



**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ecologia**

**Variações Fenotípicas nas Defesas Anti-Herbivoria de
Espécies de Cerrado: Efeitos de Diferentes Condições
Ambientais**

Marina Neves Delgado

**Brasília – DF
Dezembro de 2011**

Universidade de Brasília

**Departamento de Ecologia
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ecologia**

**Variações Fenotípicas nas Defesas Anti-Herbivoria de
Espécies de Cerrado: Efeitos de Diferentes Condições
Ambientais**

Marina Neves Delgado

Orientadora: Helena Castanheira de Moraes

**Tese apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Ecologia como
requisito parcial para a obtenção do
título de Doutora em Ecologia.**

**Brasília - DF
Dezembro de 2011**

MARINA NEVES DELGADO

**Variações Fenotípicas nas Defesas Anti-Herbivoria de Espécies de
Cerrado: Efeitos de Diferentes Condições Ambientais**

Tese aprovada junto ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ecologia

Banca Examinadora:



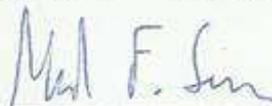
Prof. Dr.^a. Helena Castanheira de Morais
Orientadora – UnB



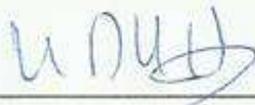
Prof. Dr.^a. Elenice Mouro Varanda
Membro Titular – USP Ribeirão Preto



Prof. Dr. Edison R. Sujii
Membro Titular – Embrapa Cenargen



Prof. Dr. Marcelo Simon
Membro Titular – Embrapa Cenargen



Prof. Dr. John Hay
Membro Titular – UnB

Prof. José Carlos Sousa Silva
Suplente – Embrapa Cerrados

Brasília, 08 de dezembro de 2011

Aos meus pais pelo carinho e ajuda, hoje e sempre.

AGRADECIMENTOS

À CAPES e ao CNPq pela concessão de bolsa de pesquisa, indispensável para a realização dos trabalhos.

À CAPES pela bolsa balcão, indispensável para o meu estágio sanduíche na University of Missouri – St. Louis (EUA).

À Professora Helena Castanheira de Moraes, minha orientadora, pela competência e orientação. Obrigada por me possibilitar estudar as defesas das plantas contra a herbivoria.

À Professora Sônia Bão pela co-orientação e presteza na disponibilização do laboratório de microscopia para análises.

Ao Professor Robert J. Marquis pela co-orientação nas análises de taninos e valiosas correções de manuscritos. Obrigada pela hospitalidade durante a minha estada em St. Louis (EUA).

À professora Lourdes Isabel V. do Amaral pela disponibilidade e gentileza nas análises do néctar.

À Professora Mercedes Bustamante e à Professora Heloísa Miranda que me possibilitaram coletar nas áreas do Projeto de Fertilização e do Projeto Fogo.

Ao Marcus, pela sua valiosa ajuda no campo e no laboratório durante seu estágio.

Ao Kirk Barnett, pela ajuda e coleguismo imprescindíveis durante meu estágio sanduíche.

Aos colegas de laboratório de Ecologia e em especial à Karen, pela ajuda na formatação das referências e no campo, à Sheila Rodvalho, pela ajuda no campo e ao Juliano, pelo incentivo profissional.

Aos amigos da UnB, principalmente à Nádia, Davi, Karen e Sheila, pela prazerosa convivência.

Aos colegas do laboratório de Microscopia Eletrônica, principalmente à Ingrid, João, Lauro e Misléia, pela ajuda na documentação fotográfica, inclusão dos materiais e ajudas corriqueiras.

Ao Professor Jader e ao colega Pedro Podestá que me possibilitaram usar o ultrafreezer do laboratório de Mamíferos.

A todos os funcionários da Reserva Ecológica do IBGE e da FAL.

Ao técnico Mardônio.

À minha família (pai, mãe, Gabi, Fred, Chico e Jonathas), tão amada e essencial na minha vida.

Agradeço em especial ao meu benzinho, Jonathas, que sempre me acolheu com palavras doces e compreensão nos momentos de mais estresse e saudades. Obrigada por estar aqui!

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| RESUMO GERAL..... | 1 |
| ABSTRACT..... | 3 |
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 5 |
| | |
| Capítulo I – Plasticidade fenotípica, distribuição, morfoanatomia e ultraestrutura de nectários extraflorais em plantas de <i>Maprounea brasiliensis</i> St. Hill. (Euphorbiaceae) submetidas a diferentes condições ambientais..... | 9 |
| Resumo | 10 |
| 1. Introdução | 12 |
| 2. Material e Métodos | 14 |
| <i>Espécies e local de estudo</i> | 14 |
| <i>Caracterização anatômica, micromorfológica e ultraestrutural dos NEFs e caracterização química do néctar extrafloral</i> | 14 |
| <i>Efeito do histórico do fogo</i> | 16 |
| <i>Herbivoria artificial</i> | 16 |
| 3. Resultados | 17 |
| <i>Caracterização anatômica, micromorfológica e ultraestrutural dos NEFs e caracterização química do néctar extrafloral</i> | 18 |
| <i>Efeito do histórico do fogo</i> | 25 |
| <i>Herbivoria artificial</i> | 25 |
| 4. Discussão | 27 |
| | |
| Capítulo II - Atributos de defesa e de qualidade foliar de plantas de <i>Maprounea brasiliensis</i> St. Hill. (Euphorbiaceae) submetidas aos resíduos de fertilização em uma área de cerrado | 33 |
| Resumo | 34 |
| 1. Introdução | 35 |
| 2. Materiais e Métodos | 38 |
| <i>Área de estudo, espécie estudada e coleta de dados no campo</i> | 38 |
| <i>Análises dos atributos de qualidade e defesa da folha</i> | 40 |
| <i>Análises estatísticas</i> | 41 |
| 3. Resultados | 42 |

| | |
|--|-----------|
| 4. Discussão | 48 |
| Capítulo III – Plasticidade fenotípica de defesas anti-herbivoria de plantas de <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville (Fabaceae, Mimosoideae) submetidas a diferentes condições ambientais | |
| Resumo | 53 |
| 1. Introdução | 54 |
| 2. Material e Métodos | 55 |
| <i>Espécie e local de estudo</i> | <i>57</i> |
| <i>Caracterização dos NEFs e do néctar extrafloral</i> | <i>57</i> |
| <i>Efeitos de queimadas na produção de NEFs e atributos foliares.....</i> | <i>59</i> |
| <i>Efeito da sazonalidade e da pressão de herbivoria na produção de NEFs e atributos foliares.....</i> | <i>59</i> |
| <i>Efeito da pressão de herbivoria na produção de néctar extrafloral.....</i> | <i>60</i> |
| 3. Resultados | 61 |
| <i>Caracterização dos NEFs e do néctar extrafloral</i> | <i>61</i> |
| <i>Efeitos de queimadas na produção de NEFs e atributos foliares.....</i> | <i>64</i> |
| <i>Efeito da sazonalidade e da pressão de herbivoria na produção de NEFs e atributos foliares.....</i> | <i>65</i> |
| <i>Efeito da pressão de herbivoria na produção de néctar extrafloral.....</i> | <i>67</i> |
| 4. Discussão | 68 |
| Capítulo IV - Atributos de defesa e de qualidade foliar de plântulas e plantas adultas de <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville (Fabaceae) submetidas aos resíduos de fertilização prévia em uma área de cerrado | |
| Resumo | 74 |
| 1. Introdução | 75 |
| 2. Material e Métodos | 76 |
| <i>Espécie da planta.....</i> | <i>79</i> |
| <i>Área de Estudo</i> | <i>79</i> |
| <i>Análises dos atributos de qualidade e defesa da folha</i> | <i>80</i> |
| <i>Análises estatísticas.....</i> | <i>82</i> |
| 3. Resultados | 83 |
| 4. Discussão | 93 |
| Anexos | 98 |

| | |
|---|------------|
| CONCLUSÃO GERAL | 100 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 102 |

LISTA DE TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Capítulo I

Figura 1: Concentrações (em porcentagem) de açúcares do néctar extrafloral de *Maprounea brasiliensis*. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo $p < 0.05$. Barras representam o desvio padrão..... 19

Figura 2. NEF de *Maprounea brasiliensis* St Hill. **A.** NEFs sem secreção de néctar na base da folha. **B.** NEF com uma gota de néctar (cabeça de seta). **C.** Imagem de microscópio eletrônico de varredura (SEM) de um NEF. Observe a cutícula ondulada devido à formação de espaço subcuticular e a ausência de estômatos e tricomas no polo secretor. **D.** NEF com uma camada de células secretoras. **E.** Detalhe da primeira divisão anticlinal (seta) das células do NEF para formar a segunda camada do nectário. Observe o floema ramificado em direção às células do NEF. **F.** Folha completamente expandida com dois NEFs maduros. **G.** O tecido subglandular, com células que formam uma barreira abaixo do NEF, já não permite a vascularização do NEF. **H.** Paredes das células do tecido subglandular estão impregnadas com lignina conforme mostrado pela coloração vermelha com floroglucinol. PC - células de parênquima, PH - floema, SC - células secretoras, ST - tecido subglandular, V - vascularização. Barras = 10 μm (C, G), 100 μm (D), 40 μm (E), 20 μm (F), 5 μm (H).....21

Figura 3. Imagens em microscópio eletrônico de transmissão (MET) do NEF em folhas recentemente expandidas de *Maprounea brasiliensis* St Hill. **A.** Células alongadas que formam o NEF com um citoplasma denso, muitos vacúolos e cromatina descondensada no núcleo. **B.** Observar plasmodesmos e vesículas que são responsáveis pela comunicação entre as células secretoras. **C.** Detalhes de duas células secretoras com mitocôndrias, vesículas e vacúolos. **D.** Complexo de Golgi, vacúolo e mitocôndrias em uma célula secretora. **E.** A formação de vesículas no ápice de células secretoras. GA – Complexo de Golgi, M - mitocôndrias, N - núcleo, n - nucléolo, Pl - plasmodesmos, V - vacúolo, v - vesículas, W - parede celular. Barras = 5 μm (A), 0.2 μm (B), 0,5 μm (C-E).....23

Figura 4. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de células do tecido subglandular e floema em folhas recentemente expandidas de *Maprounea brasiliensis* St Hill. **A.** Região entre as células secretoras e as células com paredes espessas que formam o tecido subglandular, constituindo uma barreira à vascularização para o NEF. **B.** Detalhe da região de interface entre as células secretoras e as células do tecido subglandular. **C.** Detalhe do plasmodesmo e do retículo endoplasmático que são os responsáveis pela comunicação simplástica entre as células do tecido subglandular. **D.** Células com vacúolos, núcleos e nucléolos. **E.** Mitocôndrias, plasmodesmos e retículo endoplasmático. **F.** Detalhe de uma pontuação que é a responsável por manter a comunicação entre as células. **G.** Vista geral das células que constituem o tecido subglandular. **H.** Elementos do tubo crivado que estão distribuídos entre as células do tecido subglandular. CT - célula com parede espessa, ER - retículo endoplasmático, M - mitocôndrias, N - núcleo, n - nucléolo, Pl - plasmodesmos, P - pontuação, R - ribossomas, SC - células secretoras, ST - tecido subglandular, TCE - elemento do tubo

crivado, V - vacúolo, v - vesículas. Barras = 5 µm (A), 2,5 µm (B), 0,2µm (C), 2 µm (D), 1µm (E-F), 2 µm (G-H)..... 24

Figuras 5-6: Atributos dos NEFs de *Maprounea brasiliensis* produzidos em diferentes épocas do ano: Ramo S (período seco) e Ramo H (período chuvoso). **5.** Média do número de NEFs por folha. **6.** Média do diâmetro maior dos NEFs por folha. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo $p < 0.05$. Barras representam o desvio padrão..... 26

Figuras 7-8: Atributos foliares de *Maprounea brasiliensis* produzidos em diferentes épocas do ano: Ramo S (período seco) e Ramo H (período chuvoso). **7.** Média do diâmetro total de NEFs por folha. **8.** Média da área foliar. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo $p < 0.05$. Barras representam o desvio padrão..... 26

Capítulo II

Figura 1. Diagrama das hipóteses testadas em plantas de *Maprounea brasiliensis* presentes em uma área de experimento com adição de nutrientes durante nove anos seguidos a um intervalo de dois anos sem fertilização..... 38

Tabela 1. Atributos de qualidade foliar de espécies do cerrado com a síndrome de defesa de "baixa qualidade nutricional" - ($\bar{x} \pm DP$)..... 43

Tabela 2. Índice de correlação de Spearman entre atributos de defesa direta e indireta em *Maprounea brasiliensis* ($n = 60$, $\alpha = 0.05$) em área de cerrado do Distrito Federal. Números em negrito são diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$)..... 43

Figuras 2-4: Atributos de qualidade de folhas de *Maprounea brasiliensis* em quatro tratamentos com resíduos de adição de nutrientes. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo $p < 0.05$. Barras representam o desvio padrão. **2.** Área foliar. **3.** K em porcentagem (mg/g) por matéria seca de folhas. **4.** Ca em porcentagem (mg/g) por matéria seca de folhas..... 45

Figuras 5-7: Atributos de qualidade de folhas de *Maprounea brasiliensis* em quatro tratamentos com resíduos de adição de nutrientes. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo $p < 0.05$. Barras representam o desvio padrão. **5.** Mg em porcentagem (mg/g) por matéria seca de folhas. **6.** S em porcentagem (mg/g) por matéria seca de folhas. **7.** Razão N:P..... 45

Figuras 8-10: Atributos de qualidade de folhas de *Maprounea brasiliensis* em quatro tratamentos com resíduos de adição de nutrientes. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo $p < 0.05$. Barras representam o desvio padrão. **8.** Mn em ppm (mg/Kg) por matéria seca de folhas. **9.** Cu em ppm (mg/Kg) por matéria seca de folhas. **10.** B em ppm (mg/Kg) por matéria seca de folhas..... 46

Figura 11: Atributo de defesa das folhas de *Maprounea brasiliensis* em quatro tratamentos com resíduos de adição de nutrientes: concentração de taninos condensados. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo $p < 0.05$. Barras representam o desvio padrão..... 47

Tabela 3. Concentrações de açúcares ($x \pm DP$) do néctar extrafloral de *M. brasiliensis* em quatro tratamentos de adição de nutrientes e em parcela controle, em área de cerrado do Distrito Federal..... 48

Tabela 4. Porcentagem de açúcares ($x \pm DP$) do néctar extrafloral de *M. brasiliensis* em quatro tratamentos de adição de nutrientes e em parcela controle, em área de cerrado do Distrito Federal..... 48

Capítulo III

Figura 1: Nectários extraflorais de *Stryphnodendron adstringens*. **A.** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do NEF da base da raquis. **B.** NEF do ápice da raquis. **C.** MEV do NEF do ápice da raquis **D.** Esquema do corte histológico do NEF do ápice da raquis, área pontilhada representa o floema e a área tracejada representa o xilema. **E.** Corte histológico do NEF do ápice da raquis. Observar vascularização por floema (F) e xilema (X), indícios de compostos fenólicos nas células do parênquima secretor devido à coloração esverdeada do azul de toluidina (PS) e epiderme com células altas no sentido longitudinal (Ep). Escalas: A = 1000 μm , B = 100 μm e C-D = 200 μm 63

Figura 2: Número médio de NEFs em cada região dos raquíolos de *Stryphnodendron adstringens*. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo $p < 0.05$. Barras equivalem ao desvio padrão..... 64

Tabela 1. Concentrações de açúcares ($x \pm DP$) em NEFs da base da folha e NEFs do ápice da folha (ápice da raquis e do raquíolo) de *Stryphnodendron adstringens*..... 64

Figura 3: Número médio de NEFs nas folhas de indivíduos de *Stryphnodendron adstringens* submetidos a uma área sem histórico de fogo (controle 2009 e controle 2011), a uma área queimada bianualmente de 1991 a 2008 (histórico de fogo 2009) e a uma área queimada bianualmente de 1991 a 2008 e sem fogo de 2009 a 2011 (histórico de fogo 2011). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo $p < 0.05$. Barras representam o desvio padrão..... 65

Figura 4: Largura média da folhas de indivíduos de *Stryphnodendron adstringens* produzidas na estação chuvosa e na estação seca. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo $p < 0.05$. Barras representam o desvio padrão..... 66

Figura 5: Largura média foliar dos indivíduos de *Stryphnodendron adstringens* antes de serem submetidos à desfolha total e após a desfolha total. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo $p < 0.05$. Barras representam o desvio padrão..... 67

Figuras 6-8: Concentrações médias (μM) de açúcares do néctar extrafloral de *Stryphnodendron adstringens* em quatro tratamentos de herbivoria artificial. **6.**

Concentração de glicose. **7.** Concentração de frutose. **8.** Concentração de açúcar total. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo $p < 0.05$. Barras representam o desvio padrão..... 68

Capítulo IV

Tabela 1. Atributos de defesa ($x \pm DP$) em plantas adultas e plântulas de *Stryphnodendron adstringens* em área de cerrado do Distrito Federal (grupo controle; sem adição de nutrientes)..... 84

Tabela 2. Concentrações de açúcares ($x \pm DP$) em NEFs de plantas adultas e de plântulas de *Stryphnodendron adstringens* na área controle (sem adição de nutrientes)..... 84

Tabela 3. Porcentagem de açúcares ($x \pm DP$) em relação ao açúcar total de NEFs de plantas adultas e de plântulas de *Stryphnodendron adstringens* na área controle (sem adição de nutrientes)..... 84

Tabela 4. Atributos de qualidade foliar ($x \pm DP$) em plantas adultas e plântulas de *Stryphnodendron adstringens* em área de cerrado do Distrito Federal (grupo controle; sem adição de nutrientes)..... 85

Tabela 5. Atributos de defesa ($x \pm DP$) em plantas adultas e plântulas de *Stryphnodendron adstringens* em área de cerrado do Distrito Federal (todos os tratamentos, efeito aditivo da idade e dos resíduos da adição de nutrientes)..... 85

Tabela 6. Concentrações de açúcares ($x \pm DP$) em NEFs de plantas adultas e de plântulas de *Stryphnodendron adstringens* em área de cerrado do Distrito Federal (todos os tratamentos, efeito aditivo da idade e dos resíduos da adição de nutrientes)..... 86

Tabela 7. Porcentagem de açúcares ($x \pm DP$) em relação ao açúcar total de NEFs de plantas adultas e de plântulas de *Stryphnodendron adstringens* em área de cerrado do Distrito Federal (todos os tratamentos, efeito aditivo da idade e dos resíduos da adição de nutrientes)..... 86

Tabela 8. Atributos de qualidade foliar ($x \pm DP$) em plantas adultas e plântulas de *Stryphnodendron adstringens* em área de cerrado do Distrito Federal (todos os tratamentos, efeito aditivo da idade e dos resíduos da adição de nutrientes)..... 87

Figura 1. Ordenação das variáveis-resposta nas plantas adultas de *S. adstringens* pela Análise de Componentes Principais (PCA). Foram identificados dois grupos negativamente correlacionados em relação ao fator 1: (I) Concentração de S, Zn, Cu, Fe, B, N, C e K nas folhas (círculo pontilhado em verde) e (II) número de NEF, fenólicos totais (FT), taninos hidrolisáveis (TH), taninos condensados (TC) e peso seco (círculo contínuo em vermelho). Foram identificados dois grupos negativamente correlacionados em relação aos fatores 1 e 2: Grupo II (círculo contínuo em vermelho) e grupo III formado por conteúdo de água e concentração de Ca (círculo pontilhado em azul)..... 88

Figura 2. Ordenação das variáveis-resposta nas plântulas de *S. adstringens* pela Análise de Componentes Principais (PCA). Foram identificados dois grupos negativamente correlacionados ao fator 1: (I) concentração de Zn, Cu, Fe, B, N, C e K nas folhas (círculo pontilhado em verde), (II) número de NEF, largura e comprimento da folha (círculo contínuo em vermelho)..... 89

Figuras 3-5: Atributos de qualidade de plantas adultas de *Stryphnodendron adstringens* em quatro tratamentos com resíduos de adição de nutrientes. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas. Barras representam o desvio padrão, sendo $p < 0.05$. **3.** Largura da folha. **4.** Razão N:P. **5.** Peso seco (mg)..... 90

Figuras 6-8: Atributos de qualidade de folhas de plantas adultas de *Stryphnodendron adstringens* em quatro tratamentos com resíduos de adição de nutrientes. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas. Barras representam o desvio padrão, sendo $p < 0.05$. **6.** Ca em porcentagem (mg/g) por matéria seca de folhas. **7.** Mn em ppm (mg/Kg) por matéria seca de folhas. **8.** S em porcentagem (mg/g) por matéria seca de folhas..... 90

Figuras 9-10: Atributos de qualidade de folhas de plantas adultas de *Stryphnodendron adstringens* em quatro tratamentos com resíduos de adição de nutrientes. Barras representam o desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo $p < 0.05$. **9.** B em ppm (mg/Kg) por matéria seca de folha. **10.** Mg em porcentagem (mg/g) por matéria seca de folhas..... 91

Figuras 11-13: Atributos de qualidade de plântulas de *Stryphnodendron adstringens* em quatro tratamentos com resíduos de adição de nutrientes. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo $p < 0.05$. Barras representam o desvio padrão. **11.** Fe em ppm (mg/Kg) por matéria seca de folhas. **12.** Cu em ppm (mg/Kg) por matéria seca de folhas. **13.** Mn em ppm (mg/Kg) por matéria seca de folhas..... 92

Figuras 14-16: Atributos de qualidade de folhas de plântulas de *Stryphnodendron adstringens* em quatro tratamentos com resíduos de adição de nutrientes. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo $p < 0.05$. Barras representam o desvio padrão. **14.** Ca em porcentagem (mg/g) por matéria seca de folhas. **15.** Comprimento da folha. **16.** Peso seco (mg)..... 92

Figuras 17-18: Atributos de qualidade de folhas de plântulas de *Stryphnodendron adstringens* em quatro tratamentos com resíduos de adição de nutrientes. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo $p < 0.05$. Barras representam o desvio padrão. **17.** Mg em porcentagem (mg/g) por matéria seca de folhas. **18.** Razão N:P..... 93

ANEXO I. Índice de correlação de Spearman entre atributos de qualidade foliar e características de defesa em plantas adultas de *Stryphnodendron adstringens* ($n = 18$, $\alpha = 0.05$), em área de cerrado do Distrito Federal (todos os tratamentos, efeito aditivo da idade e dos resíduos da adição de nutrientes)..... 98

ANEXO II. Índice de correlação de Spearman entre atributos de qualidade foliar e características de defesa em plântulas de *Stryphnodendron adstringens* (n = 80, $\alpha = 0.05$) em área de cerrado do Distrito Federal (todos os tratamentos, efeito aditivo da idade e dos resíduos da adição de nutrientes)..... 99

RESUMO GERAL

Nesse trabalho foi constatada a existência de variações nos atributos de defesas anti-herbivoria direta e indireta, e de tolerância em duas espécies nativas do cerrado brasileiro: *Maprounea brasiliensis* St. Hil. (Euphorbiaceae) e *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae - Mimosoideae). As defesas examinadas foram concentração de compostos fenólicos totais, taninos hidrolisáveis e taninos condensados, número e tamanho dos nectários extraflorais, volume do néctar extrafloral, quantidade relativa de açúcares do néctar e tamanhos de folhas. Apesar de indivíduos das duas espécies terem sido submetidos às mesmas condições ambientais e estarem distribuídos na mesma área de coleta, sob o mesmo tipo de solo e clima, eles apresentaram na maioria das vezes respostas distintas ao mesmo estímulo. Por exemplo, plantas de *M. brasiliensis* não produziram nectários adicionais quando submetidas a queimadas periódicas a cada dois anos durante 18 anos. Entretanto, plantas de *S. adstringens* responderam ao fogo freqüente, produzindo NEFs adicionais. Também houve resposta diferenciada entre as duas espécies quando o estímulo foi estações do ano, representadas pelo período seco do inverno e pelo período chuvoso do verão. Folhas de *M. brasiliensis* produzidas no período seco investiram mais em defesa do que em crescimento, apresentando mais NEFs e menor área foliar. Em *S. adstringens* não houve diferença nos atributos de defesa induzida após herbivoria artificial (número de NEFs) e entre as folhas produzidas no período seco e as produzidas no período chuvoso; entretanto, *S. adstringens* também investiu mais em crescimento no verão, uma vez que suas folhas foram mais largas nessa época. As plantas das duas espécies apresentaram respostas diferentes quando submetidas aos resíduos de fertilização de um experimento conduzido durante nove anos. *M. brasiliensis* foi mais responsiva aos resíduos de fertilização do que *S. adstringens*. As concentrações de nutrientes foliares e de taninos condensados foram alteradas em *M. brasiliensis* devido às modificações das características do solo determinadas por uma fertilização de médio prazo. Por outro lado, em *S. adstringens*, a concentração de metabólicos secundários não foi modificada, mas a concentração de nutrientes foliares também sofreu mudanças devido aos resíduos da fertilização. O experimento com diferentes níveis de herbivoria nos ramos marcados em plantas de *M. brasiliensis* demonstrou que as folhas novas produzidas após o estímulo formaram a mesma quantidade e tamanho de NEFs do que as folhas produzidas antes do estímulo. O mesmo tipo de experimento com diferentes níveis de

herbivoria nos ramos marcados em plantas de *S. adstringens* resultou em aumento no volume do néctar secretado. Portanto, em *M. brasiliensis*, as defesas anti-herbivoria, como número e tamanho dos NEFs e área foliar, variaram ao longo do ano e a concentração de taninos condensados se modificou devido aos resíduos da adição de fertilizantes. Já em *S. adstringens*, a presença de fogo freqüente aumentou o número de NEFs e as diferentes taxas de herbivoria artificial em ramos marcados aumentaram a quantidade de néctar produzido, além de que a área foliar variou ao longo do ano. No presente estudo foi constatada a não existência de *trade-off* entre defesas diretas e indiretas em *M. brasiliensis* e a variação da produção de néctar e da ultraestrutura e anatomia dos NEFs em diferentes fases ontogênicas da folha. Nosso estudo também mostrou que a fase ontogênica da planta em *S. adstringens* influencia a qualidade da folha para os herbívoros. Por isso, nesse trabalho nós comprovamos a plasticidade fenotípica de defesas anti-herbivoria de duas espécies de cerrado, *Maprounea brasiliensis* e *Stryphnodendron adstringens*, submetidas a experimentos controlados no campo que simulavam diferentes condições ambientais. Mostramos também que a expressão dos atributos de defesa é dependente da idade da folha e da idade do indivíduo. Tal estudo evidencia a importância de se estudar as consequências das variações nos atributos de defesa nas plantas devido às mudanças ambientais, uma vez que tais caracteres, como tamanho e número de NEFs, produção e qualidade de néctar extrafloral, concentração de fenólicos totais, taninos condensados e taninos hidrolisáveis, mediam interações ecológicas, podendo desencadear mudanças nas interações tri-tróficas.

ABSTRACT

In this work it was found that there are variations in directly and indirectly anti-herbivore defenses traits and tolerance in two native species of Brazilian Cerrado: *Maprounea brasiliensis* St. Hil. (Euphorbiaceae) and *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae - Mimosoideae). The examined defenses were concentration of total phenolics, condensed tannins and hydrolysable tannins, size and number of extrafloral nectaries, extrafloral nectar volume, the relative amount of nectar sugars and leaf sizes. Although both species have been subjected to the same environmental conditions and are distributed in the same area, under the same kind of soil and climate, they presented different answers to the same stimulus. For example, plants of *M. brasiliensis* produced no additional nectaries when subjected to periodic burning for each two years during 18 years. However, plants of *S. adstringens* produced additional EFNs (extrafloral nectaries) in the same conditions. Leaves of *M. brasiliensis* produced in the dry season spent more on defense than growing, with more EFNs and smaller leaf area. In *S. adstringens* there was no difference in the induced defense traits after artificial herbivory and in the leaves produced during the dry season and those produced during the rainy season. However, *S. adstringens* also invested more in growth in the summer, since their leaves are wider this time. Plants of both species showed different responses when exposed to fertilizer residues of a fertilization experiment conducted for nine years. *M. brasiliensis* was more responsive to fertilizer residues than *S. adstringens*. Nutrient concentrations and foliar condensed tannins were altered in *M. brasiliensis* due to changes in soil characteristics determined by medium-term fertilization. On the other hand, in *S. adstringens*, the concentration of secondary metabolites was not modified, but the concentration of foliar nutrients also changed due to residues of fertilization. The experiment with different levels of herbivory on plants in the fields demonstrated that the new leaves of *M. brasiliensis* produced after the stimulus formed the same amount and size of EFNs than leaves produced before the stimulus. The same type of experiment with different levels of herbivory in the fields in marked plants of *S. adstringens* resulted in an increase in the volume of nectar secreted. Therefore, in *M. brasiliensis*, the anti-herbivore defenses, such as number and size of EFNs and leaf area varied throughout the year and the concentration of condensed tannins has changed due to the addition of fertilizer residues. In *S. adstringens*, the presence of frequent fire increased the number of EFNs and the different artificial

herbivory rates on marked branches increased the amount of nectar, and the leaf area varied over the years. The present study found that there is no trade-off between direct and indirect defenses in *M. brasiliensis* and there are variations in nectar production and ultra-structure and anatomy of EFNs in different leaf ontogenetic stages. Our study also showed that the ontogenetic stage of the plant in *S. adstringens* influences the quality of the leaf for herbivores. Therefore, in this work we proved the phenotypic plasticity of anti-herbivore defenses in two species of Cerrado, *Maprounea brasiliensis* and *Stryphnodendron adstringens*, submitted to field experiments that simulated different environmental conditions. We also show that expression of the attributes of defense is dependent on leaf and individual age. This work highlights the importance of studying the consequences of variations in the defense attributes of plants due to environmental changes. Such traits, as size and number of EFNs, extrafloral nectar production and quality, concentration of total phenolics, condensed tannins and hydrolysable tannins, mediate ecological interactions and can trigger changes in tri-trophic interactions.

INTRODUÇÃO GERAL

As defesas anti-herbivoria são importantes mecanismos das plantas selecionados ao longo do tempo evolutivo em resposta aos danos causados pelos herbívoros (Martin & Baltzinger 2002). As defesas podem ser de resistência ou de tolerância ao herbívoro, sendo ambas adaptativas e causadoras de custos para o *fitness* da planta (Núñez-Farfán et al. 2007). A tolerância é a resposta da planta induzida após o consumo que reduz os efeitos negativos do dano causado pelo herbívoro (Núñez-Farfán et al. 2007), podendo ser um crescimento compensatório (Ruiz et al. 2006). Já a resistência constitui-se de mecanismos de defesa que evitam ou reduzem a quantidade de dano, podendo ser defesas constitutivas ou induzidas (Núñez-Farfán et al. 2007) e diretas ou indiretas. As defesas constitutivas são aquelas expressas pela planta naturalmente (Stamp 2003) e as defesas induzidas são as ativadas após a herbivoria, conferindo algum grau de resistência a subseqüentes ataques (Harvell 1990). As defesas indiretas são atributos que aumentam o desempenho de inimigos naturais dos herbívoros (patógenos, parasitóides e predadores) uma vez que o nível trófico superior pode diminuir a abundância e o impacto dos herbívoros nas plantas (Price et al. 1980). Por outro lado, as defesas diretas agem diretamente contra os herbívoros (Ness 2003), como alguns metabólitos secundários que são adstringentes ou tóxicos.

Plasticidade fenotípica é usualmente definida como a capacidade de um genótipo produzir diferentes fenótipos quando exposto a condições ambientais diferenciadas (Pigliucci et al. 2006; Valladares et al. 2006). A plasticidade fenotípica também pode ser estudada de forma mais abrangente, abordando as respostas de diferentes populações ou diferentes espécies a estímulos ecológicos. Sob tal aspecto, a plasticidade fenotípica é denominada de plasticidade fenotípica *sensu lato* (Valladares et al. 2006). A plasticidade fenotípica é uma estratégia chave para a tolerância assim como para as defesas induzidas (Barton 2008) devido à imprevisibilidade da presença de herbívoros e, conseqüentemente, de seu dano à planta (Pullice & Packer 2008). Logo, pode-se afirmar que a plasticidade fenotípica é considerada uma das principais maneiras pela qual as plantas estão adaptadas à heterogeneidade ambiental (Sultan 2000), sendo que ela pode ser adaptativa a ambientes variáveis, promovendo a sobrevivência e a reprodução de indivíduos mais plásticos (Valladares et al. 2006). Porém, o grau da plasticidade depende do atributo analisado e das condições ambientais impostas à planta (Pigliucci et al. 2006). Por exemplo, de acordo com Van Kleunen & Fischer (2005), apesar de o

potencial da resposta plástica de um dado atributo poder ser alto, a plasticidade observada pode ser baixa devido à limitação de recursos ou estresse ambiental. Estudos têm enumerado diversos fatores bióticos e abióticos que co-ocorrem e modulam a plasticidade fenotípica, como o efeito de desfolha no crescimento da folha (Parra-Tabla et al. 2004) e na produção de nectários extraflorais (NEFs) (Pullice & Packer 2008), o efeito da fertilização na produção de compostos fenólicos (Keinamen et al. 1999) e na produção de NEFs (Mondor et al. 2006) e o efeito da herbivoria na produção de néctar extra-floral (Ness 2003). Além disso, plantas podem apresentar diferentes níveis de plasticidade dependendo do seu estágio ontogênico (Pigliucci et al. 2006). Portanto, percebe-se que a plasticidade fenotípica pode ser um dos mecanismos responsáveis pela variação intra-específica nos atributos das plantas, como defesas anti-herbivoria.

Nectários extraflorais (NEFs) são estruturas que secretam néctar e estão presentes em órgãos aéreos e vegetativos das plantas (Fahn 1979a). Eles ocorrem em diversas famílias (Rudgers & Gardener 2004), sendo abundantemente observados em várias espécies do cerrado (Oliveira & Leitão-Filho 1987). Os NEFs são considerados defesas facultativas de plantas não mimercófilas (Heil & McKey 2003) e o investimento nesta defesa depende da pressão de herbivoria e disponibilidade de recursos (Mondor et al. 2006; Oliver et al. 2007). A defesa mediada por nectários ocorre principalmente devido à presença de formigas nas plantas com NEFs que atacam os herbívoros em troca de néctar (Cuautle & Rico-Gray 2003; Katayama & Suzuki 2003) ou devido à presença de formigas que por si só desencorajam os herbívoros a consumirem a planta (Oliveira & Freitas 2004). Porém, a produção de néctar pode desencadear custos fisiológicos dependentes de recursos disponíveis para as plantas (Rudgers & Gardener 2004) e custos ecológicos, como a atração de mais herbívoros que roubam o néctar sem beneficiar a planta ou que perturbam polinizadores (Adjei-Mafo & Wilson 1983). Devido a tais fatores seletivos, a seleção de características dos NEFs é provavelmente o reflexo das diversas relações plantas/outras organismos intermediadas pelos nectários. Por outro lado, variações estruturais intra-específicas dos NEFs podem ser derivadas da plasticidade fenotípica em resposta à herbivoria (Mondor & Addicott 2003). Por exemplo, a produção de NEFs pode aumentar quando o risco de herbivoria aumenta (Mondor & Addicott 2003), podendo ocorrer o aumento da produção de néctar em resposta às injúrias foliares (Ness 2003; Stephenson 1982). Apesar dos atributos dos NEFs poderem variar em diferentes condições ambientais (Mondor & Addicott 2003; Mondor et al. 2006; Ness 2003; Stephenson 1982), apenas um estudo abordando esse

tema já foi conduzido no cerrado (ver Moraes 2007), bioma cuja vegetação lenhosa é rica em nectários (Oliveira & Leitão-Filho 1987).

Metabólitos secundários são compostos orgânicos essenciais na adaptação das plantas ao ambiente (Makkar et al. 2007), podendo estar relacionados com defesa contra herbívoros (Howe & Jander 2008). Alguns metabólitos secundários são constitutivos, enquanto outros são induzidos após a herbivoria (Howe & Jander 2008). Eles podem funcionar como eficiente defesa direta das plantas contra herbívoros, como os compostos fenólicos em geral (Howe & Jander 2008), exemplificados pelas ligninas, taninos condensados e taninos hidrolisáveis (Makkar et al. 2007). Uma vez que diferentes classes de fenólicos podem ser facilmente extraídas e quantificadas, os compostos fenólicos são freqüentemente usados para quantificar o investimento da planta em defesa, sendo que diferentes compostos fenólicos apresentam diferentes efeitos sobre os herbívoros: a ingestão de taninos condensados diminui o valor nutritivo da planta para o herbívoro (Heil et al. 2002) e, por outro lado, a ingestão de taninos hidrolisáveis causa toxicidade, podendo levar a morte do herbívoro (Makkar et al. 2007). Alguns estudos têm demonstrado que a produção de compostos fenólicos pode ser plástica, sendo negativamente correlacionada com a disponibilidade de nutrientes (Keinamen et al. 1999). Porém, a síntese de algumas classes de compostos fenólicos é mais afetada pela disponibilidade de recursos do que a síntese de outras classes. Por exemplo, polímeros fenólicos, como lignina e taninos condensados, podem ser mais afetados pela disponibilidade de nutrientes, enquanto que a síntese de fenólicos com massa molecular baixa pode ser mais regulada pelas atividades enzimáticas, uma vez que eles apresentam elevado *turnover* (Keinamen et al. 1999). Apesar de existirem diversos estudos sobre defesas químicas de plantas em ambientes temperados (Keinamen et al. 1999; Kelly & Hanley 2005; Kobayashi et al. 2008; Martin & Müller 2007), esse tipo de estudo tem sido escassamente abordado para o cerrado (Gonçalves-Alvim et al. 2006; Marquis et al. 2001; Pais & Varanda 2003).

