



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ECOLOGIA, CONSERVAÇÃO E MANEJO  
DA VIDA SILVESTRE

**VANESSA CRISTINA MONTEIRO FERREIRA**

**EFEITOS DIRETOS E INDIRETOS DAS INTERAÇÕES DE TROFOBIOSE  
ENTRE HEMÍPTEROS SUGADORES E FORMIGAS NA REPRODUÇÃO DE  
UMA PLANTA ORNITÓFILA**

BELO HORIZONTE

2020

VANESSA CRISTINA MONTEIRO FERREIRA

**EFEITOS DIRETOS E INDIRETOS DAS INTERAÇÕES DE TROFOBIOSE  
ENTRE HEMÍPTEROS SUGADORES E FORMIGAS NA REPRODUÇÃO DE  
UMA PLANTA ORNITÓFILA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre.

Orientador: Prof. Dr. Frederico de Siqueira Neves

Co-orientador: Dr. Tadeu José de Abreu Guerra

BELO HORIZONTE

2020

043

Ferreira, Vanessa Cristina Monteiro.

Efeitos diretos e indiretos das interações de trofobiose entre hemípteros sugadores e formigas na reprodução de uma planta ornitófila [manuscrito] / Vanessa Cristina Monteiro Ferreira. - 2020.

54 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Frederico de Siqueira Neves. Co-orientador: Dr. Tadeu José de Abreu Guerra.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia Conservação e Manejo da Vida Silvestre.

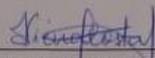
1. Ecologia. 2. Erva-de-passarinho. 3. Loranthacea. 4. Hemípteros. 5. Polinização. I. Frederico de Siqueira. II. Guerra, Tadeu José de Abreu. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 502.7

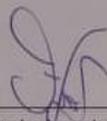
Dissertação defendida em 19 de fevereiro de 2020 e aprovada pela  
banca examinadora constituída pelos membros:



Doutor(a) Pietro Kiyoshi Maruyama



Doutor(a) Fernanda Vieira da Costa



Doutor(a) Frederico de Siqueira Neves  
(Presidente da Banca)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional ao longo desses dois anos.

Aos meus pais, Jaci e Waldete, pela confiança e apoio incondicional, por se doarem tanto pelos filhos e nunca medirem esforços para que atingíssemos nossos objetivos. Obrigada por sempre sonharem junto comigo. Amo vocês!

Aos meus irmãos Gustavo e Rayane por toda parceria e carinho.

Ao Prof. Dr. Frederico de Siqueira Neves pela orientação, confiança e apoio. Pela recepção no LEI (Laboratório Ecologia de Insetos) e por todas as oportunidades que me proporcionou durante os esses dois anos.

Ao meu co-orientador Dr. Tadeu José de Abreu Guerra por todas as ideias e sugestões e por compartilhar seu vasto conhecimento sobre as Ervas-de-passarinho.

Ao Dr. Albino Sakakibara pela identificação dos Membracidae e Aethalionidae, Dr. Takumasa Kondo pela identificação dos Coccidae, Sonia M. N. Lazzari pela identificação dos Aphidae e ao Dr. Flavio Siqueira pela identificação das formigas.

Ao Prof. Dr. Pietro Kiyoshi e a Dr. Fernanda Costa que aceitaram o convite para compor a banca.

À Laís, Tiago e aos ICs Ana, Bernardo e Ícaro pela ajuda em campo e especialmente ao Pedro Amaral por passar tantos dias em campo comigo debaixo de chuva e sol mas sempre de bom humor.

À todos os colegas da Villa pela convivência sempre agradável e trocas de informações. À Ju, Paulinho e Matheus pela amizade e por fazerem meu dia-dia mais divertido.

Aos amigos da Pós-graduação pela companhia, por tornarem esses dois anos tão divertidos e pelos almoços compartilhados.

Aos amigos da graduação Ariadna, Bruno, Lívia, Lucas e Bella por estarem sempre presentes.

Aos professores da Pós-graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre pela dedicação e pelos conhecimentos transmitidos.

À Reserva Vellozia pela hospedagem durante os campos.

Ao CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro e a FAPEMIG e CAPES pela concessão das bolsas.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	7
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	8
<b>RESUMO</b> .....	9
<b>1. Introdução</b> .....	8
<b>2. Materiais e métodos</b> .....	12
<b>2.1. Área de estudo</b> .....	12
<b>2.2. Sistema de estudo</b> .....	12
<b>2.3. Distribuição e efeito dos trofobiontes na reprodução de <i>P. robustus</i></b> .....	15
<b>2.4. Efeito da presença formigas nos polinizadores</b> .....	16
<b>2.5. Efeito dos trofobiontes na germinação e estabelecimento de <i>P. robustus</i></b> .....	17
<b>2.6. Análises estatísticas</b> .....	18
<b>3. Resultados</b> .....	20
<b>4. Discussão</b> .....	25
<b>5. Conclusões</b> .....	31
<b>6. Referências</b> .....	33
<b>7. Material Suplementar</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Campos Rupestres na Serra do Cipó - MG.....	14
Figura 2 - Rede de interações entre diferentes espécies de insetos trofobiontes e os 26 indivíduos de <i>Psittacanthus robustus</i> amostrados em uma área de Campo Rupestre da Serra do Cipó, MG.....	22
Figura 3 - Insetos trofobiontes e formigas <i>Camponotus rufipes</i> na <i>Psittacanthus robustus</i> .....	23
Figura 4 - Frequência das diferentes espécies de trofobiontes presentes em três partes diferentes da <i>Psittacanthus robustus</i> .....	24
Figura 5 - Visitação dos ramos experimentais pelo <i>Eupetonema macroura</i> .....	25
Figura 6 - Visitas pelos <i>Eupetonema macroura</i> nos três tratamentos aplicados às inflorescências.....	26
Figura 7 - Relação entre o tamanho dos frutos e o número de trofobiontes.....	28
Figura 8 - Sementes de <i>Psittacanthus robustus</i> inoculadas na <i>Vochysia thyrsoidea</i> .....	29
Figura 9 - Relação entre o número de trofobiontes e a proporção de sementes germinadas e estabelecidas.....	31
Figura S1 - Infrutescências da <i>Psittacanthus robustus</i> .....	50
Figura S2 - Experimento do efeito das formigas nos polinizadores da <i>Psittacanthus robustus</i> .....	50
Figura S3 - Experimento de inoculação de sementes de <i>Psittacanthus robustus</i> na <i>Vochysia thyrsoidea</i> .....	51
Figura S4 - Número de frutos produzidos pela <i>P. robustus</i> em função do comprimento do ramo maior.....	52
Figura S5 - Relação entre o número de indivíduos de <i>Camponotus rufipes</i> e o número total de insetos trofobiontes nos indivíduos de <i>Psittacanthus robustus</i> .....	52

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela S1 - Resumo das análises de correlação de *Pearson* para as variáveis de média de comprimento e média de largura de frutos e sementes.....53

Tabela S2 - Informações acerca das sementes inoculadas em 26 *Vochysia thyrsoidea*.....53

## RESUMO

Interações entre formigas, herbívoros sugadores e seus predadores compreendem sistemas multitróficos que podem gerar efeitos diretos e indiretos na aptidão das plantas hospedeiras. Herbívoros sugadores interagem de forma direta e antagônica ao consumir a seiva das plantas, mas também indiretamente ao estabelecer relações mutualísticas com formigas, que podem gerar custos para a reprodução da hospedeira se atuarem na repulsão dos polinizadores. Tendo em vista a variação nos custos e benefícios dessas interações, manipulamos a presença de formigas nas inflorescências e acessamos o efeito no comportamento de visitação pelos polinizadores. Registramos a abundância natural de trofobiontes e formigas numa população da planta hemiparasita e ornitófila *Psittacanthus robustus* (Loranthaceae). Também avaliamos as consequências da variação do número de herbívoros sugadores no tamanho de frutos e sementes, na sua germinação e estabelecimento das plântulas. O experimento controlando presença de formigas nas inflorescências não indicou efeitos indiretos no comportamento do principal potencial polinizador. No entanto, a alta densidade de herbívoros sugadores resultou na produção de sementes menores. Porém, os resultados do experimento de inoculação das sementes não evidenciou consequências diretas na sua germinação e estabelecimento. Nossos resultados sugerem que os efeitos indiretos não afetam a polinização da planta, embora o ataque por herbívoros trofobiontes gere um efeito direto negativo. Entretanto, esses efeitos não prejudicam a germinação e o estabelecimento das sementes indicando a tolerância ao ataque desses herbívoros. Ressaltamos a importância de estudar os efeitos diretos e indiretos em parâmetros da aptidão das plantas para esclarecer as consequências dos mutualismos formiga-trofobionte em sistemas multitróficos.

