

ETHEL FERNANDES DE OLIVEIRA PETERNELLI

**INTERAÇÃO ENTRE FORMIGAS E SEMENTES DE *Mabea fistulifera* Mart.
(EUPHORBIACEAE)**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia, para obtenção do título
de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2003

ETHEL FERNANDES DE OLIVEIRA PETERNELLI

**INTERAÇÃO ENTRE FORMIGAS E SEMENTES DE *Mabea fistulifera* Mart.
(EUPHORBIACEAE)**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia, para obtenção do título
de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 04 de julho de 2003.

Prof. Sebastião V. Martins
(Conselheiro)

Prof. Luiz A. Peternelli
(Conselheiro)

Prof. Carlos F. Speber

Prof. Luiz Cláudio de A. Barbosa

Prof^a. Terezinha M. C. Della Lucia
(Orientadora)

Aos meus pais e irmãos,
Ao meu marido, Alexandre,
Aos meus filhos, Mariana e
Mateus.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Animal, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

À professora Terezinha M. C. Della Lucia, pela orientação, pela paciência, pela amizade, pelo incentivo e pelas oportunidades oferecidas no decorrer destes anos.

Ao professor Eduardo Euclides de L. e Borges (DEF/UFV) pelo apoio na coleta das sementes e na infraestrutura concedida.

Ao professor Luiz Alexandre (DPI/UFV), pelo aconselhamento, pelas sugestões e pelo auxílio na execução das análises estatísticas.

Ao professor Sebastião Venâncio Martins (DEF/UFV), pelo aconselhamento, pelo apoio e pela confiança depositada em mim desde o início dos trabalhos.

Ao professor Luiz Cláudio de A. Barbosa (DEQ/UFV), pelo apoio técnico, pela cessão do seu laboratório, pelas críticas e sugestões.

Ao prof. Carlos Frankl Spebher (DBG/UFV), pelas preciosas sugestões e incentivo.

À secretária do curso de Pós-Graduação em Entomologia (UFV), Maria Paula A. da Costa, pela paciência, compreensão, ajuda e amizade durante estes anos.

Ao Sr. Manoel, funcionário do Insetário, pela agradável convivência, pela amizade e pelo inestimável apoio.

Ao funcionário Sr. Antônio Carlos, ao técnico Eduardo e estudantes do LASA, pelo apoio e convivência durante os trabalhos de laboratório.

Ao colega Ivan Cardoso do Nascimento (CEPLAC/BA), pela identificação das formigas.

Aos colegas e amigos de curso, pelo convívio e pela idéias trocadas durante sua realização

Aos colegas do Insetário Márcio Araújo, Clayton, Gabriela, Fabrícia, pela ajuda nos trabalhos de laboratório e campo.

Ao grande e especial amigo Danival, pelas sugestões, apoio, pelas “idéias” trocadas, pela convivência, pela sabedoria e pelo bom amigo que sempre foi.

Aos amigos da taxonomia Walquimário, Guta, Janina, Solange e Rômulo pelas boas horas de descontração e amizade.

À admirável amiga Mariana pela ajuda desmedida, pelo apoio e pela sinceridade da sua amizade.

Ao companheiro Hamilton pela humildade, pela garra e pelos bons momentos compartilhados.

À amiga Kátia, pelo apoio e torcida.

À toda minha família, que sempre me deu força nesta jornada, com muito carinho, em especial aos meus pais e irmãos.

Ao querido “sogra” (Sr. Peternelli), que tanto torceu pelo meu sucesso, mas que infelizmente hoje já não está mais aqui para presenciar minha vitória.

À D. Piedade “sogra”, pelo incentivo e pelo carinho materno.

Ao meu marido Alexandre e aos meus filhos, pela paciência e apoio nas horas de ausência e ansiedade durante a realização deste trabalho.

Especialmente a Deus, pela força divina que não me deixou desistir.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

ETHEL FERNANDES DE OLIVEIRA PETERNELLI, filha de Sebastião Gonçalves de Oliveira e Nilda Maria Fernandes de Oliveira, nasceu em Curvelo, Minas Gerais, em 31 de janeiro de 1969.

Em 1990 ingressou na Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde graduou-se Bacharela em Ciência Biológicas em agosto de 1994.

De agosto de 1994 a julho de 1995, concluiu Especialização em Microbiologia na Universidade Federal de Viçosa.

De agosto de 1995 a agosto de 1999, trabalhou como assistente de laboratório no Soil and Plant Testing Laboratory na Iowa State University, Iowa, USA.

Em janeiro 2000, iniciou estágio no Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa, no setor de Entomologia.

Em junho de 2001, iniciou o curso de Mestrado em Entomologia, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), defendendo tese em 4 de julho de 2003.

ÍNDICE

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. BIBLIOGRAFIA GERAL.....	7
The interaction between workers of the genera <i>Atta</i> and <i>Acromyrmex</i> and seeds of <i>Mabea fistulifera</i> Mart. (Euphorbiaceae), a pioneer tree species in Brazil.....	9
Abstract.....	9
Introduction.....	10
Materials and Methods.....	12
Results and Discussion.....	15
References.....	20
Espécies de formigas que interagem com as sementes de <i>Mabea fistulifera</i> Mart. (Euphorbiaceae).....	22
Resumo.....	22
Ant species interacting with seeds of <i>Mabea fistulifera</i> Mart. (Euphorbiaceae).....	23
Abstract.....	23
Introdução.....	24

Material e Métodos.....	28
Resultados e Discussão.....	30
Conclusão.....	36
Referências Bibliográficas.....	37
Isolamento dos constituintes do elaiosoma de <i>Mabea fistulifera</i> Mart. (Euphorbiaceae): Análise de ácidos e ésteres de ácidos graxos.....	39
Introdução.....	39
Material e Métodos.....	41
Resultados e Discussão.....	46
Conclusão.....	66
Referências Bibliográficas.....	67
3. CONCLUSÕES GERAIS.....	69

RESUMO

PETERNELLI, Ethel, Fernandes Oliveira, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2003. **Interação entre formigas e sementes de *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae)**. Orientadora: Terezinha Maria Castro Della Lucia. Conselheiros: Sebastião Venâncio Martins e Luiz Alexandre Peternelli.

Neste trabalho avaliou-se a interação mirmecocórica entre formigas e sementes de *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae). Os estudos de laboratório foram realizados no Insetário do Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa (UFV), no Laboratório de Análises de Sementes no Setor de Silvicultura do Departamento de Engenharia Florestal, UFV e no LASA - Laboratório de Análises e Sínteses de Agroquímicos do Departamento de Química, UFV. Já os de campo foram realizados em fragmentos florestais no Município de Viçosa-MG. Primeiramente, investigou-se a interação entre operárias de *Atta* e *Acromyrmex* e sementes de *M. fistulifera* e o efeito dessa interação na germinação dessas sementes. Quatro colônias de *Atta sexdens rubropilosa* e quatro de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* foram escolhidas e sementes frescas foram oferecidas para avaliar a interação semente-

formiga. Aquelas que foram manipuladas pelas operárias foram usadas no teste de germinação, onde quatro tratamentos foram considerados (sementes manipuladas por *Atta*; sementes manipuladas por *Acromyrmex*; sementes limpas e sementes frescas). Realizou-se também um levantamento em campo das espécies que poderiam interagir com as sementes e dessas quais poderiam transportá-las. Uma análise química do elaiosoma das sementes foi realizada, a fim de identificar o(s) composto(s) que compõem esse apêndice. Todas as sementes oferecidas às formigas, tanto no laboratório quanto no campo, foram manipuladas pelas formigas e tiveram seus elaiosomas removidos. A manipulação dessas sementes por operárias de *Atta* acarretou um aumento da sua taxa de germinação. Foram encontradas dezesseis espécies de formigas interagindo com as sementes de *M. fistulifera*, sendo cinco, de fato, dispersoras, já que transportaram efetivamente as sementes; e nove espécies foram, pela primeira vez, relatadas interagindo com sementes. A taxa de remoção destas pelas formigas foi de 85 a 97%. Na análise química, o elaiosoma de *M. fistulifera* apresentou amplo alcance de padrões de ácidos graxos, sendo o triacilglicerídeos o mais abundante. Ficou caracterizada uma importante interação mutualística entre a planta e as formigas. A planta se beneficia com a dispersão secundária de suas sementes em locais favoráveis para o seu estabelecimento e germinação, enquanto que as formigas adquirem uma fonte extra de recurso alimentar.

ABSTRACT

PETERNELLI, Ethel, Fernandes Oliveira, M.S., Universidade Federal de Viçosa. July, 2003. **Interaction between ants and seeds of *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae)**. Adviser: Terezinha Maria Castro Della Lucia. Committee members: Sebastião Venâncio Martins and Luiz Alexandre Peternelli.

This work evaluated the myrmecochory interaction between ants and seeds of *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae). The laboratory studies were conducted at the Insectary of the Animal Biology Department, Federal University of Viçosa, UFV – MG, at the Silvicultura Seed Analyses Laboratory of the Forestry Department of the same University and at the LASA – Agrochemistry Analyses and Syntheses Laboratory of the Chemistry Department (UFV). Field work was conducted in forests fragments situated in Viçosa, MG. Firstly, the interaction between workers of *Atta* and *Acromyrmex* and seeds of *M. fistulifera* was investigated. The interaction effect on seed germination was also evaluated. Four nests of *Atta sexdens rubropilosa* and four of *Acromyrmex subterraneus subterraneus* were chosen and fresh seeds were offered in the study of ant-seed interaction. Those seeds that were

manipulated by workers were used on the germination tests. Four treatments were performed (seeds manipulated by *Atta*; seeds manipulated by *Acromyrmex*; clean seeds and fresh seeds). Field work was carried out to identify the ant species which interact with the seeds and which transported them. A chemical analysis of elaiosome seeds was conducted, to identify the components of this structure. All seeds offered to ants, in laboratory or in the field were manipulated by ants and had the elaiosomes removed. The manipulation of this seeds for workers of the *Atta* resulted an increase on their germination rate. Sixteen species of ants interacted with the seeds of *M. fistulifera*; five were in fact, dispersing agents because they effectively transported these seeds and nine species are reported for the first time as interacting with seeds. Seed removal rate was from 85 to 97%. In the chemical analyses, the elaiosome of *M. fistulifera* presented a broad range of fatty acid patterns. The triacylglycerols were the major components. An important mutualism interaction was observed between the plant and the ants, in which ants use nutritionally valuable elaiosome as food, and disperse plant seeds in the process.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Um aspecto importante no processo de dispersão de sementes é que elas são transportadas da planta mãe para o local da sua germinação por agentes externos ou por métodos originados da própria planta (Milton & Dean, 1993). Os vários métodos de transporte das sementes são classificados, segundo Fahn & Werker (1972) em quatro grupos: zoocoria (dispersão por animais), anemocoria (dispersão pelo vento), hidrocoria (dispersão pela água) e autocoria (dispersão pela própria planta). A zoocoria, por sua vez, é subdividida em endozoocoria, quando as sementes são ingeridas por animais, passam pelo seu sistema digestivo e são descartadas nas fezes; epizoocoria, quando as sementes, aderidas ao pêlo ou à pena de animais, ou mesmo à sola de sapatos, são levadas para diferentes ambientes; e sinzoocoria, quando as sementes são coletadas por alguns animais e estocadas numa determinada época, como por exemplo, durante o inverno.

Geralmente os agentes externos promovem dispersão de sementes a grandes distâncias, permitindo, assim, que uma espécie vegetal dissemine-se e ocupe novos territórios (Van der Pijl, 1972). Em algumas espécies de plantas,

especialmente naquelas adaptadas a zonas áridas, a autocoria garante a dispersão à distâncias relativamente curtas. Isso garante a germinação das sementes próximas a planta mãe, geralmente onde a água é facilmente disponível (Fahn & Werker, 1972).

Na zoocoria os vertebrados não são os únicos animais atuantes. Segundo Handel & Beattie (1990) as formigas também são agentes importantes na dispersão. Muitos trabalhos têm descrito o hábito de algumas espécies de formigas de coletar e transportar sementes de plantas (Beattie & Culver, 1982; Passos & Ferreira, 1996; Horvitz & Schemake, 1986; Gorb et al., 2000). Este fenômeno é denominado mirmecocoria, ou seja, a dispersão de sementes por formigas. As plantas cujas sementes são dispersadas desse modo são denominadas plantas mirmecocóricas. A mirmecocoria foi cuidadosamente analisada, e proposta, por Johan Rutger Sernander, um botânico que publicou seu trabalho sobre a importância da mirmecocoria na vegetação Européia em 1906 (Hölldobler & Wilson, 1990).

Após ser investigada na Europa, a mirmecocoria foi também estudada na América do Norte, África e Austrália (Beattie & Culver, 1981). Os estudos referentes à mirmecocoria na América do Sul, no entanto, ainda são escassos (Pizo & Oliveira, 1998).

Plantas dispersadas por formigas são, encontradas em diversos habitats em todos os continentes, exceto Antártica (Handel & Beattie, 1990). Atualmente acima de 3000 espécies pertencentes a mais de 60 famílias de plantas são conhecidas como sendo mirmecocóricas (Hanzawa et al., 1988). Alguns autores como Morales & Heithaus (1998) e Kjelson (1985), quando estudaram a interação formiga-semente, argumentaram que entre muitas plantas e as

formigas que transportam suas sementes, existe um mutualismo verdadeiro, ou seja um relacionamento mutuamente benéfico.

Segundo Handel & Beattie (1990) a mirmecocoria ocorre através de dois mecanismos. Um deles depende da ineficiência da atividade das formigas colhedoras de semente, "harvester ants", em ambientes áridos, as quais coletam uma grande quantidade de sementes, transportando-as para seus ninhos, onde as consomem. Nesse processo, conhecido como dispersão indireta, algumas sementes são perdidas ou caem pelo caminho, enquanto outras podem ficar escondidas no solo e ser ignoradas pelas operárias. Estas sementes podem, então, germinar e estabelecer a planta em um novo local (Hölldobler & Wilson, 1990). Na literatura, pesquisadores afirmam ser esse mecanismo de dispersão de sementes por formigas colhedoras de sementes, "harvester ants", não um mutualismo verdadeiro (Mull & MacMahon, 1997), mas sim um resultado da predação da semente. Gorb & Gorb (1999) reforçam tal pensamento, afirmando que os benefícios desse mecanismo de dispersão são maiores para a formigas do que para as plantas, já que há uma perda de grande fração de suas sementes. O segundo mecanismo de dispersão conforme proposto por Handel & Beattie (1990) é chamado dispersão direta. Por esse mecanismo os dispersores beneficiam a planta por depositar suas sementes em locais favoráveis para a sua sobrevivência e crescimento (Hanzawa et al., 1988). Este é o caso da típica mirmecocoria, na qual há o envolvimento de plantas que produzem sementes com um elaiosoma atrativo às formigas (Schultz & McGlynn, 2000).

Mas as formigas não são atraídas por qualquer tipo de semente. Segundo Shultz & McGlynn (2000), para que haja mirmecocoria deve haver o

envolvimento de plantas que produzam um elaiosoma atrativo às formigas. Elaiosoma são apêndices, que podem variar em tamanho, forma e cor (Gullan & Cranston, 1994), são apêndices nutritivos, ricos em lipídeos, proteínas e carboidratos em proporções variadas (Mark & Olesen, 1996), o que confere às sementes, diferentes graus de atratividade.

O elaiosoma, ao atrair as formigas, contribui para que as sementes sejam transportadas para os ninhos, onde ele é removido e utilizado como alimento. As sementes sem o elaiosoma são, então, descartadas intactas em um novo sítio e este pode ou não ser um local favorável para sua germinação (Gullan & Cranston, 1994). Esta interação caracteriza um mutualismo verdadeiro, onde há benefício tanto para a formiga, que transporta, quanto para a planta, que produz o elaiosoma (Zettler et al., 2001).

