesso reprodutivo da planta

### **Capítulo 3.**

1. Na escala de indivíduos, a sobrevivência frente a predação pré-dispersão por *Utetheisa ornatrix* está positivamente relacionada com a densidade, sugerindo que há limitação do número de predadores. Esta limitação pode estar relacionada à mecanismos intrínsecos (tamanho populacional, estratégias de ovoposição) ou extrínsecos a dinâmica populacional do predador (defesa da planta por formigas, fecundidade da planta),
2. Com o aumento da escala, no entanto, a sobrevivência de vagens verdes apresentaram uma inversão no efeito de dependente de densidade. Além disso, a variação ao entorno da relação entre número e sobrevivência de

vagens reduziu com a escala. Estes dois resultados sugerem que o ataque de *Utetheisa ornatrix* é direcionado preferencialmente para manchas maiores de plantas e não para manchas menores e indivíduos.

3. No entanto, vagens maduras apresentaram efeitos positivos na dependência de densidade para todas as escalas e um aumento na variação entre número e sobrevivência de vagens com o aumento da escala. Estes resultados sugerem que, com o passar do tempo, manchas menores são também atacadas e a escolha do predador passa a ser baseada em características dos indivíduos.

## LITERATURA CITADA

- Andersen A (1982) Seed removal by ants in the mallee of Northwestern Victoria. In: Buckley RC (ed) Ant-plant interactions in Australia. Dr. W. Junk Publ., The Hague, The Netherlands, pp 31-43
- Apple JL, Feener DHJ (2001) Ant visitation of extrafloral nectaries of *Passiflora*: the effects of nectary attributes and ant behavior on patterns in facultative ant-plant mutualisms. *Oecologia* 127:409-416
- Ashton DH (1979) Seed harvesting by ants in forests of *Eucalyptus regnans* F. Muell. in central Victoria Effect on natural regeneration. *Aust. J. Ecol.* 4:265-277
- Ballardie RT, Whelan RJ (1986) Masting, seed dispersal and seed predation in the cycad *Macrozamia communis*. *Oecologia (Berl.)* 70:100-105
- Begon, M., Harper, J.L. & Townsend, C.R. (1996) *Ecology: Individuals, Populations and Communities*. 3rd Ed. Blackwell Science.
- Bronstein JL (1994) Conditional outcomes in mutualistic interactions. *Trends Ecol. Evol.* 9:214-217
- Brown MJF, Human KG (1997) Effects of harvester ants on plant species distribution and abundance in a serpentine grassland. *Oecologia* 112:237-243
- Buckley RC, [ed.] (1982) Ant-plant interactions: a world review. In: Buckley RC (ed) Ant-plant interactions in Australia, vol 4. Dr. W. Junk Publishers, The Hague. pp 111-141
- Cintra R (1997) A test of the Janzen-Connell model with two common tree species in Amazonian forest. *J. Trop. Ecol.* 13:641-658
- Cipollini ML, Levey DJ (1997a) Antifungal activity of *Solanum* fruit glycoalkaloids: implications for frugivory and seed dispersal. *Ecology* 78:799-809
- Cipollini ML, Levey DJ (1997b) Secondary metabolites of fleshy vertebrate-dispersed fruits: adaptive hypotheses and implications for seed dispersal. *Amer. Nat.* 150:346-372
- Cipollini ML, Levey DJ (1997c) Why are some fruits toxic? Glycoalkaloids in *Solanum* and fruit choice by vertebrates. *Ecology* 78:782-798
- Cipollini ML, Levey DJ (1998) Secondary metabolites as traits of ripe fleshy fruits: a response to Eriksson and Ehrlén. *Amer. Nat.* 152:908-911
- Cogni R, Freitas AVL (2002) The ant assemblage visiting extrafloral nectaries of *Hibiscus pernambucensis* (Malvaceae) in a mangrove forest in Southeast Brazil (Hymenoptera : Formicidae). *Sociobiology* 40:373-383
- Cogni R, Raimundo, R L G, Freitas A V L (2000) Daily activity of ants associated with the extrafloral nectaries of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae) in a suburban area in Southeast Brazil. *Entomologist's Monthly Magazine*, 136: 141-147.
- Crist TO, MacMahon JA (1992) Harvester ant foraging and shrub-steppe seeds:

- interactions of seed resources and seed use. *Ecology* 73:1768-1779
- Crist TO, Wiens JA (1994) Scale effects of vegetation on forager movement and seed harvesting by ants. *Oikos* 69:37-46
- Curran LM, Leighton M (2000) Vertebrate responses to spatiotemporal variation in seed production of mast-fruited Dipterocarpaceae. *Ecol. Monogr.* 70:101-128
- Dejean A (2000) Ant protection (Hymenoptera: Formicidae) of two pioneer plant species against the variegated locust. *Sociobiology* 36:217-226
- Dejean A, Gibernau M, Durand JL, Abehassera D, Orivel J (2000) Pioneer plant protection against herbivory: impact of different ant species (Hymenoptera: Formicidae) on a proliferation of the variegated locust. *Sociobiology* 36:227-236
- Dejean A, Solano PJ, Orivel J, Belin-Depoux M, Cerdan P, Corbara B (2001) The spread-eagling of prey by the obligate plant-ant *Pheidole minutula* (Myrmicinae): similarities with dominant arboreal ants. *Sociobiology* 38:709-721
- Del Claro K, Berto V, Reu W (1996) Effect of herbivore deterrence by ants on the fruit set of an extrafloral nectary plant, *Qualea multiflora* (Vochysiaceae). *J. Trop. Ecol.* 12:887-892
- Del Claro K, Oliveira PS (1993) Ant-Homoptera interaction: do alternative sugar sources distract tending ants? *Oikos* 68:202-206
- Del Claro K, Oliveira S (1999) Ant-homoptera interactions in a neotropical savanna: the honeydew-producing treehopper, *Guayaquila xiphias* (Membracidae), and its associated ant fauna *Didymopanax vinosum* (Araliaceae). *Biotropica* 31:135-144
- Dussourd D E, Ubik K, Harvis C, Resch J, Meinwald J & Eisner T (1988) Biparental defensive endowment of eggs with acquired plant alkaloid in the moth *Utetheisa oratrix*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5992-5996.
- Eisner T, Eisner M, Rossini C C, Iyengar V K, Roach B L, Benedikt E & Meinwald J (2000) Chemical defense against predation in an insect egg. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 1634-1639.
- Elias TS (1983) Extrafloral nectaries: Their structure and distribution. In: Bentley BL, Elias TS (eds) *The biology of nectaries*. Columbia University Press, New York, pp 174-203
- Eriksson O, Ehrlén J (1998) Secondary metabolites in fleshy fruits: are adaptive explanations needed? *Amer. Nat.* 152:905-907
- Federle W, Fiala B, Maschwitz U (1998a) *Camponotus (Colobopsis)* (Mayr 1861) and *Macaranga* (Thouars 1806): A specific two-partner ant-plant system from Malaysia. *Trop. Zool.* 11:83-94
- Federle W, Maschwitz U, Fiala B (1998b) The two-partner ant-plant system of *Camponotus (Colobopsis)* sp.1 and *Macaranga puncticulata* (Euphorbiaceae): natural history of the exceptional ant partner. *Insect. Soc.* 45:1-16
- Ferro VG (2001) Padrão de utilização de *Crotalaria* spp. (Leguminosae, Papilionoideae, Crotalariae) por larvas de *Utetheisa oratrix* (Lepidoptera: Arctiidae). Tese de Mestrado. UNICAMP.
- Fonseca RLF, Guimarães PR, Jr., Morbiolo SR, Pereira RS, Peterson AT (em