**Palavras-chave:** Erva-de-passarinho, Hemiptera, *Camponotus rufipes*, Polinização, beija-flores, Campo Rupestre, Loranthacea

## ABSTRACT

Interactions among tending-ants, sap-sucking herbivores and their predators comprise multitrophic systems that may directly and indirectly affect host plant fitness. Sap-sucking herbivores interact antagonistically with the plants, directly by consuming the sap or indirectly when establish mutualistic relationships with ants, which may also drive costs for host plant reproduction if they repel pollinators. Given the possible variation in the ecological outcomes of these interactions, we simulate the presence of ants to inflorescences in order to access effects on pollinators behavior. In addition, we recorded the trophobionts and ants natural abundance in a population of the ornithophilous plant, *Psittacanthus robustus* (Loranthaceae). We also evaluated the consequences of variation in herbivore density on size of fruits and seeds produced, but also on seed germination and seedling establishment. The experiment controlling the presence of ants in the inflorescences did not show indirect effect on the behavior of the potential pollinator. However, dense aggregations of sap-sucking herbivores resulted in smaller seeds. The inoculation experiment also failed to highlight any direct effect on seed germination or seedling establishment. Our results show that the indirect effects does not affect host plant pollination and although the attack by the trophobiont herbivores resulted in direct negative effect. Nevertheless, these effects did not affect seed germination and establishment, showing that the host plants present mechanisms of herbivory tolerance. We highlight the importance of addressing direct and indirect effects on host plant fitness parameters to clarify the possible outcomes of interactions involving multitrophic systems.

**Keywords:** Mistletoes, Hemiptera, *Camponotus rufipes*, Pollination, Hummingbirds, Campo Rupestre, Loranthaceae

## 1. Introdução

As interações bióticas entre organismos são estruturadoras das dinâmicas ecológica e evolutiva nas comunidades (Thompson 2005; Kennedy et al. 2007). O resultado das interações varia entre antagonismos e mutualismos dependendo dos custos e benefícios para os organismos envolvidos (Chamberlain et al. 2014; Revilla and Encinas 2015). Essas interações são frequentemente condicionais, com seus resultados modulados por fatores bióticos e abióticos (Bronstein 1994). Os resultados das interações podem afetar diretamente aspectos da aptidão dos organismos que interagem, sobretudo no crescimento, sobrevivência e reprodução, com consequências nos níveis populacional e da comunidade (Blüthgen et al. 2000; Herrera et al. 2002; Davidson et al. 2003). Em sistemas multitróficos compostos por plantas, herbívoros e seus predadores, os resultados das interações podem ser complexos, e para que sejam claramente compreendidos, é necessário considerar os efeitos diretos e indiretos das espécies pertencentes ao sistema biológico (Abdala-Roberts et al. 2019; McClean et al. 2019).

As interações entre plantas, herbívoros sugadores de seiva, formigas protetoras e seus predadores figuram entre os sistemas multitróficos mais bem estudados (Way 1963; Buckley 1987; Delabie 2001). Nesses sistemas, ocorrem interações mutualísticas entre os herbívoros sugadores, geralmente hemípteros, que são protegidos por formigas contra seus inimigos naturais, em troca de um líquido rico em carboidratos e aminoácidos excretado por esses insetos (Delabie, 2001). Essa interação entre hemípteros sugadores e formigas é denominada trofobiose e pode resultar em custos e benefícios para as plantas envolvidas. Os resultados dessa interação de trofobiose dependem dos efeitos diretos da herbivoria por esses sugadores e dos efeitos indiretos mediados pela presença das

formigas nas plantas. Insetos sugadores de seiva interagem de forma antagônica com suas plantas hospedeiras, acarretando custos diretos que envolvem a redução do crescimento, da capacidade fotossintética e da reprodução (Dungan et al. 2007; Zvereva et al. 2010). No entanto, algumas espécies de formigas atraídas por insetos sugadores trofobiontes podem apresentar um comportamento agressivo repelindo ou predando outros insetos herbívoros, potencialmente mais danosos para a planta. Conseqüentemente, o patrulhamento pelas formigas atraídas pelos insetos sugadores pode alterar a comunidade de herbívoros associados às plantas hospedeiras e, de forma indireta, reduzir os efeitos negativos da herbivoria por outras espécies (Styrsky and Eubanks 2007; Styrsky and Eubanks 2010; Zhang et al. 2012).

Os efeitos diretos e indiretos das interações nesses sistemas multitróficos são dependentes da densidade de insetos trofobiontes. Os custos causados por esses insetos são intensificados quando ocorrem em altas densidades, devido ao maior consumo de seiva, bem como o aumento da transmissão de patógenos para as hospedeiras (Buckley 1987; Delabie 2001; Renault et al. 2005). No entanto, o aumento na densidade de insetos trofobiontes também pode acarretar no aumento significativo do número de formigas nas plantas, mediando os resultados desse mutualismo (Cushman and Whitham 1991; Morales 2000; Blüthgen et al. 2006). Os custos e benefícios indiretos da presença de formigas nas plantas também podem aumentar com a densidade de trofobiontes (Floate and Whitham 1994; Levan and Holway 2015). Além disso, a presença de formigas nas plantas também pode afetar as interações com outros mutualistas. Por exemplo, quando ocorrem nas inflorescências, os mutualismos formiga-trofobionte podem influenciar o comportamento dos polinizadores (Levan and Holway 2015; Ibarra-Isassi and Oliveira 2018). Formigas agressivas presentes nas flores e inflorescências podem afugentar visitantes florais (Ness 2006; Lach 2008), que por sua vez podem evitar os ramos

reprodutivos em respostas à pistas olfatórias (Li et al. 2014) ou visuais (Cembrowski et al. 2014) da presença das formigas. Como consequência da redução na polinização, o sucesso reprodutivo da planta hospedeira também pode ser comprometido (Levan and Holway 2015; Ibarra-Isassi and Oliveira 2018). Dessa forma, a presença de mutualismos formiga-trofobionte podem gerar conflitos para a planta hospedeira, com consequências que irão depender do balanço entre os custos e benefícios das interações diretas e indiretas entre os organismos presentes no sistema (Carrol and Janzen 1973; Buckley 1987; Lach 2003).

A maioria dos estudos indicam que os efeitos indiretos da presença de formigas podem beneficiar as plantas, com um ganho líquido para as plantas hospedeiras dos herbívoros trofobiontes (Rosumek et al. 2009; Styrsky and Eubanks 2010). Numa meta-análise, Zang et al. (2012) encontraram que na presença de formigas, plantas hospedeiras tem uma taxa de herbivoria 55% menor, embora isso não se traduza necessariamente em um maior crescimento e reprodução. No entanto, a grande maioria dos estudos tem avaliado os efeitos sobre as taxas de herbivoria por mastigadores, com a produção de frutos e sementes avaliada em menor frequência (Styrsky and Eubanks 2010; Zang et al. 2012), e apenas mais raramente sobre a viabilidade das sementes (Canedo-Júnior et al. 2017). Até o momento, nenhum estudo avaliou especificamente como a presença e a variação na abundância de insetos trofobiontes e presença de formigas influenciam na qualidade das sementes e no seu estabelecimento em campo. Além disso, até o momento, o efeito da presença de formigas sobre o comportamento de visitantes florais foi avaliado principalmente para plantas polinizadas por abelhas (Levan and Holway 2015; Ibarra-Isassi and Oliveira 2018). As consequências dessa interação formiga-trofobionte sobre os serviços de polinização realizados por vertebrados permanecem inexplorados.

A erva-de-passarinho *Psittacanthus robustus* Mart. (Loranthaceae) é uma planta hemiparasita aérea comumente associada à árvores das famílias Vochysiaceae e Melastomataceae (Monteiro et al. 1992), especialmente em áreas de campo rupestre (Guerra et al. 2018). Para completar seu ciclo de vida, essa erva-de-passarinho é dispersa por aves e necessita que suas sementes sejam depositadas diretamente sobre galhos de suas hospedeiras vivas e susceptíveis para o estabelecimento (Monteiro et al. 1992; Guerra and Pizo 2014). Suas flores apresentam uma corola tubular amarela e produzem néctar de forma copiosa, sendo altamente atrativas para beija-flores que atuam como seus polinizadores efetivos em áreas de campo rupestre (Guerra et al. 2014). Além disso, essa espécie é hospedeira de diversos insetos fitófagos sugadores de seiva que são trofobiontes e interagem com diferentes espécies de formigas (Guerra et al. 2011; Freitas and Rossi 2015). Sabe-se que a presença do mutualismo formiga-trofobionte pode afetar a comunidade de insetos associados às plantas (Freitas and Rossi 2015). No entanto, as consequências das interações entre os insetos trofobiontes, formigas e polinizadores na aptidão dessa planta hemiparasita permanecem inexplorados.

Nesse trabalho, buscamos entender como as interações entre insetos trofobiontes e formigas podem influenciar em componentes da aptidão de *P. robustus* em áreas de campo rupestre da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. Primeiramente fizemos uma descrição do sistema planta-trofobiontes-formigas, caracterizando a rede de interações entre os indivíduos da população da planta hospedeira e seus trofobiontes associados. Posteriormente, realizamos um experimento manipulando a presença de formigas em campo testando a predição de que o forrageamento das formigas atraídas pelos trofobiontes presentes nos ramos reprodutivos de *P. robustus* deve afetar negativamente a visitação pelas aves polinizadoras. Portanto, esperamos que o número de visitas bem como o número de inserções de bicos nas flores sejam menores nos ramos com formigas

quando comparados aos ramos onde as mesmas estão ausentes. Também, avaliamos a variação na abundância de insetos sugadores trofobiontes e correlação com parâmetros da reprodução da planta hemiparasita, incluindo número e tamanho dos frutos e das sementes, sua germinação e estabelecimento através de um experimento de inoculação. Assumimos que plantas com maior abundância de trofobiontes iriam ter como custos menor número e tamanho de sementes, assim como uma menor probabilidade de germinação e estabelecimento.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1. Área de estudo**

Conduzimos o estudo na Reserva Vellozia, área privada de proteção localizada na porção sul da Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais, Brasil (43° 35'W, 19° 17'S), situada na APA morro da pedreira e próxima ao Parque Nacional Serra do Cipó. Realizamos a coleta de dados no ecossistema Campos Rupestre em áreas variando de 1100 até 1200 m. A formação vegetal associada aos afloramentos rochosos é característica do campo rupestre, com estrato herbáceo, arbustos e subarbustos esparsos verdes e esclerófilos (Figura 1a) (Le Stradic et al. 2015). As características especiais de clima, solo e relevo desses locais têm favorecido a existência de inúmeras áreas de endemismo. O solo desses ecossistemas é composto principalmente por quartzito sendo predominantemente ácidos rasos e oligotróficos (Silveira et al. 2016). O clima da região é mesotérmico, do tipo Cwb de Köppen (1948), com invernos secos de maio a setembro e verões chuvosos de outubro a abril (Alvares et al. 2013).