Os estudos sobre essa interação sugerem algumas vantagens para as espécies de plantas mirmecocóricas e para as formigas. De acordo com Beattie & Culver (1982) uma das vantagens para as plantas seria a relocação das sementes nos formigueiros (ninhos), o qual é um sítio úmido, seguro contra predadores, fogo, entre outros e rico em nutrientes necessários para a sua germinação. Outra vantagem seria evitar a competição intra-específica, quando as sementes são afastadas da sua planta mãe, pois, segundo Beattie & Culver (1981), ao serem levadas para longe, há aumento das suas chances de germinação devido ao não sombreamento por plantas coespecíficas. Handel & Beattie (1990), num experimento com três espécies de *Carex*, demonstraram que a mirmecocoria também pode reduzir a competição inter-específica. Das três espécies, somente a que era mirmecocórica cresceu bem quando afastada das outras duas, pois as espécies de formigas se interessavam apenas pela

espécie mirmecocórica e esta quando alcançava o novo sítio afastada das demais teve melhor taxa de germinação. Aqueles autores explicam que isto se dava porque as sementes não precisaram competir com as outras espécies de *Carex* por espaço, luz, nutrientes e outros recursos.

Como um sistema de dispersão de semente, a mirmecocoria tem suas limitações. Apesar do elaiosoma ser um prêmio atraente para muitas espécies de formigas, o sucesso dessa interação pode variar consideravelmente se outras fontes de alimento forem abundantes (Handel & Beattie, 1990). Nesses casos, o elaiosoma pode ser, comparativamente, menos atrativo para esses insetos. De qualquer maneira, quando todas as condições forem apropriadas, as vantagens da mirmecocoria, tanto para a planta quanto para a formiga, terão grande importância. Estas vantagens são suficientes para reforçar o poder da pressão da seleção na manutenção dessa interação inseto-planta.

Neste trabalho foram testadas as hipóteses surgidas das observações em campo, onde sementes de *M. fistulifera* eram transportadas por operárias de formigas cortadeiras do gênero *Atta* e *Acromyrmex*. Foram avaliados então: i) o por que das formigas carregarem as sementes; ii) o que é feito depois delas serem carregadas e se sua germinação, depois de serem manipuladas pelas formigas é afetada; iii) se a atração é pelo elaiosoma ou pela semente e iv) se a atratividade pelo elaiosoma é por contato-nutriente ou indução por compostos químicos (Figura 1).

Tem-se como objetivo geral verificar a interação entre operárias de formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* com sementes de *Mabea fistulifera*, pertencente a família Euphorbiaceae; identificar outras espécies de

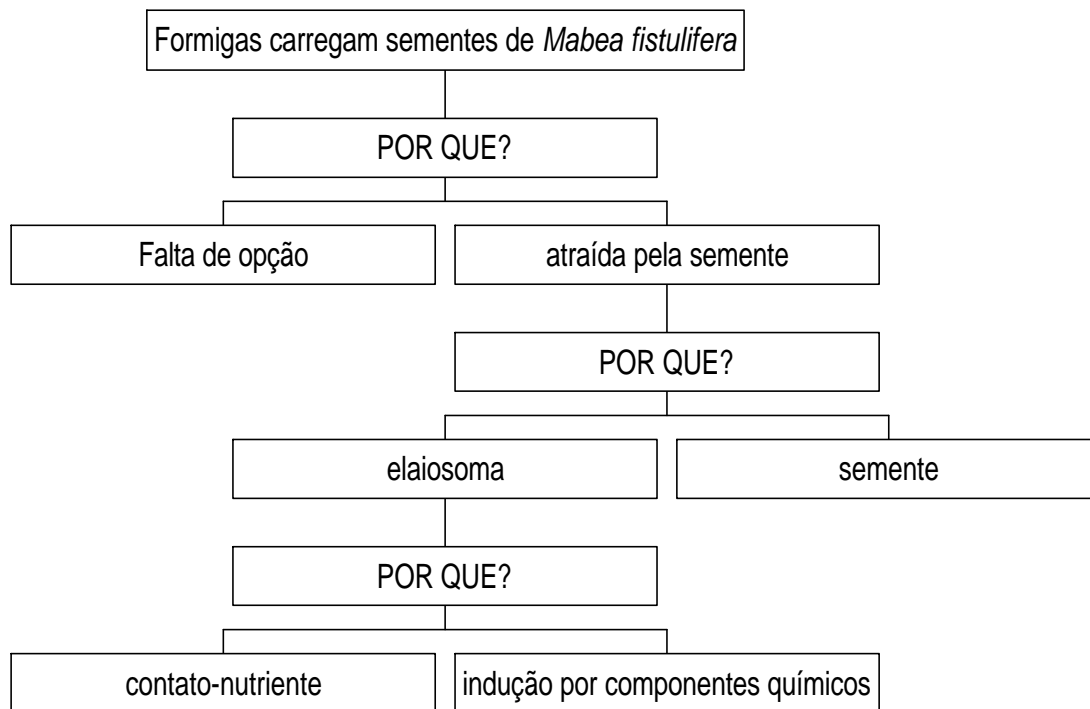


Figura 1 - Fluxograma de formulário de identificação de hipótese

formigas que podem interagir com essas sementes e determinar a composição química do seu elaiosoma.

Serão abordados três capítulos. O primeiro intitulado: "The interaction between workers of the genera *Atta* and *Acromyrmex* and seeds of *Mabea fistulifera* (Euphorbiaceae), a pioneer tree species in Brazil"; um artigo científico submetido e aceito na Revista Sociobiology. O segundo: "Espécies de formigas que interagem com as sementes de *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae)"; foi submetido á Revista Árvore; e o terceiro denomina-se "Isolamento dos constituintes do elaiosoma de *Mabea fistulifera* (Euphorbiaceae): análise de ácidos e ésteres de ácidos graxos."

2. BIBLIOGRAFIA GERAL

- Beattie, A. J. & D. C. Culver 1981. The guild of myrmecochores in the herbaceous flora of West Virginia forests. *Ecology* 62(1): 107-115.
- Beattie, A. J. & D. C. Culver 1982. Inhumation: how ants and other invertebrates help seeds. *Nature*, 297: 1.
- Fahn, A. & E. Werker 1972. Anatomical mechanisms of seed dispersal. In: Kozlowski, T. (ed.), *Seed Biology. Importance, development, and germination*. VI. 1, Academic Press, New York, N.Y., 416p.
- Gorb, S. N. & E. V. Gorb 1999. Dropping rates of elaiosome-bearing seeds during transport by ants (*Formica polyctena* Foerst.): Implications for distance dispersal. *Acta Oecologica*, 20 (5): 509-518.
- Gorb, S. N.; E. V. Gorb & P. Punttila 2000. Effects of redispersal of seeds by ants on the vegetation pattern in a deciduous forest: a case study. *Acta Oecologica* 21 (4-5): 293-301.
- Gullan, P. J. & P. S. Cranston 1994. Myrmecochory: seed dispersal by ants, 262-263p. In: Gullan, P. J. & P. S. Cranston (eds.), *The insects – an outline of entomology*. London, 470p.
- Hanzawa, F. M.; A. J. Beattie & D. C. Culver 1988. Directed dispersal: demographic analysis of an ant-seed mutualism. *The American Naturalist*, 131 (1): 1-11.
- Handel, S. N., A. J. Beattie 1990. Seed dispersal by ants. *Scientific American*. v. 263, n. 2, p. 76-83.
- Hölldobler, B. and E. O. Wilson 1990. *The ants*. Cambridge Harvard University Press, 733 p.
- Horvitz, C. C. & D. W. Schemake 1986. Seed dispersal of a Neotropical myrmecochores: variation in removal rates and dispersal distance. *Biotropica* 18(4): 319-323.

- Kjelisson, G. 1985. Seed fate in a population of *Carex pilulifera* L. I Seed dispersal and ant-seed mutualism. *Oecologia* 67: 416-423.
- Mark, S. & J. M. Olesen 1996. Importance of elaiosome size to removal of ant-dispersed seeds. *Oecologia*. 107: 95-101.
- Morales, M. A. & E. R. Heithaus 1998. Food from dispersal mutualism shifts sex ratios in colonies of the ant *Aphaenogaster rudis* *Ecology*. 70 (2), 734-739.
- Milton, S. J. & W. R. J. Dean 1993. Selection of seeds by harvester ants (*Messor capensis*) in relation to condition of arid rangeland. *Journal of Arid Environments*, 24: 63-74.
- Mull, J. F. & J. A. MacMahon 1997. Spacial variation in rates of seed removal by harvester ants *Pogonomyrmex occidentalis*) in a shrub-steppe ecosystem. *The American Midland Naturalist*, 138 (1): 1-13.
- Passos, L. & S. O. Ferreira 1996. Ant dispersal of *Croton priscus* (Euphorbiaceae) seeds in a tropical semideciduous forest in southeastern Brazil. *Biotropica* 28(4b): 697-700.
- Pizo, M. A. & P. S. Oliveira 1998. Interaction between ants and seeds of a nonmyrmecochorous neotropical tree, *Cabralea canjerana* (Meliaceae), in the Atlantic Forest of southeast Brazil. *American Journal of Botany*. 85(5): 669-674.
- Schultz, T. R. & McGlynn 2000. Interactions of ants with other organisms. pp.35-44. In: D. Agosti, J. D. Majer, L. E. Alonso and T. R. Schultz (ed.). *Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for ants*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., USA, 280p.
- Van der Pijl, L. 1972. *Principles of dispersal in higher plants*. 2 ed. Berlin, Alem.: Springer – Verlag., 162p.
- Zettler, J. A.; T. P. Spira & C. R. Allen 2001. Ant-seed mutualisms: can red imported-fire ants sour the relationship? *Biological Conservation*. 101: 249-253.

THE INTERACTION BETWEEN WORKERS OF THE GENERA *Atta* AND *Acromyrmex* AND SEEDS OF *Mabea fistulifera* MART. (EUPHORBIACEAE), A PIONEER TREE SPECIES IN BRAZIL

Ethel F. O. Peternelli, Terezinha M. C. Della Lucia, Luiz A. Peternelli, Sebastião V. Martins & Eduardo Euclides de L. e Borges

ABSTRACT

The aim of this laboratory study was to investigate the interaction between workers of the genera *Atta* and *Acromyrmex* and seeds of *Mabea fistulifera* Mart. It also evaluated this interaction effect on seed germination. Both *Atta sexdens rubropilosa* and *Acromyrmex subterraneus subterraneus* manipulated the seeds; carried them into the nests and discarded them after elaiosome removal. These results indicated that these ant subspecies are important for *M. fistulifera* seed transportation. However, *Atta* is more important because by their manipulation, seed germination is favored.

KEYWORDS: ant-plant interactions, *Acromyrmex*, *Atta*, *Mabea fistulifera*, myrmecochory, seed dispersal.

INTRODUCTION

Leaf-cutting ants collect a large variety of plant materials, and have been observed gathering seeds or parts of fruits on the forest floor (Dalling & Wirth, 1998). According to these authors, seeds of *Miconia argentea* are dispersed by *Atta colombica*, which may be considered a secondary dispersal agent of this plant on Neotropical forests. Secondary seed dispersion may also be a determinant of vegetation abundance and distribution in abandoned fields under recuperation stages (Pinto, 1998). Therefore, this activity exhibited by ants is of ecological importance in ecosystems. Recently, Leal & Oliveira (1998) showed that fungus-growing ants actively collect seeds in the Cerrado of Brazil. In those ecosystems, myrmecochory plays a fundamental role in the biology of both seeds and Attini. When the seeds are taken into the nests, they are protected from fungi and predator attack and from fire; nest sites are also rich in the nutrients required for seed germination.

On the other hand, it has been hypothesized that females originating from colonies, which have seed elaiosome on their diet, are significantly more fertile (Zettler et al., 2001).

In reforestation areas we observed a large increase in density of *Mabea fistulifera* (Euphorbiaceae), a pioneer tree species, and the simultaneous occurrence of *Atta* colonies (unpublished data). Seeds of *M. fistulifera* are initially dispersed by explosive ejection of seeds. According to Berg (1975) *apud* Passos & Ferreira (1996), mechanisms of secondary seed dispersion are very common in the Euphorbiaceae family. This might be the case in *M. fistulifera* with leaf-cutting ants acting as this secondary agent.

The aims of this study were to investigate, under laboratory conditions, the interaction between workers of the genera *Atta* and *Acromyrmex* and seeds of *M. fistulifera* and to evaluate this interaction effect on seed germination.

MATERIALS AND METHODS

Study Site

The ant-seed interaction tests were conducted at the Insectary of the Animal Biology Department, Federal University of Viçosa – MG, under $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ and $75 \pm 5\%$ RH. Germination tests were conducted at the Silvicultura Seed Analyses Laboratory of the Forestry Department of the same University.

Ant-seed Interaction

Four nests of *Acromyrmex subterraneus subterraneus* and four of *Atta sexdens rubropilosa* were chosen to evaluate the ant-seed interaction. They were approximately three years old and the fungus garden volume of about 30 liters.

Fresh seeds of *M. fistulifera* that were hand collected in the period of fruit maturation (September to October 2001) were offered to the ants. Collecting was performed in two different ways. In the first, mesh bags were placed on the trees around the fruit bunches containing the seeds. These bags were inspected daily until spontaneous fruit opening which usually occurs explosively during hot and sunny days (Vieira, 1991). In the second procedure the bunches were cut and taken to the laboratory, where they were placed on trays and maintained in a ventilated room until fruit opening. A screen covered the trays during fruit drying to avoid losses.

Leaf-cutting ant colonies were deprived of food for 12 hours (Della Lucia et al., 1993), followed by offerings, to each nest, of 20 fresh seeds on a plastic container. The number of seeds left on the container after intervals of three minutes was counted until the workers transported all of the seeds. This was repeated ten days for each nest.

Results were analyzed by means of either the SAS (v. 8.0 for Windows) or SAEG (v. 8.0 for Windows) statistical programs.

Germination Tests

Only those seeds that were transported and manipulated by workers of *A. sexdens rubropilosa* and *Ac. subterraneus subterraneus* during the test already mentioned were used. A total of 4 treatments was performed as follows: i) AT = seeds removed from *Atta* colonies, in which the elaiosome had been removed by ants; ii) AC = seeds removed from *Acromyrmex* colonies, in which the elaiosome had been removed by the ants, iii) CS = clean seeds, with the elaiosome mechanically removed; and iv) FS = fresh seeds. Six replicates were done and 50 seeds were used in each replication. The seeds were then placed on Petri dishes, previously underlined with germination paper and moistened with distilled water. The dishes were kept for up to 30 days in a BOD at 25⁰C until the emission of radicles, when the seeds were considered to have germinated (Paula, 1997).

The germination paper was moistened with distilled water after each observation; the number of radicles was counted at each inspection and, followed by their discarding. Results were expressed as average percentage of

germinated seeds. The LSD test and the SAS program were used for mean comparisons and other analyses.

RESULTS AND DISCUSSION

Ant-Seed Interaction

All seeds containing elaiosome were promptly manipulated by the ants, carried into the nests and discarded after elaiosome removal. Similar results were obtained by Leal & Oliveira (1998); Auld & Denham (1999) and Gorb & Gorb (1999). In general, these investigations concluded that seed removal rates depend on seed size, shape and elaiosome attractiveness. The elaiosome tends to dry after fruit opening and loses its attractiveness, so that fresh seeds are more attractive (Gorb & Gorb, 1999). In our work, the ants not only manipulated the seeds but these were also transported into the nest and discarded after elaiosome removal. Similar results were reported by Leal & Oliveira (1998) with seeds in Cerrado areas where the distance of seed transportation reached up to 12 m, besides elaiosome removal by some species, including those of *Atta* and *Acromyrmex*.

The average time necessary for picking up 100% of the seeds from the foraging arena ranged from 15 to 35 minutes (Fig. 1). When the tests were replicated, there was a decline in the time (x variable) used to retrieve the seeds for both *Atta* ($y = 27.30 - 1.05 X$, $P < 0,05$) and *Acromyrmex* ($y = 37.35 - 1.61 X$, $P < 0,05$). This was probably a consequence of the reduction in the time of seed exploration at the beginning of each test, each day, and could mean a strategy exhibited by the ants to maximize the use of the food source, as mentioned in the work of Herbers & Choiniere (1996). The average time in

minutes necessary to retrieve all seeds was significantly shorter ($P < 0.01$) for *Atta* ($\bar{X} = 21.52$ min.) as compared to *Acromyrmex* ($\bar{X} = 28.50$ min.).

