

Caio Guilherme Pereira

“Carnivoria e suas consequências ecológicas em *Philcoxia minensis*

V. C. Souza & Giulletti (Plantaginaceae)”

Campinas

2013



Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Biologia

Caio Guilherme Pereira

“Carnivoria e suas consequências ecológicas em *Philcoxia minensis*

V. C. Souza & Giuliatti (Plantaginaceae)”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Caio G. Pereira
e aprovada pela Comissão Julgadora.


Orientador: Prof. Dr. Rafael Silva Oliveira

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP para obtenção do
Título de Mestre em Ecologia.

Campinas

2013

iii

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

G945c Guilherme Pereira, Caio, 1988-
"Carnivoria e suas consequências ecológicas em *Philcoxia minensis* V. C. Souza & Giuliatti (Plantaginaceae)" / Caio Guilherme Pereira. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Rafael Silva Oliveira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Campos rupestres. 2. Isótopos estáveis. 3. Nutrientes. 4. Análise foliar. 5. Fotossíntese. I. Oliveira, Rafael Silva, 1974-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Carnivory and its ecological consequences in *Philcoxia minensis* V. C. Souza & Giuliatti (Plantaginaceae)

Palavras-chave em inglês:

Rupestrian fields

Stable isotopes

Nutrients

Foliar diagnosis

Photosynthesis

Área de concentração: Ecologia

Titulação: Mestre em Ecologia

Banca examinadora:

Rafael Silva Oliveira [Orientador]

André Victor Lucci Freitas

Bruno Henrique Pimentel Rosado

Data de defesa: 16-05-2013

Programa de Pós-Graduação: Ecologia

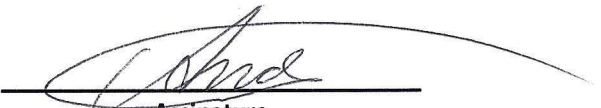
Campinas, 16 de Maio de 2013

Banca Examinadora

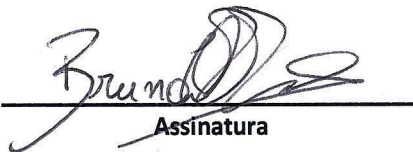
Prof. Dr. Rafael Silva Oliveira (orientador)


Assinatura

Prof. Dr. André Victor Lucci Freitas


Assinatura

Prof. Dr. Bruno Henrique Pimentel Rosado


Assinatura

Prof. Dr. Gustavo Quevedo Romero

Assinatura

Prof. Dr. Ricardo Augusto Gorni Viani

Assinatura

**Para meus pais, Eliane e Edson,
e para meu amor, Paulinha.**

“There are people. There are stories. The people think they shape the stories, but the reverse is often closer to the truth. Stories shape the world. They exist independently of people, and in places quite devoid of man, there may yet be mythologies.”

Alan Moore

Swamp Thing Vol. 2: Love and Death

“The page is long, blank, and full of truth. When I am through with it, it shall probably be long, full, and empty with words.”

Jack Kerouac

Atop an Underwood: Early Stories and Other Writings

Agradecimentos

Não posso dizer que escrever essa página, particularmente, foi mais fácil do que escrever as demais que compõem essa dissertação. Pelo contrário. Nessa eu tive que ser especialmente cuidadoso, afinal essa página é minha, minha e das pessoas a quem eu devo não só esse trabalho. Não haverá arguição sobre o que vai ser escrito nessas linhas e qualquer erro, esquecimento ou injustiça, da mesma forma, será exclusivamente meu. Por isso, e por que eu me conheço, eu gostaria de pedir desculpas, e para esses a quem a minha memória me traiu, obrigado.

Ao meu orientador, Dr. Rafael Silva Oliveira, por ter aceitado me orientar em um momento em que questionamentos profissionais quase me levaram a desistir do curso de biologia, pelos ensinamentos, pelos conselhos e pelas dicas ao longo desses últimos quatros anos, por sempre ter acreditado em mim e em meu trabalho, pelo interesse verdadeiro que sempre demonstrou na minha formação, tanto profissional quanto como ser humano e, principalmente, pela amizade, muito obrigado.

Aos membros da pré-banca, Dr. Bruno H. P. Rosado e Dr. Ricardo A. G. Viani, pela extrema eficiência, por terem sido inacreditavelmente solícitos em me auxiliar a acelerar o processo de defesa e pelos comentários e sugestões sem as quais essa dissertação ficaria - com certeza - diminuída, muito obrigado. Da mesma forma, aos membros da banca de avaliação, Dr. André V. L. Freitas e Dr. Bruno H. P. Rosado, inicialmente por disporem de seu tempo para me ajudar a aprimorar meu estudo, pela forma franca e construtiva com que apontaram os pontos fracos, pela amizade e, em

especial ao Dr. André V. L. Freitas, por ter sido um dos melhores professores com quem tive o privilegio de estudar durante minha graduação.

Aos meus pais, Eliane Figueira Rodrigues e Edson dos Santos Pereira, por me darem o suporte para eu ser a pessoa que sou atualmente, por estarem sempre ao meu lado, por me ensinarem a pensar por mim mesmo, pelos ensinamentos e pelos valores, por contribuírem na formação do meu caráter, pelo amor e por tudo, muito obrigado. Não há palavras para descrever o quanto vocês são importantes para mim.

À Paulinha, pelo amor, pelo companheirismo, pelo apoio, por cada olhar e sorriso, por me dar forças para seguir em frente e por ser a pessoa mais especial que eu conheço. Obrigado pelo bem que você me faz, e por completar a minha vida.

Aos meus grandes amigos Geraldo Menezes, Jaqueline Batista, Laura Branco e Victor Gomes que, independentemente da distância, estão sempre comigo, por tudo que vocês me ensinaram, por tudo que vocês são, pelo que vocês representam, pelo apoio, pelo carinho e pela amizade incondicional, muito obrigado.

Aos meus amigos do 07D, em especial André Moreno, Beatriz Carniel, Diego Moraes, Fernando Suzuki, Geraldo Menezes, Guilherme Alleoni, Guilherme Barbosa, Hélio Pereira, Laura Branco, Marcelo Bassalo, Mariana Nassu, Mateus Milani, Mayra Vidal, Nádía Sampaio e Victor Negri, por terem sido minha família durante os anos de graduação e pelo companheirismo, muito obrigado.

Aos amigos com quem tive o privilegio de morar ao longo dos últimos seis anos, Artur Madeira, Felipe Marco, Fernanda Piccolo, Geraldo Menezes, Guilherme Alleoni,

Guilherme Barbosa, Mario Barsottini, Mateus Milani e Thiago Costa, por me ensinarem a viver em comunidade, me fazendo ser uma pessoa melhor, obrigado.

Aos meus colegas de laboratório e pesquisa, em especial Ana Muller, André Scatigna, Anna Abrahão, Caio de Migueli, Cleiton Eller, Daniela Almenara, Gabriel Saenz, Grazielle Teodoro, Gustavo Shimizu, Hugo Cândido, Marcos Scaranello, Mario Marques, Mauro Junior, Patrícia Costa, Paulo Bittencourt e Thaís Postali, por terem me ensinado tanto, pela paciência, pela companhia e pela amizade, obrigado.

Aos meus amigos e colegas cujos nomes ainda não apareceram nas páginas dessa dissertação, mas que sabem o quanto são especiais para mim, muito obrigado. Gostaria de poder demonstrar melhor o quanto cada um de vocês é essencial em minha vida, e o quanto eu sou grato por cada momento que passo ao lado de vocês.

Ao Interbio que, por incrível que pareça, me ensinou lições importantes e me fez uma pessoa melhor, por me proporcionar momentos de incomparável felicidade.

Ao Programa de Pós Graduação em Ecologia, ao Programa de Graduação em Ciências Biológicas, ao Instituto de Biologia e à Universidade Estadual de Campinas, pela educação que me foi dada, por todas as oportunidades e pela infraestrutura, muito obrigado. Obrigado também à todos os professores e aos funcionários que, de alguma forma, participaram da minha vida universitária.

Ao CNPq, à CAPES e à FAPESP, pelo financiamento desse e de outros estudos.

Sumário

1. Resumo	12
2. Abstract	14
3. Introdução	16
4. Objetivos	25
5. Referências	26

Capítulo 01. Underground leaves of *Philcoxia* trap and digest nematodes

29

6.1. Resumo	30
6.2. Abstract	31
6.3. Introdução	32
6.4. Material e Métodos	34
6.5. Resultados	39
6.6. Discussão	49
6.7. Conclusão	51

Capítulo 02. *Philcoxia minensis* and the worldwide leaf economics spectrum

55

7.1. Resumo	56
7.2. Abstract	57
7.3. Introdução	58
7.4. Material e Métodos	61
7.5. Resultados	64
7.6. Discussão	72
7.7. Conclusão	77

1. Resumo

Plantas carnívoras são aquelas que apresentam a capacidade de capturar e digerir pequenos animais, geralmente invertebrados. Os estudos com essas plantas começaram há mais de um século e, ainda hoje, não são conhecidos os mecanismos que determinaram a evolução e a distribuição geográfica dessas singularidades vegetais. Os modelos de custos-benefícios vêm, nesse sentido, atuando como guias para diversos estudos nas últimas décadas e parecem esclarecer diversos pontos obscuros quanto à ecologia e evolução dessas plantas. O gênero *Philcoxia* (Plantaginaceae), endêmico de campos rupestres - ambientes associados a afloramentos rochosos e a formações de areia branca, propensos a eventuais queimadas e pobres em nutrientes -, apresenta características que acabaram por levar a questionamentos quanto à sua fisiologia. Com o acúmulo crescente de evidências, estudiosos começaram a sugerir que tais espécies pudessem apresentar mecanismos ativos de captura e digestão de presas. O estudo em questão teve como objetivo determinar se *Philcoxia minensis* exibe a síndrome da carnivoría e analisar os custos e benefícios desse hábito no contexto teórico sugerido por Thomas J. Givnish para a evolução da carnivoría. Para isso, fizemos uma detalhada descrição anatômica das folhas de *P. minensis*, na qual pudemos observar padrões evidentes de produção enzimática associada à digestão de invertebrados, em especial de fosfatases. Caracterizamos as estruturas glandulares responsáveis pela produção dessas enzimas, assim como os nematódeos que são considerados, até o momento, as únicas presas de *P. minensis*. Por fim, quanto à absorção de nutrientes derivados dos nematódeos, pudemos observar uma incorporação de 5% do nitrogênio das presas

(*Caenorhabditis elegans*) em apenas 24h, e 15% em 48h em um experimento com isótopos estáveis. Para avaliar o balanço energético dessa espécie, analisamos de que forma características foliares associadas aos processos de fotossíntese e respiração se correlacionam. De maneira geral, encontramos forte correlação entre as capacidades fotossintéticas (A_{area} e A_{mass}) e os valores de LMA (quantidade de massa seca por unidade de área foliar) para as espécies não carnívoras, com um claro distanciamento dos indivíduos de *P. minensis*, que apresentaram taxas fotossintéticas extremamente baixas. Quanto às correlações entre os conteúdos de nitrogênio e de fósforo com as capacidades fotossintéticas, vimos que os indivíduos de *P. minensis* apresentaram taxas fotossintéticas extremamente baixas para os valores desses dois nutrientes e, embora uma tendência possa ser observada, não observamos correlações entre capacidades fotossintéticas e os conteúdos foliares de nitrogênio e fósforo. Por fim, conseguimos determinar conclusivamente a natureza carnívora de *P. minensis*, assim como pudemos posicionar essa espécie ao longo do espectro de economia foliar, tanto de forma local quanto em uma escala global. Nossos resultados ilustram o quanto ainda há para ser descoberto quanto à origem, à distribuição e à frequência da síndrome da carnivoría.

2. Abstract

Carnivorous plants are plants that have the ability to capture and digest small animals, usually insects and other invertebrates. The studies with these plants began in the nineteenth century and until today it is unknown the underlying mechanisms that determine the evolution and the geographical distribution of these singularities. The cost-benefit models are, accordingly, acting as guidelines to various studies in recent decades and seem to be able to clarify many obscure points concerning the ecology and the evolution of these plants. The three species of the genus *Philcoxia*, endemic to *campos rupestres* - fire prone and nutrient-poor environments usually associated with rocky outcrops and white sand formations - have unique characteristics and adaptations that eventually led to several questions regarding the physiology of these plants. With growing accumulation of evidence, scholars started to consider the possibility that such plants could present active mechanisms for capturing and digesting prey. The present study aimed to determine if *Philcoxia minensis* exhibits the syndrome of carnivory and to analyze the costs and benefits of this habit in the theoretical context suggested by Thomas J. Givnish for the evolution of carnivory. In order to do so, we have made a detailed anatomical description of the leaves of *P. minensis*, in which we observed a clear pattern of enzyme production possibly associated with prey digestion, including phosphatases. We also characterized the glandular structures that are responsible for the production of the enzymes as well as the nematodes that are considered, until now, the only prey of *P. minensis*. Concerning the absorption of nutrients derived from prey, we observed an incorporation of 5% of the nitrogen of the nematodes (*Caenorhabditis*

elegans) in 24h, and 15% in 48h in an experiment with stable isotopes. To evaluate the energy balance of this species, we analyzed correlations between leaf traits associated with the processes of photosynthesis and respiration. Generally speaking, we found a strong correlation between the photosynthetic capacity (A_{mass} and A_{area}) and the LMA (leaf mass per area) values for neighboring non-carnivorous plants, with a distancing of *P. minensis* individuals, which showed very low photosynthetic rates. Regarding the correlations between the contents of nitrogen and phosphorus with photosynthetic capacities, we observed that the individuals of *P. minensis* showed extremely low photosynthetic rates for their nutrient concentrations and, although a tendency could be observed, there is no correlation between photosynthetic capacity and the foliar contents of nitrogen and phosphorus. Finally, we have conclusively determined the carnivorous nature of *P. minensis* and we placed this species along the leaf economics spectrum, both in local and global scale. Our results illustrate how much there is still to be discovered about the origin, distribution and frequency of the carnivorous syndrome.

3. Introdução

3.1. Carnivoría em Plantas

As plantas carnívoras têm fascinado pesquisadores evolucionistas, botânicos e ecólogos há séculos. Inicialmente, a ideia de que certas plantas pudessem consumir pequenos invertebrados não foi amplamente aceita (Juniper et al. 1989). Contudo, com a publicação dos trabalhos de Darwin (1875), nos quais foram apresentadas as primeiras evidências experimentais da síndrome da carnivoría em diversos gêneros, esse quadro mudou e, desde então, mais de 600 espécies de plantas carnívoras já foram descritas em seis subclasses distintas de angiospermas, compreendendo tanto monocotiledôneas quanto eudicotiledôneas (Albert et al. 1992).

Plantas carnívoras podem ser encontradas ao redor do mundo em pântanos, turfeiras, planícies, topos de *inselbergs*, tepuis e outras montanhas, vales e margens de rios, e em lagos e lagoas (Ellison, 2006) - ambientes geralmente caracterizados por altos índices de luminosidade e umidade e pela baixíssima disponibilidade de nutrientes no solo, em especial nitrogênio, fósforo e potássio (Givnish et al. 1984). Com efeito, por sofrerem intensa pressão evolutiva de ambientes semelhantes, convergência evolutiva torna-se constante nesse grupo de plantas (Benzing, 1987), fato que, quando associado à importância dada aos caracteres morfológicos nos estudos cladísticos, passa a ser um obstáculo para o entendimento das relações filogenéticas do grupo (Juniper et al. 1989). De fato, a dificuldade na determinação da proximidade entre essas plantas era tanta que, até o fim da década de 80, muitos pesquisadores acreditavam que todas as plantas carnívoras derivavam de um ancestral comum (Juniper et al. 1989). Entretanto, dados

moleculares e estudos filogenéticos modernos vêm cada vez mais dando suporte a ideia de uma origem polifilética para esse hábito em plantas (Ellison, 2001).

A evolução múltipla e independente da síndrome da carnivoría em diferentes grupos de plantas sugere que tal característica deva ser uma adaptação às condições desfavoráveis dos ambientes onde tais espécies ocorrem, principalmente às baixas disponibilidades de nutrientes (Adamec, 1997). Givnish propôs um modelo geral de custo-benefício para explicar a evolução da carnivoría no qual sugere que exista um *trade-off* entre o custo fotossintético associado à síntese das diversas estruturas de carnivoría (custo marginal) e o benefício fotossintético associado à aquisição adicional de nutrientes por essas estruturas (benefício marginal). Desse ponto, a carnivoría irá evoluir se os benefícios fotossintéticos excederem os custos associados (Ellison, 2006).

O modelo de Givnish, ademais, faz três previsões. A primeira é que plantas com investimentos em estruturas de carnivoría devem apresentar uma vantagem energética quando "competindo" com outras plantas, não carnívoras (Givnish et al. 1984). Em segundo lugar, o benefício energético primário da carnivoría será ou um aumento na taxa fotossintética por unidade de massa foliar, ou um aumento na quantidade de massa foliar total suportada pela planta (Givnish et al. 1984). Por fim, o modelo prevê que, com o aumento do investimento em estruturas de carnivoría, o benefício marginal da carnivoría deverá decrescer e o benefício absoluto deverá atingir um platô conforme outros fatores, não associados à disponibilidade de nutrientes, passem a limitar as taxas fotossintéticas (Givnish et al. 1984). O primeiro e o terceiro aspecto são especialmente interessantes, pois é a partir deles que nós chegamos à generalização do modelo de

Givnish, que postula que, em ambientes pobres em nutrientes, mas nos quais nem a luminosidade nem a disponibilidade de água sejam limitantes, as espécies carnívoras devam apresentar certa vantagem energética quando "competindo" com plantas não carnívoras (Ellison, 2006).

O modelo proposto por Givnish foi, algum tempo depois, ampliado por Benzing, que permitiu *trade-offs* específicos entre umidade, luminosidade e disponibilidade de nutrientes advindos de serapilheira (Benzing, 2000 apud Ellison, 2006). Dessa forma, a existência de carnivoría em diferentes regimes de luminosidade e disponibilidade de água pôde, finalmente, ser explicada, dado os possíveis *trade-offs* entre os três eixos estabelecidos pelo autor (Ellison et al. 2001; Ellison et al. 2006).