- preparo). Predicting the potential of invasion of two *Crotalaria* species (Fabaceae) in Conservation Units in Brazil.
- Fox GA (2001) Failure-time Analysis: Studying Times to Events and Rates at Which Events Occur. In: Scheiner SM, Gurevitch J. Design and analysis of ecological experiments. Oxford University Press.
- Fragoso JMV (1997) Tapir-generated seed shadows: scale-dependent patchiness in the amazon rain forest. *J. Ecol.* 85:519-529
- Francisco MR, de Oliveira V, Galetti M (2003) Massive seed predation of *Pseudobombax grandiflorum* (Bombacaceae) by Parakeets *Brotogeris versicolurus* (Psittacidae) in a Forest Fragment in Brazil. *Biotropica* 34: 613-615
- Freitas AVL, Oliveira PS (1996) Ants as Selective Agents on Herbivore Biology: Effects on the Behaviour of a Non-Myrmecophilous Butterfly. *J. Anim. Ecol.* 65:205-210
- Freitas L, Galetto L, Bernardello G, Paoli AAS (2000) Ant exclusion and reproduction of *Croton sarcopetalus* (Euphorbiaceae). *Flora, Morphol., Geobot., Oekophysiol.* 195:398-402
- Garcia D, Zamora R, Gomez JM, Hodar JA (2001) Frugivory at *Junipepus communis* depends more on population characteristics than on individual attributes. *Journal of Ecology* 89:639-647
- Gordon DM (1993) The spatial scale of seed collection by harvester ants. *Oecologia* 95:479-487
- Gross CL, Whalen MA, Andrew MH (1991) Seed selection and removal by ants in a tropical savanna woodland in Northern Australia. *J. Trop. Ecol.* 7:99-112
- Guimarães PR, Cogni R (2002) Seed cleaning of *Cupania vernalis* (Sapindaceae) by ants: edge effect in a highland forest in south-east Brazil. *J. Trop. Ecol.* 18:303-307
- Guimarães PR, José J, Galetti M, Trigo JR (2003) Quinolizidine alkaloids in *Ormosia arborea* seeds inhibit predation but not caching by agoutis (*Dasyprocta leporina*). *J. Chem. Ecol.* 29:1065-1072
- Harms KE, Wright SJ, Calderón O, Hernández A, Herre EA (2000) Pervasive density-dependent recruitment enhances seedling diversity in a tropical forest. *Nature* 404:493-495
- Hartmann T, Witte L. (1995) Pyrrolizidine alkaloids: chemical, biological and chemoecological aspects. In: Alkaloids: Chemical & Biological Perspectives (S.W.Pelletier, ed.) vol. 9, 155-233, Pergamon Press, Oxford
- Heads PA, Lawton JH (1985) Bracken, ants and extrafloral nectaries. III. How insect herbivores avoid ant predation. *Ecol. Entomol.* 10:29-42
- Henderson CB (1990) The influence of seed apparency, nutrient content and chemical defenses on dietary preference in *Dipodomys ordii*. *Oecologia (Berl.)* 82:333-341
- Herrera CM (1986) Vertebrate-dispersed plants: why they don't behave the way they should. In: Estrada A, Fleming TH (eds) Frugivores and seed dispersal Book chapter. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 5-18
- Hölldobler B, Wilson EO (1990) The ants. Harvard University Press, Cambridge, Mass.

- Howe HF, Smallwood J (1982) Ecology of seed dispersal. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 13:201-228
- Hughes L, Westoby M (1992) Effect of diaspore characteristics on removal of seeds adapted for dispersal by ants. *Ecology* 73:1300-1312
- Hulme PE, Hunt MK (1999) Rodent post-dispersal seed predation in deciduous woodland: predator response to absolute and relative abundance of prey. *J. Anim. Ecol.* 68:417-428
- Janzen DH (1969) Seed-eaters versus seed size, number, toxicity and dispersal. *Evolution* 23:1-27
- Janzen DH (1970) Herbivores and the number of tree species in tropical forests. *Am. Nat.* 104:501-528
- Janzen DH (1971a) Escape of *Cassia grandis* L. beans from predators in time and space. *Ecology* 52:964-979
- Janzen DH (1971b) Seed predation by animals. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 2:465-492
- Janzen DH (1981) The defenses of legumes against herbivores. In: Polhill RM, Raven PH (eds) *Advances in legume systematics*, pp 951-977
- Janzen DH, Ryan CA, Liener IE, Pearce G (1986) Potentially defensive proteins in mature seeds of 59 species of tropical Leguminosae. *J. Chem. Ecol.* 12:1469-1480
- Johnson AE, Molyneux RJ & Merrill GB (1985) Chemistry of toxic range plants. Variation in pirrolozidine alkaloid content of *Senecio*, *Amsinckia* and *Crotalaria* species. *J. Agric. Food Chem.*, 33: 50-55.
- Keeler KH (1981) Function of *Mentzelia nuda* (Loasaceae) postfloral nectaries in seed defense. *Am. J. Bot.* 68:295-299
- Keeler KH (1985) Cost-benefit models of mutualism. In: Boucher DH (ed) *The Biology Of Mutualism*. Oxford Univ. Press, New York. 387 p, pp 100-126
- Kemp WM, Petersen JE, Gardner Rh (2001) Scale-dependence and the problem of extrapolation: implication for experimental and natural coastal ecosystems. In: Gardner RH, Kemp, WM, Kennedy VS, Petersen JE. *Scaling relations in experimental ecology*. Columbia University Press.
- Kelly D (1994) The evolutionary ecology of mast seeding. *Trend. Ecol. Evol.* 9:465-470
- Knoch TR, Faeth SH, Arnott DL (1993) Endophytic fungi alter foraging and dispersal by desert seed-harvesting ants. *Oecologia* 95:47-473
- Koptur S (1979) Facultative mutualism between weedy vetches *Vicia* spp. bearing extrafloral nectaries and weedy ants *Iridomyrmex humilis* in California. *Am. J. Bot.* 66:1016-1020
- Koptur S (1984) Experimental evidence for defense of *Inga* (Mimosoidae) saplings by ants. *Ecology* 65:1787-1793
- Law R, Koptur S (1986) On the evolution of non-specific mutualism. *Biol. J. Linn. Soc.* 27:251-267
- Leal IR, Oliveira PS (1998) Interactions between fungus-growing ants (Attini), fruits and seeds in cerrado vegetation in southeast Brazil. *Biotropica* 30:170-178
- Levey DJ, Byrne MM (1993) Complex ant-plant interactions: rain forest ants as secondary dispersers and post-dispersal seed predators. *Ecology* 74:1802-1812