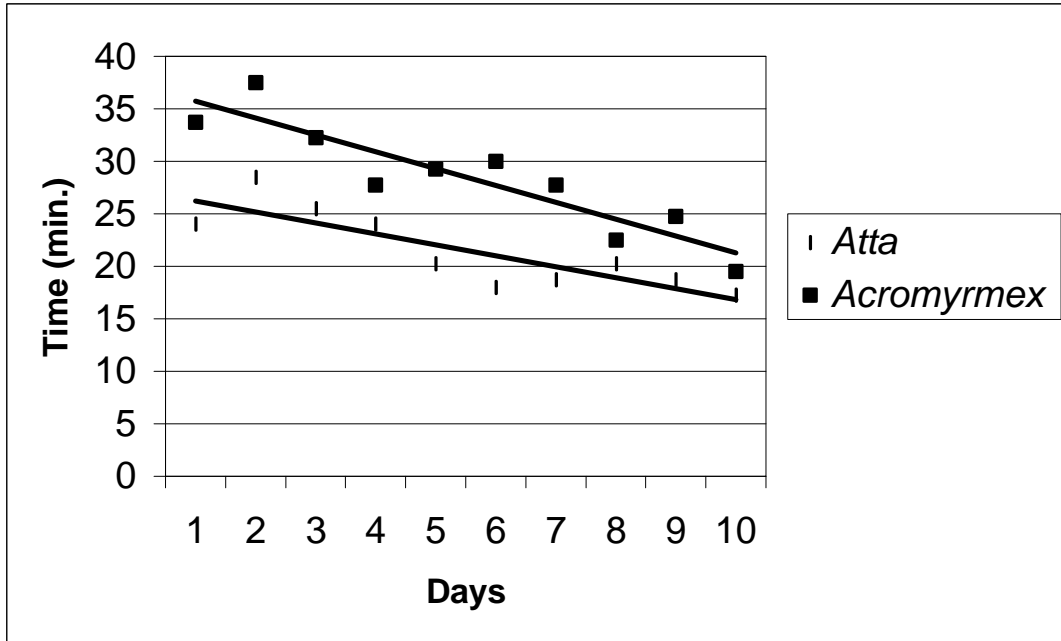


Fig.1. Average time taken by leaf-cutting ants to transport all the seeds of *Mabea fistulifera* offered on the arena per day of experiment.

The workers of *A. sexdens rubropilosa* were capable of carrying the seeds into the nests without any difficulties whereas those of *Ac. subterraneus subterraneus* generally had more difficulty in picking up the seeds; sometimes, other workers had to be recruited to help, picking up occasionally fallen seeds. The rate of fallen seeds is affected by their weight and size in relation to ant workers, according to Gorb & Gorb (1999). *Acromyrmex subterraneus subterraneus* possibly utilizes a different foraging strategy in comparison to *Atta* since caste polymorphism is less pronounced in that genus (Rudolph & Loudon, 1986; Nichols-Orion & Schultz, 1990; Araújo et al., 1998). This is evident in species of desert ants; the high degree of polymorphism of the individuals that

forage may significantly influence resource utilization by the ants in the colony (Morehead and Freener-Jr., 1998).

Seed size and shape also determine the way ants deal with them (Gorb & Gorb, 1995). Seeds of *M. fistulifera* are small (6 mm) and the ants grab the seed elaiosome by their mandibles.

Five days after the tests, seeds were seen discarded on the refuse piles or along the foraging arena, completely clean, i.e., without the elaiosome, but unharmed. Similar results were reported by Leal & Oliveira (1998) with seeds of Cerrado vegetation. Passos & Ferreira (1996) mentioned that elaiosome removal by Attini plays an important role in the establishment of seeds of trees in the Neotropics. In addition, Augspurger *apud* Leal & Oliveira (1998) added that fungus infestation on the elaiosome could be a source of seed mortality in tropical forests. Thus, when seeds do not have elaiosome removed they may fail to germinate.

The results obtained under laboratory conditions indicated the possibility of seed dispersal of *M. fistulifera* by *Atta* and *Acromyrmex* workers at field level.

Germination Test

Results of the germination experiments indicated that seeds that had elaiosomes removed by *Atta* workers had a significant increase on their germination rate ($P < 0.01$).

Fig. 2 illustrates germination rates as a function of time. The last seeds to germinate in all treatments were at day 24th. Seeds previously manipulated by *Acromyrmex* workers germinated earlier, but they had germination rates

similar to those of fresh seeds (FS) and of clean seeds (CS). These results are similar to those reported by Passos & Ferreira (1996) with seeds of *Croton priscus*.

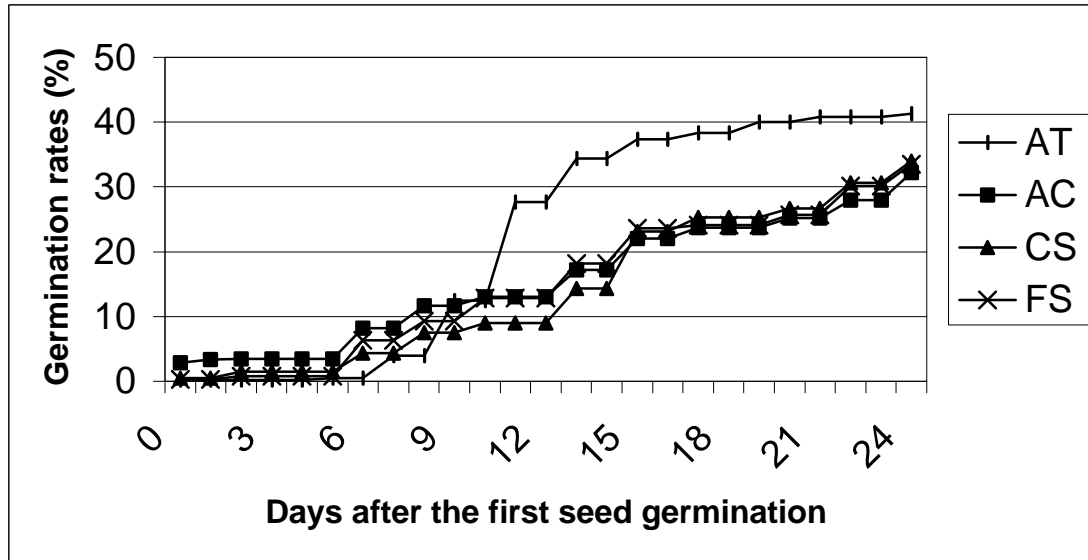


Fig. 2, Accumulated germination rate as a function of days after first seed germination: AT (seeds removed from *Atta* colonies), AC (seeds removed from *Acromyrmex* colonies), CS (clean seeds) and FS (fresh seeds).

On the other hand, the average total germination of seeds that had been manipulated by *Atta* workers was significantly higher (Tab.1), although germination was later (9 days – Fig. 2). Dalling & Wirth (1998) obtained similar data with seeds of *Miconia argentea* and workers of *Atta colombica* and concluded that under certain conditions the seeds removed and transported by leaf-cutting ants may be sufficient to affect the distribution pattern of some tree species. Our data could also support the affirmative by Pizo & Oliveira (1998) that, although leaf-cutting ants are well known as pests, they may play an opposite role, as secondary seed dispersing agents in tropical forests.

TABLE 1, AVERAGE¹ PERCENTAGE OF GERMINATION TO TREATMENTS: AT, AC, CS, AND FS.

Treatments	Average ²
AT	41,33 a
AC	32,17 b
CS	34,00 b
FS	33,50 b

¹ AVERAGE OF SIX REPLICATIONS;

² AVERAGES FOLLOWED BY THE SAME LETTER DO NOT DIFFER AMONGST THEMSELVES BY LSD TEST.

AT – SEEDS REMOVED FROM *ATTA* COLONIES

AC – SEEDS REMOVED FROM *ACROMYRMEX* COLONIES

CS – CLEAN SEEDS

FS – FRESH SEEDS

We can conclude that both ant subspecies are important for *M. fistulifera* transportation seen that they both readily pick up and carry *M. fistulifera* seeds. *Atta* is more important, however, because by their manipulation, seed germination is favored.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to the Brazilian research agency National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the scholarships.

REFERENCES

- Araújo, M. S.; T. M. C. Della Lucia; M. C. Picanço; N. Anjos & E. F. Vilela 1998. Polimorfismo e transporte de cargas em *Acromyrmex laticeps nigrosetosus* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 41(2-4): 443-446.
- Auld, T. D. & A. J. Denham 1999. The role of ants and mammals in dispersal and post-dispersal seed predation of the shrubs *Grevillea* (Proteaceae). *Plant Ecology*, 144: 201-213.
- Dalling, J. W. & R. Wirth 1998. Dispersal of *Miconia argentea* seeds by the leaf-cutting ant *Atta colombica*. *Journal of Tropical Ecology*. 14: 705-710.
- Della Lucia, T. M. C., H. G. Fowler & D. D. O. Moreira 1993. Criação de formigas cortadeiras em laboratório. In: Della Lucia, T. M. C. (ed.) *As Formigas Cortadeiras*, Viçosa, pp. 151 – 162.
- Gorb, N. & E. V. Gorb 1995. Removal rates of seeds of five myrmecochorous plants by the ant *Formica polyctena* (Hymenoptera: Formicidae). *Oiko*, 73: 367-374.
- Gorb, S. N. & E. V. Gorb 1999. Dropping rates of elaiosome-bearing seeds during transport by ants (*Formica polyctena* Foerst.): Implications for distance dispersal. *Acta Oecologica* 20(5), 509-518.
- Herbers, J. M. & E. Choiniere 1996. Foraging behavior and colony structure in ants. *Animal Behaviour*, 51: 141-153.
- Leal, I. R. & P. S. Oliveira 1998. Interactions between fungus-growing ants (Attini), fruits and seeds in cerrado vegetation in southeast Brazil. *Biotropica* 30(2): 170-178.
- Morehead, S. A. & D. H. Feener-Fr 1998. Foraging behavior and morphology: seed selection in the harvester ant genus, *Pogonomyrmex*. *Oecologia*, 114: 548-555.
- Nichols-Orians, C. M. & J. C. Schultz 1990. Interactions among leaf toughness, chemistry and harvesting by attine ants. *Ecological Entomology*, 15: 311 – 320.
- Passos, L. & S. O. Ferreira 1996. Ant dispersal of *Croton priscus* (Euphorbiaceae) seeds in a tropical semideciduous forest in southeastern Brazil. *Biotropica* 28(4b): 697-700.
- Paula, N. F. 1997. Alterações fisiológicas em sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) durante o armazenamento. Viçosa: UFV, 52p. Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Viçosa.

- Pinto, F. S. 1998. Efeitos da dispersão de sementes por animais e dos fatores edáficos sobre a germinação, crescimento e sobrevivência das plântulas de lobeira *Solanum lycocarpum*. Brasília, DF: UNB, 1998. 68p. Tese (Mestrado em Ecologia). Universidade de Brasília.
- Pizo, M. A. & P. S. Oliveira 1998. Interaction between ants and seeds of a nonmyrmecochorous neotropical tree, *Cabralea canjerana* (Meliaceae), in the Atlantic Forest of southeast Brazil. *American Journal of Botany*. 85(5): 669-674.
- Rudolph, S. & C. Loudon 1986. Load size selection by foraging leaf-cutter ants (*Atta cephalotes*). *Ecological Entomology*, 11: 401-410.
- Vieira, M. F. 1991. Ecologia da polinização de *Mabea fistulifera* (Euphorbiaceae) na região de Viçosa – MG. Campinas, SP: UNICAMP, 1991, 85p. Tese (Mestrado em Biologia). Universidade Estadual de Campinas.
- Zettler, J. A.; T. P. Spira & C. R. Allen 2001. Ant-seed mutualisms: can red imported-fire ants sour the relationship? *Biological Conservation*, 101: 249 - 253.

ESPÉCIES DE FORMIGAS QUE INTERAGEM COM AS SEMENTES DE *Mabea fistulifera* Mart. (EUPHORBIACEAE)

Ethel F. O. Peternelli, Terezinha M. C. Della Lucia e Sebastião Venâncio
Martins

RESUMO – As formigas, quando atraídas por um apêndice nutritivo, produzido na semente de certas plantas, podem exercer o papel de agente predador ou dispersor das sementes. No processo de dispersão, grande número de espécies de formigas pode interagir com sementes de determinada planta. O objetivo deste trabalho foi identificar as espécies de formigas que interagem com sementes de *Mabea fistulifera* Mart., uma espécie arbórea colonizadora de áreas antropizadas no Brasil. Objetivou-se, ainda, verificar o tipo de interação desses insetos com as sementes, determinando-se as espécies dispersoras. Foram realizadas coletas manuais de formigas em fragmentos de vegetação com alta densidade de *M. fistulifera*, no Município de Viçosa – MG, no momento de sua visitação às sementes. As formigas capturadas foram triadas e identificadas a nível de espécie. Além disso, durante as coletas foram feitas observações do tipo de comportamento das formigas que interagiram com as sementes e o cálculo da taxa de remoção das sementes. Dezesesseis espécies interagiram com as sementes. *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, *Atta sexdens rubropilosa*, *Ectatomma edentatum*, *Pachycondyla* sp.1 e *Pheidole* sp.2 foram de fato dispersoras, já que transportaram efetivamente as sementes. *Ac. subterraneus subterraneus*, *C. rufipes*, *Ectatomma permagnum*, *Megalomyrmex* sp.1, *Pachycondyla* sp.1, *Pachycondyla* sp.2, *Pheidole* sp. 4, *Pheidole* sp. 5 e *Pogonomyrmex* sp. são, pela primeira vez, relatadas

interagindo com sementes. A taxa de remoção das sementes de *M. fistulifera* pelas formigas variou de 85 a 97%.

Palavras-chave: interação formiga-planta, mirmecocoria e dispersão de semente

**ANT SPECIES INTERACTING WITH SEEDS OF *Mabea fistulifera* Mart.
(EUPHORBIACEAE)**

ABSTRACT – Ants, when attracted to a nutritious corpuscle produced by seeds of certain plant species, can act as predators or dispersing agents of these seeds. During seed dispersal, a great number of ant species can interact with seeds of a particular plant species. The purpose of this study was to identify the ant species which interact with seeds of *Mabea fistulifera* Mart., a pioneer tree species in antropic disturbed areas in Brazil. Another objective of this work was to determine the type of ant-seed interaction and the possible dispersing ant species of this Euphorbiaceae. Hand colecting of ant species was performed in four sites where *M. fistulifera* abunded in the region of Viçosa, MG, at the moment of seed visiting. These were taken to the laboratory and identified to species level. During collecting, observation on the type of behavior the ants exhibited when interacting with the seeds were catalogued. Seed removal rate was also obtained. Sixteen species of ants interacted with the seeds; *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, *Atta sexdens rubropilosa*, *Ectatomma edentatum*, *Pachycondyla* sp.1 and *Pheidole* sp.2 were in fact, dispersing agents because they effectively transported these seeds. *Ac. subterraneus*

subterraneus, *C. rufipes*, *Ectatomma permagnum*, *Megalomyrmex* sp.1, *Pachycondyla* sp.1, *Pachycondyla* sp.2, *Pheidole* sp. 4, *Pheidole* sp. 5 and *Pogonomyrmex* sp. are reported for the first time as interacting with seeds. Seed removal rate was ranged 85 to 97%.

Key words: ant-plant interaction, myrmecochory and seed dispersal

1. INTRODUÇÃO

Na mirmecocoria, a interação entre plantas mirmecocóricas com as espécies de formigas, envolve grande diversidade de formigas associadas com as sementes e, portanto, essa interação não é especializada (Gorb & Gorb, 1995; Passos & Ferreira, 1996). Alguns trabalhos chegaram a essa conclusão, como, Passos & Ferreira (1996), estudando a dispersão de sementes de *Croton priscus* (Euphorbiaceae) em que identificaram onze espécies de formigas que interagem com as sementes. Já Culver & Beattie (1978) encontraram 12 espécies de formigas interagindo com sementes do gênero *Viola* (Violaceae). Também Horvitz & Schemske (1986) observaram cinco espécies de formigas interagindo com sementes de *Calathea ovandensis* (Marantaceae).

