



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

JÚLIA CABRAL TERESA

RESPOSTAS INDUZIDAS EM *CROTALARIA PAULINA* (Fabaceae)
FRENTE AO ATAQUE DE UM HERBÍVORO ESPECIALISTA E UM NÃO
ESPECIALISTA

CAMPINAS
2018

JÚLIA CABRAL TERESA

RESPOSTAS INDUZIDAS EM *CROTALARIA PAULINA* (Fabaceae)
FRENTE AO ATAQUE DE UM HERBÍVORO ESPECIALISTA E UM NÃO
ESPECIALISTA

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade Estadual
de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do
título de Mestra em ECOLOGIA.

Orientador: Prof. Dr. Martin Francisco Pareja Piaggio

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELA ALUNA JÚLIA CABRAL TERESA E
ORIENTADA PELO MARTIN FRANCISCO PAREJA PIAGGIO

CAMPINAS

2018

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

T272r Teresa, Júlia Cabral, 1990-
Respostas induzidas em *Crotalaria paulina* (Fabaceae) frente ao ataque de um herbívoro especialista e um não especialista / Júlia Cabral Teresa. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Martin Francisco Pareja Piaggio.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Herbívoro. I. Pareja, Martin Francisco, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Induced *Crotalaria paulina* (Fabaceae) responses to specialist and generalist herbivores

Palavras-chave em inglês:

Herbívoros

Área de concentração: Ecologia

Titulação: Mestra em Ecologia

Banca examinadora:

Martin Francisco Pareja Piaggio [Orientador]

Rodrigo Cogni

Mariana Alves Stanton

Data de defesa: 22-02-2018

Programa de Pós-Graduação: Ecologia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-3341-1936>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2818841907794013>

Campinas, 22 de fevereiro de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Martin Francisco Pareja Piaggio

Dra. Mariana Alves Stanton

Prof. Dr. Rodrigo Cogni

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Ecologia do Instituto de Biologia.

Dedicatória

A todos aqueles que
contribuíram direta ou
indiretamente para que
eu ocupasse o lugar
que estou.

AGRADECIMENTOS

Todo o espaço reservado aos agradecimentos não é suficiente para manifestar o meu sentimento de gratidão por todos aqueles que fizeram parte da minha caminhada. Acredito que a contribuição a esse trabalho não foi dada apenas por aqueles que conviveram comigo nos anos em que ele foi desenvolvido, mas também por aqueles que se fizeram (e ainda se fazem) presentes através da transformação que causaram em mim. Acredito que somos um pouco de cada pessoa que passou em nossas vidas, e, nessas linhas, vou tentar agradecer algumas pessoas que me transformaram/transformam.

Primeiramente, gostaria de agradecer a todos os funcionários da Unicamp que, apesar de serem fundamentais para o funcionamento da universidade, não são reconhecidos por isso. Um agradecimento especial à Dona Ziná, pelas conversas, pelas risadas e pelo incentivo nos dias de cansaço.

Agradeço ao professor José Roberto Trigo pela orientação e apoio. Agradeço aos colegas de laboratório pelas angústias compartilhadas e pela força. Deixo um agradecimento muito especial ao Zé, por todo trabalho e cuidado, pelo conhecimento e pelo apoio a todo mundo do laboratório.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ecologia, a todos os professores e funcionários, em especial ao professor Martin Pareja pelo apoio na fase final.

Gostaria de agradecer aos membros da pré-banca, Monica Kersch-Becker, Leonardo Ré Jorge e Carlos Henrique Zanini Martins, por terem aceito ler o meu trabalho e pelas contribuições fundamentais. Aos membros da banca, Mariana Stanton e Rodrigo Cogni, por aceitarem o convite e por todas as sugestões que enriqueceram o trabalho.

Não posso deixar de agradecer aos amigos Sheldon, Cuca e Maiona pela parceria e por serem as melhores pessoas com quem já dividi um teto. Aos amigos Karine, Kidó, Fernanda, Melô, Villa, Proveta, Lana, Lui, Privê, Bianca, Glauco e Tissu que encontrei na biologia (ou através dela) que me acompanharam e ouviram durante todo o tempo e que faço questão de ter comigo para sempre. Tenho que agradecer também à Marininha, Monique e Simone, que conheci fora da Biologia, por todas as conversas, os conselhos e as trocas enriquecedoras.

Agradeço à minha família, meu pai Alcides, minha mãe Neiva e minha irmã Sílvia por todo apoio e preocupação, por se fazerem presentes mesmo distantes. Por todo incentivo e conselhos sem os quais eu não teria conseguido. Agradecer a eles por terem, muito antes desse mestrado, me mostrado relações de respeito, empatia, bondade e outros valores para os quais não existe diploma.

Quero agradecer ainda ao Mauricio, Mauri, Mosquito, por tudo que compartilhamos, por ser meu parceiro, pelo amor e carinho que fizeram toda diferença nesse processo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Gostaria de agradecer também ao Cnpq pela bolsa concedida.

RESUMO

Herbívoros exercem pressão seletiva sobre suas plantas hospedeiras e são um fator fundamental no processo de diversificação dos compostos defensivos dessas plantas. Esses compostos são eficazes na defesa contra os herbívoros não especializados e são responsáveis por aumentar a aptidão das plantas que os produziram. Entretanto, insetos especialistas possuem a capacidade de detoxificar esses compostos e/ou sequestrá-los e utilizá-los em sua própria defesa contra predadores. Portanto, sugere-se que plantas podem responder de forma diferente de acordo com o herbívoro que está infligindo o dano. Se o ataque for por herbívoros especialistas, espera-se que plantas não invistam em um aumento de defesas químicas após o ataque. Se o ataque for por não especialistas, espera-se um aumento das defesas químicas.

Testamos a indução de compostos defensivos de *Crotalaria paulina* [alcaloides pirrolizidínicos (APs) e compostos fenólicos (CFs)] em resposta ao dano por um herbívoro especialista [*Utetheisa oratrix* (Erebidae: Arctiidae)], um herbívoro não especialista [*Spodoptera eridania* (Noctuidae)] e dano mecânico manual. As medidas foram feitas 3 dias após o dano para uma folha intacta da planta (indução sistêmica). Em relação ao controle sem dano, *Crotalaria paulina* induziu a produção de APs em resposta ao dano por *S. eridania*, mas não ao dano por *U. oratrix*, indicando uma possível resposta adaptativa da planta. A planta discrimina os agentes do ataque permitindo que ela responda apenas ao herbívoro que será afetado pelo composto. A produção de CFs não diferiu entre os tratamentos. É possível que os mecanismos de indução e ação desses compostos sejam mais gerais, ou que CFs estejam relacionados a outras funções em *C. paulina*.

Em outro experimento, avaliamos o efeito do dano pelo herbívoro especialista na indução de respostas nas novas folhas produzidas por *C. paulina*, e o efeito dessa indução no desempenho de *U. oratrix*. Folhas novas são valiosas devido à sua maior capacidade fotossintética e maior vida útil, em relação a folhas mais velhas. Portanto, proteger tecidos jovens pode conferir uma vantagem para as plantas. Plantas de *C. paulina* foram quase totalmente consumidas por *U. oratrix*, e separadas para que rebrotassem. As novas folhas produzidas foram utilizadas para análise de APs e CFs, e também para alimentar indivíduos de *U. oratrix*. As larvas foram criadas desde a eclosão do ovo até o estágio de pupa, e medimos as taxas de consumo e de crescimento e o peso de pupa. Folhas novas de plantas que haviam sido previamente danificadas apresentaram maiores concentrações de APs e CFs que folhas controle, e os indivíduos alimentados com essas folhas apresentaram menores taxas de consumo e crescimento e maior tempo de desenvolvimento. O peso das pupas não diferiu entre os grupos.

Concluimos que a indução de compostos químicos em *C. paulina* pode ter evoluído em resposta ao ataque de insetos herbívoros. A intensidade de indução está relacionada ao tipo de herbívoro responsável pelo dano, sendo maior para o herbívoro não especialista. Além disso, a indução de respostas pode ocorrer nas próximas folhas produzidas após o dano, garantindo à planta uma proteção em maior escala temporal.

Palavras-chave: herbivoria, repostas induzidas, alcaloides pirrolizidínicos, compostos fenólicos.

ABSTRACT

Herbivores are an important selective pressure on their host plants and play a major role in the diversification process of plant defensive compounds. These compounds are effective against non-specialized herbivores and are responsible for increasing plant fitness. However, specialist insects have the ability to detoxify these compounds and/or sequester them and use them in their own defense against predators. Thus, plants may respond differently according to the herbivore that is inflicting damage, optimizing their defenses. When damaged by specialist herbivores, plants may invest in an increase in chemical defenses after the attack. However, if the damage was inflicted by non-specialists herbivores, an increase in chemical defenses is expected.

We tested the induction of defensive compounds in *Crotalaria paulina* [pyrrolizidine alkaloids (APs) and phenolic compounds (CFs) in response to damage by a specialist herbivore, the moth *Utetheisa ornatrix* (Erebidae: Arctiidae) and a non-specialist herbivore, the moth *Spodoptera eridania* (Noctuidae). We made the measures 3 days after damage, using a non-damaged plant leaf (systemic induction). *Crotalaria paulina* induced APs production in response to *S. eridania* damage, but not in response to damage by *U. ornatrix*, indicating a possible plant adaptive response. The plant discriminates the agents of attack, and can induce a response only to the herbivore that will be affected by the compound. The production of CFs did not differ between treatments, and we believe that the mechanisms of induction of these compounds are more general, or that CFs are related other functions in *C. paulina*.