Diversos estudos se esforçaram em determinar se, de fato, o crescimento de plantas carnívoras é afetado de forma positiva pela obtenção adicional de nutrientes através das estruturas de carnivoría. Uma meta-análise desses trabalhos indicou a existência de um efeito positivo da adição de presas no crescimento dessas plantas (Ellison, 2006). No entanto, o mesmo não foi verificado para a adição de nutrientes no solo, nem para a interação entre adição de nutrientes no solo e presas (Ellison, 2006). Dessa forma, entende-se que os nutrientes adicionais - obtidos através da carnivoría - são menos valiosos quando a planta está crescendo em solos relativamente mais ricos (Aldenius et al. 1983; Karlsson, 1991). Contudo, ainda é importante ressaltar que esses estudos só apresentam evidências indiretas do modelo de custo-benefício, uma vez que Givnish (1984) expressa os benefícios da carnivoría em termos de taxas fotossintéticas, e não em termos de crescimento (Pavlovic et al. 2009).

As plantas carnívoras situam-se ao longo de um gradiente que varia de quase completa dependência até certa independência dos nutrientes obtidos diretamente por carnivoría na determinação de crescimento, ocorrência natural e propagação (Adamec, 1997). De maneira geral, a dependência de nutrientes derivados de carnivoría aumenta conforme as estruturas de captura de presas se tornam mais elaboradas (Ellison et al. 2001). No mais, existem variações significativas ao longo do ano quanto à contribuição relativa dos nutrientes derivados de presas para as plantas carnívoras (Friday, 1992).

Os processos fisiológicos e o crescimento das plantas podem ser limitados tanto pelas concentrações absolutas dos nutrientes disponíveis, quanto pelas concentrações relativas (Aerts et al. 2000). Givnish deixa claro em seus estudos que as disponibilidades de nitrogênio, de fósforo e de potássio podem afetar as taxas fotossintéticas de plantas carnívoras (Givnish et al. 1984) e, embora praticamente todos os estudos subsequentes assumam que o nitrogênio seja o principal nutriente obtido através da carnivoría, alguns estudos sugerem uma preferência pela absorção de fósforo em determinadas espécies (Wakefield et al. 2005).

Os estudos de Wakefield e colaboradores (2005), assim como outros nos quais o foco volta-se ao fósforo como principal nutriente obtido através da carnivoría (Chandler et al. 1976; Stewart et al. 1993), são particularmente interessantes, uma vez que podem ajudar a elucidar diversos pontos obscuros acerca da evolução das plantas carnívoras, principalmente ao estudarmos os padrões de distribuição dessas plantas em ambientes conhecidamente pobres quanto a esse nutriente, como os campos rupestres.

3.2. Campos Rupestres

Campo rupestre define um tipo peculiar de vegetação associado a afloramentos rochosos e formações de areia branca que ocorre principalmente acima de 1000 metros de altitude, na porção central do Brasil (Alves et al. 2007). Compreende, de uma forma geral, complexos de vegetação extrazonais vinculados a afloramentos pré-cambrianos de quartzito que emergem como mosaicos circundados, principalmente, por cerrado e caatinga (Alves et al. 2007).

Os campos rupestres exibem condições ambientais extremamente limitantes ao estabelecimento de espécies vegetais, como grandes oscilações de temperatura, altas taxas de radiação e baixas disponibilidades de nutrientes (Shure, 1977; Ware, 1990). Contudo, ainda assim, mais de 4000 espécies de plantas vasculares já foram descritas para esses ambientes (Giulietti, 1997). O mais interessante é que grande parte dessas espécies apresenta distribuição limitada e muitas, ainda, são microendêmicas, de modo que algumas localidades ao longo da Cadeia do Espinhaço podem apresentar cerca de 30% de suas composições florísticas completamente baseadas em espécies endêmicas (Burman, 1991). Apesar dessa incrível riqueza de espécies, no entanto, pouco se sabe sobre a diversidade de mecanismos de aquisição de nutrientes das plantas que ocorrem nesses ambientes.

3.3. Gênero *Philcoxia*

O gênero *Philcoxia* P. Taylor & V. C. Souza (fig. 01) é composto por três espécies singulares, endêmicas do Brasil (Taylor et al. 2000). O grupo é caracterizado por caules

subterrâneos, folhas orbiculares usualmente peltadas e situadas na superfície do solo ou imediatamente abaixo desse. Quanto às flores, elas se localizam em pedúnculos que, por sua vez, não apresentam folhas; o cálice é relativamente profundo e composto por cinco lobos sub-iguais e os estames são inclusos no tubo da corola (Fritsch et al. 2007).



Fig. 01. *Philcoxia minensis* em seu hábitat natural na Serra do Cabral, Joaquim Felício, MG, Brasil.

A presença de folhas peltadas, característica de todas as espécies de *Philcoxia*, tornam o gênero quase único na família Plantaginaceae (Taylor et al. 2000). Embora extremamente raro, esse traço foliar já foi descrito em Apocynaceae, Asclepiadaceae, Gesneriaceae, Lentibulariaceae e Pedaliaceae. Outra característica muito interessante também foi observada em *P. goiasensis*: a venação foliar é, aparentemente, circinada, um atributo incomum em fanerógamas, embora constante em algumas famílias, como Lentibulariaceae e a pouco aparentada Droseraceae (Taylor et al. 2000). Pesquisadores notaram, ainda, a presença de numerosas glândulas na superfície superior das folhas, similares àquelas encontradas em algumas famílias de plantas carnívoras (Fritsch et al. 2007; Taylor et al. 2000).

Características como essas já seriam mais do que suficientes para elevar esse gênero ao patamar das plantas “ímpares”, daquelas que apresentam especializações altamente singulares. Contudo, com cada olhar esmiuçado que lançamos sobre essas plantas, mais peculiaridades são encontradas; a presença de vermes nematódeos na superfície das folhas de *P. minensis* (Fritsch et al. 2007) é somente mais um exemplo. Dessa maneira, era somente de se esperar que surgissem questionamentos acerca da fisiologia e da evolução dessas plantas. As primeiras ideias foram propostas no artigo original em que esse gênero é descrito (Taylor et al. 2000), no qual os autores sugerem uma similaridade geral, aparentemente convergente, entre as espécies de *Philcoxia* e alguns membros das famílias Droseraceae e Lentibulariaceae, especialmente devido às abundantes glândulas na superfície superior das folhas e à suposta venação circinada. Os ambientes onde tais plantas ocorrem, abertos, pobres em nutrientes e propensos a

eventuais queimadas, também são consistente com o hábito e a forma de diversas espécies carnívoras (Lloyd, 1942; Givnish, 1989).

Por fim, o acúmulo crescente de evidências, associado às observações cada vez mais frequentes de nematódeos sobre as folhas das espécies de *Philcoxia* (Fritsch et al. 2007) acabou levando alguns pesquisadores a conduzir um teste simples de carnivoria. Os resultados negativos encontrados para o teste de atividade de proteases proposto por Hartmeyer (1997), conforme as modificações de Meyers-Rice (1999), apontaram na direção oposta à esperada, sugerindo que *Philcoxia* não era, de fato, carnívora (Fritsch et al. 2007). Contudo, devido a várias fontes potenciais de erros, os autores deixaram claro que a possibilidade de carnivoria para esse gênero não deveria ser descartada (Fritsch et al. 2007).

3.4. Justificativa

Considerando o que foi apresentado, e atentos ao fato de que os mecanismos de obtenção de nutrientes de *Philcoxia* permanecem desconhecidos, acreditamos que um conjunto substancial de experimentos deva ser conduzido no sentido de determinar, conclusivamente, se as plantas desse gênero apresentam a síndrome da carnivoria. Nós acreditamos, ainda, que o conhecimento dos mecanismos de aquisição de nutrientes de plantas como essas - altamente adaptadas a seus ambientes e com graus singulares de especializações - pode nos ajudar a entender, de forma mais completa, os processos ecológicos e evolutivos que determinaram a distribuição das espécies vegetais. No mais, também permanecem desconhecidos os mecanismos intrínsecos que podem ter levado

a evolução dessa síndrome em *Philcoxia* - assim como em todas as plantas carnívoras. Dessa forma, e observando o fato de que praticamente não existem estudos avaliando os custos e os benefícios da carnivoría no contexto originalmente proposto por Givnish em 1984, decidimos conduzir um conjunto de experimentos para determinar quais são esses custos e benefícios - em termos de eficiência fotossintética - em *P. minensis*. De forma geral, *Philcoxia* constitui um excelente estudo de caso acerca de angiospermas que evoluíram em ambientes geologicamente antigos e pobres em nutrientes, e várias questões sobre a ecologia e a evolução dessa espécie, ainda sem respostas definitivas, serão investigadas nessa dissertação de mestrado.

4. Objetivos

O objetivo deste estudo é determinar, primeiramente, se *Philcoxia minensis* apresenta o hábito da carnivoría. Queremos, em um segundo momento, determinar quais são os custos e os benefícios da síndrome da carnivoría, no contexto teórico originalmente proposto por Givnish (1984), para *P. minensis*. Para isso, pretendemos entender de que maneira os compromissos impostos pela síndrome da carnivoría se expressam em determinadas relações alométricas quando comparadas com espécies não carnívoras da comunidade. Com isso, queremos entender de que forma o espectro de economia foliar global se expressa em uma comunidade caracterizada por intensas limitações nutricionais e, principalmente, como as plantas carnívoras se comportam ao longo desse espectro, uma vez que deveriam apresentar certo relaxamento quanto à limitação por nutrientes.

5. Referências

Adamec, L. (1997) Mineral nutrition of carnivorous plants: a review. *Botanical Review*, 63, 273-299.

Aerts, R. & Chapin, F.S. (2000) The mineral nutrition of wild plants revisited: a re-evaluation of processes and patterns. *Advances in Ecological Research* 30, 1-67.

Albert, V.A., Williams, S.E., & Chase, M.W. (1992) Carnivorous plants: phylogeny and structural evolution. *Science* 257, 1491-1495.

Aldenius, J., Carlsson, B., & Karlsson, S. (1983) Effects of insect trapping on growth and nutrient content of *Pinguicula vulgaris* L. in relation to the nutrient content of the substrate. *New Phytologist* 93, 53-59.

Alves, R.J.V., Cardin, L. & Kropf, M.S. (2007) Angiosperm disjunction - Campos rupestres - restingas: a re-evaluation. *Acta Botanica Brasilica* 21 (3), 675-685.

Barthlott, W., Porembski, S., Fischer, E. & Gemmel, B. (1998) First protozoa-trapping plant found. *Nature* 392, 447.

Benzing, D.H. (1987) The origin and rarity of botanical carnivory. *Trends in Ecology and Evolution* 2, 364-369.

Burman, A. (1991) Saving Brazil's savannas. *New Scientist* 129, 30-34.

Chandler, G.E. & Anderson, J.W. (1976) Studies on the nutrition and growth of *Drosera* species with reference to carnivorous habit. *New Phytologist* 76, 129-141.

Croizat, L. (1960) *Principia botanica*, Caracas, Venezuela: León Croizat.

Darwin, C. (1875) *Insectivorous Plants*, Appleton and Company, London.

Ellison, A.M. & Gotelli, N.J. (2001) Evolutionary ecology of carnivorous plants.

Trends in Ecology and Evolution 16, 623-629.

Ellison, A.M. (2006) Nutrient Limitation and Stoichiometry of Carnivorous Plants. *Plant Biology* 8, 740-747.

Ellison, A.M. & Gotelli, N.J. (2009) Energetics and the evolution of carnivorous plants, Darwin's most wonderful plants in the world'. *Journal of Experimental Botany* 60, 19-42.

Friday, L.E. (1992) Measuring investment in carnivory: seasonal and individual variation in trap number and biomass in *Utricularia vulgaris* L. *New Phytologist* 121, 439-445.

Fritsch P.W., Almeda F., Martins A.B., Cruz B.C. & Estes D. (2007) Rediscovery and phylogenetic placement of *Philcoxia minensis* (Plantaginaceae), with a test of carnivory. *Proceedings of the California Academy of Sciences* 58, 447-467.

Giulietti, A.M., Pirani, J.R. & Harley, R.M. (1997) Espinhaço Range Region, Eastern Brazil. Pp. 397-404. In: S. D. Davis *et al.* (eds.). *Centres of plant diversity - Guide and Strategy for Conservation*. World Wildlife Fund & World Conservation Union.

Givnish, T.J., Burkhardt, E.L., Happel, R.E., & Weintraub, J.D. (1984) Carnivory in the bromeliad *Brocchinia reducta*, with a cost/benefit model for the general restriction of carnivorous plants to sunny, moist, nutrient-poor habitats. *American Naturalist* 124, 479-497.

Givnish, T.J. (1989) Ecology and evolution of carnivorous plants. Pages 243-290 in W. G. Abrahamson, *Plant-animal interactions*. New York.

Hartmeyer, S. (1997) Carnivory of *Byblis* revisited — a simple method for enzyme

testing on carnivorous plants. *Carnivorous Plant Newsletter* 26, 39-45.

Juniper B.E., Robins R.J. & Joel D.M. (1989) *The Carnivorous Plants*. Academic Press, London.

Karlsson, P.S., Nordell, K.O., Carlsson, B.A., & Svensson, B.M. (1991) The effect of soil nutrient status on prey utilization in carnivorous plants. *Oecologia* 86, 1-7.

Lloyd, F.E. (1942) *The Carnivorous Plants*. Chronica Botanica, Massachusetts.

Shure, D.J. & Ragsdale, L. (1977) Patterns of primary succession on granite outcrop surfaces. *Ecology* 58, 993-1006.

Stewart, C.N. & Nilsen, E.T. (1993) Responses of *Drosera capensis* and *D. binata* var. *multifida* (Droseraceae) to manipulations of insect availability and soil nutrient levels. *New Zealand Journal of Botany* 31, 385-390.

Taylor P., Souza V.C., Giulietti A.M. & Harley R.M. (2000) *Philcoxia*: A new genus of Scrophulariaceae with three new species from eastern Brazil. *Kew Bulletin* 55, 155-163.

Wakefield, A.E., Gotelli, N.J., Wittman, S.E., & Ellison, A.M. (2005) The effect of prey addition on nutrient stoichiometry, nutrient limitation, and morphology of the carnivorous plant *Sarracenia purpurea* (Sarraceniaceae). *Ecology* 86, 1737-1743.

Ware, S. (1990) Adaptation to substrate-and lack of it-in rock outcrop plants: *Sedum* and *Arenaria*. *American Journal of Botany* 77, 1095-1100.

Capítulo 1

Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 109 (4), 1154-1158.

Underground leaves of *Philcoxia* trap and digest nematodes

Caio Guilherme Pereira¹, Daniela Peres Almenara², Carlos Eduardo Winter², Peter W. Fritsch³, Hans Lambers⁴ & Rafael Silva Oliveira^{1,4,A}

¹Laboratório de Ecologia Funcional de Plantas, Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 13083-862, SP, Brasil

²Laboratório de Biologia Molecular de Nematóides, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-900, SP, Brasil

³Department of Botany, California Academy of Sciences, San Francisco, CA 94118, USA

⁴School of Plant Biology, University of Western Australia, Crawley 6009, WA, Australia

^ACorresponding author: rafaelso@unicamp.br

6.1. Resumo

O gênero *Philcoxia* compreende três espécies restritas a ambientes bastante iluminados e com solos pobres em nutrientes do Cerrado Brasileiro. As similaridades morfológicas de *Philcoxia* - assim como as semelhanças de hábitat - com a de espécies carnívoras, juntamente às recentes observações de nematódeos sobre a superfície das folhas dessas plantas levou a sugestão de que o gênero poderia ser carnívoro. Nesse estudo apresentamos evidências convincentes de carnivoría em *Philcoxia* e, de forma análoga, em Plantaginaceae, uma família de plantas em que nenhum outro membro carnívoro é conhecido. Nós também documentamos uma estratégia de captura única para plantas carnívoras e o primeiro caso de uma espécie que captura e digere vermes nematódeos com folhas adesivas subterrâneas. Nossos resultados ilustram o quanto ainda há para ser descoberto quanto à origem, distribuição e frequência da síndrome da carnivoría em angiospermas e, de forma geral, sobre a diversidade de mecanismos de aquisição de nutrientes que evoluíram em plantas que ocorrem em ambientes muito limitados quanto à disponibilidade de nutrientes, como é o caso do Cerrado Brasileiro, um dos 34 *hotpots* de diversidade mundial.

Palavras-chave: carnivoría em plantas | estratégias de aquisição de nutrientes | campos rupestres | nitrogênio | isótopos estáveis

6.2. Abstract

The recently described genus *Philcoxia* comprises three species restricted to well lit and low-nutrient soils in the Brazilian Cerrado. The morphological and the habitat similarities of *Philcoxia* to those of carnivorous plants, along with recent observations of nematodes over its subterranean leaves, prompted the suggestion that the genus is carnivorous. Here we report compelling evidence of carnivory in *Philcoxia* of the Plantaginaceae, a family in which no carnivorous members are otherwise known. We also document both a unique capturing strategy for carnivorous plants and a case of a plant that traps and digests nematodes with underground adhesive leaves. Our findings illustrate how much can still be discovered about the origin, distribution, and frequency of the carnivorous syndrome in angiosperms and, more generally, about the diversity of nutrient acquisition mechanisms that have evolved in plants growing in severely nutrient-impooverished environments such as the Brazilian Cerrado, one of the world's 34 biodiversity hotspots.

Key words: plant carnivory | plant nutrient acquisition | campos rupestres | nitrogen | stable isotopes

6.3. Introdução

Carnivoria evoluiu pelo menos seis vezes nas angiospermas e, desde os trabalhos iniciais de Darwin (1875), cerca de 20 gêneros de plantas carnívoras distribuídos em dez famílias distintas e quatro linhagens foram identificados (Ellison, 2009; Krol et al. 2011). Um modelo geral de custo-benefício prediz que a carnivoria será restrita a ambientes intensamente iluminados, pobres em nutrientes e pelo menos sazonalmente úmidos (Givnish, 1984), nos quais a principal fonte de nitrogênio, fósforo, potássio e demais nutrientes será derivada de invertebrados capturados, digeridos e absorvidos (Juniper, 1989). Condições de intensa luminosidade e umidade estão incluídas no modelo porque os custos fotossintéticos da carnivoria deverão exceder os benefícios em ambientes secos e sombreados (Givnish, 1984; Ellison, 2006).