### **2.2. Sistema de estudo**

O sistema estudado envolve a planta hemiparasita *Psittacanthus robustus* Mart. (Loranthaceae), uma planta com ampla distribuição na América do Sul, em especial no

Bioma do Cerrado (Monteiro et al. 1992). É comumente associada às plantas hospedeiras do clado Myrtales, sobretudo Vochysiaceae, mas também em Melastomataceae. Na área de estudo as principais hospedeiras são espécies arbóreas especialmente *Vochysia thyrsoidea* (Vochysiaceae), embora também infecte *Qualea cordata*, *Qualea dichotoma* (Vochysiaceae), *Trembleya laniflora* e *Miconia ferruginata* (Melastomataceae) (Guerra et al. 2011). *Psittacanthus robustus* apresenta inflorescências umbeladas terminais e axilares dispostas frequentemente em tríades. As flores são hermafroditas e comumente abrem sequencialmente na mesma inflorescência sendo visitadas por diversas espécies de beija-flores e pássaros (Guerra et al. 2014). A antese é diurna começando entre 05:00 e 07:00 h sendo que as flores duram entre 3 – 4 dias. A floração ocorre na estação chuvosa (Novembro – Março) enquanto a frutificação ocorre na estação seca (Abril – Setembro). As flores são polinizadas por espécies de beija-flores sendo a produção de sementes limitada em flores autopolinizadas (Guerra et al. 2014). Os frutos produzem uma única semente que são dispersas principalmente pela ave *Eleania Cristata* (Tyrannidae) (Figura 1) (Pelzeln, 1868) (Guerra dados não publicados).

Na área de estudo, *P. robustus* é atacada por diversos insetos fitófagos trofobiontes, sendo as espécies frequentes: *Guayaquila xiphias* Fabricius 1803 (Hemiptera: Membracidae); *Aethalion reticulatum* Linnaeus 1767 (Hemiptera: Aetalionidae); *Eurystethus microlobatus* Ruckes 1966 (Hemiptera: Pentatomidae) e algumas espécies de afídeos. Todas essas espécies estabelecem relação de trofobiose com espécies de formigas, sobretudo, *Camponotus rufipes* (Formicidae) considerada numericamente dominante em relação às demais formigas (Guerra et al. 2011; Freitas and Rossi 2015). Além disso, *C. rufipes* apresenta comportamento agressivo, comumente observada excluindo outras espécies de formigas das agregações de insetos trofobiontes (Guerra et al. 2011).



**Figura 1.** a) Campos rupestres da Serra do Cipó com vegetação típica de arbusto e subarbusto crescendo em afloramentos rochosos; b) Indivíduo adulto de *Psittacanthus robustus* parasitando *Vochysia thyrsoidea*; c) e d) Inflorescências e e) e f) Infrutescências de *Psittacanthus robustus*.

### 2.3. Distribuição e efeito dos trofobiontes na reprodução de *P. robustus*

Para descrever o sistema e avaliar como a abundância de trofobiontes afeta a reprodução, germinação e estabelecimento da *P. robustus*, durante o mês de julho (2018), selecionamos 26 indivíduos de *P. robustus* que apresentavam entre eles variação natural na abundância de insetos trofobiontes. Essas hemiparasitas parasitavam diferentes indivíduos de *V. thyrsoidea*. Para cada *P. robustus* registramos o número total de frutos verdes na fase de pré-dispersão. Posteriormente, pelo menos duas infrutescências de cada indivíduo foram ensacas com tule antes da maturação dos frutos. Os sacos de tule permitiram a livre movimentação das formigas e trofobiontes nos ramos das plantas, mas evitaram a predação pré-dispersão e a remoção desses frutos (Figura S1). Entre os meses de Julho e Outubro coletamos de 3 a 12 frutos maduros de cada *P. robustus*. Utilizamos essas sementes provenientes das infrutescências ensacadas de cada indivíduo de *P. robustus* para medir o efeito da densidade de trofobiontes no comprimento e largura tanto dos frutos, quanto das sementes, utilizando um paquímetro de precisão digital (150MM-6 MARBERG). Essas foram também utilizadas em experimentos de inoculação nas hospedeiras e avaliação da germinação e estabelecimento (ver abaixo para mais detalhes).

No final do mês de julho do mesmo ano, em cada indivíduo selecionado registramos: 1) Altura - tamanho do ramo maior como indicativo do tamanho da planta (Guerra et al. 2011); 2) Número de indivíduos de cada espécie de inseto trofobionte, incluindo adultos e ninfas; 3) localização dos insetos na planta, sendo que as plantas foram divididas em: haustório (raiz), ramo primário (ramos emergindo do haustório), ramos secundários e folhas (ramos emergindo dos ramos primários) e ramos reprodutivos (infrutescências) 4) Número de formigas da espécie *Camponotus rufipes*. Realizamos esses registros no período de 8:00 – 17:00 h.

Durante a frutificação há intensificação de transporte de nutrientes via floema favorecendo um ambiente de alta qualidade para insetos sugadores (Quental et al. 2005). Dessa forma, os censos foram feitos em Julho que corresponde ao pico do período de maturação dos frutos da *P. robustus* (Guerra dados não publicados).

#### **2.4. Efeito da presença formigas nos polinizadores**

Para avaliar o efeito da presença de formigas nos potenciais polinizadores realizamos um experimento envolvendo a manipulação da presença de formigas e a avaliação da visitação por beija-flores em condições naturais. Para simular a ocupação pelas formigas fixamos nas inflorescências, indivíduos de *Camponotus rufipes* (~ 0,7 cm, Formicinae) previamente coletados e fixados com auxílio de formol (Ibarra-Isassi and Oliveira 2018).

Selecionamos 10 indivíduos de *P. robustus* com uma distância mínima de 30 m entre si. Em cada indivíduo selecionamos aleatoriamente 3 ramos reprodutivos com alturas similares onde estabelecemos os seguintes tratamentos: 1) Inflorescências sem formigas (controle 1); 2) Inflorescências com 10 gotas de cola (controle 2 para a presença de cola); 3) Inflorescências com 10 indivíduos de *C. rufipes* fixadas com cola (a base de água/ não tóxica). Todas as outras inflorescências foram cortadas para restringir as visitas aos ramos experimentais. Impedimos o acesso de formigas, por meio da aplicação de uma resina atóxica (Tanglefoot©) na base dos ramos reprodutivos (Figura S2). Além disso, todos os dias antes de iniciar as observações as inflorescências foram checadas a fim de manter um número idêntico de flores em antese e botões florais nos três tratamentos de um mesmo indivíduos. Também controlamos as idades das flores baseadas na coloração da corola, que é amarela nos dois primeiros dias, tornando-se mais alaranjada a partir do terceiro dia de antese. Dessa forma, mantivemos os três tratamentos com flores da mesma idade aproximada, afim de evitar algum ruído nas taxas de visitação

em função da coloração, uma vez que flores mais velhas tendem a ter menos néctar que é reabsorvido ao longo da antese (Guerra et al. 2014). Portanto, cada bloco experimental consistiu nos três tratamentos expostos simultaneamente em uma mesma planta. Realizamos as observações com o auxílio de binóculos (Nikon 10 x 50) totalizando 10 horas por indivíduo, sendo distribuídos cinco períodos de uma hora por dia durante cinco dias, sempre entre as 8:00h – 12:00 e 15:30 - 18h (50 horas de observação focal na população). Os horários de observação para cada indivíduo foram aleatorizados de forma que todas as plantas foram observadas todos os dias nos diferentes intervalos ao longo do dia até o final do experimento.

Durante as observações, consideramos como visita os eventos onde ocorreram o contato do polinizador com os verticilos florais e potencial consumo de néctar em pelo menos em uma das flores. Registramos a espécie e o número de provas de néctar (inserção do bico no interior da corola) pelo potencial polinizador nos diferentes tratamentos de um mesmo indivíduo em cada intervalo de hora.

## **2.5. Efeito dos trofobiontes na germinação e estabelecimento de *P. robustus***

Para realizar a avaliação dos efeitos da densidade de insetos trofobiontes sobre a germinação e estabelecimento de *P. robustus*, utilizamos as mesmas sementes medidas e provenientes dos 26 indivíduos selecionados, para um experimento de inoculação nas hospedeiras. Aderimos as sementes advindas de cada indivíduo de *P. robustus* em um indivíduo de *V. thyrsoidea* não infectado. As sementes foram fixadas através da viscina (substância pegajosa) presente na região apical, sempre em ramos vivos determinados pela presença de folhas verdes com diâmetro de 1 – 1,5 cm. Inoculamos cada conjunto de sementes oriundas de um indivíduo de *P. robustus* em um mesmo indivíduo de *V. thyrsoidea* (N = 26) 24 horas no máximo após a coleta e medição dos frutos nas plantas.