In a second experiment, we evaluated the effect of damage by the herbivore specialist on the induction of responses in new leaves produced by *C. paulina*, and the effect of this induction on the performance of *U. ornatrix*. Young leaves are valuable because of their photosynthetic capacity and longer lifespan compared to older leaves. Therefore, protecting young tissues can confer an advantage to plants. *C. paulina* plants were almost totally consumed by *U. ornatrix*, and then separated to regrow. The new leaves produced were used for APs and CFs analysis, and also to feed *U. ornatrix* larvae. The larvae were raised from egg hatching to the pupa stage, and we measured consumption and growth rates. New leaves of previously damaged plants had higher concentrations of APs and CFs than control leaves, and individuals fed with those leaves had lower consumption and growth rates compared to control. Pupal weight did not differ between treatment and control.

We conclude, therefore, that induction of chemical compounds in *C. paulina* may have evolved in response to the attack of herbivorous insects. The intensity of induction is related to the type of herbivore responsible for the damage, and are higher for the non- specialist herbivore. Furthermore, induction of responses can occur in the leaves produced after damage, and confers to the plant a protection in a greater temporal scale.

Key-words: herbivory, induced responses, pyrrolizidine alkaloids, phenolic compounds.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Sistema planta-inseto estudado: (A) *Crotalaria paulina*, (B) fêmea de *Utetheisa ornatix* depositando ovos em flores de *Crotalaria ochroleuca* (fonte: Martins (2016)) e (C) larva de *Utetheisa ornatix* em folha de *Crotalaria ochroleuca* (fonte: Martins (2016)). 22
- Figura 2. Esquema do desenho experimental para testar a indução de respostas por herbivoria: (A) tratamento com herbívoro especialista, (B) tratamento com herbívoro não especialista, (C) tratamento com dano mecânico manual. (D) controle com a “clip-cage” 25
- Figura 3. *Crotalaria paulina* com “clip-cages” acopladas às folhas. 27
- Figura 4. Concentração sistêmica de alcaloides pirrolizidínicos em folhas de *Crotalaria paulina* após dano, em diferentes tempos, pelo herbívoro especialista *Utetheisa ornatix*, o herbívoro não especialista *Spodoptera eridania* e controle sem danos. 39
- Figura 5. Concentração sistêmica de compostos fenólicos em folhas de *Crotalaria paulina* após dano, em diferentes tempos, pelo herbívoro especialista *Utetheisa ornatix*, o herbívoro não especialista *Spodoptera eridania* e controle sem danos. 30
- Figura 6. Concentração de alcaloides pirrolizidínicos em *Crotalaria paulina* três dias após o dano pelos herbívoros especialista e não especialista, dano mecânico e controle sem dano. Letras diferentes representam diferenças significativas de 5% (Fisher’sLSD). 32
- Figura 7. Concentração de compostos fenólicos em *Crotalaria paulina* três dias após o dano pelos herbívoros especialista e não especialista, dano mecânico e controle sem dano. 33

Figura 8. Esquema do sistema utilizado para a obtenção dos tratamentos para o experimento de desempenho de <i>Utetheisa ornatix</i> .	40
Figura 9. (A) Concentração de alcaloides pirrolizidínicos e (B) de compostos fenólicos em folhas dos grupos controle e rebrota.	42
Figura 10. Área foliar consumida (mg) por larvas de <i>Utetheisa ornatix</i> ao longo de 12 dias nos tratamentos controle e rebrota.	43
Figura 11. Desempenho de larvas <i>Utetheisa ornatix</i> nos tratamentos controle e rebrota. Sobrevivência das larvas (A). Massa das larvas (B). Tempo de desenvolvimento até o estágio de pupa (C). Massa da pupa (D).	44

Sumário

AGRADECIMENTOS	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
INTRODUÇÃO GERAL	12
CAPÍTULO 1. Respostas induzidas de <i>Crotalaria paulina</i> (Fabaceae) frente ao ataque de um inseto herbívoro especialista e um não especialista.	17
INTRODUÇÃO	17
MATERIAIS E MÉTODOS	20
Organismos estudados.	20
Criação dos herbívoros.	22
Indução de respostas por herbivoria em folhas.	23
Análises químicas.	27
Análises estatísticas.	28
RESULTADOS	28
Indução de respostas químicas por herbivoria.	28
DISCUSSÃO	33
CAPÍTULO 2. Como o dano por herbivoria afeta a indução de respostas nas folhas novas, e o efeito dessa indução no desempenho de <i>Utetheisa ornatrix</i> .	37
INTRODUÇÃO	37
MATERIAIS E MÉTODOS	39
Criação dos herbívoros.	39
Plantio de <i>Crotalaria paulina</i> .	39
Análises químicas.	40
Desempenho de <i>Utetheisa ornatrix</i> .	40
Análises Estatísticas.	41
RESULTADOS	41
Análises químicas.	41

Desempenho de <i>Utetheisa ornatix</i> .	42
DISCUSSÃO	44
CONCLUSÕES GERAIS	48
LITERATURA CITADA	49
ANEXO 1: Declaração referente à Bioética e Biossegurança	60
ANEXO 2: Declaração referente aos direitos autorais	61

INTRODUÇÃO GERAL

Os herbívoros são considerados uma importante força seletiva na evolução e diversificação das plantas (Becerra 1997, Schoonhoven et al. 2005). Considerando que as plantas competem por recursos limitantes e os herbívoros diminuem a capacidade competitiva dos indivíduos atacados, a herbivoria é um fator fundamental no estudo das dinâmicas de populações e comunidades de plantas (Brown & Allen 1989, Augner et al. 1991, Fine et al. 2004). Em florestas tropicais, a perda de biomassa por herbivoria é bem acentuada, e uma árvore pode ter até 92% das suas folhas danificadas (Coley & Barone 1996, Smith & Nufio 2004). A perda da área foliar compromete a capacidade fotossintética, impede o estabelecimento de plântulas, dificulta a aquisição de nutrientes e pode aumentar a mortalidade até mesmo entre indivíduos adultos (Louda & Potvin 1995, Warner & Cushman 2002, Zangerl et al. 2002, Nabity et al. 2009, Gormley et al. 2012). Um estudo recente avaliou as causas da mortalidade em espécies tropicais de árvores, e os resultados indicaram que o ataque por herbívoros foi o fator com maior impacto na mortalidade dos indivíduos (Holland et al. 2016). A perda de área foliar pode trazer ainda consequências para a atividade reprodutiva das plantas, como diminuição na produção de flores e sementes, aumento na inviabilidade de sementes, alteração de características morfológicas florais e menor atração de polinizadores (Marquis 1984, Strauss et al. 1996, Mothershead & Marquis 2000).

Tendo em vista que plantas são massivamente atacadas por herbívoros, e que esses ataques têm influência direta na sua aptidão, as plantas desenvolveram, ao longo do tempo evolutivo, mecanismos de defesas responsáveis por diminuir o consumo dos herbívoros e minimizar a perda de tecidos vegetais. Entre os mecanismos de defesas já estudados, encontra-se a produção de compostos químicos secundários, que, por serem tóxicos ou inibidores de alimentação para grande parte dos herbívoros, atuam como compostos defensivos (Karban & Myers 1989, Alves et al. 2007, Trigo 2011). Esses compostos caracterizam-se por alterar a qualidade nutricional dos tecidos, interferindo diretamente no comportamento alimentar do herbívoro. Uma variedade de classes de compostos secundários já foi descrita, como os alcaloides, glicosídeos cianogênicos, glicosinolatos, compostos fenólicos e terpenoides (Karban & Baldwin 1997, Bennett & Wallsgrove 1994). Seus

efeitos nos herbívoros incluem redução da sobrevivência, da taxa de crescimento, da fecundidade e da preferência do herbívoro por determinada planta para alimentação e deposição de ovos (Havill & Raffa 1999, Bandoly et al. 2016, Biere et al. 2016, Cogni & Trigo 2016).

Sabendo que plantas contam com um conjunto limitado de recursos para serem alocados entre todas as suas atividades metabólicas, como crescimento e reprodução, por exemplo, possuir compostos químicos de defesa representa um custo para a planta (Karban & Baldwin 1997, Howe & Schaller 2008). Fine et al. (2006) encontraram uma correlação negativa entre taxa de crescimento e um índice que mediu a quantidade de defesas das plantas, apontando para uma demanda conflitante na alocação de recursos para crescimento e defesa. Esses autores encontraram um efeito indireto, onde as espécies de plantas que apresentaram o crescimento mais rápido foram mais atacadas por herbívoros, em comparação às plantas de crescimento mais lento, sugerindo que as plantas de crescimento rápido fossem menos defendidas (Fine et al. 2006). Além dos recursos gastos na biossíntese dos compostos, existe para a planta o custo de armazenamento de compostos de alta toxicidade e custos ecológicos associados à sua acumulação (Bergelson & Purrington 1996, Strauss et al. 1999, Purrington 2000). Em um estudo com *Brassica rapa* (Brassicaceae), os pesquisadores evidenciaram que plantas de uma população artificialmente selecionada para conter altos níveis da enzima mirosinase¹ foram menos visitadas por polinizadores que as plantas da população com menores concentrações da enzima.

Essa alteração nas visitas representa um custo ecológico para as plantas, uma vez que pode acarretar em menor transferência e deposição de pólen e diminuir o potencial reprodutivo dos indivíduos (Strauss et al. 1999).

A redução dos custos de possuir defesas constitutivas (defesas que estão sempre presentes na planta, independente da presença do herbívoro) pode ser obtida através da estratégia de indução de defesas (produção de defesas apenas após um estímulo inicial que indique a presença do herbívoro). Plantas atacadas por

¹ Mirosinases são uma classe de enzimas que decompõe glicosinolatos em glucosinóis e isotiocianatos. Os glicosinolatos e as mirosinases são estocados em diferentes células do tecido vegetal. Quando a planta é atacada por herbívoros a mirosinase catalisa a hidrólise dos glicosinolatos, liberando isotiocianatos, nitrilas e tiocianatos, os quais são tóxicos para insetos herbívoros (Winde & Wittstock 2011).

herbívoros podem induzir mudanças na sua composição química (Baldwin & Schultz 1983, Hartley & Lawton 1987, Tschardtke et al. 2001), que as tornam menos susceptíveis a ataques subsequentes (Risch 1985, Dolch & Tschardtke 2000). Plantas de tabaco apresentaram aumento na concentração de metabólitos secundários em até quatro vezes, quando danificados tanto nas folhas por herbívoros mastigadores, quanto nas raízes por nematódeos, em comparação a plantas intactas (Kaplan et al. 2008). As respostas químicas induzidas por herbivoria envolvem aumento nas concentrações de compostos relacionados diretamente com a digestibilidade do tecido, como taninos, alcaloides e compostos fenólicos (Risch 1985, Hartley & Lawton 1987, Tschardtke et al. 2001, Babst et al. 2009). Insetos alimentados com plantas danificadas tiveram o seu desempenho negativamente afetado, quando comparados a insetos alimentados com plantas não danificadas (Haukioja & Hanhimäki 1985, Alves et al. 2007).