Recentemente, esse modelo foi expandido por incluir *trade-offs* específicos entre intensidade luminosa, umidade e disponibilidade de nutrientes advindos de serapilheira, o que pode explicar a ocorrência de carnivoria em uma variedade de habitats com regimes contrastantes de luz e água (Benzing, 2000; Ellison, 2001). O gênero *Philcoxia* compreende três espécies que crescem exclusivamente em campos rupestres do Bioma Cerrado no Brasil Central (Taylor, 2000; Fritsch, 2007), um mosaico de afloramentos rochosos e formações de areia branca com grande diversidade de espécies, intensas taxas luminosidade e baixa disponibilidade de nutrientes sob um regime de precipitação sazonal. De acordo com o modelo de custo-benefício, essas condições são propícias à evolução da carnivoria e, de fato, espécies do gênero *Genlisea* (Barthlott, 1998) são comuns nessas áreas. *Philcoxia* apresenta diversas características

morfologias similares às de espécies carnívoras, especialmente um sistema radicular pouco desenvolvido e sem associações micorrízicas, folhas peltadas e dobradas na nervura quando imaturas, glândulas capitadas na superfície superior das folhas e inflorescências sem folhas (Ellison, 2009; Taylor, 2000; Fritsch, 2007; Givnish, 1989). Um traço adicional marcante de *Philcoxia* é o posicionamento de muitas de suas pequenas folhas (0.5 - 1.5mm de diâmetro da lâmina) sob a superfície da areia branca onde as plantas ocorrem. No caso, as glândulas capitadas produzem substâncias adesivas que prendem fortemente grãos de areia às folhas.

Para poder ser considerada carnívora, uma planta deve ser capaz de absorver os nutrientes de animais presos a superfície de suas folhas, além de apresentar alguma característica cujo efeito primário seja a atração, a captura e a digestão das presas (Givnish, 1984). Por fim, a combinação das características morfológicas, o substrato seriamente empobrecido quando a disponibilidade de nutrientes, e as observações de nematódeos aderindo as superfícies foliares - tanto em herbário (Fritsch, 2007) quanto no campo - levou a hipótese de que *Philcoxia* seria carnívora, capturando nematódeos e talvez outros organismos e absorvendo os nutrientes dessas presas (Fritsch, 2007). Para testar essa hipótese, nos avaliamos uma espécie, *P. minensis*, para sua capacidade de digerir e absorver nutrientes de nematódeos.

6.4. Material e Métodos

O presente estudo foi realizado em duas etapas distintas, sendo que cada uma será apresentada, e propriamente explicada, nos procedimentos a seguir. Quanto à infraestrutura, os diferentes experimentos foram conduzidos nas dependências do **Laboratório de Ecologia Funcional de Plantas**, na Universidade Estadual de Campinas, e no **Laboratório de Biologia Molecular de Nematódeos**, na Universidade de São Paulo.

6.4.1. Primeira Parte

Descrição Anatômica

A descrição anatômica das folhas de *Philcoxia minensis* foi feita a partir de observações de material foliar fresco e fixado - seccionado transversalmente - em estereomicroscópio; o registro das imagens foi feito através de fotografias, com as devidas escalas demonstrativas.

O material foi fixado em FAA (formalina, ácido acético e álcool 50% 1:1:18, v:v), conforme Johansen (1940), por um período de 24 horas sendo, logo após, estocado em álcool etílico 70%. Após essa etapa, o material foi submetido a uma câmara de vácuo, na qual os gases contidos nos tecidos foram eliminados, e a uma série de desidratação etílica. O material foi, enfim, incluído em resina plástica (Historesin Leica®) conforme os protocolos descritos por Gerrits (1983) e de acordo com as sugestões do fabricante. Após o processo de inclusão, os materiais foram montados em blocos de madeira e seccionados transversalmente em um micrótomo rotativo manual (Microm® HM 340 E), com a utilização de uma navalha do tipo C e em seções de 5-7µm de espessura. Os

cortes foram corados com azul de toluidina 0,05% em solução tampão acetato, de pH 4,7 (Sakai, 1973; O'Brien et al, 1964), por um período de 30 minutos.

Como o objetivo principal de nossa análise anatômica era evidenciar estruturas glandulares encontradas nas folhas de *P. minensis*, e avaliar o sugerido papel que essas podem apresentar quanto ao hábito da carnivoría, outras secções foram coradas com o vermelho de rutênio, um composto que evidencia pectinas e polissacarídeos (Johansen, 1940); além disso, um último conjunto de secções foi corado com ácido tânico/cloreto férrico, um composto que evidencia as proteínas de mucilagem (Pizzolato et al. 1973). As preparações foram observadas e fotografadas com o uso de uma câmera Olympus® DP71 acoplada a um fotomicroscópio Olympus® BX51.

Quanto à análise superficial das folhas, um estudo mais detalhado foi feito com imagens de microscopia eletrônica de varredura. O material foi fixado em solução de Karnovsky (1965) e desidratado em uma série etílica para, em seguida, sofrer outra desidratação pelo método de ponto crítico com CO₂, em equipamento Balzers® CPD 030. O material foi, então, colocado em cima de *stubs* de alumínio e recoberto com camadas de ouro em equipamento Bal-Tec® SCD 050 por um período de 220 segundos. Logo após, o material foi analisado em um microscópio eletrônico de varredura LEO® VP435 (operado a 10kV), e as imagens obtidas serão apresentadas e analisadas adiante nesse estudo. Por fim, para avaliar a produção de fosfatases, as folhas intactas de *P. minensis* foram analisadas com o substrato de fosfatase ELF97 (Invitrogen Molecular Probes®) conforme descrito em trabalhos anteriores (Plachno et al. 2009; Plachno et al. 2006; Nedoma et al. 2003). De forma geral, as amostras foram incubadas em solução

250 μ M de substrato para fosfatases ELF97 em água milli-Q à temperatura ambiente por 15 minutos. Depois, essas amostras foram analisadas para fluorescência verde em um microscópio de epifluorescência (Optiphot-2 ou Eclipse E800 com filtro UV-2A da Nikon com excitação de 330-380nm, um filtro de emissão de 420nm e um espelho dicromático de 400nm). Por fim, as imagens foram documentadas com uma câmera digital Nikon FDX-35. Amostras sem substrato para fluorescência ELF97 foram testadas para possível autofluorescência.

6.4.2. Segunda Parte

Marcação Isotópica

Os isótopos estáveis podem ser usados como marcadores ecológicos, permitindo compreender o fluxo e as transformações de um determinado recurso nos mais diversos sistemas naturais (Dawson et al. 2002). Considerando isso, decidimos fazer um ensaio usando invertebrados marcados isotopicamente, analisando o fluxo desses isótopos em um sistema controlado, a fim de determinar se ocorre absorção ativa desses animais por *Philcoxia minensis*.

O experimento foi composto por três grupos de estudo - um controle externo e dois grupos tratamentos - cada um contendo oito indivíduos de *P. minensis*. O elemento que determinou a diferença entre os grupos tratamentos foi o tempo de permanência dos nematódeos sobre a superfície das folhas (sendo 24h para o **Grupo I** e 48h para o **Grupo II**), acomodando uma janela de tempo adequada para avaliar a absorção ativa dos nutrientes derivados das presas, conforme descrito por Barthlott (1998). O grupo

Controle Externo, por sua vez, caracterizou-se pelo fornecimento de invertebrados não marcados por um período de 48h (garantindo a exposição experimental máxima desses invertebrados).

Os animais escolhidos para esse experimento, *Caenorhabditis elegans*, foram cultivados e mantidos em placas de ágar tipo NGM* contendo NA22, uma linhagem específica de *Escherichia coli*, segundo o protocolo descrito por Brenner (1974), mas com as alterações sugeridas pelo Dr. Carlos E. Winter e pela Dr. Daniela P. Almenara (comunicação pessoal). Os *C. elegans* não marcados foram cultivados em meio NGM simples (Wood, 1988), no qual as bactérias foram mantidas como fonte de alimento. Cultivamos, entretanto, uma linhagem dessa mesma bactéria em um meio enriquecido específico (CGM-1020-SL-N, Cambridge Isotope Laboratories, Inc.®) a fim de estabelecer a assinatura isotópica dos *C. elegans* que foram fornecidos aos dois grupos tratamentos. Crescemos uma colônia isolada de NA22 em 90ml de meio CGM-1020-SL-N *overnight*, centrifugamos esse volume em *ependorfs* de 1,5ml e, em seguida, ressuspendemos o conteúdo de cada *ependorf* em 50µl de tampão M9. Com isso, conseguimos semear um conjunto de 30 placas de Petri (cada uma com 3cm de diâmetro) contendo NGM* sem peptona, estabelecendo, dessa forma, um meio em que a única fonte de nitrogênio disponível aos nematódeos foram as bactérias marcadas.

Colocamos somente um indivíduo de *C. elegans* em cada placa, de forma que os conteúdos individuais de $\delta^{15}\text{N}$ dos nematódeos que se estabeleceram foram os mais elevados possíveis. Inicialmente, as placas com os nematódeos foram deixadas à 15°C, dada a impossibilidade de controle durante o final de semana; logo após esse período,

alteramos a temperatura para 22°C e deixamos as colônias crescerem por quatro dias. O processo de passagem dos nematódeos para as folhas de *P. minensis* começou com a lavagem das placas em tampão M9; cada uma exigiu um volume de aproximadamente 400µl. Conseguimos, dessa forma, seis *ependorfs* contendo os nematódeos em solução aquosa. Centrifugamos esses *ependorfs* à 1000 RPM por 60 segundos, eliminamos os sobrenadantes e suspendemos o conteúdo em *C. elegans* de cada *ependorf* em 200µl de M9 estéril. Colocamos, por fim, 20µl dessa solução extremamente concentrada sobre algumas das folhas, devidamente identificadas, dos indivíduos de *P. minensis*; as demais folhas haviam sido anteriormente coletadas para análise dos conteúdos originais de $\delta^{15}\text{N}$, a fim de nos garantir um controle experimental individual passível de comparação.

Coletamos as folhas dos indivíduos envolvidos no experimento, após os devidos intervalos de exposição, e eliminamos quaisquer vestígios de nematódeos e de outros contaminantes através de cuidadosas lavagens com água Milli-Q®. Colocamos, depois disso, o material em estufa à 60°C por três dias e, após as preparações, o enviamos ao Laboratório de Ecologia Isotópica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA, Piracicaba - SP) para determinação das concentrações totais e composição isotópica de nitrogênio através de um espectrômetro de massa (Thermo Finnigan MAT Delta Plus - Bremen, Germany). Os dados obtidos foram comparados através do teste de análise de variância univariado '*Kruskal-Wallis*', um similar não paramétrico do '*ANOVA on ranks*'.

6.5. Resultados

Continuaremos a apresentar os experimentos separadamente. Os dados, as análises e algumas das conclusões serão expostos a seguir. O estudo será, no entanto, discutido somente após a exposição dos resultados encontrados para as diferentes etapas propostas pelo projeto.

6.5.1. Primeira Parte

Descrição Anatômica

Quanto à estrutura geral das folhas, não encontramos nenhuma característica excepcional. Os indivíduos de *P. minensis* apresentam uma epiderme unisseriada, com células que variam muito pouco, quanto à estrutura e organização, entre uma superfície e outra. Contudo, observamos um conjunto de células que apresentam um volume significativamente maior, especialmente na superfície adaxial da lâmina (fig. 2a e 2b). Os corantes utilizados durante o experimento não foram capazes de evidenciar o conteúdo dessas células, ao contrário das demais células da epiderme.

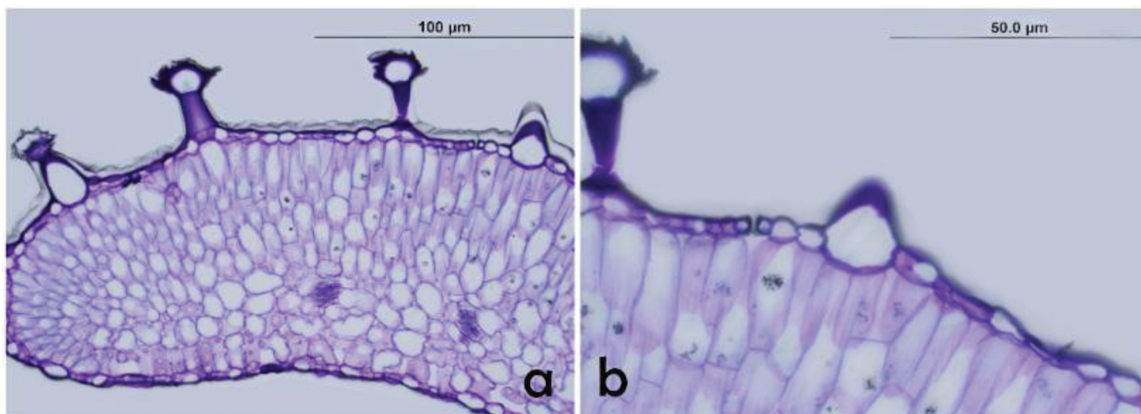


Figura 2. Cortes transversais de *P. minensis*, evidenciando a epiderme e as suas células (a), e célula epidérmica com volume significativamente maior cuja função ainda permanece desconhecida (b).

Como a maioria das plantas superiores, *P. minensis* apresenta o mesofilo dividido em dois conjuntos celulares fotossintetizante distintos, que são comumente conhecidos como parênquima paliçádico e parênquima esponjoso (Apezzato-da-Glória et al. 2006). O primeiro encontra-se imediatamente abaixo da epiderme e é composto por células que, sob secção transversal, se assemelham a barras dispostas em fileiras; são células alongadas que se tornam menores à medida que se afastam da epiderme (fig. 3a). O último, por sua vez, apresenta células isodiamétricas, substancialmente maiores e bem menos numerosas (fig. 3b). O espaço entre as diferentes células excede o de qualquer outro tecido da folha, abrigando grandes conjuntos de feixes vasculares.

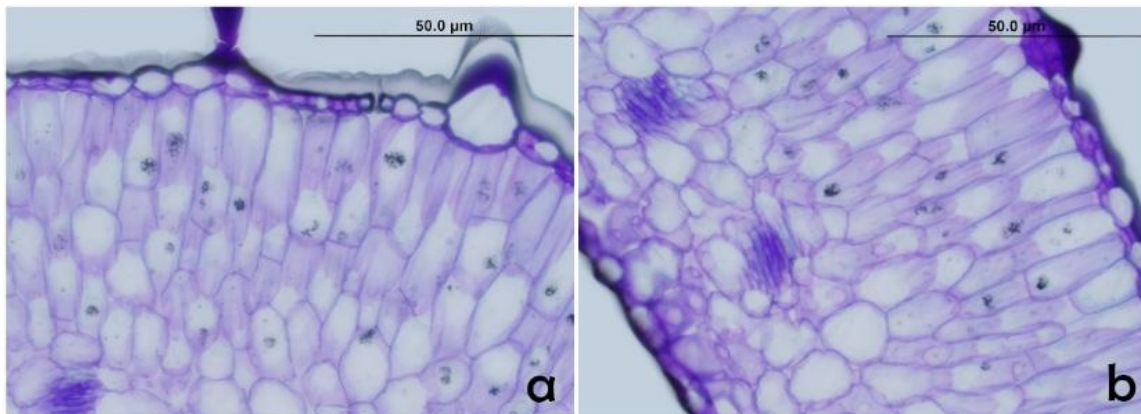


Figura 3. Cortes transversais de *P. minensis*, evidenciando a estrutura geral do mesofilo e as células do parênquima paliçádico (a), e as células do parênquima esponjoso próximas à feixes vasculares (b).

Os aspectos mais interessantes e, sem dúvida, os mais importantes no contexto desse trabalho, foram as glândulas encontradas sobre a superfície das folhas (fig. 4a). Consideravelmente grandes (com cerca de 30µm de comprimento), essas glândulas se estendem ao longo de toda a superfície adaxial da lâmina foliar, sendo exclusivas dessa área (fig. 4b). Semelhantemente às glândulas encontradas em diversas outras espécies

carnívoras (*Drosera* e *Pinguicula*, especialmente), os tricomas observados nos indivíduos de *P. minensis* apresentam formato pedunculado; de maneira geral, sua extremidade é formada por uma cabeça, aparentemente unicelular, que se une a epiderme através de um pedúnculo composto por 1-2 células (fig. 5a). Como em outras glândulas, as paredes anticlinais das células que compõem o pedúnculo apresentam grandes quantidades de cutina e/ou suberina, um aspecto que é evidenciado com o azul de toluidina (fig. 5b); acredita-se que tal característica evite o transporte apoplástico de substâncias, fazendo com que essas sejam conduzidas obrigatoriamente através do citoplasma, a exemplo de como ocorre com diversas células endodérmicas (Apezzato-da-Glória et al. 2006).

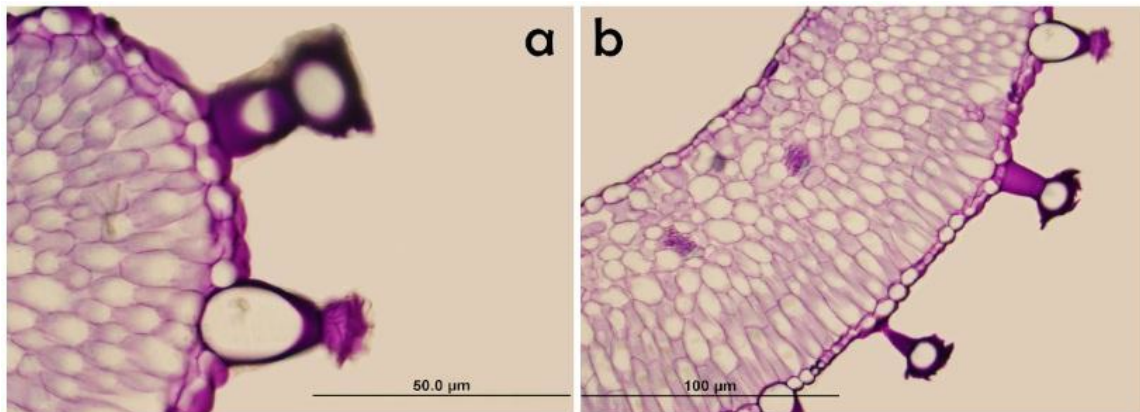


Figura 4. Cortes transversais de *P. minensis* evidenciando duas glândulas secretoras (a), que são exclusivamente encontradas sobre a superfície adaxial, como é possível observar em (b).