Muitos gêneros de Formicidae são relatados como dispersoras de sementes, como é o caso de *Formica*, *Myrmica* e *Aphaenogaster*, comuns nas florestas temperadas da Europa e América do Norte, além de espécies de *Rhytidoponera*, *Pheidole* e *Iridomyrmex*, provenientes da Austrália (Handel & Beattie, 1990). Já nas regiões de Cerrado no Brasil foram identificados, por

Leal & Oliveira (1998), vários gêneros de Attini, dispersoras de sementes, como *Cyphomyrmex*, *Mycetarotes*, *Mycocepurus*, *Myrmicocrypta*, *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex*, incluindo ainda as cortadeiras *Atta* e *Acromyrmex*. Estes dois últimos não só removeram o elaiosoma das sementes como também as transportaram a distâncias de cerca de 12 m. Segundo aqueles autores, os Attini podem ter efeito benéfico na biologia das sementes de plantas superiores quando agem como dispersores secundários em florestas neotropicais.

As espécies de formigas que interagem com sementes diferem na morfologia e biologia, assim como as espécies de plantas mirmecocóricas diferem no tamanho das suas sementes e de seus elaiosomas (Gorb & Gorb, 1999; Gorb et al., 2000). Sementes pequenas tendem a ser removidas por formigas pequenas e sementes grandes tendem a ser removidas por formigas grandes que possuem fortes mandíbulas. Essa relação foi estudada por Gorb & Gorb (1995), quando avaliaram a taxa de remoção de sementes de cinco espécies de plantas mirmecocóricas por *Formica polyctena*. Eles mostraram, ainda, que o sucesso da mirmecocoria depende da atratividade do elaiosoma, (seu valor energético é o principal sinal para as formigas) (Gorb & Gorb, 1995), do grau de polimorfismo das operárias que forrageiam (Culver & Beattie, 1978; Kaspari, 1996) e de suas estratégias de forrageamento (Beattie & Lyon, 1975; Morehead & Feener-Jr., 1998). É importante mencionar um outro aspecto relevante desse processo que é a maneira como as formigas pegam as sementes. A forma e o tamanho das formigas determinam a maneira pela qual elas carregam as sementes. Para isso, a formiga seleciona uma parte da semente que seja fácil de apreender com as suas mandíbulas; normalmente

sementes grandes são apreendidas pelo elaiosoma e as menores são apreendidas pelo corpo da semente (Gorb & Gorb, 1999).

Vulgarmente conhecida como canudo-de-pito, *Mabea fistulifera* Mart. é uma árvore pioneira pertencente à família Euphorbiaceae (Lorenzi, 1992). Seu fruto é uma tricoca, subgloboso, levemente tri-sulcado, de aproximadamente 15,5 a 19,0 mm de comprimento e também de diâmetro, com pilosidade acastanhada e com o epi-mesocarpo trincado por ocasião da deiscência; a coca é bilvalvar e monospérmica. Durante o desenvolvimento dos frutos, as glândulas nectaríferas do receptáculo aumentam de duas a três vezes o seu tamanho e são, constantemente, visitadas por formigas (Vieira, 1991).

O papel exercido por *M. fistulifera* no ecossistema é relevante. Diversos animais, cerca de 67 espécies, com diferentes características morfológicas, fisiológicas e comportamentais, visitam suas flores, frutos e utilizam seus abundantes recursos florais como alimento durante a estação seca, período em que outros itens alimentares podem ser escassos (Vieira, 1991).

É sabido que plantas colonizadoras apresentam, geralmente, sementes pequenas, que germinam rapidamente quando dispersadas em ambientes abertos, podendo, por outro lado, permanecer dormentes no solo por anos ou décadas em locais de vegetação densa (Kozlowski, 1972). A ocorrência de saueiros dentro dessas áreas abertas poderia representar uma interação formiga-planta importante no processo de dispersão secundária das sementes e no fornecimento de um ambiente propício para o desenvolvimento dessa espécie (Pinto, 1998).

Os objetivos deste trabalho foram identificar as espécies de formigas que interagem com as sementes de *M. fistulifera*, determinando as espécies

dispersoras, e verificar o tipo de interação dessas espécies de formigas com as sementes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia para os trabalhos em campo foi adaptada e modificada de Passos & Ferreira (1996).

2.1. Época e local de coletas de formigas

Os experimentos foram conduzidos em quatro fragmentos vegetais no Município de Viçosa (20^o45'S e 42^o55'W) – MG, nas imediações do Campus da Universidade Federal de Viçosa – MG. Esses locais foram escolhidos por causa da grande abundância de *M. fistulifera* e cada local recebeu o nome de sítio: o sítio I, no Condomínio Bosque Acamari; sítio II, no Barbado (Campus UFV); sítio III, no Apiário (Campus UFV) e sítio IV, no Belvedere (Campus UFV). Esses experimentos foram efetuados no período de setembro à dezembro de 2001 e 2002. As formigas coletadas em campo foram levadas ao laboratório onde foram feitas as triagens e identificação a nível de espécie, com o auxílio de chaves taxonômicas de Bolton (1994) e do Dr. Jacques Delabie do Laboratório de Mirmecologia da CEPLAC (Itabuna, BA).

2.2. Taxa de remoção de sementes

Para determinar a taxa de remoção das sementes, 20 sementes frescas de *M. fistulifera* foram marcadas com tinta e colocadas em cinco pontos ao longo da área de estudo (totalizando N= 100 observações por sítio de

avaliação). As sementes foram espalhadas em parcela de 0,5 m² no chão. Após 24 horas as sementes remanescentes nas parcelas foram contadas.

2.3. Interação semente-formiga

Para examinar a interação de espécies de formigas com as sementes de *M. fistulifera*, trabalhou-se nos quatro sítios de fragmentos vegetais anteriormente mencionados (item 2.1). Em cada sítio realizou-se sete experimentos, em sete dias consecutivos, onde setenta sementes frescas de *M. fistulifera* foram regularmente colocadas em uma parcela de 1x2 m, distante 10 m da árvore com frutos. O comportamento foi observado entre 7:00 e 18:00 horas por, pelo menos, cinco horas consecutivas. Com base na metodologia utilizada por Passos & Ferreira (1996), foram observados os seguintes comportamentos: cortar ou mastigar o elaiosoma (c), examinar o elaiosoma (e), ignorar a semente (i), remover a semente (r) e tentar remover a semente (t). Algumas formigas, as que removeram as sementes, foram seguidas para determinar a distância que elas carregavam as sementes e qual o destino destas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observações de campo indicam que a distância média atingida pelas sementes de *M. fistulifera* após a explosão dos frutos é de cerca de 6,90 m (Martins, S. V.*). As sementes de *M. fistulifera* são diplocóricas, portanto, inicialmente dispersas pela própria planta por deiscência explosiva de seus frutos e depois dispersadas pelas formigas, atraídas pelo seu elaiosoma.

3.1. Taxa de remoção de sementes

As taxas de remoção de sementes foram relativamente elevadas, variando de 85 a 97% (Quadro 1). Todos os sítios tiveram taxas de remoção similares ou maiores que as taxas encontradas por Passos & Ferreira (1996), que trabalharam em região tropical, e superiores aos encontrados por Culver & Beattie (1978) e Horvitz & Schemske (1986) em regiões temperadas. Comparando os resultados encontrados com os dos autores já citados pode-se prever que a taxa de remoção de sementes tende a aumentar nas regiões neotropicais, devido a maior diversidade de formigas nestas regiões, comparadas com as temperadas.

* Professor Adjunto, Departamento de Engenharia Floresta da Universidade Federal de Viçosa.

Quadro 1 - Taxa (%) de sementes de *Mabea fistulifera* removidas por formigas em quatro sítios. Viçosa, MG. 07/10/2002 (N=100)
 Table 1 – Proportion (%) of *Mabea fistulifera* seeds removed by ants in four locations. Viçosa, MG. 10/07/2002 (N=100)

Sítios	Nº de sementes não carregadas	% de sementes removidas
I	15	85
II	9	91
III	3	97
IV	14	86

3.2. Interação semente-formiga

Durante as observações diretas feitas em campo, observou-se 16 espécies de formigas interagindo com as sementes de *M. fistulifera* (Quadro 2). Este resultado veio acrescentar a outros encontrados na literatura, adicionando 9 espécies (*Ac. subterraneus subterraneus*, *C. rufipes*, *Ectatomma permagnum*, *Megalomyrmex sp.1*, *Pachycondyla sp.*, *Pachycondyla sp.1*, *Pheidole sp. 4*, *Pheidole sp. 5* e *Pogonomyrmex sp*) a um grande número delas que interagem com sementes contendo elaiosoma (Culver & Beattie, 1978; Horvitz & Schemske, 1986; Passos & Ferreira, 1996). Isto confirma então, a hipótese, de que na dispersão de *M. fistulifera* não ocorre interação espécie-específica.

Em todos os testes realizados, assim que as sementes eram colocadas nas parcelas, passaram-se cerca de trinta minutos de observações até que as primeiras espécies de formigas surgissem, e grande era a atividade das operárias com as sementes. Seis espécies cortavam e/ou mastigavam o elaiosoma; oito examinaram as sementes; apenas três ignoraram-nas e seis

tentaram removê-las. Algumas espécies chegaram a transportar as sementes. Em média, as operárias de *Atta* transportaram as sementes a cerca de 4 m e as de *Acromyrmex* a 2 m de distância do local onde as sementes eram encontradas, porém as operárias de *Acromyrmex* não tinham a facilidade de transportar as sementes como tinham as de *Atta*.

As formigas *Pheidole* sp. 2 eram agressivas e recrutavam numerosas operárias para ajudar no transporte das sementes. Já as de *Camponotus rufipes* também apresentavam o comportamento agressivo, mas apenas exploravam, tentavam remover as sementes e depois as ignoravam. As demais espécies de *Pheidole* exploravam as sementes, recrutavam grande número de operárias, mas não removiam as sementes. Simplesmente manipulavam-nas no local onde elas eram encontradas; removiam o elaiosoma em pequenos fragmentos, levando-os para seus ninhos. Além de *C.rufipes* ignorar as sementes também tiveram esse comportamento *Pogonomyrmex* sp., *Camponotus* sp.1 e *Pachycondyla striata* (Quadro 2).

Quadro 2 – Comportamento observado para cada uma das 16 espécies de formigas interagindo com sementes de *Mabea fistulifera*. Viçosa, MG. Set-Dez./2001 e 2002.

Table 2 – Behavior exhibited by each one of 16 ant species that interacted with *Mabea fistulifera*. Viçosa, MG. Set.-Dez./2001 and 2001.

Espécies	Comportamento	Distância média de remoção das sementes (m)	Subfamília
<i>Acromyrmex subterraneus subterraneus</i>	r	2	Myrmicinae
<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	r	4	Myrmicinae
<i>Camponotus rufipes</i>	i, e, t, *	-	Formicinae
<i>Camponotus sp.1</i>	i	-	Formicinae
<i>Ectatomma edentatum</i>	e, t, r	3,30	Ponerinae
<i>Ectatoma permagnum</i>	e, t	-	Ponerinae
<i>Megalomyrmex sp.1</i>	t, e, c	-	Ponerinae
<i>Pachycondyla sp.1</i>	e, t	-	Ponerinae
<i>Pachycondyla sp.2</i>	t, e, r	0,15	Ponerinae
<i>Pachycondyla striata</i>	i	-	Ponerinae
<i>Pheidole sp.1</i>	c	-	myrmicinae
<i>Pheidole sp.2</i>	r, c, *	1,3	Myrmicinae
<i>Pheidole sp.3</i>	e, c	-	Myrmicinae
<i>Pheidole sp.4</i>	c	-	Myrmicinae
<i>Pheidole sp.5</i>	e, c	-	Myrmicinae
<i>Pogonomyrmex sp.</i>	i	-	Myrmicinae

remover (r), cortar e mastigar (c), examinar (e), tentar remover (t) e ignorar (i).

* agressivas

Foi observado que tanto operárias de *Atta* quanto de *Acromyrmex* não removiam as sementes quando as operárias de *Pheidole sp. 2* estavam forrageando, pois estas eram bastante agressivas com qualquer outra espécie que tentasse remover alguma semente na área de seu forrageamento. O maior número de operárias de *Atta* e *Acromyrmex* que interagiram com as sementes foi visto no período de final de tarde quando a atividade das operárias de *Pheidole sp.2* diminuía.

As sementes removidas pelas formigas tiveram como destino final, seus ninhos, onde os elaiosomas eram removidos e depois eram descartadas nas proximidades do ninho ou em seus lixos. Isto, não ocorreu com as sementes manipuladas pelas espécies de *E. edentatum*, as quais tiveram um comportamento curioso: as operárias dessa espécie ao encontrarem as sementes, examinavam-nas e em seguida as transportavam para locais

escondidos como debaixo de folhas e galhos, onde elas cortavam o elaiosoma. Nenhuma semente foi vista sendo levada para os ninhos dessa formiga, no período de observação. Talvez esse comportamento seja uma estratégia dessa espécie para proteger seu ninho contra predadores. No dia seguinte à realização das observações, era efetuada nova visita em todos os locais, quando, então, foram encontradas sementes sem o elaiosoma.

Das espécies que interagiram com as sementes 8 pertenciam à subfamília Myrmicinae; 6 pertenciam à subfamília Ponerinae e 2 à subfamília Formicinae (Quadro 2). Myrmicinae é uma subfamília diversificada que ocupa diversos habitats, em regiões temperadas e tropicais (Sudd & Franks, 1987). As espécies colhedoras de sementes “Harvesting-ants” são consideradas predadoras de sementes, mas em algumas circunstâncias são dispersoras, ou seja, quando estas transportam as sementes para seus ninhos e neste percurso podem perder ou abandonar as sementes em locais em que elas poderão ter a chance de se estabelecer e germinar (Handel & Beattie, 1990). Já as espécies das tribos Attini e Pheidolini podem ser eficientes dispersoras diretas (Leal & Oliveira, 1998). As formigas Ponerinae são, na maioria das vezes, predadoras de sementes, mas assim como as formigas colhedoras, podem ser dispersoras em circunstâncias especiais. Nos Formicinae o gênero *Camponotus* é o que apresenta o número maior com cerca de 1000 espécies. Algumas delas podem interagir com as sementes que possuem elaiosoma, mas não são eficientes dispersoras (Sudd & Franks 1987). É importante mencionar que o elaiosoma tende a secar rapidamente após a abertura do fruto. Sementes com elaiosoma seco têm baixa atratividade para as formigas e freqüentemente não são dispersas por elas (Mark & Olesen, 1996).

Das observações feitas, constatou-se, ainda, que algumas espécies de formigas são mais eficientes no transporte das sementes que outras. Tal variação pode ter importantes conseqüências ecológicas, como por exemplo, as sementes removidas podem estar livres de predação. Segundo Horvitz & Schemske (1986) a proteção contra a predação pode ser sugerida como uma importante força seletiva favorecendo o mutualismo entre sementes e formigas.

Sementes sem o elaiosoma e plântulas de *M. fistulifera* foram freqüentemente vistas nos montes de terra solta das formigas de *Atta*, sugerindo que o transporte dessas sementes para esses locais pode beneficiar a planta. Apesar de *Atta* e *Pheidole* serem consideradas pragas agrícolas (Hölldobler & Wilson, 1990) os Attini e Pheidolini exercem efeitos benéficos quando dispersam as sementes de *Croton* (Leal & Oliveira, 1998; Passos & Ferreira, 1996 e Kaspari, 1996). De maneira semelhante as sementes de *M. fistulifera* também foram manipuladas por essas espécies de formigas. A dispersão de sementes de *M. fistulifera* por formigas deve ser mais um fator que contribui para a agressividade dessa planta na colonização de áreas degradadas, como áreas queimadas, barrancos, bordas de florestas secundárias etc.

Vários aspectos no sucesso da remoção de sementes no processo da mirmecocoria foram relatados neste trabalho, como as características das sementes, polimorfismo das formigas e suas estratégias de forrageamento.

4. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que um total de 16 espécies de formigas interage com sementes de *M. fistulifera*. Destas, apenas *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, *Atta sexdens rubropilosa*, *Ectatomma edentatum*, *Pachycondyla* sp.1 e *Pheidole* sp.2 são mirmecocóricas. As formigas apresentaram diferentes estratégias de comportamento ao interagirem com as sementes, favorecendo assim o sucesso desse mutualismo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEATTIE, A. J. & LYONS, N. Seed dispersal in *Viola* (Violaceae): adaptations and strategies. **Amer. J. Bot.** 62(7): 714-722, 1975.

BOLTON, B. **Identification guide to the ant genera of the world.** London. Harvard University, 1994. 222p.

CULVER, D. C. & BEATTIE, A. J. Myrmecochory in *Viola*: dynamics of seed-ant interaction in some West Virginia species. **Journal of Ecology**, 66, 53-72, 1978.