As sementes foram inoculadas em ramos distintos, contendo entre 1 – 4 sementes por ramo os quais foram devidamente marcados para o acompanhamento dos diferentes estádios das sementes.

Após as inoculações monitoramos as sementes em intervalos de aproximadamente 30 dias entre os censos, durante 1 ano (12 meses). Em cada censo, as sementes foram classificadas em: 1) Não germinada; 2) Germinada (abertura dos cotilédones e emergência do epicótilo) e 3) Estabelecida (com desenvolvimento dos folíolos) (Figura S3) (Ramírez and Ornelas 2012). A ocorrência dos estádios e o tempo de germinação e estabelecimento de todas as sementes foram registradas até o final do experimento.

## **2.6. Análises estatísticas**

Para descrever a distribuição das diferentes espécies de trofobiontes nos indivíduos da planta hemiparasita *P. robustus* construímos uma rede bipartida de interações. As espécies de trofobiontes foram ordenadas em colunas e cada indivíduos de *P. robustus* nas linhas indicando interação de forma quantitativa. Dessa forma as interações na rede correspondem a abundância de cada espécie de trofobiontes no sistema.

Aplicamos o modelo misto linear generalizado (GLMM) para testar o efeito da presença de formigas na visitação e no número de provas pelo polinizador. Utilizamos como variável preditora os diferentes tratamentos (cola, controle e formiga) e como variável resposta o número de visitas e o número de provas pelos potenciais polinizadores. Os indivíduos de planta foram considerados variável aleatória assumido a distribuição de erros binomial negativa.

Para testar o efeito do número de trofobiontes na abundância de formigas *C. rufipes* utilizamos o modelo linear generalizado (GLM) com distribuição dos erros quasipoisson após a adequação do modelo.

Aplicamos testes de *Correlação de Pearson* entre as variáveis de comprimento e largura dos frutos e sementes e retiramos variáveis com correlações  $\geq 55\%$ . O comprimento e largura dos frutos apresentaram forte correlação com o comprimento e largura das sementes. Dessa forma, utilizamos apenas o comprimento e largura das sementes para as análises posteriores (Tabela S1).

Posteriormente, para avaliar o efeito da abundância de trofobiontes na reprodução de *P. robustus*, utilizamos como variáveis respostas: 1) médias de comprimento das sementes 2) médias da largura das sementes. As variáveis preditoras foram: Número de trofobiontes, e as covariáveis número de frutos produzidos e a altura da planta (tamanho do ramo maior). As covariáveis foram incluídas uma vez que poderia ocorrer balanço de alocação de recurso entre o tamanho da planta ou número de frutos produzidos e o tamanho das sementes. Além disso, também, aplicamos testes de correlação entre as variáveis preditoras e retiramos as variáveis com  $\geq 55\%$  (Figura S4). Em ambas análises utilizamos modelos lineares generalizados (GLMs) com distribuição de erros gaussianas.

Ademais, ainda para avaliar o efeito da abundância de trofobiontes na reprodução de *P. robustus*, utilizamos o número total de frutos produzidos como variável resposta e a abundância de trofobiontes como variável explicativa. Aplicamos modelo linear generalizado (GLM) com a distribuição de erros quasipoisson, após a adequação do modelo.

Para testar se a germinação e estabelecimento das sementes são afetados pela abundância de insetos trofobiontes, utilizamos modelos lineares generalizados de efeitos mistos (GLMMs) com distribuição de erros binomial. Como variável preditora, utilizamos o número de insetos trofobiontes e como variáveis resposta a proporção de sementes germinadas e proporção de plântulas estabelecidas em cada indivíduo de *V. thyrsoidea*. Os indivíduos de *V. thyrsoidea* (N = 25) foram considerados variável

aleatória. Não incluímos no modelo sementes: perdidas, atacadas por herbívoros ou cujos galhos dessecaram antes da germinação.

Por fim, utilizamos análises de sobrevivência com distribuição Weibull, para testar se a abundância de trofobiontes afeta o tempo necessário de 1) germinação e 2) estabelecimento das plântulas (N = 150). Com isso, utilizamos a abundância de trofobiontes como variável preditora, bem como o tempo de germinação e estabelecimento como variáveis respostas. Os indivíduos de *V. thyrsoidea* (25) foram considerados variável aleatória. As sementes perdidas foram incluídas, sendo atribuídas a elas a não ocorrência do evento (germinação ou estabelecimento) até o tempo (dias) do último registro. Não incluímos no modelo as sementes atacadas por herbívoros ou cujos galhos dessecaram antes da germinação.

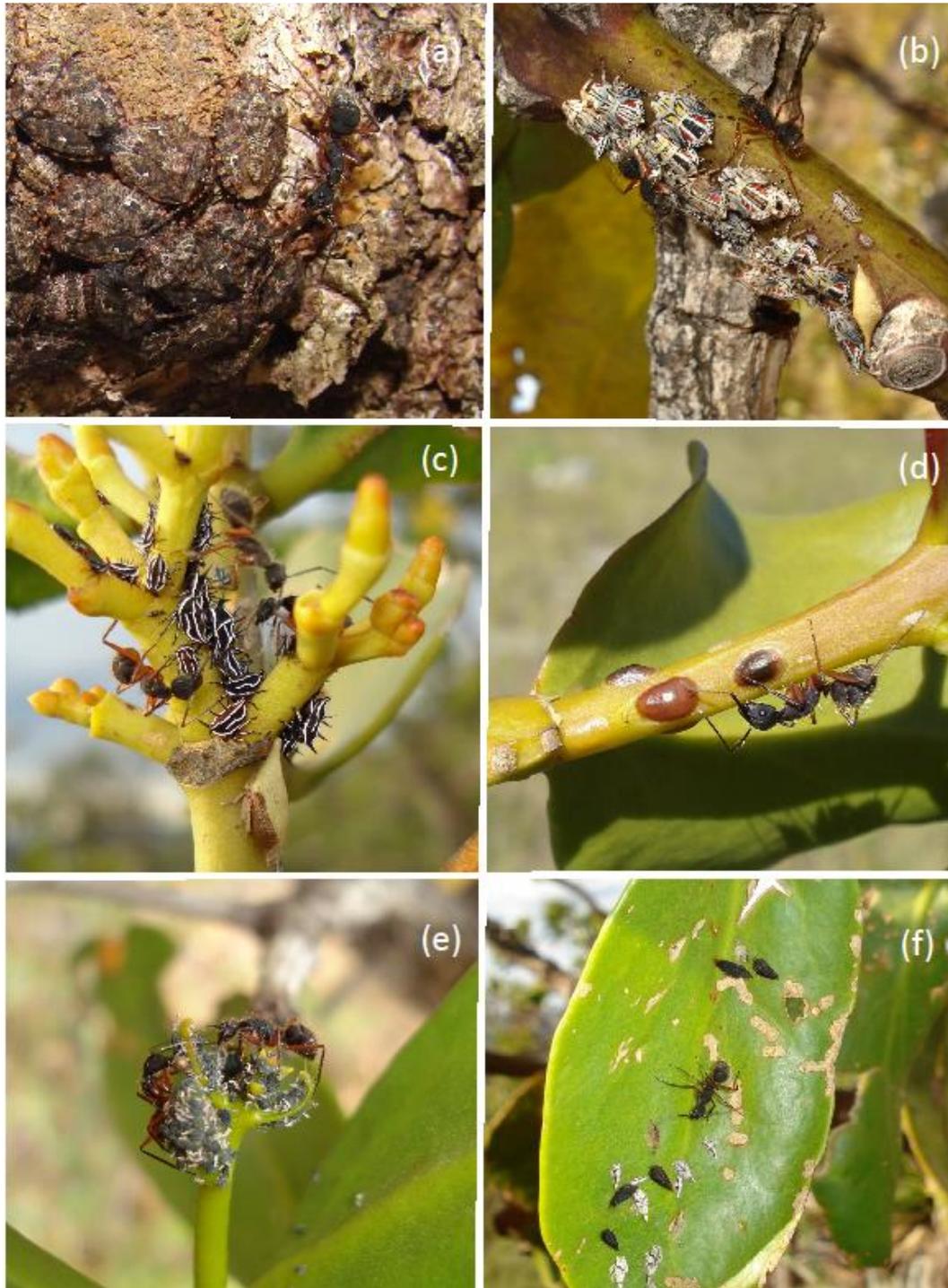
Para todos os modelos acima as distribuições utilizadas foram verificadas e alteradas quando não se adequaram às análises de resíduos. Todas análises e gráficos foram feitas utilizando o programa R v 3.5.3 (Crawley 2013; R Core Team 2019).