Muitos herbívoros são capazes de discriminar entre alimentos com qualidades nutricionais diferentes. Estudos demonstraram que folhas não danificadas são preferidas pelos insetos para alimentação e até mesmo para a deposição de ovos (Karban & Carey 1984, Hartley & Lawton 1987, Bruin et al. 1992).

Após a indução da resposta, na ausência do estímulo, as plantas podem reduzir os níveis dos compostos de defesa, e retornar suas concentrações para os valores em que se encontravam antes do dano, relaxando as respostas induzidas (Baldwin & Schultz 1983, Tschardtke et al. 2001, Mathur et al. 2011). Dessa forma, ao induzir respostas apenas após um estímulo inicial e relaxá-las quando esse estímulo não está presente, as plantas são beneficiadas por pouparem o gasto energético de produzir defesas quando os herbívoros estão ausentes. Utilizar o dano causado por herbivoria como pista para a indução de respostas permite ainda que haja um aumento na variabilidade das defesas. Ajustes mais finos da interação das plantas e seus herbívoros garantem respostas mais eficientes para diferentes grupos de herbívoros, tipos de dano e intensidades de ataque (Hartley & Lawton 1987, Karban et al. 1997, Tschardtke et al. 2001). Kaplan et al. (2008) mostraram que a magnitude da resposta induzida por herbívoros não especialistas em plantas de tabaco foi sempre maior que a resposta induzida pelos especialistas. Outros estudos investigaram as mudanças produzidas por plantas atacadas por herbívoros com diferentes mecanismos de dano, como mastigadores e sugadores, e encontraram uma especificidade de resposta pela planta (Hartley & Lawton 1987, Erbilgin &

Colgan 2012).

Karban & Myers (1989) revisaram as definições envolvendo respostas induzidas. Se o estresse ou o dano causado pelo herbívoro afetar a qualidade da planta, e essa modificação afeta a aptidão do herbívoro ou da planta, essa alteração é considerada uma resposta induzida. Se essa resposta induzida reduzir a preferência e afetar negativamente a aptidão do herbívoro, considera-se uma resistência induzida. Somente será uma defesa induzida quando a diminuição da preferência e do desempenho do herbívoro aumentar a aptidão da planta.

As mudanças induzidas pela planta após o dano podem afetar de forma diferente a comunidade de herbívoros. Entre as espécies de insetos herbívoros, há uma variação no grau de especialização de dieta, que está relacionado com a capacidade de cada espécie em lidar com os compostos produzidos pelas plantas (Karban & Baldwin 1997). Insetos especialistas possuem menor amplitude de dieta e uma relação mais estreita com suas plantas hospedeiras. Esses herbívoros são capazes de detoxificar e/ou sequestrar os compostos defensivos das plantas das quais se alimentam, e, por isso, são menos afetados por esses compostos (Ali & Agrawal 2012). Herbívoros especialistas que sequestram compostos de suas plantas hospedeiras podem utilizá-los em sua própria defesa contra predadores, por isso plantas com altos níveis de defesa beneficiariam esses insetos. Insetos não especialistas não desenvolveram a capacidade de metabolizar esses compostos, e, portanto, são mais afetados pelas defesas das plantas (Ali & Agrawal 2012). Os efeitos que os compostos defensivos das plantas têm nos herbívoros com diferentes graus de especialização de dieta pode influenciar a preferência desses herbívoros. Herbívoros não especialistas preferem se alimentar em plantas com baixos níveis de compostos defensivos, enquanto herbívoros especialistas podem preferir se alimentar em plantas com altos níveis de defesa ou não apresentar preferência alguma (Ali & Agrawal 2012, Hoina et al. 2012, Volf et al. 2015). Dessa forma, acredita-se que o padrão de respostas induzidas nas plantas foi moldado pela preferência e pelo efeito que essas respostas têm nos herbívoros da comunidade local (Lankau 2007, Kaplan et al. 2008, Mooney et al. 2009).

Neste trabalho, abordamos a indução de respostas químicas em plantas e seus efeitos no desempenho dos herbívoros. No primeiro capítulo, investigamos a produção de compostos de defesa em folhas da leguminosa *Crotalaria paulina* (Fabaceae) consumidas por um herbívoro especialista, um não especialista e de da

no manual. Procuramos encontrar possíveis variações na estratégia de indução de *C. paulina* em relação ao tipo de herbívoro e classe de composto produzido. No segundo capítulo, avaliamos a indução de respostas em folhas novas de *C. paulina*, produzidas após o dano pelo herbívoro especialista *Utetheisa ornatix* (Erebidae:Arctiinae). Posteriormente, avaliamos o efeito da resposta induzida no desempenho de larvas de *U.ornatrix*, quando alimentadas com folhas novas de plantas previamente danificadas e não danificadas.

CAPÍTULO 1. Respostas induzidas de *Crotalaria paulina* (Fabaceae) frente ao ataque de um inseto herbívoro especialista e um não especialista.

INTRODUÇÃO

Entre os possíveis fatores que favoreceram a evolução das defesas induzidas por herbivoria está a imprevisibilidade do ambiente, que pode se relacionar tanto com o tempo de ataque quanto à natureza do estímulo sofrido (Karban et al. 1997, Agrawal & Karban 1999). Plantas são atacadas por uma comunidade heterogênea de herbívoros, que as utilizam como recurso de forma distinta. A capacidade das plantas em induzir respostas que suprimam cada ataque da forma mais eficiente representa uma vantagem em ambientes em que a chance de ataque por herbívoros é tão imprevisível. Sugere-se que plantas respondem de forma diferente ao tipo de dano sofrido: danos por insetos especialistas², dano por insetos não especialistas e dano mecânico (Hartley & Lawton 1987, Van Zandt & Agrawal 2004, Mooney et al. 2009). Por exemplo, o desfolhamento manual, um dano mecânico, é caracterizado por induzir menos resistência que o dano por herbivoria (Haukioja & Neuvonen 1985, Howe & Schaller 2008). Acredita-se que uma resposta com uma maior intensidade é requerida frente ao ataque de insetos, em comparação à resposta necessária apenas para reparar danos mecânicos quaisquer, como por exemplo aqueles causados por ventos ou passagens de animais (Hartley & Lawton 1987). Pode haver ainda uma variação no tempo de resposta das plantas em relação ao tipo de dano, e essa variação determina como

² Usamos o termo não especialista ao invés de generalista, porque podemos ter um inseto generalista (polífago no senso de Bernays & Chapman 1994) especializado em compostos químicos produzidos por plantas (p.e. as mariposas arctíneas dos gêneros *Estigmene* e *Grammia* são polípagas, mas especializadas em alcaloides pirrolizidínicos, Hartmann et al. 2004). Da mesma forma, podemos ter um inseto especialista em um grupo de plantas que contém uma dada classe de compostos (monófago no senso de Bernays & Chapman 1984), mas esse inseto não é especializado em compostos de outras plantas hospedeiras (ver p.e. Blau et al. 1978).

os herbívoros serão afetados (Karban & Myers 1989, Mathur et al. 2011). Diferentes herbívoros podem provocar taxas de indução e relaxamento diferentes (Hartley & Lawton 1987, Tschardt et al. 2001).

Como o dano por herbivoria diminui a aptidão da planta, espera-se que a seleção natural favoreça plantas que contenham altos níveis de defesa. Entretanto, as populações de plantas existem em comunidades complexas e podem estar sob pressões de seleção conflitantes exercidas por múltiplas espécies que interagem (Lankau 2007, Moreira et al. 2015). Diante do fato que os insetos apresentam preferências diferentes em relação aos compostos químicos presentes nas plantas (Hoina et al. 2012, Volf et al. 2015), é possível supor que as respostas induzidas pelas plantas se relacionem com as preferências desses herbívoros. Insetos polívoros não especialistas, por exemplo, são mais comumente afetados por mudanças que alteram a toxicidade dos tecidos foliares (Hartley & Lawton 1987). Para insetos especialistas, sejam eles monófagos, oligófagos ou polívoros, há uma forte relação evolutiva inseto-planta hospedeira, e a produção de metabólitos especializados (= metabólitos secundários, ver Pichersky & Lewinsohn 2011) não representa uma defesa tão eficaz quanto para insetos não especialistas, que, ao contrário dos especialistas, não desenvolveram mecanismos para superar essa barreira química (Risch 1985). Os compostos defensivos da planta que agem como deterrentes ou inibidores de alimentação para alguns insetos podem atuar como estimulantes de deposição de ovos e estimulantes de alimentação em insetos especialistas; esses últimos evoluíram vias para sequestrar esses compostos e utilizá-los para proteção química em diferentes estágios de seu ciclo de vida (Sime et al. 2000, Ferro et al. 2006).