Características interessantes também foram encontradas através de uma análise diferencial de coloração. Com o uso do vermelho de rutênio, um corante que evidencia os compostos de mucilagem, polissacarídeos diversos e pectinas, as glândulas ficaram intensamente coradas, em especial a superfície das células apicais (fig. 6a). Com o ácido

tânico/cloreto férrico, de maneira análoga, as glândulas apresentaram forte coloração escura, indicando a presença de proteínas de mucilagem (fig. 6b).

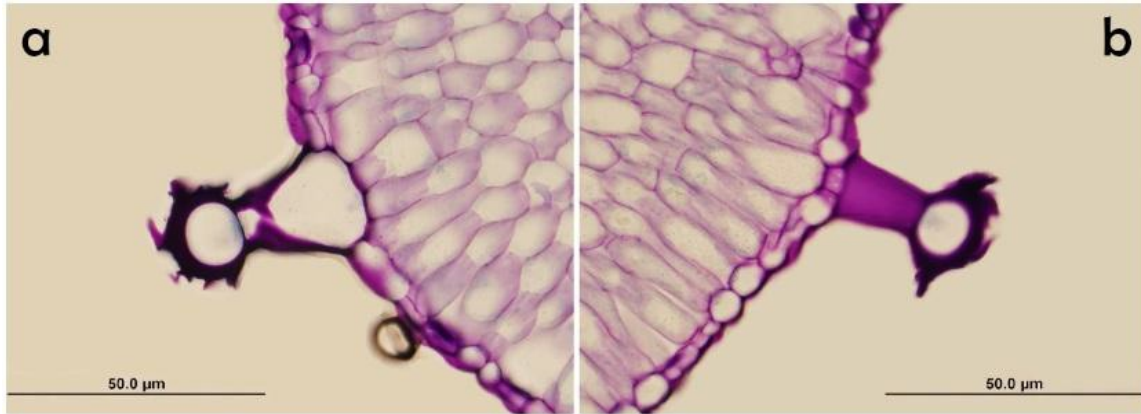


Figura 5. Cortes transversais de *P. minensis*, evidenciando a estrutura de uma glândula (a), assim como as paredes anticlinais das células do pedúnculo, altamente cutinizadas e suberizadas (b).

Os aspectos mais particulares observados durante essa análise anatômica, no entanto, foram os conjuntos celulares exteriores à superfície das folhas; essas células, significativamente menores e organizadas de uma maneira completamente diferente, apresentam núcleos bem evidentes e ausência de parede celular sendo, dessa forma, características de tecidos animais (fig. 7a). Cortes de células de animais, associados às constantes observações de nematódeos sobre as folhas de *Philcoxia*, sugerem que esses conjuntos celulares correspondam a esses organismos, uma vez que essas imagens são coerentes com secções de corpos cilíndricos (fig. 7b).

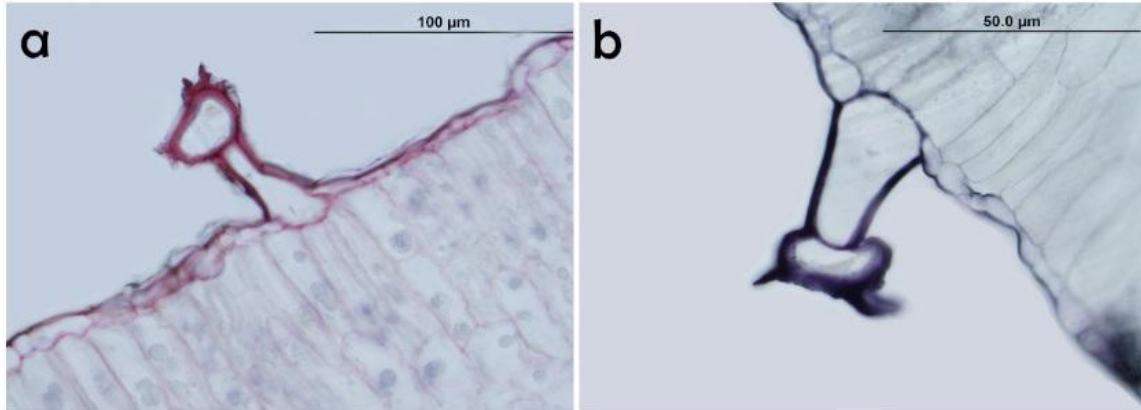


Figura 6. Cortes transversais de *P. minensis*, evidenciando a superfície das glândulas com a coloração diferencial do vermelho de rutênio (a) e do ácido tânico/cloreto férrico (b).

Grande parte das espécies carnívoras “historicamente verdadeiras” apresenta atividade de fosfatases nas glândulas secretoras e emergências foliares (Juniper et al. 1989; Plachno et al. 2009). Conseguimos detectar a atividade de fosfatases nas folhas de *P. minensis* (fig. 8a-b), o que sugere que os nematódeos são digeridos diretamente pela planta, ao invés de serem degradados por microrganismos, como é o caso de algumas *Nepenthes* e *Sarracenia* (Adams et al, 1977).

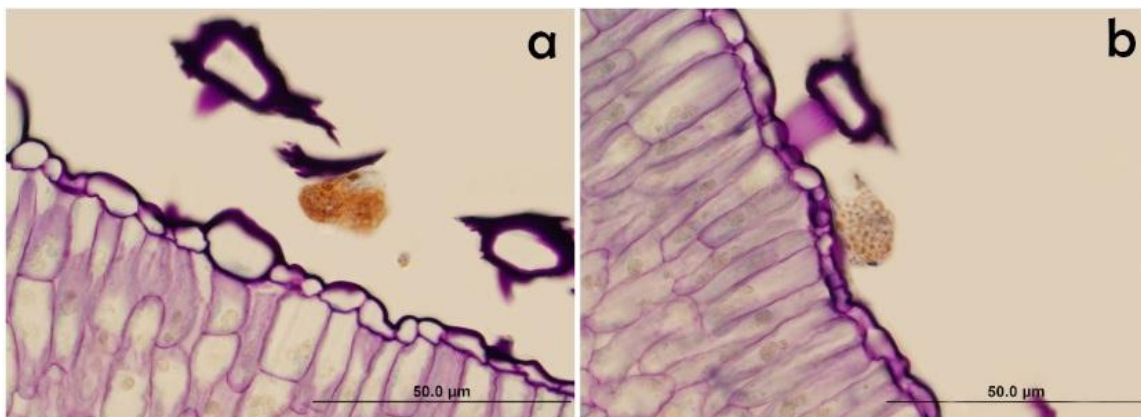


Figura 7. Cortes transversais de *P. minensis*, evidenciando os conjuntos celulares atribuídos às secções de nematódeos (a) constantemente encontrados na superfícies das folhas (b).

Concluimos esse estudo anatômico com uma análise da estrutura externa das folhas de *P. minensis*. Conseguimos, através de imagens de microscopia eletrônica de varredura, observar detalhes da superfície das folhas (fig. 9a), da estrutura geral das glândulas (fig. 9b), além de uma grande quantidade de grãos de areia e de nematódeos aderidos às folhas de *P. minensis* (fig. 9c-d). Com uma análise minuciosa das glândulas (fig. 10a-b), observamos que elas se assemelham, e a semelhança é extraordinária, com aquelas encontradas em espécies de *Pinguicula*, onde tais estruturas são conhecidas como *columella*; aparentemente, a única diferença entre as glândulas de *P. minensis* e as dessas espécies é a quantidade de células. Por fim, quanto aos diversos organismos encontrados sobre as folhas de *Philcoxia* (fig. 9a-d), de acordo com o Dr. Carlos Winter, do Laboratório de Biologia Molecular de Nematódeos (USP), tais animais correspondem, de fato, a diferentes espécies de nematódeos.

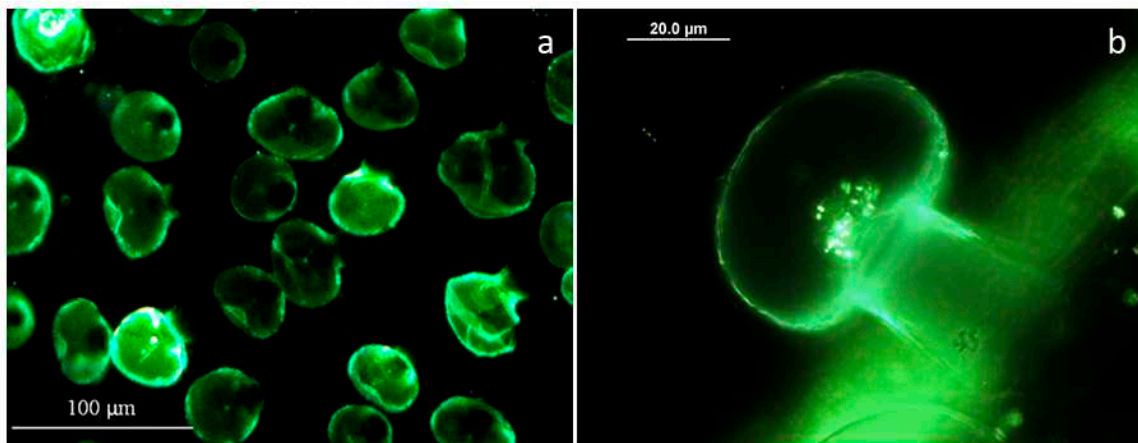


Figura 8. Diversas glândulas de *P. minensis* marcadas com substrato de fosfatase ELF97 (a) e uma glândula isolada com alta concentração de fosfatases em seu interior e em seu entorno (b)

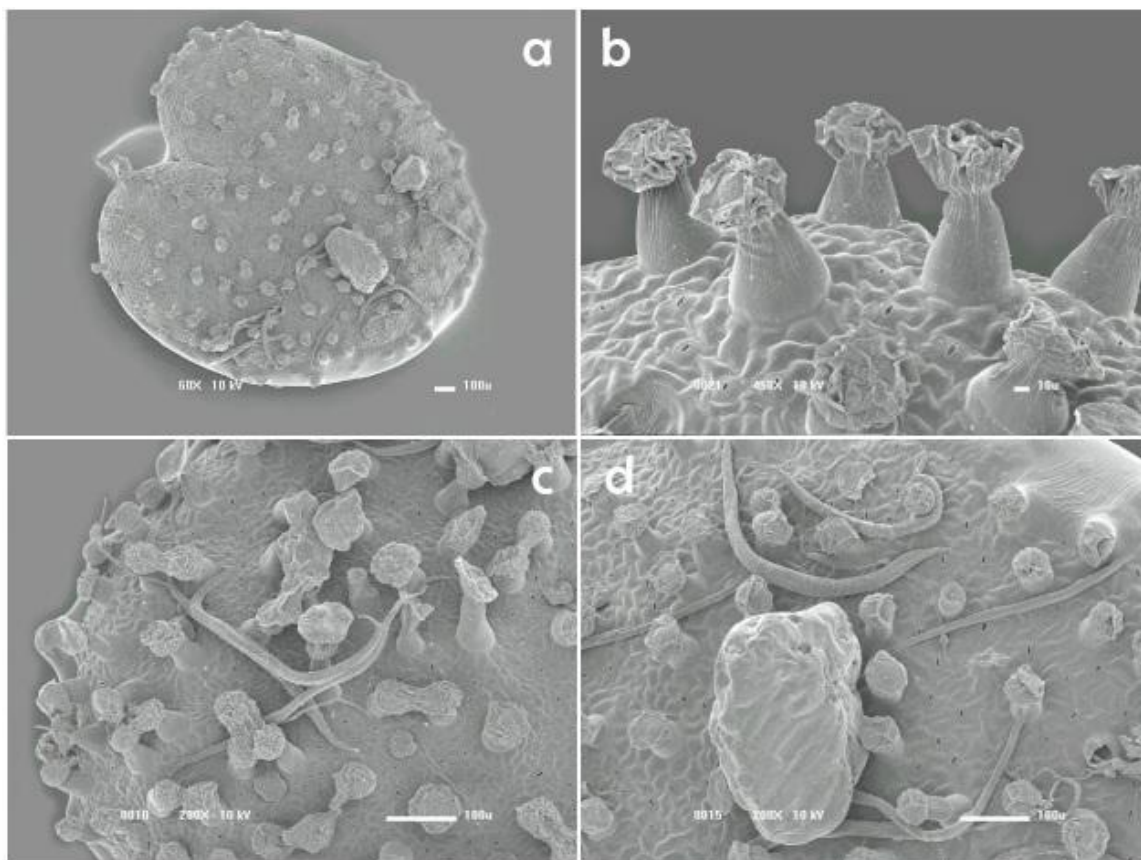


Figura 9. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de *P. minensis*, evidenciando a superfície das folhas (a), as glândulas (b) e as várias espécies de nematódeos (c) e (d).

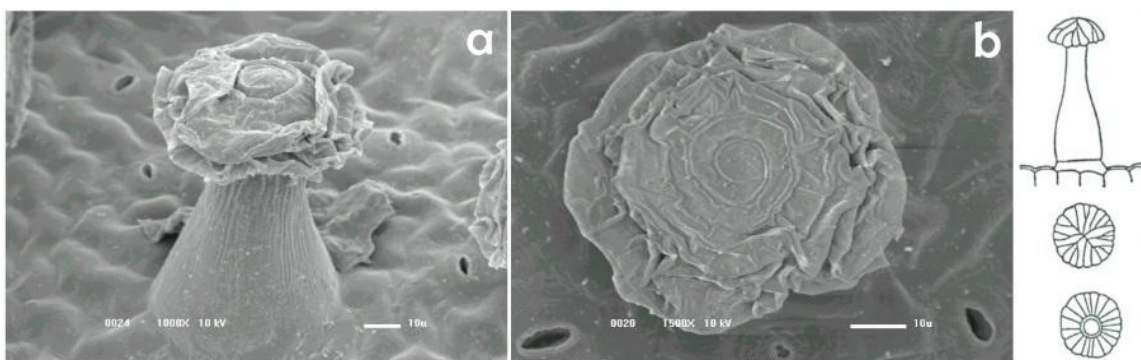


Figura 10. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de *P. minensis*, evidenciando suas glândulas (a) e (b) e o esquema das glândulas encontradas no gênero *Pinguicula* (*columella*).

6.5.2. Segunda Parte

Marcação Isotópica

Quanto à segunda - e certamente a mais importante - etapa desse estudo, nós observamos uma variação significativa na composição isotópica de *P. minensis* após a exposição das folhas aos nematódeos marcados nos dois grupos tratamentos (fig. 11). Quantidades significativas de ^{15}N foram encontradas nas folhas submetidas ao nosso tratamento: aproximadamente 5% do ^{15}N de *C. elegans* foram encontrados nas folhas de *P. minensis* em apenas 24h, e esse valor subiu para 15% quando deixamos as presas sobre as folhas por 48h. Os dois tratamentos não apresentaram, no entanto, diferenças significativas entre si, uma vez que a amplitude dos valores encontrados para o **Grupo II** foi substancial e nossa pequena quantidade de amostras impossibilitou a eliminação de possíveis *outliers*.

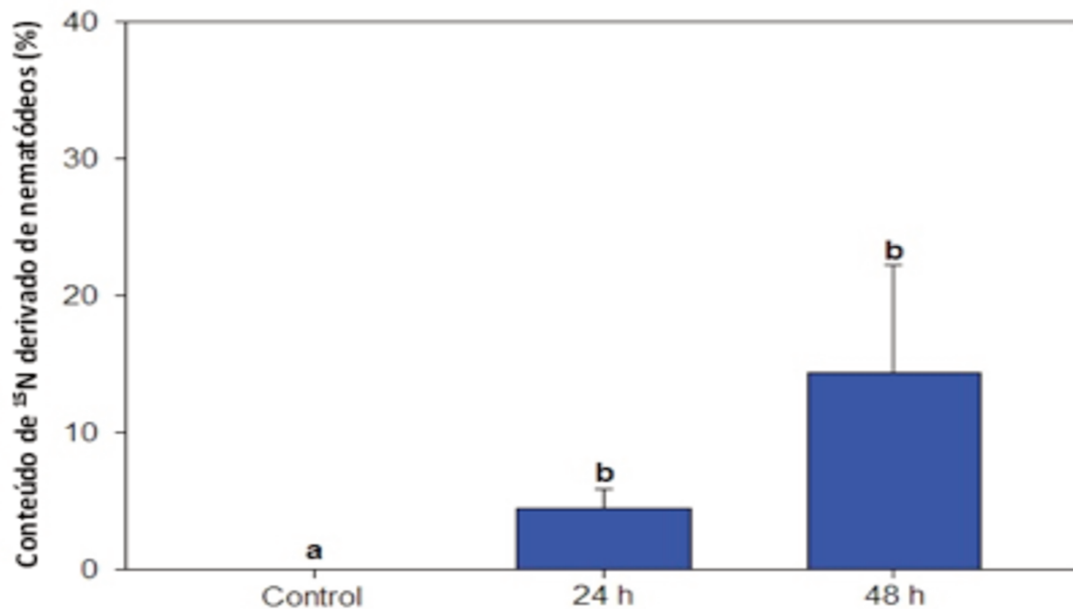


Figura 11. Padrão de absorção de ^{15}N em *Philcoxia minensis*, expresso pelas médias de ^{15}N derivado de *C. elegans* com barras de erro padrão (n=8). Os dados mostram uma diferença significativa na assinatura isotópica das plantas em 24h e 48h depois que os nematódeos foram colocados sobre as folhas.

O padrão observado sugere fortemente - e outra vez - que os nematódeos são digeridos diretamente, ao invés de decompostos por outros microrganismos, e então absorvidos rapidamente pelas folhas de *P. minensis*. De maneira geral, esse padrão é inteiramente consistente com carnivoría, e as taxas de absorção são relativamente altas quando comparadas com outras espécies carnívoras (Plachno et al, 2009).