### **3. Resultados**

#### **Distribuição e abundância de insetos trofobiontes**

Encontramos seis espécies de herbívoros sugadores trofobiontes pertencentes a cinco famílias da ordem Hemiptera associados aos indivíduos de *P. robustus* (Figura 2). *Eurystethus microlobatus* Ruckes (Pentatomidae) (Figura 3a) foi a espécie mais abundante representando 69% do total de insetos sugadores, presentes em 46% dos indivíduos. *Aethalion reticulatum* Linnaeus (Aetalionidae) (Figura 3b) foi a segunda espécie mais abundante representando 19% do total de insetos, porém ocorrendo de forma mais agregada em apenas 8% dos indivíduos. *Guayaquila xiphias* Fabricius (Membracidae) (Figura 3c), foi a terceira espécie mais abundante (7%), ocupando 50%

dos indivíduos. *Parasaissetia nigra* (Nietner) (Coccidae) (Figura 3d) representou 3% do total, ocorrendo em 12% dos indivíduos. *Aphis fabae* Scopoli (Aphididae) (Figura 3e) e *Enchenopa loranthacina* Sakakibara and Marques (Membracidae) (Figura 3f) foram as espécies menos abundantes representando apenas 1,8% e 0,2% do total de insetos, respectivamente. O número total de insetos trofobiontes associados às plantas variou de 0 a 805, sendo em média  $141,30 \pm 216,55$  (Média $\pm$ SD). No entanto, em 31% de indivíduos de *P. robustus* foi registrada a co-ocorrência de diferentes espécies de insetos trofobiontes, sendo de duas à quatro espécies de trofobiontes por indivíduo (Figura 2). A ocorrência dos trofobiontes nas plantas não se deu de forma homogênea, embora *E. microlobatus* se distribua por toda a planta, essa espécie ocorreu mais frequentemente na região do haustório e nas partes vegetativas, enquanto as demais espécies ocorreram mais frequentemente nas partes reprodutivas (Figura 4).



**Figura 3:** Insetos trofobiontes e formigas *Camponotus rufipes* associados a hemiparasita *Psittacanthus robustus* em uma área de campo rupestre da Serra do Cipó, MG. **a)** *Eurystethus microlobatus*; **b)** *Aethalion reticulatum*; **c)** *Guayaquila xiphias*; **d)** *Parasaissetia nigra*; **e)** *Aphis fabae*; e **f)** *Enchenopa loranthacina*.

### **Efeito das formigas nos polinizadores**

A formiga *Camponotus rufipes* (Formicidae) foi a espécie mais frequentemente encontrada nas agregações de insetos trofobiontes, sendo frequentemente observada nas inflorescências e flores (Figura 3). Observamos um efeito positivo do número de insetos trofobiontes no número de indivíduos de *C. rufipes* (Figura S6;  $F_{1,24}=34.39$ ,  $p < 0.001$ ;  $y = 0.47 + 0.0038x$ ). Observamos ao todo 41 visitas por duas espécies de beija-flores, sendo *Eupetionema macroura* (Trochilidae) (Figura 5) a mais frequente ( $N = 40$ ), com registro de apenas uma visita por *Colibri serrirostris* (Trochilidae). No entanto, a presença das formigas nas flores não alterou o comportamento de *E. macroura*, não havendo diferenças entre os tratamentos quanto ao número total de visitas (Figura 6a;  $\chi^2 = 0.34$ ;  $gl = 2$ ;  $p = 0.84$ ), nem no número de inserções do bico pelo beija-flor nas corolas (Figura 6b;  $\chi^2 = 0.73$ ;  $gl = 2$ ;  $p = 0.69$ ).

### **Efeito dos insetos trofobiontes sobre o tamanho das sementes**

A produção de frutos foi fortemente explicada pelo tamanho dos indivíduos de *P. robustus*, sendo a quantidade total de frutos produzida pelos indivíduos positivamente correlacionada ao comprimento de seu ramo maior (Figura S5;  $R^2 = 0.63$ ,  $p = 0.0004$ ,  $N = 26$ ). Por outro lado, a abundância de trofobiontes não afetou diretamente o número total de frutos produzidos pelas plantas ( $F_{1,24} = 1.41$ ,  $p = 0.25$ ). No entanto, o aumento na abundância de trofobiontes diminuiu significativamente tanto o comprimento médio (Figura 7a;  $F_{1,24} = 4.75$ ,  $p = 0.03$ ;  $y = 14.98 - 0.001x$ ), quanto a largura média das sementes (Figura 7b;  $F_{1,24} = 6.22$ ,  $p = 0.01$ ;  $y = 5.81 - 0.0009x$ ). A co-variável número total de frutos produzidos pelos indivíduos não evidenciou qualquer efeito sobre o comprimento ( $F_{1,23} =$

0.14,  $p = 0.7$ ) ou largura ( $F_{1,23} = 0.63$ ,  $p = 0.4$ ) das sementes, indicando que a variação natural na abundância de trofobiontes explica de forma mais acurada a variação no tamanho das sementes de *P. robustus*.

### **Efeito dos trofobiontes na germinação e estabelecimento de *P. robustus***

Inoculamos ao todo 207 sementes distribuídas em 26 plantas hospedeiras de *Vochysia thyrsoidea* com uma média de  $7,9 \pm 2,75$  (Média $\pm$ SD) sementes por árvore. Entretanto ao longo do experimento uma planta hospedeira foi perdida. Além disso 34,29% das sementes foram: perdidas, atacadas por herbívoros ou os galhos onde foram inoculadas dessecaram antes da germinação (Figura 8) (Tabela S2).

Do total de 207 sementes inoculadas restaram ao final do experimento 136 sementes distribuídas em 25 hospedeiras para avaliar a proporção germinação/estabelecimento. Do total de 136 sementes com uma média de  $5,44 \pm 2,59$  (Média $\pm$ SD), 105 (77,2%) germinaram e 95 (69,8%) estabeleceram, ou seja, 90% das sementes que germinaram também desenvolveram em plântula. Não houve influência da abundância de trofobiontes tanto na proporção de sementes germinadas (Figura 9a;  $\chi^2$  (N = 25) = 1.71; gl = 1;  $p = 0.18$ ) quanto na proporção de plântulas estabelecidas (Figura 9b;  $\chi^2$  (N = 25) = 0.53; gl = 1;  $p = 0.46$ ).

Nenhum efeito da densidade de insetos trofobiontes foi verificado tanto no tempo de germinação ( $\chi^2$  (N = 150) = 2.27; gl = 1;  $p = 0.13$ ) quanto no tempo de estabelecimento das plântulas ( $\chi^2$  (N = 150) = 0.27; gl = 1;  $p = 0.59$ ).

#### 4. Discussão

Primeiramente verificamos que a presença de trofobiontes em altas densidades leva à um aumento do número de formigas fazendo o patrulhamento na planta hemiparasita, padrão já bem estabelecido nesse tipo de interação mutualística (Cushman and Whitham 1991; Morales 2000; Blüthgen et al. 2006). No entanto, observamos que o efeito indireto das formigas presentes nas inflorescências não reduziu a visitação pelo principal potencial polinizador, como observado em estudos recentes onde os polinizadores são invertebrados (Levan and Holway 2015; Ibarra-Isassi and Oliveira 2018). Embora insetos sugadores em altas densidades acarretem uma redução do tamanho das sementes de *P. robustus*, esse efeito não levou a uma menor proporção de sementes germinando e de plântulas se estabelecendo.

Além disso, as agregações de insetos trofobiontes são geralmente pequenas ou de tamanho intermediário (Guerra et al. 2011). Portanto, o efeito da redução do tamanho das sementes se dá em um pequeno número de indivíduos da planta hospedeira, possivelmente com efeitos negligenciáveis na dinâmica da população. No caso das ervas-de-passarinho, o principal gargalo na reprodução se relaciona a capacidade de dispersão direcionada das sementes para os galhos de hospedeiras vivas e susceptíveis (Sargent 1995; Watson and Rawsthorne 2013). Consequentemente, a inexistência de efeitos diretos da densidade de insetos sugadores nos estágios cruciais do ciclo de vida indica um resultado neutro dessas interações na aptidão da planta hospedeira.

A atividade de insetos trofobiontes próximo aos ramos reprodutivos pode estar associada a um aumento no patrulhamento das flores por formigas agressivas, reduzindo as interações com visitantes florais e comprometendo o serviço de polinização (Levan and Holway 2015; Ibarra-Isassi and Oliveira 2018). Todavia, demonstramos experimentalmente que o principal polinizador (*Eupetonema macroura*) não exibiu

preferência por inflorescências onde as formigas estavam ausentes, sendo que o número de visitas e de inserções de bico nas corolas a procura de néctar também não diferiu entre os tratamentos com presença e ausência de formigas. Esses resultados contradizem estudos recentes nos quais os autores encontraram que a presença de formigas afeta negativamente o comportamento de abelhas polinizadoras, reduzindo o sucesso reprodutivo das plantas hospederias (e.g., Cembrowski et al. 2014; Levan and Holway 2015; Ibarra-Isassi and Oliveira 2018). É importante frisar que nesses estudos, os polinizadores eram invertebrados, mas nem todos visitantes florais evitaram as plantas. Por exemplo, sirfídeos visitaram mais frequentemente plantas com alta densidade de afídeos associados à formigas (Levan and Holway 2015). Nossos dados corroboram a idéia de que beija-flores quando submetidos apenas à pistas visuais não alteram seu comportamento pela presença de formigas (Rankin et al. 2018).