GORB, S. N. & GORB, E. V. Removal rates of seeds of five myrmecochorous plants by the ant *Formica polyctena* (Hymenoptera: Formicidae). **Oikos**, 73: 367-374, 1995.

GORB, S. N. & GORB, E. V. Dropping rates of elaiosome-bearing seeds during transport by ants (*Formica polyctena* Foerst.): Implications for distance dispersal. **Acta Oecologica** 20(5), 509-518, 1999.

GORB, S. N.; E. V. GORB & P. PUNTTILA. Effects of redispersal of seeds by ants on the vegetation pattern in a deciduous forest: a case study. **Acta Oecologica** 21 (4-5): 293-301, 2000.

HANDEL, S. N., BEATTIE, A. J. Seed dispersal by ants. **Scientific American**. v. 263, n. 2, p. 76-83, 1990.

HÖLLDOBLER, B. AND WILSON, E. O. **The ants.** Cambridge Harvard University Press, 1990, 733 p.

HORVITZ, C. C. & SCHEMSKE, D. W. Seed dispersal of a neotropical myrmecochore: variation in removal rates and dispersal distance. **Biotropica** 18(4): 319-323, 1986.

KASPARI, M. Worker size and seed size selection by harvester ants in a Neotropical forest. **Oecologia**, 105: 397-404, 1996.

KOZLOWSKI, T. T. **Seed biology – Importance, development and germination.** VI.1, 1972, 416 p.

LEAL, I. R. & P. S. OLIVEIRA. Interactions between fungus-growing ants (Attini), fruits and seeds in cerrado vegetation in southeast Brazil. **Biotropica**, 30(2): 170-178, 1998.

LORENZI, H. **As árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2 ed., VI. 1, Nova Odessa, SP. Editora Plantarum. 1992. p.106,

MARK, S. & J. M. Olesen. Importance of elaiosome size to removal of ant-dispersed seeds. **Oecologia**. 107: 95-101, 1996.

MOREHEAD, S. A. & FEENER-JR., D. H. Foraging behavior and morphology: seed selection in the harvester ant genus, *Pogonomyrmex*. **Oecologia**, 114: 548-555, 1998.

PASSOS, L. & S. O. FERREIRA. Ant dispersal of *Croton priscus* (Euphorbiaceae) seeds in a tropical semideciduous forest in southeastern Brazil. **Biotropica**, 28(4b): 697-700, 1996.

PINTO, F. S. **Efeitos da dispersão de sementes por animais e dos fatores edáficos sobre a germinação, crescimento e sobrevivência das plântulas de lobeira *Solanum lycocarpum***. Brasília, DF: UNB, 1998. 68p. Tese (Mestrado em Ecologia). Universidade de Brasília, 1998.

SUDD, J. H.; FRANKS, N. R. **The Behavioural Ecology of Ants**. Chapman & Hall, New York, 1987, 206p.

VIEIRA, M. F. **Ecologia da polinização de *Mabea fistulifera* (Euphorbiaceae) na região de Viçosa – MG**. Campinas, SP: UNICAMP, 1991. 85p. Tese (Mestrado em Biologia). Universidade Estadual de Campinas, 1991.

CAPÍTULO 3

ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES DO ELAIOSOMA DE *Mabea fistulifera* Mart. (EUPHORBIACEAE): ANÁLISE DE ÁCIDOS E ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS

1. INTRODUÇÃO

No mutualismo entre plantas mirmecocóricas e formigas dispersoras de sementes, fenômeno este conhecido como mirmecocoria, o elaiosoma das sementes dessas plantas tem sido caracterizado como o agente atrativo às formigas (Beattie & Culver, 1981). Esse tipo de atração foi indiretamente confirmado por Peternelli et al. (2003) ao observar que sementes com elaiosoma, após serem transportadas para os ninhos, tinham seu elaiosoma removido, sendo elas, posteriormente descartadas.

O elaiosoma é um apêndice nutritivo ligado à semente, consistindo de células modificadas formando vacúolos, onde se encontra uma rica mistura de ácidos graxos, lipídeos e proteínas (Hanzawa et al., 1988). Além disso, ele varia muito quanto à forma, tamanho e cor em cada espécie de plantas (Kaspari, 1996; Mark & Olesen, 1996).

Não se sabe ao certo a origem evolutiva do elaiosoma, mas uma das hipóteses explicativas seria que algumas espécies de plantas produziam sementes que tinham externamente um tecido envoltório com a função de

proteção contra predadores. Durante o processo de evolução dessas plantas, esse tecido sofreu mudanças químicas e estruturais, e expandiu-se formando o elaiosoma. Em consequência, além de função de proteção contra predadores este tecido passou também a atrair dispersores (Handel & Beattie, 1990).

Para as formigas o elaiosoma é uma fonte extra de recurso alimentar (Davidson & Morton, 1981). Sabe-se que esses insetos não possuem algumas vias de biossíntese de lipídeos e requerem, por exemplo, uma dieta rica em fonte de esteróides (Hanzawa et al., 1988). Na composição química do elaiosoma encontram-se muitas classes de lipídeos, e tem sido mostrado que eles estimulam as formigas fazendo com que elas colem as sementes (Kusmenoglu et al., 1989).

Neste capítulo objetivou-se determinar composição química do elaiosoma de *Mabea fistulifera* Mart., uma espécie de árvore pioneira da região de Viçosa, pertencente à família Euphorbiaceae.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Análises e Síntese de Agroquímicos (LASA) da Universidade Federal de Viçosa – MG.

2.1. - Coleta das sementes para extração

As sementes de *Mabea fistulifera*, espécie vulgarmente conhecida como canudo-de-pito, foram coletadas manualmente no campo, nos meses de setembro e outubro de 2001 e setembro de 2002, época da maturação dos frutos. A coleta foi dividida em duas etapas. Na primeira foram colocados sacos de filó nos cachos contendo as sementes, na própria árvore. Esses sacos foram observados até a abertura dos frutos os quais foram, então, coletados. Essa abertura espontânea pode ser facilmente notada em dia de sol, conforme comenta Vieira (1991), pelos estalos provocados por sua deiscência explosiva. Na segunda etapa, os cachos foram cortados das árvores e levados para laboratório, onde ficaram em bandejas, em local arejado até a abertura dos frutos. As bandejas foram cobertas por tela ou peneira durante a secagem para evitar perda das sementes.

As sementes coletadas foram divididas em amostras de acordo com a época de suas coletas: Mf1 (set/2001), Mf2 (out/2001) e Mf3 (set/2002).

2.2. Extração dos componentes do elaiosoma

Os elaiosomas das sementes de cada amostra foram removidos manualmente, utilizando um estilete, e pesados. Portanto, as amostras de sementes completas resultaram em amostras de seus elaiosomas apenas.

Cada amostra foi submetida a uma extração contínua com metanol e clorofórmio (2:1), em extrator Soxhlet por 48 h. Após a extração, o material foi filtrado e o solvente removido com a utilização de um evaporador rotatório. Os extratos obtidos, Mf1 E, Mf2 E e Mf3 E, foram pesados e armazenados a 4 °C, até o momento das análises cromatográficas (Kusmenoglu et al, 1989).

2.3. - Análises qualitativas

2.3.1. - Cromatografia em coluna (CC)

Na separação dos compostos em cada amostra, utilizou-se coluna com sílica-gel 60 (70 – 230 Mesh, Merck), com diâmetro de 35 mm e altura de 25 cm. Para a fase móvel, foi utilizada a mistura hexano:éter dietílico (3:1), e foram incorporadas, em três diferentes colunas, 200 mg de cada extrato.

Em todas as análises cromatográficas em camada delgada, foram usadas lâminas de vidro com 0,25 mm de sílica-gel. Como revelador utilizou-se solução de ácido fosfomolibdico na concentração de 12 g de ácido fosfomolibdico : 250 mL de etanol.

Todas as frações obtidas foram concentradas sob pressão reduzida, utilizando evaporador rotatório, e pesadas.

2.3.2. - Análises espectroscópicas

Os espectros dos extratos no infravermelho e de suas respectivas frações eluídas foram obtidos como filme líquido, em célula de NaCl, utilizando-se espectrofotômetro Perkin Elmer FT-IR 1000.

2.3.3. - Análise de ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos, por cromatografia em fase gasosa, das frações obtidas.

Para essa análise as frações obtidas de cada amostra foram submetidas a dois procedimentos: i) transesterificação de ésteres de ácidos graxos; e ii) esterificação de ácidos graxos, para obtenção de seus respectivos ésteres metílicos.

2.3.3.1. - Transesterificação de ésteres de ácidos graxos para obtenção de seus respectivos ésteres metílicos, utilizando metóxido de sódio/metanol

As frações que foram caracterizadas, pelo espectro no infravermelho, como sendo uma mistura de ésteres de ácidos graxos foram submetidas a um processo de transesterificação, para obtenção de seus ésteres metílicos, conforme o procedimento descrito a seguir.

Amostras de 10 mg foram dissolvidas em 0,25 mL de THF em tubos de ensaio. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL da solução de metóxido de sódio 0,5 M (preparado a partir de metanol anidro e sódio metálico), sendo o tubo de ensaio levado ao aquecimento a 50 °C por vinte minutos. Adicionaram-se, então, 25 µL de ácido acético glacial e, posteriormente, 1,5 mL de água. Os ésteres metílicos obtidos foram extraídos com hexano (2 x 2,5 mL), sendo a fase orgânica secada com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), contendo 10% de carbonato de ácido de potássio sólido (KHCO₃), e filtrada. O solvente foi removido em evaporador rotatório, sob pressão reduzida. O material resultante foi, finalmente, dissolvido em 0,25 mL de hexano, para análise por cromatografia em fase gasosa (Paula, 1995).

2.3.3.2. Esterificação de ácidos graxos para obtenção de seus respectivos ésteres metílicos, utilizando BF₃/metanol

As frações que foram caracterizadas como misturas de ácidos graxos, através da análise dos espectros no infravermelho, foram submetidas a um processo de esterificação com trifluoreto de boro e metanol (BF₃/metanol), de acordo com o procedimento, descrito a seguir.

Uma amostra de 10 mg de cada fração foi dissolvida em 0,5 mL de BF₃/metanol (solução a 14% de BF₃ em metanol, Sigma) em tubos de ensaio. Aqueceu-se o tubo a 60 °C por vinte minutos, resfriou-se o material e procedeu-se à extração com 6 mL de hexano. A fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) (2x 5 mL), secada com MgSO₄ (sulfato de magnésio) e filtrada, sendo o material resultante concentrado à

pressão reduzida. Os ésteres metílicos obtidos foram dissolvidos em 0,5 mL de hexano, para análise por cromatografia em fase gasosa (Paula, 1995).

2.4.4. – Cromatografia em fase gasosa

Os cromatogramas em fase gasosa foram obtidos em um cromatógrafo Shimadzu GC – 17A, equipado com detector de ionização de chamas (FID), acoplado a um registrador e integrador chromatopac C-R6A da Shimadzu, sendo utilizado uma coluna capilar SP 2330 (30m x 0,25 mm, filme de 0,1 μ m), fluxo de gás de arraste (N_2): 1,33 mL/min. Temperatura: injetor (220 $^{\circ}$ C), detector (250 $^{\circ}$ C) e coluna 60 $^{\circ}$ C, isotérmica durante dez minutos e, então, programada na razão de 10 $^{\circ}$ C/min., até atingir a temperatura máxima de 220 $^{\circ}$ C, permanecendo isotérmica durante 10 min.

Utilizou-se os seguintes padrões: miristato de metila (C14:0), palmitato de metila (C16:0), estearato de metila (C18:0), oleato de metila (C18:1), linoleato de metila (C18:2), linolenato de metila (C18:3) e eicosanoato de metila (C20:0) em solução de 1000 ppm (1mg/mL). Foi efetuada uma mistura desses padrões, tomando-se 100 μ L de cada solução padrão, de modo que a concentração final fosse de 142,8 ppm. O volume injetado tanto para os padrões quanto para as amostras foi de 1 μ L.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Coleta das sementes para extração

As amostras, de elaiosoma, por época de coleta, com suas respectivas massas estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 - Época de coletas e massa (g) de cada amostra.

Amostras	Época de coletas	Massa elaiosoma (g)
Mf1	SET/2001	4,137
Mf2	OUT/2001	4,237
Mf3	SET/2002	3,512

3.2. Extração dos componentes do elaiosoma

Os elaiosomas foram submetidos a extração com metanol e clorofórmio (2:1), de modo que parte do material pudesse ser dissolvido. Os componentes desta fração solúvel são os lipídios. No Quadro 2 estão apresentados as massas de cada extrato obtido nessa extração.

Quadro 2 - Massa(g) de cada extrato obtido após as extrações.

Extratos	Massa (g)
Mf1 E	0,882
Mf2 E	2,321
Mf3 E	1,078

3.3. Cromatografia em coluna (CC)

Nas três análises cromatográficas foram realizados fracionamentos dos extratos. Na primeira coluna (1) obteve-se as seguintes frações: Mf1 E(1): 1-27, Mf1 E(1): 28-37 e Mf1 E(1): 38-77 (Figura 1). Na Segunda coluna (2) obteve-se as frações: Mf2 E(2): 1-25, Mf2 E(2): 26-90 (Figura 2) e na terceira coluna (3) também obteve-se duas frações: Mf3 E(3): 1-20 e Mf3 E(3): 21-55 (Figura 3).

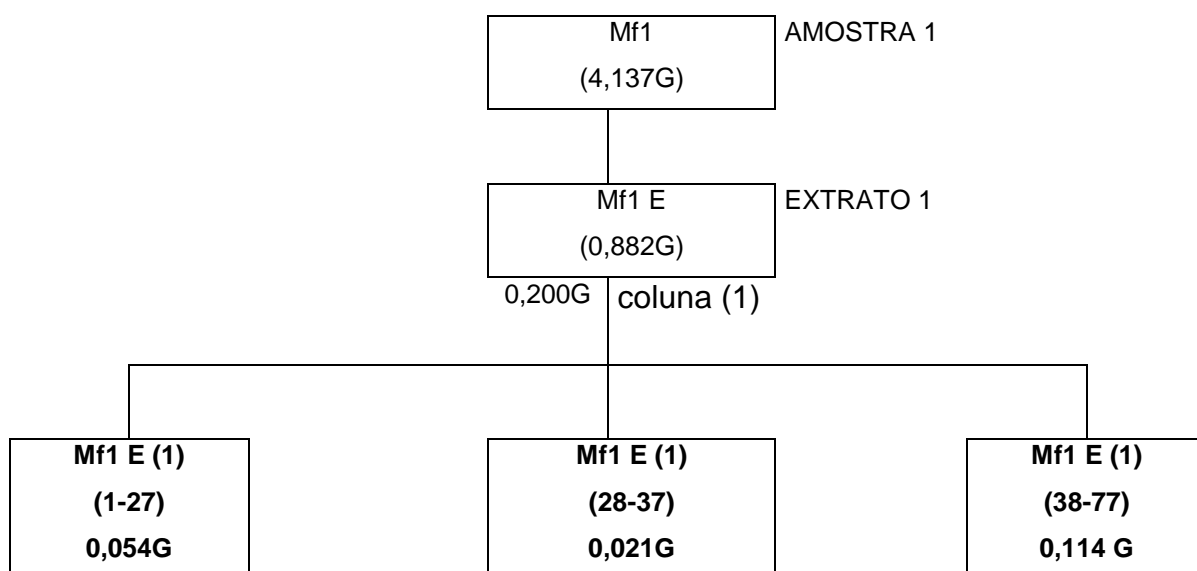


Figura 1 – Fluxograma das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato 1 do elaiosoma de *Mabea fistulifera*.