Portanto, nesse trabalho, foi estudada a plasticidade fenotípica de defesas anti-herbivoria de duas espécies de cerrado, *Maprounea brasiliensis* St. Hil. (Euphorbiaceae) e *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae - Mimosoideae), submetidas a experimentos controlados no campo que simulavam diferentes condições ambientais. O estudo das variações nos atributos de defesa nas plantas faz-se necessário devido às grandes mudanças ambientais determinadas por ações antrópicas que modificam não apenas caracteres estruturais e químicos das plantas, como também suas possíveis

implicações ecológicas. Dessa forma, os objetivos do nosso estudo foram: verificar se existem variações nos atributos de defesa (NEFs, néctar extrafloral e compostos fenólicos) em diferentes condições ambientais (período chuvoso e período seco; diferentes taxas de herbivoria manual; diferentes tipos de adição de nutrientes) e verificar a existência de *trade-offs* entre os diferentes tipos de defesa (defesa indireta e defesa direta); analisar e comparar qualidade foliar e defesa (concentração de nutrientes, produção de compostos secundários e produção de NEFs) de plântulas e plantas adultas de *S. adstringens* submetidas a diferentes condições de fertilização e descrever a anatomia dos NEFs de *S. adstringens* e de *M. brasiliensis* por meio da microscopia de luz e eletrônica de varredura e microscopia de transmissão para *M. brasiliensis*.

Capítulo I – Plasticidade fenotípica, distribuição, morfoanatomia e ultraestrutura de nectários extraflorais em plantas de *Maprounea brasiliensis* St. Hill. (Euphorbiaceae) submetidas a diferentes condições ambientais

RESUMO - Nectários extraflorais (NEFs) estão presentes na família Euphorbiaceae, porém pouco se conhece sobre NEFs em *Maprounea*. Nesse estudo, foram estudadas a anatomia e ultra-estrutura dos NEFs de *Maprounea brasiliensis*, sua distribuição e a constituição química do néctar. Também foram realizados experimentos a fim de elucidar quais fatores ambientais influenciam na produção de NEFs em *M. brasiliensis* e se, nessa espécie, os NEFs são defesas induzidas. NEFs estão presentes na base e no ápice foliar; porém, eles são maiores e estão mais concentrados na base. O néctar é composto predominantemente por glicose e frutose, sendo que sacarose está presente em menor quantidade, principalmente rafinose. A produção do néctar está associada com folhas imaturas e recentemente expandidas. NEFs originam da protoderme. No final da ontogênese do nectário, as células secretoras são circundadas por três ou mais camadas de células com paredes lignificadas que mantêm o tecido secretor isolado do tecido vascular. A ultra-estrutura revelou NEFs maduros, sem atividade secretora, com mitocôndrias, retículo endoplasmático liso, complexo de Golgi, ribossomos e vesículas. Abaixo dos NEFs, as células com paredes lignificadas estão vivas e contêm citoplasma granular com ribossomos, retículo endoplasmático rugoso, vacúolos, mitocôndrias e núcleo. Os experimentos realizados com plantas de *M. brasiliensis* demonstraram que a produção de NEFs não foi influenciada pela presença de queimadas frequentes, sendo que plantas em área com histórico de fogo recente não apresentaram mais NEFs nem NEFs maiores do que plantas em área controle. Além disso, plantas que sofreram diferentes níveis de herbivoria em um ramo marcado não produziram mais NEFs nem nectários com maior diâmetro nas folhas novas produzidas após o tratamento do que as plantas controle. Essas plantas também não mostraram efeito sistêmico em resposta à herbivoria, isto é, as folhas novas produzidas após a aplicação dos tratamentos e presentes nos ramos vizinhos ao ramo que sofreu herbivoria não tiveram mais NEFs. Entretanto, as folhas produzidas no período seco investiram mais em defesa do que as folhas produzidas no período chuvoso, apresentando nectários em maior quantidade e diâmetro. Em compensação, as folhas produzidas no período chuvoso apresentaram maior área foliar. Nesse trabalho, nós demonstramos que a produção do néctar é fortemente influenciada pela idade dos nectários devido a mudanças anatômicas e estruturais, sendo que mudanças na produção do néctar influenciam o patrulhamento de formigas nos NEFs, uma vez que não foram observadas formigas nas folhas que não secretavam mais néctar. Ademais, NEFs de *M. brasiliensis* não são defesas induzidas, pois os estímulos do fogo e de desfolha manual não alteraram a expressão desse atributo

de defesa, além de que a produção de NEFs foi menor na estação de maior pressão de herbivoria, uma vez que maior quantidade de NEFs foi produzida no período seco do que no período chuvoso.

1. Introdução

Nectários extraflorais (NEFs) são glândulas que secretam açúcares e estão localizadas em órgãos vegetativos das plantas (Caspary 1848; Koptur 1992). Os NEFs atraem vários insetos (Cuautle & Rico-Gray 2003; Oliveira & Freitas 2004), especialmente formigas (Oliveira 1997), que defendem a planta contra herbívoros e em troca recebem alimento: o néctar (Costa et al. 1992; Katayama & Suzuki 2003). NEFs ocorrem em 93 famílias, sendo que as plantas que os possuem representam 30% das espécies em alguns ambientes (Rudgers & Gardener 2004). Por exemplo, plantas com nectários extraflorais são mais comuns nos trópicos do que nas comunidades de clima temperado (Koptur 1992). No cerrado, savana tropical, onde mais de 25% das espécies possuem NEFs (Oliveira & Leitão-Filho 1987; Oliveira & Oliveira-Filho 1991). Estudos experimentais em áreas de cerrado demonstraram que as formigas que são atraídas pelo néctar extrafloral defendem as plantas contra herbívoros, apresentando função anti-herbivoria (Costa et al. 1992; Del-Claro et al. 1996; Oliveira 1997). No entanto, o mutualismo defensivo entre formiga e planta pode mostrar variação temporal e espacial (Rico-Gray & Oliveira 2007), que depende da idade do NEF, da abundância de formigas e herbívoros e da tolerância das plantas à herbivoria (Heil et al. 2000; Rios et al. 2008). Por exemplo, alguns NEFs são funcionais apenas em folhas jovens (Paiva 2009), o que pode ser explicado pelo *trade-off* entre a pressão de herbivoria, a disponibilidade de recursos e os benefícios da nova produção de folha (Mondor et al. 2006; Oliver et al. 2007).

Nectários extraflorais podem ser atributos extremamente plásticos que são responsivos a diferentes condições ambientais, como o efeito de desfolha (Pullice & Packer 2008) e do fogo recorrente (Morais 2007) na produção de NEFs e o efeito da herbivoria na produção de néctar extrafloral (Ness 2003). Além disso, o estágio ontogênico também pode influenciar na produção de nectários (Heil et al. 2000), uma vez que as plantas podem apresentar diferentes níveis de plasticidade dependendo do seu estágio de desenvolvimento (Pigliucci et al. 2006). Portanto, percebe-se que a plasticidade fenotípica pode ser um dos mecanismos responsáveis pela variação intra-específica nos atributos ligados aos NEFs, apesar do grau de plasticidade ser específico aos atributos individuais e às condições ambientais (Pigliucci et al. 2006), significando que o nível da mudança fenotípica difere entre espécies e/ou atributos e depende do ambiente considerado (Valladares et al. 2002a; Valladares et al. 2002b). Dessa forma, o estudo de diferentes condições ambientais que possam estar modulando diferentes

características dos NEFs pode nos auxiliar a entender mudanças nas interações mediadas por esses atributos.

Com esse intuito, o presente trabalho teve como objetivo estudar a plasticidade fenotípica de nectários extraflorais em plantas de *Maprounea brasiliensis* St. Hill (Euphorbiaceae), um pequeno arbusto comumente encontrado no cerrado do Brasil. Para tanto, nós comparamos a produção e o desenvolvimento anatômico e ultraestrutural dos NEFs em folhas em diferentes fases ontogênicas e realizamos experimentos controlados no campo, a fim de elucidar quais fatores poderiam desencadear mudanças fenotípicas nos atributos dos NEFs de *M. brasiliensis* submetidas a diferentes condições ambientais. Como as plantas produzem defesas proporcionalmente à taxa de herbivoria, sendo que diferentes fatores ambientais também podem influenciar a produção de defesas (Bryant et al. 1988), espera-se que a produção de NEFs em *M. brasiliensis* seja maior em condições que se assemelhem a uma desfolha total ou em situações de maior pressão de herbivoria. Assim, como o fogo pode ter efeito semelhante ao obtido com uma desfolha das plantas (César 1980), nossa hipótese é que indivíduos de *M. brasiliensis* em área com queimadas frequentes produzam mais NEFs do que indivíduos presentes em área controle. Além disso, NEFs podem funcionar como defesa induzida, ocorrendo o aumento no número de nectários nas próximas folhas produzidas pela planta após herbivoria (Mondor & Addicott 2003). Dessa forma, é esperado encontrar maior quantidade de NEFs e nectários maiores nas folhas novas produzidas nos ramos que sofreram diferentes níveis de desfolha do que nos ramos controle e nos ramos vizinhos ao ramo danificado, uma vez que a defesa não deve ser sistêmica. Além disso, como o efeito da herbivoria é maior na época das chuvas (Marquis et al. 2001), espera-se observar maior número e tamanho de NEFs em folhas produzidas na época chuvosa do que na época seca.

Portanto, este estudo esclarece os aspectos estruturais e a distribuição de NEFs em folhas de *M. brasiliensis*, elucida a composição química do seu néctar e documenta a variação dos atributos dos NEFs, tais como anatomia, micromorfologia e aspectos ultraestruturais durante o desenvolvimento do nectário e da folha, relacionando essas características com as funções fisiológica e ecológica dos NEFs. Além disso, os experimentos conduzidos no campo nos auxiliaram a responder as seguintes perguntas: (1) NEFs em *M. brasiliensis* são defesas indiretas; isto é, eles atraem formigas que podem afugentar os herbívoros? Se sim, (2) nectários extraflorais de *M. brasiliensis* são defesas induzidas? Se sim, (3) plantas em áreas com histórico de fogo recente

apresentam mais NEFs do que plantas em áreas controle? E (4) o número de NEFs aumenta após herbivoria ou durante o período de maior possibilidade de herbivoria (época chuvosa)?

2. Material e Métodos

Espécie e local de estudo

Maprounea brasiliensis St Hill (Euphorbiaceae) é um pequeno arbusto perene de 0,5 a 2 m de altura, sempre verde, com folhas alternas, com dois a cinco NEFs ovais na base das folhas (Hans-Joach 1999; Senna 1984). A produção de folhas ocorre praticamente durante todo o ano, sendo que a maior produção de folhas novas ocorre em setembro, quando há também produção de flores. O principal herbívoro de *M. brasiliensis* é uma lagarta gregária, *Deuterollyta chrysoderas* (Dyar 1917) (Pyrilidae), localmente monófaga (Diniz *et al.* 1999). As lagartas constroem abrigos tubulares com fezes e material vegetal em vários ramos de um indivíduo e, ainda que não muito freqüentes, causam danos consideráveis na planta, pois os grupos normalmente são compostos por mais de 50 lagartas. Seu principal fungo patogênico é *Coleosporium maprouneae* (P. Henn.) n. comb. (Uredinales), frequentemente observado nas folhas onde causa lesões avermelhadas (Viégas 1945).

A pesquisa foi conduzida na Reserva Ecológica do IBGE (RECOR) (15° 56' 41" S e 47° 53' 07" W), no Distrito Federal. A fitofisionomia dominante é o cerrado *sensu stricto*, constituído por um estrato herbáceo com gramíneas e um estrato lenhoso descontínuo (Eiten 1994). O clima é Aw pela classificação de Köppen com uma distinta estação seca de maio até setembro e a estação chuvosa de outubro ao início de maio. Os solos são profundos, bem drenados, ácidos e distróficos (Franco 2002; Franco *et al.* 2005). Devido à sazonalidade das chuvas, as camadas superficiais dos solos tornam-se secas na estação seca enquanto que as mais profundas mantêm maior quantidade de água ao longo do ano (Franco 2002).

Caracterização anatômica, micromorfológica e ultraestrutural dos NEFs e caracterização química do néctar extrafloral

Amostras de folhas de *M. brasiliensis* foram coletadas em diferentes fases de desenvolvimento, incluindo folhas jovens e folhas senescentes, em uma área de cerrado, na RECOR. Exemplar de *M. brasiliensis* estão depositados no herbário da Reserva Ecológica do IBGE com o número 41883.

A área foliar em cm^2 foi obtida por meio de uma regressão cuja largura da folha que variou de 3.2 - 5.5 cm correspondia ao x, sendo que a equação da reta, (área foliar = $(8.35 \cdot \text{largura foliar}) - 16.76$) cujo $R^2 = 0.806$, foi determinada pela área de 30 folhas, uma por planta, desenhadas em papel quadriculado. Dessas 30 folhas, 16 foram sorteadas e nelas foi determinada a quantidade de NEFs na base e no ápice foliar. Os NEFs também foram classificados em pequenos (0.1-1.0 mm de diâmetro) e grandes (1.1-2.5 mm de diâmetro). A comparação do número de NEFs e a quantidade de NEFs pequenos e grandes na base e no ápice das folhas foram feitas com teste *t* quando a distribuição de dados foi normal ou com o teste de Mann-Whitney U quando os dados não apresentaram distribuição normal. O nível de significância foi de 0,05. Além disso, foi determinada a correlação (Correlação de Spearman) entre o número de NEFs e área foliar.

Para a coleta de néctar, ramos de *M. brasiliensis* foram ensacados com plástico durante 96 horas para excluir a visita de formigas aos NEFs e para obter néctar suficiente para a coleta. O néctar foi coletado em sete plantas, sendo quatro NEFs por planta. Ele foi coletado com uma seringa de 0,5 ml, diluído em 500 μl de água destilada e armazenado em eppendorf dentro de nitrogênio líquido no campo. No laboratório, as amostras foram mantidas a -80°C . A composição de carboidratos no néctar extrafloral foi determinada pelo cromatógrafo de íons (Dionex) integrado ao modelo ICS3000 de HPAEC-IPAD com coluna para detecção de carboidratos (CarboPacTM PA10, 2 X 250 mm). Foi usada como eluente solução aquosa de 200 mM de NaOH. As concentrações dos carboidratos (glicose, frutose e sacarose) e de açúcar total foram calculadas com o Software de Chromeleon através de uma curva padrão nas seguintes concentrações: 0.625, 1.25, 2.5, 5.0 e 10.0 μM . A fim de se comparar a concentração de cada tipo de açúcar, teste de Kruskal-Wallis ($\alpha=5\%$) foi feito, uma vez que os dados não apresentaram distribuição normal. A porcentagem de glicose, frutose e sacarose em relação ao açúcar total foi também analisada para cada amostra de néctar extrafloral e testada por ANOVA, seguida de teste de Tukey ($\alpha=5\%$).

Formigas que estavam patrulhando os NEFs de diferentes indivíduos de *M. brasiliensis* foram coletadas com pinça, fixadas em álcool 70% e identificadas.

Para microscopia de luz, folhas em diferentes fases de desenvolvimento foram fixadas em FAA (ácido acético a 5%, 5% formaldeído, 90% de etanol 70%), armazenadas em álcool 70% (Johansen 1940), processadas e infiltradas em historesina

(Kit Technovit). Cortes transversais, longitudinais e paradérmicos com 5µm de espessura foram feitos em micrótomo, montados em lâminas e corados com Azul de Toluidina (O'Brien et al. 1964). Para testes histoquímicos, cortes a mão livre foram feitos e corados com Floriglucina para a detecção de lignina, Sudan Vermelho B para lipídios totais e Lugol para amido (Johansen 1940).

Para estudos de microscopia eletrônica de varredura, fragmentos das folhas completamente expandidas com NEFs foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de 0,05 M em pH 7,2 durante 24 h, desidratados em uma série de acetona (30% - 100%), secos no ponto crítico de CO₂ e cobertos com uma camada de ouro (Bozzola & Russel 1992). A análise da superfície do NEF foi feita em microscópio eletrônico varredura (Jeol ® 840A) com voltagem de 5.0 kV.

Para estudos de microscopia eletrônica de transmissão, fragmentos de folhas recentemente expandidas com NEFs funcionais foram fixados em solução de Karnovsky (Karnovsky 1965) durante 24 h, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% em 0,1 M de tampão fosfato (pH 7.2) e processados usando método padrão (Roland 1978). Secções ultrafinas foram pós-contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. A ultraestrutura dos NEFs e de seus tecidos vizinhos foi visualizada em microscópio eletrônico de transmissão (Jeol ® 1011) com 80 kV.

Efeito do histórico do fogo

Em maio de 2009 (início da estação seca), na Reserva Ecológica do IBGE, para se verificar a existência de variação na produção de NEFs e tamanho dos NEFs devido ao efeito de queimadas recorrentes, foi feito um experimento inteiramente casualizado. Coletaram-se três folhas completamente expandidas de 15 indivíduos em área com histórico de fogo, depois de nove meses da última queimada experimental, e em área controle. A área com histórico de fogo sofreu queimadas experimentais de 1991 a 2008 no início do mês de agosto, em meados da seca, a cada dois anos (Dias & Miranda 2010; Miranda et al. 2004). Número de NEFs foi mensurado no limbo da folha de *M. brasiliensis* assim como o seu diâmetro maior com o auxílio de um estéreo-microscópio.

Teste *t* ($\alpha = 5\%$) foi realizado a fim de comparar médias do número de NEFs e do tamanho dos NEFs entre plantas de *M. brasiliensis* em área com queimadas experimentais freqüentes e plantas em área sem queimadas freqüentes (controle).

Herbivoria artificial

Em agosto de 2009 (estação seca), foi montado um experimento inteiramente casualizado com parcelas divididas. No total foram 80 plantas com 20 plantas reprodutivas por tratamento. Foram marcados dois ramos por indivíduo, sendo que cada ramo foi considerado uma sub-parcela da parcela planta. Em um ramo não foi feita herbivoria manual (ramo S) e no outro ramo foi realizada a herbivoria manual (ramo H), cortando-se com tesoura toda a folha (exceto o pecíolo), menos no grupo controle. Antes de se começar o experimento, o número de folhas em cada ramo (ramo S e ramo H) foi mensurado. Em cada bloco aplicaram-se no ramo H de cada indivíduo quatro tratamentos com diferentes níveis de herbivoria: 0% de folhas retiradas do ramo H (grupo A), 10% de folhas retiradas do ramo H (grupo B), 50% de folhas retiradas do ramo H (grupo C) e 100% de folhas retiradas do ramo H (grupo D).

No início de dezembro (estação chuvosa), três novas folhas completamente expandidas, produzidas no ápice do ramo S, e todas as novas folhas completamente expandidas, produzidas no ápice do ramo H (acima da área que sofreu herbivoria), foram coletadas nos indivíduos que sofreram desfolha no ramo H. Nos indivíduos que não sofreram desfolha no ramo H (grupo A) foram coletadas três folhas na base do ramo S e três folhas novas no ápice do ramo H. Nas três folhas coletadas de cada ramo por indivíduo, o número e o maior diâmetro dos NEFs com auxílio de um estereomicroscópio com escala acoplada e a largura da folha com auxílio de uma régua foram mensurados. A área foliar foi obtida por meio de uma regressão cuja largura da folha, conforme citado anteriormente.

Os dados analisados foram: a média do número NEF por folha (NEF), a média do diâmetro dos NEFs (DIAM), a média do diâmetro total de NEF por folha (\sum DIAM) de três folhas por indivíduo e a média da área foliar. Para todos os dados, a normalidade e a homogeneidade de variâncias foram testadas, usando-se teste de Kolmogorov-Smirnov e teste de Levene, respectivamente. A fim de se comparar o efeito de diferentes níveis de herbivoria no ramo H de plantas de cada tratamento, foram comparadas plantas que sofreram herbivoria artificial no ramo H e plantas controle. As análises estatísticas foram feitas com as plantas controle (folhas coletadas no ápice do ramo H) e com as plantas que produziram folhas após o tratamento de herbivoria. A média do diâmetro dos NEFs (DIAM) foi transformada em sua raiz quadrada para se alcançar as premissas dos testes paramétricos. Os efeitos dos tratamentos de herbivoria no número de NEFs, diâmetro dos NEFs e área foliar foram testados por MANOVA tipo III e a comparação

entre os diferentes níveis de herbivoria foi feita usando-se Tukey. Kruskal-Wallis foi utilizado a fim de se comparar o diâmetro total dos NEFs por folha entre os tratamentos, uma vez que os dados não apresentaram distribuição normal. A fim de se comparar o efeito de diferentes níveis de herbivoria no ramo vizinho que não sofreu herbivoria com plantas controle (efeito sistêmico), ramos S das plantas que sofreram diferentes níveis de herbivoria foram comparados com o ramo H das plantas controle. O número de NEFs e a área foliar foram testados por MANOVA tipo IV e a comparação entre os diferentes níveis de herbivoria foi feita usando-se Tukey. Kruskal-Wallis foi utilizado a fim de se comparar a média do diâmetro dos NEFs e diâmetro total dos NEFs por folha entre os tratamentos. Para se testar o efeito da sazonalidade nos atributos das folhas produzidas nas diferentes estações do ano, foram comparadas folhas produzidas no ramo S (folhas produzidas no período seco, coletadas na base do ramo) e folhas produzidas no ramo H (folhas produzidas no período chuvoso, coletadas no ápice do ramo) das plantas controle. O efeito do tempo foi testado com teste t - amostras dependentes para o número e diâmetro dos NEFs, área foliar e diâmetro total de NEFs por folha.

Para todos os dados, a normalidade foi testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade das variâncias foi comprovada pelo teste de Levene. O software utilizado em todas as análises estatísticas foi o Statistica 7.0 e o nível de significância adotado foi de 5%.

3. Resultados

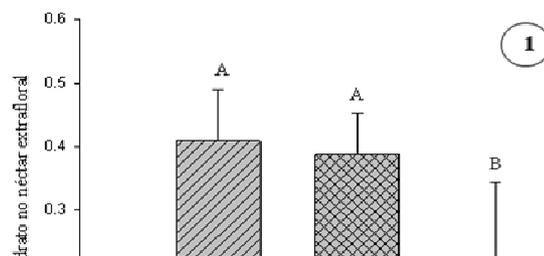
Caracterização anatômica, micromorfológica e ultraestrutural dos NEFs e caracterização química do néctar extrafloral

Todos os NEFs de *M. brasiliensis* ocorrem na superfície abaxial, sendo que a maioria está na base (2.854 ± 1.068) do que no ápice da folha (1.417 ± 0.907) ($t = 4.105$; $p < 0.01$). Há maior quantidade de NEFs grandes (2.063 ± 1.237) do que pequenos (0.792 ± 0.942) na base foliar ($Z = 2.933$; $p < 0.01$). Por outro lado, existe apenas NEFs pequenos (1.396 ± 0.913) no ápice da folha ($Z = -4.917$; $p < 0.01$).

Os NEFs começam sua atividade secretora nas folhas jovens e perdem sua funcionalidade nas folhas senescentes. O volume de néctar produzido diminui à medida que a folha amadurece, é impossível coletar gotas de néctar nas folhas completamente expandidas. É possível coletar néctar de nectários ativos grandes ou pequenos.

Formigas, tais como *Cephalotes*, visitam apenas os NEFs de folhas jovens, patrulhando os ramos de folhas imaturas.

A composição de açúcares do néctar extrafloral permanece essencialmente a mesma entre NEFs grandes e pequenos. O néctar é composto por hexoses (glicose e frutose) e sacarose, além de traços de rafinose. Não existe diferença entre a concentração em μM de cada tipo de carboidrato ($H = 1.355$; $p > 0.05$), sendo a concentração média da glicose de 24.310 ± 33.366 , a de frutose de 23.160 ± 33.577 e a de sacarose de 12.750 ± 21.937 . Entretanto, foi constatada diferença na porcentagem de sacarose em relação a glicose e frutose no néctar extrafloral ($F = 10.174$; $p < 0.01$) (Fig 1).



das células secretoras, começam a expandir e impregnar suas paredes com lignina (Fig. 2H). No final da ontogênese do nectário, as células secretoras são circundadas por três ou mais camadas de células com paredes lignificadas que mantêm o tecido secretor isolado do tecido vascular (Fig. 2F-H). Amido não foi detectado nas células secretoras de NEFs de folhas completamente expandidas.

NEFs completamente formados estão incorporados ao mesofilo e isolados do tecido vascular por meio de várias camadas de células com paredes espessas impregnadas de lignina (Fig. 2F-H). Apesar de o tecido vascular ser mais denso na parte da folha onde está o nectário, nem floema nem xilema atingem as células secretoras (Fig. 2G). O tecido secretor apresenta células alongadas radialmente com citoplasma denso e núcleo conspícuo. O néctar se acumula dentro do espaço subcuticular (Fig. 2C) e sua liberação ocorre por ruptura da cutícula observada nos NEFs completamente formados.

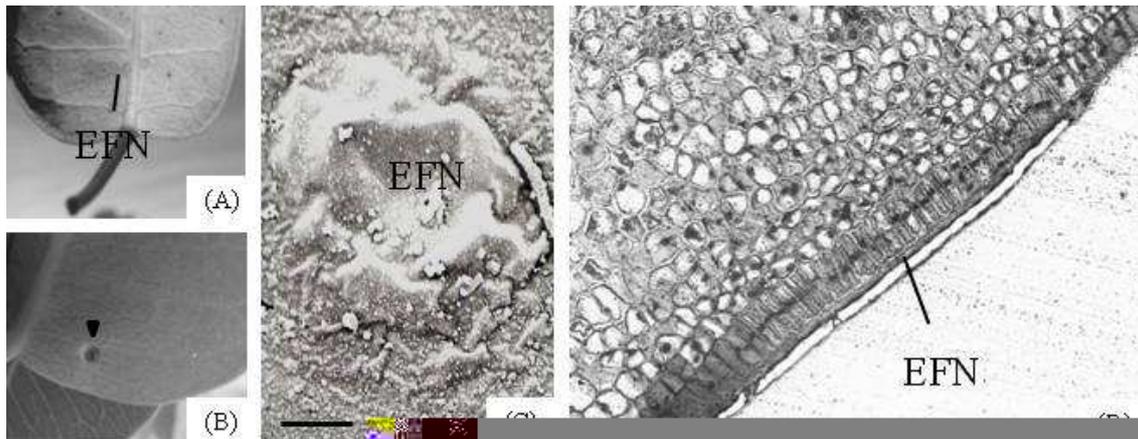


Figura 2. NEF de *Maprounea brasiliensis* St Hill. **A.** NEFs sem secreção de néctar na base da folha. **B.** NEF com uma gota de néctar (cabeça de seta). **C.** Imagem de microscópio eletrônico de varredura (SEM) de um NEF. Observe a cutícula ondulada devido à formação de espaço subcuticular e a ausência de estômatos e tricomas no polo secretor. **D.** NEF com uma camada de células secretoras. **E.** Detalhe da primeira divisão anticlinal (seta) das células do NEF para formar a segunda camada do nectário. Observe o floema ramificado em direção às células do NEF. **F.** Folha completamente expandida com dois NEFs maduros. **G.** O tecido subglandular, com células que formam uma barreira abaixo do NEF, já não permite a vascularização do NEF. **H.** Paredes das células do tecido subglandular estão impregnadas com lignina conforme mostrado pela coloração vermelha com floroglucinol. PC - células de parênquima, PH - floema, SC - células secretoras, ST - tecido subglandular, V - vascularização. Barras = 10 μm (C, G), 100 μm (D), 40 μm (E), 20 μm (F), 5 μm (H).

A ultraestrutura dos NEFs foi investigada em folhas recentemente expandidas. Ela demonstrou que as células dos NEFs possuem citoplasma repleto de mitocôndrias

(Fig. 3A, 4C, 4D), retículo endoplasmático liso, complexo de Golgi (Fig. 3D) e ribossomos. Algumas células secretoras contêm vacúolos com secreção ou muitos corpos multivesiculares (Fig. 3D), e núcleos grandes com cromatina não condensada (Fig. 3A). A comunicação entre as células secretoras foi mantida por plasmodesmos (Fig. 3B, C) e vesículas (Fig. 4C), como está evidenciada pela presença de gotículas de óleo espalhadas perto da membrana plasmática. Além disso, a secreção granulócrica pode ser inferida devido à formação de vesículas (Fig. 3E). Abaixo do NEF, foram observadas células vivas com paredes espessas (Fig. 4A-C, F-H), que continham citoplasma granular com muitos ribossomos (Fig. 4C-G), retículo endoplasmático rugoso (Fig. 4C, E-F, H), grandes vacúolos (Fig. 3D, G), mitocôndrias com estroma denso e cristas desenvolvidas (Fig. 4E-F) e núcleos irregulares (Fig. 4A, D). Estas células, entre o tecido secretor e o floema, formam o tecido subglandular (Fig. 4A) que apresentam ligações simplásticas entre suas células, tais como plasmodesmos (Fig. 4C, E), que algumas vezes estão localizados dentro de campos primários de pontuações (Fig. 4C). Não observamos plasmodesmos ligando as células de paredes espessas, que formam o tecido subglandular, e as células secretoras (Fig. 4A, B). Alguns elementos do tubo crivado (Fig. 4H) foram observados distribuídos entre as células do tecido subglandular, estando mais concentrados em camadas perto do feixe vascular.

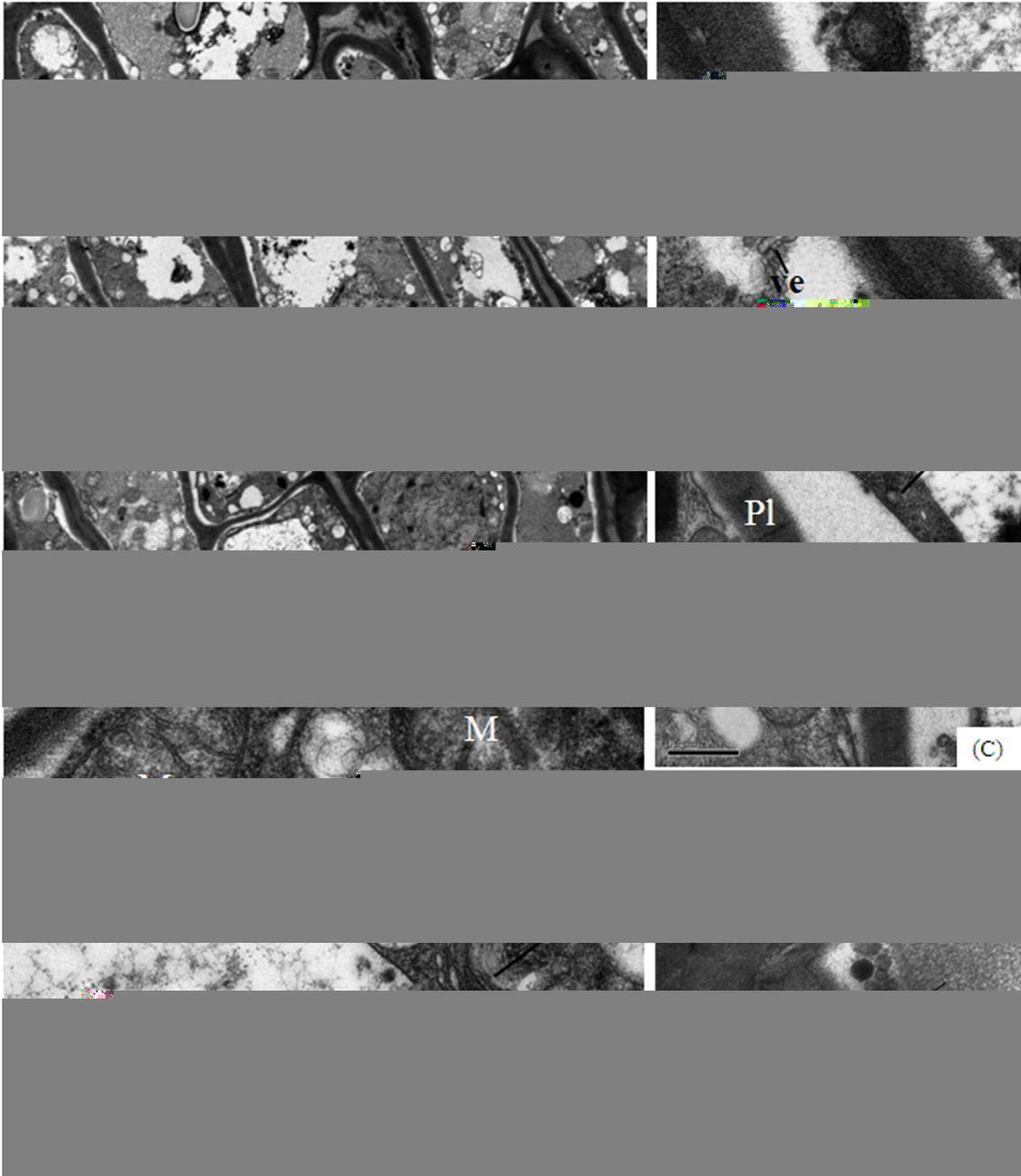


Figura 3. Imagens em microscópio eletrônico de transmissão (MET) do NEF em folhas recentemente expandidas de *Maprounea brasiliensis* St Hill. **A.** Células alongadas que formam o NEF com um citoplasma denso, muitos vacúolos e cromatina descondensada no núcleo. **B.** Observar plasmodesmos e vesículas que são responsáveis pela comunicação entre as células secretoras. **C.** Detalhes de duas células secretoras com mitocôndrias, vesículas e vacúolos. **D.** Complexo de Golgi, vacúolo e mitocôndrias em uma célula secretora. **E.** A formação de vesículas no ápice de células secretoras. GA – Complexo de Golgi, M - mitocôndrias, N - núcleo, n - nucléolo, PI - plasmodesmos, V -vacúolo, v - vesículas, W - parede celular. Barras = 5 μm (A), 0,2 μm (B), 0,5 μm (C-E).

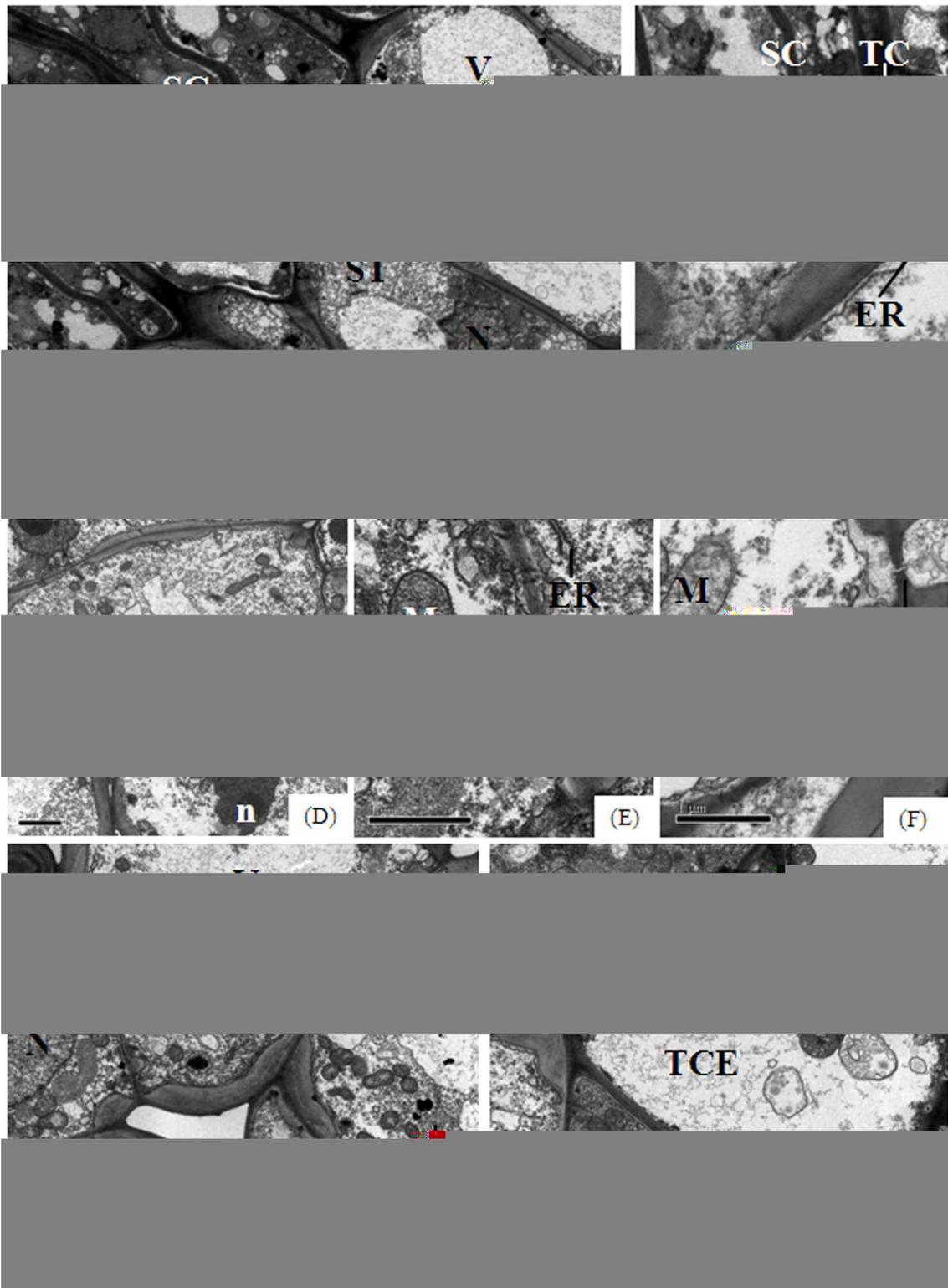


Figura 4. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de células do tecido subglandular e floema em folhas recentemente expandidas de *Maprounea brasiliensis* St Hill. **A.** Região entre as células secretoras e as células com paredes espessas que formam o tecido subglandular, constituindo uma barreira à vascularização para o NEF. **B.** Detalhe da região de interface entre as células secretoras e as células do tecido subglandular. **C.** Detalhe do plasmodesmo e do retículo endoplasmático que são os responsáveis pela comunicação simplástica entre as células do tecido subglandular. **D.** Células com vacúolos, núcleos e nucléolos. **E.** Mitocôndrias, plasmodesmos e retículo endoplasmático. **F.** Detalhe de uma pontuação que é a responsável por manter a comunicação entre as células. **G.** Vista geral das células que constituem o tecido subglandular. **H.** Elementos do tubo crivado que estão distribuídos entre as células do tecido subglandular. CT - célula com parede espessa, ER - retículo endoplasmático, M - mitocôndrias, N -

núcleo, n - nucléolo, Pl - plasmodesmos, P - pontoação, R - ribossomas, SC - células secretoras, ST - tecido subglandular, TCE - elemento do tubo crivado, V - vacúolo, v - vesículas. Barras = 5 μ m (A), 2,5 μ m (B), 0,2 μ m (C), 2 μ m (D), 1 μ m (E-F), 2 μ m (G-H).