O comportamento de forrageamento por polinizadores pode ser influenciado por outros fatores mais determinantes, como o risco de predação e pela competição pelo recurso. Romero et al. (2011) demonstraram que a resposta de polinizadores ao risco de predação é influenciada pelo táxon e tamanho corporal, sendo que polinizadores de maior tamanho corporal, especialmente vertebrados, geralmente não apresentam o comportamento de evitação das flores. Isso ocorre uma vez que esses organismos são difíceis de serem capturados e conseqüentemente são menos suscetíveis ao ataque por inimigos naturais presentes nas flores (Dukas et al. 2003). *Eupetionema macroura* apresenta um comportamento de defesa das plantas em floração, agredindo e perseguindo outras espécies de beija-flores indicando que seu néctar é um recurso muito valioso (Guerra et al. 2014). Nossos resultados indicam que os beija-flores provavelmente são menos vulneráveis ao ataque pelas formigas e por isso não apresentam mudança significativa no comportamento de visitaçã floral. A planta hemiparasita é dependente

da visitação pelos beija-flores para produzir sementes (Guerra et al. 2014). Portanto, mesmo que formigas possam ser comuns nas inflorescências de plantas com presença de agregações de trofobiontes, efeitos indiretos negativos no sucesso reprodutivo de *P. robustus* parecem mínimos, ao menos no que tange a visitação pelos polinizadores potenciais.

A abundância de formigas em *P. robustus* esteve positivamente associada à quantidade de insetos trofobiontes, corroborando resultados de outros estudos (e.g., Levan and Holway 2015; Canedo-Júnior et al. 2018; Monteiro et al. 2019). Por exemplo, Guerra et al. (2011), demonstraram que o número médio de indivíduos de *C. rufipes* aumenta significativamente com o aumento no tamanho das agregações de *E. microlobatus* associados à *P. robustus*, tanto no período diurno quanto noturno. A presença de mutualismos formigas-trofobiontes tem sido considerados geralmente positivos para aptidão das plantas hospedeiras, sobretudo, devido aos efeitos indiretos mediados pelas formigas que reduzem a herbivoria foliar nas plantas hospedeiras (Styrsky and Eubanks 2007; Rosumek et al. 2009; Zhang et al. 2012).

Nesse estudo não avaliamos os efeitos indiretos da presença de formigas sobre a herbivoria causadas por mastigadores, como comumente reportando na maioria dos estudos (Styrsky and Eubanks 2007). No entanto, detectamos efeitos negativos diretos causados pelos insetos sugadores. O sucesso reprodutivo das plantas medido através do número de frutos produzidos, parece ser determinada pelo tamanho das plantas, sem uma relação com o número de trofobiontes. Observamos que reprodução de *P. robustus* pode ser afetada negativamente, uma vez que a presença de um grande número de sugadores nas plantas acarreta em sementes de tamanho mais reduzido. Isso se deu provavelmente porque quando em altas densidades, esses insetos podem consumir uma grande quantidade de seiva promovendo a drenagem e a limitação de recursos alocados para os

órgãos reprodutivos (Larson and Whitham 1991, 1997; Renault et al. 2005). A maioria dos insetos trofobiontes são sedentários formando drenos mais ou menos contínuos em suas plantas hospedeiras (Zvereva et al. 2010). Os danos ao sistema vascular geram alterações fisiológicas e morfológicas cujos efeitos na planta hospedeira são considerados muitas vezes mais severos do que os causados por herbívoros mastigadores (Macedo et al. 2003; Zvereva et al. 2010). Por exemplo, o ataque por esses herbívoros sugadores tem uma relação com a alteração nos padrões de translocação já que promovem a perda de água, nutrientes e fotossintatos. Com isso uma menor quantidade desses recursos é alocado para os órgãos drenos (frutos, folhas jovens e raízes) reduzindo seu conteúdo nutricional e armazenamento de biomassa (Larson and Whitham 1991, 1997; Nabity et al. 2009). Zvereva et al. (2010) mostrou que plantas lenhosas demonstram pouca tolerância a esse tipo danos, uma vez que esses insetos sugadores frequentemente conseguem escapar das defesas, já que as mesmas estão presentes em baixa concentração no floema. Além disso, raramente compensam os prejuízos no crescimento e reprodução, pois uma vez que os recursos drenados por esses insetos dos órgãos reprodutivos, serão utilizados pelos próprios trofobiontes. Além disso, insetos sugadores podem também transmitir patógenos (Ammar and Nault 2002) ou injetar toxinas as quais podem provocar malformações e necrose dos tecidos (Carter 1962) acentuando, assim, os prejuízos na planta hospedeira. Consequentemente, as interações com insetos sugadores podem resultar em uma diminuição dos recursos alocados para a reprodução da planta, refletindo na diminuição do número, tamanho e massa de frutos e sementes (e.g., Wu et al. 2014; Tito and de la Torre-Mayorga 2016 ; Canedo-Júnior et al. 2017).

Dessa forma, nossos resultados corroboram que presença de agregações de insetos trofobiontes em grandes números tem o potencial de reduzir o tamanho das sementes de *P. robustus*. No entanto, devido à baixa frequência de grandes agregações de

insetos sugadores nas plantas hospedeiras, esse efeito negativo direto estará restrito a um pequeno número de indivíduos na população.

Embora a presença de insetos trofobiontes influencie negativamente o tamanho das sementes de *P. robustus*, esses efeitos não tiveram consequências na germinação e estabelecimento das plântulas. A germinação das sementes das ervas-de-passarinho pode estar relacionada a outros fatores, como a disponibilidade de luz, substrato e características das hospedeiras (Yan 1993; Sargent 1995; Rödl and Ward 2002). Canedo-Júnior et al. (2017) também encontraram ausência de efeito de insetos sugadores na germinação das sementes da *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae). Mesmo a infestação por esses herbívoros reduzindo o número de frutos e o número e biomassa das sementes produzidas, quase todas as sementes germinaram independente da presença dos insetos sugadores. Esse padrão também foi reportado por Tito e de la Torre-Mayorga (2016) que apesar de encontrarem um decréscimo no número e aumento no tamanho de frutos e sementes em plantas com altas densidades do afídeo *Aphis cytisorum*, não identificaram diferenças na germinação das sementes. Entretanto, os mecanismos subjacentes às estratégias empregadas pelas plantas nesses estudos não são claros.

Ervas-de-passarinho geralmente germinam prontamente e indiscriminadamente quando depositadas em ambientes adequados dependendo pouco do substrato (Rödl and Ward 2002). A maioria das sementes germinam logo após a remoção do exocarpo e deposição nos ramos da planta hospedeira. Aparentemente, o papel das aves dispersoras na transferência direcional das sementes até as plantas hospedeiras é o ponto mais crucial no ciclo de vida dessas plantas (Roxburgh 2007; Watson and Rawsthorne 2013). Assim, como observado nesse trabalho e também reportado em outros estudos (e.g, Yan and Reid 1995; Rödl and Ward 2002), uma vez depositadas em locais adequados as sementes têm altas chances de germinar e se estabelecer. Já o estabelecimento das plântulas e seu

desenvolvimento é influenciado, sobretudo, pela qualidade do substrato como disponibilidade de água e nutrientes bem como a compatibilidade fisiológica com a planta hospedeira, ou seja, adaptações que conferem capacidade de aderência e penetração do haustório no tecido vascular da planta hospedeira (Yan 1993; Rödl and Ward 2002; Okubamichael et al. 2016). Assim, podemos sugerir que o comportamento de deposição das sementes pelos dispersores e posteriormente as características das hospedeiras, são os fatores mais preponderantes na germinação e estabelecimento de *P. robustus*. Nossos resultados indicam que mesmo com uma redução no tamanho das sementes devido à presença de insetos trofobiontes, esse efeito negativo não levou a redução do sucesso de transição para os estágios mais cruciais do seu ciclo de vida.

As espécies de insetos trofobiontes estão distribuídas diferentemente nos órgãos da hemiparasita e na população de *P. robustus*. A utilização de diferentes recursos por insetos numa mesma planta hospedeira está principalmente relacionada às demandas nutricionais específicas desses insetos, bem como estratégias para evitar inimigos naturais (Denno and Roderick 1990) e competição (Ferrenberg and Denno 2003). *Eurystethus microlobatus* foi a espécie mais abundante no sistema e interagiu com maior número de indivíduos de *P. robustus*. Além disso esteve presente em todos os órgãos da hemiparasita sendo mais abundante no haustório e ramos primários. Esses insetos, devido à coloração, estão normalmente camuflados na casca da hospedeira o que provavelmente influencia a seleção preferencial pelo haustório e ramos primários uma vez que, assim, aumentam a proteção contra predadores (Guerra et al. 2011). A migração para os ramos reprodutivos ocorre provavelmente somente quando as altas densidades das agregações resulta em limitação do espaço (Guerra et al. 2011). O trofobionte *Aethalion reticulatum* foi observado em alta densidade porém ocorreu em poucos indivíduos de *P. robustus* apresentando uma distribuição agregada na população e co-ocorrendo com poucas

espécies de trofobiontes, o que provavelmente podem maximizar os efeitos de drenagem das plantas hospedeiras. Já *G. xiphias* apesar de estar presente em pequena abundância no sistema, apresentou maior distribuição entre os indivíduos de *P. robustus*. A maior parte das agregações se alimentavam preferencialmente nos ramos reprodutivos o que também foi observado em plantas da espécie *Didymopanax vinosum* (Apiaceae) presentes no Cerrado. A preferência pelas partes reprodutivas pode estar relacionada ao melhor desenvolvimento das ninfas devido à maior concentração de nutrientes (Del-Claro and Oliveira 1999). *Parasaissetia nigra* também foi encontrado nos ramos reprodutivos, entretanto ocorrendo geralmente nas folhas e com isso provavelmente não compete com as outras espécies que ocorrem nos ramos reprodutivos. Já *Aphis fabae* e *Enchenopa loranthacina* foram raramente encontrados nas plantas e seus efeitos devem ser reduzidos, pois geralmente estão presentes em pequenas agregações. Embora a maioria das espécies de trofobiontes coexistam em um mesmo indivíduo de *P. robustus*, esses indivíduos na maioria das vezes ocupam diferentes partes nas plantas hemiparasitas. A coexistência entre as espécies de trofobiontes pode ser determinada por diversos fatores sendo os principais filogenéticos, ecofisiológicos e qualidade nutricional das hospedeiras (Hajek and Dahlsten 1986; Inbar and Wool 1995; Ferrenberg and Denno 2003; Hernández et al. 2011).