Comparamos, também, as quantidades absolutas de nitrogênio das amostras, antes e depois da exposição das folhas aos nematódeos, e fomos capazes de observar um aumento significativo no conteúdo de nitrogênio, em relação às folhas não expostas, 48h depois da adição das presas (fig. 12). No mais, as concentrações de nutrientes nas folhas de *P. minensis*, quando comparadas às de suas vizinhas não carnívoras, sugerem que o uso de presas é criticamente importante como fonte de nitrogênio e fósforo, uma vez que os conteúdos observados para esses dois nutrientes foram significativamente maiores que a média de oito espécies não carnívoras¹ da comunidade (Nitrogênio: 29,2 ± 1,6mg/g para *P. minensis* e 9,4 ± 3,8mg/g para a média da comunidade; e Fósforo: 0,9 ± 0,2mg/g para *P. minensis* e 0,4 ± 0,2mg/g para a média da comunidade).

¹ Como o cronograma desse projeto foi bastante apertado, ainda não conseguimos identificar as espécies envolvidas na segunda parte desse estudo. Confirmamos, contudo, que pertencem as seguintes famílias: Clusiaceae, Cyperaceae, Ericaceae, Eriocaulaceae, Fabaceae, Poaceae, Velloziaceae e Xyridaceae.

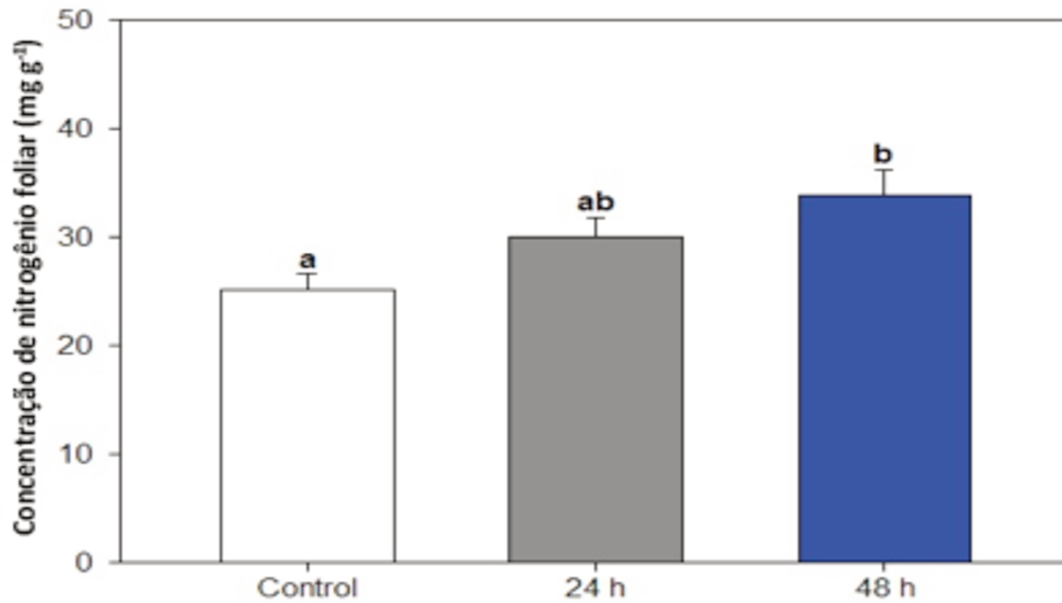


Figura 12. Padrão de absorção de N em *Philcoxia minensis*, expresso pelas médias de conteúdo foliar de N, com barras de erro padrão (n=8). Os dados mostram uma tendência a acréscimo em 24h, e um aumento significativo na concentração de nitrogênio foliar depois de 48h que os nematódeos foram adicionados às folhas de *Philcoxia minensis* (^{a,b}P < 0,05 entre tratamentos).

Com esse conjunto consistente de dados, que mostram o aumento significativo nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ e nos conteúdos absolutos de nitrogênio após a adição de vermes nematódeos enriquecidos com ^{15}N às folhas de *Philcoxia minensis*, assim como dados mostrando diferenças substanciais nos conteúdos foliares de nitrogênio e fósforo em condições naturais, comprovamos que essa espécie apresenta, de fato, a capacidade de absorver e incorporar nutrientes derivados de presas.

6.6. Discussão

Os primeiros aspectos que precisam ser discutidos dizem respeito às diversas características morfológicas apresentadas por *P. minensis*, e que poderiam sugerir a síndrome da carnivoría no gênero. Os primeiros trabalhos com *Philcoxia* apontavam as glândulas como uma forte evidência de carnivoría, embora uma análise mais detalhada fosse necessária. Nós conduzimos essa análise, e apresentamos aqui uma caracterização detalhada dessas estruturas. Como foi possível observar, essas glândulas apresentam semelhanças morfológicas consideráveis com aquelas encontradas em outras espécies conhecidamente carnívoras, como *Drosera* e *Byblis* (Plachno, 2006; Plachno, 2009); a semelhança com as glândulas de *Pinguicula* (Plachno, 2006; Plachno, 2009), sobretudo, foi extraordinária, variando somente quanto à quantidade de células.

Quanto à análise citoquímica, os corantes utilizados durante os experimentos evidenciaram a presença, na superfície das folhas e das glândulas - principalmente - de componentes de mucilagem, pectinas e polissacarídeos diversos, compostos coerentes com a sugerida função digestiva/absortiva dessas estruturas (Apezato-da-Glória et al, 2006). De maneira geral, a intensa produção de fosfatases corrobora essa hipótese, e indica que as características necessárias para a digestão de presas estão presentes.

O experimento com vermes nematódeos marcados foi conclusivo. Conseguimos observar a absorção de uma quantidade substancial de ^{15}N pelas folhas de *P. minensis* após um curto período de exposição a *C. elegans*, resultado que, quando associado à magnitude nos níveis de absorção, garante que essa tenha ocorrido de maneira ativa. Com espécies do gênero *Genlisea* (Lentibulariaceae), em um ensaio muito semelhante,

as folhas só apresentaram ^{35}S em níveis detectáveis após 48h (Barthlott et al, 1998). Contudo, o aspecto mais importante não foi a rapidez com que as plantas absorveram os nematódeos enriquecidos, e sim a absorção em si, o que garante que essa espécie pode ser considerada, do ponto de vista puramente ecológico, uma verdadeira planta carnívora. Conseguimos, ainda, observar um aumento significativo nas concentrações absolutas de nitrogênio (N% em massa) em todos os grupos em que foram adicionados nematódeos, inclusive no controle, o que é mais uma evidência de que *P. minensis* é capaz de absorver e incorporar nutrientes derivados de presas.

O uso de presas por espécies vegetais não é considerado o meio mais econômico de adquirir nutrientes. De maneira geral, esse fato parece derivar da relativa raridade da síndrome da carnivoría, que é encontrada em aproximadamente 0,002% das espécies de angiospermas (Givnish, 1989; Benzing, 1987). O número de espécies carnívoras pode, dessa forma, representar uma subestimativa do verdadeiro total, isso em parte porque apenas testes preliminares foram conduzidos com os gêneros supostamente carnívoros *Dipsacus*, *Geranium*, *Petunia* e *Potentilla* (Benzing, 1987; Simons, 1981; Spomer, 1999; Shaw et al. 2011). No contexto desse estudo, a carnivoría pode ser críptica - devido ao uso de presas microscópicas, de mecanismos dificilmente visíveis e da relativa raridade ou acessibilidade das espécies -, e esses motivos poderiam explicar porque apenas agora a síndrome da carnivoría está sendo descrita para *Philcoxia*.

6.7. Conclusão

Com as evidências apresentadas aqui, conseguimos demonstrar que *P. minensis* apresenta, de fato, o hábito da carnivoría. Comparativamente, a importância disso se estende para muito além do nível específico, ou até mesmo genérico. Comprovamos a carnivoría em um grupo novo de plantas que, até pouco tempo atrás, era desconhecido. Não bastasse, essa espécie é a primeira em sua família a apresentar essa síndrome, algo que pode ser extremamente importante do ponto de vista evolutivo. O presente estudo, e até então dados menos conclusivos de outras espécies com folhas adesivas (Benzing, 1987; Simons, 1981; Spomer, 1999; Shaw et al. 2011) e com estruturas do tipo “*pitfall*” parece suportar a noção de que estamos cercados por mais plantas carnívoras do que pensamos (Chase et al, 2009).

6.8. Referências

Adams R.M. & Smith G.W. (1977) An SEM survey of the carnivorous pitcher plant genera. *American Journal of Botany* 64, 256-272.

Appezato-da-Glória, B. & Carmello-Guerreiro, S.M. (2006) *Anatomia Vegetal*. Ed. UFV, Viçosa.

Barthlott, W., Porembski, S., Fischer, E. & Gemmel, B. (1998). First protozoa-trapping plant found. *Nature* 392, 447.

Benzing, D.H. (1987) The origin and rarity of botanical carnivory. *Trends in Ecology and Evolution* 2, 364-369.

Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71-94.

Chase M.W., Christenhusz M.J.M., Sanders D. & Fay M.F (2009) Murderous plants: Victorian Gothic, Darwin and modern insights into vegetable carnivory. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161, 329-356.

Darwin, C. (1875) *Insectivorous Plants*, Appleton and Company, London.

Dawson, T.E., Mambelli, S., Plamboeck, A.H. & Templer P.H. (2002) Stable Isotopes in Plant Ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33, 507-559.

Ellison, A.M. & Gotelli, N.J. (2001) Evolutionary ecology of carnivorous plants. *Trends in Ecology and Evolution* 16, 623-629.

Ellison, A.M. (2006) Nutrient Limitation and Stoichiometry of Carnivorous Plants. *Plant Biology* 8, 740-747.

Ellison, A.M. & Gotelli, N.J. (2009) Energetics and the evolution of carnivorous plants, Darwin's most wonderful plants in the world'. *Journal of Experimental Botany* 60,

19-42.

Fritsch P.W., Almeda F., Martins A.B., Cruz B.C. & Estes D. (2007) Rediscovery and phylogenetic placement of *Philcoxia minensis* (Plantaginaceae), with a test of carnivory. Proceedings of the California Academy of Sciences 58, 447-467.

Gerrits, P.O. & Smid, L. (1983) A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. Journal of Microscopy 95, 150-155.

Johansen, D.A. (1940) Plant Microtechnique, McGraw-Hill Book Co., New York.

Juniper B.E., Robins R.J. & Joel D.M. (1989) The Carnivorous Plants. Academic Press, London.

Karnovsky, M.J. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. Journal of Cellular Biology 27, 137-138.

Król E, Płachno B.J., Adamec L., Stolarz M., Dziubinska H. & Trebacz K. (2011) Quite a few reasons for calling carnivores 'the most wonderful plants in the world'. Ann Bot, 10.1093/aob/mcr249.

Nedoma J.S., Strojsová A., Vrba J., Komárková J. & Simek K. (2003) Extracellular phosphatase activity of natural plankton studied with ELF97 phosphate: Fluorescence quantification and labelling kinetics. Environmental Microbiology 5, 462-472.

O'Brien, T.P., Feder, N. & McCully, M.E. (1964) Polychromatic staining of plant cell wall by toluidine blue. Protoplasma 59, 368-373.

Pizzolato, T.D. & Lillie, R.D. (1973) Mayer's tannic acid-ferric chloride stain for mucins. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 21, 56-64.

Płachno B.J., et al. (2006) Fluorescence labelling of phosphatase activity in digestive glands of carnivorous plants. *Plant Biology* 8, 813-820.

Płachno B.J., Adamec L. & Huet H. (2009) Mineral nutrient uptake from prey and glandular phosphatase activity as a dual test of carnivory in semi-desert plants with glandular leaves suspected of carnivory. *Annals of Botany* 104, 649-654.

Sakai, W.S. (1973) Simple method of differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue. *Stain Technology* 48, 247-249.

Simons P. (1981) How exclusive are carnivorous plants? *Carnivorous Plant Newsletter* 10, 65–68.

Spomer G.G. (1999) Evidence of proto-carnivorous capabilities in *Geranium viscosissimum* and *Potentilla arguta* and other sticky plants. *International Journal of Plant Sciences* 160, 98-101.

Shaw P.J.A. & Shackleton K. (2011) Carnivory in the teasel *Dipsacus fullonum* - the effect of experimental feeding on growth and seed set. *PLoS ONE* 6, e17935.

Taylor P., Souza V.C., Giuliatti A.M. & Harley R.M. (2000) *Philcoxia*: A new genus of Scrophulariaceae with 3 new species from eastern Brazil. *Kew Bulletin* 55, 155-163.

Wood, W.B. (1988) The nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory, 587-606.

Capítulo 2

Philcoxia minensis and the worldwide leaf economics spectrum

Caio Guilherme Pereira¹, Paulo Bernardino¹, André Vito Scatigna², André Olmos Simões² & Rafael Silva Oliveira^{1,3,A}

¹Laboratório de Ecologia Funcional de Plantas, Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 13083-862, SP, Brasil

²Laboratório de Sistemática Filogenética, Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 13083-862, SP, Brasil

³School of Plant Biology, University of Western Australia, Crawley 6009, WA, Australia

^ACorresponding author: rafaalso@unicamp.br

7.1. Resumo

Os estudos com plantas carnívoras começaram há mais de um século e, ainda nos dias de hoje, não são conhecidos os mecanismos que determinam a evolução e a distribuição geográfica dessas singularidades vegetais. Os modelos de custo-benefício vêm, nesse sentido, atuando como guias para diversas pesquisas nas últimas décadas e parecem poder esclarecer diversos pontos obscuros quanto à ecologia dessas plantas. O gênero *Philcoxia*, endêmico de campos rupestres - ambientes associados a formações de areia branca e afloramentos rochosos, propensos a eventuais queimadas e pobres em nutrientes -, apresenta características que acabaram por levar a questões quanto à sua fisiologia e evolução. Nosso grupo de pesquisa demonstrou que as espécies desse gênero são carnívoras, contudo ainda não sabemos bem o papel que essa síndrome desempenha no balanço energético dessas plantas. O estudo em questão teve como objetivo analisar os custos e os benefícios da carnivoría em *P. minensis* no contexto teórico sugerido por Thomas J. Givnish para a evolução da carnivoría. Para tal, nós posicionamos essa espécie no espectro global de economia foliar, analisando de que forma essa planta se comporta quanto aos *trade-offs* energético-estruturais impostos pelos ambientes restritivos onde ocorrem.

Palavras-chave: espectro global de economia foliar | atributos foliares | capacidade fotossintética | LMA | nitrogênio | fósforo

7.2. Abstract

The studies with carnivorous plants began more than a century ago and until today it is unknown what are the mechanisms that determine the evolution and the geographical distribution of these singularities. The cost-benefit models are, in this context, acting as guidelines to several surveys in recent decades and they appear to clarify many obscure points about the ecology of these plants. The genus *Philcoxia*, endemic to campos rupestres - environments associated with white sand and rocky outcrops, fire-prone and nutrient-poor - has characteristics which eventually led to inquiries concerning its physiology and evolution. Our research group has shown that the species of this genus are carnivorous, but we do not yet know the role that this syndrome plays in the energetic balance of these plants. This study aimed to analyze the costs and benefits of the carnivorous syndrome in *P. minensis* in the theoretical context suggested by Thomas J. Givnish for the evolution of carnivory. In order to do this, we placed this species in the worldwide leaf economics spectrum, analyzing how it behaves regarding the energetic/structural trade-offs imposed by the restrictive environments where they occur.

Key words: worldwide leaf economics spectrum | leaf traits | photosynthetic rates | LMA | nitrogen | phosphorus

7.3. Introdução

Um dos objetivos centrais da ecologia vegetal é entender os mecanismos pelos quais as plantas assimilam os nutrientes e alocam os recursos essenciais aos processos fisiológicos, ao crescimento e à reprodução (Farnsworth et al. 2008). De maneira geral, as concentrações de nutrientes foliares, especialmente nitrogênio, fósforo e potássio, são amplamente conhecidas por determinarem capacidades fotossintéticas máximas, assim como medidas de massa foliar específica (Reich et al. 1999; Wright et al. 2004). De fato, a correlação entre esses traços é tão geral que ficou conhecida como o “espectro global de economia foliar” (Wright et al. 2004).

O “espectro global de economia foliar” engloba um padrão de correlações entre características foliares que é virtualmente universal e consistente ao longo de todas as angiospermas (Reich et al. 1997; Wright et al. 2004). De um lado do espectro, estão as espécies vegetais de crescimento rápido e que produzem folhas efêmeras e de baixo custo estrutural, mas que apresentam altas concentrações de nitrogênio e de outros nutrientes, assim como altas capacidades fotossintéticas. Do outro lado desse espectro, no entanto, estão descritas espécies vegetais de crescimento lento que produzem folhas duradouras e estruturalmente mais custosas, pequenas concentrações de nitrogênio e outros nutrientes, assim como baixas capacidades fotossintéticas (Donovan et al. 2011). Essas diferentes combinações de aspectos foliares representam alternativas ecológicas associadas ao balanço entre os custos de construção de uma folha e os benefícios que essa estrutura fornece na forma de assimilação de carbono via fotossíntese - ou seja, aquisição rápida de recursos versus a conservação de recursos (Reich et al. 1997; Reich

et al. 1999; Wright et al. 2004; Westoby et al. 2006). Devido ao fato dessas correlações entre atributos ser observada entre espécies dentro de comunidades isoladas, assim como através de diferentes biomas, o espectro global de economia foliar é tido como reflexo de adaptações a gradientes ambientais em larga escala (Donovan et al. 2011).

Contudo, plantas são extremamente sensíveis quanto às quantidades locais de nutrientes disponíveis e, de maneira geral, a limitação por um nutriente pode interferir substancialmente na habilidade dessa planta usar outro nutriente, água e até mesmo luz (Farnsworth et al. 2008). Dessa forma, diversos estudos recentes têm ilustrado o papel que as diferenças locais nas disponibilidades de recursos, assim como variações espécie-específicas, podem exercer sobre as relações de forma e de função das folhas (Dudley, 1996; Ordonez et al. 2010), e no quanto essas correlações podem divergir do espectro global de economia foliar proposto por Wright et al. (2004).