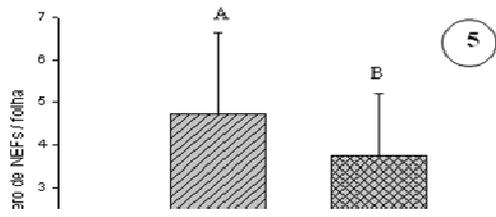
Experimento do efeito do histórico do fogo

Em *Maprounea brasiliensis* a produção de NEFs não foi influenciada pela presença de queimadas frequentes. A média de NEFs encontrada na área controle foi de 3,02 NEFs/ folha e na área com histórico de fogo foi de 3,55 NEFs/ folha ($t = -0,772$; $p = 0,446$) e a média do diâmetro maior dos NEFs encontrada na área controle foi de 4,82 e na área com histórico de fogo foi de 5,17 ($t = -0,358$; $p = 0,723$). Portanto, plantas em área com histórico de fogo recente não apresentaram mais NEFs nem NEFs maiores do que plantas em área controle.

Experimento de herbivoria artificial

O número médio, o diâmetro médio ($F = 1.039$; $p > 0.05$) e o diâmetro total médio dos NEFs ($H = 2.172$; $p > 0.05$) não aumentaram assim como a área foliar média ($F = 1.039$; $p > 0.05$) não sofreu mudança significativa quando comparamos folhas produzidas no ramo H em plantas que sofreram diferentes níveis de herbivoria em um ramo marcado e plantas controle. Quando comparamos o ramo vizinho S das plantas submetidas à herbivoria artificial com as plantas controle, constatamos que não houve mudança significativa para nenhum atributo analisado no ramo vizinho: número médio de NEFs e área foliar média ($F = 0.897$; $p > 0.05$) e diâmetro médio do NEF e diâmetro total médio dos NEFs por folha ($H = 0.004$; $p > 0.05$).

A fim de se verificar o efeito das estações do ano sobre os atributos de defesa e área foliar, foram comparadas folhas produzidas no ramo S (folhas produzidas no período seco, na base do ramo) e folhas produzidas no ramo H (folhas produzidas no período chuvoso, no ápice do ramo) em plantas controle. Verificou-se que as folhas produzidas durante o período seco apresentaram mais NEFs (Fig. 5) ($t = 2.611$; $p < 0.05$), NEFs com maior diâmetro (Fig. 6) ($t = 3.397$; $p < 0.05$) e maior diâmetro total dos nectários por folha (Fig. 7) ($t = 3.237$; $p < 0.05$) do que as folhas produzidas na época chuvosa. Por outro lado, as folhas produzidas na época chuvosa foram maiores (Fig. 8) ($t = -2.776$; $p < 0.05$) do que as folhas produzidas no período seco (Anexo 1).



4. Discussão

Os NEFs de *Maprounea brasiliensis* podem ser descritos como estruturalmente diferenciados (Elias 1983), uma vez que é fácil distingui-los dos tecidos circundantes. Todos os NEFs de *M. brasiliensis* ocorrem na superfície abaxial, especialmente na base da folha, sendo que alguns nectários são observados no ápice foliar. A presença de NEFs funcionais na base e ápice das folhas apresenta valor adaptativo, porque as formigas precisam patrulhar uma folha inteira para obter o néctar (Delgado et al. 2011a; Delgado et al. 2011b; Morellato & Oliveira 1994). Entretanto, os nectários no ápice são menores do que aqueles na base da folha, favorecendo a presença das formigas na base foliar. Este fenômeno pode ser considerado vantajoso para a planta, pois restringe a maior produção de néctar para um local que é biologicamente mais importante (McDade & Turner 1997). Do ponto de vista adaptativo, é melhor manter a base da folha mais saudável do que seu ápice, uma vez que a porção basal da folha é a responsável pela fixação da mesma à planta.

A composição de carboidratos do néctar extrafloral de *M. brasiliensis* revelou a presença de hexoses (glicose, frutose e traços de rafinose) e sacarose, não havendo diferença quantitativa entre os diferentes tipos de carboidratos quando comparada a concentração em μM . A concentração em μM foi uma medida indireta do volume do néctar produzido, pois como o néctar coletado foi liofilizado e depois foi colocado o mesmo volume para cada amostra de néctar dentro dos eppendorfs a fim de se fazer a análise no cromatógrafo de íons. Isso significa que a não diferença estatística entre os diferentes tipos de carboidratos quando comparada a concentração foi devido a não diferença de volume de néctar produzido pelos NEFs. Porém, foi constatada diferença na porcentagem entre os açúcares. A porcentagem significa a quantidade relativa de cada tipo de carboidrato quando comparada à quantidade total de açúcares que compõem o néctar. Portanto, o néctar apresentou menos sacarose do que glicose e frutose em termos de massa. Glicose, frutose e sacarose são comumente encontradas no néctar de várias espécies de planta (Coutinho et al. 2010; Paiva 2009). Além disso, sabe-se que a composição química do néctar afeta a identidade das formigas que visitam o NEF (Baker & Baker 1982; Heil et al. 2005), uma vez que a sacarose é extremamente atraente para muitas espécies de formigas não mutualísticas (Heil et al. 2005). Por exemplo, em *M. brasiliensis*, foram coletados indivíduos de *Cephalotes*, que é um gênero conhecido por se alimentar de diversas fontes alimentares (Andrade & Baroni-Urbani 1999). Apesar de espécies de *Cephalotes* não serem mutualísticas obrigatórias, a

sua presença na planta pode inibir ataque de potenciais herbívoros (Del-Claro et al. 1996 ; Oliveira 1997).

Tão comumente observado em outros táxons, os NEFs de *M. brasiliensis* consistem em várias camadas de pequenas células colunares e secretoras em paliçada (Elias & Gelband 1976; McDade & Turner 1997). O pré-néctar é derivado do floema localizado abaixo de algumas células de parênquima encontradas entre as células secretoras e o tecido vascular, uma vez que não foram observados cloroplastos nas células secretoras e nas células parenquimáticas que circundam o NEF, assim como não foram observados amido nas células que compõem o nectário. Portanto, o pré-néctar deve ser transportado através de células parenquimáticas até que chegue às células secretoras do NEF. Assim, podemos denominar o conjunto das células parenquimáticas abaixo das células secretoras como tecido subglandular (Wergin et al. 1975).

Como Paiva et al. (2007) descreveu para *Cedrela fissilis* (Meliaceae) e Rocha et al. (2009) para *Passiflora amethystine* (Passifloraceae), as primeiras células dos NEFs de *M. brasiliensis* se originam da protoderme que, por meio de divisão celulares, produzem um grupo de células em direção ao parênquima. Este processo ontogênico é completamente diferente do que ocorre em *Sapium biglandulosum* (Euphorbiaceae), na qual as células da protoderme e do meristema fundamental se dividem de modo assincrônico (Coutinho et al. 2010). Quando o processo de formação do NEF é concluído, as paredes do tecido subglandular tornam-se totalmente impregnadas com lignina. Simultaneamente o processo de transporte do pré-néctar é finalizado, uma vez que o tecido subglandular passa a ser uma barreira apoplástica e simplástica. A barreira apoplástica é devido à deposição de cutina, suberina ou lignina nas paredes das células sob o tecido secretor (Evert 2006; Fahn 1988; Lüttge 1971; McDade & Turner 1997; Paiva et al. 2007; Paiva & Machado 2006). Já a barreira simplástica foi demonstrada pelos estudos ultraestruturais uma vez que não foram identificados plasmodesmos fazendo a comunicação entre as células secretoras e as células do tecido subglandular. Dessa forma, quando o fluxo do pré-néctar cessa, o néctar deve ser sintetizado a partir de açúcares armazenados em vacúolos das células secretoras até o seu consumo total. Logo, a atividade secretora termina quando o pré-néctar que estava armazenado nos vacúolos se esgota totalmente.

A ultraestrutura dos NEFs ilustrou a fase final de secreção nas folhas completamente expandidas. Foram encontradas mitocôndrias, segmentos de retículo endoplasmático, complexo de Golgi, ribossomos e núcleo conspícuo com cromatina

descondensada que são características das células secretoras funcionais (Delgado et al. 2011b; Fahn 1988). Também foram observadas células do tecido subglandular com paredes espessadas. Essa alteração pode impedir o transporte de pré-néctar do floema para as células do nectário (Power & Skog 1987). As várias mitocôndrias observadas nas células secretoras são devido à demanda de ATP para o transporte ativo de exsudação do néctar que envolve ATPase como proposto por Vassilyev (2010) e/ou a síntese do néctar propriamente dito (Delgado et al. 2011b). Como plastídios não foram observados nas células secretoras, podemos inferir que a fonte de açúcar do néctar provém da seiva do floema (Rocha & Machado 2009). A presença de cromatina descondensada e ribossomos é uma evidência de que as proteínas são sintetizadas dentro das células do nectário (Alberts et al. 2002), tais como invertases, que são responsáveis pela hidrólise da sacarose da seiva do floema para frutose e glicose (Fahn 1988). O transporte do pré-néctar entre as células secretoras é feito por plasmodesmos (Fahn 1979a, 1979b) ou difusão (Vassilyev 2010). Além disso, a presença de retículo endoplasmático, complexo de Golgi e vesículas perto da membrana citoplasmática pode ser considerada um recurso de secreção granulócina (Fahn 1979b; O'Brien et al. 1996). No entanto, Vassilyev (2010) assinalou que a secreção écrina é o único mecanismo de exsudação de néctar, sendo proposto como universal e aplicável a todos os nectários. Portanto, a elucidação do mecanismo responsável pela exsudação de néctar em *M. brasiliensis* ainda precisa ser feita.

Em *Maprounea brasiliensis*, os NEFs são funcionais em folhas jovens e recentemente expandidas. Nas folhas completamente expandidas com os primeiros sinais de senescência, os NEFs param de secretar, sendo que a perda de sua funcionalidade está completamente relacionada às suas alterações estruturais. O volume de néctar provavelmente diminui à medida que a folha amadurece, porque a fonte de pré-néctar se esgota quando a ontogênese fica completa. Uma vez que o tecido vascular é essencial para manter a secreção a taxas elevadas (Frey-Wissling 1955), a barreira formada por espessas paredes lignificadas do tecido subglandular evita o transporte de pré-néctar para as células secretoras. Por isso, as formigas são encontradas patrulhando apenas folhas jovens ou recentemente expandidas onde há NEFs ativos. A presença de formigas sugere um mecanismo de defesa biótico em *M. brasiliensis* (Heil et al. 2005; Janzen 1966). Além disso, a concentração das formigas em folhas jovens é vantajosa para a planta, pois as folhas não expandidas e recentemente expandidas sofrem mais ataque de herbívoros do que folhas maduras (Heil & McKey

2003) e essas são as folhas com maior expectativa de vida útil (fotossíntese) para a planta.

Apesar dos NEFs serem um provável mecanismo de defesa indireta das plantas de *M. brasiliensis*, uma vez que folhas jovens ou recentemente expandidas possuem NEFs ativos que atraem formigas, o número de NEFs e seu diâmetro não aumentaram nas folhas novas produzidas após eventos que representassem maior pressão de dano. Por exemplo, queimadas freqüentes desencadeiam a perda de muitas folhas pelas plantas, podendo ser interpretada como alta proporção de herbivoria (Morais 2007), além de que, após cada queimada, há rápida rebrota da copa de diversas plantas com folhas tenras (Vieira et al. 1996). Por isso, era de se esperar um efeito aditivo das queimadas subseqüentes sobre a produção de NEFs e seu tamanho em plantas de *M. brasiliensis*. Entretanto, nossa hipótese foi refutada, uma vez que não observamos diferença nos atributos dos NEFs quando comparamos plantas em área controle e plantas submetidas ao histórico de fogo. Provavelmente, o estímulo de perda das folhas após queimadas a cada dois anos não seja suficiente para desencadear uma maior produção de NEFs nas folhas novas, uma vez que o fogo freqüente diminui a abundância de lepidópteros (Diniz et al. 2011) que são os herbívoros mais comuns em *M. brasiliensis*. As lagartas gregárias de *Deuterollyta chrysoderas* (Pyralidae) que causam danos importantes na planta e pelo menos outras 10 espécies de lagartas polípagas já foram registradas em folhas de *M. brasiliensis* (Diniz et al. 1999). Logo, de acordo com a predição de que as plantas que investem em atributos de defesa na ausência de herbívoros são selecionadas negativamente comparando-se com as plantas que não investem (Whittaker & Feeny 1971), plantas de *M. brasiliensis* na área com histórico de fogo não deveriam apresentar mais atributos de defesa do que plantas em áreas controle, uma vez que isso não seria uma característica evolutivamente vantajosa.

A nossa hipótese de que o número e o tamanho dos NEFs aumentariam após diferentes níveis desfolha foi também refutada, já que ramos que sofreram 100% de desfolha produziram a mesma quantidade e tamanho de NEFs nas folhas novas do que ramos que sofreram 0%, 10% e 50% de desfolha manual. É sabido que a plasticidade ou a habilidade da planta de induzir respostas é dependente do tipo de atributo estudado e dos herbívoros indutores (Bingham & Agrawal 2010), assim como do estímulo dado. Assim, como ocorreu no experimento de histórico do fogo, provavelmente, o estímulo de perda das folhas em um ramo da planta não tenha sido apropriado para desencadear

uma maior produção de NEFs nas folhas novas, sendo um estímulo sub-ótimo para resposta da planta.

Nossos resultados foram surpreendentes quando comparamos folhas produzidas na época seca e folhas produzidas na época chuvosa de *M. brasiliensis*, uma vez que esperávamos que o número e o tamanho dos NEFs seriam maiores nas folhas produzidas durante o período de maior probabilidade de herbivoria, que é o período chuvoso (Marquis et al. 2001). Entretanto, nós encontramos resultados opostos: as plantas investiram mais em defesa indireta na época seca, apresentando NEFs maiores e em maior quantidade do que na época chuvosa, quando elas investiram mais em crescimento apresentando maior área foliar. Na época seca há menor abundância de formigas arborícolas em plantas de cerrado do que na época chuvosa (Morais 1980). Portanto, a maior disponibilidade de alimento promovida pelo aumento do número e tamanho dos NEFs de *M. brasiliensis* pode aumentar a taxa de visitas dessas formigas aos nectários, possibilitando uma defesa mais efetiva no período de menor abundância de formigas. Por outro lado, as folhas produzidas na época chuvosa mesmo tendo menos NEFs já atraem uma quantidade razoável de formigas uma vez que elas são mais freqüentes na estação chuvosa (Morais 1980). Ademais, o mecanismo de defesa de *M. brasiliensis* na época chuvosa deve ser a saciação do herbívoro, com produção de folhas maiores, uma vez que na época chuvosa há maior disponibilidade de recursos que serão utilizados no crescimento da planta. Por isso, a perda de parte da folha devido à herbivoria pode não ser tão custosa para a planta. Além disso, no período seco, as plantas reduzem sua área foliar, aumentando a eficiência no uso da água (Scholz et al. 2008) já que a demanda evaporativa da atmosfera aumenta (Meinzer et al. 1999). Portanto, a diferença da área foliar entre plantas de *M. brasiliensis* que produziram folhas no período seco e plantas que produziram folhas no período das chuvas deve ser resultado de um somatório de fatores: maior abundância de insetos herbívoros (mecanismo de defesa por tolerância) e maior disponibilidade de água na estação chuvosa (maior quantidade de recursos para o crescimento).

Nesse trabalho, conclui-se que a estrutura e função de NEFs de *Maprounea brasiliensis* são determinadas pelo estágio de desenvolvimento da folha, que resulta no fim do suprimento do pré-néctar oriundo do floema às células do NEF. A consequência ecológica das mudanças anatômicas e ultraestruturais são o fim da interação mutualista planta-formiga através do NEF. Demonstramos também que a produção de néctar extrafloral é fortemente influenciada pela idade dos nectários devido a alterações

anatômicas e ultraestruturais, influenciando a presença de formigas no NEF. Além disso, provamos que NEFs de *M. brasiliensis* não são defesas induzidas em resposta a diferentes pressões de herbivoria simuladas com desfolha manual e passagem do fogo. Porém, a produção dos seus nectários é responsiva à disponibilidade de água, sendo maior na época seca e menor na época chuvosa. Por outro lado, a área foliar das folhas produzidas na época chuvosa é maior do que a área foliar das folhas produzidas na seca. Portanto, as defesas anti-herbivoria em *M. brasiliensis* variam ao longo do ano e em diferentes fases ontogênicas da folha.

Capítulo II - Atributos de defesa e de qualidade foliar de plantas de *Maprounea brasiliensis* St. Hill. (Euphorbiaceae) submetidas aos resíduos de fertilização em uma área de cerrado

RESUMO – Algumas plantas apresentam diversos tipos de defesa diretas e indiretas que em conjunto formam uma síndrome de defesa. Entretanto, parte da literatura prediz a existência de *trade-off* entre diferentes tipos de defesa devido a limitação de recursos disponíveis para crescer, reproduzir e se defender. As características ambientais também influenciam a produção de defesa pelas plantas, uma vez que a quantidade de compostos químicos secundários produzidos de base carbônica é menor em ambientes eutróficos e a produção de nectários extraflorais (NEFs) como defesa induzida é maior em áreas com mais recursos nutricionais. Plantas do cerrado são excelentes modelos para se testar a produção de defesa em diferentes condições ambientais, pois muitas delas possuem metabólitos secundários (defesas diretas) e NEFs (defesas indiretas), além de estarem sujeitas a solos distróficos e ácidos que vêm sofrendo processos de fertilização devido à ocupação agrícola. Neste estudo, nós examinamos a ocorrência de *trade-off* entre diferentes tipos de defesa e testamos os efeitos dos resíduos da fertilização nas características foliares de *Maprounea brasiliensis* St. Hill. (Euphorbiaceae) em uma área experimental de cerrado submetida à adição de nutrientes por nove anos. Atributos de qualidade da folha (área foliar, peso seco, SLA, conteúdo de água, macronutrientes, micronutrientes, C:N e N:P) e de defesa (fenólicos totais, taninos condensados e hidrolisáveis, número de NEFs/folha, comprimento total de NEF/folha, volume e qualidade do néctar) foram mensurados em folhas coletadas de plantas de *M. brasiliensis* que estavam em áreas com resíduos de fertilização de N, P e Ca e em área controle. A coleta foi realizada dois anos após a última aplicação de nutrientes. *Maprounea brasiliensis* apresentou folhas de baixo conteúdo de água e N, alta SLA e grande quantidade de compostos fenólicos, caracterizando a síndrome de baixa qualidade nutricional. Não foi encontrado *trade-off* entre os diferentes tipos de defesa (metabólitos secundários e NEFs). Resíduos de fertilização de médio prazo do cerrado alteraram características foliares de *Maprounea brasiliensis*, como concentração de nutrientes e de taninos condensados. Plantas que cresceram em parcelas com adição de P apresentaram folhas com mais nutrientes e plantas nas parcelas com N tiveram maior concentração de taninos condensados. O estudo demonstrou que *M. brasiliensis* apresenta a síndrome de “baixa qualidade nutricional”, a não existência de *trade-off* entre defesa direta e indireta e que seus atributos foliares são modificados devido à fertilização.

1. Introdução

A pressão de herbivoria exerce importante função na produção de defesas (Martin & Baltzinger 2002) que podem ser classificadas como diretas e indiretas (Ness 2003). As defesas indiretas aumentam o desempenho de inimigos naturais de herbívoros, como predadores, parasitóides e agentes patogênicos (Price et al. 1980). Por outro lado, as defesas diretas são atributos que agem diretamente contra o herbívoro (Ness 2003).

Muitas plantas apresentam mais de um atributo de defesa que pode ser positivamente correlacionado a outro. O conjunto dos atributos de defesa correlacionados positivamente constitui uma "síndrome de defesa". As síndromes de defesa podem ser de três tipos: a síndrome de defesa de "baixa qualidade nutricional" contém plantas com baixa qualidade nutricional para os herbívoros e muitos mecanismos de defesa; a síndrome "nutrição e defesas" inclui plantas com alta qualidade nutricional para os herbívoros e algumas defesas; e a síndrome de defesa do tipo "tolerante" compreende plantas tolerantes à herbivoria (Agrawal & Fishbein 2006). A presença de síndrome de defesa na planta pode ser adaptativamente vantajosa devido à imprevisibilidade ambiental (Koricheva et al. 2004). Por outro lado, produzir várias defesas pode ser metabolicamente custoso (Boege & Dirzo 2004; Mole 1994; Pullice & Packer 2008), podendo haver *trade-off* entre diferentes tipos de defesa (Koricheva 2002). Como parte do recurso disponível para crescer e reproduzir é alocado para defesa, o que caracteriza a "Hipótese do Equilíbrio entre Crescimento e Diferenciação" (Herms & Mattson 1992; Strauss et al. 2002), a produção de diferentes tipos de defesas pode não ser adaptativa, dependendo da pressão de seleção.

Além das condições inerentes à planta, diversos fatores ambientais, tais como disponibilidade de nutrientes, também influenciam a produção de defesa (Bryant et al. 1988; Stamp 2003). A "Hipótese do Equilíbrio entre Carbono: Nutriente" prevê que o montante de compostos secundários produzidos de base carbônica depende dos nutrientes disponíveis para as plantas. Por exemplo, plantas que crescem em solos pobres em nutrientes produzem mais metabólitos secundários, como taninos condensados, e plantas que crescem em solos férteis investem mais na produção de biomassa, diminuindo a alocação de recursos para defesa química (Bryant et al. 1983). Porém, a produção de outro tipo de defesa que não seja metabólitos secundários de base carbônica, como nectários extraflorais (NEFs), pode ser positivamente correlacionada

com disponibilidade de nutrientes, sendo dependente de recursos adicionais (Mondor et al. 2006).

O cerrado é considerado uma das mais ricas savanas tropicais do mundo (Coutinho 2002), apresentando estrato herbáceo muito diversificado e flora arbórea com características peculiares (Brandão 2000). Suas plantas estão expostas à alta irradiância, altas temperaturas, baixa umidade relativa do ar e déficit hídrico durante a estação seca (Franco & Lüttge 2002) e a solos usualmente bem drenados, com alta concentração de argila e alumínio e baixa disponibilidade de nutrientes (Furley & Ratter 1988). No cerrado, a presença de solos pobres, ácidos, distróficos (Haridasan 2000) e com alta concentração de Al (Franco 2002; Franco et al. 2005) influencia os atributos de defesa de muitas plantas (Gonçalves-Alvim et al. 2006; Gonçalves-Alvim et al. 2011). A “Hipótese do Escleromorfismo Oligotrófico e Aluminotóxico” (Goodland & Ferri 1979) prediz que folhas espessas e rígidas com grande quantidade de tecidos mecânicos, (Sarmiento & Monasterio 1975; Sobrado & Medina 1980), baixos níveis de nitrogênio e água e alta quantidade de taninos (Marquis et al. 2002) são adaptações encontradas em plantas do cerrado devido aos baixos níveis de nutrientes no solo e à toxidez por alumínio. Estas características são conhecidas como escleromorfismo (Goodland & Ferri 1979) e caracterizam a síndrome de "baixa qualidade nutricional" comumente encontrada em plantas nativas do cerrado (Marquis et al. 2001). Além desses tipos de defesas, mais de 25% das espécies lenhosas da flora do cerrado possuem NEFs (Oliveira & Leitão-Filho 1987) que podem desempenhar funções anti-herbivoria (Del-Claro et al. 1996; Oliveira & Freitas 2004).

Apesar do cerrado ser megadiverso (Mantovani & Martins 1993), sua destruição devido à ação antrópica vem ocorrendo paulatinamente. O cerrado brasileiro apresenta enorme importância para a agricultura, sendo intenso o uso de adubos químicos devido à baixa fertilidade dos solos presentes nestas áreas (Cavalcanti & Joly 2002; Klink & Moreira 2002). Tanto a fertilização quanto as diferentes fontes dos fertilizantes podem alterar algumas características do solo distrófico, como aumentar a acidez e a disponibilidade de Al nas áreas com adição de sulfato de amônio (Alcarde 2007; Jacobson et al. 2011), aumentar o pH e a concentração de Al nas áreas com adição de calcário e aumentar a disponibilidade de fósforo e cálcio em áreas com aplicação de superfosfato simples (Jacobson 2009). Tais modificações das características do solo podem resultar em alterações dos atributos foliares das plantas nativas do cerrado (Jacobson et al. 2011). Além dessas modificações resultantes da fertilização direta de

áreas de cerrado para a agricultura, resíduos de fertilização prévia nas áreas degradadas em processo de recuperação natural também podem modificar as características do solo e atributos foliares das plantas nativas que crescem no local.

Neste estudo, nós testamos os efeitos dos resíduos de fertilização nas características de qualidade e defesa de folha em *Maprounea brasiliensis* St Hill (Euphorbiaceae) em uma área experimental de cerrado submetida anteriormente à adição de nutrientes por nove anos. Tivemos como objetivo responder as seguintes questões: (1) *M. brasiliensis* apresenta um conjunto de atributos foliares que caracteriza uma síndrome de defesa? Em caso afirmativo, (1.2) Qual é esta síndrome? (2) Existe *trade-off* entre defesas indiretas (NEF) e defesas diretas (compostos fenólicos totais, condensado e taninos hidrolisáveis)? (3) Após um período sem adição de nutrientes, resíduos de fertilizações em área de cerrado alteraram as características de qualidade e defesa em folhas de *M. brasiliensis*? Em caso afirmativo, (3.1) resíduos de adição regular de sulfato de amônio aumentam a quantidade de compostos fenólicos totais e taninos? Resíduos de calcário e de superfosfato simples diminuem a quantidade de compostos fenólicos totais e taninos? E (3.2) resíduos de adição regular de nutrientes aumentam defesas indiretas (número, tamanho e concentrações de açúcares em NEFs) em folhas de *M. brasiliensis*?

As hipóteses testadas ao longo do estudo foram (Figura 1): (1) *M. brasiliensis*, por ser uma planta típica de cerrado, tem como síndrome de defesa a "baixa qualidade nutricional"; (2) *M. brasiliensis* apresenta *trade-off* entre produção de NEFs e de metabólitos secundários, apoiando a "Hipótese do Equilíbrio entre Crescimento e Diferenciação"; (3) resíduos de adubações regulares alteram as características foliares de *M. brasiliensis* devido às modificações das características do solo, pois as causas do escleromorfismo foliar (Hipótese do Escleromorfismo Oligotrófico) são intensificadas com adição de sulfato de amônio e mitigadas com adição de calcário e superfosfato simples; (4) De acordo com a "Hipótese do Equilíbrio entre Carbono: Nutriente", a quantidade de compostos fenólicos totais e taninos aumentam nas áreas com menor disponibilidade de nutrientes (distróficas) e diminuem nas áreas com maior disponibilidade de nutrientes (eutróficas); (5) De acordo com a Hipótese de que uma maior produção de NEFs é dependente de recursos adicionais, as plantas de *M. brasiliensis* presentes nas áreas experimentais apresentam mais NEFs e ou maiores concentrações de açúcares do que as plantas presentes nas áreas controle.

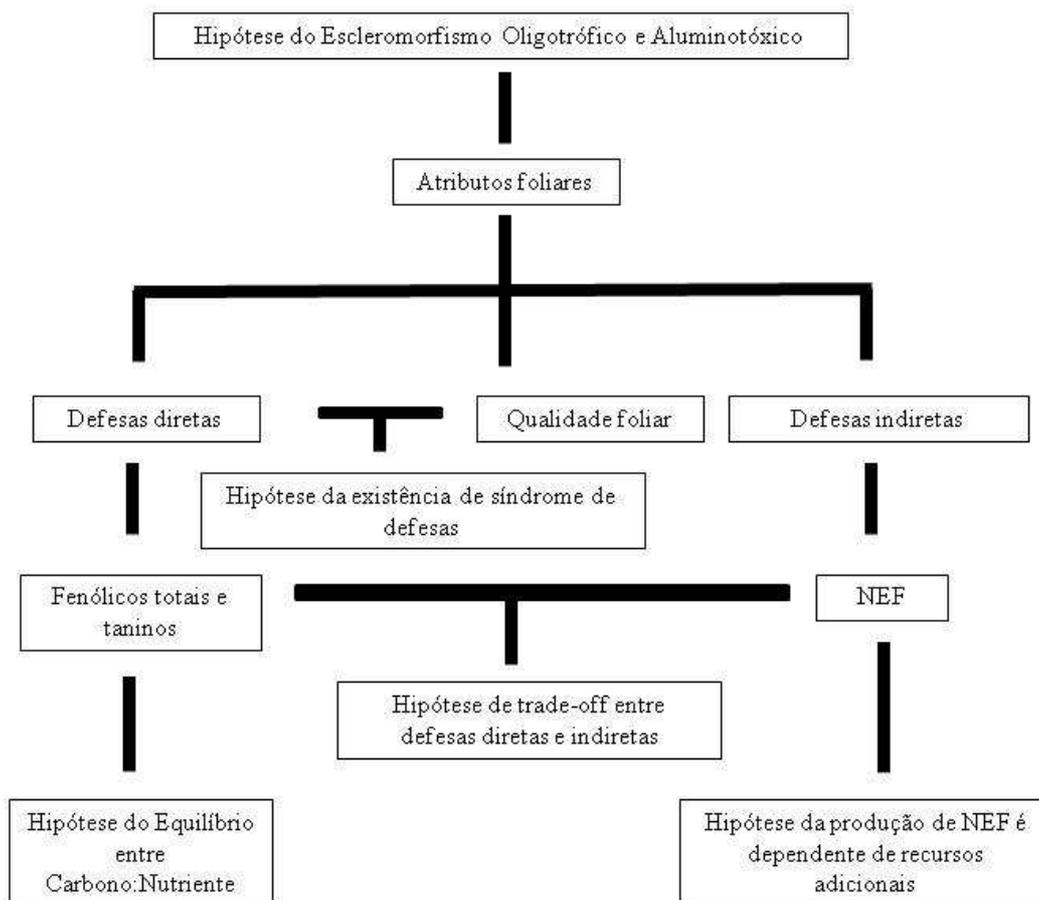


Figura 1. Diagrama das hipóteses testadas em plantas de *Maprounea brasiliensis* presentes em uma área de experimento com adição de nutrientes durante nove anos seguidos a um intervalo de dois anos sem fertilização.

2. Materiais e Métodos

Área de estudo, espécie estudada e coleta de dados no campo

Esta pesquisa foi conduzida na Reserva Ecológica do IBGE (15°56'S; 47°53'N), região do Centro Oeste do Brasil. O clima regional é Aw pela classificação de Köppen com uma estação seca de maio a setembro e uma estação chuvosa de outubro a abril (Ab'Saber 1983). O tipo predominante da vegetação é o cerrado que se caracteriza por um estrato herbáceo com gramíneas e um estrato lenhoso descontínuo com árvores e arbustos esparsos (Eiten 1972). O solo é do tipo latossolo, sendo profundo e bem drenados com alto conteúdo de óxidos de Fe e Al (Motta et al. 2002) e baixa concentração de nutrientes disponíveis para as plantas, como P, Mg, K e Ca (Haridasan 2000).

Maprounea brasiliensis é um arbusto pequeno, perene e endêmico do cerrado (Hans-Joach 1999), com dois a cinco NEFs nas bases das folhas (Senna 1984). Algumas folhas também apresentam NEFs no ápice. Os NEFs tanto da base quanto do ápice

foliar já foram caracterizados anatomicamente e ultraestruturalmente (Capítulo 1). O principal herbívoro de *M. brasiliensis* é uma lagarta gregária, *Deuterollyta chrysoderas* (Dyar 1917) (Pyralidae), localmente monófaga (Diniz *et al.* 1999). As lagartas constroem abrigos tubulares com fezes e material vegetal em vários ramos de um indivíduo e, ainda que não muito freqüentes, causam danos consideráveis na planta, pois os grupos normalmente são compostos por mais de 50 lagartas. Seu principal fungo patogênico é *Coleosporium maprouneae* (P. Henn.) n. comb. (Uredinales), frequentemente observado nas folhas onde causa lesões avermelhadas (Viégas 1945).

Os dados do presente trabalho foram coletados em 2009 em uma área experimental onde foi feita adição de nutrientes durante nove anos, de 1999 a 2006 (Jacobson 2009). O desenho experimental foi do tipo completamente casualizado, com quatro tratamentos, sendo três com adição de nutrientes (N, P e Ca) e um controle. Cada tratamento tinha quatro replicações em parcelas de 225 m², separadas pelo menos 10 m de distância. O grupo controle foi formado por parcelas com nenhuma aplicação de adubos. Nas parcelas com adição de N foi aplicado 100 kg.ha por ano de sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄; nas parcelas com adição de P foi aplicado 100 kg ha por ano de superfosfato simples (superfosfato simples 20% - Ca (H₂PO₄)₂ + .2H₂O CaSO₄) e nas parcelas com adição de Ca foi aplicado 4 t.ha por ano de Ca como calcário dolomítico e gesso (60% de calcário dolomítico ((CaO + MgO) + 40% de gesso (CaSO₄.2H₂O)). Os nutrientes eram aplicados sobre a serrapilheira duas vezes por ano, exceto a adição de Ca que foi feita apenas uma vez por ano (para mais detalhes, ver Jacobson 2009).

Em outubro de 2009, ramos de *M. brasiliensis* foram ensacados com plástico durante 96 horas para excluir a visita de formigas aos NEFs e para obter néctar suficiente para a coleta. O néctar foi coletado em cinco plantas por tratamento, sendo quatro NEFs por planta. O néctar foi coletado com uma seringa de 0,5 ml, diluído em 500 µl de água destilada e armazenado em eppendorf dentro de nitrogênio líquido. No laboratório, as amostras foram mantidas a -80°C. Após a coleta do néctar, 20 folhas de 15 plantas distribuídas aleatoriamente em cada tratamento foram coletadas. Dessas folhas, dez foram congeladas em nitrogênio líquido imediatamente após a coleta e foram mantidas a -80°C a fim de se evitar a perda de taninos, depois foram liofilizadas e conservadas novamente a -80°C. As outras folhas foram mantidas refrigeradas para evitar degradação e perda de água e a medida dos atributos foliares foi feita logo após a coleta.

Análises dos atributos de qualidade e defesa da folha

Os atributos foliares mensurados foram: número e tamanho (diâmetro) dos NEFs, largura e área foliar, peso fresco e seco, conteúdo de água, SLA, macronutrientes (N, P, Ca, K, S, C e Mg), micronutrientes (Mn, B e Cu), C:N, N:P e metabólitos secundários (fenólicos totais, taninos condensados e hidrolisáveis). As características do néctar analisadas foram: concentração de glicose, frutoses, rafinose, sacarose e açúcares totais.

O número e o diâmetro dos NEFs, largura e área foliar, peso fresco e seco, conteúdo de água e SLA foram determinados em três folhas de cada indivíduo, sendo no total 15 indivíduos por tratamento. O número de NEFs e seu diâmetro foram mensurados com o auxílio de um microscópio com uma escala acoplada na ocular. A área da folha foi determinada por regressão cuja largura que variou de 3.2 - 5.5 cm correspondia ao X. A equação (área foliar = $(8.35 \cdot \text{largura foliar}) - 16.76$) cujo $R^2 = 0.806$, foi determinada em 30 folhas de 30 plantas presentes em vegetação de cerrado não modificada, sendo que a área foliar foi obtida pelo desenho da folha em um papel quadriculado. Para a mensuração do peso fresco e seco, um disco foliar de mesma área (raio = 0.3 cm) foi pesado em balança de precisão (0.001g) antes e depois de seco em estufa a 60°C por 72 horas. A porcentagem do conteúdo de água foi medida pela fórmula $((\text{peso fresco} - \text{peso seco}) / \text{peso fresco}) \cdot 100$. A SLA (área foliar/ peso seco da folha, Cornelissen et al. 2003), foi determinada em folhas que foram totalmente secas em estufa a 60°C por 72 horas e posteriormente pesadas em balança de precisão.

A fim de se determinar macro e micronutrientes por peso seco, 10 folhas por indivíduo, sendo no total 15 indivíduos, foram secas em estufa a 60°C por 72 horas e transformadas em pó. K, P, S, Ca, Mg, Mn e Cu foram extraídos por digestão nitro-perclórica, N por digestão com ácido sulfúrico e B por inceneração. A quantificação de K, Ca, Mg, Mn e Cu foi feita por espectrometria de absorção atômica, a de P, B e S foi realizada por espectrometria óptica e a quantificação de N foi feita por destilador de Kjeldahl. A razão C:N foi calculada como um indicador de qualidade nutricional (Bryant et al. 1983; Lenza & Klink 2006) e a razão N:P foi calculada como um indicador de qual nutriente era mais limitante (Wright et al. 2010).

A fração do peso total de fenólicos totais foi determinada em 10 folhas por indivíduo, sendo no total 15 indivíduos, por Folin-Denis (Waterman & Mole 1994), a de taninos condensados pelo teste do ácido butanol (Rossiter et al. 1988; Waterman & Mole 1994) e a de taninos hidrolisáveis pelo ensaio com iodeto de potássio (Schultz &

Baldwin 1982). O padrão foi obtido pela purificação do extrato aquoso com várias lavagens em etanol a 95% seguida por lavagens em solução aquosa de acetona a 70% em um Sephadex LH-20 com um funil de Büchner. A acetona foi removida por evaporação rotativa e o extrato aquoso foi liofilizado para a obtenção dos taninos. A absorção em cada ensaio foi determinada por cromatografia (Molecular Devis – VERSA max). A concentração de taninos e fenólicos totais foi calculada com o Software Softmax Pro, utilizando a curva obtida com o padrão.

A composição de carboidratos no néctar extrafloral foi determinada pelo cromatógrafo de íons (Dionex) integrado ao modelo ICS3000 de HPAEC-IPAD com coluna para detecção de carboidratos (CarboPac™ PA10, 2 X 250 mm). Foi usado como eluente solução aquosa de 200 mM de NaOH. As concentrações dos carboidratos (glicose, frutose, sacarose e rafinose) e de açúcar total foram calculadas com o Software de Chromeleon através de uma curva padrão nas seguintes concentrações: 0.625, 1,25, 2.5, 5.0 e 10.0 µM.