- Levin SA (1992) The Problem of Pattern and Scale in Ecology. *Ecology* 73:1943-1967
- Louda SM (1982) Seed predation and seedling mortality in the recruitment of a shrub, *Haplopappus venetus* (asteraceae) along a climatic gradient. *Ecology* 64: 511 - 521
- Maelzer DA (1970) The regression of  $\log n_{t+1}$  on  $\log n_t$  as a test of density dependence: an exercise with computer-constructed density-independent populations. *Ecology* 51:810-822
- Manly BFJ (1997) Randomization and Montecarlo methods in biology. Chapman and Hall, London, England
- Marquis RJ (1992) Selective impact of herbivores. In: Fritz RS, Simms EL (eds) Plant resistance to herbivores and pathogens. Ecology, evolution, and genetics. University of Chicago Press, Chicago, IL, USA, pp 301-325
- Mattocks AR (1986) Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids. Academic Press, London.
- Moore LR (1978a) Seed predation in the legume *Crotalaria*. I. Intensity and variability of seed predation in native and introduced populations of *C. pallida* Ait. *Oecologia* (Berl.) 34:185-202
- Moore LR (1978b) Seed predation in the legume *Crotalaria*. II. Correlates of interplant variability in predation intensity. *Oecologia* (Berl.) 34:203-223
- Oliveira PS (1997) The ecological function of extrafloral nectaries: herbivore deterrence by visiting ants and reproductive output in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae). *Funct. Ecol.* 11:323-330
- Oliveira PS, Oliveira Filho AT, Cintra R (1987) Ant foraging on ant-inhabited *Triplaris* (Polygonaceae) in western Brazil: a field experiment using live termite-baits. *J. Trop. Ecol.* 3:193-200
- Oliveira PS, Rico-Gray V, Diaz-Castelazo C, Castillo-Guevara C (1999) Interaction between ants, extrafloral nectaries and insect herbivores in Neotropical coastal sand dunes: herbivore deterrence by visiting ants increases fruit set in *Opuntia stricta* (Cactaceae). *Functional Ecology* 13:623-631
- Orivel J, Dejean A (2002) Ant activity rhythms in a pioneer vegetal formation of French Guiana (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 39:65-76
- Pease RW, Jr. (1968) Evolution and hybridization in the *Utetheisa ornatrix* complex (Lepidoptera: Arctiidae). I. Inter and intra population variation and its relation to hybridization. *Evolution*, 22: 719-735.
- Polhill RM (1982). *Crotalaria* in Africa and Madagascar. A.A. Balkema, Rotterdam.
- Peres CA, Schiesari LC, Diasleme CL (1997) Vertebrate predation of brazil-nuts (*Bertholletia excelsa*, Lecythidaceae), an agouti-dispersed Amazonian seed crop: a test of the escape hypothesis. *J. Trop. Ecol.* 13:69-79
- Pickett CH, Clark WD (1979) The function of extrafloral nectaries in *Opuntia acanthocarpa* (Cactaceae). *Am. J. Bot.* 66:618-625
- Rico Gray V (1993) Use of plant-derived food resources by ants in the dry tropical lowlands of coastal Veracruz, Mexico. *Biotropica* 25 (3):301-315
- Rico Gray V, Palacios Rios M, Garcia Franco JG, MacKay WP (1998) Richness and seasonal variation of ant-plant associations mediated by plant-derived food resources in the semiarid Zapotitlan Valley, Mexico. *Am. Midl. Nat.* 140:21-26