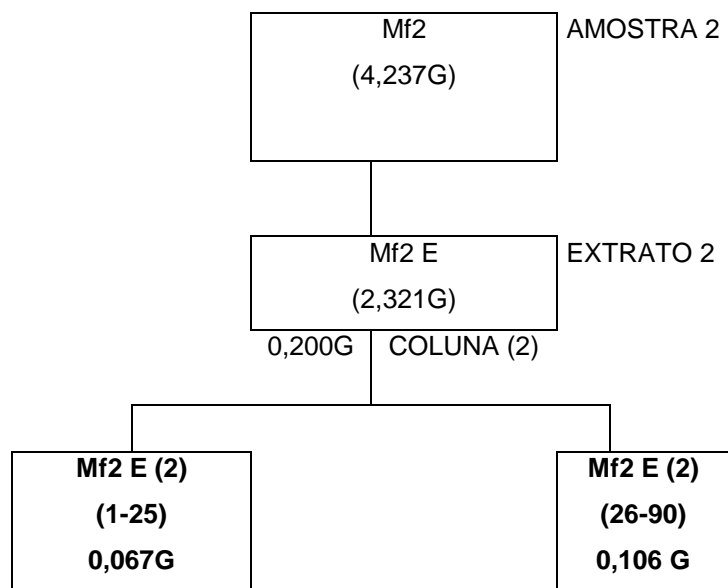


Figura 2 – Fluxograma das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato 2 do elaiosoma de *Mabea fistulifera*.

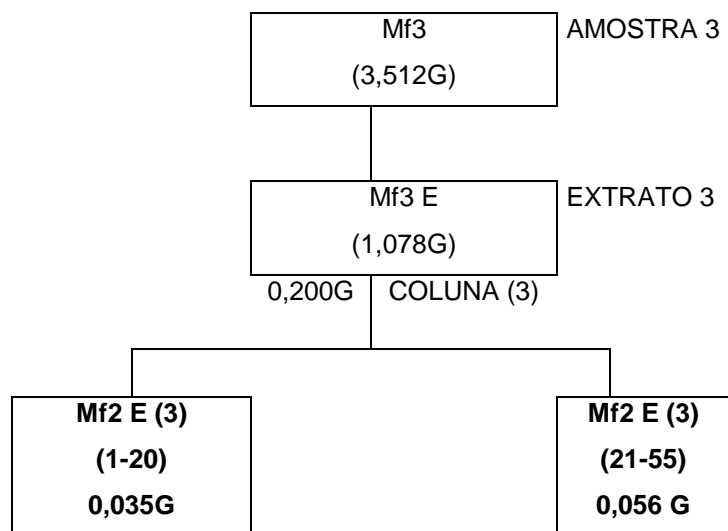


Figura 3 – Fluxograma das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato 3 do elaiosoma de *Mabea fistulifera*.

As massas das frações obtidas nos fracionamentos realizados com cada extrato estão apresentados no Quadro 3.

Quadro 3 – Massa (g) de cada fração obtida dos extratos: Mf1 E (1), Mf2 E (2) e Mf3 E (3).

Extratos	Frações	Massa (g)
Mf1 E (1)*	1-27	0,054
	28-37	0,021
	38-77	0,114
Mf2 E (2)*	1-25	0,067
	26-90	0,106
Mf3 E (3)*	1-20	0,035
	21-55	0,056

* (1), (2) e (3) representam o número das colunas, nas quais foram incorporados os extratos.

3.4. Análises espectroscópicas

Os espectros no infravermelho dos extratos Mf1 E (Figura 4) e Mf2 E (Figura 5) apresentaram absorções semelhantes, enquanto os do extrato Mf3 E (Figura 6) foram diferentes dos dois primeiros. Nesse espectro foi observado uma forte banda em 3.387 cm^{-1} devido a estiramento de OH. A presença da banda em 1.821 cm^{-1} , associado à banda em 3.387 cm^{-1} sugere a presença de água na amostra. Esta amostra, então, foi secada em estufa $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h e analisada novamente no infravermelho, mas mesmo após secagem obteve-se

os mesmos espectros acima mencionados. Este resultado sugere que o OH presente pode ser algum composto orgânico. Essa hipótese tem suporte pela presença da banda em 1.047 cm^{-1} que pode ser atribuída a estiramento da ligação C-O.

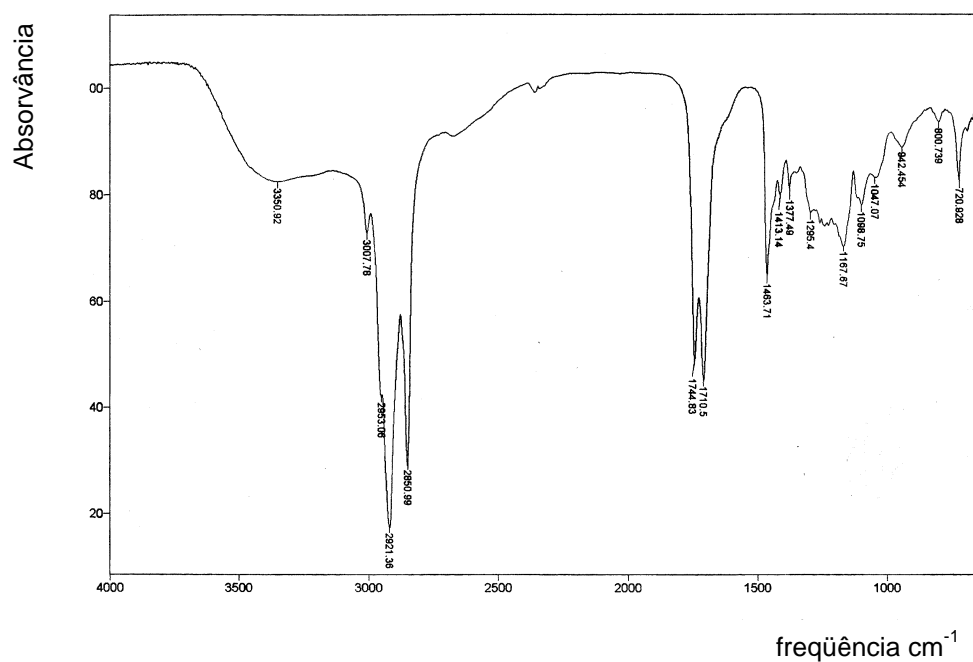


Figura 4 – Espectro no infravermelho do extrato Mf1 E.

3.5. Ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos

3.5.1. Mistura de ésteres de ácidos graxos

Os espectros no infravermelho das frações Mf1 E(1): 1-27 (Figura 7), Mf2 E(2): 1-25 (Figura 8) e Mf3 E(3): 1-20 (Figura 9) característicos de ésteres apresentaram absorções em 3.007 (ν = C-H), 2.955, 2.923 e 2.853 (ν C-H), 1.746 (ν C=O de éster), 1.463 e 1.377 (δ_s C-H), 1.260 (ν C-O de éster) e 721 cm^{-1} [δ_s (CH₂)_n; n>4]. Já os espectros no infravermelho da fração Mf1 E(1): 28-37 (Figura 10), apesar de característico de éster, apresentou algumas diferenças nas absorções em relação as demais, 3.459 (ν = OH), 2.918, 2.923 e 2.849 (ν C-H), 1.740 (ν C=O de éster), 1.463 e 1.375 (δ_s C-H), 1.102 (ν C-O de éster) e 719 cm^{-1} [δ_s (CH₂)_n; n>4]. Esses dados sugerem que, as amostras Mf1 E(1): 1-27, Mf2 E(2): 1-25 e Mf3 E(3): 1-20 sejam constituídos por triacilglicerídeos (Figura 11), enquanto a amostra Mf1 E(1): 28-57 deve ser constituída por diacilglicerídeos (Figura 12).

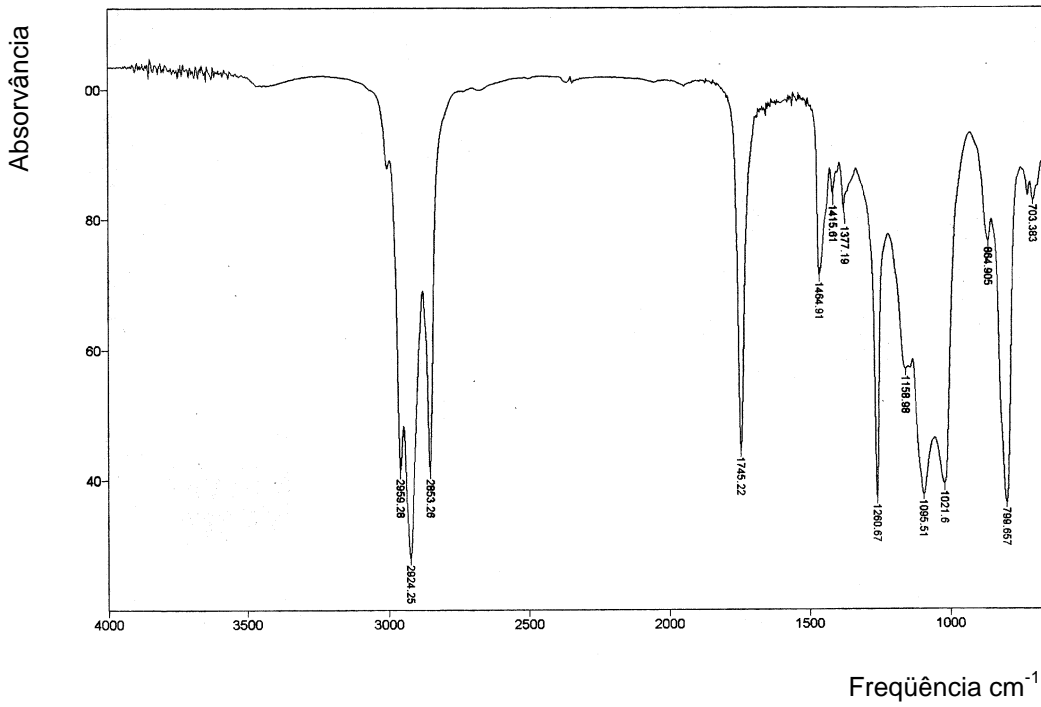


Figura 7 – Espectro no infravermelho da fração Mf1 E (1): 1-27.

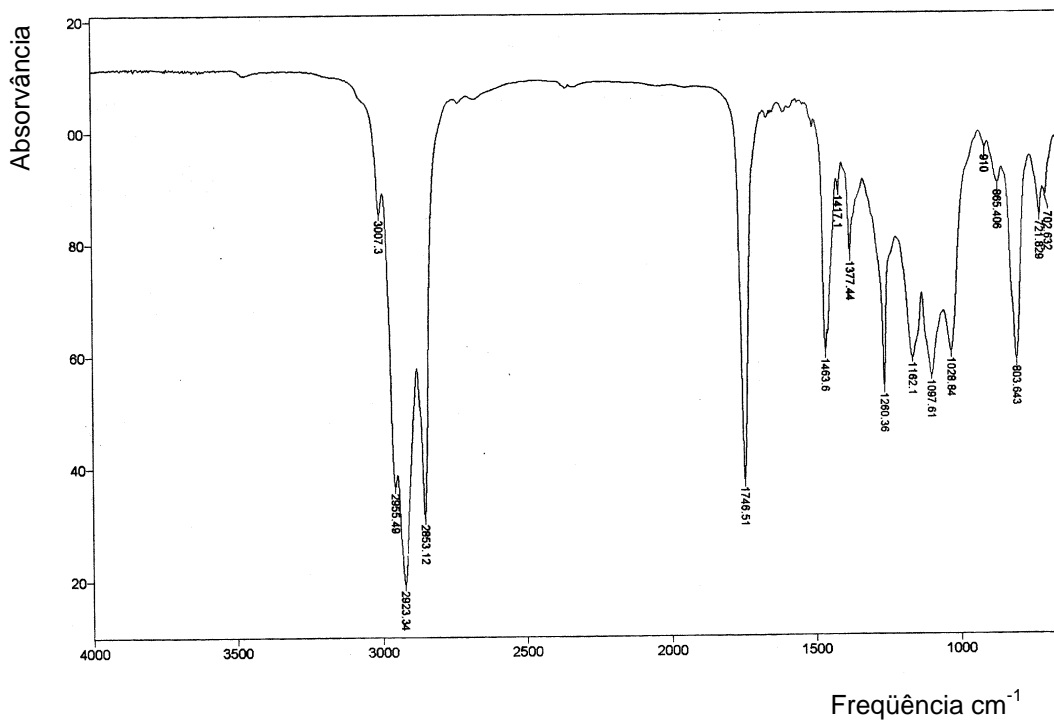


Figura 8 – Espectro no infravermelho da fração Mf2 E (2) 1-25.

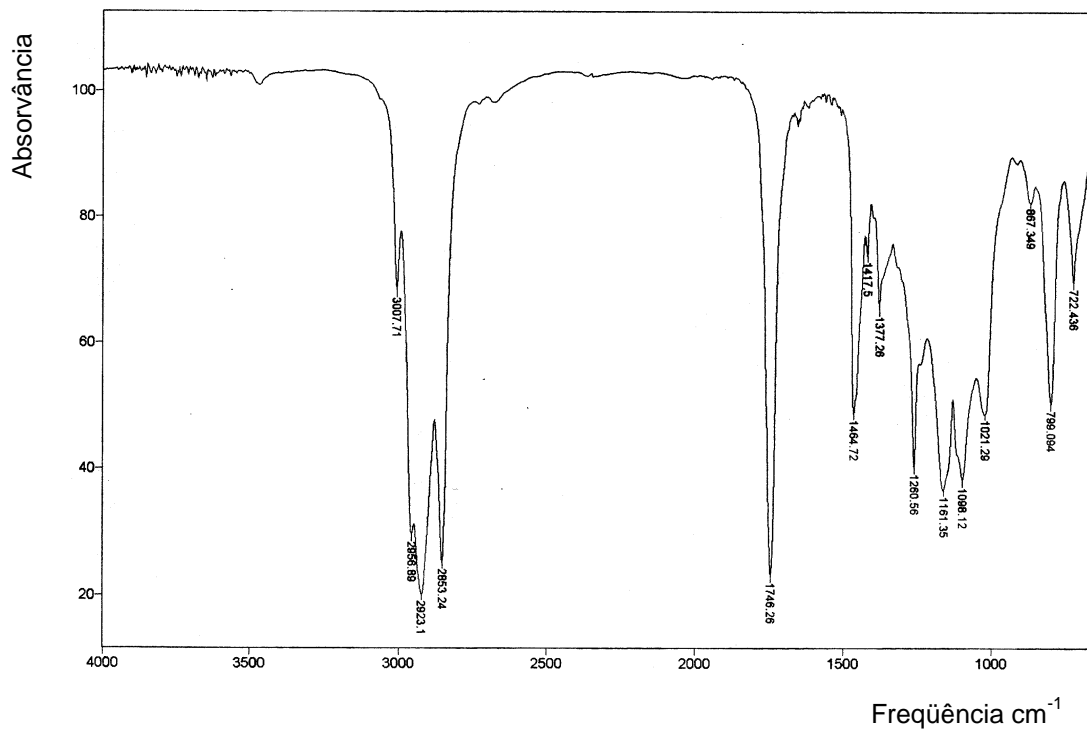


Figura 9 – Espectro no infravermelho da fração Mf3 E(3): 1-20.

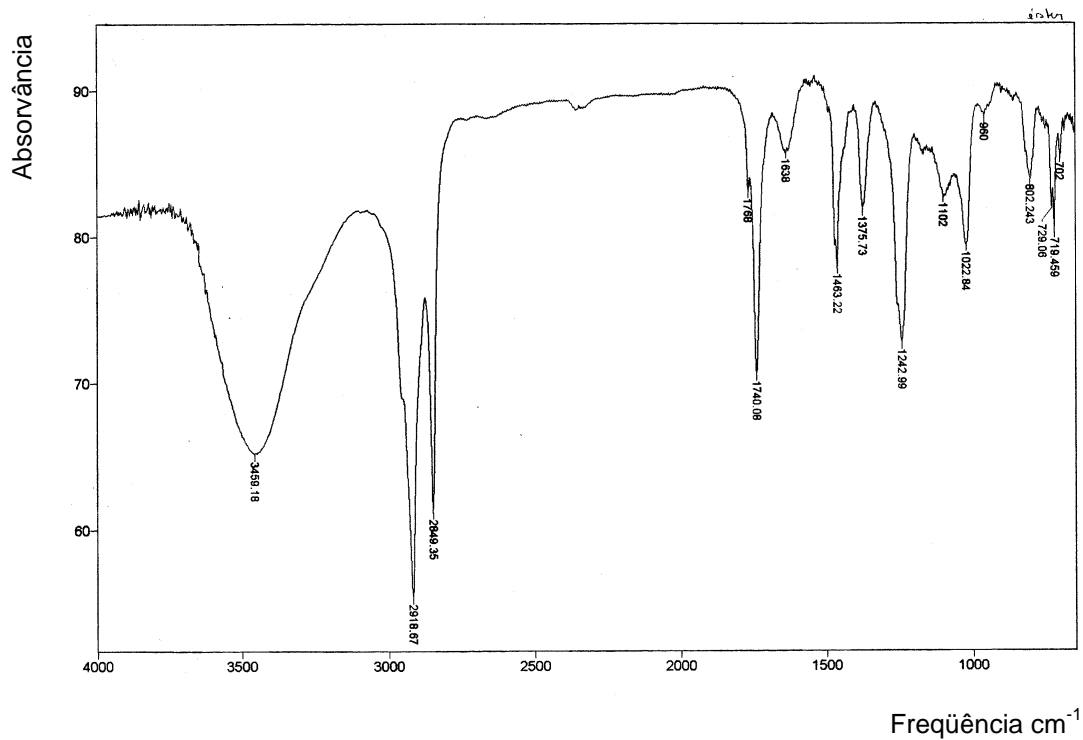
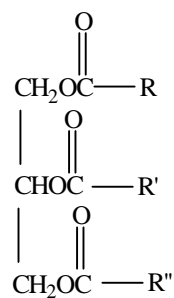
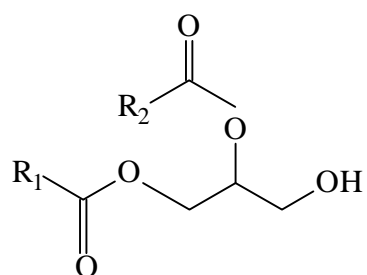


Figura 10 – Espectro no infravermelho da fração Mf1 E(1): 28-57.