Análises estatísticas

Os dados obtidos foram agrupados em atributos de qualidade foliar e atributos de defesa. Os atributos de qualidade foliar foram: a média de área foliar, SLA, peso seco e porcentagem do conteúdo de água em três folhas por indivíduo; a média de porcentagem por massa seca (mg/g) para P, N, K, Ca, Mg, S e Cu e ppm (mg/Kg) por massa seca de Mn, Cu, B e C:N, N:P de 10 folhas por indivíduo. Os atributos de defesa foram: a média do número NEF por folha (NEF) e a média do diâmetro total de NEF por folha (\sum DIAM) de três folhas por indivíduo; a média da concentração (µM) de glicose, frutose, sacarose, rafinose e açúcar total do nectar e a média da porcentagem de glicose, frutose, sacarose, rafinose em relação ao açúcar total mensurados em quatro NEFs por indivíduo quando possível e a fração pelo peso total de compostos fenólicos totais, taninos condensados e taninos hidrolisáveis mensurada em 10 folhas por indivíduo. Para todos os dados foi calculado o desvio padrão.

A normalidade de dados e a homogeneidade da variância foram testadas por Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente ($\alpha = 0.05$). Quando necessário e se possível, os dados foram transformados, usando raiz quadrada e arco-seno. Análise de variância multivariada (MANOVA) foi utilizada para quantificar as diferenças entre os tratamentos de adição de nutrientes com teste de Tukey a posteriori. Usamos testes não

paramétricos (teste de Kruskal-Wallis, com valor de p de comparações múltiplas) nos dados que não conseguimos transformar ou naqueles que não obtivemos homogeneidade de variância. Alguns pares de atributos de defesa, como a média do número NEFs por folha (NEF), a média do comprimento total de NEF por folha (Σ DIAM) e concentração de fenólicos totais, taninos condensados e taninos hidrolisáveis foram analisados pelo teste de correlação de Spearman, utilizando-se apenas o grupo controle. Os valores da concentração de glicose, frutose, sacarose, rafinose e açúcar total não foram usados na análise de correlação, uma vez o número de indivíduos analisados por tratamento foi diferente do número de indivíduos analisados para os outros atributos. Além de fazer ANOVA tipo III com os dados de concentrações (μ M) de cada açúcar (glicose, frutose, sacarose, rafinose e açúcar total) em cada tratamento, as porcentagens de glicose e sacarose em relação ao açúcar total foram analisadas pelo teste de MANOVA tipo III e as porcentagens de sacarose e rafinose em relação ao açúcar total foram testadas pelo teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância foi de 5%. O software utilizado nas análises estatísticas foi o Statistica 7.0.

3. Resultados

Foram observadas nas folhas de *Maprounea brasiliensis* coletadas no grupo controle a razão média de C:N de 43.075 ± 5.420 , conteúdo de água de 16 ± 6.400 , SLA de 90.620 ± 20.860 e metabólitos secundários como fenólicos totais (0.278 ± 0.022) e taninos condensados (2.766 ± 0.920 mg/g) e hidrolisáveis (0.002 ± 0.919 mg/g). Tais atributos foliares caracterizaram a síndrome de "baixa qualidade nutricional" contra herbívoro e são comparáveis aos valores de outras espécies de cerrado (Tabela 1). Além disso, suas folhas possuíam NEFs que são defesas indiretas das plantas.

Tabela 1. Atributos de qualidade foliar de espécies do cerrado com a síndrome de defesa de "baixa qualidade nutricional" - ($\bar{x} \pm DP$)

| Espécies | Família | C:N | Conteúdo de água | SLA | Taninos condensados |
|--|---------------|---------------|------------------|-----------------|---------------------|
| <i>Maprounea brasiliensis</i> | Euphorbiaceae | 43.070 ± 5.42 | 16 ± 6.4 | 90.620 ± 20.860 | 2.766 ± 0.920 |
| <i>Pera glabrata</i> (Schott) Poepp. ex Baill.* | Euphorbiaceae | 31 ± 2 | 20 ± 0 | 74 ± 9 | 1 |
| <i>Byrsonima verbascifolia</i> (L.) DC.* | Malpighiaceae | 40 ± 7 | 25 ± 7 | 74 ± 7 | 1 |
| <i>Ouratea spectabilis</i> (Mart. ex Engl.) Engl.* | Ochnaceae | 32 ± 7 | 22 ± 5 | 63 ± 12 | 1 |

*- dados retirados da literatura (Silva & Batalha 2011).

Não foi constatado *trade-off* entre defesas indiretas (atributos dos NEFs) e defesas diretas (metabólitos secundários) nas plantas do grupo controle (Tabela 2).

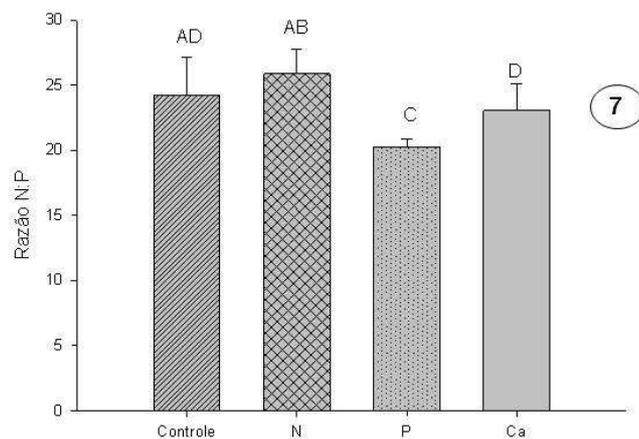
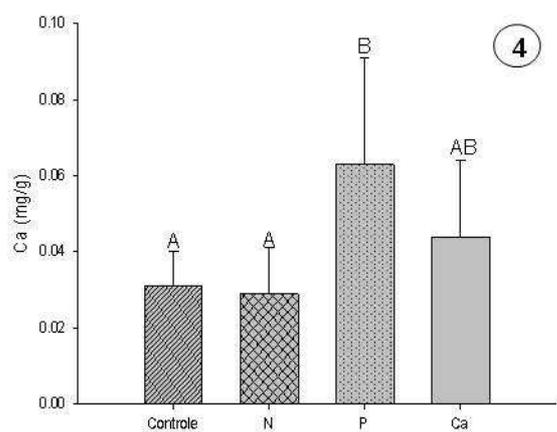
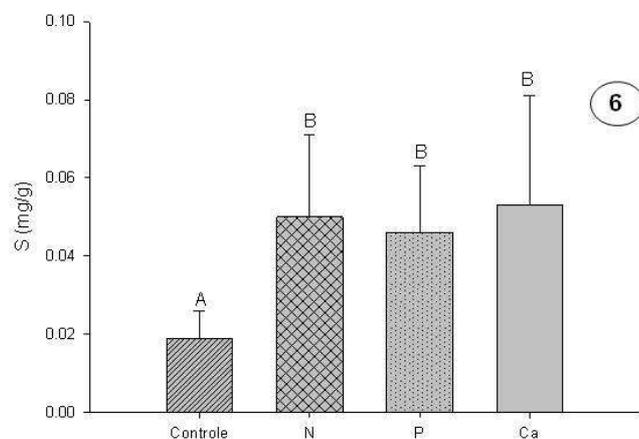
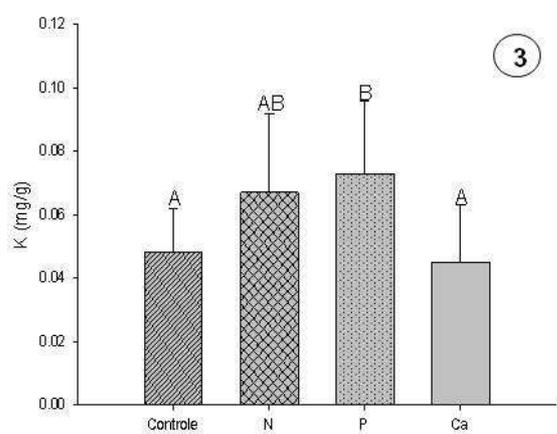
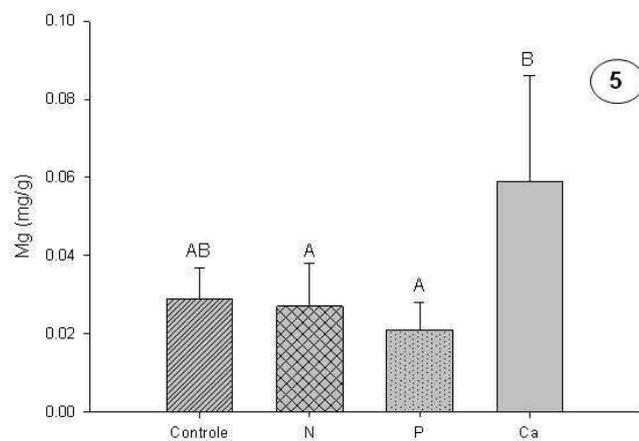
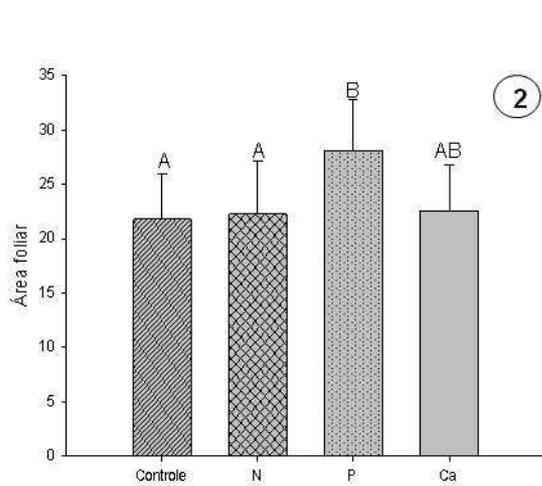
Tabela 2. Índice de correlação de Spearman entre atributos de defesa direta e indireta em *Maprounea brasiliensis* (n = 60, $\alpha = 0.05$) em área de cerrado do Distrito Federal.

| Defesa direta | Defesa indireta | |
|-----------------------|---------------------------------|--|
| | Média do número de NEFs / folha | Média do comprimento total de NEFs / folha |
| Fenólicos totais | 0.42 | 0.26 |
| Taninos condensados | 0.39 | 0.40 |
| Taninos hidrolisáveis | 0.28 | 0.08 |

Números em negrito são diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

Apesar da não adição de nutrientes durante dois anos, algumas características de qualidade foliar de *M. brasiliensis* foram alteradas devido aos resíduos da fertilização regular a médio prazo. A maior área foliar (Figura 2) foi observada em plantas das parcelas com adição de P do que em plantas no controle. Comparando todos os tratamentos com controle, plantas que cresceram em parcelas com adição de P apresentaram folhas com mais nutrientes do que as plantas dos outros tratamentos. Por outro lado, as plantas das parcelas com N apresentaram mesma concentração de nutrientes do que as plantas controle, exceto para S (Figura 6). A concentração de K (Figura 3) e de Ca (Figura 4) foi maior em indivíduos que cresceram em parcelas com adição de P do que nas parcelas controles. A concentração de Mg (Figura 5) foi maior nas plantas das parcelas do Ca do que nas parcelas de N e P, enquanto a menor

concentração de S (Figura 6) foi encontrada nas parcelas do controle. A razão N:P (Figura 7) foi menor nas plantas das parcelas de P, seguida pelas plantas das parcelas de Ca, do que em todos os outros tratamentos. A menor concentração de Mn (Figura 8) foi encontrada em parcelas de Ca. A concentração de Cu (Figura 9) foi maior em plantas das parcelas do Ca do que em plantas das parcelas de P. A menor concentração de B (Figura 10) foi encontrada nas parcelas de P. Não houve nenhuma diferença significativa no peso seco, conteúdo de água, SLA, concentração de N, P e C e na razão C:N entre as plantas de todos os tratamentos.



Figuras 2-4: Atributos de qualidade de folhas de *Maprounea brasiliensis* em quatro tratamentos com resíduos de adição de nutrientes. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo $p < 0.05$. Barras representam o desvio padrão. **2.** Área foliar. **3.** K em porcentagem (mg/g) por matéria seca de folhas. **4.** Ca em porcentagem (mg/g) por matéria seca de folhas.

Figuras 5-7: Atributos de qualidade de folhas de *Maprounea brasiliensis* em quatro tratamentos com resíduos de adição de nutrientes. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo $p < 0.05$. Barras representam o desvio padrão. **5.** Mg em porcentagem (mg/g) por matéria seca de folhas. **6.** S em porcentagem (mg/g) por matéria seca de folhas. **7.** Razão N:P.



Figuras 8-10: Atributos de qualidade de folhas de *Maprounea brasiliensis* em quatro tratamentos com resíduos de adição de nutrientes. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo $p < 0.05$. Barras representam o desvio padrão. **8.** Mn em ppm (mg/Kg) por matéria seca de folhas. **9.** Cu em ppm (mg/Kg) por matéria seca de folhas. **10.** B em ppm (mg/Kg) por matéria seca de folhas.

Algumas diferenças nos atributos de defesa também foram observadas devido aos resíduos oriundos dos tratamentos de adição de nutrientes. Por exemplo, a maior concentração de taninos condensados (Figura 11) foi encontrada em parcelas N, enquanto a menor concentração foi encontrada em plantas das parcelas controle e com adição de Ca. Entretanto, não existiu diferença significativa no número de NEFs por folha (NEF), na média do diâmetro total do NEFs por folha (\sum DIAM), bem como na concentração de compostos fenólicos totais e taninos hidrolisáveis entre as plantas de todos os tratamentos. Também não foi encontrada diferença significativa na concentração de glicose, frutose, sacarose, rafinose e açúcar total do néctar extrafloral entre os tratamentos (Tabela 3) e na porcentagem de glicose, frutose, sacarose e rafinose em relação ao açúcar total (Tabela 4).

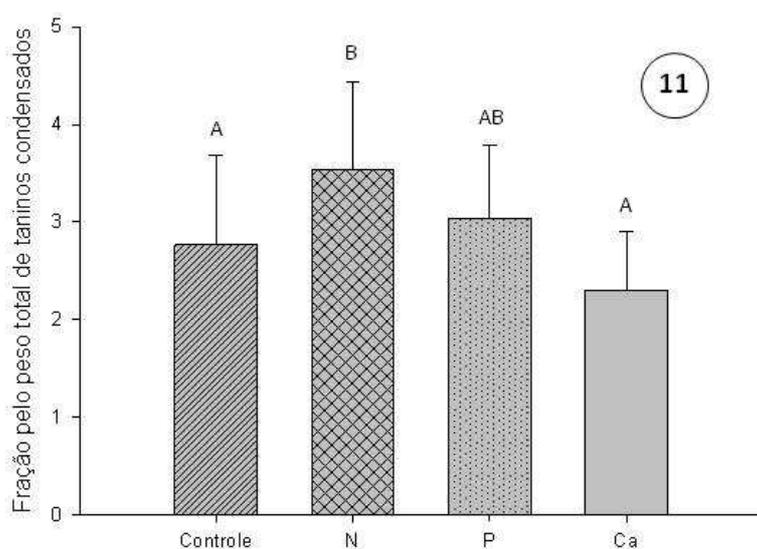


Figura 11: Atributo de defesa das folhas de *Maprounea brasiliensis* em quatro tratamentos com resíduos de adição de nutrientes: concentração de taninos condensados. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo $p < 0.05$. Barras representam o desvio padrão.

Tabela 3. Concentrações de açúcares ($x \pm DP$) do néctar extrafloral de *M. brasiliensis* em quatro tratamentos de adição de nutrientes e em parcela controle, em área de cerrado do Distrito Federal.

| Atributos de defesa | Tratamentos | | | | | | |
|---------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------|-------|-------|
| | Controle | N | P | Ca | F* | H** | p |
| Glicose | 6.133 ± 3.067 | 7.682 ± 5.729 | 3.930 ± 6.147 | 0.874 ± 1.002 | 1.010 | | >0,05 |
| Frutose | 5.998 ± 2.838 | 8.044 ± 5.930 | 4.38 ± 5.071 | 1.043 ± 0.949 | 1.010 | | >0,05 |
| Sacarose | 4.912 ± 3.229 | 4.906 ± 3.562 | 3.425 ± 2.494 | 1.064 ± 0.996 | 1.010 | | >0,05 |
| Rafinose | 0.548 ± 1.096 | 0.000 | 0.038 ± 0.086 | 0.052 ± 0.074 | | 2.976 | >0,05 |
| Açúcar total | 17.591 ± 8.476 | 11.756 ± 13.291 | 11.756 ± 13.291 | 11.756 ± 13.291 | 1.010 | | >0,05 |

As concentrações de glicose, frutose, sacarose, rafinose e açúcar total do néctar extrafloral estão em μM . N = 18, $\alpha = 0.05$, MANOVA seguido pelo teste de Tuckey * ou Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Mann-Whitney **

Tabela 4. Porcentagem de açúcares ($x \pm DP$) do néctar extrafloral de *M. brasiliensis* em quatro tratamentos de adição de nutrientes e em parcela controle, em área de cerrado do Distrito Federal.

| Atributos de defesa | Tratamentos | | | | | | |
|---------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-------|-------|-------|
| | Controle | N | P | Ca | F* | H** | p |
| % Glicose | 0.346 ± 0.043 | 0.326 ± 0.094 | 0.218 ± 0.145 | 0.213 ± 0.142 | 0.891 | | >0,05 |
| % Frutose | 0.341 ± 0.033 | 0.383 ± 0.040 | 0.406 ± 0.203 | 0.418 ± 0.101 | 0.891 | | >0,05 |
| % Sacarose | 0.264 ± 0.045 | 0.290 ± 0.108 | 0.406 ± 0.269 | 0.418 ± 0.191 | | 0.895 | >0,05 |
| % Rafinose | 0.049 ± 0.098 | 0.000 | 0.013 ± 0.03 | 0.038 ± 0.078 | | 3.313 | >0,05 |

N = 18, $\alpha = 0.05$, MANOVA seguido pelo teste de Tuckey * ou Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Mann-Whitney **

4. Discussão

Em *Maprounea brasiliensis* encontramos atributos que demonstraram que ela possui a síndrome de "baixa qualidade nutricional", porque suas folhas têm baixo conteúdo de água e N, baixa SLA, bem como alta quantidade de compostos fenólicos (Marquis et al. 2002). Portanto, nossa hipótese de que *M. brasiliensis*, por ser uma espécie típica de cerrado, tem como síndrome de defesa a "baixa qualidade nutricional" foi corroborada. Tal afirmação é confirmada quando comparamos os dados foliares de *M. brasiliensis* com um estudo de defesa anti-herbívoria em uma comunidade de cerrado (Silva & Batalha 2011). De acordo com o trabalho de Silva & Batalha (2011), *M. brasiliensis* pode ser agrupada ao grupo 4 (estratégia de baixa qualidade nutricional), junto com *Pera glabrata* (Schott) Poepp. ex Baill. cuja família é também Euphorbiaceae e com *Ouratea spectabilis* (Mart. ex Engl.) Engl. (Ochnaceae) e *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC. (Malpighiaceae) que compõem a mesma ordem Malpighiales (Tabela 1). No entanto, *M. brasiliensis* está agrupada com outras espécies não

relacionadas filogeneticamente. Portanto, esses atributos foliares não são determinados pela filogenia (Silva & Batalha 2011). Provavelmente, os danos foliares devido a herbivoria e a patógenos (Marquis et al. 2001; Silva & Batalha 2011) e a presença de solos ácidos e pobres em nutrientes (Gonçalves-Alvim et al. 2006) são os dois filtros ambientais que influenciam os atributos foliares de *M. brasiliensis*.

A pressão de herbivoria e de patógenos pode ser um importante fator seletivo em atributos foliares de *M. brasiliensis*. Quando presentes, as lagartas gregárias de *Deuterollyta chrysoderas* causam danos severos na planta, uma vez consomem muitas folhas, e pelo menos outras 10 espécies de lagartas polípagas já foram registradas utilizando folhas de *M. brasiliensis* (Diniz et al. 1999). Na área de estudos o ataque de um fungo patogênico é comum nas folhas de *M. brasiliensis*. O ataque de patógenos é comum em folhas de plantas de cerrado e compostos fenólicos são defesas tanto contra herbívoros quanto patógenos (Marquis et al. 2001). Assim, tanto a herbivoria quanto o ataque de patógenos, aliados a um solo pobre, podem exercer pressão seletiva na composição e nas concentrações de compostos fenólicos nessa planta.

Ademais, os atributos de qualidade e de defesa nas folhas de *M. brasiliensis* podem influenciar de várias maneiras o *fitness* dos insetos herbívoros. Os taninos condensados diminuem a qualidade nutricional da folha e os taninos hidrolisáveis são tóxicos para herbívoros (Makkar et al. 2007). Os NEFs são visitados por predadores, especialmente formigas, e por parasitóides que podem reduzir o ataque de herbívoros, diminuindo suas frequências ou tempo de permanência nas plantas (Gentry 2003; Rico-Gray & Oliveira 2007; Schoereder et al. 2010). Além dos compostos fenólicos e NEFs, folhas de *M. brasiliensis* tem alta razão C:N, o que é um indicador de baixa qualidade nutricional, e defesas estruturais como baixa SLA e elevado peso seco. De uma maneira geral, essas são características comuns em plantas lenhosas de cerrado (Marquis et al. 2001; Silva & Batalha 2011).

A hipótese da existência de um *trade-off* entre defesa indireta e defesa direta, representadas respectivamente pelos atributos relacionados aos NEFs e pelos compostos fenólicos, foi refutada. Tal hipótese prediz que existe uma compensação entre os tipos de defesa devido à limitação de recursos (Bingham & Agrawal 2010). Como afirmado por Koricheva et al. (2004), as plantas podem possuir numerosos tipos de defesa, sem apresentar consideráveis *trade-off*. Do ponto de vista da planta, é vantajoso apresentar tanto taninos quanto NEFs, pois essas podem ser estratégias defensivas complementares. Defesas químicas de base carbônica são frequentemente eficazes

contra herbívoros generalistas (Wittstock & Gershenson 2002) e fungos patogênicos (Marquis et al. 2001). O mesmo ocorre com NEFs que, aliados a voláteis das plantas (Heil 2011), podem aumentar rapidamente o recrutamento de inimigos naturais. Resta saber como estas defesas atuam no principal herbívoro e patógeno de *M. brasiliensis*, e quão tolerante a planta é aos danos causados por esses organismos.

Em *M. brasiliensis*, alguns atributos de qualidade foliar e de defesa sofreram alteração depois de nove anos de fertilização seguidos por dois anos sem adição de nutrientes, sendo que diferentes tipos de nutrientes adicionados ao solo resultaram em diferentes consequências nos atributos foliares. Tal resultado ratificou nossa hipótese de que resíduos de adubações regulares alteram as características foliares de *M. brasiliensis*. Como todos os adubos utilizados tinham sulfato em suas fórmulas (ver Métodos), plantas que cresceram nas parcelas com P, N e Ca apresentaram mais S nas folhas do que plantas das parcelas do controle. Plantas encontradas em parcelas de Ca tinham a maior concentração de Mg devido ao calcário dolomítico e plantas que estavam nas parcelas com adição de P apresentaram mais Ca do que as plantas nas parcelas com N, por causa do superfosfato simples. As modificações desses atributos de qualidade foliar ocorreram por causa de modificações nas características do solo (Jacobson et al. 2011). Conforme relatado por Jacobson (2009) e Jacobson *et al.* (2011), nas parcelas com adição de N, o solo tornou-se mais ácido e com maior concentração de Al. A disponibilidade de Ca foi aumentada em solos das parcelas com Ca e P e a concentração P aumentou no solo das parcelas com adição de P. O pH e a concentração Mg aumentaram assim como a concentração de K e Al diminuiu em solos com adição de Ca. Como nosso estudo foi feito depois de dois anos do estudo de Jacobson (2009), podemos inferir que a disponibilidade de P não estava mais elevada durante nossas coletas, porque o fosfato antes disponível no solo já devia estar ligado aos óxidos de Fe e Al (Motta et al. 2002). Tal inferência pode ser justificada pelas constantes e intensas aplicações de P nos solos de cerrado agrícolas (Motta et al. 2002) com o intuito de manter sua alta disponibilidade para plantas. Esse fato explica porque não foi encontrada diferença na concentração de P nas folhas entre as parcelas com adição prévia de P e outras parcelas do experimento. Entretanto, nós encontramos a menor proporção de N:P nas plantas das parcelas com aplicação de P. Como não houve nenhuma mudança na concentração N entre os tratamentos, a diferença na relação N:P se deve à maior absorção de P nas parcelas com P, apesar da inexistência de variação em números absolutos de P entre os tratamentos.

De acordo com Jacobson (2009), a consequência mais importante do experimento de fertilização regular a médio prazo foi a acidificação dos solos e o aumento da concentração de Al nas parcelas com N, a neutralização da acidez dos solos nas parcelas com adição de Ca, diminuindo a quantidade de Al, e o aumento da concentração de Ca nas parcelas com adição de Ca e P. Assim, podemos inferir que os solos das parcelas com N, com adição de sulfato de amônio, tornaram-se mais distróficos do que os solos dos outros tratamentos, uma vez que eles ficaram mais ácidos (Goodland & Ferri 1979; Jacobson et al. 2011). A “Hipótese do Escleromorfismo Oligotrófico” sugere que a presença de alguns atributos escleromórficos nas plantas do cerrado é devido à baixa disponibilidade de nutrientes do solo relacionado à acidez do mesmo (Goodland & Ferri 1979). Esta hipótese foi confirmada em nosso estudo, uma vez que a maior concentração de taninos condensados foi encontrada nas parcelas com adição de N, enquanto que a menor concentração estava nas parcelas com Ca e controle. Tal resultado também corrobora a “Hipótese de Equilíbrio entre Carbono: Nutriente” (Bryant *et al.* 1983) e o “Modelo de Competição de Proteína” (Protein Competition Model - Jones & Hartley 1999), pois as plantas no tratamento com adição de N apresentaram mais taninos condensados comparada com as plantas dos outros tratamentos, uma vez que as plantas das parcelas N tiveram menor disponibilidade de nutrientes devido à acidificação dos solos (Jacobson et al. 2011). A biossíntese da maioria dos compostos fenólicos ocorre principalmente pela via do ácido chiquímico que converte precursores de carboidratos derivados do metabolismo primário para os aminoácidos aromáticos. Taninos condensados e hidrolisáveis são derivados especificamente da rota da fenilalanina e do ácido gálico, respectivamente (Taiz & Zeiger 2006). Sabe-se que, em condições de baixa disponibilidade de nutrientes, a taxa de incorporação da fenilalanina para a síntese de fenólicos aumenta. Como resultado, a concentração de taninos condensados e de fenólicos totais também se eleva (Jones & Hartley 1999). Por outro lado, o mecanismo de síntese de taninos hidrolisáveis ainda não está completamente esclarecido (Ossipov et al. 2003). Portanto, a determinação dos fatores ambientais que podem influenciar a produção de taninos hidrolisáveis é ainda obscura.

Atributos relacionados aos NEFs, tais como número e tamanho médio por folha e concentração e porcentagem de açúcares, não sofreram alterações devido aos resíduos oriundos dos tratamentos de adição de nutrientes. Os NEFs de *M. brasiliensis* não produziram volumes diferenciados de néctar quando as plantas foram submetidas a

diferentes tratamentos de adição de nutrientes, pois como o néctar coletado foi liofilizado e depois foi colocado o mesmo volume para cada amostra de néctar para a análise no cromatógrafo de íons, significa que a igual concentração de açúcares em μM detectada nas amostras do NEF foi devido à igual quantidade de volume coletado nesse tipo de NEF. Além disso, não houve diferença na quantidade relativa (porcentagem) dos tipos de carboidratos produzidos nos diferentes tratamentos, significando que não há diferença qualitativa no néctar extrafloral entre os tratamentos. Este resultado indica que a produção de NEFs e de néctar não está diretamente relacionada com a disponibilidade de nutrientes. Mondor et al. (2006) mostraram que a maior formação de NEFs como defesa induzida, em *Vicia faba*, está relacionada a intensidade de dano foliar e a disponibilidade de nutrientes. Portanto, para quantificar o custo direto da produção de novos NEFs em *M. brasiliensis*, serão necessários estudos experimentais de herbivoria artificial com exclusão de formigas, seguidos de análise do volume do néctar, de atributos relacionados aos NEFs e do *fitness* da planta em diferentes tratamentos de fertilização.

O presente estudo mostrou que os resíduos de fertilização regular de médio prazo em uma área de cerrado alteraram atributos de defesas e de qualidade foliar em *M. brasiliensis*, mesmo após um intervalo de dois anos sem aplicação de nutrientes na área. Isso significa que mesmo após um intervalo sem adição de nutrientes, as plantas ainda foram responsivas às mudanças que ocorreram nos solos devido à adubação, indicando que *M. brasiliensis* não é resiliente aos resíduos de fertilização. Os efeitos de adubação residual em áreas naturais de cerrado estão apenas começando a serem conhecidos. Alterações de atributos de defesas e de qualidade foliar constituem forças *bottom-up* que podem afetar toda a cadeia trófica. Tendo em vista a rápida ocupação dos cerrados brasileiros por sistemas agrícolas de larga escala, com intensa aplicação de fertilizantes, esse é um tema que precisa ser rapidamente melhor compreendido.

Capítulo III – Plasticidade fenotípica de defesas anti-herbivoria de plantas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae, Mimosoideae) submetidas a diferentes condições ambientais

RESUMO - Algumas plantas apresentam nectários extraflorais (NEFs) que atuam como defesas indiretas e induzidas contra herbívoros. Essas mesmas plantas também podem ter tolerância que é a capacidade de possuir crescimento compensatório após um evento de herbivoria. O cerrado possui uma vegetação que está submetida à sazonalidade climática, herbivoria e presença do fogo. Tais fatores podem ser decisivos quanto à expressão dos atributos de defesa das plantas como quantidade de NEFs e produção do néctar extrafloral, assim como tolerância. A fim de se estudar a influência desses fatores na expressão dos atributos de defesa, plantas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae, Mimosoideae), espécie nativa do cerrado que apresenta NEFs nas suas folhas, foram submetidas a queimadas periódicas, condições de seca e chuva e taxas distintas de herbivoria. Além disso, seus NEFs foram caracterizados morfológica e anatomicamente, assim como a química do néctar foi elucidada. *Stryphnodendron adstringens* apresentou um NEF na base e no ápice da raquis e pequenos NEFs nos raquíolos. Os NEFs são protuberantes, com epiderme, parênquima secretor e tecido vascular. A superfície do NEF não apresentou estômatos nem tricomas. A quantidade de NEFs no raquíolo aumentou da base para o ápice e o néctar produzido na base da raquis teve maior volume e menos sacarose do que o néctar produzido no ápice da raquis e nos raquíolos. Plantas submetidas ao fogo periódico apresentaram mais NEFs do que plantas controle; entretanto, após um período sem queimada, essas plantas que antes apresentavam mais NEFs voltaram a ter a mesma quantidade de nectários que as plantas controle. O número de NEFs não se modificou quando comparadas folhas produzidas na seca e folhas produzidas na chuva, mas as folhas produzidas na seca foram menos largas do que as folhas produzidas na chuva. Plantas que sofreram apenas um evento de desfolha total não produziram mais NEFs nem folhas mais largas do que plantas controle; porém as folhas foram mais largas após a desfolha total e na estação chuvosa quando comparada com folhas da mesma planta produzidas antes da aplicação do tratamento de desfolha total e na estação seca. Plantas submetidas a diferentes níveis de herbivoria nos seus ramos apresentaram variação na produção de néctar. Maior quantidade de néctar foi produzida em ramos que sofreram 100% de herbivoria do que em ramos que sofreram 0% ou 10% de herbivoria. Tais resultados mostraram que *S. adstringens* é uma espécie plástica no que diz respeito a seus atributos de defesa.

1. Introdução

As defesas anti-herbivoria são essenciais para aumentar a sobrevivência das plantas ao ataque de herbívoros, uma vez que as plantas são fontes de alimento para mais de um milhão de espécies de insetos (Howe & Jander 2008). As defesas anti-herbivoria podem ser defesas constitutivas ou induzidas (Stamp 2003), defesas diretas ou indiretas (Price et al. 1980) e tolerância (Strauss et al. 2002). As defesas induzidas são ativadas após a herbivoria e conferem algum grau de resistência a subseqüentes ataques (Harvell 1990). As defesas indiretas são atributos que aumentam o desempenho de inimigos naturais dos herbívoros (patógenos, parasitóides e predadores), reduzindo o impacto dos herbívoros nas plantas hospedeiras (Price et al. 1980). Por outro lado, a tolerância é a resposta da planta induzida após o consumo que reduz os efeitos negativos do dano causado pelo herbívoro (Núñez-Farfán et al. 2007), podendo ser a capacidade da planta de crescer novamente após um evento de herbivoria, apresentando um crescimento compensatório que pode ser em tamanho de folhas novas produzidas (Cap. 1) ou diâmetro do tronco (Mundim et al. 2011).

Nectários extraflorais (NEFs) são estruturas que secretam néctar, estando presentes em órgãos aéreos das plantas (Fahn 1979b). Vários estudos têm demonstrado que plantas com NEFs são freqüentemente protegidas por formigas que atacam os herbívoros em troca de néctar (mutualismo defensivo) (Costa et al. 1992; Cuautle & Rico-Gray 2003; De La Fuente & Marquis 1999; Katayama & Suzuki 2003). Por isso, os NEFs são considerados defesas indiretas que, algumas vezes, são induzidas (Ness 2003). O investimento das plantas nesta defesa depende do balanço custo-benefício ditado pela pressão de herbivoria e pela disponibilidade de recursos. Assim, espera-se uma variação temporal e espacial no investimento das plantas nesta defesa (Mondor et al. 2006; Oliver et al. 2007). Por exemplo, algumas espécies de plantas aumentam a produção de néctar extrafloral após eventos de herbivoria, atraindo mais formigas aos ramos danificados (Ness 2003; Rios et al. 2008), enquanto outras produzem mais NEFs nas folhas novas produzidas depois dos danos mecânicos (Mondor & Addicott 2003).

O cerrado possui uma flora lenhosa com mais de 25% das espécies portadoras de NEFs (Oliveira & Leitão-Filho 1987). As plantas do cerrado estão submetidas à sazonalidade climática, com distinção de uma estação seca para uma chuvosa (Coutinho 2002), herbivoria (Costa et al. 2008) e presença do fogo (Miranda et al. 2004; Simon et al. 2009). Tais fatores, que são determinantes dos padrões florísticos e fitossociológicos do cerrado, podem ser também decisivos quanto à expressão dos atributos de defesa das

plantas como quantidade de NEFs e produção do néctar extrafloral, uma vez que as plantas desenvolvem defesas proporcionalmente a sua taxa de herbivoria (Bryant et al. 1983). Isso ocorre porque a sazonalidade pluviométrica influencia a densidade de insetos, sendo o efeito da herbivoria maior na época das chuvas (Marquis et al. 2001). Além disso, o fogo pode ter efeito semelhante ao obtido com uma desfolha das plantas ou a uma herbivoria intensa (César 1980), resultando em aumento de defesa induzida ou no crescimento compensatório.

Como os atributos de defesas são adaptativos e variam em diferentes condições ambientais, a nossa hipótese é que a produção de NEF e/ou de néctar extrafloral varia devido à sazonalidade climática, intensidade da pressão de herbivoria e presença de fogo. Logo, nós esperamos encontrar (1) maior produção de NEFs na época chuvosa, após um evento de herbivoria e em áreas com histórico de fogo muito recente; (2) maior produção de néctar em folhas que sofreram herbivoria artificial do que em folhas saudáveis; e (3) crescimento compensatório nas plantas que sofreram herbivoria, como produção de folhas maiores após um evento de desfolha total. Para testar essas hipóteses, experimentos controlados foram conduzidos em uma área de cerrado com *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae, Mimosoideae), uma espécie típica do cerrado (Felfili et al. 1999), nas estações seca e chuvosa, em plantas submetidas a desfolha e plantas controle e em áreas com diferentes históricos de queimadas.

Portanto, o nosso objetivo principal foi verificar se a quantidade de NEF, a produção de néctar e se o número de NEFs é modificado em diferentes épocas do ano e em diferentes regimes de fogo, e se a planta apresenta crescimento compensatório após um evento de desfolha total. Além disso, também objetivamos determinar a distribuição dos NEFs, descrever os aspectos anatômicos dos mesmos e elucidar a química do néctar extrafloral. Tais dados nos auxiliaram a responder as seguintes questões: (1) NEFs em *S. adstringens* são defesas indiretas; isto é, eles atraem formigas que podem afugentar os herbívoros? Se sim, (2) NEFs em *S. adstringens* são defesas induzidas; isto é, há um aumento no número de NEFs ou na produção do néctar extrafloral após um evento de desfolha ou na época de maior possibilidade de herbivoria? (3) Existe crescimento compensatório em *S. adstringens* após um evento de herbivoria artificial? Além disso, tendo como premissa que plantas submetidas à queimada sofrem os mesmos efeitos de uma herbivoria intensa, uma vez que todas as folhas caem após a passagem do fogo, nós também investigamos a seguinte questão: (4) Plantas em áreas com histórico de fogo

frequente apresentam mais NEFs do que plantas em áreas controle e plantas em área com histórico de fogo não recente?

2. Material e Métodos

Espécies e local de estudo

Stryphnodendron adstringens apresenta de 4 a 5 metros de altura e folhas compostas bipinadas, com 6 a 8 folíolos por pina (Lorenzi 2000). É uma espécie brevidecídua, sendo que sua brotação ocorre durante o mês de setembro e no início do mês de outubro, finalizando a recomposição da copa no início das chuvas (Lenza & Klink 2006). Nectários extraflorais de dois tipos são encontrados nas folhas de *S. adstringens* (Oliveira & Leitão-Filho 1987). Na base da ráquis observa-se NEF elevado, oval ou arredondado e com uma superfície lisa (Machado et al. 2008) e ao longo da ráquis e dos raquíolos são observados NEFs pequenos (Oliveira & Leitão-Filho 1987).

A pesquisa foi conduzida na Reserva Ecológica do IBGE (RECOR) (15° 56' 41" S e 47° 53' 07" W) e na Fazenda Água Limpa da Universidade de Brasília (FAL) (15° 56' 45" S 47° 56' 08" W), no Distrito Federal. A fitofisionomia dominante das duas áreas é o cerrado *sensu stricto*, diferenciado pelo estrato herbáceo com gramíneas e o estrato lenhoso descontínuo (Eiten 1994; Ratter 1986). O clima é Aw pela classificação de Köppen com uma distinta estação seca de maio até setembro e a estação chuvosa de outubro ao início de maio. Os solos são profundos, bem drenados, ácidos, latossolos distróficos com alto conteúdo de Al (Franco 2002; Franco et al. 2005) e com baixa concentração de nutrientes (Haridasan 2000). Devido à sazonalidade, as camadas superficiais dos solos tornam-se secas durante a estação de estiagem enquanto as camadas mais profundas mantêm maior quantidade de água ao longo do ano (Franco 2002).