Nesse contexto, as plantas carnívoras (que derivam uma grande quantidade de seus nutrientes da captura e da digestão de presas) exibem relações alométricas foliares diferentes das previstas pelo espectro global de economia foliar (Ellison, 2006); essas plantas apresentam, por exemplo, taxas fotossintéticas extremamente baixas, e o uso de nitrogênio durante o processo de fotossíntese chega a ser 50% menos eficiente do que o esperado segundo padrões mundiais. Dessa maneira, tais características podem determinar um deslocamento considerável da posição relativa das plantas carnívoras na correlação que Wright et al. (2004) propôs para todas as espécies vegetais - um fato que foi verificado em apenas alguns estudos (Farnsworth et al. 2008). De forma geral, esses trabalhos deixam claro que as plantas carnívoras estão sob uma grande desvantagem

energética quando comparadas com espécies não-carnívoras.

Contudo, as plantas carnívoras crescem em ambientes considerados “extremos” e, dessa forma, o desempenho energético dessas espécies deve ser avaliado dentro do contexto desses ambientes, algo geralmente ignorado por pesquisadores que trabalham com ecossistemas. Por esse motivo, decidimos analisar as relações alométricas descritas por Wright et al. (2004) e outros autores em uma comunidade específica, avaliando de que maneira as plantas carnívoras se comportam quando comparadas às vizinhas não carnívoras que crescem no mesmo ambiente.

De forma geral, esperávamos encontrar a mesma correlação descrita por muitos autores (Reich et al. 1999; Wright et al. 2004; Westoby et al. 2006) para as espécies não carnívoras, com maiores concentrações de nutrientes, no caso o fósforo e o nitrogênio, determinando maiores capacidades fotossintéticas. Por outro lado, todavia, esperamos uma correlação apenas semelhante para as espécies carnívoras, com uma alteração na posição da curva e em sua angulação, visto que essas espécies apresentam *trade-offs* adicionais a serem considerados, já que uma parte da área foliar apresenta funções relacionadas à atração, captura e digestão de presas (Ellison, 2006; Farnsworth et al. 2008). Quanto à correlação entre fotossíntese e LMA (quantidade de massa seca por unidade de área foliar), por fim, esperávamos que *P. minensis*, apesar de sua posição relativa ao longo do espectro, apresentasse o mesmo padrão que descreve o *trade-off* entre os gastos estruturais e a fase líquida (fotossíntese) e, dessa forma, formasse uma curva semelhante à observada para as espécies não carnívoras da própria comunidade.

7.4. Material e Métodos

O experimento foi conduzido no parque onde são encontrados os indivíduos de *P. minensis*, em Joaquim Felício, MG. Nessa área, nós coletamos dados de fotossíntese (A_{area}) para quatro indivíduos de *P. minensis*, assim como de quatro indivíduos das dez espécies não carnívoras mais abundantes². Depois disso, coletamos as folhas usadas nas medições de fotossíntese e o material, após ser mantido a 60°C por 48 horas, foi moído e as concentrações dos principais nutrientes (nitrogênio e fósforo) foram determinadas em um espectrômetro de massa (Thermo Finnegan, Delta Plus - Bremen, Germany) no laboratório de Ecologia Isotópica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA, Piracicaba - SP). No caso, as análises das amostras de *P. minensis* tiveram que ser feitas separadamente, uma vez que os indivíduos dessa espécie apresentaram um conteúdo em massa muito limitado, o que impediu que nós fizéssemos as quantificações da forma convencional. Dessa forma, os conteúdos de nitrogênio foram determinados através de análise elementar (CHN Elementar Analyzer 2400 Perkin Elmer, USA), enquanto que as concentrações de fósforo foram determinadas por espectrometria de emissão atômica acoplada a plasma (ICP-MS, Spectro Ciros CCD, Germany). Como esses equipamentos são extremamente complexos, nossas amostras foram enviadas a Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP, São Paulo - SP). Por fim, as medidas de fotossíntese foram correlacionadas com razões de massa por área foliar e com as concentrações de nitrogênio e de fósforo através de regressões lineares no

² Como o cronograma do projeto foi apertado, ainda não conseguimos identificar as espécies envolvidas nesse estudo. Confirmamos, entretanto, que pertencem as famílias Annonaceae, Asteraceae, Clusiaceae, Cyperaceae, Ericaceae, Fabaceae, Melastomataceae, Proteaceae, Velloziaceae e Vochysiaceae.

software SYSTAT 13.0 (Systat).

O foco desse estudo foram quatro características foliares que, juntas, capturam diversos aspectos da economia foliar; (1) **LMA** (*leaf mass per area*), mede o peso seco da folha que é investido por unidade de área foliar fotossintetizante. De maneira geral, as espécies que possuem altos **LMAs** têm lâminas foliares mais grossas e tecidos mais densos (Witkowski et al. 1991). (2) Capacidade de assimilação fotossintética máxima (**A_{max}**), medida em condições de alta umidade e luminosidade e ampla disponibilidade de CO_{2(g)}. Dentre outros fatores, a capacidade fotossintética máxima é influenciada pela condutância estomática e pela capacidade de carboxilação dos cloroplastos no interior da folha. (3) Concentração de nitrogênio (**N**), já que esse nutriente é um componente integral de diversas proteínas do maquinário fotossintético, em especial a Rubisco (ou Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase). O aparato fotossintético, principalmente devido a essa enzima, é diretamente responsável pelo uso do CO_{2(g)} intracelular, em um processo que também é afetado pela estrutura geral das folhas e; (4) Concentração de fósforo (**P**), uma vez que esse nutriente está presente em ácidos nucleicos, membranas lipídicas e em moléculas ligadas à química energética da célula, como o ATP e o ADP. O fósforo deriva da desagregação de certos minerais, ao contrario do nitrogênio, que é predominantemente incorporado ao solo via fixação da atmosfera por microrganismos associados, ou não, às plantas (Wright et al. 2004). Os outros parâmetros analisados ao longo desse estudo são, de uma forma ou de outra, derivações desses quatro atributos foliares chave. O primeiro, eficiência do uso de nitrogênio na fotossíntese (ou **PNUE_N**), mede o quanto eficaz uma determinada espécie é em utilizar o nitrogênio no processo

fotossintético. Dentre diferentes espécies, a capacidade fotossintética máxima (A_{max}) geralmente está fortemente correlacionada com a concentração de nitrogênio foliar (N) e, grosso modo, essa correlação normalmente é atribuída ao fato de que a maior parte do nitrogênio foliar está alocada no aparato fotossintético (Evans, 1989). No entanto, é sabido também que, quando comparadas sob a mesma concentração de nitrogênio (N), espécies diferentes exibem amplas variações quanto às capacidades fotossintéticas (Field et al. 1986). Permanece desconhecido o motivo pelo qual certas espécies apresentam $PNUE_N$ consistentemente baixos, mas normalmente esses valores são observados em espécies tolerantes ao estresse (Poorter et al. 1990). Por fim, $PNUE_P$, ou eficiência do uso de fósforo na fotossíntese, é um parâmetro que equivale ao $PNUE_N$, mas associado ao fósforo. Dessa forma, analisamos o uso dos dois principais nutrientes associados à assimilação de carbono que mais frequentemente limitam a produtividade primária em ecossistemas terrestres.

7.5. Resultados

Os quatro atributos foliares chave analisados para *P. minensis* e para as espécies não carnívoras variaram em, no máximo, uma ordem de grandeza ao longo do conjunto de dados que coletamos para a comunidade em questão. Os valores de **LMA** variaram entre 55,43g/m² e 269,42g/m². Quanto às capacidades fotossintéticas máximas (**A_{max}**), os valores baseados em área (**A_{area}**) variaram entre 1,28μmol CO_{2(g)}·m⁻²·s⁻¹ e 18,20μmol CO_{2(g)}·m⁻²·s⁻¹ e os com base em massa (**A_{mass}**) variaram entre 14,78nmol CO_{2(g)}·g⁻¹·s⁻¹ e 163,26nmol CO_{2(g)}·g⁻¹·s⁻¹. Os conteúdos foliares de nutrientes variaram entre 7,22mg/g e 20,58mg/g para nitrogênio (**N**), e entre 0,26mg/g e 1,00mg/g para fósforo (**P**). Quanto aos demais parâmetros expandidos, os valores de eficiências do uso de nitrogênio (ou **PNUE_N**) variaram entre 18,99μmol CO_{2(g)}·mol⁻¹ N·s⁻¹ e 181,37μmol CO_{2(g)}·mol⁻¹ N·s⁻¹, e os valores de eficiências do uso de fósforo na fotossíntese (ou **PNUE_P**) variaram na faixa entre 566,67μmol CO_{2(g)}·mol⁻¹ P·s⁻¹ e 8331,85μmol CO_{2(g)}·mol⁻¹ P·s⁻¹.

Quanto às análises estatísticas, nós encontramos correlações significativas para apenas algumas combinações de atributos, mas principalmente quando as capacidades fotossintéticas foram expressas em relação à massa (**A_{mass}**). Os gráficos de correlação entre **A_{max}** e **LMA** das espécies não carnívoras apresentaram padrões semelhantes aos encontrados em trabalhos anteriores (Wright et al. 2004 e Westoby et al. 2006), com diminuições nas taxas de fotossíntese (**A_{area}** e **A_{mass}**) com aumentos nos índices de **LMA** (fig. 13 e 14). Esse padrão não foi evidenciado para *P. minensis*, embora uma aparente tendência tenha sido observada na correlação entre **A_{mass}** e **LMA** (fig. 14).

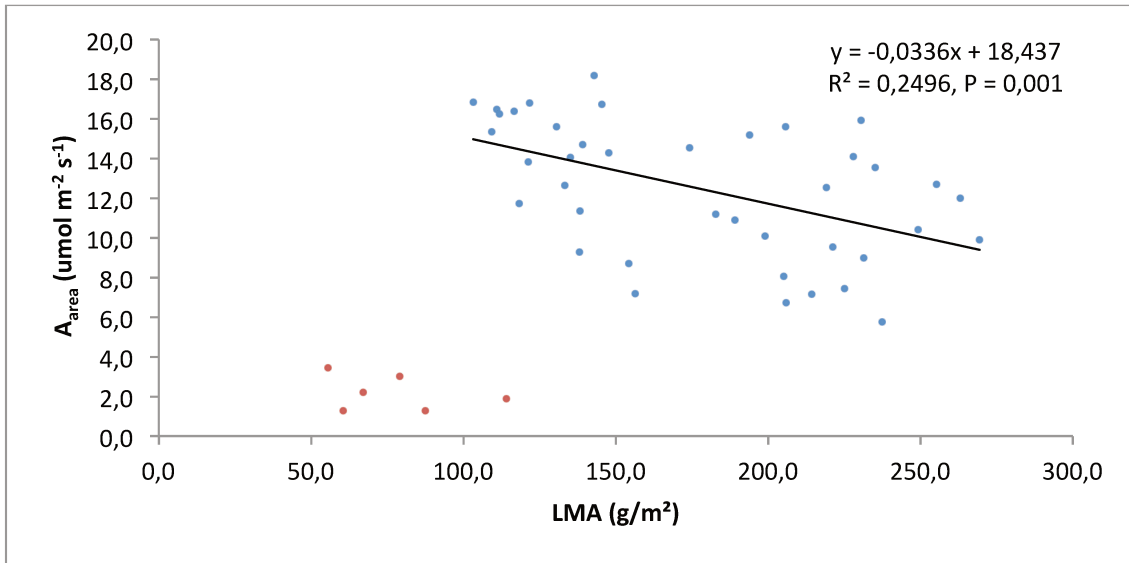


Figura 13 - Correlações entre A_{area} e LMA para dez espécies não carnívoras (pontos azuis, equação da direita) e para *P. minensis* (pontos vermelhos).

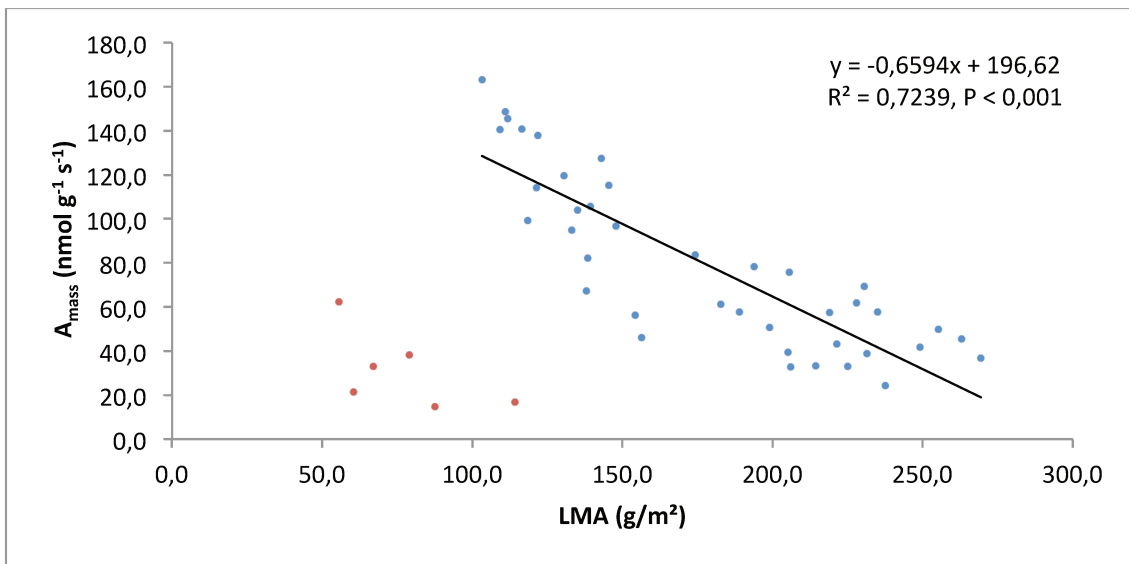


Figura 14 - Correlações entre A_{mass} e LMA para dez espécies não carnívoras (pontos azuis, equação da direita) e para *P. minensis* (pontos vermelhos).

Como foi possível observar, os valores de LMA puderam explicar 24,96% da variação de A_{area} para as plantas não carnívoras da comunidade. Quando a capacidade fotossintética está expressa em função da massa dos indivíduos (A_{mass}), esses valores são ainda maiores; nesse caso, os valores de LMA explicaram 72,39% dessa variação.

Convertendo os valores para uma escala logarítmica, as correlações ficaram ainda mais próximas àquela descrita para as espécies do Glopnet - o maior conjunto de dados já publicado sobre as correlações entre características foliares - (Wright et al. 2004), com os valores de LMA explicando 74,09% da variação de A_{mass} das plantas não carnívoras.

Nesse caso, fica evidente o quanto *P. minensis* se distancia das demais espécies da comunidade, apresentado índices de LMA substancialmente mais baixos do que os das espécies não carnívoras (fig. 15). Da mesma forma, as capacidades fotossintéticas de *P. minensis* são extremamente baixas - e isso independentemente do parâmetro usado, A_{area} ou A_{mass} (fig. 16 e 17) -, consistente com o que parece ser uma propriedade geral das plantas carnívoras (Ellison, 2006; Ellison et al, 2005).

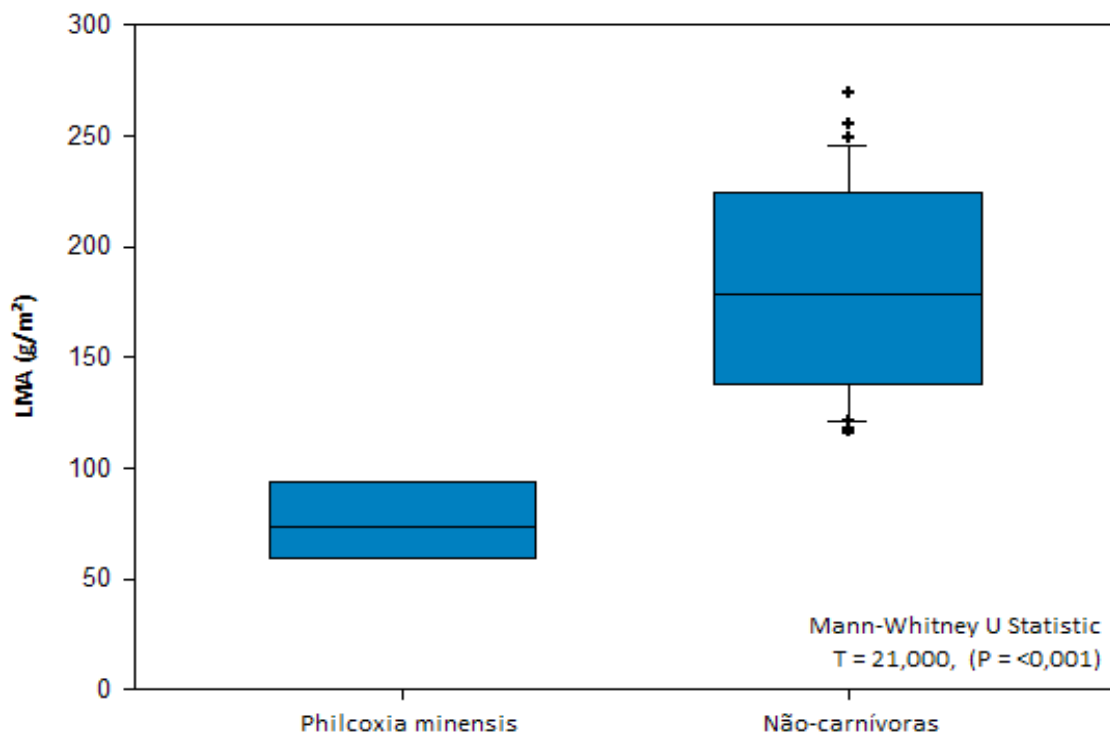


Figura 15 - Médias de LMA de *P. minensis* e das plantas não-carnívoras, com os quartis inferiores (25%) e superiores (75%), barras de erro padrão e outliers (pontuações).