Triacilglicerol

Figura 11 – Estrutura de um triacilglicerídeo (Solomons, 1994).



Diacilglicerol

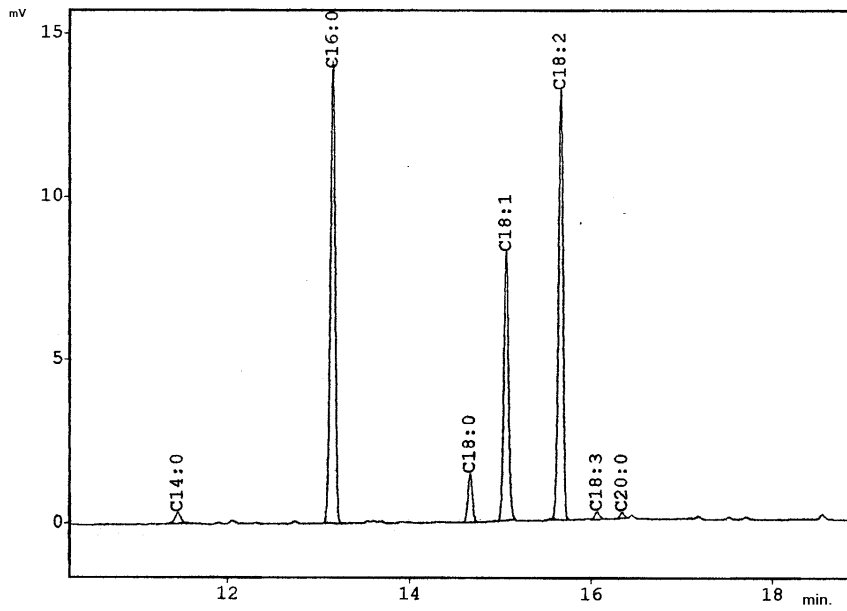
Figura 12 – Estrutura de um diacilglicerídeo (Kang, J. H., 2003).

De acordo com essas análises do espectro no infravermelho, resolveu-se fazer a transesterificação dos constituintes dessas frações acima mencionadas, utilizando MeONa/MeOH. Após reação de transesterificação, estes constituintes foram identificados por cromatografia em fase gasosa, através de comparação dos tempos de retenção destes ésteres metílicos com padrões. Os padrões utilizados estão apresentados no Quadro 4.

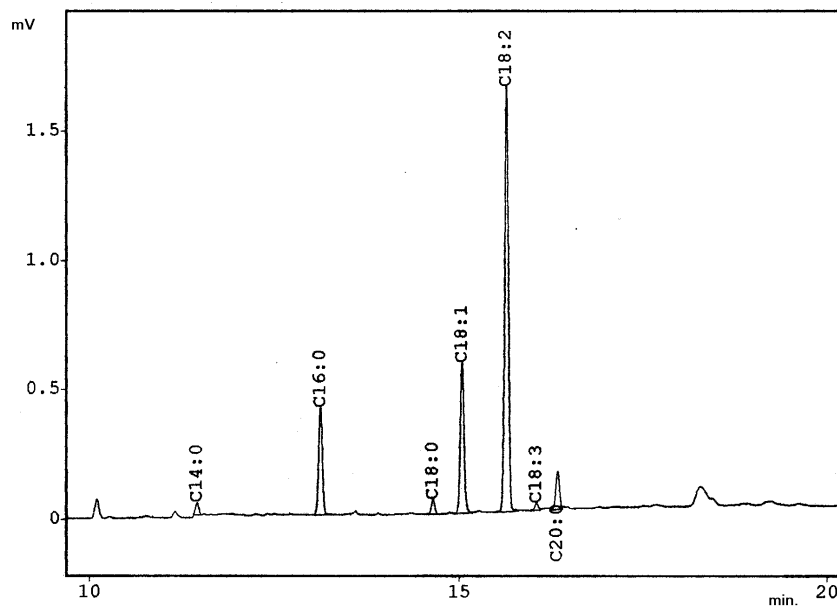
Quadro 4 – Tempos de retenção dos padrões de ésteres metílicos e dos constituintes das amostras Mf1 E (1) (1-27)), Mf1 E (1) (28-57), Mf2 E (2) (1-25) e Mf3 E (3) (1-20).

PADRÕES	Tempo de retenção (MIN.)				
	(% área)				
N ^o DE C:INSATURAÇÕES	PADRÕES	MF1 E (1) 1-27	MF1 E (1) 28-57	MF2 E (2) 1-25	MF3 E (3) 1-20
C14:0	11,474	11,451 (1,23%)	11,471 (9,48%)	11,449 (1,50%)	11,485 (5,81%)
C16:0	13,155	13,151 (38,14%)	13,156 (34,13%)	13,115 (14,20%)	13,216 (31,87%)
C18:0	14,700	14,663 (3,70%)	14,681 (16,52%)	14,642 (1,88%)	14,747 (12,17%)
C18:1	15,099	15,060 (21,92%)	15,070 (20,22%)	15,035 (20,35%)	15,136 (29,67%)
C18:2	15,680	15,660 (33,87%)	15,659 (10,58%)	15,637 (55,97%)	15,710 (18,54%)
C18:3	16,106	16,062 (0,67%)	16,073 (2,20%)	16,042 (0,96%)	16,104 (1,20%)
C20:0	16,370	16,338 (0,44%)	16,347 (6,84%)	16,330 (5,11%)	16,368 (0,70%)

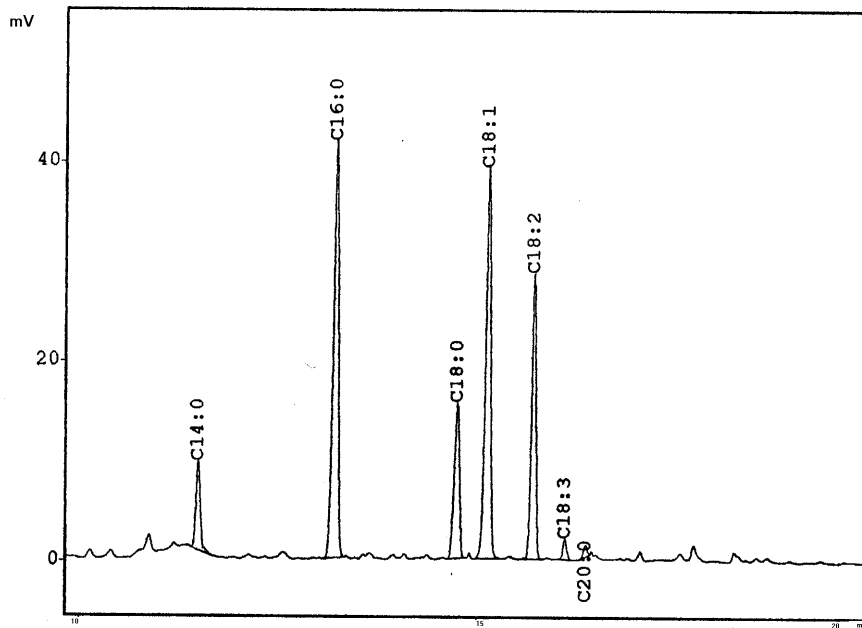
Pelos cromatogramas obtidos (Figura 13) e dos tempos de retenção dos padrões (Quadro 4), identificou-se nas frações Mf1 E(1): 1-27, Mf1 E(1): 28-57, Mf2 E(2): 1-25 e na Mf3 E(3): 1-20 uma mistura de sete ésteres metílicos de ácidos graxos: miristato (C14:0), palmitato (C16:0), estearato (C18:0), oleato (C18:1), linoleato (C18:2), linolenato (C18:3) e icosanoato (C20:0). As porcentagens relativas de cada um destes ésteres foram calculadas em relação à área do pico (Quadro 4).



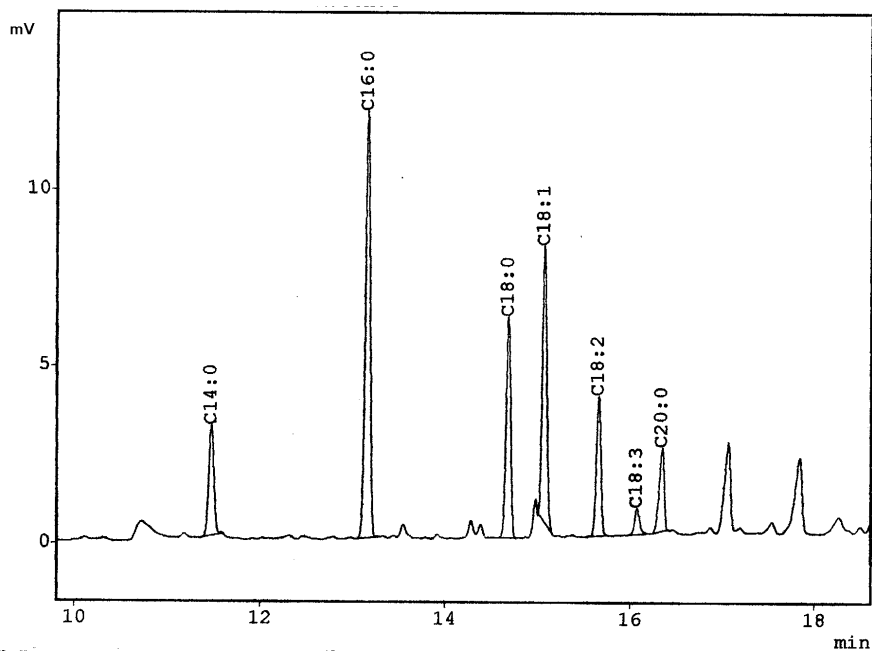
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 13 – Cromatogramas dos ésteres metílicos das frações Mf1 E(1): 1-27 (A), Mf1 E(1): 28-37 (B), Mf2 E(2): 1-25 (C) e Mf3 E(3): 1-20 (D).

3.5.2. Mistura de ácidos graxos

As frações Mf1 E(1): 38-77 (Figura 14), Mf2 E(2): 26-90 (Figura 15) e Mf3 E(3): 21-55 (Figura 16) apresentaram espectros no infravermelho característico de ácido graxos, com uma banda de absorção entre 3.600 e 2.500 cm^{-1} (ν O-H) e absorções em 2.953, 2.918 e 2.849 (ν C-H), 1.710 (ν C=O), 1.463 (δ_s C-H) e 720 cm^{-1} [δ_s (CH₂)_n; n>4].

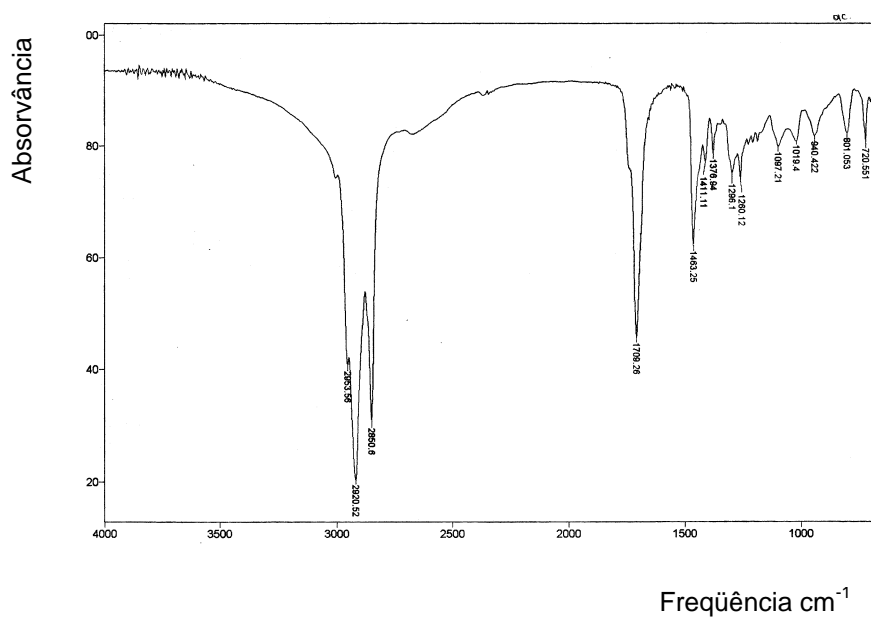


Figura 14 – Espectro no infravermelho da fração Mf1 E(1): 38-77.

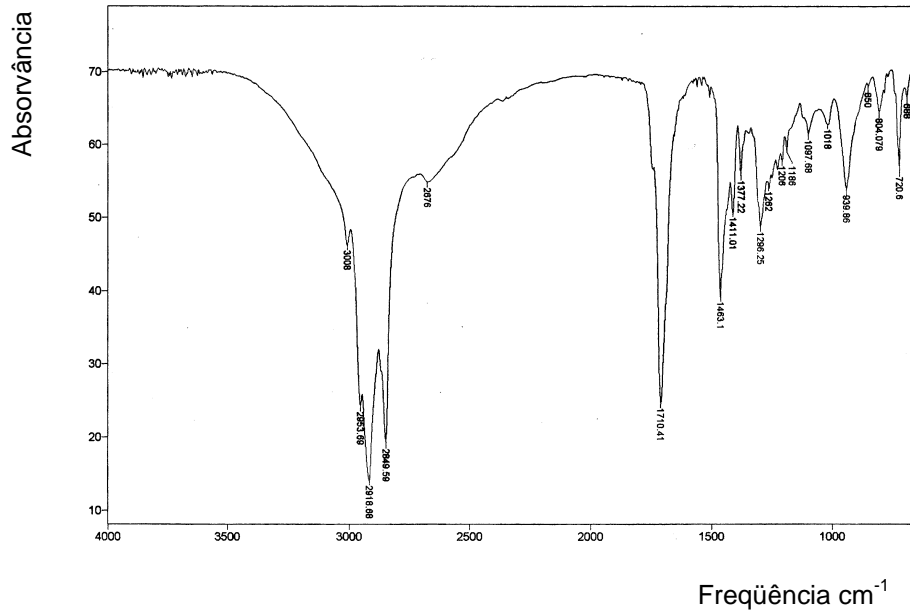


Figura 15 – Espectro no infravermelho da fração Mf1 E(1): 26-90.