Caracterização dos NEFs e do néctar extrafloral

Para se determinar o número de NEFs por folha (na base, no ápice da raquis e ao longo do raquíolo) assim como sua localização, foram contados os NEFs em uma folha por indivíduo de *S. adstringens*, sendo no total 57 plantas. Os comprimentos da raquis e dos raquíolos foram também mensurados. Os raquíolos foram divididos em regiões (base, meio e ápice) para se mensurar em qual localidade do raquíolo teria mais nectários. Tais dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$), uma vez que sua normalidade não foi comprovada.

Para a caracterização estrutural do NEF da base da folha, da raquis e do raquíolo, folhas completamente expandidas foram fixadas em FAA 70 (5% de ácido acético, 5% de formaldeído, 90% de álcool 70), armazenadas em álcool 70 (Johansen 1940), processadas e infiltradas em historesina (Technovit Methyl Methacrylate Embedding Kit). Cortes transversais e longitudinais de 5 μm foram corados com Azul de Toluidina (O'Brien et al. 1996). Além disso, para a caracterização da superfície dos NEFs, amostras foram fixadas em 2,5% de gluraldeído em tampão fosfato a 0,05M (pH de 7,2) por 24 horas, desidratadas em série acetônica (30-100%), secas em ponto crítico de CO_2 , cobertas com ouro (Bozzola & Russel 1992) e observadas em Jeol[®] 840A (5.0kV).

A fim de se caracterizar a química do néctar secretado pelo NEF da base da folha das mesmas plantas utilizadas para as análises anatômicas e de varredura, um ramo com folhas novas por planta, sendo no total 10 plantas, foi ensacado durante 96 horas (4 dias) para a exclusão das formigas e acúmulo de néctar suficiente para coleta. O néctar produzido por cada NEF da base da raquis foi coletado com o auxílio de uma seringa, armazenado em um eppendorf com 50 μL de água destilada e mantido em recipiente com nitrogênio líquido no campo. Como o volume do néctar produzido pelos nectários do ápice da raquis e do raquíolo era extremamente pequeno, nós coletamos o néctar produzido por esses nectários em folhas novas que foram armazenadas em geladeira por um dia a fim de acumular néctar suficiente para coleta. No próprio laboratório, o néctar foi coletado, seguindo os mesmos procedimentos acima. No total, foi coletado néctar do NEF da raquis e do raquíolo de 10 plantas. As amostras de néctar foram armazenados em freezer ultra-frio (-80 °C) e depois liofilizadas.

A composição e a concentração de carboidratos no néctar extrafloral foi determinada pelo cromatógrafo de íons (Dionex) integrado ao modelo ICS3000 de HPAEC-IPAD com coluna para detecção de carboidratos (CarboPacTM PA10, 2 X 250 mm). Foi usado como eluente solução aquosa de 200 mM de NaOH. As concentrações dos carboidratos (glicose, frutose e sacarose) e de açúcar total foram calculadas com o Software de Chromeleon através de uma curva padrão nas seguintes concentrações: 0.625, 1,25, 2.5, 5.0 e 10.0 μM .

As concentrações de carboidratos do néctar em μM dos NEFs da base e da raquis e raquíolo foram analisadas. Para as análises estatísticas, dados de glicose e frutose foram transformados pela sua raiz quadrada. Teste t ($\alpha = 5\%$) foi realizado a fim

de comparar concentração de glicose, frutose e açúcar total para amostras independentes e Mann-Whitney U Test foi usado para examinar a concentração de sacarose entre o néctar do NEF da base da folha e o néctar dos NEFs da raquis e raquíolo de plantas de *S. adstringens*. A porcentagem de frutose e arcosseno de glicose em relação ao açúcar total também foram analisadas para cada amostra de néctar extrafloral e testadas pelo teste *t* para amostras independentes e a porcentagem de sacarose foi testada por Mann-Whitney U Test.

Formigas que visitavam as plantas foram coletadas e armazenadas em etanol 70% e, posteriormente, identificadas.

Efeitos de queimadas na produção de NEFs e atributos foliares – experimento 1

Em maio de 2009 (início da estação seca), na RECOR, para se verificar a existência o efeito de queimadas recorrentes na produção de NEFs e em alguns atributos foliares, foram coletadas três folhas completamente expandidas de 15 indivíduos em área com histórico de fogo, depois de nove meses da última queimada experimental, e em área controle. A área com histórico de fogo sofreu queimadas experimentais de 1991 a 2008 no início do mês de agosto, em meados da seca, a cada dois anos (Dias & Miranda 2010; Miranda et al. 2004). Em maio de 2011, foram coletadas novamente três folhas completamente expandidas em 15 indivíduos na área com histórico de fogo, que já se encontrava em processo de regeneração, uma vez que a última queimada ocorreu em agosto de 2008, e na área controle. O número de NEFs foi mensurado no segundo raquíolo à direita por folha.

Teste *t* ($\alpha = 5\%$) foi realizado a fim de comparar médias do número de NEFs entre plantas em área com histórico de fogo e plantas em área sem histórico de fogo em 2009 e em 2011 e entre plantas controle e plantas em área com histórico de fogo no ano de 2009 e 2011.

Efeito da sazonalidade e da pressão de herbivoria na produção de NEFs e atributos foliares – experimento 2

Em julho de 2010 (estação seca), na FAL, a fim de se verificar se existia variação na produção de NEFs e em alguns atributos foliares devido ao efeito da sazonalidade das chuvas ou ao efeito de grande pressão de herbivoria, foram marcados 30 indivíduos em processo de perda de folhas (folhas amareladas e que se desprendem facilmente do ramo). Em 15 indivíduos, foi feita a desfolha total (Grupo B), cortando

todas as folhas da copa com a tesoura e os outros 15 foram mantidos como controle, apenas com a herbivoria natural (Grupo A). Além disso, nessa estação seca, coletamos folhas de outros 10 indivíduos que já possuíam sua copa formada totalmente por folhas novas (Grupo C). Foram coletadas três folhas por indivíduos do grupo de plantas que sofreram herbivoria (folhas amarelas que se desprendiam facilmente do ramo) e três folhas dos 10 indivíduos do grupo de plantas que já apresentavam folhas novas no início da estação seca. As análises do número de NEFs e da largura da folha foram feitas no quarto raquíolo à direita e o comprimento da folha foi obtido mensurando toda a raquis.

Em dezembro de 2010 (estação chuvosa), foram coletadas as folhas novas que surgiram após o tratamento de herbivoria nas plantas do grupo B (que sofreu herbivoria total) e as folhas novas que surgiram nas plantas do grupo controle. Foram analisadas três folhas por planta, sendo mensurado número de NEFs, largura e comprimento da folha como dito anteriormente.

Portanto, ao final do experimento, nós comparamos o número de NEFs, densidade de NEFs em um raquíolo ($\text{NEF/raquíolo} = \text{número de NEFs/comprimento do raquíolo}$), largura e comprimento da folha de plantas cuja produção de folhas foi no início da estação seca ou no início da estação chuvosa e de plantas submetidas à herbivoria artificial total e controle (com herbivoria natural).

As análises estatísticas dos dados constaram de teste para comparar médias entre os tratamentos A e B e A e C (test t e Mann-Whitney U test), teste t de amostras dependentes dos indivíduos que foram submetidos à desfolha total, antes e depois do tratamento para comparar NEF/raquíolo, comprimento e largura foliar, e Sign test de amostras dependentes de dados sem distribuição normal para comparar número de NEFs dos indivíduos que foram submetidos à desfolha total, antes e depois do tratamento.

Efeito da pressão de herbivoria na produção de néctar extrafloral – experimento 3

Em agosto de 2010 (estação seca), na RECOR, para verificar se a produção, composição e concentração de néctar do NEF da base da folha variavam em diferentes níveis de herbivoria, foram marcadas aleatoriamente 24 plantas. O tratamento de herbivoria foi cortar 10, 50 ou 100% das folhas completamente expandidas no ramo marcado, deixando a base do pecíolo com seu NEF. Portanto, no grupo A, nenhuma folha do ramo foi cortada; no grupo B, 10% das folhas do ramo foram cortadas; no grupo C, 50% das folhas do ramo foram cortadas e, no grupo D, 100% das folhas foram

cortadas. Após a aplicação dos tratamentos, os ramos marcados foram ensacados com sacos plásticos e a coleta de néctar foi feita da mesma forma descrita acima. Foi coletado néctar após 96 horas da aplicação do tratamento de no máximo quatro NEFs por planta quando era possível coletar o néctar secretado, sendo no total seis plantas por tratamento.

As análises estatísticas dos dados constaram de teste para examinar a comparação de médias entre os tratamentos 0, 10, 50 e 100% de herbivoria por meio de: MANOVA tipo III seguido de Tukey para concentração de glicose e frutose e Kruskal-Wallis para concentração de sacarose e açúcar total. A porcentagem de glicose e sacarose em relação ao açúcar total foi também analisada pelo teste de MANOVA tipo III e a porcentagem de frutose em relação ao açúcar total foi testada pelo teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância foi de 5%.

Para todos os dados, a normalidade foi testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade das variâncias foi comprovada pelo teste de Levene. Todos os testes estatísticos foram feitos com o software Statistica 7.0 e o nível de significância adotado foi de 5%.

3. Resultados

Caracterização dos NEFs e do néctar extrafloral

Stryphnodendron adstringens possui distintos tipos de NEF, distribuído em distintas regiões das folhas (Fig. 1). Na base da raquis, há um grande nectário oval, protuberante e com superfície secretora (Fig. 1A) onde existem muitas formigas patrulhando. No ápice da raquis (Fig. 1B-C) e nos raquíolos são observados NEFs circulares, protuberantes onde também se encontram formigas. O NEF do ápice da raquis é maior do que os nectários dos raquíolos, porém aquele é menor do que o grande nectário da base da folha. No raquíolo, o número de NEFs aumenta da base para o ápice ($H = 7.759$; $p < 0.05$) (Fig.2).

Os NEFs em *S. adstringens* apresentaram epiderme com células tubulares no sentido longitudinal, parênquima secretor e tecido vascular (Fig. 1D-E). O parênquima secretor tinha indícios de compostos fenólicos (Fig. 1E) e a vascularização ocorria principalmente por floema (Fig. 1D-E), sendo também observado xilema (Fig. 1D-E). A microscopia de varredura revelou que a superfície do nectário não apresentava tricomas e estômatos (Fig 1A-C).

O néctar da base da folha foi mais concentrado em μM do que o néctar da raquis e do raquíolo, quando comparamos glicose, frutose e açúcar total. Tal diferença não foi encontrada para sacarose (Tabela 1). Entretanto, não foi constatada diferença entre néctar extrafloral produzido na base da folha e o produzido no ápice da raquis e nos raquíolos quando comparada a porcentagem de glicose e frutose em relação ao açúcar total. Por outro lado, o néctar extrafloral no ápice teve maior porcentagem de sacarose do que o néctar extrafloral na base da raquis ($Z = 2.116$; $p < 0.05$).

Formigas dos gêneros *Camponotus* e *Cephalotes* foram encontradas forrageando os NEFs de *S. adstringens*.



Figura 1: Nectários extraflorais de *Stryphnodendron adstringens*. **A.** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do NEF da base da raquis. **B.** NEF do ápice da raquis. **C.** MEV do NEF do ápice da raquis **D.** Esquema do corte histológico do NEF do ápice da raquis, área pontilhada representa o floema e a área tracejada representa o xilema. **E.** Corte histológico do NEF do ápice da raquis. Observar vascularização por floema (F) e xilema (X), indícios de compostos fenólicos nas células do parênquima secretor devido à coloração esverdeada do azul de toluidina (PS) e epiderme com células altas no sentido longitudinal (Ep). Escalas: A = 1000 μm , B = 100 μm e C-D = 200 μm .

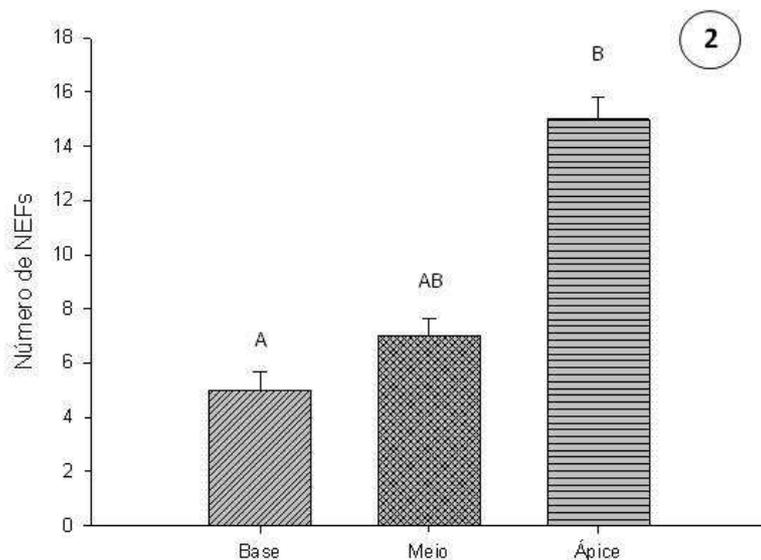


Figura 2: Número médio de NEFs em cada região dos raquíolos de *Stryphnodendron adstringens*. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo $p < 0.05$. Barras equivalem ao desvio padrão.

Tabela 1. Concentrações de açúcares ($x \pm DP$) em NEFs da base da folha e NEFs do ápice da folha (ápice da raquis e do raquíolo) de *Stryphnodendron adstringens*.

| Atributos de defesa NEFs da base e do ápice da folha | | | | | |
|--|----------------------|----------------------|---------------|-------|------------------|
| Açúcares | Base | Ápice | T | Z | p |
| Glicose | 0.283 ± 0.123 | 0.08 ± 0.055 | -5.710 | | <0.001 |
| Frutose | 0.375 ± 0.185 | 0.098 ± 0.147 | -4.792 | | <0.001 |
| Sacarose | 1.027 ± 0.334 | 0.879 ± 0.601 | | 0.227 | >0.05 |
| Açúcar total | 1.423 ± 0.558 | 1.057 ± 0.680 | -2.163 | | <0.05 |

As concentrações de glicose, frutose, sacarose e açúcar total do néctar extrafloral estão em μM . Números em negrito são estatisticamente significativos (N das plantas = 10, $\alpha = 0.05$, Teste t ou Teste de Mann-Whitney U).

Efeitos de queimadas na produção de NEFs e atributos foliares – experimento 1

O experimento testando o efeito do fogo no número de NEFs entre plantas submetidas a eventos constantes de queimada (histórico de fogo 2009) foi de 2,2 e na área controle foi de 1,2 ($t = -4,395$; $p < 0,01$) (Fig. 3). Portanto, nossa hipótese de que plantas presentes em área com histórico de fogo freqüente possuiriam mais NEFs nos raquíolos do que plantas na área controle foi corroborada. Entretanto, após três anos sem queimada experimental (histórico de fogo 2011), as plantas presentes nessa área apresentaram estatisticamente a mesma quantidade de NEFs (média de NEFs = 1,75) que as plantas presentes em área controle (média de NEFs = 1.82) ($t = 0,3159$; $p > 0,05$)

(Fig. 3). Quando comparamos o número de NEFs das plantas distribuídas na área com histórico de fogo de 2009 e 2011, encontramos uma diferença significativa ($t = -2,1268$; $p < 0,005$), sendo que as plantas na área com histórico de fogo em 2009 apresentaram mais NEFs do que as plantas na área com histórico de fogo em 2011 (Fig. 3).

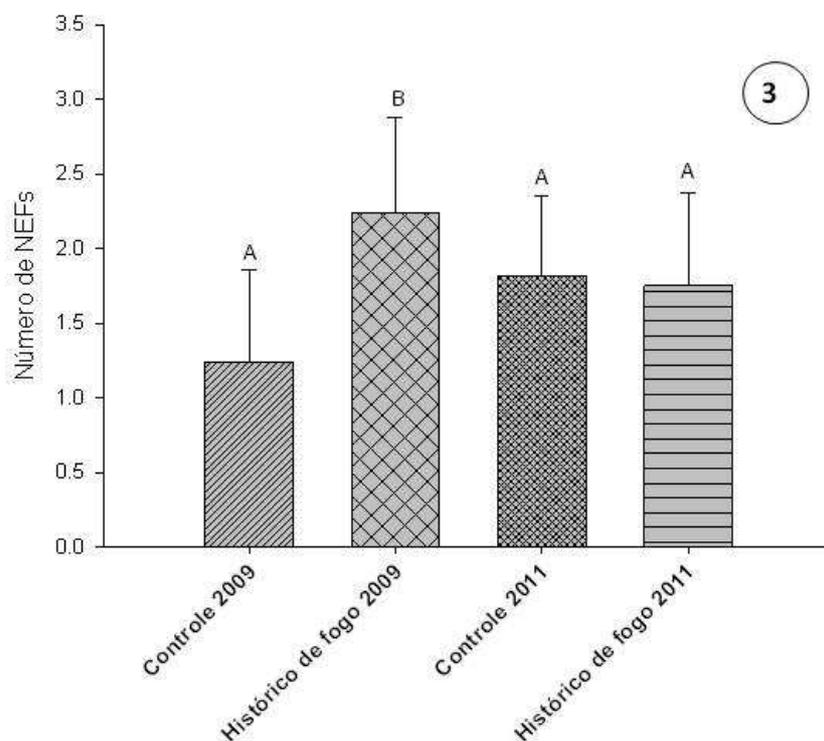


Figura 3: Número médio de NEFs nas folhas de indivíduos de *Stryphnodendron adstringens* submetidos a uma área sem histórico de fogo (controle 2009 e controle 2011), a uma área queimada bianualmente de 1991 a 2008 (histórico de fogo 2009) e a uma área queimada bianualmente de 1991 a 2008 e sem fogo de 2009 a 2011 (histórico de fogo 2011). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo $p < 0.05$. Barras representam o desvio padrão.

Efeito da sazonalidade e da pressão de herbivoria na produção de NEFs e atributos foliares – experimento 2

O resultado do experimento que comparou o número de NEFs, densidade de NEFs por raquíolo, largura e comprimento foliar das folhas produzidas na época seca e das folhas produzidas na época chuvosa refutou parcialmente nossa hipótese. Não houve diferença na quantidade de NEFs ($t = -0.917$; $p = 0.375$) e na densidade de NEFs por raquíolo ($t = 0.362$; $p = 0.723$) entre os indivíduos que produziram folhas em estações distintas do ano. Entretanto, as folhas produzidas na estação seca foram menos largas do que as folhas produzidas na estação chuvosa (Fig. 4; $t = -3.52$; $p < 0.01$). O mesmo não

ocorreu quando o comprimento foliar foi comparado entre os indivíduos dos dois tratamentos ($t = -1.323$; $p = 0.207$).

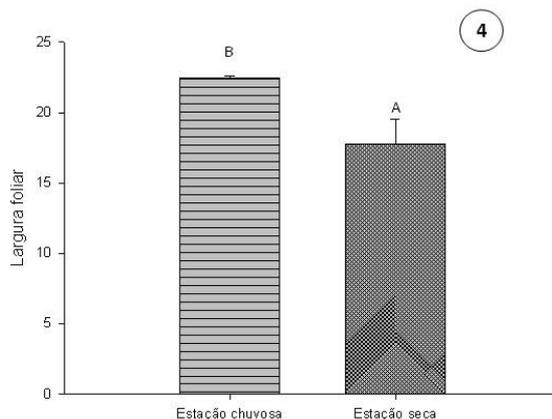


Figura 4: Largura média da folhas de indivíduos de *Stryphnodendron adstringens* produzidas na estação chuvosa e na estação seca. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo $p < 0.05$. Barras representam o desvio padrão.

A hipótese de que plantas submetidas à desfolha total apresentariam mais NEFs e folhas maiores do que plantas controle não foi confirmada. Não houve diferença no número de NEFs ($Z = -1.214$; $p = 0.225$), na densidade de NEFs por raquíolo ($t = -1.495$; $p = 0.160$), largura da folha ($t = 0.912$; $p = 0.380$) e comprimento foliar ($t = 0.157$; $p = 0.878$) entre indivíduos que sofreram desfolha total e indivíduos que não sofreram desfolha total. Também não houve diferença significativa no número de NEFs ($Z = 0.408$; $p = 0.683$), na densidade de NEFs por raquíolo ($t = 1.358$; $p = 0.223$) e comprimento foliar ($t = -0.978$; $p = 0.366$) no mesmo indivíduo nas folhas produzidas antes e depois do tratamento de desfolha total. Porém, as folhas produzidas depois da desfolha total foram mais largas do que as folhas produzidas antes da aplicação do tratamento (Fig. 5; $t = -4.268$; $p < 0,01$) quando analisado o mesmo indivíduo.

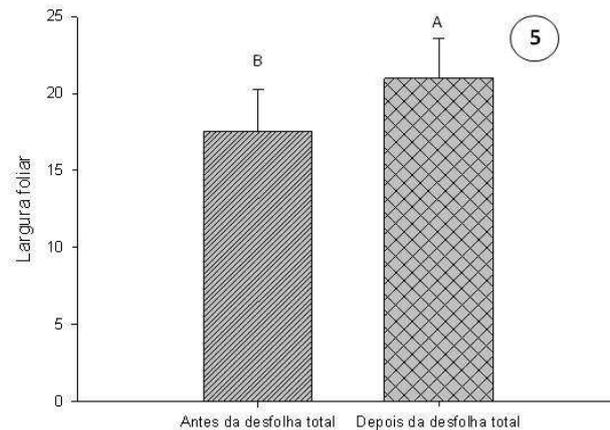
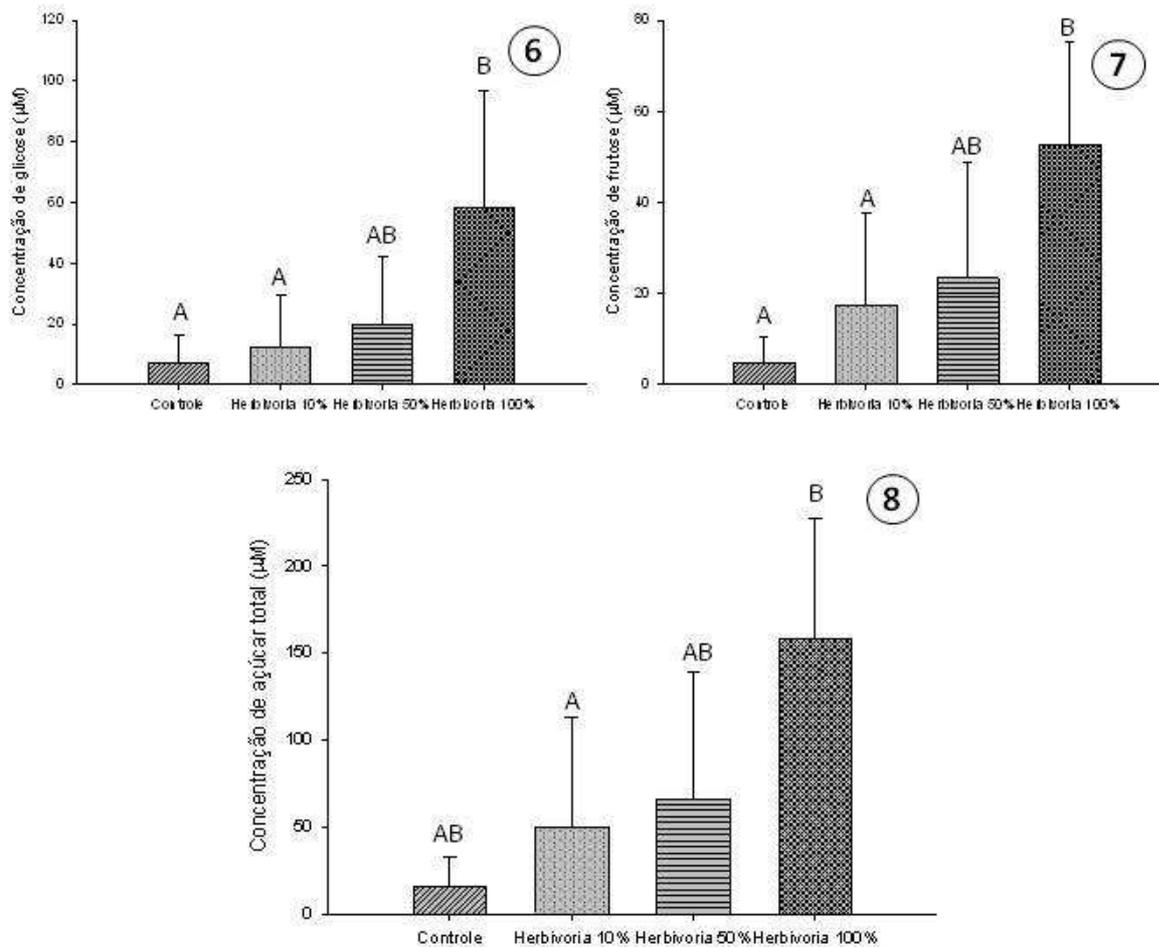


Figura 5: Largura média foliar dos indivíduos de *Stryphnodendron adstringens* antes de serem submetidos à desfolha total e após a desfolha total. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo $p < 0.05$. Barras representam o desvio padrão.

Efeito da pressão de herbivoria na produção de néctar extrafloral – experimento 3

O resultado do experimento que comparou a concentração do néctar extrafloral em μM e em porcentagem produzido pelas plantas submetidas a diferentes níveis de herbivoria comprovou a hipótese de que a produção de néctar é maior em folhas que sofreram herbivoria artificial do que em folhas saudáveis, e que quanto maior o nível de herbivoria artificial no ramo maior é a produção de néctar. A concentração em μM de glicose (Fig. 6) e frutose (Fig. 7) produzida foi significativamente maior nas plantas com ramo que sofreu 100% de herbivoria do que nas plantas com ramo que sofreu 10% e 25% de herbivoria. A concentração de açúcar total foi menor nas plantas com ramo que sofreu 10% de herbivoria do que nas plantas com ramo que sofreu 100% de herbivoria (Fig. 8) e a concentração de sacarose em μM não diferiu entre os tratamentos. Não foi verificada diferença na porcentagem de glicose ($F = 1.842$; $p > 0.05$), frutose ($H = 1.647$; $p > 0.05$) e sacarose ($F = 1.842$; $p > 0.05$) em relação ao açúcar total, comparando-se o néctar extrafloral dos diferentes tratamentos, o que comprovou a não variação na produção da massa de cada tipo de carboidrato.



Figuras 6-8: Concentrações médias (μM) de açúcares do néctar extrafloral de *Stryphnodendron adstringens* em quatro tratamentos de herbivoria artificial. **6.** Concentração de glicose. **7.** Concentração de frutose. **8.** Concentração de açúcar total. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo $p < 0.05$. Barras representam o desvio padrão.

4. Discussão

Nectários extraflorais em *Stryphnodendron adstringens* são nectários elevados. Esse tipo de nectário é comumente encontrado em diversas famílias de plantas, sendo inclusive observados em diversos gêneros de leguminosas (Elias 1983). Os NEFs encontrados na base da raquis de folhas de *S. adstringens* já foram morfológicamente caracterizados por Oliveira & Leitão Filho (1987) e Machado et al. (2008). Entretanto, os NEFs circulares e pequenos, distribuídos ao longo dos raquíolos, ainda não tinham sido descritos na literatura, bem como a descrição anatômica e caracterização do néctar dos NEFs de *S. adstringens*.

Os NEFs são freqüentemente visitados por formigas que podem ser observadas tanto nos nectários maiores, como o da base da raquis, quanto nos nectários menores, como os dos raquíolos. As formigas provavelmente exercem função anti-herbivoria,

afugentando ou dissuadindo os potenciais herbívoros da planta portadora de NEFs, como ratificados por alguns estudos experimentais realizados em sistemas plantas – NEF – formigas, no cerrado (Costa et al. 1992; Del-Claro et al. 1996 ; Oliveira 1997; Schororeder et al. 2010). O néctar extrafloral é a recompensa oferecida às formigas. Porém, a eficiência desse mutualismo defensivo é dependente de quais são as espécies de formigas visitantes dos NEFs (Heil et al. 2005). A identidade dessas espécies é determinada pelos componentes do néctar extrafloral (Baker & Baker 1982), como a sacarose, que é extremamente atraente para diferentes espécies de formigas, incluindo formigas generalistas e não mutualísticas (Heil et al. 2005). Tal fato foi confirmado para *S. adstringens*, uma vez que seu néctar extrafloral apresentou glicose, frutose e sacarose, e seus NEFs foram frequentemente visitados por formigas generalistas, como *Cephalotes* (Andrade & Baroni-Urbani 1999) e *Camponotus* (Hölldobler & Wilson 1990).

No raquíolo, o número de NEFs aumenta da base para o ápice, o que pode ser interpretado como característica adaptativa da planta, uma vez que as formigas que se alimentam do néctar produzido pelos NEFs distribuídos nos raquíolos precisam trafegar por toda a folha, protegendo-a. A maior distribuição de NEFs na porção distal das folhas, já foi também observada para outras espécies com folhas compostas, como em *Cedrela fissilis* (Paiva et al. 2007) e em *Hymenaea stigonocarpa* (Paiva & Machado 2006). O patrulhamento das formigas por toda a folha também é determinado pela diferença da qualidade e da quantidade do alimento produzido pelo NEF da base da raquis comparado com o produzido pelos NEFs do ápice da raquis e do raquíolo. O NEF da base da raquis produziu maior volume de néctar do que os NEFs do ápice da raquis e do raquíolo, pois como o néctar coletado foi liofilizado e depois foi colocado o mesmo volume para cada amostra de néctar para a análise no cromatógrafo de íons, significa que a maior concentração de glicose e frutose em μM detectada nas amostras do NEF da base da raquis foi devido à maior quantidade de volume coletado nesse tipo de NEF. Tal resultado foi também corroborado quando comparamos a porcentagem de glicose e de frutose entre o néctar do NEF da base da raquis e o néctar dos outros NEFs, uma vez que não houve diferença em porcentagem (quantidade relativa) para glicose e frutose. Por outro lado, o NEF da base da raquis produziu néctar com menos sacarose do que os NEFs do ápice da raquis e dos raquíolos, pois o néctar extrafloral coletado na base da raquis teve menor porcentagem (quantidade relativa) de sacarose do que o

néctar extrafloral na base da raquis. Isso significa que apesar de ter produzido maior volume de néctar, o NEF da base da raquis produziu néctar com menos sacarose.

Os NEFs em *S. adstringens* são estruturas complexas apresentando epiderme diferenciada, parênquima secretor com compostos fenólicos e tecidos vasculares, especialmente floema. A presença de compostos fenólicos no parênquima secretor pode inibir o ataque de herbívoros e patógenos (Koptur 1992) ao NEF. Tal fato deve aumentar a vida útil dos NEFs de *S. adstringens*, que permanecem funcionais tanto nas folhas novas quanto nas folhas completamente expandidas e que estejam iniciando o processo de senescência. A vascularização dos NEFs por floema e xilema contribui para a formação do néctar extrafloral cuja principal fonte de açúcar deve provir da seiva do floema (Fahn 2000; Rocha & Machado 2009). A presença dos tecidos vasculares nos NEFs é importante para a manutenção de altas taxas de secreção (Rudgers 2004), sendo que a quantidade de tecido vascular que irriga a estrutura secretora é diretamente proporcional ao seu tamanho (Carlquist 1969). Tais afirmações foram comprovadas nesse estudo, uma vez que o NEF da base da raquis é maior e produz maior quantidade de néctar do que os NEFs da raquis e dos raquíolos.

Nossos experimentos comprovaram que os NEFs de *S. adstringens* são defesas induzidas, pois eles são produzidos em maior quantidade nas folhas novas após eventos repetitivos de desfolha total (fogo) e produzem maior volume de néctar após herbivoria artificial em folhas completamente expandidas.

No experimento em que foi verificado o efeito do fogo na produção de NEFs, foi observada uma maior produção em área com histórico de fogo do que em plantas na área controle. Segundo Raw & Hay (1985), a simples retirada das folhas após a queima pode ser interpretada pela vegetação como alta proporção de herbivoria. O resultado sugere que as plantas presentes na área do tratamento, por estarem submetidas ao efeito de desfolha freqüente, passaram a produzir maior quantidade de NEFs no raquíolo do que as plantas presentes na área controle. Além disso, as plantas, após o fogo, possuem uma rápida e vigorosa rebrota com folhas tenras que tendem a sofrer alta pressão de herbivoria (Lopes & Vasconcelos 2011; Vieira et al. 1996). Portanto, a própria herbivoria após o fogo, aliada à perda total das folhas causada pela queimada, são os fatores que induzem a maior produção de NEFs nas plantas de *S. adstringens*. De acordo com Knoechelmann & Morais (2008), em 2003, 15 meses após a última queimada, a freqüência de formigas foi maior em plantas de *S. adstringens* na mesma área experimental do que na área controle. O aumento do número de NEFs nas plantas

de *S. adstringens* em área freqüentemente queimada é justificado, pois a maior quantidade de NEFs e de visitas de formigas podem estar reduzindo a herbivoria na segunda produção completa de folhas, uma vez que a primeira produção de folhas está sendo perdida a cada dois anos pelo fogo. Logo, a segunda produção completa de folhas precisa ser protegida do ataque de herbívoros. Entretanto, o aumento da produção de NEFs só ocorreu quando a desfolha total causada pelo fogo foi repetida a intervalos regulares de tempo ao longo dos anos, uma vez que, após três anos sem o estímulo similar a uma herbivoria intensa, as plantas presentes na área com histórico de fogo apresentaram estatisticamente a mesma quantidade de NEFs que as plantas presentes em área controle. Além disso, as plantas na área com histórico de fogo em 2009 apresentaram mais NEFs do que as plantas na área com histórico de fogo em 2011. Portanto, a alta produção de NEFs em *S. adstringens* é apenas sustentada quando as plantas são mantidas sob pressão de desfolha total regular, causada pela queimada experimental, sendo que o fim dessa pressão determina a volta da produção normal de NEFs pelas plantas. Tal fato também foi comprovado pelo experimento 3, uma vez que plantas submetidas a uma única desfolha total (herbivoria artificial com uso de tesoura) não aumentaram o número de NEFs nas novas folhas produzidas.

O experimento 2 demonstrou que a sazonalidade pluviométrica que influencia a densidade de insetos (Marquis et al. 2001; Pinheiro et al. 2002) não foi suficiente para aumentar a quantidade de NEFs presentes nas folhas produzidas na época chuvosa comparada com a quantidade de NEFs nas folhas produzidas na época seca. Tal resultado foi inesperado, pois como o efeito da herbivoria é maior na época das chuvas (Marquis et al. 2001), esperava-se que o número de NEFs fosse maior em folhas submetidas a maior pressão de herbivoria. Entretanto, a tolerância foi o tipo de resposta observada nessas plantas no período com maior pressão de herbivoria, já que as folhas produzidas na estação chuvosa foram mais largas do que as folhas produzidas na estação seca. Sabe-se que a abundância de insetos herbívoros pode influenciar a tolerância de várias plantas (Guillet & Bergstrom 2006). A produção de folhas mais largas na época de crescimento (estação chuvosa) também está relacionada com a maior disponibilidade de recursos para as plantas, podendo estar mais fortemente relacionada à sazonalidade e uso de recursos do que à herbivoria. Logo, o efeito sinérgico dos dois fatores, maior pressão de herbivoria e maior disponibilidade de água na estação chuvosa, pode ser o responsável pela produção de folhas largas na estação de crescimento. Tal fato também é corroborado quando se constatou que as folhas

produzidas depois da desfolha total (estação chuvosa) foram mais largas do que as folhas produzidas antes da aplicação do tratamento (estação seca) no mesmo indivíduo, enfatizando-se o efeito sinérgico dos dois fatores na produção de folhas mais largas.

Por outro lado, não houve diferença na largura e no comprimento foliar de folhas produzidas na mesma época do ano quando foram comparadas plantas controle com plantas que sofreram um evento de desfolha total (experimento 3). Possivelmente, as plantas de *S. adstringens* precisam ser submetidas a repetidos eventos de desfolha total para que ocorra o crescimento compensatório que é um tipo de tolerância. Por exemplo, algumas espécies de cerrado apenas apresentaram maior desenvolvimento de brotos após repetidos tratamentos de desfolha total durante dois anos (Mundim et al. 2011). Tal efeito foi considerado uma característica de tolerância. Portanto, pode-se concluir que *S. adstringens* deve apresentar crescimento compensatório após repetidos eventos de desfolhas e não quando apenas um evento de desfolha acontece.

Enquanto que a produção de NEFs adicionais aconteceu apenas após repetidos eventos de desfolhas, a produção de maior quantidade de néctar foi uma resposta rápida ao dano artificial sofrido por algumas folhas. NEFs presentes em folhas que sofreram danos manuais produziram maior volume de néctar do que NEFs em folhas saudias, sendo que essa resposta induzida foi dependente do nível de herbivoria artificial no ramo. A alteração na produção de néctar após herbivoria ou danos manuais já foi comprovada para algumas espécies (Koptur 1992; Ness 2003; Rios et al. 2008), porém essa é a primeira vez que se relata tal fato para uma espécie do cerrado. Os NEFs da base da raquis de folhas danificadas em ramos com 100% de herbivoria produziram maior volume de néctar do que os NEFs em ramos controle e 10% de herbivoria, pois a maior concentração de glicose e frutose em μM detectada nas amostras dos NEFs do tratamento com 100% foi devido à maior quantidade de volume coletada, uma vez que o néctar coletado foi liofilizado e depois foi colocado o mesmo volume em cada amostra de néctar para se fazer a análise no cromatógrafo de íons. A análise da porcentagem de glicose e frutose também confirmou esse resultado, pois não houve diferença em porcentagem (quantidade relativa) para glicose, frutose e sacarose. Por outro lado, como a produção de sacarose não diferiu entre os tratamentos, isso significa que o incremento em volume do néctar secretado nas folhas dos ramos que sofreram 100% de herbivoria não foi acompanhado pelo incremento na quantidade de sacarose produzida (massa), apesar de não termos encontrado diferença significativa em porcentagem (quantidade relativa). Esse aumento da produção de néctar extrafloral em ramos com 100% de

herbivoria é adaptativamente vantajoso para a planta, pois o aumento localizado de recompensas atrai ou mantém as formigas nas áreas mais vulneráveis, beneficiando toda a planta (Ness 2003).