O dano por herbívoros não especialistas pode levar a um aumento nos níveis dos compostos defensivos, o que aumentaria a efetividade da defesa das plantas durante o ataque (Karban & Baldwin 1997). Entretanto, alguns herbívoros evoluíram a capacidade de sequestrar esses compostos, que muitas vezes conferem maior sobrevivência e sucesso reprodutivo para os insetos que os sequestram (Brown 1984, Eisner & Meinwald 1995). Em um estudo com a mariposa erebídea *Utetheisa ornatrix*, que sequestra alcaloides pirrolizidínicos (APs) de suas plantas hospedeiras, os indivíduos mostraram preferência por dietas que continham maiores concentrações desses compostos ou não apresentaram

preferência alguma (Hoina et al. 2012). Sendo assim, não aumentar os níveis de defesa após o dano por herbívoros especialistas pode ser uma estratégia evolutiva em algumas espécies de plantas. Plantas atacadas por especialistas podem até mesmo diminuir a produção de compostos de defesa e alocar mais energia para o crescimento (Arab & Trigo 2011). Lankau (2007) encontrou que a produção de glicosinolatos em *Brassica nigra* diminuiu na presença do herbívoro especialista *Brevycorine brassica* e aumentou na presença do não especialista *Agriliomax reticulates*. Por meio desse estudo, Lankau (2007) sugere que os herbívoros especialistas e não especialistas têm impactos diferentes e geram respostas distintas no contexto das defesas químicas em plantas.

A produção de compostos defensivos pode ainda ser influenciada pela ontogenia da planta (Ohnmeiss & Baldwin 2000, Van Dam et al. 2001, Ishida et al. 2005, Hanley et al. 2007). Plantas muito novas ou plantas em estado reprodutivo podem apresentar pouca inducibilidade em decorrência de suas demandas conflitantes. Plantas jovens alocam grande parte dos seus recursos para o crescimento, podendo investir menos em defesas (Boege & Marquis 2005, Ishida et al. 2005). Plantas muito novas apresentam menor capacidade de aquisição de recursos e menos estruturas para armazenamento de compostos químicos que plantas maduras, o que influencia a capacidade de defesa de indivíduos nesse estágio de desenvolvimento (Hanley et al. 2007). Ishida et al. (2005) sugeriram que ao longo do desenvolvimento de uma planta, o período de transição entre o estágio de plântula e o estágio adulto seja marcado pela alteração na prioridade de investimento de recursos, de atividade fotossintética para defesa. À medida que as plantas se desenvolvem, as taxas de crescimento e atividade metabólica diminuem, entretanto surgem novas demandas que podem desviar os investimentos em defesa. Plantas adultas investem muitos recursos para reprodução, e durante a época reprodutiva, possuem um alto gasto energético com a produção de flores e frutos (Boege & Marquis 2005, Hanley et al. 2007). Portanto, plantas em estágios intermediários de desenvolvimento podem representar um modelo mais seguro para avaliar a indução de respostas, pois os fatores de confusão são minimizados.

Crotalaria paulina é uma espécie nativa dos Neotrópicos e é atacada pelo herbívoro especialista nativo, a mariposa *Utheteisa ornatrix* (Martins et al. 2015, Magalhães et al. 2017). A espécie é caracterizada por conter altas concentrações de APs tanto em folhas quanto em sementes (Martins et al. 2015, Magalhães et al.

2017). Esses compostos foram selecionados ao longo do tempo evolutivo provavelmente em resposta à herbivoria e a outros inimigos naturais, e têm como efeito a diminuição da digestibilidade dos tecidos e toxicidade para insetos herbívoros (Macel 2011, Trigo 2011, Cogni & Trigo 2016). Algumas espécies do gênero *Crotalaria* possuem também compostos fenólicos (CFs) (Mun'im et al. 2003, Uraguchi et al. 2006). Ao contrário dos APs, os CFs representam uma defesa química eficaz tanto contra não especialistas quanto contra especialistas (p.e. Govind et al. 2010), portanto um incremento nos níveis desses compostos após o ataque pode amplificar a capacidade de defesa das plantas contra ambos os herbívoros.

Como é nativa *C. paulina* está coadaptada ao herbívoro especialista. Indivíduos de *U. ornatrix* foram encontrados se alimentando tanto em folhas quanto em vagens de *C. paulina* (Magalhães et al. 2017). Além disso, ao contrário de algumas espécies de *Crotalaria*, *C. paulina* não possui nectários extraflorais. A presença de nectários extraflorais é considerada uma estratégia de defesa das plantas por atrair predadores dos seus herbívoros, e sua produção pode ser induzida em resposta ao dano (Heil & Bueno 2007a), podendo representar um fator de confusão em experimentos de indução.

Neste capítulo, avaliamos a indução diferencial de respostas químicas por *C. paulina* após o dano por dano manual, e por um herbívoro especialista e um não especialista. Espera-se que o dano por herbívoro especialista não aumente as concentrações de APs, porém espera-se que os CFs sejam induzidos. Para um herbívoro não especialista, espera-se uma resposta indutiva em ambas categorias de compostos. Em plantas danificadas artificialmente espera-se que não haja respostas indutivas significativa em ambos os compostos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Organismos estudados. *Crotalaria* (Fabaceae: Papilionoideae: Crotalarieae) é um gênero Pantropical composto por aproximadamente 720 espécies, sendo a maioria de origem africana e asiática (le Roux et al. 2013). No Brasil, ocorrem cerca de 31 espécies nativas e 11 introduzidas (Flores 2004). Esse gênero de plantas é caracterizado por conter APs, que atuam na defesa contra herbívoros não

especialistas, devido à sua capacidade tóxica e deterrente (Aerts et al. 1994, Macel 2011, Trigo 2011, Cogni & Trigo 2016). Algumas espécies do gênero *Crotalaria* possuem ainda compostos fenólicos (Mun'im et al. 2003, Uraguchi et al. 2006), mas sua atividade em relação a herbívoros ainda é desconhecida.

Utetheisa ornatix (Erebidae: Arctiinae) é uma mariposa Neotropical, cujas larvas se alimentam somente em folhas e sementes verdes de plantas do gênero *Crotalaria* e especializada em APs (Eisner & Meinwald 1995, Trigo 2011, Martins et al. 2015, Magalhães et al. 2017) (Figura1). Entre as espécies de *Crotalaria* que foram observadas como planta hospedeira de *U. ornatix* estão: *C. balansae*, *C. breviflora*, *C. incana*, *C. juncea*, *C. micans*, *C. ochroleuca*, *C. paulina*, *C. pallida* (antiga *C. mucronata*), *Crotalaria pumila*, *C. rotundifolia*, *C. spectabilis*, *C. trichotomae* *C. vitelina* (Eisner and Meinwald 1995, Ferro et al. 2006, Cogni 2010, Martins et al. 2015, Sourakov 2015, Magalhães et al. 2017, JR Trigo com.pess.). Os indivíduos de *U. ornatix* são quimicamente defendidos pelos alcaloides que sequestram dessas plantas (Eisner and Meinwald 1995, Ferro et al. 2006, Trigo 2011, Martins et al.2015).

O gênero *Spodoptera* apresenta distribuição tropical e subtropical, ocorrendo da América do Sul à América do Norte (Pogue 2002). É composto por cerca de 30 espécies que possuem grande importância agrícola, por serem consideradas pragas devido ao seu amplo espectro de alimentação (Pogue 2002). *Spodoptera eridania* é uma espécie com alto grau de polifagia, com registros indicando a utilização de plantas hospedeiras pertencentes a 58 famílias diferentes, incluindo espécies do gênero *Crotalaria* (Montezano et al. 2014).

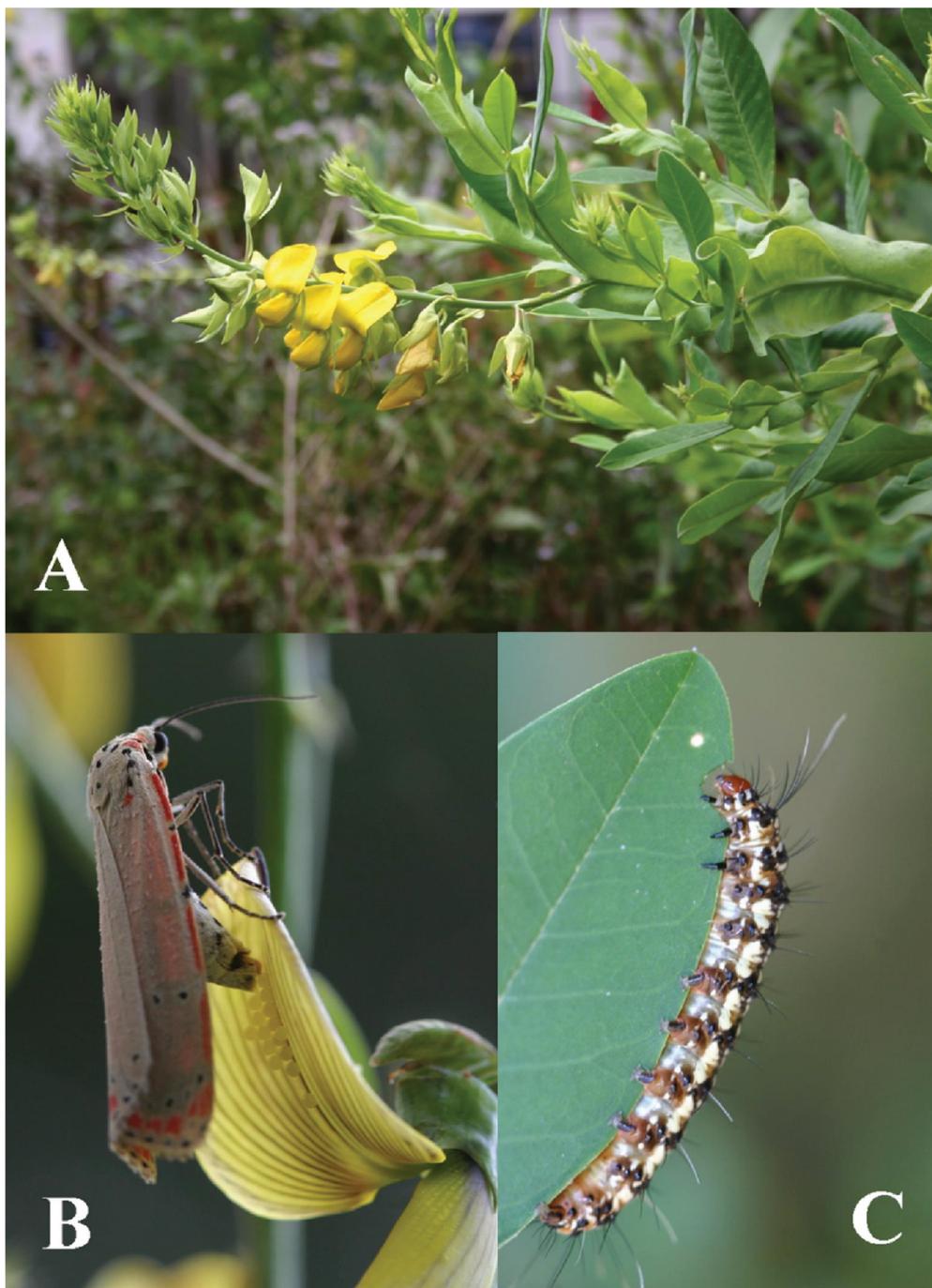


Figura 1. Sistema planta-inseto estudado: (A) *Crotalaria paulina*, (B) fêmea de *Utetheisa ornatrix* depositando ovos em flores de *Crotalaria ochroleuca* (fonte: Martins (2016)) e (C) larva de *Utetheisa ornatrix* em folha de *Crotalaria ochroleuca* (fonte: Martins (2016)).