- Roughgarden, J., 1996. Theory of Population Genetics and Evolutionary Ecology: an introduction. Prentice Hall, Upper Saddle River (New Jersey).
- Schemske DW (1982) Ecological correlations of a neotropical mutualism: ant assemblages at *Costus* extrafloral nectaries. *Ecology* 63:932-941
- Schupp EW (1992) The Janzen-Connel model for tropical tree diversity: population implications and the importance of spatial scale. *Am. Nat.* 140:526-530
- Sharma RK, Kasture AV, Kapoor KK, Atal CK (1965) Phytochemical investigation of the genus *Crotalaria*. Part V. Occurrence of tertiary bases and their N-oxides in indian *Crotalaria*. *Lloydia*, 28: 209-211.
- Silva KL, Trigo JR (2002) Structure-activity relationships of pyrrolizidine, alkaloids in insect chemical defense against the orb-weaving spider *Nephila clavipes*. *Journal of Chemical Ecology* 28:657-668
- Smiley JT (1985) *Heleconius* caterpillar mortality during establishment on plants with and without attending ants. *Ecology* 66:845-849
- Sobrinho TG, Schoereder JH, Rodrigues LL, Collevatti RG (2002) Ant visitation (Hymenoptera: Formicidae) to extrafloral nectaries increases seed set and seed viability in the tropical weed *Triumfetta semitriloba*. *Sociobiology* 39:353-368
- Solow AR, Steele JH (1990) On sample size, statistical power, and the detection of density dependence. *J. Anim. Ecol.* 59:1073-1076
- Trigo JR, Brown KS, Henriques SA, Barata LES (1996) Qualitative patterns of pyrrolizidine alkaloids in Ithomiinae butterflies. *Biochemical Systematics and Ecology* 24:181-188
- van Dam NM, Witte L, Theuring C, Hartmann, T.(1995) Distribution, biosynthesis and turnover of pyrrolizidine alkaloids in *Cynoglossum officinale*. *Phytochemistry* 39, 287-292
- van der Pijl L (1982) Principles of dispersal in higher plants. Third revised and expanded edition, 3rd edn, Berlin
- Vander Wall SB (1990) Food hoarding in animals. University of Chicago Press
- Vander Wall SB (2002) Mastig in animal-dispersed pines facilitates seed dispersal. *Ecology* 83:3508-3516
- Wagner D, Kay A (2002) Do extrafloral nectaries distract ants from visiting flowers? An experimental test of an overlooked hypothesis. *Evolutionary Ecology Research* 4:293-305
- Wetterer, J.K., A.L. Wetterer, and E. Hebard. 2001. Impact of the Argentine ant, *Linepithema humile* on the native ants of Santa Cruz Island, California. *Sociobiology* 38:709-721
- Whittaker RH, Feeny PP 1971. Allelochemicals: Chemical interactions between species. *Science* 171: 757-770
- Vasconcellos-Neto J, Monteiro RF (1993) Inspection and evaluation of host plant by the butterfly *Mechanitis lysimnia* (Nymph, Ithomiinae) before laying eggs – a mechanism to reduce intra-specific competition. *Oecologia* 95:431–438
- Webb CO, Peart, DR (1999) Seedling density dependence promotes coexistence of Bornean rain forest trees. *Ecology* 80:2006-2017
- Wenny DG (2001) Advantages of seed dispersal: a re-evaluation of directed dispersal. *Evol. Ecol. Res.* 3:51-74

- Wilby A, Shachak M (2000) Harvester ant response to spatial and temporal heterogeneity in seed availability: pattern in the process of granivory. *Oecologia* 125:495-503
- Wolff A, Debussche M (1999) Ants as seed dispersers in a mediterranean old-field succession. *Oikos* 84:443-452
- Zar JH (1984) *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, USA