Stryphnodendron adstringens apresentou diferentes estratégias de defesa, como defesa indireta e induzida por meio da variação da produção de NEFs ou de néctar extrafloral e tolerância por meio da alteração da produção de folhas mais largas. Tais estratégias de defesa são bastante plásticas, sendo dependentes de diferentes condições ambientais. Por exemplo, a presença de fogo freqüente elevou o número de NEFs e diferentes taxas de herbivoria artificial em ramos marcados aumentaram a quantidade de néctar produzido. Além disso, a variação na disponibilidade de recursos entre a época chuvosa e seca e a maior pressão de herbivoria durante a época das chuvas influenciaram na produção de folhas mais largas durante o período de maior vulnerabilidade às plantas. Tais modificações nos atributos de defesa devido a diferentes condições ambientais podem afetar as interações ecológicas entre plantas de *S. adstringens* e seus forrageadores de néctar extrafloral e, conseqüentemente, entre as plantas e seus herbívoros.

Capítulo IV - Atributos de defesa e de qualidade foliar de plântulas e plantas adultas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) submetidas aos resíduos de fertilização prévia em uma área de cerrado

RESUMO – O investimento das plantas em defesa anti-herbivoria pode depender de diferentes fatores, tais como idade da planta e disponibilidade de nutrientes no solo. Espera-se encontrar menos defesa em plantas jovens, seguidas por um aumento nos atributos de defesa em plantas adultas. Além disso, espera-se encontrar mais compostos fenólicos totais, taninos condensados e taninos hidrolisáveis em plantas que cresçam em áreas com solos distróficos do que em plantas que cresçam em áreas com solos eutróficos e um maior número de nectários extraflorais (NEFs) em plantas que estejam em áreas mais férteis. Nesse estudo, nós avaliamos o efeito da idade e de resíduos de fertilização nos atributos de defesa e de qualidade foliar de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) em uma área experimental de cerrado submetida anteriormente à adição de nutrientes por nove anos. Atributos de defesa (fenólicos totais, taninos condensados e hidrolisáveis, número de NEFs/folha, densidade de NEFs por raquíolo e qualidade do néctar) e de qualidade da folha (largura foliar, comprimento foliar, peso seco, conteúdo de água, macronutrientes, micronutrientes, C:N e N:P) foram mensurados em folhas coletadas de plantas e de plântulas que estavam em áreas com resíduos de fertilização de médio prazo de N, P e Ca e em área controle de vegetação de cerrado no Distrito Federal. A coleta foi realizada dois anos após a última aplicação de nutrientes. Nossos resultados demonstraram que as folhas das plantas adultas são menos atraentes para os herbívoros, tendo mais defesa química e menos qualidade de alimento do que as folhas das plântulas. Por outro lado, plântulas em geral apresentaram mais NEFs e maior concentração de glicose em seu néctar do que plantas adultas, o que foi nesse estudo uma medida indireta de volume. Esse resultado indica que plantas adultas utilizam mais defesas quantitativas (compostos fenólicos) enquanto plântulas utilizam mais defesa indireta (NEFs). Compostos fenólicos totais e taninos hidrolisáveis tiveram correlação negativa com concentração de nutrientes foliares em plantas adultas, o peso seco apresentou correlação positiva com taninos condensados e o número de NEF teve correlação negativa com a maioria dos nutrientes nas plantas adultas e plântulas. Os resíduos de fertilizações regulares alteraram a concentração de nutrientes foliares em plantas adultas e plântulas de *S. adstringens*, mas não mudaram seus atributos de defesa quando esses atuaram sozinhos. Nosso estudo mostrou que a fase ontogênica da planta influencia a qualidade da folha para os herbívoros, assim como os resíduos de fertilização.

1. Introdução

O desenvolvimento das plantas ou ontogenia pode ser categorizado em quatro fases: plântula, juvenil, adulto e senescente (Barton & Koricheva 2010; Hanley et al. 2004). O estágio de plântula compreende indivíduos que possuem as primeiras folhas fotossintéticas verdadeiras e o estágio adulto compreende indivíduos que já passaram por um evento reprodutivo (Boege & Marquis 2005). Como a pressão de herbivoria e as necessidades de alocação de recursos alteram ao longo da vida da planta, fases ontogênicas distintas podem apresentar diferentes mecanismos de defesa (Barton & Koricheva 2010; Boege & Marquis 2005). Na fase de plântula espera-se uma forte pressão seletiva para produção de atributos de defesa (Barton 2008) uma vez que os herbívoros são responsáveis por mais de 38% da mortalidade de plântulas em áreas naturais (Moles & Westoby 2004).

Entretanto, a vantagem adaptativa da produção intensa de defesa pode ser limitada por *trade-offs* entre defesa e crescimento (Herms & Mattson 1992). Sob a perspectiva da plântula, o investimento em defesa é extremamente custoso, uma vez que seus órgãos de aquisição de recursos não estão completamente desenvolvidos, pois suas raízes são pouco profundas e suas folhas não são numerosas (Herms & Mattson 1992; Kelly & Hanley 2005). Portanto, a produção de raízes e folhas (crescimento) pode ser considerada a prioridade para plântulas, sendo restrita a alocação de recursos para produção de atributos de defesa (Boege & Marquis 2005; Elger et al. 2009). Por isso, espera-se encontrar menos defesa em plantas jovens, seguidas por um aumento nos atributos de defesa em plantas adultas, que estão mais vulneráveis aos herbívoros durante um longo tempo, como prediz a “Hipótese de Equilíbrio entre Crescimento e Diferenciação” (Herms & Mattson 1992).

Além da influência da ontogenia, a produção de defesa também é determinada pela disponibilidade de nutrientes para as plantas. A “Hipótese do Equilíbrio entre Carbono: Nutriente” prediz que plantas em áreas com solos distróficos investem mais em defesa de base carbônica, como compostos fenólicos, taninos condensados e taninos hidrolisáveis, do que plantas em áreas com solos férteis (Bryant et al. 1983). O mecanismo bioquímico da produção de fenólicos é explicado pela “Hipótese do Modelo de Competição por Proteína” que prediz que a taxa de incorporação da fenilalanina na síntese de fenólicos aumenta quando a demanda por síntese de proteínas de crescimento diminui sob condições de baixa disponibilidade de nutrientes (Haukioja et al. 1998).

As plantas com nectários extraflorais (NEFs) são frequentemente visitadas por predadores e parasitóides, especialmente formigas, que atacam os herbívoros em troca

de néctar (Costa et al. 1992; Rico-Gray & Oliveira 2007). O investimento das plantas na defesa indireta via NEFs depende do balanço custo-benefício ditado pela pressão de herbivoria e pela disponibilidade de recursos para a planta (Mondor et al. 2006; Oliver et al. 2007), podendo ser maior a produção de NEFs em áreas com maior disponibilidade de nutrientes (Hipótese da Produção de Nectários Extraflorais -Mondor et al. 2006).

O cerrado é um bioma com vegetação do tipo savânica extremamente diversa (Coutinho 2002). Ele é caracterizado por solos ácidos e pobres em nutrientes (Haridasan 2000), com alta concentração de Al (Franco et al. 2005), profundos e bem drenados. O clima apresenta intensa sazonalidade pluviométrica, com uma estação seca e outra chuvosa (Furley 1999). Devido a essas restrições ambientais, as plantas adultas do cerrado possuem diversas características adaptativas, tais como raízes profundas (Bucci *et al.* 2008) e folhas escleromórficas (Goodland 1971; Goodland & Ferri 1979) com muitos tecidos mecânicos (Sarmiento & Monasterio 1975), baixo níveis de nitrogênio e água e muitos taninos (Marquis et al. 2002). As raízes profundas permitem as plantas manterem o seu status hídrico favorável durante a estação seca (Hoffmann & Franco 2003; Hoffmann et al. 2004) e o escleromorfismo pode ser uma adaptação aos solos oligotróficos com muito alumínio (Goodland 1971; Goodland & Ferri 1979) ou à herbivoria (Coley 1983a, 1983b).

Extensas áreas de cerrado estão sendo modificadas devido à expansão agrícola (Cavalcanti & Joly 2002; Klink & Moreira 2002), ocorrendo o emprego de calagem e adubação química de seus solos. Essas modificações resultantes da fertilização direta para a agricultura ou dos resíduos de fertilização prévia em áreas degradadas de cerrado em processo de recuperação natural modificam as características peculiares do solo do cerrado (Alcarde 2007). Tais mudanças edáficas também podem resultar em mudanças das características inerentes às plantas nativas desse bioma (Jacobson et al. 2011). Portanto, as plantas do cerrado que crescem em áreas previamente fertilizadas são ótimos modelos para se estudar a “Hipótese do Equilíbrio entre Carbono: Nutriente” / “Hipótese do Modelo de Competição por Proteína” e a “Hipótese da Produção de Nectários Extraflorais” e simultaneamente estudar a influência dos resíduos da fertilização prévia em atributos foliares de plantas nativas.

Nesse trabalho, nós investigamos a influência da ontogenia na produção de defesa e nos atributos de qualidade foliar e avaliamos os efeitos de resíduos de fertilização nos atributos das folhas de plântulas e de plantas adultas de

Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville (Fabaceae) que crescem em uma área experimental anteriormente submetida à fertilização no cerrado brasileiro. A hipótese geral testada no presente estudo é a de que plantas em diferentes fases ontogênicas apresentam diferentes atributos foliares e respondem de maneira distinta à disponibilidade de nutrientes, apresentando variação quantitativa nos atributos de defesa e na concentração de nutrientes das folhas.

Os objetivos desse trabalho foram responder as seguintes questões: (1) Plântulas e plantas adultas de *S. adstringens* apresentam características foliares diferenciadas devido à fase ontogênica em que se encontram? Se sim, (1.2) qual é a fase de vida da planta que ela é mais susceptível à herbivoria? (2) Existe alguma relação entre qualidade e atributos de defesa foliar em plântulas e plantas adultas? Se sim, (2.1) os compostos fenólicos nas folhas estão correlacionados negativamente com os nutrientes foliares e positivamente com peso seco? (2.2) NEFs estão correlacionados positivamente com os nutrientes foliares? (3) Após um período sem adição de nutrientes, os resíduos de uma fertilização prévia em área de cerrado alteraram as características de qualidade e defesa em folhas de *S. adstringens*, independente da fase ontogênica da planta? Em caso afirmativo, (3.1) resíduos de adição regular de nutrientes em área de cerrado diminuem a quantidade de compostos fenólicos totais e taninos e aumentam o número e a densidade de NEF em folhas de *S. adstringens*?

Ao responder as questões acima seria possível testar as seguintes hipóteses: (1) as plântulas têm mais qualidade como alimento para herbívoros do que plantas adultas, porque as primeiras investem mais em crescimento do que em defesa, corroborando a “Hipótese de Equilíbrio entre Crescimento e Diferenciação” (Herms & Mattson 1992); (2.1) Existe uma correlação negativa entre nutrientes foliares e compostos fenólicos, uma vez que plantas com menos nutrientes produzirão menos proteínas, de acordo com a “Hipótese do Modelo de Competição por Proteína” (Haukioja et al. 1998). Além disso, existe correlação positiva entre compostos fenólicos e peso seco, pois os compostos fenólicos com grandes cadeias carbônicas incrementam o peso seco da folha. (2.2) Existe correlação positiva entre síntese de NEFs e seus atributos com nutrientes foliares, uma vez que uma maior produção de NEFs é dependente de recursos adicionais (Mondor et al. 2006). (3) Os resíduos de fertilização diminuem a alocação de recursos para a defesa química pelas plântulas e plantas adultas, apoiando a “Hipótese do Equilíbrio entre Carbono: Nutriente” (Bryant et al. 1983), aumentam a quantidade de NEFs produzidos de acordo com a “Hipótese da Produção de Nectários Extraflorais”

(Mondor et al. 2006) e alteram a qualidade da folha da planta, uma vez que as características do solo são modificadas após a fertilização.

2. Material e Métodos

Espécie da planta

Stryphnodendron adstringens ocorre no Brasil, sendo comumente encontrada no cerrado (Felfili et al. 1999). É uma árvore brevidecídua com folhas compostas que perde todas as folhas durante a estação seca e produz novas folhas de setembro a outubro, no início da estação chuvosa (Lenza & Klink 2006). Os NEFs estão distribuídos um na base e um no ápice da raquis e pequenos NEFs nos raquíolos (Oliveira & Leitão-Filho 1987). Os NEFs tanto na raquis quanto nos raquíolos já foram caracterizados anatomicamente (Capítulo 3). Taninos também estão presentes nas folhas de *S. adstringens* (Silva & Batalha 2011).

Os principais herbívoros de *S. adstringens* são duas espécies de microlepidópteros: *Ophiolechia contrasta* Satler, 1996 (Gelechiidae, Depressariinae) e uma espécie de Epipaschiinae (Pyralidae), não identificada. Ambas têm dieta restrita a essa planta em áreas de cerrado do Distrito Federal e ocorrem em baixa frequência (I.R. Diniz & H.C. Morais, dados não publicados).

Área de Estudo

Esta pesquisa foi conduzida na Reserva Ecológica do IBGE (15°56'S; 47°53'N), região do Centro Oeste do Brasil. O clima regional é Aw de acordo com a classificação de Köppen (Ab'Saber 1983) com uma estação seca de maio a setembro e uma estação chuvosa de outubro a abril. O tipo predominante da vegetação é o cerrado que se caracteriza por um estrato herbáceo com gramíneas e um estrato lenhoso descontínuo com árvores e arbustos esparsos (Eiten 1972). O solo é do tipo latossolo, sendo profundo e bem drenado, com alto conteúdo de óxidos de Fe e Al (Jacobson 2009) e baixa concentração de nutrientes disponíveis para as plantas, como P, Mg, K e Ca (Haridasan 2000).

Os dados do presente trabalho foram coletados em 2009 em uma área experimental onde foi feita adição de nutrientes durante nove anos, de 1999 a 2006 (Jacobson 2009; Jacobson et al. 2011). O desenho experimental foi do tipo completamente casualizado, com quatro tratamentos, sendo três com adição de nutrientes (N, P e Ca) e um controle. Cada tratamento tinha quatro réplicas em parcelas

de 225 m², separadas pelo menos 10 m de distância. O grupo controle foi formado por parcelas com nenhuma aplicação de adubos. Nas parcelas com adição de N foi aplicado 100. kg.ha.y-1 de sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄; nas parcelas com adição de P foi aplicado 100 kg ha y-1 de superfosfato simples (superfosfato simples 20% - Ca (H₂PO₄)₂ + .2H₂O CaSO₄) e nas parcelas com adição de Ca foi aplicado 4 t.ha.y-1 de Ca como calcário dolomítico e gesso (60% de calcário dolomítico ((CaO + MgO) + 40% de gesso (CaSO₄.2H₂O)). Os nutrientes eram aplicados sobre a serrapilheira duas vezes por ano, exceto a adição de Ca que foi feita apenas uma vez (para obter mais detalhes olhar Jacobson *et al.* 2010). No trabalho, foram estudadas vinte plântulas com seis folhas cada uma e cinco plantas adultas de *S. adstringens* em cada tratamento do experimento, exceto no tratamento com adição de P onde encontramos apenas três plantas adultas.

Em outubro de 2009, ramos de plântulas e plantas adultas de *S. adstringens* foram ensacados com plástico durante 96 horas para excluir a visita de formigas aos NEFs e para obter néctar suficiente para a coleta. O néctar foi coletado em cinco plântulas e plantas adultas por tratamento, sendo quatro NEFs por planta, exceto no tratamento com adição de P onde coletamos néctar em apenas três plantas adultas. O néctar foi coletado com uma seringa de 0,5 ml, diluído em 500 µl de água destilada e armazenado em eppendorf dentro de nitrogênio líquido. No laboratório, as amostras foram mantidas a -80°C e posteriormente foram liofilizadas para futuras análises. Após a coleta do néctar, foram coletadas seis folhas completamente expandidas de cada plântula e planta adulta distribuídas nos tratamentos. Das seis folhas coletadas, três foram congeladas em nitrogênio líquido no campo e depois foram mantidas em -80°C para a não deterioração dos compostos fenólicos. As outras três folhas foram colocadas dentro de um isopor com gelo durante o trabalho de campo e mantidas refrigeradas para evitar degradação e perda de água e as medidas dos atributos foliares foram feitas logo após a coleta.

Análises dos atributos de qualidade e defesa da folha

Os atributos foliares mensurados foram: número de NEFs (NEF), número de NEF pelo comprimento do raquíolo (NEF/raquíolo) que é a densidade de NEF no raquíolo, largura e comprimento foliar, peso fresco, peso seco, porcentagem do conteúdo de água, macronutrientes (N, P, Ca, K, S, C e Mg), micronutrientes (Mn, B, Fe, Zn e Cu), C:N, N:P e metabólitos secundários (fenólicos totais, taninos condensados e hidrolisáveis). As características do néctar analisadas foram: concentração de glicose,

frutose, sacarose e açúcares totais em μM e porcentagem de glicose, frutose e sacarose em relação ao açúcar total.

O número de NEFs e a largura da folha foram medidos no segundo raquíolo à esquerda da folha. O comprimento da folha foi a medida da raquis. Para a mensuração do peso fresco e seco em cada folha, um disco foliar de mesma área (raio = 0.3 cm) foi pesado em balança de precisão (0.001g) antes e depois de seco em estufa a 60°C por 72 horas. A porcentagem do conteúdo de água foi medida pela fórmula ((peso fresco - peso seco/ peso fresco)*100). Tais dados (número de NEFs, densidade de NEF no raquíolo, largura e comprimento da folha, peso fresco, peso seco e porcentagem do conteúdo de água) foram obtidos em três folhas por indivíduo para o cálculo da média.

A fim de se determinar macro e micronutrientes/ peso seco, folíolos de três folhas por indivíduo utilizadas nas análises acima foram secos em estufa a 60°C por 72 horas e transformadas em pó. K, P, S, Ca, Mg, Mn e Cu foram extraídos por digestão nitro-perclórica, N por digestão com ácido sulfúrico e B por incineração. A quantificação de K, Ca, Mg, Mn, e Cu foi feita por espectrometria de absorção atômica, a de P, B e S foi realizada por espectrometria óptica e a quantificação de N foi feita por destilador de Kjeldahl. A razão C:N foi calculada como um indicador de qualidade nutricional (Bryant et al. 1983; Silva & Batalha 2011) e a razão N:P foi calculada como um indicador de qual nutriente era mais limitante (Wright et al. 2010).

A fração pelo peso total de fenólicos totais foi determinada em três folhas por indivíduo pelo teste de Folin-Denis (Waterman & Mole 1994), a de taninos condensados pelo teste do ácido butanol (Rossiter et al. 1988; Waterman & Mole 1994) e a de taninos hidrolisáveis pelo ensaio com iodeto de potássio (Bate-Smith 1977, Schultz & Baldwin 1982). O padrão foi obtido pela purificação do extrato aquoso com várias lavagens em etanol a 95% seguida por lavagens em solução aquosa de acetona a 70% em um Sephadex LH-20 com um funil de Büchner. A acetona foi removida por evaporação rotativa e o extrato aquoso foi liofilizado para a obtenção dos taninos. A absorção em cada ensaio foi determinada por cromatografia (Molecular Devis – VERSA max). A concentração de taninos e fenólicos totais foi calculada com o Software Softmax Pro, utilizando a curva obtida com o padrão.

A composição de carboidratos no néctar extrafloral foi determinada pelo cromatógrafo de íons (Dionex) integrado ao modelo ICS3000 de HPAEC-IPAD com coluna para detecção de carboidratos (CarboPac™ PA10, 2 X 250 mm). Foi usado como eluente solução aquosa de 200 mM de NaOH. As concentrações dos carboidratos

(glicose, frutose e sacarose) e de açúcar total foram calculadas com o Software de Chromeleon através de uma curva padrão nas seguintes concentrações: 0.625, 1.25, 2.5, 5.0 e 10.0 μM .

Análises estatísticas

Os dados obtidos foram agrupados em atributos de qualidade foliar e atributos de defesa. Os atributos de qualidade foliar foram a média em três folhas por indivíduo: do comprimento e da largura foliar, peso seco e conteúdo de água, a percentagem por massa seca para P, N, K, Ca, Mg, S e Cu, ppm (mg/Kg) por massa seca de Mn, Cu, B, Fe e Zn e as razões C:N e N:P. Os atributos de defesa foram: a média do número de NEFs (NEF) e a média da densidade de NEFs por raquíolo (NEF/raquíolo) em três folhas por indivíduo, a média da concentração em μM de glicose, frutose, sacarose e açúcar total do néctar coletado em quatro nectários por indivíduo, a porcentagem de glicose, frutose e sacarose em relação ao açúcar total e a fração pelo peso total de compostos fenólicos totais, taninos condensados e taninos hidrolisáveis medida em três folhas por indivíduo.

A fim de se determinar o efeito da idade nas variáveis respostas, a normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variância pelo teste de Levene ($\alpha = 0,05$). Teste t ou Mann-Whitney U Test foram usados, comparando plântulas com plantas adultas do grupo controle. Para saber o efeito aditivo da idade junto com o efeito da fertilização, todas as variáveis respostas de plântulas e plantas adultas em todos os tratamentos foram comparadas por Teste t quando os dados apresentavam distribuição normal e homogeneidade das variâncias ou Mann-Whitney U Test quando não foram alcançadas as duas premissas para se fazer testes paramétricos.

A correlação dos dados foi analisada pelo teste de correlação de Spearman para todos os pares de atributos, exceto para concentração de glicose, frutose, sacarose e açúcar total, uma vez que o número de indivíduos analisados por tratamento foi diferente do número de indivíduos analisados para os outros atributos. Além disso, as características de qualidade e defesa foliar (exceto dados de química do néctar) foram também avaliadas pela Análise de Componentes Principais (PCA), usando correlação e dois fatores. Tais testes foram feitos para plântulas e plantas adultas separadamente de todos os tratamentos.

Foram analisados os dados das plântulas e das plantas adultas separadamente para a quantificação das diferenças entre os tratamentos de fertilização em cada fase de vida da planta de *S. adstringens*. Para determinar o efeito dos tratamentos de adição de nutrientes nas plântulas e plantas adultas, a normalidade de dados e a homogeneidade da variância foram testadas por Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente ($\alpha = 0,05$). Quando necessário e se possível, os dados foram transformados, usando raiz quadrada e \log_{10} . Análise de variância multivariada (MANOVA) foi utilizada para quantificar as diferenças entre os tratamentos de adição de nutrientes com teste de Tukey. Usamos testes não paramétricos (teste de Kruskal-Wallis com valor de p de comparações múltiplas) nos dados que não conseguimos transformar ou naqueles que não obtivemos homogeneidade de variância.

3. Resultados

Nossos resultados demonstraram que características de defesa (Tabelas 1 - 3) e de qualidade (Tabela 4) da folha alteraram de plântulas para plantas adultas na área controle. As folhas das plantas adultas tiveram mais fenólicos totais e taninos condensados (Tabela 1). Além disso, os NEFs das plantas adultas produziram néctar com menor concentração de glicose do que os NEFs das plântulas (Tabela 2), apesar da porcentagem de cada tipo de carboidrato ter sido a mesma (Tabela 3). As folhas das plantas adultas também foram mais compridas e menos largas, com maior peso seco, menor concentração de nutrientes e maior razão de C:N (Tabela 4). Entretanto, a concentração de açúcares totais, frutose e sacarose entre o néctar extrafloral produzido nas adultas e nas plântulas de *S. adstringens* não diferiram. Quando comparamos plantas adultas e plântulas de todos os tratamentos, incluindo controle e tratamentos com resíduos de nutrientes, encontramos os mesmos resultados obtidos na comparação entre plantas adultas e plântulas do controle (Tabelas 5-8), exceto para número de NEFs, pois as folhas das plantas adultas tiveram menos NEFs do que as folhas das plântulas (Tabela 5).

Tabela 1. Atributos de defesa ($x \pm DP$) em plantas adultas e plântulas de *Stryphnodendron adstringens* em área de cerrado do Distrito Federal (grupo controle; sem adição de nutrientes).

| Atributos de defesa | Fase ontogênica | | | | |
|----------------------------|----------------------|----------------------|--------|--------------|-----------------|
| | Planta adulta | Plântula | t | Z | p |
| NEF | 2.068 ± 0.723 | 2.35 ± 1.445 | -0.217 | | >0.05 |
| NEF/ raquíolo | 0.273 ± 0.092 | 0.21 ± 0.104 | 1.233 | | >0.05 |
| Fenólicos totais | 0.403 ± 0.034 | 0.155 ± 0.160 | | 3.125 | <0.01 |
| Taninos condensados | 3.565 ± 0.314 | 2.397 ± 0.693 | | 3.057 | <0.01 |
| Taninos hidrolisáveis | 0.001 ± 0.000 | 0.001 ± 0.000 | 1.326 | | >0.05 |

NEF – média do número de NEFs, NEF/raquíolo – média do número de NEFs pelo comprimento do raquíolo. Números em negrito são estatisticamente significativos (n das plantas adultas = 5, n das plântulas = 20, $\alpha = 0.05$, Teste t ou Teste de Mann–Whitney U).

Tabela 2. Concentrações de açúcares ($x \pm DP$) em NEFs de plantas adultas e de plântulas de *Stryphnodendron adstringens* na área controle (sem adição de nutrientes).

| Atributos de defesa | Fase ontogênica | | | | |
|---------------------|----------------------|----------------------|--------------|--------------|-----------------|
| | Adultos | Plântulas | t | Z | P |
| Glicose | 0.272 ± 0.287 | 2.117 ± 2.546 | | 2.197 | <0.05 |
| Frutose | 0.965 ± 1.694 | 2.172 ± 2.354 | 1.556 | | >0.05 |
| Sacarose | 1.633 ± 2.363 | 1.713 ± 1.843 | 1.028 | | >0.05 |
| Açúcar total | 2.870 ± 4.245 | 6.247 ± 6.247 | 1.660 | | >0.05 |

As concentrações de glicose, frutose, sacarose, e açúcar total do néctar extrafloral estão em μM . Números em negrito são estatisticamente significativos (n das plantas adultas = 5, n das plântulas = 4, $\alpha = 0.05$, Teste t ou Teste de Mann–Whitney U).

Tabela 3. Porcentagem de açúcares ($x \pm DP$) em relação ao açúcar total de NEFs de plantas adultas e de plântulas de *Stryphnodendron adstringens* na área controle (sem adição de nutrientes).

| Atributos de defesa | Fase ontogênica | | | |
|---------------------|-----------------|---------------|--------|-------|
| | Adultos | Plântulas | t | p |
| Glicose | 0.328 ± 0.203 | 0.391 ± 0.142 | 0.527 | >0.05 |
| Frutose | 0.325 ± 0.157 | 0.401 ± 0.065 | 0.897 | >0.05 |
| Sacarose | 0.347 ± 0.200 | 0.208 ± 0.135 | -1.186 | >0.05 |

Números em negrito são estatisticamente significativos (n das plantas adultas = 5, n das plântulas = 4, $\alpha = 0.05$, Teste t ou Teste de Mann–Whitney U).

Tabela 4. Atributos de qualidade foliar ($\bar{x} \pm DP$) em plantas adultas e plântulas de *Stryphnodendron adstringens* em área de cerrado do Distrito Federal (grupo controle; sem adição de nutrientes).

| Atributos de qualidade foliar | Fase ontogênica | | | | |
|-------------------------------|------------------------|------------------------|--------|---------------|-----------------|
| | Planta adulta | Plântula | t | Z | p |
| Comprimento | 25.748 ± 6.731 | 17.865 ± 4.967 | | 2.582 | <0.01 |
| Largura | 15.378 ± 4.484 | 21.726 ± 5.908 | | -2.310 | <0.05 |
| Peso seco | 1,4 ± 0.122 | 0.835 ± 0.198 | | 3.332 | <0.01 |
| Conteúdo de água | 39.318 ± 7.334 | 54.081 ± 8.271 | | -2.859 | <0.01 |
| N | 0.122 ± 0.042 | 1.168 ± 1.042 | | -3.057 | <0.05 |
| P | 0.004 ± 0.001 | 0.065 ± 0.115 | | -3.397 | <0.01 |
| K | 0.018 ± 0.009 | 0.383 ± 0.642 | | -3.329 | <0.01 |
| Ca | 0.005 ± 0.004 | 0.007 ± 0.112 | | -3.193 | <0.01 |
| Mg | 0.006 ± 0.003 | 0.085 ± 0.123 | | -3.397 | <0.01 |
| S | 0.006 ± 0.003 | 0.102 ± 0.189 | | -3.397 | <0.01 |
| C | 2.758 ± 1.032 | 12.279 ± 9.721 | | -3.397 | <0.01 |
| C:N | 22.69 ± 1.032 | 14.497 ± 8.071 | | 2.859 | <0.01 |
| N:P | 32.436 ± 4.551 | 37.046 ± 8.037 | -1.219 | | >0.05 |
| Fe | 0.001 ± 0.0005 | 28.698 ± 44.306 | | -3.397 | <0.01 |
| Zn | 0.0004 ± 0.0002 | 7.470 ± 13.276 | | -3.397 | <0.01 |
| Mn | 0.0009 ± 0.0004 | 25.557 ± 42.332 | | -3.397 | <0.01 |
| Cu | 0.00005 ± 0.000 | 2.387 ± 3.493 | | -3.397 | <0.01 |
| B | 0.0007 ± 0,0002 | 8.427 ± 7.912 | | -3.397 | <0.01 |

Números em negrito são estatisticamente significativos (n das plantas adultas = 5, n das plântulas = 20, $\alpha = 0.05$, Teste t ou Teste de Mann-Whitney U). Unidades: comprimento e largura (cm), peso seco (mg), conteúdo de água (%), macronutrientes (mg/g), C em % por matéria seca e micronutrientes (mg/Kg).

Tabela 5. Atributos de defesa ($\bar{x} \pm DP$) em plantas adultas e plântulas de *Stryphnodendron adstringens* em área de cerrado do Distrito Federal (todos os tratamentos, efeito aditivo da idade e dos resíduos da adição de nutrientes).

| Atributos de defesa | Fase ontogênica | | | | |
|----------------------------|----------------------|----------------------|---------------|---------------|-----------------|
| | Planta adulta | Plântula | t | U | p |
| NEF | 1.871 ± 0.687 | 2.912 ± 1.468 | -2.932 | | <0.01 |
| NEF/ raquíolo | 0.243 ± 0.073 | 0.254 ± 0.126 | | 651.00 | >0.05 |
| Fenólicos totais | 0.384 ± 0.039 | 0.184 ± 0.131 | | 34.50 | <0.01 |
| Taninos condensados | 3.172 ± 0.559 | 2.089 ± 0.723 | | 190.00 | <0.01 |
| Taninos hidrolisáveis | 0.0008 ± 0,0001 | 0.0009 ± 0,0001 | | 614.50 | >0.05 |

NEF – média do número de NEFs, NEF/raquíolo – média do número de NEFs pelo comprimento do raquíolo. Números em negrito são estatisticamente significativos (n das plantas adultas = 18, n das plântulas = 80, $\alpha = 0.05$, Teste t ou Teste de Mann-Whitney U).

Tabela 6. Concentrações de açúcares ($x \pm DP$) em NEFs de plantas adultas e de plântulas de *Stryphnodendron adstringens* em área de cerrado do Distrito Federal (todos os tratamentos, efeito aditivo da idade e dos resíduos da adição de nutrientes).

| Atributos de defesa | Fase ontogênica | | | |
|---------------------|----------------------|----------------------|--------------|-----------------|
| | Adultos | Plântulas | Z | p |
| Açúcares | | | | |
| Glicose | 0.719 ± 1.63 | 1.729 ± 1.872 | 2.197 | <0.05 |
| Frutose | 0.963 ± 1.55 | 1.823 ± 1.761 | 1.864 | >0.05 |
| Sacarose | 1.336 ± 2.078 | 2.107 ± 2.412 | 1.146 | >0.05 |
| Açúcar total | 3.019 ± 4.276 | 5.659 ± 5.275 | 1.592 | >0.05 |

As concentrações de glicose, frutose, sacarose, e açúcar total do néctar extrafloral estão em μM . Números em negrito são estatisticamente significativos (n das plantas adultas = 20, n das plântulas = 15, $\alpha = 0.05$, Teste t ou Teste de Mann–Whitney U).

Tabela 7. Porcentagem de açúcares ($x \pm DP$) em relação ao açúcar total de NEFs de plantas adultas e de plântulas de *Stryphnodendron adstringens* em área de cerrado do Distrito Federal (todos os tratamentos, efeito aditivo da idade e dos resíduos da adição de nutrientes).

| Atributos de defesa | Fase ontogênica | | | | |
|---------------------|-----------------|---------------|-------|--------|-------|
| | Adultos | Plântulas | t | Z | p |
| Glicose | 0.258 ± 0.183 | 0.322 ± 0.112 | | -1.353 | >0.05 |
| Frutose | 0.443 ± 0.174 | 0.380 ± 0.124 | 1.221 | | >0.05 |
| Sacarose | 0.326 ± 0.230 | 0.299 ± 0.190 | 0.192 | | >0.05 |

Números em negrito são estatisticamente significativos (n das plantas adultas = 20, n das plântulas = 15, $\alpha = 0.05$, Teste t ou Teste de Mann–Whitney U).

Tabela 8. Atributos de qualidade foliar ($\bar{x} \pm DP$) em plantas adultas e plântulas de *Stryphnodendron adstringens* em área de cerrado do Distrito Federal (todos os tratamentos, efeito aditivo da idade e dos resíduos da adição de nutrientes).

| Atributos de qualidade foliar | Fase ontogênica | | | | |
|-------------------------------|------------------------|------------------------|---------------|---------------|-----------------|
| | Planta adulta | Plântula | t | U | p |
| Comprimento | 26.487 ± 5.646 | 19.771 ± 6.309 | 4.153 | | <0.01 |
| Largura | 17.208 ± 5.552 | 23.047 ± 5.207 | -4.247 | | <0.01 |
| Peso seco | 0.012 ± 0.002 | 0.009 ± 0.002 | 5.337 | | <0.01 |
| Conteúdo de água | 45.291 ± 8.774 | 51.480 ± 12.629 | | -2.425 | <0.01 |
| N | 0.122 ± 0.061 | 0.878 ± 0.811 | | -6.175 | <0.05 |
| P | 0.004 ± 0.001 | 0.034 ± 0.063 | | -6.496 | <0.01 |
| K | 0.016 ± 0.009 | 0.202 ± 0.356 | | -6.505 | <0.01 |
| Ca | 0.014 ± 0.018 | 0.091 ± 0.13 | | -4.973 | <0.01 |
| Mg | 0.007 ± 0.005 | 0.055 ± 0.076 | | -5.945 | <0.01 |
| S | 0.010 ± 0.006 | 0.080 ± 0.137 | | -5.936 | <0.01 |
| C | 2.950 ± 1.128 | 12.735 ± 7.507 | | -63.84 | <0.01 |
| C:N | 33.645 ± 43.675 | 19.040 ± 2.677 | | -5.843 | <0.01 |
| N:P | 33.423 ± 11.072 | 35.889 ± 7.651 | | -0.854 | >0.05 |
| Fe | 0.0014 ± 0.001 | 15.429 ± 25.623 | | -6.606 | <0.01 |
| Zn | 0.0004 ± 0.0002 | 3.898 ± 7.347 | | -6.606 | <0.01 |
| Mn | 0.0007 ± 0.0006 | 12.549 ± 23.842 | | -6.606 | <0.01 |
| Cu | 0.00004 ± 0.000 | 1.155 ± 1.999 | | -6.606 | <0.01 |
| B | 0.0008 ± 0.0004 | 5.823 ± 5.786 | | -6.606 | <0.01 |

Números em negrito são estatisticamente significativos (n das plantas adultas = 18, n das plântulas = 80, $\alpha = 0.05$, Teste t ou Teste de Mann-Whitney U). Unidades: comprimento e largura (cm), peso seco (mg), conteúdo de água (%), macronutrientes (mg/g), C em % por matéria seca e micronutrientes (mg/Kg).

Alguns atributos de defesa em plantas adultas apresentaram correlação negativa com concentração de nutrientes (Anexo I). Por exemplo, o número de NEF foi negativamente correlacionado com a concentração de P, K, Mg, C e Zn por massa seca de folha, bem como a densidade de NEF no raquíolo foi negativamente correlacionada com concentração de Ca foliar. Houve correlação negativa entre compostos fenólicos totais e concentração de S e taninos hidrolisáveis e N, K, Mg, C e Zn. Houve correlação positiva entre a concentração de Mn e a densidade de NEF no raquíolo, entre a razão de C:N e compostos fenólicos totais e entre densidade de NEF no raquíolo e taninos condensados.

A projeção dos atributos foliares das plantas adultas em dois fatores da PCA (Fig. 1) mostrou que atributos dos NEFs, compostos fenólicos e peso seco formaram um grupo que tinha correlação negativa com alguns nutrientes foliares (Mg, P, Zn, K, Fe, C e N) em relação ao fator 1. O grupo composto por atributos de defesa e peso seco também apresentou correlação negativa com conteúdo de água e concentração de Ca em

relação aos dois fatores que explicaram 58.12% da variância de todas as variáveis. O fator 1 explicou 39.65% e o fator 2 explicou 18.47% da variância.