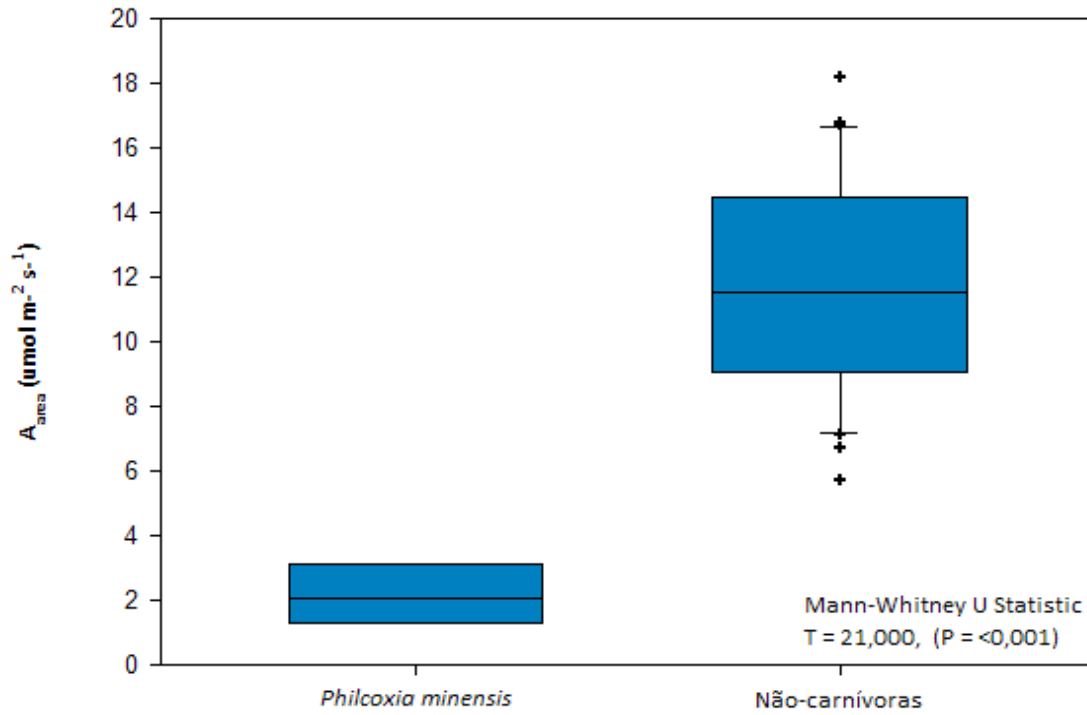


Figura 16 - Média de A_{area} de *P. minensis* e das plantas não carnívoras, com os quartis inferiores (25%) e superiores (75%), barras de erro padrão e outliers (pontuações).

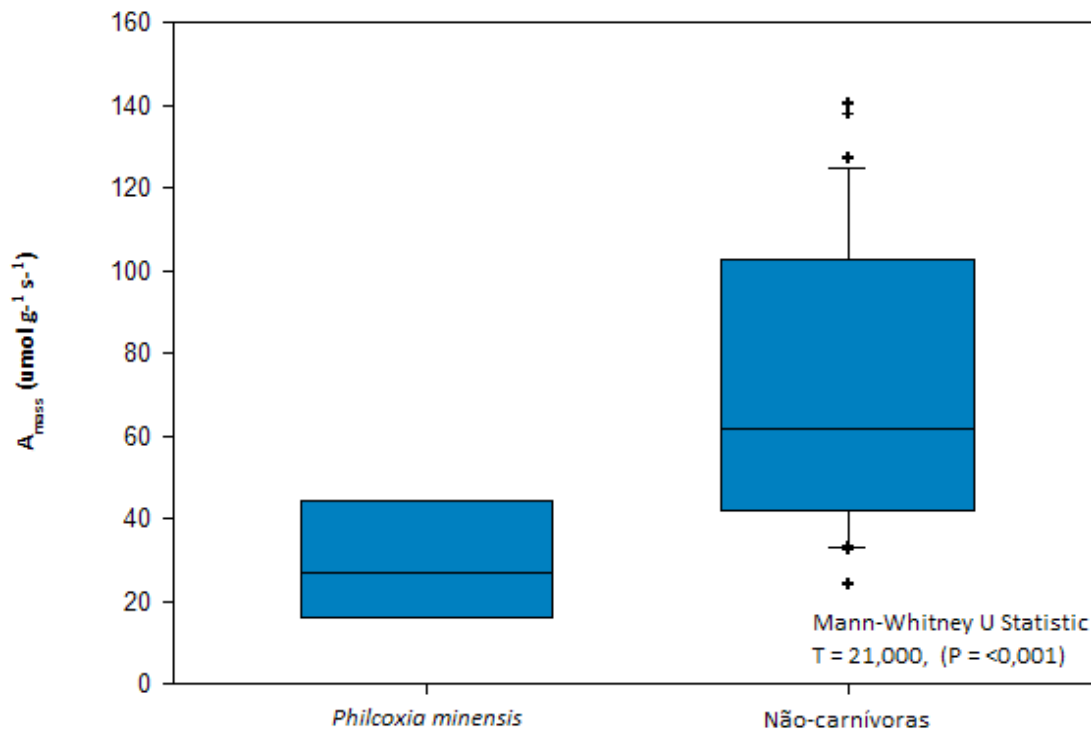


Figura 17 - Média de A_{mass} de *P. minensis* e das plantas não carnívoras, com os quartis inferiores (25%) e superiores (75%), barras de erro padrão e outliers (pontuações).

Quanto às correlações entre os demais parâmetros, os valores de concentração de nitrogênio (N) puderam explicar 19,80% da variação de A_{mass} (fig. 18) para as espécies não carnívoras. Os valores de conteúdo de fósforo (P), por sua vez, explicaram 23,78% da variação de A_{area} e 36,96% da variação de A_{mass} (fig. 19) para esse mesmo grupo. Não encontramos correlações significativas entre esses atributos para *P. minensis*, porém o posicionamento dessa espécie indica que as capacidades fotossintéticas (A_{area} e A_{mass}) são muito baixas para as concentrações foliares de nitrogênio e fósforo (fig. 18 e 19).

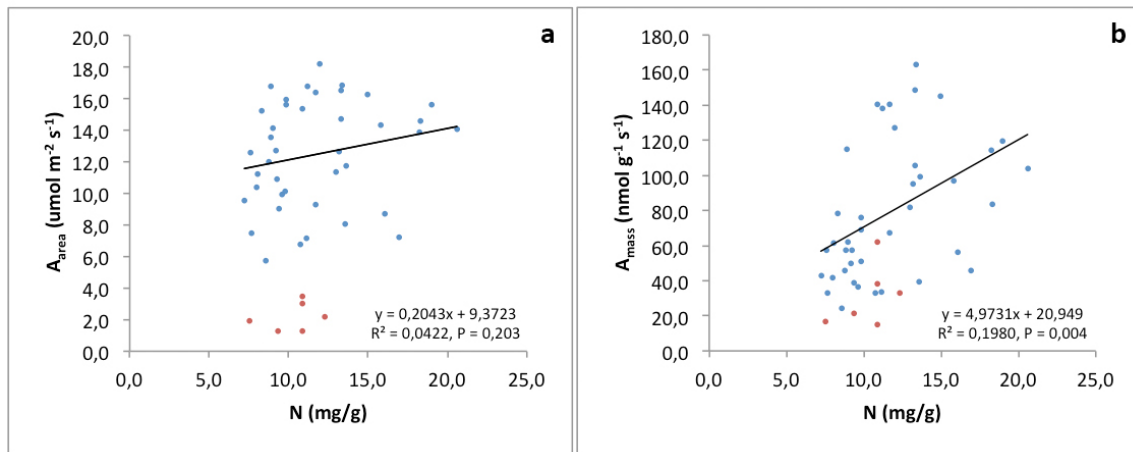


Figura 18 - Correlações entre A_{area} e N (a) e entre A_{mass} e N (b) para espécies não carnívoras (pontos azuis, equações na parte inferior dos gráficos) e *P. minensis* (pontos vermelhos).

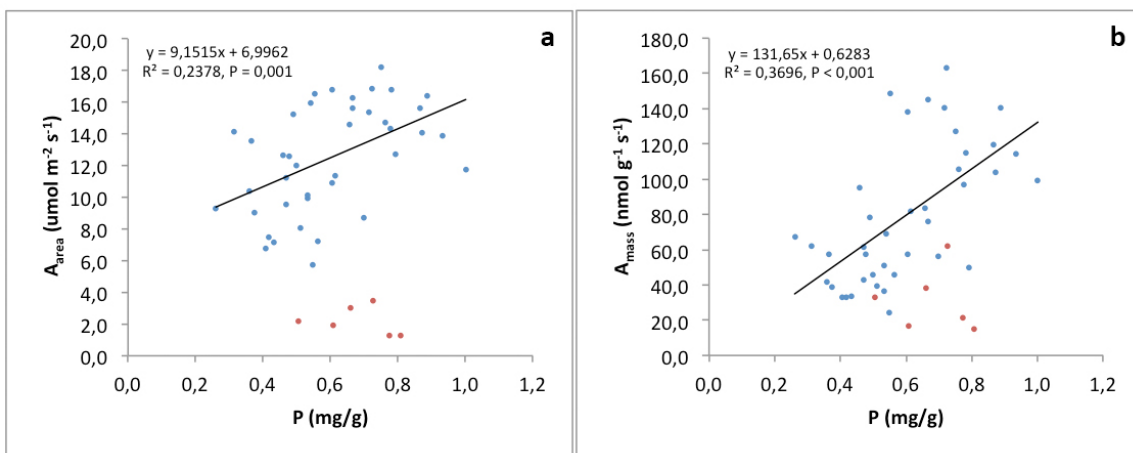


Figura 19 - Correlações entre A_{area} e P (a) e entre A_{mass} e P (b) para espécies não carnívoras (pontos azuis, equações na parte superior dos gráficos) e *P. minensis* (pontos vermelhos).

Como em absolutamente todos os estudos anteriores (Reich et al. 1999; Wright et al. 2004; Westoby et al. 2006), com o aumento nas concentrações de nitrogênio (N) e de fósforo (P), nós fomos capazes de observar aumentos nas capacidades fotossintéticas (A_{area} e A_{mass}) das espécies não carnívoras, consequência de uma melhora na eficiência e na concentração das enzimas do fotossistema (Poorter et al. 1990).

Quanto às características estequiométricas gerais, apenas dois indivíduos³ não apresentaram deficiências nutricionais⁴ sérias: o primeiro (*Annona crassiflora* Mart.) apresentou um nível de nitrogênio (N) comparativamente alto (20,59mg/g), mas uma marcada deficiência de fósforo (0,87mg/g); o segundo (*Gaylussacia brasiliensis* Meisn.), apresentou uma concentração imediatamente acima do nível de limitação de fósforo (1,00mg/g), mas uma significativa deficiência de nitrogênio (13,62 mg/g). De maneira geral, podemos observar um padrão nítido nas razões entre nitrogênio (N) e fósforo (P) para as espécies dessa comunidade, com 67,3% dos indivíduos apresentando valores de **N:P** maiores que 16 - indicando limitação por fósforo -, o que é ainda mais evidenciado com o valor médio de $19,94 \pm 6,30$ na razão N:P para essa comunidade. O padrão fica mais visível no gráfico de correlação entre nitrogênio (N) e fósforo (P) (fig. 20), no qual os valores de fósforo quase não variam independentemente dos valores de nitrogênio.

Os índices de LMA puderam explicar 34,19% da variação do PNUE_N e 37,88% da variação do PNUE_P (fig. 21) para as plantas não carnívoras. Como pudemos observar, os aumentos nos valores de LMA determinaram diminuições na eficiência da utilização de

³ No caso, apenas dois indivíduos no total, sendo um de cada espécie (*A. crassiflora* e *G. brasiliensis*).

⁴ No caso, as deficiências nutricionais são definidas segundo os estudos de Koerselman & Meuleman (1996) e Aerts & Chapin (2000), nos quais a limitação por N é dada quando $N < 20\text{mg/g}$ e $N:P < 14$, a limitação por P é dada quando $P < 1\text{mg/g}$ e $N:P > 16$ e a co-limitação é dada quando $14 \leq N:P \leq 16$.

nutrientes (tanto o nitrogênio quanto o fósforo) no processo de fotossíntese para essas espécies, padrão que não foi observado para os indivíduos de *P. minensis*. Quanto aos valores de eficiência do uso de nutrientes (PNUE) para *P. minensis*, eles variaram entre $18,99\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ e $80,47\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ para o PNUE_N e entre $566,67\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ e $2659,36\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ para PNUE_P . Como fica evidente, a eficiência do uso de nutrientes em *Philcoxia* é significativamente menor que o das plantas não carnívoras (fig. 22 e 23).

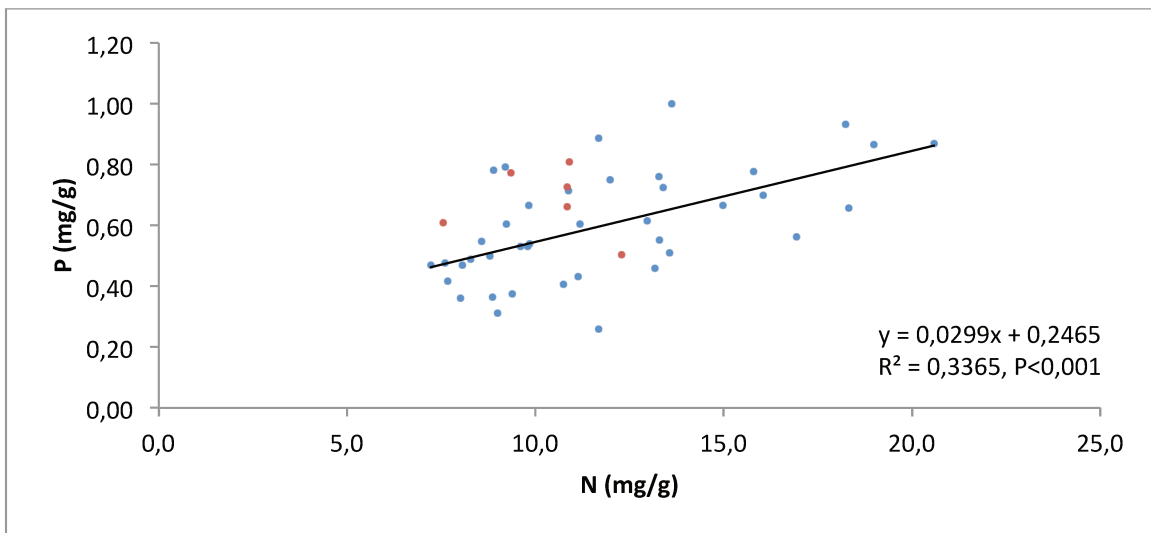


Figura 20 - Correlação entre nitrogênio (N) e fósforo (P) para espécies não carnívoras (pontos azuis, equação descrita) e para *Philcoxia minensis* (pontos vermelhos).

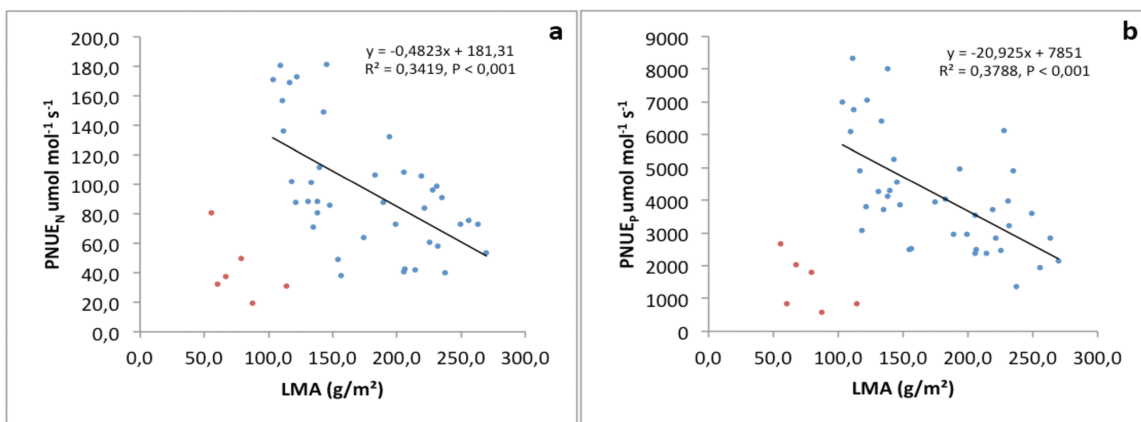


Figura 21 - Correlação entre eficiência do uso de nitrogênio na fotossíntese (PNUE_N) e LMA (a) e correlação entre eficiência do uso de fósforo na fotossíntese (PNUE_P) e LMA (b) para as plantas não carnívoras (pontos azuis, equações na parte superior dos gráficos) e *P. minensis* (pontos vermelhos).

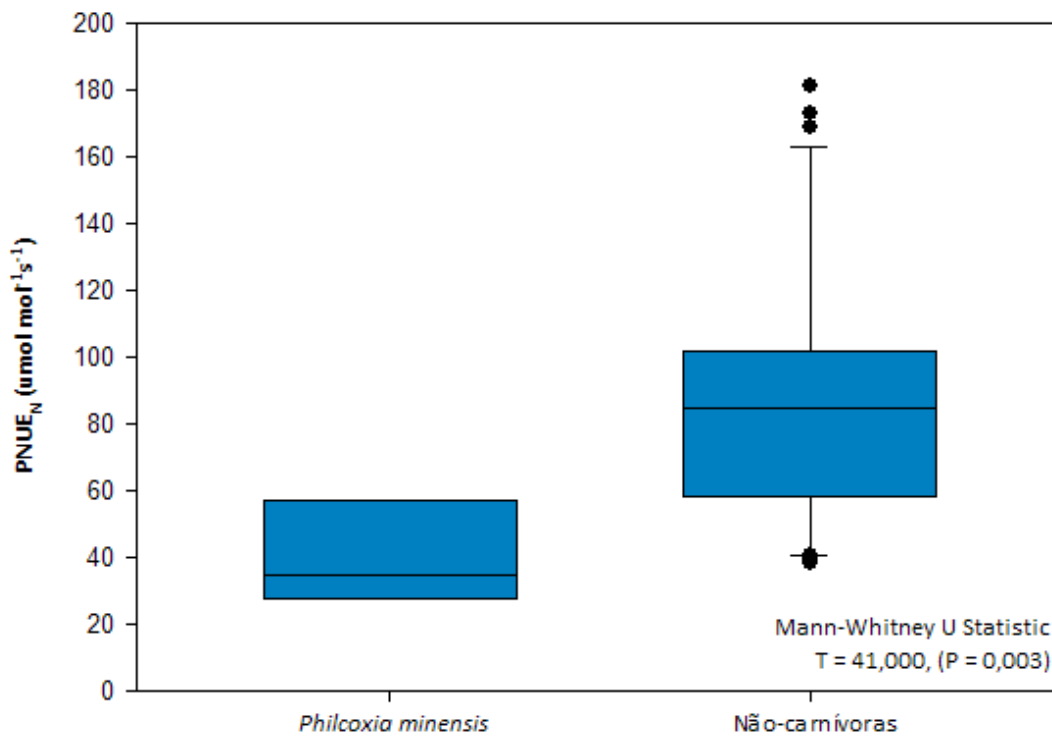


Figura 22 - Média de $PNUE_N$ de *P. minensis* e das plantas não carnívoras, com os quartis inferiores (25%) e superiores (75%), barras de erro padrão e outliers (pontuações).