Criação dos herbívoros. A criação dos herbívoros foi mantida no Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual

de Campinas. Ovos de *U. ornatix* foram coletados no campo, na região de Campinas e mantidos em câmara de criação a 27°C, com luminosidade controlada 12 horas claro:12 horas escuro. Após a eclosão, as larvas foram alimentadas com folhas de indivíduos de *Crotalaria paulina* cultivados em casa de vegetação. As larvas foram inicialmente criadas em potes cilíndricos de plástico de 500mL (7,9 cm de altura e 11,9 cm de diâmetro) sem contagem do número de indivíduos. Ao atingirem o terceiro instar, foram transferidas para potes cilíndricos de aproximadamente 4,5L (18 cm de diâmetro, 18 cm de altura) em grupos de até 30 indivíduos, e foram mantidas em câmara de criação nas mesmas condições de temperatura e luminosidade dos ovos. As folhas foram trocadas diariamente e as fezes retiradas para higienização. As larvas não utilizadas no experimento foram criadas até o estágio de pupa. As pupas foram mantidas nas mesmas condições acima. Após emergirem, os adultos foram usados para manutenção da criação como descrito em Cogni(2010).

Os indivíduos de *S. eridania* foram obtidos a partir de ovos coletados na região de Campinas. A criação das larvas seguiu o mesmo procedimento de separação em grupos adotado para *U. ornatix*. As larvas foram alimentadas em folhas de mamona, *Ricinus communis* (Euphorbiaceae), coletadas no campus da Universidade Estadual de Campinas. As larvas não utilizadas para o experimento foram criadas até o estágio de pupa. As pupas foram mantidas nas mesmas condições acima. Após emergirem, os adultos foram usados para manutenção da criação como descrito em Cogni (2010) para *U. ornatix*.

Indução de respostas por herbivoria em folhas. Os indivíduos de *C. paulina* foram obtidos a partir de sementes coletadas de plantas em uma área perto do Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP (22°54'20''S, 47°03'39''W). As sementes foram plantadas em uma mistura de terra vermelha coletada na área acima descrita e terra vegetal, em vasos cilíndricos de plástico (25 cm de diâmetro, 25 cm de altura) e mantidas em casa de vegetação, na mesma área, sem controle de temperatura e luminosidade. As plantas foram molhadas diariamente e conferidas quanto à ocorrência de dano. As plantas que apresentaram qualquer dano físico foram descartadas. Foram separadas para os experimentos de indução de herbivoria em folhas as plantas que apresentavam ao menos 10 folhas completamente expandidas e nunca mais que 14 folhas. Nesse estágio de

desenvolvimento, as folhas possuem tamanhos suficientes para fixar “clip-cage” e as plantas possuem uma altura de aproximadamente 35cm, e não ultrapassam o limite superior do recipiente de vidro em que foram colocadas para a realização dos experimentos. As larvas de terceiro instar de *U. ornatrix* e *S. eridania* criadas em potes plásticos foram acompanhadas diariamente até realizarem a ecdise para o quarto instar, quando foram separadas e usadas no experimento de indução de respostas por herbivoria em folhas.

As plantas foram submetidas a quatro tratamentos: (1) controle, (2) folha danificada por larvas do quarto instar do herbívoro especialista *U. ornatrix* e (3) folha danificada por larvas do quarto instar do herbívoro não especialista *S. eridania* e (4) dano mecânico manual. As plantas foram colocadas dentro de recipientes cilíndricos de vidro (40 cm de altura, 14 cm de diâmetro) apenas com a extremidade superior aberta (Figura 2). Esse sistema reduz a possibilidade de que qualquer possível volátil emitido pelas plantas seja liberado sem entrarem contato com as outras plantas dos tratamentos, e evita possíveis alterações químicas induzidas por esses voláteis. As plantas foram aclimatadas nestes vidros em sala de criação a 27°C, com luminosidade controlada 12 horas claro:12 horas escuro por cinco dias antes do início dos experimentos. Esse procedimento pode evitar possíveis interferências na sua composição química devido à mudança de ambiente. Os tratamentos foram aplicados na quinta folha a partir do meristema apical.

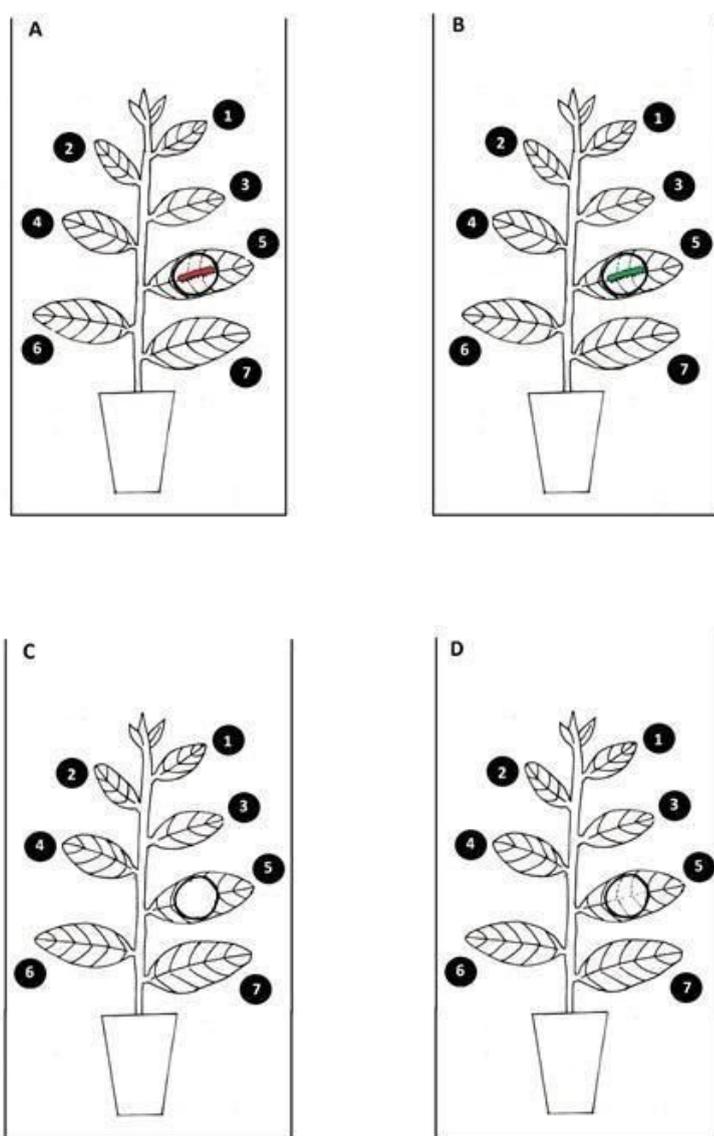


Figura 2. Esquema do desenho experimental para testar a indução de respostas por herbivoria: (A) tratamento com herbívoro especialista, (B) tratamento com herbívoro não especialista, (C) tratamento com dano mecânico manual. (D) controle com a “clip-cage”.

Nos tratamentos com o herbívoro especialista e o não especialista, as larvas de quarto instar de *U. ornatrix* ou *S. eridania* foram colocadas em uma “clip cage” (Bioquip®) (Figura 3). A “clip cage” de 2,5 cm de diâmetro permite que os insetos se alimentem apenas em uma área de 4,9cm². Esse confinamento, além de padronizar a área foliar consumida, evita que as larvas percorram livremente as plantas e apresentem um padrão de alimentação disperso (Weisser & Siemann 2008). Para o tratamento de dano manual, a “clip cage” sem o herbívoro foi colocada na quinta

folha da planta e, utilizando um perfurador, foi removido o mesmo diâmetro da “clip cage”. Esse procedimento assegura que a área foliar retirada nesse tratamento seja a mesma consumida nos tratamentos que utilizam as larvas. Nas plantas do controle, foi colocada uma “clip cage” sem o herbívoro na quinta folha.

Vinte e quatro horas após o início do experimento, isto é, após a “clip cage” ser colocada na folha, a mesma era retirada nos tratamentos 3 e 4, e retirada juntamente com os herbívoros nos tratamentos 1 e 2. Nos tratamentos 1 e 2, as plantas que, após 24 horas, não tiveram toda a área da “clip-cage” consumida pelo herbívoro não foram consideradas.

Em um experimento preliminar, com 18 plantas, sendo seis para cada tratamento, definimos o melhor intervalo de tempo para medir a indução após o dano, em cada tratamento as respostas químicas foram analisadas 1 dia, 3 dias e 9 dias após a inserção do herbívoro, em plantas diferentes. Nesse experimento não aplicamos o tratamento de dano manual. Em um segundo experimento, com 40 plantas, sendo 10 para cada tratamento, usamos o intervalo de 3 dias após a aplicação do dano.