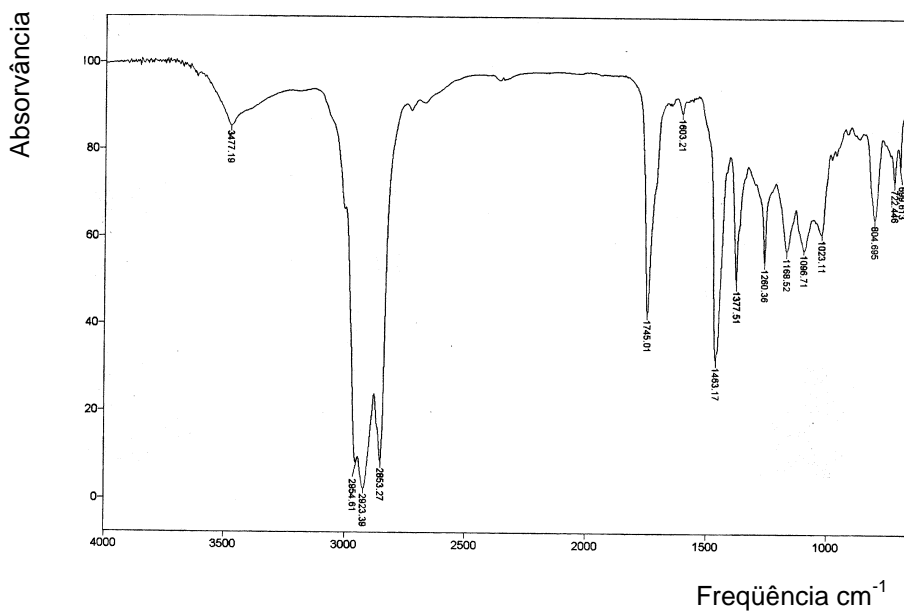
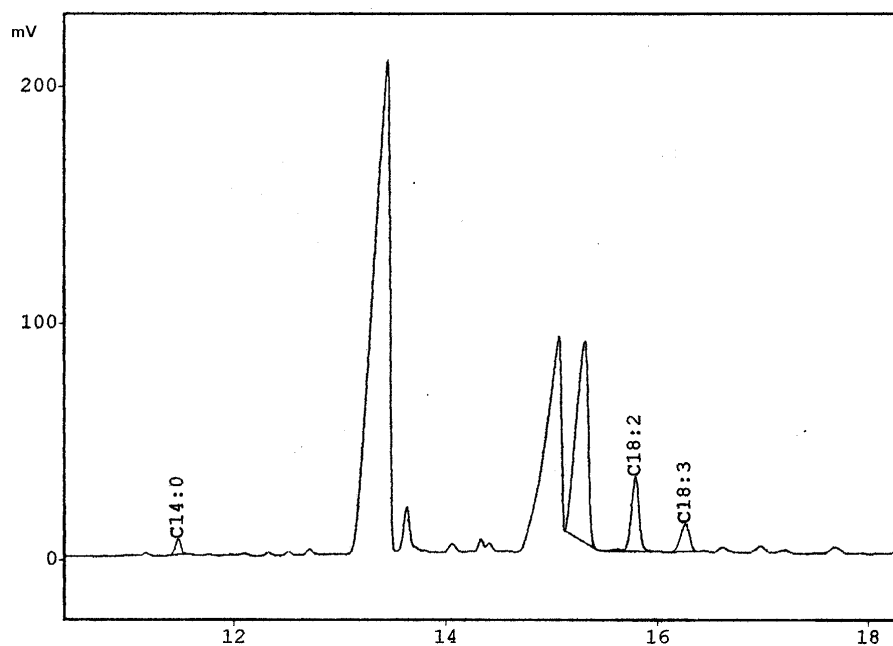
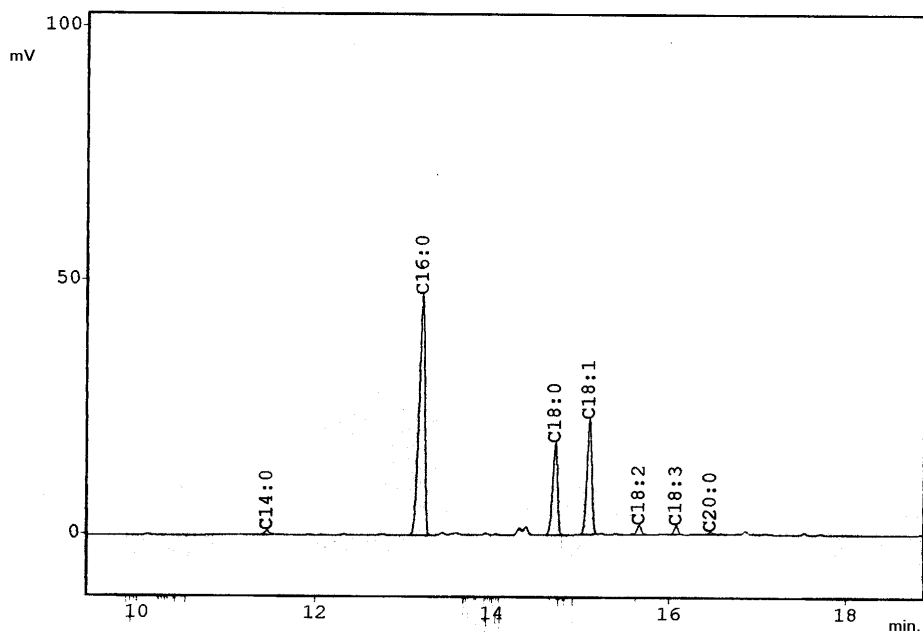


Figura 16 – Espectro no infravermelho da fração Mf1 E(1): 21-55.

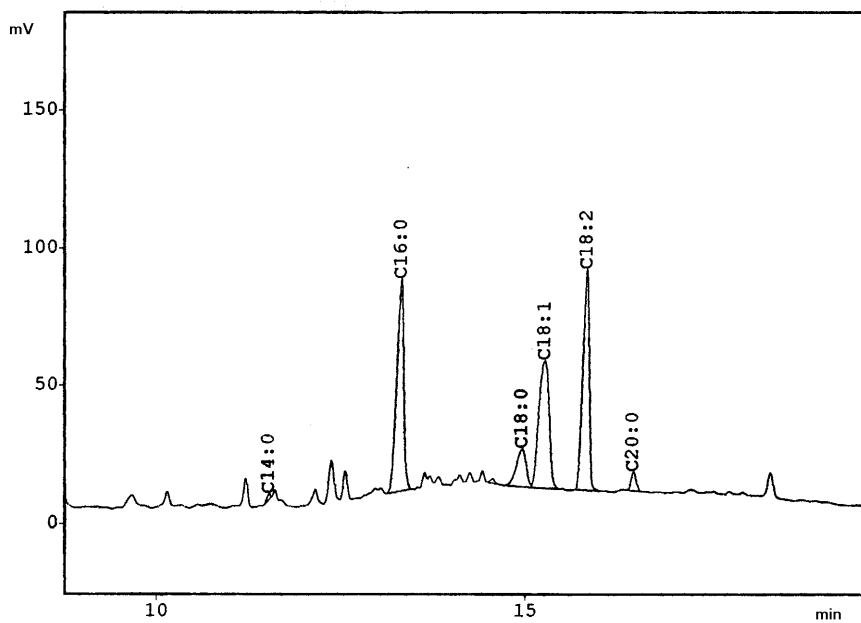
Com esses resultados, procedeu-se à esterificação dessas frações, utilizando BF₃/MeOH, para a posterior análise por cromatografia em fase gasosa. Pelos cromatogramas obtidos (Figura 17) e de posse dos tempos de retenção dos padrões (Quadro 5), verificou-se a presença dos ácidos mirístico (C14:0), linoleico (C18:2), icosanóico (C20:0) na fração Mf1 E(1): 38-77; ácidos mirístico (C14:0), palmitico (C16:0), estearico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2), linolenico (C18:3) icosanóico (C20:0) na fração Mf2 E(2): 26-90 e ácidos mirístico (C14:0), palmitico (C16:0), estearico (C18:0) oleico (C18:1), linoleico (C18:2) icosanóico (C20:0) na fração Mf3 E(3): 21-55.



(A)



(B)



(C)

Figura 17 – Cromatogramas dos ésteres metílicos das frações Mf1 E(1): 38-77 (A), Mf2 E(2): 26-90 (B) e Mf3 E(3): 21-55 (C).

Quadro 5 – Tempos de retenção dos padrões de ésteres metílicos e dos constituintes das amostras Mf1 E(1): 38-77, Mf2 E(2): 26-90 e Mf3 E(3): 21-55

PADRÕES		TEMPO DE RETENÇÃO (min.)		
		% ÁREA		
N ^o DE C:INSATURAÇÕES	PADRÕES	MF1 E(1): 38-77	MF2 E(2): 26-90	MF3 E(3): 21-55
C14:0	11,474	11,468 (2,59%)	11,457 (0,87%)	11,522 (0,41%)
C16:0	13,155	-	13,206 (55,74%)	13,321 (31,34%)
C18:0	14,700	-	14,711 (17,83%)	14,962 (7,97%)
C18:1	15,099	-	15,095 (22,03%)	15,269 (27,80%)
C18:2	15,680	15,786 (17,20%)	15,658 (1,65%)	15,843 (29,95%)
C18:3	16,106	-	16,076 (1,38%)	-
C20:0	16,370	16,259 (7,55%)	16,464 (0,47%)	16,469 (2,07%)

A composição dos ácidos graxos do elaiosoma de *M. fistulifera* está representada no Quadro 6. O ácido palmítico (C16:0) foi o mais abundante em todas as frações, exceto na Mf2 E(2): 1-25. Os ácidos linolênico (C18:3) e icosanóico (C20:0) em todas as frações foram os que se apresentaram em menores quantidades. Triacilglicerídeo foi o componente majoritário no elaiosoma de *M. fistulifera*, já o diacilglicerídeo apenas foi encontrado na fração Mf1 E(1): 28-37.

Quadro 6 – Composição dos ácidos graxos (%) de di e triacilglicerídeo das frações isoladas do elaiosoma de *Mabea fistulifera*.

Ácidos graxos	Diacilglicerídeo		Triacilglicerídeo	
	MF1 E(1): 28-37	MF1 E(1): 1-27	MF2 E(2): 1-25	MF3 E(3): 1-20
C14:0	9,48	1,23	1,50	5,81
C16:0	34,13	38,14	14,20	31,87
C18:0	16,52	3,70	1,88	12,17
C18:1	20,22	21,92	20,35	29,67
C18:2	10,58	33,87	55,97	18,54
C18:3	2,20	0,67	0,96	1,20
C20:0	6,84	0,44	5,11	0,70

A condição de ampla extensão dos padrões de ácidos graxos encontrados na análise do elaiosoma de *M. fistulifera* foi semelhante aos resultados encontrados por Soukup & Holman (1987) quando analisaram os ácidos graxos do elaiosoma de *Pedicillate trillium* (Trilliaceae). Esses autores acreditam que o elaiosoma tem a função de fornecer à formiga uma “isca” energética alimentar de fácil acesso e não a função de atratividade. Eles sugerem que a atração das formigas pelas sementes se dê via mecanismo olfativo envolvendo alguns compostos voláteis secretados por tecido da semente ou mesmo do próprio elaiosoma.

Ao contrário dessa sugestão, Marshall et al. (1979) e Kusmenoglu et al. (1989) acreditam e afirmam que os ácidos graxos componentes de lipídeos sejam responsáveis pela atração para as formigas e sugerem o 1,2 dioelina

como sendo o componente atrativo. Os resultados de Sheridan et al. (1996) também indicam que as formigas não percebem as sementes, que têm elaiosoma, por mecanismo olfativo, mas apenas depois de antená-las.

Os resultados encontrados nessa análise química do elaiosoma de *M. fistulifera* mostraram que além de lipídeos também existem outros compostos, que podem, posteriormente, ser investigados. Estes resultados foram pioneiros na investigação da mirmecocoria em região Neotropical. Pouco se sabe sobre as evidências dos compostos químicos dos elaiomas de plantas mirmecocóricas em tais regiões, como atrativos na interação formiga-semente.

Resultados semelhantes aos deste trabalho já foram encontrados, mas em regiões diferentes, como por exemplo, os de Kusmenoglu et al (1989) quando isolaram lipídeos do elaiosoma de quatro espécies de plantas mirmecocóricas em Florestas Decíduas dos EUA, *Jeffersonia diphylla*, *Sanguinaria canadensis*, *Trillium sessile* e *Dicentra cucullaria*. Já Marshall et al (1979), investigaram as bases químicas da dispersão de sementes de *Viola odorata* pelas formigas *Aphaenogaster rudis*, também nos EUA e obtiveram evidências de que o diacilglicerídeo seja um componente atrativo na interação formiga-semente. Resultados semelhantes foram encontrados por Soukup and Holman (1987) quando obtiveram ácidos graxos do elaiosoma de sementes de *Pedicellate trillium* uma espécie também norte americana. Trabalhos posteriores, que utilizem análises de frações e subfrações de amostras permitirão um avanço maior no entendimento do papel real desses compostos na interação formiga-semente.

4. CONCLUSÃO

O elaiosoma da semente de *M. fistulifera* apresenta um amplo alcance de padrões de ácidos graxos, sendo o triacilglicerídeo o mais abundante e o diacilglicerídeo o menos abundante.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beattie, A. J. & D. C. Culver, 1981. The guild of myrmecochores in the herbaceous flora of West Virginia forests. *Ecology* 62(1): 107-115.
- Davidson, D. W. & S. R. Morton 1981. Myrmecochory in some plants (F. chenopodiaceae) of the Australian arid zone. *Oecologia*, 50: 357-366.
- Hanzawa, F. M.; A. J. Beattie & D. C. Culver 1988. Directed dispersal: demographic analysis of an ant-seed mutualism. *The American Naturalist*, 131 (1): 1-11.
- Handel, S. N. & A. J. Beattie 1990. Seed dispersal by ants. *Scientific American*, 263 (2): 76-83.
- Kaspari, M. 1996. Worker size and seed size selection by harvester ants in a Neotropical forest. *Oecologia*, 105: 397-404.
- Kusmenoglu, S.; L. L. Rockwood & M. R. Gretz 1989. Fatty acids and diacylglycerols from elaiosome of some ant-dispersed seeds. *Phytochemistry*, 28 (10): 2601-2602.
- Mark, S. & J. M. Olesen 1996. Importance of elaiosome size to removal of ant-dispersed seeds. *Oecologia*. 107: 95-101.
- Marshall, D. L.; A. J. Beattie & W. E. Bollenbacher 1979. Evidence for diglycerides as attractants in an ant-seed interaction. *Journal of Chemical Ecology*, 5 (3): 335-343.
- Paula, V. F. 1995. Estudo químico e da interação inseto-planta em *Ochroma lagopus* Swartz. Viçosa, MG: UFV, 1995. 134p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa.
- Peternelli, E. O.; T. M. C. Della Lucia; L. A. Peternelli; S. V. Martins & E. E. L. Borges 2003. The interaction between workers of the genera *Atta* and *Acromyrmex* and seeds of *Mabea fistulifera* (Euphorbiaceae), a pioneer tree species in Brazil. *Sociobiology*, 42(2).

- Sheridan, S. L.; K. A. Iversen & H. Itagaki 1996. The role of chemical senses in seed-carrying behavior by ants: A behavioral, physiological, and morphological study. *J. Insect Physiol.*, 42(2), 149-159.
- Soukup, V. G. & R. T. Holman 1987. Fatty acids of seeds of north american Pedicellate trillium species. *Phytochemistry*, 26(4): 1015-1018.
- Vieira, M. F. 1991. Ecologia da polinização de *Mabea fistulifera* (Euphorbiaceae) na região de Viçosa – MG. Campinas, SP: UNICAMP, 1991. 85p. Tese (Mestrado em Biologia). Universidade Estadual de Campinas.

3. CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho, concluiu-se que tanto *Atta sexdens rubropilosa* como *Acromyrmex subterraneus subterraneus* transportaram as sementes de *Mabea fistulifera* para seus ninhos, onde seus elaiosomas foram removidos, mas operárias de *Atta* foram significativamente mais eficientes na remoção das sementes comparadas com as operárias de *Acromyrmex*. As sementes manipuladas pelas operárias de *Atta* tiveram sua taxa de germinação aumentada.

Um total de 16 espécies de formigas interagiram com as sementes de *M. fistulifera*. Destas, *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, *Atta sexdens rubropilosa*, *Ectatomma edentatum*, *Pachycondyla* sp.1, e *Pheidole* sp.2 foram consideradas mirmecocóricas e 9 espécies foram, pela primeira vez, relatadas interagindo com sementes. As formigas apresentaram diferentes estratégias de comportamento ao interagirem com as sementes, favorecendo assim o sucesso desse mutualismo.

No elaiosoma das sementes, encontrou-se um amplo espectro de padrões de ácidos graxos, sendo o triacilglicerídeo o mais abundante e o diacilglicerídeo o menos abundante.