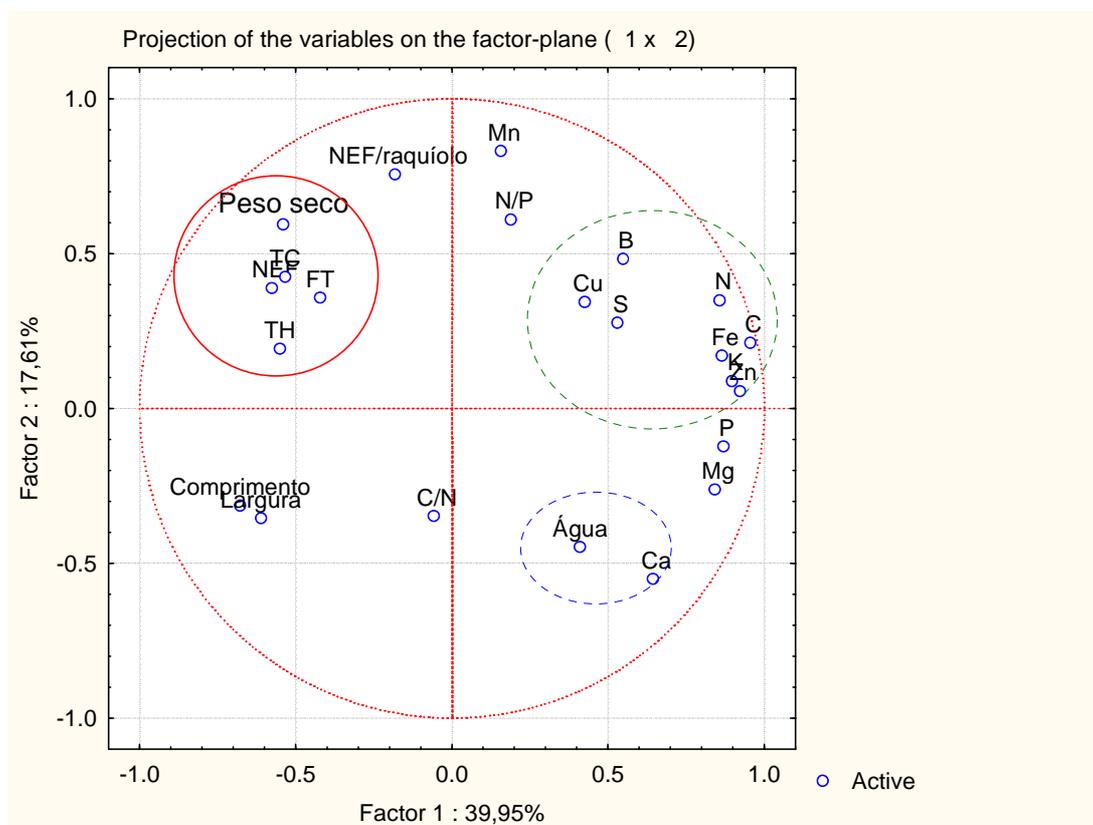


Figura 1. Ordenação das variáveis-resposta nas plantas adultas de *S. adstringens* pela Análise de Componentes Principais (PCA). Foram identificados dois grupos negativamente correlacionados em relação ao fator 1: (I) Concentração de S, Zn, Cu, Fe, B, N, C e K nas folhas (círculo pontilhado em verde) e (II) número de NEF, fenólicos totais (FT), taninos hidrolisáveis (TH), taninos condensados (TC) e peso seco (círculo contínuo em vermelho). Foram identificados dois grupos negativamente correlacionados em relação aos fatores 1 e 2: Grupo II (círculo contínuo em vermelho) e grupo III formado por conteúdo de água e concentração de Ca (círculo pontilhado em azul).

O número de NEF nas plântulas apresentou correlação negativa com alguns nutrientes foliares, como N, P, K, S, C, Zn, Fe, Mn, Cu e B (Anexo II). Este tipo de correlação não foi encontrada entre concentração de nutrientes e compostos fenólicos. Foram encontradas correlações positivas entre número de NEF e comprimento e largura da folha e número de NEF e razão de C:N. Taninos condensados e hidrolisáveis mostraram correlações diferenciadas em relação ao peso seco, sendo correlação negativa entre o peso seco e taninos hidrolisáveis e correlação positiva entre peso seco e taninos condensados. Taninos condensados apresentaram correlação negativa com o comprimento da folha.

A Análise de Componentes Principais (PCA) (Fig. 2) confirmou o resultado obtido com o índice de correlação de Spearman. Todos os nutrientes, especialmente N,

P, K, C, Fe, Cu, B e Zn, tiveram correlação negativa com o número de NEF, comprimento e largura foliar em relação ao fator 1. Os dois fatores explicaram 55.05% da variância de todas as variáveis, sendo que o fator 1 explicou 43.58% e o fator 2, 11.47%.

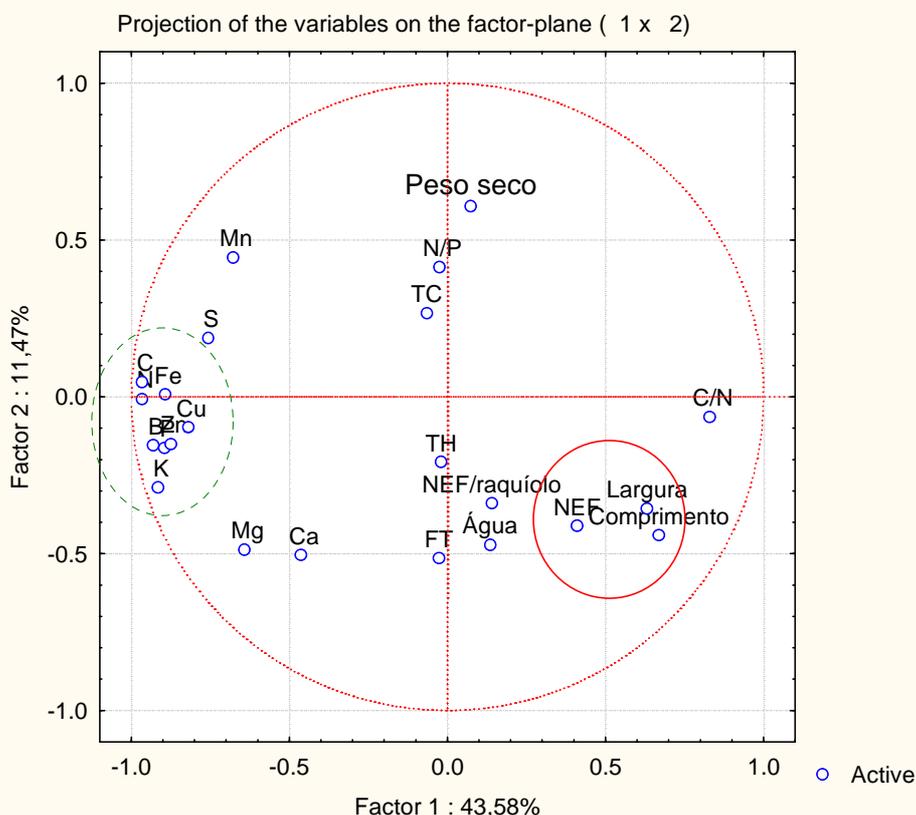
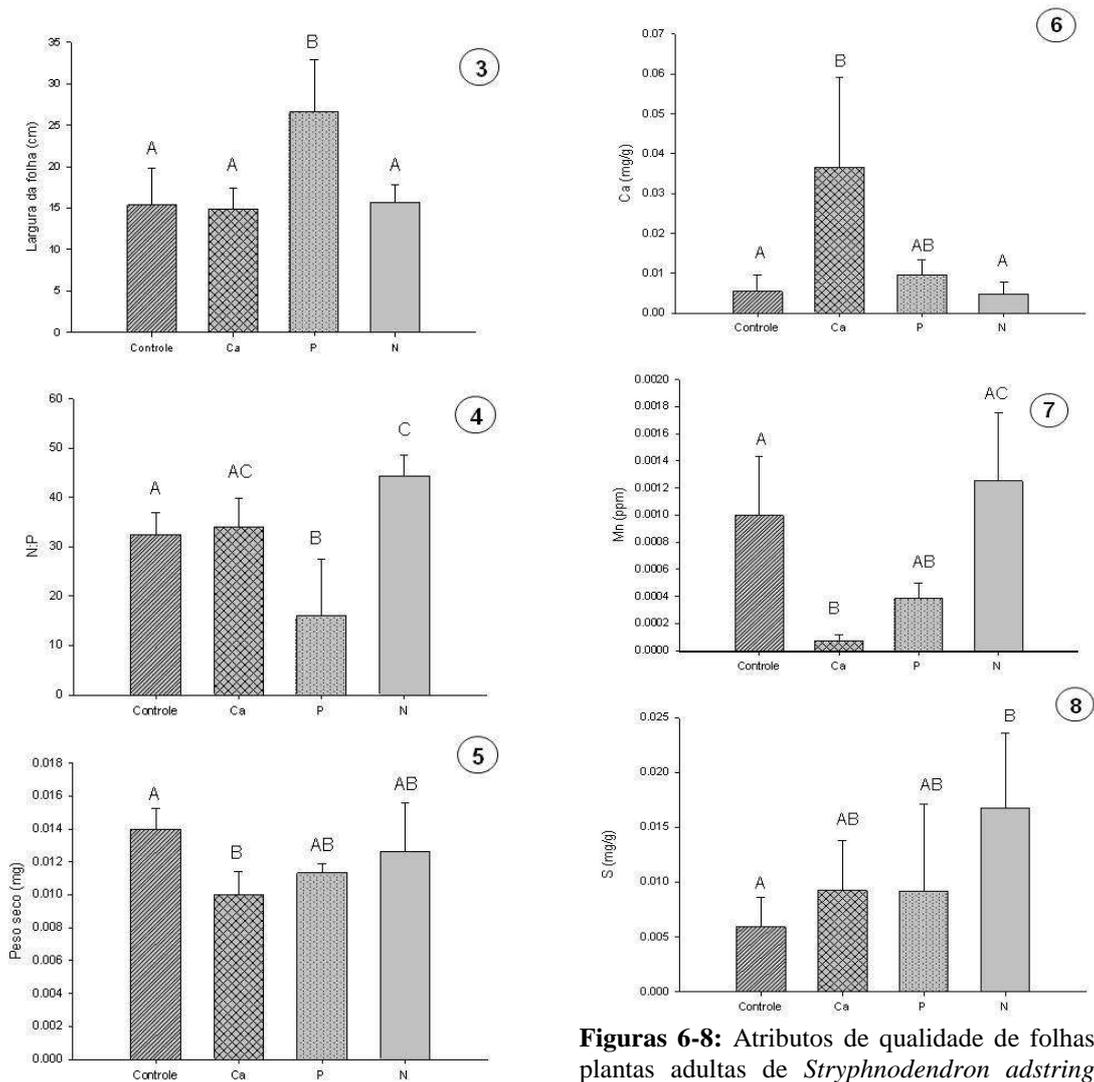


Figura 2. Ordenação das variáveis-resposta nas plântulas de *S. adstringens* pela Análise de Componentes Principais (PCA). Foram identificados dois grupos negativamente correlacionados ao fator 1: (I) concentração de Zn, Cu, Fe, B, N, C e K nas folhas (círculo pontilhado em verde), (II) número de NEF, largura e comprimento da folha (círculo contínuo em vermelho).

Após a fertilização regular de médio prazo em uma área de cerrado e dois anos sem aplicação de nutrientes, plantas adultas e plântulas de *S. adstringens* revelaram diferenças nas características de qualidade foliar, mas não nos atributos de defesas. As plantas adultas e as plântulas não mostraram diferenças na concentração de compostos fenólicos, atributos dos NEFs, concentração de açúcares do néctar e porcentagem de cada de glicose, frutose e sacarose em relação ao açúcar total entre os tratamentos.

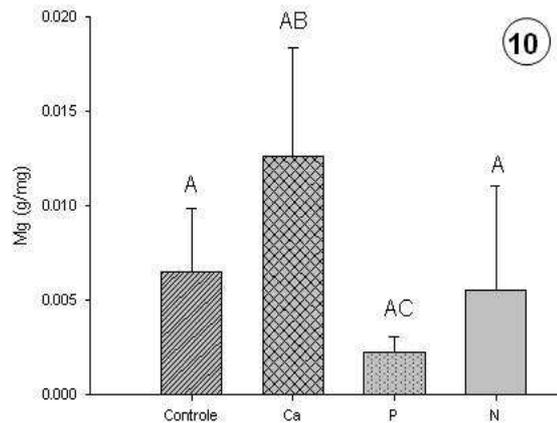
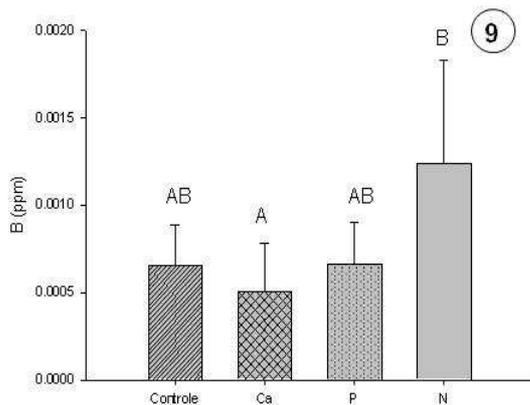
Comparando as plantas adultas submetidas aos tratamentos de adição de nutrientes com o grupo controle, foi constatado que as folhas de *S. adstringens* nas parcelas com P tiveram maior largura (Fig. 3) e menor razão de N:P (Fig. 4), plantas nas parcelas com Ca apresentaram menor peso seco (Fig. 5), maior concentração de Ca (Fig.

6) e menor concentração de Mn (Fig. 7) e plantas nas parcelas com N tiveram maior razão de N:P (Fig. 4). Plantas nas parcelas com N tiveram mais S (Fig. 8) e B (Fig. 9) por massa seca do que plantas nas parcelas com P, a concentração de Mn foi maior nas parcelas com adição de N do que nas com adição de P e Ca (Fig. 7), a concentração de Ca foi maior nas plantas das parcelas com Ca do que em parcelas com N (Fig. 6), concentração de Mg foi maior nas parcelas com Ca do que nas parcelas com P (Fig. 10) e a razão N:P foi menor nas parcelas P do que em todos os outros tratamentos, sendo também maior em parcelas N do que em parcelas do controle (Fig. 4).



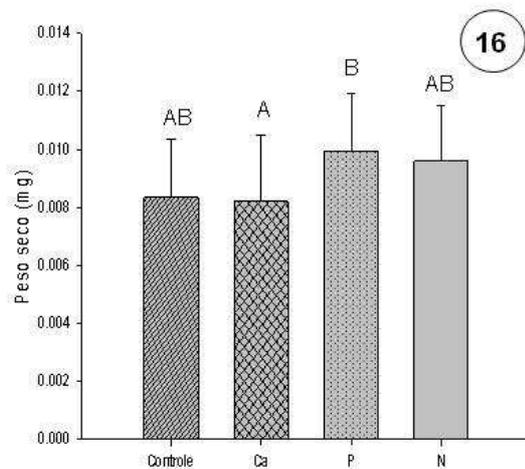
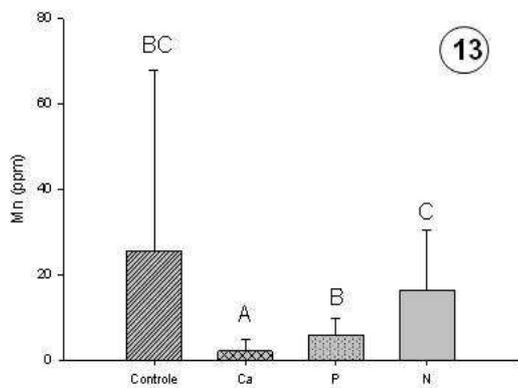
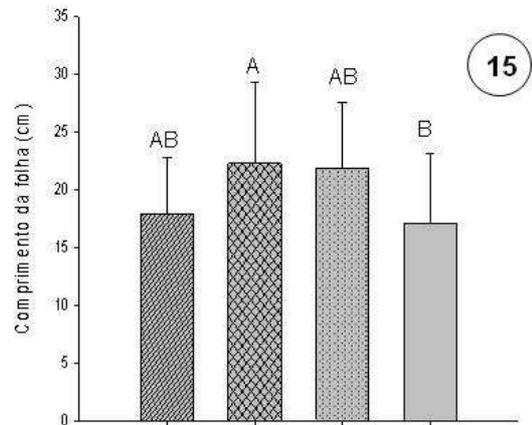
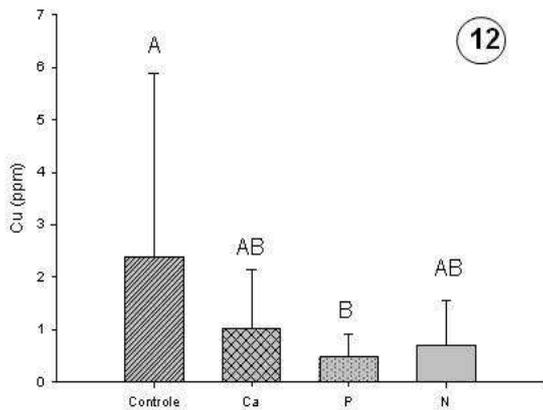
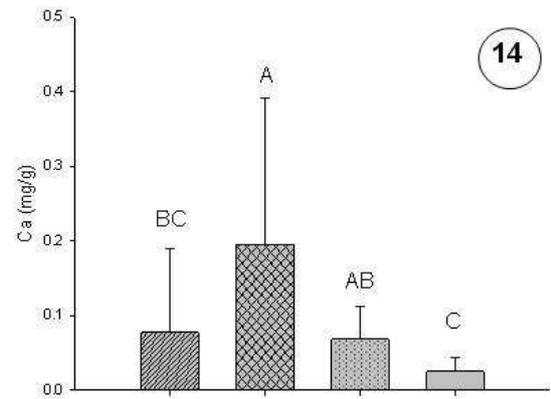
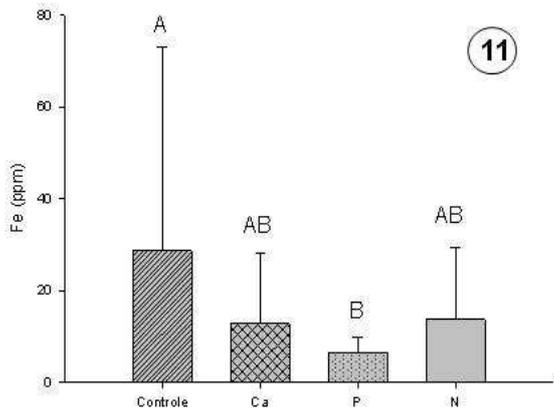
Figuras 3-5: Atributos de qualidade de plantas adultas de *Stryphnodendron adstringens* em quatro tratamentos com resíduos de adição de nutrientes. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas. Barras representam o desvio padrão, sendo $p < 0.05$. **3.** Largura da folha. **4.** Razão N:P. **5.** Peso seco (mg).

Figuras 6-8: Atributos de qualidade de folhas de plantas adultas de *Stryphnodendron adstringens* em quatro tratamentos com resíduos de adição de nutrientes. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas. Barras representam o desvio padrão, sendo $p < 0.05$. **6.** Ca em porcentagem (mg/g) por matéria seca de folhas. **7.** Mn em ppm (mg/Kg) por matéria seca de folhas. **8.** S em porcentagem (mg/g) por matéria seca de folhas.



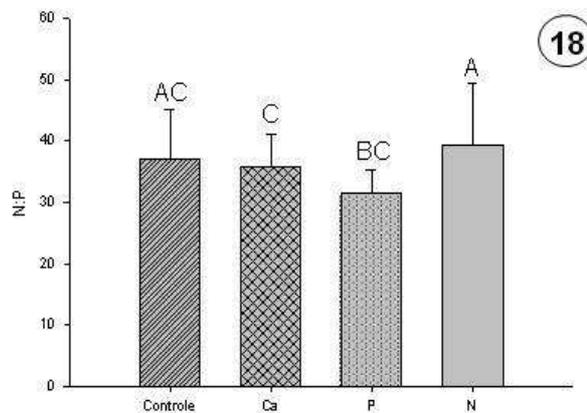
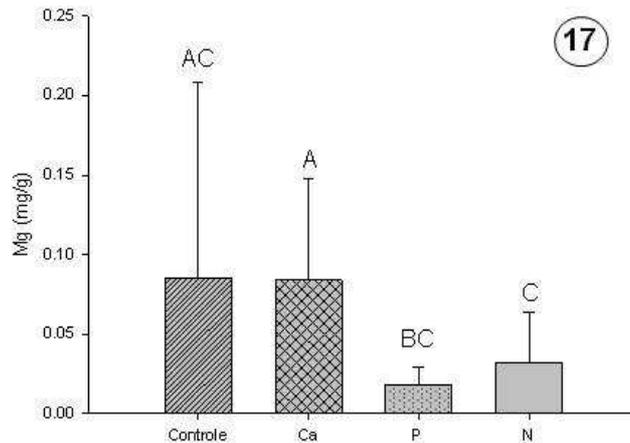
Figuras 9-10: Atributos de qualidade de folhas de plantas adultas de *Stryphnodendron adstringens* em quatro tratamentos com resíduos de adição de nutrientes. Barras representam o desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo $p < 0.05$. **9.** B em ppm (mg/Kg) por matéria seca de folha. **10.** Mg em porcentagem (mg/g) por matéria seca de folhas.

Comparando as plântulas submetidas aos tratamentos de adição de nutrientes com o grupo controle, não foi encontrada diferença entre plântulas que cresceram no controle e nas parcelas com adição de N. No entanto, plântulas nas parcelas controle apresentaram maior concentração de Fe (Fig. 11) e Cu (Fig. 12) do que plântulas nas parcelas P e indivíduos nas parcelas com Ca tiveram menos Mn (Fig. 13) e mais Ca (Fig. 14) do que indivíduos do controle. Além disso, o comprimento foliar foi maior nas plântulas com adição de Ca do que nas plantas das parcelas com adição de N (Fig. 15), o peso seco foi menor nas parcelas com Ca do que nas parcelas com P (Fig. 16) e a concentração de Ca foi maior nas parcelas com Ca do que nas com N, sendo também maior nas parcelas com P do que parcelas com N (Fig. 14). A concentração de Mg foi menor em parcelas com adição de P e maior em parcelas com adição de Ca (Fig. 17), a menor concentração de Mn foi em parcelas de Ca seguindo por parcelas de P (Fig. 13) e a razão N:P foi maior em parcelas com N e menores em parcelas com P (Fig. 18).



Figuras 11-13: Atributos de qualidade de plântulas de *Stryphnodendron adstringens* em quatro tratamentos com resíduos de adição de nutrientes. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo $p < 0.05$. Barras representam o desvio padrão. **11.** Fe em ppm (mg/Kg) por matéria seca de folhas. **12.** Cu em ppm (mg/Kg) por matéria seca de folhas. **13.** Mn em ppm (mg/Kg) por matéria seca de folhas.

Figuras 14-16: Atributos de qualidade de folhas de plântulas de *Stryphnodendron adstringens* em quatro tratamentos com resíduos de adição de nutrientes. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo $p < 0.05$. Barras representam o desvio padrão. **14.** Ca em porcentagem (mg/g) por matéria seca de folhas. **15.** Comprimento da folha. **16.** Peso seco (mg).



Figuras 17-18: Atributos de qualidade de folhas de plântulas de *Stryphnodendron adstringens* em quatro tratamentos com resíduos de adição de nutrientes. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, sendo $p < 0.05$. Barras representam o desvio padrão. **17.** Mg em porcentagem (mg/g) por matéria seca de folhas. **18.** Razão N:P.

4. Discussão

Nossos resultados demonstraram que as folhas das plantas adultas apresentam menor qualidade para os herbívoros, tendo mais defesa química e menor concentração de macro e micro nutrientes do que as folhas das plântulas de *S. adstringens* quando comparamos plantas adultas com plântulas do tratamento controle ou de todos os tratamentos. Esses resultados corroboram outros estudos que mostraram que as plantas nos primeiros estádios ontogênicos têm mais qualidade alimentar do que as plantas nos estádios ontogênicos mais avançados (Barton & Koricheva 2010; Boege & Dirzo 2004; Boege & Marquis 2005; Del-Val & Dirzo 2003). Provavelmente, a alocação de recursos para o crescimento de raízes e folhas restringe o desenvolvimento de defesa direta em plântulas, corroborando a “Hipótese de Equilíbrio entre Crescimento e Diferenciação” (Herms & Mattson 1992).

No entanto, em relação à defesa indireta, descobrimos que as plântulas do grupo controle ou de todos os tratamentos produziram néctar extrafloral com maior concentração de glicose do que plantas adultas, o que sugere que os NEFs são mais atrativos em plântulas. Na verdade, a maior concentração glicose no néctar das plântulas significa que seus NEFs produziram maior volume de néctar do que os NEFs da planta adulta, pois como o néctar coletado foi liofilizado e depois foi colocado o mesmo volume para cada amostra de néctar para a análise no cromatógrafo de íons, o que expressa que a maior concentração de glicose em μM detectada nas amostras do NEF das plântulas foi devido à maior quantidade de volume coletado nesse tipo de NEF. Tal resultado foi também corroborado quando comparamos a porcentagem de glicose entre plântulas e plantas adultas, uma vez que não houve diferença em porcentagem (quantidade relativa) para glicose. Ademais, quando comparamos todos os tratamentos, observando o efeito aditivo da idade e dos resíduos de fertilização, as plântulas tiveram mais NEF do que as plantas adultas. Como as plântulas são menores do que as plantas adultas, o aumento do número de NEFs por folha significa maior área potencial patrulhada por formigas. Assim, esses resultados sugerem que os NEFs podem ser um atributo de defesa chave para plântulas de *S. adstringens*, uma vez que muitos estudos demonstram que as formigas que são atraídas pela recompensa do néctar dos NEFs são muito eficazes para dissuadir os herbívoros (De La Fuente & Marquis 1999; Del-Claro et al. 1996 ; Oliveira & Freitas 2004), cumprindo várias funções que são também fornecidas pela defesa química (Heil et al. 2001). Além disso, o mutualismo defensivo é considerado uma alternativa de defesa anti-herbivoria relativamente barata quando comparado às defesas químicas, devido ao alto custo de síntese e armazenamento de compostos secundários (Rehr et al. 1973). Portanto, a defesa indireta via NEFs não representa um possível *trade-off* com o crescimento, como ocorre com as defesas químicas e o crescimento.

As características foliares das plantas adultas também demonstraram que elas são mais escleromórficas, com menos macro e micro nutrientes, maior peso seco e mais compostos fenólicos do que as plântulas. Sabe-se que o escleromorfismo pode ser considerado uma adaptação contra herbivoria (Coley 1983a, 1983b) das plantas adultas tiveram menor qualidade nutricional para os herbívoros se considerarmos a razão C:N. Como o elemento limitante para o desenvolvimento dos insetos herbívoros é o N (Huberty & Denno 2006), quanto menor a quantidade de N em relação à quantidade de C, menos nutritiva a planta é para seu herbívoro (Elser et al. 2000;

Huberty & Denno 2006). Portanto, além das plantas adultas serem mais defendidas quimicamente e estruturalmente, elas também são menos nutritivas, com menor concentração de nutrientes foliares e maior razão C:N.

Nossos resultados mostraram que compostos fenólicos totais e taninos hidrolisáveis tiveram correlação negativa com concentração de nutrientes foliares em plantas adultas, pois a fenilalanina fica mais disponível para a produção de fenólicos em condições de baixa produção de proteínas, quando há supressão de crescimento (Tuomi et al. 1991). Isso ocorreu em plantas adultas, pois seu investimento em crescimento é sempre menor do que em plântulas. Além disso, o peso seco apresentou correlação positiva com taninos condensados nas plantas adultas e plântulas. Como *S. adstringens* cresce em solos pobres em nutrientes e a pleno sol, seu desenvolvimento é mais limitado pela escassez de nutrientes do que pelo carbono produzido pela fotossíntese (Bryant et al. 1983). Assim, seus carboidratos produzidos em excesso são desviados para formar defesas com grandes cadeias carbônicas, tais como taninos (Bryant et al. 1983) e tecidos mecânicos (Goodland 1971) que incrementam o peso seco. Portanto, nossos resultados corroboraram parcialmente nossa hipótese de que existe correlação negativa entre nutrientes foliares e compostos fenólicos, uma vez que a comprovamos em plantas adultas e a refutamos para plântulas. Além disso, nossos resultados ratificam a hipótese de haver correlação positiva entre compostos fenólicos e peso seco da folha tanto em plantas adultas quanto em plântulas.

Nas plantas adultas e plântulas, o número de NEF teve correlação negativa com nutrientes, exceto a correlação entre número de NEF e concentração de Mn em plantas adultas. Tal resultado negou a hipótese de que a produção de nectários seja dependente de recursos nutricionais. Provavelmente, a formação de NEF não é tão custosa para a planta, pois as células formadoras do nectário são principalmente um local de armazenamento do pré-néctar oriundo do xilema e floema (Capítulo 3). Entretanto, para quantificar o verdadeiro custo da produção de NEFs em *S. adstringens*, diferentes estudos experimentais de indução de produção de NEFs e avaliação do *fitness* da planta deverão ser realizados.

Os resíduos de fertilizações regulares alteraram a concentração de nutrientes foliares em plantas adultas e plântulas de *S. adstringens*, mas não mudaram seus atributos de defesa. Portanto, nossos resultados apoiaram parcialmente a nossa hipótese que previa que os resíduos de fertilizações anteriores modificariam a qualidade da folha da planta, diminuiriam a quantidade de compostos fenólicos e

taninos e aumentaria a quantidade de NEFs. Provavelmente, os resíduos de fertilização não foram suficientes para causar alteração no metabolismo secundário da planta, assim como para aumentar a produção de NEFs adicionais. Outra explicação pode ser a de que *S. adstringens* é muito resiliente à fertilização. Assim, após dois anos sem aplicação de nutrientes, as plantas de *S. adstringens* das parcelas com adição de nutrientes voltaram para o mesmo estado de equilíbrio das plantas do grupo controle.

As características de qualidade foliar mostraram que plantas adultas nas parcelas com P tiveram menor razão de N:P do que plantas controle, e plantas adultas nas parcelas com N tiveram maior razão de N:P. Estas diferenças ocorreram, porque as plantas nas parcelas P e N absorveram mais fósforo e nitrogênio, respectivamente, durante a aplicação dos fertilizantes. O menor peso seco encontrado na plantas adultas presentes nas parcelas com Ca quando comparadas às plantas adultas do controle pode ser uma consequência do aumento do pH do solo devido à aplicação de Ca (Jacobson 2009). Sabe-se que o escleromorfismo, caracterizado também pelo aumento do peso seco das folhas, é uma característica de plantas que crescem em solos ácidos e ricos em Al (Goodland 1971; Goodland & Ferri 1979). Como o pH do solo das parcelas com Ca aumentou (Jacobson 2009), as características escleromórficas nas plantas presentes nessas parcelas diminuíram. Constatou-se que outros nutrientes foliares mudaram suas concentrações nas folhas devido à adição de fertilizantes. Por exemplo, plantas submetidas aos resíduos da adição de N tiveram maior concentração S do que plantas das parcelas controle, porque o fertilizante utilizado apresentava sulfato em sua fórmula e plantas submetidas aos resíduos da adição de Ca tiveram mais Mg do que plantas das parcelas com P por causa do calcário dolomítico. O efeito da adição dos fertilizantes na concentração de outros nutrientes foliares já havia sido constatado por Jacobson em (2009) outras espécies de plantas.

As plântulas responderam de forma diferenciada aos resíduos de fertilização quando comparadas às plantas adultas. O tratamento com adição de N não mostrou efeito quando comparado com o controle. Isso pode ter ocorrido, pois o sulfato de amônio aplicado até 2006 pode ter sido lixiviado durante os dois anos sem aplicação de nutrientes. Além disso, conforme relatado por Jacobson (2009) e Jacobson *et al.* (2011), o solo das parcelas com adição de N tornou-se mais ácido e com mais concentração de Al após a fertilização. Assim, do ponto de vista das plântulas, as condições do solo nas parcelas com resíduos de N eram semelhantes às encontradas nas parcelas controle, não existindo efeito de tratamento. Por outro lado, as plântulas

nas parcelas controle apresentaram mais micronutrientes do que as plântulas nas parcelas com Ca. Como o calcário dolomítico é corretivo de acidez (Alcarde 2007), o tratamento de Ca reduziu a acidez do solo (Jacobson 2009) o que diminuiu a disponibilidade de micronutrientes (Mn) para as plântulas (Sousa et al. 2007).

Nosso estudo mostrou que a fase ontogênica da planta influencia a qualidade da folha para os herbívoros, alterando atributos de defesa direta e indireta, concentração de nutrientes, tamanho da folha e peso seco. Também mostramos que existe um efeito aditivo da idade da planta com resíduos de nutrientes, uma vez plântulas apresentaram mais NEFs e maiores e com maior volume produzido de néctar, detectado indiretamente pela maior concentração de glicose, do que plantas adultas quando comparamos todos os tratamentos. Considerando-se defesa direta e qualidade nutricional, nosso trabalho demonstrou que plântulas são mais susceptíveis à herbivoria do que plantas adultas. Entretanto, as plântulas investiram mais em defesa indireta do que as plantas adultas, o que comprova a importância chave da interação formiga-plântula para sua defesa contra herbívoros. Além disso, os resíduos da fertilização em médio prazo, após dois anos sem adição de nutrientes, influenciaram alguns atributos foliares, tais como a concentração de nutrientes, tamanho e peso seco de plantas adultas e plântulas. Entretanto, eles não modificaram a concentração de compostos químicos de base carbônica e dos atributos dos NEFs.

Dessa forma, resíduos da fertilização de áreas de cerrado alteram alguns atributos foliares que podem resultar em mudanças nas interações planta – herbívoro, independentemente da idade da planta. Portanto, estudos que visem compreender e quantificar as mudanças nos atributos de defesa e de qualidade de plantas adultas e plântulas de espécies nativas do cerrado devido à ação de resíduos de fertilização são essenciais, uma vez que esse bioma vem sofrendo intenso processo de expansão agrícola.

ANEXOS

ANEXO I. Índice de correlação de Spearman entre atributos de qualidade foliar e características de defesa em plantas adultas de *Stryphnodendron adstringens* (n = 18, $\alpha = 0.05$), em área de cerrado do Distrito Federal (todos os tratamentos, efeito aditivo da idade e dos resíduos da adição de nutrientes).

| Atributos de qualidade foliar | Atributos de defesa | | | | |
|-------------------------------|---------------------|---------------|------------------|---------------------|-----------------------|
| | NEF | NEF/raquíolo | Fenólicos totais | Taninos condensados | Taninos hidrolisáveis |
| Comprimento | 0.363 | -0.107 | -0.027 | 0.255 | 0.351 |
| Largura | 0.407 | -0.281 | -0.290 | 0.216 | 0.168 |
| Peso seco | 0.521 | 0.479 | 0.465 | 0.716 | 0.214 |
| Conteúdo de água | -0.377 | -0.276 | -0.269 | -0.431 | -0.343 |
| N | -0.413 | 0.023 | -0.311 | -0.271 | -0.474 |
| P | -0.484 | -0.219 | -0.358 | -0.439 | -0.380 |
| K | -0.604 | -0.218 | -0.167 | -0.257 | -0.581 |
| Ca | -0.433 | -0.541 | -0.337 | -0.325 | -0.265 |
| Mg | -0.581 | -0.171 | -0.220 | -0.226 | -0.614 |
| S | 0.045 | 0.123 | -0.562 | -0.395 | -0.063 |
| C | -0.509 | -0.052 | -0.254 | -0.329 | -0.562 |
| C/N | -0.023 | 0.228 | 0.469 | 0.007 | 0.036 |
| N/P | 0.114 | 0.420 | -0.009 | 0.170 | -0.042 |
| Zn | -0.543 | -0.094 | -0.157 | -0.587 | -0.530 |
| Fe | -0.259 | 0.213 | -0.216 | -0.110 | -0.420 |
| Mn | 0.342 | 0.515 | -0.010 | 0.203 | 0.117 |
| Cu | -0.157 | 0.138 | 0.072 | -0.195 | -0.298 |
| B | -0.246 | -0.021 | -0.170 | -0.193 | -0.294 |

A concentração de macronutrientes é em porcentagem por matéria seca de folhas (mg/g) e a concentração de micronutrientes é em ppm por matéria seca de folhas. NEF – número de NEF por folha e NEF /raquíolo – densidade de NEF no raquíolo. Números em negrito são estatisticamente significativos. Unidades: comprimento e largura (cm), peso seco (mg), conteúdo de água (%), macronutrientes (mg/g), C em % por matéria seca e micronutrientes (mg/Kg).

ANEXO II. Índice de correlação de Spearman entre atributos de qualidade foliar e características de defesa em plântulas de *Stryphnodendron adstringens* (n = 80, $\alpha = 0.05$) em área de cerrado do Distrito Federal (todos os tratamentos, efeito aditivo da idade e dos resíduos da adição de nutrientes).

| Atributos de qualidade foliar | Atributos de defesa | | | | |
|-------------------------------|---------------------|--------------|------------------|---------------------|-----------------------|
| | NEF | NEF/raquíolo | Fenólicos totais | Taninos condensados | Taninos hidrolisáveis |
| Comprimento | 0.349 | 0.095 | 0.067 | -0.244 | 0.125 |
| Largura | 0.463 | 0.09 | -0.027 | -0.19 | 0.059 |
| Peso seco | -0.048 | -0.082 | -0.1 | 0.239 | -0.25 |
| Conteúdo de água | 0.11 | 0.078 | 0.057 | -0.169 | 0.131 |
| N | -0.335 | -0.146 | 0.013 | 0.001 | 0.121 |
| P | -0.295 | -0.086 | 0.049 | 0.024 | 0.07 |
| K | -0.261 | -0.045 | 0.047 | 0.049 | 0.029 |
| Ca | -0.068 | 0.042 | 0.154 | -0.153 | 0.025 |
| Mg | -0.148 | 0.022 | 0.13 | 0.012 | -0.002 |
| S | -0.282 | -0.081 | -0.051 | -0.045 | 0.047 |
| Zn | -0.247 | -0.043 | -0.001 | 0.087 | -0.024 |
| Fe | -0.33 | -0.085 | 0.035 | -0.009 | 0.077 |
| Mn | -0.321 | -0.131 | -0.166 | 0.126 | -0.017 |
| Cu | -0.246 | -0.06 | -0.04 | 0.046 | -0.014 |
| B | -0.288 | -0.05 | 0.02 | 0.124 | 0.047 |
| C | -0.378 | -0.125 | -0.015 | 0.078 | 0.016 |
| N/P | -0.049 | 0.03 | -0.151 | -0.069 | -0.011 |
| C/N | 0.354 | 0.132 | 0.014 | -0.008 | -0.08 |

A concentração de macronutrientes é em porcentagem por matéria seca de folhas (mg/g) e a concentração de micronutrientes é em ppm por material seca de folhas. NEF – número de NEF por folha e NEF /raquíolo – densidade de NEF no raquíolo. Números em negrito são estatisticamente significativos. Unidades: comprimento e largura (cm), peso seco (mg), conteúdo de água (%), macronutrientes (mg/g), C em % por matéria seca e micronutrientes (mg/Kg).