Em ambos os experimentos, a sexta folha, que permaneceu intacta, foi coletada para análise de APs e CFs. Essas análises fornecem informações sobre a resposta induzida sistêmica total, que pode ocorrer tanto via comunicação interna na planta, quanto por voláteis liberados pela quinta folha atacada pelo herbívoro (de Bruxelles 2001, Heil & Bueno 2007a, Heil & Bueno 2007b).



Figura 3. *Crotalaria paulina* com “clip-cages” acopladas às folhas.

Análises químicas. As folhas retiradas das plantas foram colocadas imediatamente a -20°C e, posteriormente, liofilizadas por 48 horas em um liofilizador (Labconco Freezone 6 Liter Freeze Dry System, Model 77530). Foram pesados 30 mg de cada folha, os quais foram macerados com um bastão de vidro e areia em 2 mL de EtOH, em tubos de extração de vidro. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm e a fase líquida foi reservada. O processo foi repetido mais duas vezes, e, ao final da extração, o volume foi completado para 10mL, resultando em uma solução com concentração 3 mg/mL.

A solução etanólica foi usada para quantificar colorimetricamente os APs (Trigo et al. 1996) e os CFs (Chiari et al. 2012). Para análise de APs foram utilizadas alíquotas de 1 mL de cada amostra. As amostras foram evaporadas em banho-maria a 90°C . Em seguida, foram adicionados 500 μL de reagente de oxidação e deixados por 25 minutos em banho-maria a 100°C . Foram adicionados aos tubos 1mL de acetato de isoamila e 100 μL de anidrido acético. Os tubos foram fechados colocados em banho-maria por 2 minutos a 100°C . Por fim, foi adicionado 1mL de reagente de Ehrlich a cada amostra, que ficou por 5 minutos em banho-maria a 60°C em tubos fechados. As amostras foram lidas no espectrofotômetro a 561 nm. Como padrão de referência para o cálculo de APs foi utilizada a monocrotalina.

Para a análise de CFs, foi utilizada uma alíquota de 1mL de cada um dos extratos etanólicos. A alíquota de 1 mL de cada amostra foi evaporada em banho-maria a 60°C e recuperada em 400µL de EtOH. Foram adicionados 2mL de solução de Folin-Ciocalteu 10% e deixados por 8 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 1,6mL de solução de Na₂CO₃ 7,5% e deixados por 30 minutos no escuro. Após esse tempo, as amostras foram lidas no espectrofotômetro a 765 nm. Como padrão de referência para o cálculo de CFs foi utilizado o ácido tânico.

Análises estatísticas. Para o experimento preliminar foi realizada uma ANOVA de dois fatores para cada uma das variáveis resposta (concentração de APs e CFs dadas em µg/mg de massa seca da planta), e os fatores fixos foram o tempo (três níveis: 1, 3 e 9 dias) e o tipo de tratamento (dano pelo especialista, dano pelo não especialista e controle). A análise da indução de APs e CFs no segundo experimento foi feita por uma ANOVA de um fator para cada variável resposta, onde o fator correspondia ao tipo de tratamento (quatro níveis: controle, dano pelo especialista, dano pelo não especialista e dano mecânico manual). Quando necessário foi realizado um teste a posteriori Fisher's LSD ("least square difference), para determinar a diferença entre os níveis dentro de um fator ou interação entre fatores. As análises foram realizadas no programa Statistica.

RESULTADOS

Indução de respostas químicas por herbivoria. No experimento preliminar, as plantas diferiram significativamente na concentração de APs nos diferentes tempos após o dano e na interação entre tratamento e tempo; não houve diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela1). No primeiro e nono dias após o dano, não houve diferenças significativas entre os tratamentos, entretanto no terceiro dia a concentração de APs foi significativamente maior em plantas danificadas pelo herbívoro não especialista do que plantas controle sem dano (LSD, P=0,002) ou plantas danificadas pelo herbívoro especialista (LSD, P = 0,016) (Figura 4). Em relação aos CFs, as plantas diferiram não significativamente na concentração nos

diferentes tratamentos, assim como na interação entre tratamento e tempo; entretanto a concentração de CFs aumentou significativamente ao longo do tempo (Tabela 2, Figura5).

No segundo experimento, as plantas induziram mudanças sistêmicas significativas na concentração de APs (ANOVA, $F_{3,36} = 5,134$, $P = 0,005$). Quando atacadas pelo herbívoro não especialista *S. eridania*, folhas de *C. paulina* produziram uma quantidade de APs significativamente maior que folhas em plantas controle sem dano, folhas de plantas com dano mecânico ou folhas com dano pelo herbívoro especialista *U. oratrix*; não houve diferença na indução de alcaloides entre os tratamentos controle, dano manual e dano pelo herbívoro especialista (Figura 6). Com relação à concentração de compostos fenólicos, as plantas não induziram respostas para nenhum dos tratamentos (Figura7).

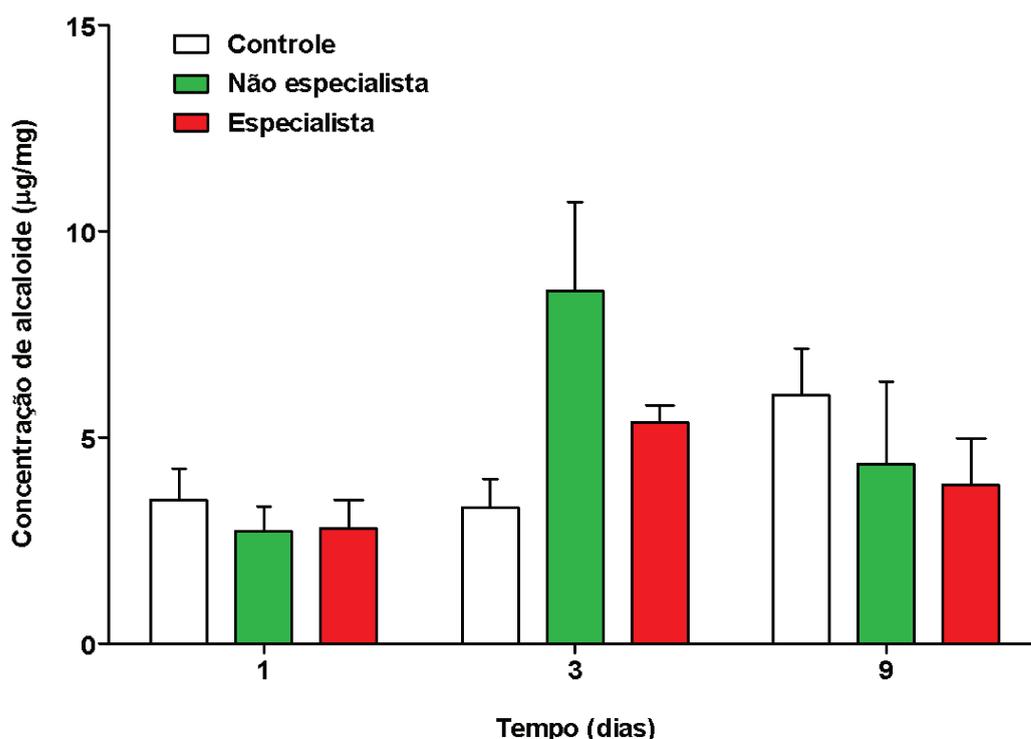


Figura 4. Concentração sistêmica de alcaloides pirrolizidínicos em folhas de *Crotalaria paulina* após dano, em diferentes tempos, pelo herbívoro especialista *Utetheisa oratrix*, o herbívoro não especialista *Spodoptera eridania* e controle sem danos.

Tabela 1. Resultado da análise de variância de dois fatores sobre a concentração de alcaloides pirrolizidínicos em folhas de *Crotalaria paulina* após dano, em diferentes tempos, pelo herbívoro especialista *Utetheisa ornatix*, o herbívoro não especialista *Spodoptera eridania* e controle sem danos. (SQ = soma dos quadrados, GL = graus de liberdade, QM = quadrados das médias)

	SQ	GL	QM	F	P
Tratamento	20.598	2	10.299	1.355	0.269
Tempo	53.913	2	26.957	3.545	0.038
Tratamento x tempo	84.791	4	21.198	2.788	0.039
Resíduo	311.738	41	7.603		

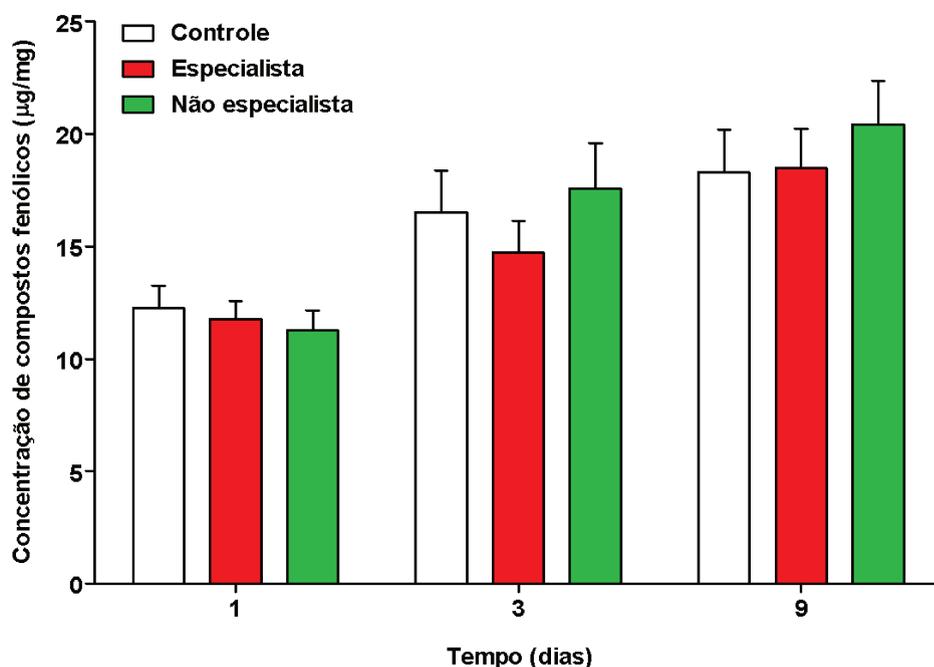


Figura 5. Concentração sistêmica de compostos fenólicos em folhas de *Crotalaria paulina* após dano, em diferentes tempos, pelo herbívoro especialista *Utetheisa ornatix*, o herbívoro não especialista *Spodoptera eridania* e controle sem danos.