## **5. Conclusões**

Nesse estudo demonstramos que a erva-de-passarinho *P. robustus* é afetada principalmente pelas interações diretas com seus herbívoros sugadores associados. A presença de insetos trofobiontes pode gerar uma consequência negativa para as plantas, devido à drenagem de recursos causada pela intensa herbivoria em grandes agregações de trofobiontes. No entanto, as interações indiretas mediadas pelas formigas parecem ser neutras ou exercem pouco efeito, uma vez que o principal polinizador é indiferente à sua

presença nas inflorescências. Embora o aumento na quantidade de insetos sugadores possa reduzir o tamanho médio das sementes, a sua germinação e o estabelecimento das plântulas não foram afetadas. Portanto, nosso estudo demonstra que essa espécie apresenta uma certa tolerância frente ao ataque intenso por insetos sugadores. Mesmo sofrendo com os custos da herbivoria na produção das sementes, sementes menores ainda sim podem germinar e se estabelecer. Até o momento, poucos estudos sobre a perspectiva das plantas hospedeiras avaliaram os efeitos das interações com trofobiontes na produção e germinação das sementes (Wu et al. 2014; Tito and de la Torre-Mayorga 2016 ; Canedo-Júnior et al. 2017). Nosso estudo ilustra a importância de se considerar os efeitos diretos e indiretos das associações mutualísticas formiga-trofobiontes na reprodução das plantas hospedeiras. Nesse sentido, fomos um passo além, avaliando de forma inédita os possíveis efeitos da herbivoria por insetos trofobiontes no estabelecimento da planta hospedeira. Essa abordagem se mostrou essencial para entender os resultados das interações formiga-trofobionte, uma vez que o estabelecimento é o estágio que melhor representa as consequências diretas na aptidão de suas plantas hospedeiras. Por fim, ressaltamos a importância de se avaliar os efeitos diretos e indiretos em parâmetros da aptidão das plantas para esclarecer as consequências ecológicas dos mutualismos formiga-trofobionte em sistemas multitróficos.

## 6. Referências

- Abdala-Roberts L, Puentes A, Finke DL, et al (2019) Tri-trophic interactions: Bridging species, communities and ecosystems. *Ecol Lett* 22:2151–2167. <https://doi.org/10.1111/ele.13392>
- Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, et al (2013) Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorol Zeitschrift* 22:711–728. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>
- Ammar ED, Nault LR (2002) Virus transmission by leafhoppers, planthoppers and treehoppers (auchenorrhyncha, homoptera). *Adv Bot Res* 36:141–167. [https://doi.org/10.1016/s0065-2296\(02\)36062-2](https://doi.org/10.1016/s0065-2296(02)36062-2)
- Blüthgen N, Mezger D, Linsenmair KE (2006) Ant-hemipteran trophobioses in a Bornean rainforest - Diversity, specificity and monopolisation. *Insectes Soc* 53:194–203. <https://doi.org/10.1007/s00040-005-0858-1>
- Blüthgen N, Verhaagh M, Goitía W, et al (2000) How plants shape the ant community in the Amazonian rainforest canopy: The key role of extrafloral nectaries and homopteran honeydew. *Oecologia* 125:229–240. <https://doi.org/10.1007/s004420000449>
- Bronstein JL (1994) Conditional outcomes in mutualistic interactions. *Trends Ecol Evol* 9:214–217. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(94\)90246-1](https://doi.org/10.1016/0169-5347(94)90246-1)
- Buckley RC (1987) Interactions involving plants, Homoptera, and ants. *Annu Rev Ecol Syst* 18:111–135
- Canedo-Júnior EO, Santiago GS, Zurlo LF, et al (2017) Isolated and community contexts

- produce distinct responses by host plants to the presence of ant-aphid interaction: Plant productivity and seed viability. *PLoS One* 12:1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170915>
- Canedo-Júnior EO, Santiago GS, Ribas CR, et al (2018) The effect size of aphid-tending ants in an agricultural tri-trophic system. *J Appl Entomol* 142:349–358. <https://doi.org/10.1111/jen.12475>
- Carroll CR, Janzen DH (1973) Ecology of foraging by ants. *Annu Rev Ecol Syst* 4:231–257
- Carter W (1962) *Insects in relation to plant disease*, 2nd edn. John Wiley & Sons, New York
- Cembrowski AR, Tan MG, Thomson JD, Frederickson ME (2014) Ants and ant scent reduce bumblebee pollination of artificial flowers. *Am Nat* 183:133–139. <https://doi.org/10.1086/674101>
- Chamberlain SA, Bronstein JL, Rudgers JA (2014) How context dependent are species interactions? *Ecol Lett* 17:881–890. <https://doi.org/10.1111/ele.12279>
- Cushman JH, Whitham TG (1991) Competition mediating the outcome of a mutualism: Protective services of ants as a limiting resource for membracids. *Am Nat* 138:851–865. <https://doi.org/10.1086/285256>
- Davidson DW, Cook SC, Snelling RR, Chua TH (2003) Explaining the abundance of ants in lowland tropical rainforest canopies. *Science* 300:969–972. <https://doi.org/10.1126/science.1082074>
- Freitas JD, Rossi MN (2015) Interaction between trophobiont insects and ants: The effect of mutualism on the associated arthropod community. *J Insect Conserv* 19:627–638.

<https://doi.org/10.1007/s10841-015-9785-2>

Del-Claro K, Oliveira PS (1999) Ant-Homoptera interactions in a Neotropical Savanna: The Honeydew-producing Treehopper, *Guayaquila xiphias* (Membracidae), and its associated ant fauna on *Didymopanax vinosum* (Araliaceae). *Biotropica* 31:135. <https://doi.org/10.2307/2663967>

Delabie JHC (2001) Trophobiosis between Formicidae and Hemiptera ( Sternorrhyncha and Auchenorrhyncha): an Overview. *Neotrop Entomol* 30:501–516. [https://doi.org/DOI 10.1007/s11284-004-0015-8](https://doi.org/DOI%2010.1007/s11284-004-0015-8)

Denno RF, Roderick GK (1990) Host plant specialization and host shifting. *Annu Rev Entomol* 35:489–520

Dukas R, Morse DH, Crab DH (2003) Crab spiders affect flower visitation by Bees. *Oikos* 101:157–163

Dungan RJ, Turnbull MH, Kelly D (2007) The carbon costs for host trees of a phloem-feeding herbivore. *J Ecol* 95:603–613. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2007.01243.x>

Ferrenberg SM, Denno RF (2003) Competition as a factor underlying the abundance of an uncommon phytophagous insect, the salt-marsh planthopper *Delphacodes penedetector*. *Ecol Entomol* 28:58–66. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.2003.00479.x>

Floate KD, Whitham TG (1994) Aphid-ant interaction reduces chrysomelid herbivory in a cottonwood hybrid zone. *Oecologia* 97:215–221. <https://doi.org/10.1007/BF00323152>

Guerra TJ, Camarota F, Castro FS, et al (2011) Trophobiosis between ants and

- Eurystethus microlobatus* Ruckes 1966 (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae) a cryptic, gregarious and subsocial stinkbug. *J Nat Hist* 45:1101–1117.  
<https://doi.org/10.1080/00222933.2011.552800>
- Guerra TJ, Galetto L, Silva WR (2014) Nectar secretion dynamic links pollinator behavior to consequences for plant reproductive success in the ornithophilous mistletoe *Psittacanthus robustus*. *Plant Biol* 16:956–966.  
<https://doi.org/10.1111/plb.12146>
- Guerra TJ, Pizo M a. (2014) Asymmetrical dependence between a Neotropical mistletoe and its avian seed disperser. *Biotropica* 46:285–293.  
<https://doi.org/10.1111/btp.12112>
- Guerra TJ, Pizo MA, Silva WR (2018) Host specificity and aggregation for a widespread mistletoe in Campo Rupestre vegetation. *Flora Morphol Distrib Funct Ecol Plants* 238:148–154. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2016.12.011>
- Hajek AE, Dahlsten DL (1986) Coexistence of three species of leaf-feeding aphids (Homoptera) on *Betula pendula*. *Oecologia* 68:380–386.  
<https://doi.org/10.1007/BF01036743>
- Hernández MC, Brentassi ME, Sosa AJ, et al (2011) Feeding behavior and spatial distribution of two planthoppers, *Megamelus scutellaris* (Delphacidae) and *Taosa longula* (Dictyopharidae), on water hyacinth. *Biocontrol Sci Technol* 21:941–952.  
<https://doi.org/10.1080/09583157.2011.596624>
- Herrera CM, Medrano M, Rey PJ, et al (2002) Interaction of pollinators and herbivores on plant fitness suggests a pathway for correlated evolution of mutualism-and antagonism-related traits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16823–16828.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.252362799>