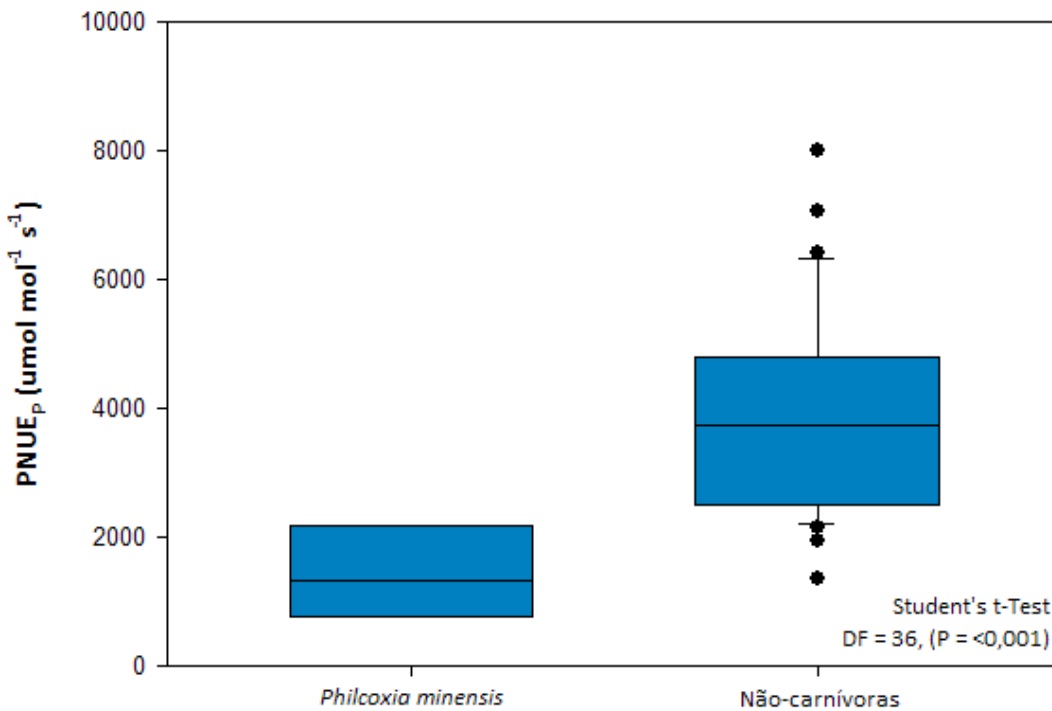


Figura 23 - Média de $PNUE_P$ de *P. minensis* e das plantas não carnívoras, com os quartis inferiores (25%) e superiores (75%), barras de erro padrão e outliers (pontuações).

7.6. Discussão

O primeiro aspecto a ser discutido diz respeito às correlações encontradas para os valores de A_{\max} e LMA. Como nós pudemos observar, o mesmo padrão descrito por diversos pesquisadores (Wright et al. 2004; Westoby et al. 2006) foi encontrado para as espécies não carnívoras dessa comunidade, mas não para os indivíduos de *P. minensis*. Nesse contexto, duas hipóteses surgem como possíveis explicações para essa correlação não significativa em *P. minensis*. De forma geral, o que observamos pode ser um quadro incompleto, derivado do simples fato da amostragem de indivíduos em *P. minensis* ter sido substancialmente menor ($n=6$ para *P. minensis*, comparado com um $n=32$ para as demais espécies não carnívoras). Por outro lado, um fator possivelmente importante e que não havia sido exposto pode fornecer uma explicação alternativa; de fato, os dados descritos aqui, seja para os valores de A_{area} , A_{mass} quanto para os de LMAs não foram obtidos a partir das folhas dessa espécie, e sim das inflorescências. Devido à pequena área absoluta (menos de $0,5 \text{ cm}^2$), ao fato de estarem quase que permanentemente enterradas sob a areia e, principalmente, ao fato de apresentarem uma função dupla como armadilha para nematódeos e outras presas, as folhas de *P. minensis* parecem ter apenas um papel acessório, se não desprezível, na assimilação de carbono por parte dessas plantas. De fato, nós tentamos diversas vezes medir a capacidade fotossintética desses órgãos, sob as mais diferentes condições, e nunca obtivemos valores positivos. Dessa forma, e levando em consideração várias observações anteriores, nós sugerimos a existência de um desacoplamento de forma e função nos órgãos dessa espécie, onde as inflorescências - comparativamente muito maiores e mais expostas - são as principais

responsáveis pelas funções de fotossíntese e respiração.

De qualquer forma, é interessante notar que o *trade-off* obrigatório entre a alocação de recursos em componentes estruturais ou nos processos de fase líquida (fotossíntese), sugerido por Shipley (2006), parece ser uma tendência, ainda que as correlações não tenham sido significativas, e isso independentemente da origem do tecido, desde que a função fotossintética seja mantida. O modelo em que o autor se baseia deriva de um compromisso anterior entre o número de células ao longo da lâmina foliar e o tamanho das mesmas, além da variação na espessura das folhas. De maneira geral, isso cria uma ampla coordenação entre os parâmetros A_{mass} , LMA e N, e determina as diferenças nos custos de construção das folhas de diferentes espécies.

Quanto ao evidente distanciamento dos indivíduos de *P. minensis* das curvas observadas para as plantas não carnívoras da comunidade, podemos extrair algumas conclusões importantes. Os valores de LMA para os indivíduos de *P. minensis* foram comparativamente muito baixos (fig. 15), o que indicaria um investimento preferencial em área fotossintética, em detrimento de uma possível complexidade estrutural. Com efeito, seria de se esperar que tais estruturas apresentassem altas taxas de assimilação de carbono. Contudo, como vemos, as capacidades fotossintéticas dessa espécie são extremamente baixas (fig. 16 e 17). Dois motivos podem explicar o porquê isso é uma propriedade geral das plantas carnívoras: (1) em espécies que apresentam armadilhas adesivas, ou *sticky-trap* (como *Byblis*, *Drosera*, *Drosophyllum*, *Pinguicula*, etc.), as folhas apresentam duas funções - assimilação de carbono através da fotossíntese e captura / digestão / absorção de presa -, o que impõe necessidades diferenciais de investimentos.

De forma geral, gastos com carnivoría determinam uma diminuição nos investimentos da fase líquida e, com isso, superestimam os valores esperados para as capacidades fotossintéticas. Colocando de outra forma, se pudéssemos separar as quantidades de nitrogênio e de fósforo efetivamente alocadas no aparato fotossintético, veríamos que esses valores representam apenas uma pequena parcela dos conteúdos nutricionais que observamos em nossas análises e, possivelmente, a correlação entre essas pequenas porções e a taxas de fotossíntese observadas seriam coerentes com o espectro global de economia foliar. (2) Quanto à *Philcoxia* - assim como diversas outras espécies carnívoras - esse padrão parece derivar do fato de os órgãos fotossintéticos serem apenas soluções possíveis, ao contrário de adaptações ótimas. Com efeito, as taxas fotossintéticas são limitadas por características intrínsecas dos tecidos vegetais (como abertura estomática, concentrações enzimáticas, etc.), o que acaba determinando a posição periférica dessas espécies no espectro de economia foliar (fig. 24).

Quanto às correlações entre as capacidades fotossintéticas máximas (A_{max}) e as concentrações foliares de nutrientes (N e P), outro padrão interessante aparece. Como pudemos observar, as variações nos conteúdos de nitrogênio (fig. 18) e fósforo (fig. 19) determinaram conseqüentes variações nas taxas fotossintéticas, principalmente A_{mass} , para as espécies não carnívoras. No entanto, diferentemente de estudos anteriores, o fósforo conseguiu explicar as variações de A_{area} e A_{mass} de forma muito mais consistente do que o nitrogênio. De forma geral, isso é um indício de que as plantas da comunidade apresentam uma maior limitação por fósforo, o que é coerente com estudos anteriores para essa área (Cândido, H. G., comunicação pessoal) e com as características sugeridas

para os OCILs (Lambers et al. 2010). Novamente, as correlações entre as concentrações de nutrientes (nitrogênio e fósforo) e as capacidades fotossintéticas (A_{area} e A_{mass}) para *P. minensis* não foram significativas. No entanto, a informação mais importante dessas análises ainda pode ser obtida; as taxas fotossintéticas dos indivíduos de *P. minensis* são extremamente baixas para as concentrações nutricionais que essas plantas apresentam. De fato, quando as capacidades fotossintéticas são expressas em termos de utilização dos nutrientes - $PNUE_N$ (fig. 22) e $PNUE_P$ (fig. 23) -, os valores encontrados para *Philcoxia* foram significativamente menores que o das plantas não carnívoras da comunidade, e próximos aos valores observados em outras espécies carnívoras (Ellison, 2006. Ellison, 2005). Mais uma vez, pudemos observar o *trade-off* adicional que as plantas carnívoras precisam enfrentar, deslocando recursos para os processos de fase líquida ou para os processos de captura / absorção / digestão de presas. Dessa forma, acreditamos que o posicionamento adequado das plantas carnívoras no espectro global de economia foliar deva considerar um modelo diferente do proposto por alguns estudiosos (Wright et al. 2004; Westoby et al. 2006) e assim, considerar o compromisso originalmente descrito por Shipley (2006) com um componente adicional, que chamamos de “fase carnívora”. Com efeito, a construção das folhas em plantas carnívoras deverá ser conduzida por um *trade-off* composto por três eixos principais; (1) estrutura foliar, (2) fase líquida e (3) os investimentos em carnivoría.

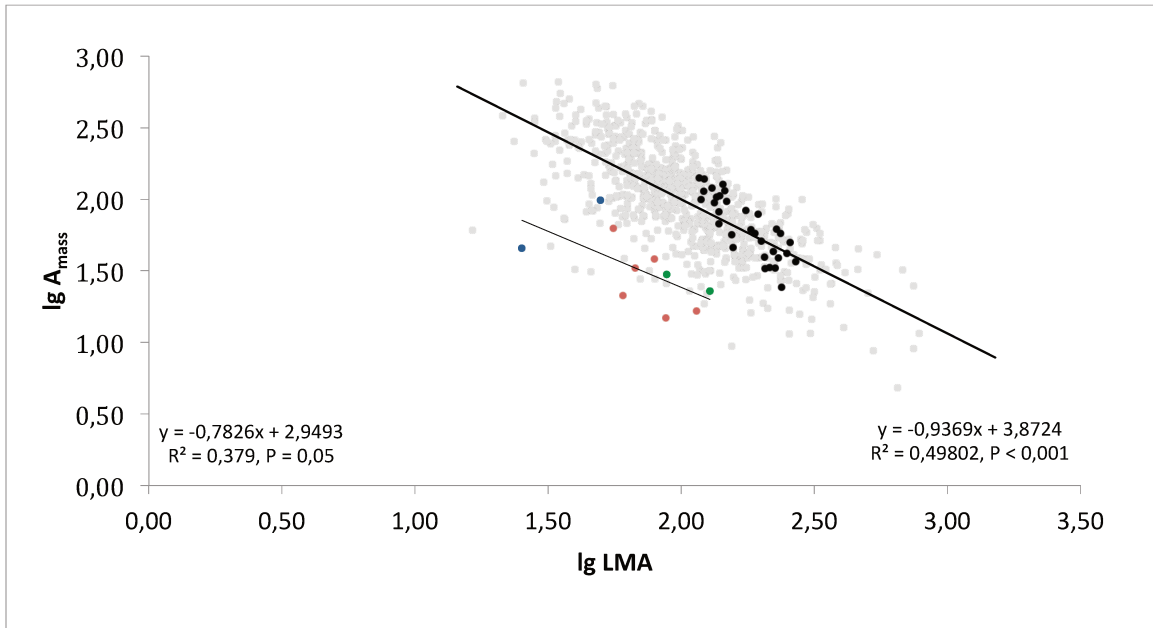


Figura 24 - Correlação entre **logA_{mass}** e **logLMA** para as espécies do Glopnet, o maior conjunto de dados publicado sobre correlações entre atributos foliares (pontos cinzas, equação da direita, linha de tendência superior), e para as espécies carnívoras (Glopnet e *P. minensis*, equação da esquerda, linha de tendência inferior, pontos vermelhos para *Philcoxia minensis*, pontos verdes para *Sarracenia* sp. e pontos azuis para *Drosera* sp.). Os pontos em preto representam as espécies não-carnívoras da comunidade em estudo.

7.7. Conclusão

Com as evidências apresentadas nesse estudo, conseguimos entender melhor de que forma as restrições impostas pela síndrome da carnivoría se expressam em termos de relações alométricas e custos de construção foliar. De maneira geral, nós observamos que o *trade-off* sugerido por Shipley (2006) não é adequado para explicar a posição das espécies carnívoras no espectro global de economia foliar proposto por Wright (2004). Devemos, dessa forma, unir o compromisso explícito indicado por Givnish (1984) para a evolução das plantas carnívoras e considerar um *trade-off* com três componentes: (1) a estrutura foliar, (2) a fase líquida e (3) os investimentos em carnivoría.

No mais, esses resultados corroboram nossa hipótese de que *P. minensis* é, de fato, carnívora, assim como posiciona essa espécie na periferia do espectro global de economia foliar, onde são encontradas as demais plantas carnívoras (notadamente, as espécies do gênero *Drosera* e *Sarracenia*). Por fim, ainda apresentamos evidências de que o ambiente onde *P. minensis* ocorre apresenta forte limitação por fósforo.

7.8. Referências

Aerts, R. & Chapin, F.S. (2000) The mineral nutrition of wild plants revisited: a re-evaluation of processes and patterns. *Advances in Ecological Research* 30, 1-67.

Donovan, L.A., Maherali, H. Caruso, C.M., Huber, H. & de Kroon, H. (2011) The evolution of the worldwide leaf economics spectrum. *Trends in Ecology and Evolution* 26, 88-95.

Dudley, S.A. (1996) Differing selection on plant physiological traits in response to environmental water availability: test of adaptive hypotheses. *Evolution* 50, 92-102.

Ellison A.M. & Farnsworth E.J. (2005) The cost of carnivory for *Darlingtonia californica* (Sarraceniaceae): evidence from relationships among leaf traits. *American Journal of Botany* 92, 1085-1093.

Ellison, A.M. (2006) Nutrient Limitation and Stoichiometry of Carnivorous Plants. *Plant Biology* 8, 740-747.

Evans, J.R. (1989) Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. *Oecologia* 78, 9-19

Farnsworth E.J. & Ellison A.M. (2008) Prey availability directly affects physiology, growth, nutrient allocation and scaling relationships among leaf traits in 10 carnivorous plant species. *Journal of Ecology* 96, 213-221.

Field, C. & Mooney, H. (1986) The photosynthesis–nitrogen relationship in wild plants *in* *On the Economy of Form and Function*. Cambridge Press, Cambridge.

Givnish, T.J., Burkhardt, E.L., Happel, R.E. & Weintraub, J.D. (1984) Carnivory in the bromeliad *Brocchinia reducta*, with a cost/benefit model for the general restriction

of carnivorous plants to sunny, moist, nutrient-poor habitats. *American Naturalist* 124, 479-497.

Koerselman, W. & Meuleman, A.F.W. (1996) The vegetation N:P ratio: a new tool to detect the nature of nutrient limitation. *Journal of Applied Ecology* 33, 1441-1450.

Lambers, H., Brundrett, M.C., Raven, J.A. & Hopper, S.D. (2010) Plant mineral nutrition in ancient landscapes: high plant species diversity on infertile soils is linked to functional diversity for nutritional strategies. *Plant and Soil* 334, 11-31.

Ordonez, J.C. van Bodegom, P.M., Witte, J.P., Bartholomeus, R.P., van Hal, J.R. & Aerts, R. (2010) Plant strategies in relation to resource supply in mesic to wet environments: does theory mirror nature? *American Naturalist* 175, 225-239.

Poorter, H., Remekes, C. & Lambers, H. (1990) Carbon and nitrogen economy of 24 wild species differing in relative growth rate. *Plant Physiology* 94, 621-627.

Reich, P.B., Walters, M.B. & Ellsworth, D.S. (1997) From tropics to tundra: global convergence in plant functioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 94, 13730-13734

Reich, P.B., Ellsworth, D.S., Walters, M.B., Vose, J.M., Gresham, C., Volin, J.C. & Bowman, W.D. (1999) Generality of leaf trait relationships: a test across six biomes. *Ecology* 80, 1955-1969.

Shipley, B., Lechowicz, M.J., Wright I. & Reich, P.B. (2006) Fundamental trade-offs generating the worldwide leaf economics spectrum. *Ecology* 87, 535-541.

Westoby, M. & Wright, I. J. (2006) Land-plant ecology on the basis of functional traits. *Trends in Ecology and Evolution* 21, 261-268.

Witkowski, E.T.F. & Lamont, B.B. (1991) Leaf specific mass confounds leaf density and thickness. *Oecologia* 88, 486-493.

Wright, I.J., Reich, P.B., Westoby, M., Ackerly, D.D., Baruch, Z., Bongers, F., Cavender-Bares, J., Chapin, T., Cornelissen, J.H.C., Diemer, M., Flexas, J., Garnier, E., Groom, P.K., Gulias, J., Hikosaka, K., Lamont, B.B., Lee, T., Lee, W., Lusk, C., Midgley, J.J., Navas, M.L., Niinemets, U., Oleksey, J., Osada, N., Poorter, H., Poot, P., Prior, L., Pyankov, V., Roumet, C., Thomas, S.C., Tjoelker, M.G., Veneklaas, E.J. & Villar, R. (2004) The worldwide leaf economics spectrum. *Nature* 428, 821-827.