Tabela 2. Resultado da análise de variância de dois fatores sobre a concentração de compostos fenólicos em folhas de *Crotalaria paulina* após dano, em diferentes tempos, pelo herbívoro especialista *Utetheisa ornatrix*, o herbívoro não especialista *Spodoptera eridania* e controle sem danos. (SQ = soma dos quadrados, GL = graus de liberdade, QM = quadrados das médias)

	SQ	GL	QM	F	P
Tratamento	18.337	2	9.168	0.625	0.540
Tempo	488.75 0	2	244.37 5	16.650	<0.001
Tratamento x tempo	25.786	4	6.447	0.439	0.780
Resíduo	660.46 8	45	14.677		

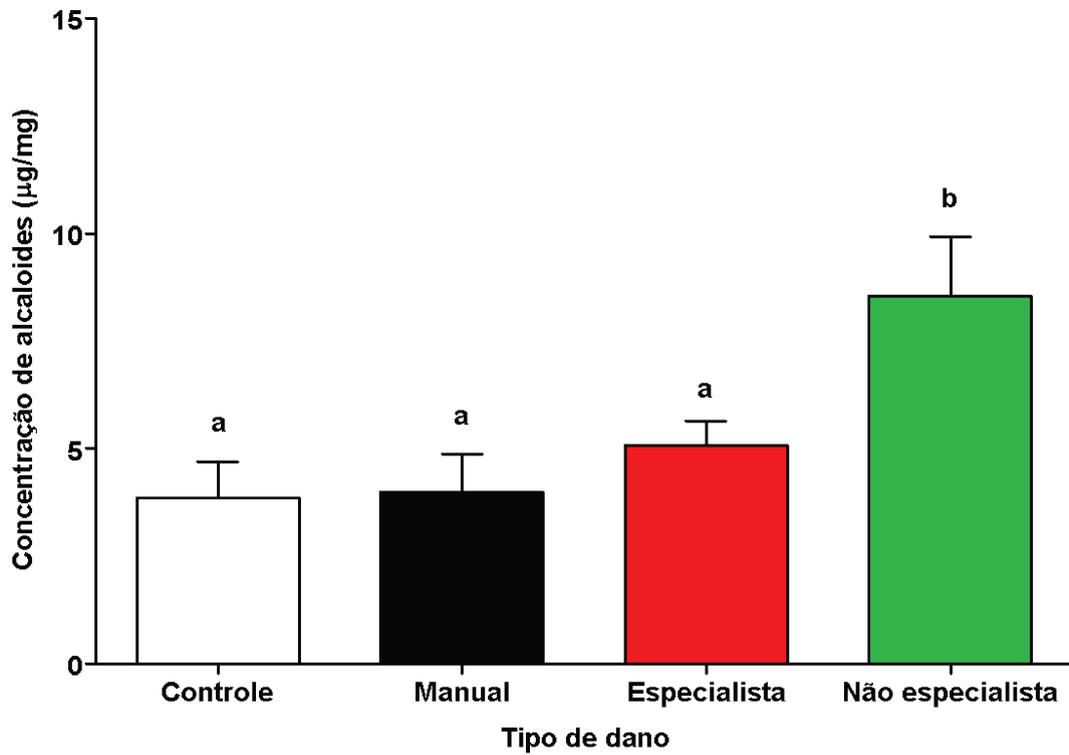


Figura 6. Concentração de alcaloides pirrolizidínicos em *Crotalaria paulina* três dias após o dano pelos herbívoros especialista e não especialista, dano mecânico e controle sem dano. Letras diferentes representam diferenças significativas de 5% (Fisher'sLSD).

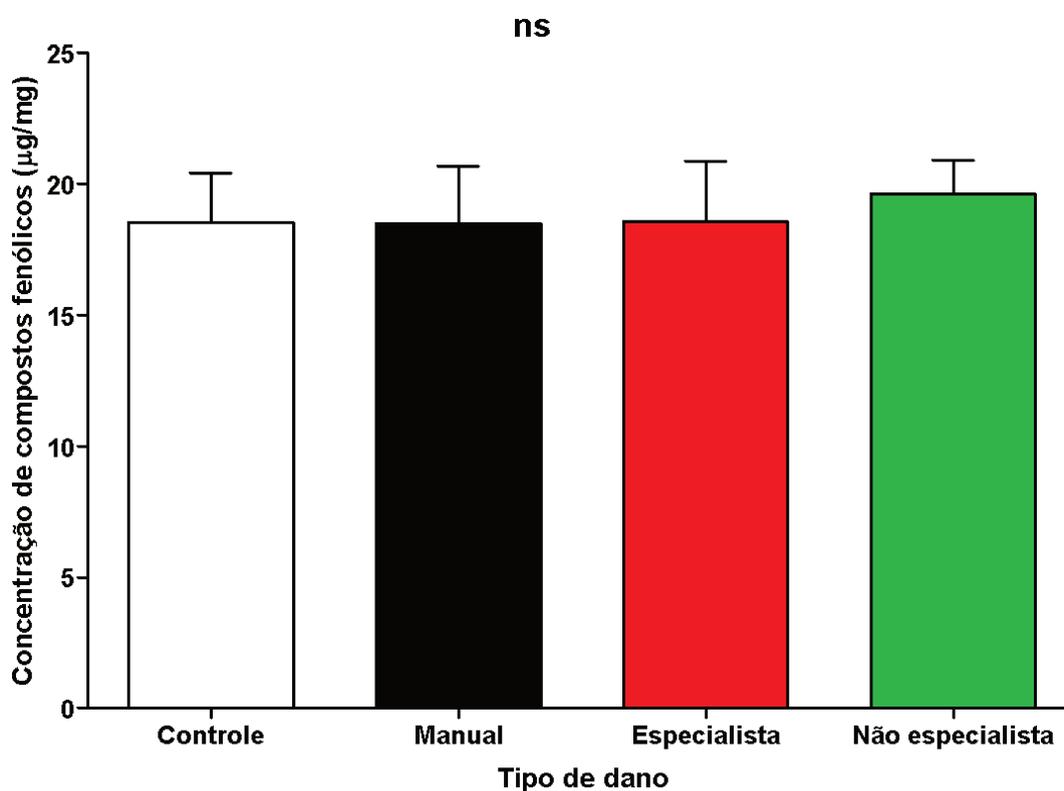


Figura 7. Concentração de compostos fenólicos em *Crotalaria paulina* três dias após o dano pelos herbívoros especialista e não especialista, dano mecânico e controle sem dano.

DISCUSSÃO

A resposta de *C. paulina* a diferentes tipos de danos é plástica. As plantas induziram a produção de alcaloides apenas em resposta ao dano pelo herbívoro não especialista *S. eridania*. APs são compostos conhecidos pela sua alta toxicidade e seus efeitos negativos no desempenho de herbívoros (Trigo et al. 1996, Trigo 2011). Por isso, acredita-se que tenham evoluído como compostos defensivos nas plantas, sendo eficazes principalmente contra herbívoros não especialistas (Macel et al. 2005, Cogni & Trigo 2016). Krug & Proksch (1993) avaliaram o efeito de 25 alcaloides diferentes no desempenho de larvas de *Spodoptera littoralis* e encontraram que todos eles causaram redução no crescimento dos indivíduos. Em outro estudo, os pesquisadores mostraram que os APs isoladamente não tiveram efeito em *Spodoptera exigua*, mas apresentaram atividade deterrente, quando incorporados juntos em dieta artificial. Portanto, o aumento na concentração de APs

totais observado em *C. paulina* garante uma estratégia mais eficaz contra *S. eridania*.

Não foi observado aumento na concentração de alcaloides nas plantas danificadas por *U. ornatix*, em comparação ao grupo controle ou ao dano manual. Ao contrário de *S. eridania*, *U. ornatix* é um herbívoro especialista que sequestra os APs de suas plantas hospedeiras, e os utiliza como precursores na biossíntese de feromônios sexuais em machos para reprodução, além de fornecer proteção química contra predadores para os ovos, larvas e adultos (Bezzerides et al. 2004, Ferro et al. 2006, Martins et al. 2015). Sendo assim, os alcaloides não conferem às plantas proteção contra esses herbívoros, e altas concentrações de APs mostraram não ter efeito no desempenho de larvas de *U. ornatix* (Hoina et al. 2012). Cogni et al. (2012) evidenciaram que, mesmo sob intensa atividade de detoxificação de alcaloides, as larvas de *U. ornatix* tiveram seu desempenho pouco ou nada afetado, sugerindo que os processos de metabolização e sequestro desses compostos não representem um grande custo para a espécie. Portanto, não induzir a produção de APs após o dano por *U. ornatix* permite que *C. paulina* poupe o gasto energético em sintetizar um composto que não afetará o consumo pelo herbívoro.