- Ibarra-Isassi J, Oliveira PS (2018a) Indirect effects of mutualism: Ant–treehopper associations deter pollinators and reduce reproduction in a tropical shrub. *Oecologia* 186:691–701. <https://doi.org/10.1007/s00442-017-4045-7>
- Ibarra-Isassi J, Oliveira PS (2018) Indirect effects of mutualism: Ant–treehopper associations deter pollinators and reduce reproduction in a tropical shrub. *Oecologia* 186:691–701. <https://doi.org/10.1007/s00442-017-4045-7>
- Inbar M, Wool D (1995) Phloem-feeding specialists sharing a host tree: Resource partitioning minimizes interference competition among galling aphid species. *Oikos* 73:109. <https://doi.org/10.2307/3545732>
- Kennedy PG, Bergemann SE, Hortal S, Bruns TD (2007) Determining the outcome of field-based competition between two *Rhizopogon* species using real-time PCR. *Mol Ecol* 16:881–890. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03191.x>
- Lach L (2008) Floral visitation patterns of two invasive ant species and their effects on other hymenopteran visitors. *Ecol Entomol* 33:155–160. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2007.00969.x>
- Lach L (2003) Invasive ants: Unwanted partners in ant–plant interactions? *Ann Missouri Bot Gard* 90:91–108
- Larson KC, Whitham TG (1991) Manipulation of food resources by a gall-forming aphid: The physiology of sink-source interactions. *Oecologia* 88:15–21. <https://doi.org/10.1007/BF00328398>
- Larson KC, Whitham TG (1997) Competition between gall aphids and natural plant sinks: Plant architecture affects resistance to galling. *Oecologia* 109:575–582. <https://doi.org/10.1007/s004420050119>

- Le Stradic S, Buisson E, Fernandes GW (2015) Vegetation composition and structure of some Neotropical Mountain Grasslands in Brazil. *J Mt Sci* 12:864–877. <https://doi.org/10.1007/s11629-013-2866-3>
- Levan KE, Holway DA (2015) Ant-aphid interactions increase ant floral visitation and reduce plant reproduction via decreased pollinator visitation. *Ecology* 96:1620–1630. <https://doi.org/10.1890/14-0058.1>
- Li J, Wang Z, Tan K, et al (2014) Giant Asian honeybees use olfactory eavesdropping to detect and avoid ant predators. *Anim Behav*
- Macedo TB, Bastos CS, Higley LG, et al (2003) Photosynthetic responses of soybean to Soybean Aphid (Homoptera: Aphididae) Injury. *J Econ Entomol* 96:188–193. <https://doi.org/10.1093/jee/96.1.188>
- McClellan D, Friman VP, Finn A, et al (2019) Coping with multiple enemies: Pairwise interactions do not predict evolutionary change in complex multitrophic communities. *Oikos* 128:1588–1599. <https://doi.org/10.1111/oik.06586>
- Monteiro GF, Macedo-Reis LE, Dáttilo W, et al (2019) Ecological interactions among insect herbivores, ants and the host plant *Baccharis dracunculifolia* in a Brazilian mountain ecosystem. *Austral Ecol* 1–10. <https://doi.org/10.1111/aec.12839>
- Monteiro RF, Martins RP, Yamamoto K (1992) Host specificity and seed dispersal of *Psittacanthus robustus* (Loranthaceae) in south-east Brazil. *J Trop Ecol* 8:307–314. <https://doi.org/10.1017/S026646740000657X>
- Morales MA (2000) Mechanisms and density dependence of benefit in an ant-membracid mutualism. *Ecology* 81:482–489. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2000\)081\[0482:MADDOB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2000)081[0482:MADDOB]2.0.CO;2)

- Nabity PD, Zavala JA, DeLucia EH (2009) Indirect suppression of photosynthesis on individual leaves by arthropod herbivory. *Ann Bot* 103:655–663. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn127>
- Ness JH (2006) A Mutualism 's Indirect Costs : The most aggressive plant bodyguards also deter pollinators. *Oikos* 113:506–514
- Okubamichael DY, Griffiths ME, Ward D (2016) Host specificity in parasitic Plants- perspectives from mistletoes. *AoB Plants* 8:. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plw069>
- Quental TB, Trigo JR, Oliveira PS (2005) Host-plant flowering status and the concentration of sugar in phloem sap: Effects on an ant-treehopper interaction. *Eur J Entomol* 102:201–208. <https://doi.org/10.14411/eje.2005.032>
- Ramírez MM, Ornelas JF (2012) Cross-Infection experiments of *Psittacanthus schiedeanus* : Effects of host provenance, gut passage, and host fate on mistletoe seedling survival . *Plant Dis* 96:780–787. <https://doi.org/10.1094/pdis-06-11-0509>
- Rankin DT, Clark CJ, Wilson Rankin EE (2018) Hummingbirds use taste and touch to discriminate against nectar resources that contain Argentine ants. *Behav Ecol Sociobiol* 72:. <https://doi.org/10.1007/s00265-018-2456-z>
- Renault CK, Buffa LM, Delfino MA (2005) An aphid-ant interaction : Effects on different trophic levels. *Ecol Res* 20:71–74. <https://doi.org/10.1007/s11284-004-0015-8>
- Revilla TA, Encinas F (2015) Dynamical transitions in a pollination – Herbivory interaction : A conflict between mutualism and antagonism. *PLoS One* 10:1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117964>
- Rödl T, Ward D (2002) Host recognition in a desert mistletoe: Early stages of development are influenced by substrate and host origin. *Funct Ecol* 16:128–134.

<https://doi.org/10.1046/j.0269-8463.2001.00592.x>

Romero GQ, Antiqueira PAP, Koricheva J (2011) A meta-analysis of predation risk Effects on pollinator behaviour. *PLoS One* 6:.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020689>

Rosumek FB, Silveira FAO, De S. Neves F, et al (2009) Ants on plants: A meta-analysis of the role of ants as plant biotic defenses. *Oecologia* 160:537–549.

<https://doi.org/10.1007/s00442-009-1309-x>

Roxburgh L (2007) The effect of gut processing on the quality of mistletoe seed dispersal.

*J Trop Ecol* 23:377–380. <https://doi.org/10.1017/S0266467407004014>

Roxburgh L, Nicolson SW (2005) Patterns of host use in two African mistletoes: The importance of mistletoe-host compatibility and avian disperser behaviour. *Funct Ecol* 19:865–873.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2005.01036.x>

Sargent S (1995) Seed Fate in a Tropical Mistletoe: The Importance of host twig size.

*Funct Ecol* 9:197–204

Silveira FAO, Negreiros D, Barbosa NPU, et al (2016) Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: A neglected conservation priority. *Plant Soil* 403:129–152.

<https://doi.org/10.1007/s11104-015-2637-8>

Styrsky JD, Eubanks MD (2007) Ecological consequences of interactions between ants and honeydew-producing insects. *Proc R Soc B Biol Sci* 274:151–164.

<https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3701>

Styrsky JD, Eubanks MD (2010) A facultative mutualism between aphids and an invasive ant increases plant reproduction. *Ecol Entomol* 35:190–199.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2009.01172.x>

- Tito R, de la Torre-Mayorga F (2016) Effects of an aphid pest on an invasive plant in the Peruvian Andes. *Plant Ecol* 217:817–823. <https://doi.org/10.1007/s11258-016-0596-7>
- Watson DM, Rawsthorne J (2013) Mistletoe specialist frugivores: Latterday “Johnny Appleseeds” or self-serving market gardeners? *Oecologia* 172:925–932. <https://doi.org/10.1007/s00442-013-2693-9>
- Way MJ (1963) Mutualism between ants and honeydew-producing Homoptera. *Annu Rev Entomol* 8:307–344. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.08.010163.001515>
- Wu D, Zeng L, Lu Y, Xu Y (2014) Effects of *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) and its interaction with aphids on the seed productions of mungbean and rapeseed plants. *J Econ Entomol* 107:1758–1764. <https://doi.org/10.1603/EC14162>
- Yan Z (1993) Germination and seedling development of two misletoes, *Amyema preisii* and *Lysiana exocarpi*: Host specificity and mistletoe-host compatibility. *Aust J Ecol* 18:419–429
- Yan Z, Reid N (1995) Mistletoe (*Amyema miquelii* and *A. pendulum*) seedling establishment on eucalypt hosts in Eastern Australia. *J Appl Ecol* 32:778. <https://doi.org/10.2307/2404817>
- Yao I, Akimoto SI (2002) Flexibility in the composition and concentration of amino acids in honeydew of the drepanosiphid aphid *Tuberculatus quercicola*. *Ecol Entomol* 27:745–752. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.2002.00455.x>
- Zhang S, Zhang Y, Ma K (2012) The ecological effects of the ant-hemipteran mutualism: A meta-analysis. *Basic Appl Ecol* 13:116–124.

<https://doi.org/10.1016/j.baae.2012.02.002>

Zvereva EL, Lanta V, Kozlov M V. (2010) Effects of sap-feeding insect herbivores on growth and reproduction of woody plants: A meta-analysis of experimental studies. *Oecologia* 163:949–960. <https://doi.org/10.1007/s00442-010-1633-1>