CONCLUSÃO GERAL

Nesse trabalho foram estudados atributos de defesa de duas espécies nativas do cerrado, submetidas a diferentes condições ambientais. As condições ambientais avaliadas foram: sazonalidade climática, taxas diferenciais de herbivoria, presença de fogo freqüente e resíduos de adubação a médio prazo. Tais condições são corriqueiramente observadas em área de cerrado, uma vez que esse bioma é caracterizado por uma drástica estacionalidade das chuvas, com um inverno seco e um verão chuvoso, taxas diferenciadas de herbivoria devido à grande diversidade de insetos e presença do fogo natural. Além disso, os cerrados brasileiros vêm sofrendo rápida ocupação por sistemas agrícolas e de pecuária de larga escala, com intensa aplicação de fertilizantes e uso do fogo para o manejo das culturas e do pasto. Portanto, abordamos como hipótese central do trabalho que os fatores acima poderiam ser decisivos quanto à expressão dos atributos de defesa das plantas como quantidade de NEFs, produção do néctar extrafloral, compostos secundários, características estruturais e de qualidade das folhas, assim como tolerância.

Nossos resultados demonstraram que atributos de defesa de *Maprounea brasiliensis* não variaram pela presença de queimadas freqüentes nem por diferentes níveis de herbivoria em um ramo marcado. Entretanto, demonstramos que a sazonalidade climática influenciou fortemente na expressão dos atributos de defesa, como a produção de maior quantidade e de NEFs maiores nas folhas produzidas no período seco do que nas folhas produzidas no período chuvoso. Ademais, mostramos que resíduos de fertilização de médio prazo do cerrado alteraram características foliares de *M. brasiliensis*, como concentração de nutrientes e de taninos condensados. Além dos fatores extrínsecos, como os ambientais, os fatores intrínsecos, como idade da folha e conseqüentemente dos NEFs, influenciaram fortemente a produção do néctar devido a mudanças anatômicas e estruturais, sendo que mudanças na produção do néctar modificaram o patrulhamento de formigas nos NEFs.

Por outro lado, plantas de *Stryphnodendron adstringens* comportaram-se de maneira distinta quando submetidas a condições ambientais similares às que foram submetidas plantas de *M. brasiliensis*. Por exemplo, indivíduos de *S. adstringens*, quando submetidos ao fogo periódico, produziram mais NEFs. Além disso, apresentaram variação na produção de néctar sob diferentes níveis de herbivoria nos seus ramos. Entretanto, quando sofreram apenas um evento de desfolha total, não

produziram mais NEFs, apesar de terem apresentado crescimento compensatório. Assim como em *M. brasiliensis*, os resíduos de fertilizações regulares alteraram a concentração de nutrientes foliares em plantas de *S. adstringens*, mas não mudaram seus atributos de defesa. Diferentemente de *M. brasiliensis*, a quantidade de NEFs não se modificou quando comparadas folhas produzidas na seca e folhas produzidas na chuva. Além dos fatores ambientais, nosso estudo mostrou que a fase ontogênica da planta também influenciou a expressão dos atributos de defesa da folha. As folhas das plantas adultas apresentaram mais defesa química e menos qualidade de alimento do que as folhas das plântulas. Por outro lado, as plântulas tinham mais NEFs e produziam maior concentração de glicose (uma medida indireta de volume nesse trabalho) em seu néctar do que plantas adultas.

Portanto, concluímos, por meio de experimentos controlados no campo, que diversos fatores ambientais, assim como os intrínsecos às plantas, modificaram de maneiras distintas alguns atributos foliares de *M. brasiliensis* e *S. adstringens*. Tais alterações de atributos de defesas e de qualidade foliar constituem forças *bottom-up* que podem comprometer toda a cadeia trófica. Assim, diante das grandes mudanças ambientais causadas pela ação antrópica, que modificam os padrões climáticos, a diversidade biológica, as paisagens naturais e condições edáficas, essa é uma questão que precisa ser rapidamente abordada e entendida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AB'SABER A.N. 1983. O domínio dos cerrados: introdução ao conhecimento. Revista do Servidor Público 111: 41-55.
- ADJEI-MAAFO I.K. and WILSON L.T. 1983. Factors affecting the relative abundance of arthropods on nectaried and nectariless cotton. Environmental Entomology 12: 349-352.
- AGRAWAL A.A. and FISHBEIN M. 2006. Plant defense syndromes. Ecology 87: 132-149.
- ALBERTS B., A. J., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K. and WALTER P. 2002. Molecular Biology of the Cell. Garland Science, New York.
- ALCARDE J.C. 2007. Fertilizantes. In: Novais R. F., Alvarez V. H., Barros N. F., Fontes R. L., Cantarutti R. B. and Neves J. C. L. (eds), Fertilidade do solo. Editora UFV, Viçosa, pp. 737-768.
- ANDRADE M.L. and BARONI-URBANI C. 1999. Diversity and adaptation in the ant genus *Cephalotes*, past and present. . Stuttgarter Beitrage zuer Naturkunde, Serie B. Geologie und Palaeontologie 271: 1 - 889.
- BAKER H.G. and BAKER I. 1982. Chemical constituents of nectar in relation to pollination mechanisms and phylogeny. In: Nitecki N. M. (ed), Biochemical Aspects of Evolutinary Biology. University of Chicago Press, Chicago, pp. 131-171.
- BARTON K.E. 2008. Phenotypic plasticity in seedling defense strategies: compensatory growth and chemical induction. Oikos 117: 917-925.
- BARTON K.E. and KORICHEVA J. 2010. The ontogeny of plant defense and herbivory: characterizing general patterns using meta-analysis. The American Naturalist 175: 481-493.
- BINGHAM R.A. and AGRAWAL A.A. 2010. Specificity and trade-offs in the induced plant defence of common milkweed *Asclepias syriaca* to two lepidopteran herbivores. Journal of Ecology 98: 1014-1022.
- BOEGE K. and DIRZO R. 2004. Intraspecific variation in growth, defense and herbivory in *Dialium guianense* (Caesalpinaceae) mediated by edaphic heterogeneity. Plant Ecology 175: 59-69.
- BOEGE K. and MARQUIS R.J. 2005. Facing herbivory as you grow up: the ontogeny of resistance in plants. Trends in Ecology & Evolution 20: 441-448.
- BOZZOLA J.J. and RUSSEL L.D. 1992. Electron Microscopy. Jones and Barlett Publishers, Boston.

- BRANDÃO M. 2000. Cerrado. In: Mendonça M. P. and Lins L. V. (eds), Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais. Fundação Biodiversitas, Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte, Belo Horizonte, pp. 55-63.
- BRYANT J.P., CHAPPIN F.S., REICHARDT P.B. and KLEIN D.R. 1983. Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos* 40.
- BRYANT J.P., TUOMI J. and NIEMALA P. 1988. Environmental constraint of constitutive and long-term inducible defenses in woody plants. In: Spencer K. C. (ed), *Chemical Mediation of Coevolution*. Academic Press, California.
- CARLQUIST S. 1969. Toward acceptable evolutionary interpretations of floral anatomy. *Phytomorphology* 19: 332-362.
- CASPARY R. 1848. De néctariis. Ph.D. Thesis. Adolphum Marcum, Bonn.
- CAVALCANTI R.B. and JOLY C.A. 2002. Biodiversity and Conservation Priorities in the Cerrado Region. In: Oliveira P. S. and Marquis R. J. (eds), *The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna*. Columbia University Press, New York, pp. 351-368.
- CÉSAR H.L. 1980. Efeitos da queima e corte sobre a vegetação de um Campo Sujo na Fazenda Água Limpa, Brasília-DF. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Brasília.
- COLEY P.D. 1983a. Herbivory and defensive characteristics of tree species in a lowland tropical forest. *Ecology Monograph* 53: 209-233.
- COLEY P.D. 1983b. Intraspecific variation in herbivory on two tropical tree species. *Ecology* 64: 426-433.
- CORNELISSEN J.H.C., LAVOREL S., GARNIEL E., DÍAZ S., BUCHMANN N., GURVICH D.E., REICH P.B., TER STEEGE H., MORGAN H.D., VAN DER HEIJDEN M.G.A., PAUSAS J.G. and POORTER H. 2003. A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany* 51: 335-380.
- COSTA A.N., VASCONCELOS H.L., VIEIRA-NETO E.H.M. and BRUNA E.M. 2008. Do herbivores exert top-down effects in Neotropical savannas? Estimates of biomass consumption by leaf-cutter ants. *Journal of Vegetation Science* 19: 849-854.
- COSTA F.M.C.B., OLIVEIRA-FILHO A.T. and OLIVEIRA P.S. 1992. The role of extrafloral nectaries in *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae) in limiting herbivory: an experiment of ant protection in Cerrado vegetation. *Ecology Entomology* 17: 362-365.
- COUTINHO I.A.C., VALENTE V.M.M. and MEIRA R.M.S.A. 2010. Ontogenetic, anatomical and histochemical study of the extrafloral nectaries of *Sapium biglandulosum* (Euphorbiaceae). *Australian Journal of Botany* 58: 224-232.
- COUTINHO L.M. 2002. O bioma do cerrado. In: Klein A. L. (ed), *Eugen Warming e o Cerrado Brasileiro: um século depois*. Editora Unesp, São Paulo, pp. 77-91.

- CUAUTLE M. and RICO-GRAY V. 2003. The effect of wasps and ants on the reproductive success of the extrafloral nectaried plant *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). *Functional Ecology* 17: 417-423.
- DE LA FUENTE M.A.S. and MARQUIS R.J. 1999. The role of ant-tended extrafloral nectaries in the protection and benefit of a Neotropical rainforest tree. *Oecologia* 118: 192-202.
- DEL-CLARO K., BERTO V. and RÉU W. 1996 Effect of herbivore deterrence by ants on the fruit set of an extrafloral nectary plant, *Qualea multiflora* (Vochysiaceae). *Journal of Tropical Ecology* 12 887 - 892.
- DEL-VAL E. and DIRZO R. 2003. Does ontogeny cause changes in the defensive strategies of the myrmecophyte *Cecropia peltata*? *Plant Ecology* 169: 35-41.
- DELGADO M.N., AZEVEDO A.A., SILVA L.C., VALENTE G.E. and KASUYA M.C.M. 2011a. Comparative anatomy of *Calolisianthus* species (Gentianaceae - Heliae) from Brazil: taxonomic aspects. *Edinburgh Journal of Botany* 68: 139-155.
- DELGADO M.N., SILVA L.C., BÁO S.N., MORAIS H.C. and AZEVEDO A.A. 2011b. Distribution, structural and ecological aspects of the unusual leaf nectaries of *Calolisianthus* species (Gentianaceae). *Flora* 206: 676-683.
- DIAS B.F.S.D. and MIRANDA H.S. 2010. O Projeto Fogo. In: Miranda H. S. (ed), Efeitos do regime do fogo sobre a estrutura de comunidades de cerrado: Resultados do Projeto Fogo. IBAMA - MMA, Brasília, pp. 15-52.
- DINIZ I.R., HIGGINS B. and MORAIS H.C. 2011. How do frequent fires in the Cerrado alter the lepidopteran community? *Biodiversity and Conservation* 20: 1415-1426.
- DINIZ I.R., MORAIS H.C., BOTELHO A.M.F., VENTUROLI F. and CABRAL B.C. 1999. Lepidopteran caterpillar fauna on lactiferous host plants in the central Brazilian cerrado. *Revista Brasileira de Biologia* 59: 627-635.
- EITEN G. 1972. The Cerrado vegetation of central Brazil. *Botany Review* 38: 201-341.
- EITEN G. 1994. Vegetação do cerrado. In: Pinto M. N. (ed), Cerrado: caracterização, ocupação e perspectiva. Editora Universidade de Brasília, Brasília.
- ELGER A., LEMOINE D.G., FENNER M. and HANLEY M.E. 2009. Plant ontogeny and chemical defence: older seedlings are better defended. *Oikos* 118: 767-773.
- ELIAS T.S. 1983. Extrafloral nectaries: their structure and distribution. In: Bentley B. L. and Elias T. S. (eds), *The Biology of Nectaries*. Columbia University Press, New York, pp. 174- 203.
- ELIAS T.S. and GELBAND H. 1976. Morphology and anatomy of floral and extrafloral nectaries in *Campsis* (Bignoniaceae). *American Journal of Botany* 63: 1349-1353.

- ELSER J.J., FAGAN W.F., DENNO R.F., DOBBERFUHL D.R., FOLARIN A., HUBERTY A., INTERLANDI S., KILHAM S.S., MCCAULEYK E., SCHULZ K.L., SIEMANN E.H. and STERNER R.W. 2000. Nutritional constraints in terrestrial and freshwater food webs. *Nature* 408: 578-580.
- EVERT R.F. 2006. *Esau's Plant Anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body*. Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey.
- FAHN A. 1979a. Ultrastructure of nectaries in relation to nectar secretion. *American Journal of Botany* 66: 977-985.
- FAHN A. 1979b. *Secretory Tissues in Plants*. Academic Press, London.
- FAHN A. 1988. Secretory tissues in vascular plants. *New Phytology* 108: 229-257.
- FAHN A. 2000. Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research* 31.
- FELFILI J.M., JUNIOR M.C.D.S., DIAS B.J. and REZENDE A.V. 1999. Estudo fenológico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville no cerrado sensu stricto da Fazenda Água Limpa no Distrito Federal, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 22: 83-90.
- FRANCO A.C. 2002. Ecophysiology of cerrado woody plants. In: Oliveira P. S. and Marquis R. J. (eds), *The cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna*. Columbia University Press, New York, pp. 178-198.
- FRANCO A.C., BUSTAMANTE M., CALDAS L.S., GOLDSTEIN G., MEINZER F.C., KOZOVITZ A.R., RUNDEL P. and CORADIN V. 2005. Leaf functional traits of Neotropical savanna trees in relation to seasonal water deficit. *Trees* 19: 326-335.
- FRANCO A.C. and LÜTTGE U. 2002. Midday depression in savanna trees: coordinated adjustments in photochemical, efficiency, photorespiration, CO₂ assimilation and water use efficiency. *Oecologia* 131: 356-365.
- FREY-WISSLING A. 1955. The phloem supply to the nectaries. *Acta Botanica Neerlandica* 4: 358-369.
- FURLEY P.A. 1999. The nature and diversity of neotropical savanna vegetation with particular reference to the Brazilian cerrado. *Global Ecology and Biogeography* 8: 223-241.
- FURLEY P.A. and RATTER J.A. 1988. Soil resources and plant communities of the Central Brazilian cerrado and their development. *Journal of Biogeographic* 15: 97-108.
- GENTRY G. 2003. Multiple parasitoid visitors to the extrafloral nectarines of *Solanum adherens*. Is *S. adherens* an insectary plant? *Basic and Applied Ecology* 4: 405-411.
- GONÇALVES-ALVIM S.J., KORNDORF G. and WILSON G.F. 2006. Sclerophilly in *Qualea parviflora* (Vochysiaceae): influence of herbivory, mineral nutrients, and water status. *Plant Ecology* 187: 153-162.

- GONÇALVES-ALVIM S.J., LANA T., RANIERI B.D. and WILSON G.F. 2011. Test of hypotheses about herbivory and chemical defences of *Qualea parviflora* (Vochysiaceae) in Brazilian Cerrado. *Revista Brasileira de Botânica* 34: 223-230.
- GOODLAND R. 1971. Oligotrofismo e Alumínio no Cerrado. In: Ferri M. G. (ed), III Simpósio sobre o Cerrado. Editora Edgar Blucher/ Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, pp. 44-60.
- GOODLAND R. and FERRI M.G. 1979. *Ecologia do cerrado*. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- GUILLET C. and BERGSTROM R. 2006. Compensatory growth of fast-growing willow (*Salix*) coppice in response to simulated large herbivore browsing. *Oikos* 113: 33-42.
- HANLEY M.E., FENNER M., WHIBLEY H. and DARVILL B. 2004. Early plant growth: identifying the end point of the seedling phase. *New Phytologist* 163: 61-66.
- HANS-JOACH E. 1999. Taxonomic notes on Neotropical *Maprounea* Aublet (Euphorbiaceae). *Novon* 9: 32-35.
- HARIDASAN M. 2000. Nutrição mineral das plantas nativas do Cerrado. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12: 54-64.
- HARVELL C.D. 1990. The ecology and evolution of inducible defenses. *The Quarterly Review of Biology* 65: 323-340.
- HAUKIOJA E., OSSIPOV V., KORICHEVA J., HONKANEN T., LARSSON S. and LEMPA K.S. 1998. Biosynthetic origin of carbon-based secondary compounds: cause of variable responses of woody plants to fertilization? *Chemoecology* 8: 133-139.
- HEIL M. 2011. Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends in Plant Science* 16: 191-200.
- HEIL M., BAUMANN B., ANDARY C., LINSENMAIR K.E. and MCKEY D. 2002. Extraction and quantification of "condensed tanins" as valuable measure of plant anti-herbivory defence? Revisiting and old problem. *Naturwissenschaften* 89: 519-524.
- HEIL M., FIALA B., BAUMANN B. and LINSENMAIR K.E. 2000. Temporal, spatial and biotic variations in extrafloral nectar secretion by *Macaranga tanarius*. *Functional Ecology* 14: 749-757.
- HEIL M., HILPERT A., FIALA B. and LINSENMAIR K.E. 2001. Nutrient availability and indirect (biotic) defence in a Malaysian ant-plant. *Oecologia* 126: 404-408.
- HEIL M. and MCKEY D. 2003. Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 34: 425-453.
- HEIL M., RATKE J. and BOLAND W. 2005. Postsecretory hydrolysis of nectar sucrose and specialization in ant/plant mutualism. *Science* 308: 561-563.

- HERMS D.A. and MATTSON W.J. 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *The Quarterly Review of Biology* 67: 283-335.
- HOFFMANN W.A. and FRANCO A.C. 2003. Comparative growth analysis of tropical forest and savanna woody plants using phylogenetically independent contrasts. *Journal of Ecology* 91: 475-484.
- HOFFMANN W.A., ORTHEN B. and FRANCO A.C. 2004. Constraints to seedling success of savanna and forest trees across the savanna-forest boundary. *Oecologia* 140: 252-260.
- HÖLLDOBLER B. and WILSON E.O. 1990. *The ants*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge/ Massachusetts.
- HOWE G.A. and JANDER G. 2008. Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology* 59: 41-66.
- HUBERTY A.F. and DENNO R.F. 2006. Consequences of nitrogen and phosphorus limitation for the performance of two planthoppers with divergent life-history strategies. *Oecologia* 149: 444-455.
- JACOBSON T.K.B. 2009. Composição, estrutura e funcionamento de um cerrado sentido restrito submetido à adição de nutrientes em médio prazo. Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em Ecologia. Universidade de Brasília, Brasília, p. 172.
- JACOBSON T.K.J., BUSTAMANTE M.M. and KOZOVITS A.R. 2011. Diversity of shrub tree layer, leaf litter decomposition and N release in a Brazilian Cerrado under N, P and N plus P additions. *Environmental Pollution* 159: 2236-2242.
- JANZEN D.H. 1966. Coevolution of mutualism between ants and acacias in Central America. *Evolution* 20: 249-275.
- JOHANSEN D.A. 1940. *Plant Microtechnique*. McGraw Hill Book Co, New York.
- JONES C.G. and HARTLEY S.E. 1999. A protein competition model of phenolic allocation. *Oikos* 86: 27-44.
- KARNOVSKY M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27: 137-138.
- KATAYAMA N. and SUZUKI N. 2003. Changes in the use of extrafloral nectaries of *Vicia faba* (Leguminosae) and honeydew of aphids by ants with increasing aphid density. *Annals of Entomological Society of America* 96: 579-584.
- KEINAMEN M., JULKUNEN-TIITTO R., MUTIKAINEN P., WALLS M., OVASKA J. and VAPAAVUORI E. 1999. Trade-offs in phenolic metabolism of silver birch: effects of fertilization, defoliation, and genotype. *Ecology* 80: 1970-1986.
- KELLY C.K. and HANLEY M.E. 2005. Juvenile growth and palatability in co-occurring, congeneric British herbs. *American Journal of Botany* 92: 1586-1589.

KLINK C.A. and MOREIRA A.G. 2002. Past and current human occupation, and land use. In: Oliveira P. S. and Marquis R. J. (eds), *The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna*. Columbia University Press, New York, pp. 69-90.

KNOECHELMANN C.M. and MORAIS H.C. 2008. Visitas de formigas (Hymenoptera, Formicidae) a nectários extraflorais de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae, Mimosoideae) em uma área de cerrado frequentemente queimado. *Revista Brasileira de Zoociências* 10: 35-40.

KOBAYASHI K., ASAI T., FUJIMOTO Y. and KOHSIMA S. 2008. Anti-herbivore structures of *Paulownia tomentosa*: morphology, distribution, chemical constituents and change during shoot and leaf development. *Annals of Botany* 101: 1035-1047.

KOPTUR S. 1992. Extrafloral nectary-mediated interactions between insects and plants. In: Bernays E. (ed), *Insect-Plant Interactions*. CRC Press, Boca Raton, pp. 81-129.

KORICHEVA J. 2002. Meta-analysis of sources of variation in fitness costs of plant anti-herbivore defenses. *Ecology* 83: 176-190.

KORICHEVA J., NYKÄNEN H. and GIANOLI E. 2004. Meta-analysis of trade-offs among plant antiherbivore defences: are plants jacks-of-all-trades, masters of all? *The American Naturalist* 163: 64-75.

LENZA E. and KLINK C.A. 2006. Comportamento fenológico de espécies lenhosas em um cerrado sentido restrito de Brasília, DF. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 627-638.

LOPES C. and VASCONCELOS H.L. 2011. Fire increases herbivory in a Neotropical savanna. *Biotropica* 43: 612 - 618

LORENZI H. 2000. *Árvores Brasileiras*. Vol 1. Instituto Plantarum, Nova Odessa.

LÜTTGE U. 1971. Structure and function of plant glands. *Annual Review of Plant Physiology* 22: 23-44.

MACHADO S.R., MORELLATO L.P.C., SAJO M.G. and OLIVEIRA P.S. 2008. Morphological patterns of extrafloral nectaries in woody plant species of the brazilian cerrado. *Plant Biology*: 1-14.

MAKKAR H.P.S., SIDDHURAJU P. and BECKER K. 2007. *Plant Secondary Metabolites*. Humana Press, Totowa, New Jersey.

MANTOVANI W. and MARTINS F.R. 1993. Florística do cerrado na Reserva Biológica de Moji Guaçu, SP. *Acta Botanica Brasilica* 7: 33-40.

MARQUIS R.J., DINIZ I.R. and MORAIS H.C. 2001. Patterns and correlates of interspecific variation in foliar insect herbivory and pathogen attack in Brazilian cerrado. *Journal of Tropical Ecology* 17: 127-148.

- MARQUIS R.J., MORAIS H.C. and DINIZ I.R. 2002. Interactions among Cerrado plants and their herbivores: unique or typical? In: Oliveira P. S. and Marquis R. J. (eds), *The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna*. Columbia University Press, New York, pp. 306-328.
- MARTIN J.L. and BALZINGER C. 2002. Interaction among deer browsing, hunting, and tree regeneration. *Canadian Journal of Forest Research* 32: 1254-1264.
- MARTIN N. and MÜLLER C. 2007. Induction of plant responses by a sequestering insect: Relationship of glucosinolate concentration and myrosinase activity. *Basic and Applied Ecology* 8: 13-25.
- MCDADE L.A. and TURNER M.D. 1997. Structure and development of bracteal nectary glands in *Aphelandra* (Acanthaceae). *American Journal of Botany* 84: 1-15.
- MEINZER F.C., GOLDSTEIN G., FRANCO A.C., BUSTAMANTE M., IGLER E., JACKSON O., CALDAS L. and RUNDEL P.W. 1999. Atmospheric and hydraulic limitations on transpiration in Brazilian Cerrado woody species. *Functional Ecology* 13: 273-282.
- MIRANDA H.S., SATO M.N., ANDRADE S.M.A., HARIDASAN M. and MORAIS H.C. 2004. Queimadas de cerrado: caracterização e impactos. In: Aguiar L. M. S. C., A. J. A. (ed), *Cerrado - ecologia e caracterização*. Embrapa-Cerrados, Planaltina, pp. 69-123.
- MOLE S. 1994. Trade-offs and constraints in plant-herbivore defence theory: a life-history perspective. *Oikos* 71: 3-12.
- MOLES A.T. and WESTOBY M. 2004. What do seedlings die from and what are the implications for evolution of seed size? *Oikos* 106: 193-199.
- MONDOR E.B. and ADDICOTT J.F. 2003. Conspicuous extrafloral nectarines are inducible in *Vicia faba*. *Ecology Letters* 6: 495-497.
- MONDOR E.B., TREMBLAY M.N. and MESSING R.H. 2006. Extrafloral nectary phenotypic plasticity is damage-and resource-dependent in *Vicia faba*. *Biology Letters* 2: 583-585.
- MORAIS H.C. 1980. Estrutura de uma comunidade de formigas arborícolas em vegetação de campo cerrado. M. Sc. Thesis. Campinas: São Paulo.
- MORAIS H.C. 2007. Nectários extraflorais em barbatimão: comparação entre áreas de cerrado queimado e não queimado. *Heringeriana* 1: 55-59.
- MORELLATO L.P.C. and OLIVEIRA P.S. 1994. Extrafloral nectarines in the tropical tree *Guarea macrophylla* (Meliaceae). *Canadian Journal of Botany* 72: 157-160.
- MOTTA P.E.F., CURI N. and FRANZMEIER D.P. 2002. Relation of soils and geomorphic surfaces in the Brazilian Cerrado. In: Oliveira P. S. and Marquis R. J. (eds), *The*

Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna. Columbia University Press, New York.

MUNDIM F., BRUNA E., VIEIRA-NETO E. and VASCONCELOS H. 2011. Attack frequency and the tolerance to herbivory of Neotropical savanna trees. *Oecologia*: 1-10.

NESS J.H. 2003. *Catalpa bignonioides* alters extrafloral nectar production after herbivory and attracts ant bodyguards. *Oecologia* 134: 210-218.

NÚÑEZ-FARFÁN J., FORNONI J. and VALVERDE P.L. 2007. The evolution of resistance and tolerance to herbivores. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 38: 541-566.

O'BRIEN S.P., LOVEYS B.R. and GRANT W.J.R. 1996. Ultrastructure and function of floral nectaries of *Chamelaucium uncinatum* (Myrtaceae). *Annals of Botany* 78: 189-196.

O'BRIEN T.P., FEDER N. and MCCULLY M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma* 59: 368-373.

OLIVEIRA P.S. 1997. The ecological function of extrafloral nectaries: herbivore deterrence by visiting ants and reproductive output in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae). *Functional Ecology* 11: 323-330.

OLIVEIRA P.S. and FREITAS A.V.L. 2004. Ant-plant-herbivore interactions in the neotropical Cerrado savanna. *Naturwissenschaften* 91: 557-570.

OLIVEIRA P.S. and LEITÃO-FILHO H. 1987. Extrafloral nectaries: their taxonomic distribution and abundance in the woody flora of Cerrado vegetation in southeast Brazil. *Biotropica* 19: 140-148.

OLIVEIRA P.S. and OLIVEIRA-FILHO A.T. 1991. Distribution of extrafloral nectaries in the woody flora of tropical communities in Western Brazil. In: Price P. W., Lewinsohn T. M., Fernandes G. W. and Benson W. W. (eds), *Plant-animal interactions: evolutionary ecology in Tropical and Temperate Regions*. John Wiley and Sons, New York, pp. 163-175.

OLIVER T.H., COOK J.M. and LEATHER S. 2007. When are ant-attractant devices a worthwhile investment? *Vicia faba* extrafloral nectarines and *Lasius niger* ants. *Population Ecology* 49: 265-273.

OSSIPOV V., SALMINEN J., OSSIPOVA S., HAUKIOJA E. and PIHLAJA K. 2003. Gallic acid and hydrolysable tannins are formed in birch leaves from an intermediate compound of the shikimate pathway. *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 3-16.

PAIS M.P. and VARANDA E.M. 2003. Variation in plant defenses of *Didymopanax vinosum* (Cham. & Schltdl.) Seem. (Apiaceae) across a vegetation gradient in a Brazilian Cerrado. *Acta Botanica Brasilica* 17: 395-403.

PAIVA E.A.S. 2009. Ultrastructure and post-floral secretion of the pericarpial nectaries of *Erythrina speciosa* (Fabaceae). *Annals of Botany* 104: 937-944.

- PAIVA E.A.S., BUONO R.A. and DELGADO M.N. 2007. Distribution and structural aspects of extrafloral nectaries in *Cedrela fissilis* (Meliaceae). *Flora* 202: 455-461.
- PAIVA E.A.S. and MACHADO S.R. 2006. Ontogênese, anatomia e ultra-estrutura dos nectários extraflorais de *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae-Caesalpinioideae). *Acta Botanica Brasilica* 20: 471-482.
- PARRA-TABLA V., RICO-GRAY V. and CARBAJAL M. 2004. Effect of defoliation on leaf growth, sexual expression and reproductive success of *Cnidocolus aconitifolius* (Euphorbiaceae). *Plant Ecology* 173: 153-160.
- PIGLIUCCI M., MURREN C.J. and SCHLICHTING C.D. 2006. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *The Journal of Experimental Biology* 209: 2362-2367.
- PINHEIRO A.A.S., DINIZ I.R., COELHO D. and BANDEIRA M.P.S. 2002. Seasonal pattern of insect abundance in the Brazilian cerrado. *Austral Ecology* 27: 132 - 136.
- POWER M.S. and SKOG J.E. 1987. Ultrastructure of the extrafloral nectaries of *Pteridium aquilinum*. *American Fern Journal* 77: 1-15.
- PRICE P.W., BOUTON C.E., GROSS P., MCPHERON B.A., THOMPSON J.N. and WEIS A.E. 1980. Interactions among 3 trophic levels - influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11: 41-65.
- PULLICE C.E. and PACKER A.A. 2008. Simulated herbivory induces extrafloral nectary production in *Prunus avium*. *Functional Ecology* 22: 801-807.
- RATTER J.A. 1986. Notas sobre a vegetação da Fazenda Água Limpa (Brasília, DF). *Textos Universitários* N° 3. Editora UnB, Brasília.
- RAW A. and HAY J.D. 1985. Fire and others factors affecting a population of *Simarouba amara* in cerradão near Brasília, Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 8: 101 - 107.
- REHR S.S., FEENY P.P. and JANZEN D.H. 1973. Chemical defence in Central American non ant-acacias. *Journal of Animal Ecology* 42: 405-416.
- RICO-GRAY V. and OLIVEIRA P.S. 2007. The ecology and evolution of ant-plant interactions. University of Chicago Press, Chicago.
- RIOS R.S., MARQUIS R.J. and FLUNKER J.C. 2008. Population and variation in plants traits associated with ant attraction and herbivory in *Chamaecrista fasciculata* (Fabaceae). *Oecologia* 156: 577-588.
- ROCHA D.I., SILVA L.C., VALENTE V.M.M., FRANCINO D.M.T. and MEIRA R.M.S.A. 2009. Morphoanatomy and development of leaf secretory structures in *Passiflora amethystina* Mikan (Passifloraceae). *Australian Journal of Botany* 57: 619-626.

- ROCHA J.F. and MACHADO S.R. 2009. Anatomy, ultrastructure and secretion of *Hibiscus pernambucensis* Arruda (Malvaceae) extrafloral nectary. *Revista Brasileira de Botânica* 32: 489-498.
- ROLAND A.M. 1978. General preparations and staining of thin sections. In: Hall J. L. (ed), *Electron microscopy and cytochemistry of plant cells*. Elsevier, New York, pp. 1-62.
- ROSSITER M., SCHULTZ J.C. and BALDWIN I.T. 1988. Relationships among defoliation, red oak phenolics, and gypsy moth growth and reproduction. *Ecology* 69: 267-277.
- RUDGERS J.A. 2004. Enemies of herbivores can shape plant traits: selection in a facultative ant-plant mutualism. *Ecology* 85: 192-205.
- RUDGERS J.A. and GARDENER M.C. 2004. Extrafloral nectar as a resource mediating multispecies interactions. *Ecology* 85: 1495-1502.
- RUIZ N., SALTZ D. and WARD D. 2006. The effects of herbivory and resource variability on the production of a second inflorescence by the desert lily, *Pancratium sickenbergeri*. *Plant Ecology* 186.
- SARMIENTO G. and MONASTERIO M. 1975. A critical consideration of the environmental conditions associated with the occurrence of savanna ecosystems in tropical American. In: Golley F. B. and Medina E. (eds), *Tropical Ecological Systems*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 223-250.
- SCHOEREDER J.H., SOBRINHO T.G., MADUREIRA M.S., RIBAS C.R. and OLIVEIRA P.S. 2010. The arboreal ant community visiting extrafloral nectaries in the Neotropical cerrado savanna. *Terrestrial Arthropod Reviews* 3: 3-27.
- SCHOLZ F.G., BUCCI S.G., GOLDSTEIN G., MOREIRA M.Z., MEINZER F.C., DOMEK J.C., VILLALOBOS-VEGA R., FRANCO A.C. and MIRALLES-WILHELM F. 2008. Biophysical and life-history determinant of hydraulic lift in neotropical savanna trees. *Functional Ecology* 22: 773-786.
- SCHULTZ J.C. and BALDWIN I.T. 1982. Oak leaf quality declines in response to defoliation by gypsy moth larvae. *Science* 217: 149-151.
- SENNA L.M. 1984. *Maprounea* Aubl. (Euphorbiaceae). Considerações taxonômicas e anatômicas das espécies sul-americanas. *Rodriguésia* 36: 51-78.
- SILVA D.M. and BATALHA M.A. 2011. Defense syndromes against herbivory in a cerrado plant community. *Plant Ecology* 212: 181-193.
- SIMON M.F., GREYER R., QUEIROZ L.P., SKEMA C., PENNINGTON R.T. and HUGHES C.E. 2009. Recent assembly of the Cerrado, a neotropical plant diversity hotspot, by in situ evolution of adaptations to fire. *PNAS* 106: 20359 - 20364.

- SOBRADO M.A. and MEDINA E. 1980. General morphology, anatomical structure, and nutrient concentration of sclerophyllous leaves of the “bana” vegetation of Amazonas. *Oecologia* 45: 341-345.
- SOUSA D.M.G., MIRANDA L.N. and OLIVEIRA A.S. 2007. Acidez do solo e sua correção. In: Novais R. F., Alvarez V. H., Barros N. F., Fontes R. L., Cantarutti R. B. and Neves J. C. L. (eds), *Fertilidade do solo*. Editora UFV, Viçosa, pp. 205-274.
- STAMP N. 2003. Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *The Quarterly Review of Biology* 78: 23-55.
- STEPHENSON A.G. 1982. The role of the extrafloral nectarines of *Catalpa speciosa* in limiting herbivory and increasing fruit production. *Ecology* 63: 663-669.
- STRAUSS S.Y., RUDGERS J.A., LAU J.A. and IRWIN R.E. 2002. Direct and ecological costs of resistance to herbivory. *Trends in Ecology and Evolution* 17: 278-285.
- SULTAN S.E. 2000. Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends in Plants Science* 5: 537-542.
- TAIZ L. and ZEIGER E. 2006. *Nutrição Mineral*. In: Taiz L. and Zeiger E. (eds), *Fisiologia Vegetal*. Artmed, Porto Alegre, pp. 95-113.
- TUOMI J., FAGERSTRÖM T. and NIEMELÄ P. 1991. Carbon allocation, phenotypic plasticity and induced defenses. In: Tallamy D. W., Allamy D. W. and Raupp M. J. (eds), *Phytochemical induction by herbivores*. John Wiley, New York, pp. 85-104.
- VALLADARES F., BALAGUER L., MARTINEZ-FERRI E., PEREZ-CORONA E. and MANRIQUE E. 2002a. Plasticity, instability and canalization: is the phenotypic variation in seedlings of sclerophyll oaks consistent with the environmental unpredictability of Mediterranean ecosystems? *New Phytologist* 156: 457-467.
- VALLADARES F., CHICO J.M., ARANDA I., BALAGUER L., DIZENGREMEL P., MANRIQUE E. and DREYER E. 2002b. Greater high light seedling tolerance of *Quercus robur* over *Fagus sylvatica* is linked to a greater physiological plasticity. *Trees, Structure and Function* 16: 395-403.
- VALLADARES F., SANCHEZ-GOMEZ D. and ZAVALA M.A. 2006. Quantitative estimation of phenotypic plasticity: bridging the gap between the evolutionary concept and its ecological applications. *Journal of Ecology* 94: 1103-1116.
- VAN KLEUNEN M. and FISCHER M. 2005. Constraints on the evolution of adaptive phenotypic plasticity in plants. *New Phytology* 166: 49-60.
- VASSILYEV A.E. 2010. On the mechanisms of nectar secretion revisited. *Annals of Botany* 105: 349-354.
- VIÉGAS A.P. 1945. Alguns fungos do Brasil IV: Uredinales. *Bragantia* 5: 1-144.

VIEIRA E.M., ANDRADE I. and PRICE P.W. 1996. Fire effects on a *Palicourea rígida* (Rubiaceae) gall midge: a test of the plant vigor hypothesis. *Biotropica* 28: 210-217.

WATERMAN P.G. and MOLE S. 1994. *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Blackwell Scientific, Oxford, UK.

WERGIN W.P., ELMORE C.D., HANNY B.W. and INGBER B.F. 1975. Ultrastructure of the subglandular cells from the foliar nectaries of cotton in relation to the distribution of plasmodesmata and-the sym-plastic transport of nectar. *American Journal of Botany* 62: 842- 849.

WHITTAKER R.H. and FEENY P.P. 1971. Allelochemicals - chemical interactions between species. *Science* 171: 757-770.

WITTSTOCK U. and GERSHENZON J. 2002. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 1-8.

WRIGHT D.M., JORDAN G.J., LEE W.G., DUNCAN R.P., FORSYTH D.M. and COOMES D.A. 2010. Do leaves of plants on phosphorus-impooverished soils contain high concentrations of phenolic defence compounds? *Functional Ecology* 24: 52-61.