Muitos estudos se empenharam em testar o efeito de diferentes tipos de dano na indução de respostas pela planta (Haukioja & Neuvonen 1985, Hartley & Lawton 1987, Voeckel & Baldwin 2004, Lankau et al. 2007, Mooney et al. 2009), entretanto, os mecanismos através dos quais ocorre indução diferencial ainda são pouco conhecidos. Voeckel & Baldwin 2004 encontraram diferenças no padrão de resposta expresso pela planta, quando atacada por herbívoros especialistas e não especialistas. Os pesquisadores encontraram ainda que essas diferenças se correlacionavam com os perfis dos FAC (fatty acid amino acid conjugates), aminoácidos presentes na saliva dos insetos e que são responsáveis por elicitar as respostas nas plantas. Os perfis de FAC eram idênticos para os herbívoros não especialistas e diferentes do herbívoro especialista (Voeckel & Baldwin 2004). Esses resultados nos permitem imaginar um cenário onde as plantas são capazes de utilizar elementos característicos de cada tipo de herbívoro como pista química para gerar uma resposta específica e adequada. Esses elementos seriam peças-chave no entendimento da evolução das defesas químicas, moldando a interação entre herbívoros especialistas e não especialistas e suas plantas hospedeiras.

O aumento na concentração de alcaloides das plantas danificadas por *S. eridania* foi observada no terceiro dia após o dano. Entretanto, as análises feitas no

teste de premissa com as plantas nove dias após terem sido danificadas não mostraram diferenças entre nenhum dos quatro tratamentos. A partir desses resultados, é possível inferir que existem taxas de indução e relaxamento que permitem que as plantas, mesmo gerando uma resposta após o dano pelo herbívoro, desacelerem a síntese de alcaloides algum tempo após a retirada do estímulo. Resultados similares já haviam sido encontrados em outros trabalhos para outros organismos, e são diferentes de acordo com o herbívoro e o composto analisado (Karban & Myers 1989, Agrawal 1998).

Encontramos que as plantas induziram sistemicamente a produção de alcaloides. Acredita-se que uma resposta local mais expressiva pode ser necessária para reparar o dano no tecido da folha e proteger o local danificado da entrada de patógenos (Babst e tal. 2009). Entretanto, em relação ao efeito nos herbívoros, a ação desse tipo de resposta é bastante pontual e direcionada apenas para o herbívoro agente do ataque. Aumentar as defesas químicas localmente, mas não sistemicamente, pode deslocar o herbívoro para se alimentarem outras partes, não protegidas, da mesma planta, e, dessa forma, dispersar o dano sem necessariamente reduzi-lo (Karban & Myers 1989). Portanto, a indução sistêmica de respostas levaria o herbívoro a procurar outra planta para se alimentar. Além disso, pode ser mais vantajoso para a planta investir na defesa de folhas que ainda não estão sob ataque, ao invés de investir em folhas que já tiveram suas funções prejudicadas pelo dano e, por consequência, sua contribuição para a aptidão da planta reduzida. Dessa forma, a produção sistêmica de alcaloides em *C. paulina* garante à planta uma proteção mais eficiente.

Tanto a concentração de APs quanto a concentração de CFs aumentou nos quatro tratamentos ao longo do tempo. Esse aumento não se relaciona com a ocorrência de dano, e pode estar relacionado à ontogenia da planta. Plantas mais jovens podem investir mais em crescimento que em defesa (Boege & Marquis 2005, Ishida et al. 2005). Além disso, plantas adultas já possuem as estruturas de produção de compostos químicos bem estabelecidas, sendo, portanto, mais capazes de sintetizá-los (Hanley et al 2007).

Não houve indução de compostos fenólicos para nenhum dos quatro tratamentos. Os CFs são compostos de defesa bastante comuns e cuja ação no contexto da herbivoria é pouco específica (Ware et al. 2012, Fürstenberg-Hägget al. 2013). Ajustes finos dos compostos químicos de defesa que regulam as interações

de herbivoria são resultado de um processo evolutivo entre os insetos e suas plantas hospedeiras (Ehrlich & Raven 1964, War 2012), e são mais prováveis quanto mais estreita for a história compartilhada pelos organismos. Abaixa especificidade nos mecanismos defensivos dos CFs pode não fornecer um cenário que facilite a evolução de sistemas de defesa tão particulares.

O conjunto de defesas químicas de uma planta reflete os processos evolutivos aos quais foi submetida, que, por sua vez, relacionam-se com a comunidade de organismos com a qual interagiu durante sua evolução (Ehrlich & Raven 1964, Becerra 1997, Mauricio & Rausher 1997, Lankau 2007). O padrão de respostas encontrado para *C. paulina* pode representar o modelo de maior eficiência para a defesa da planta, moldado ao longo do tempo evolutivo. É possível que os CFs não constituam o principal componente do sistema de defesa dessas plantas, e, assim, o investimento nos mecanismos de sua indução não foi selecionado. Além disso, os CFs possuem outras funções no metabolismo da planta, como atração de polinizadores, proteção contra radiação ultravioleta e suporte estrutural (War et al. 2012, Fürstenberg-Hägg et al. 2013). Os APs, no entanto, são compostos característicos do gênero *Crotalaria*, altamente tóxicos e cuja ação anti-herbivoria é reconhecida (Aerts et al. 1994, Trigo 2011). Todos esses fatores contribuem para determinar o padrão de resposta encontrado em *C. paulina*.

CAPÍTULO 2. Como o dano por herbivoria afeta a indução de respostas nas folhas novas, e o efeito dessa indução no desempenho de *Utetheisa ornatix*.

INTRODUÇÃO

A capacidade das plantas de induzir respostas após o dano por herbívoros pode envolver muitas estratégias diferentes. As plantas podem induzir defesas local ou sistemicamente, gerar respostas nos ramos ou nas raízes, ou podem ainda aumentar seus níveis de defesa nas próximas folhas a serem produzidas (Karban & Carey 1984, Kaplan et al. 2008, Cornelissen et al. 2011). Essas diferentes estratégias de indução variam nos mecanismos de sensibilização da planta, rotas bioquímicas e classes de compostos produzidos, mas principalmente no herbívoro alvo que será afetado por essas mudanças (Bukovinsky et al. 2009). As respostas induzidas nas novas folhas produzidas pelas plantas após o ataque permitem que o efeito defensivo se dê não só no herbívoro agente do ataque, mas se estenda também para os próximos herbívoros que encontrarem a planta (Cornelissen et al. 2011)

As vantagens em aumentar os níveis de defesa nas novas folhas estão associadas ao ambiente em que a planta se encontra (Young & Okello 1998, Karban et al. 1999). Estudos mostraram que a plasticidade representada pela indução de respostas será favorecida se a planta puder utilizar as informações contidas no ambiente para responder adequadamente à herbivoria (Lloyd 1984, Stephens 1989, Karban & Adler 1996). Se a pressão de herbivoria for constante e previsível, a seleção natural favorecerá fenótipos cujas defesas são constitutivas. Caso a pressão de herbivoria for imprevisível, a seleção favorecerá fenótipo de defesa que melhor se adequa a essa imprevisibilidade, ou seja fenótipos com alta capacidade de indução. Por fim, em um cenário onde a herbivoria é variável, mas as condições ambientais fornecem pistas confiáveis sobre a probabilidade de um ataque futuro, serão favorecidas aquelas plantas capazes de utilizar essas pistas para responder ao dano sofrido através da alteração do seu fenótipo de defesa (Karban et al. 1999). Uma vez que o dano sofrido inicialmente é frequentemente um bom preditor do dano que a planta sofrerá no futuro (Karban et al. 1999, Cornelissen et al. 2011), proteger quimicamente as folhas novas pode ser benéfico para o indivíduo.

As características dos herbívoros da comunidade local contribuem para

moldar as estratégias de defesas induzidas das plantas. A indução de respostas nas folhas novas pode ser uma vantagem para plantas perenes atacadas por herbívoros cuja locomoção é restrita ou cujo ciclo de vida é muito mais rápido que o de suas plantas hospedeiras, como por exemplo espécies de Lepidoptera (Karban et al. 1999). A produção de folhas novas com maiores níveis de defesas químicas garante às plantas proteção contra um herbívoro que passa grande parte do seu ciclo se alimentando em um único indivíduo, e também contra os herbívoros das gerações subsequentes à geração do herbívoro que realizou o dano.

A proteção química das folhas jovens das plantas pode ser explicada pela Teoria da Defesa Ótima, que diz que os organismos alocam suas defesas de forma a maximizar sua aptidão (Rhoades 1979). Folhas em desenvolvimento são um dreno de nutrientes e demandam um alto gasto energético para sua manutenção, por isso são tecidos bastante valiosos para as plantas (Harper 1989, Anderson & Agrell 2005). Há, frequentemente, uma maior concentração de metabólitos secundários nas folhas jovens, pois a perda desses tecidos pode afetar mais negativamente a aptidão das plantas, em comparação a folhas mais velhas (Bowers & Stamp 1993, Karban & Baldwin 1997). Assim, as defesas nas plantas serão alocadas proporcionalmente ao risco de herbivoria e ao valor do tecido para a planta (Stamp 2003), e uma maior proteção química de tecidos jovens em ambientes com alto risco de herbivoria futura é esperada.

Sabendo do caráter defensivo dos compostos induzidos, a proteção química das folhas jovens deverá afetar o desempenho dos herbívoros, beneficiando a planta que os induziu. Muitos estudos evidenciaram a influência negativa dos metabólitos secundários das plantas no desempenho dos herbívoros. Herbívoros alimentados com plantas contendo altos níveis de defesa apresentaram menores taxa de crescimento e consumo, maior tempo de desenvolvimento e menor peso de pupa (Blau et al. 1978, Krug & Proksch 1993, Anderson & Agrell 2005, Macel et al. 2005, Cogni et al. 2012).

Tendo em vista que folhas jovens são importantes para a aptidão da planta, e que o dano sofrido é uma pista confiável do risco de dano futuro, avaliamos nesse capítulo o efeito da herbivoria na produção de defesas químicas em folhas produzidas após o dano, e o desempenho de herbívoros alimentados com folhas novas de plantas danificadas e não danificadas. Esperamos que as plantas que foram danificadas produzam folhas novas com maiores concentrações de CFs e

APs, que as plantas não danificadas. Conseqüentemente, esperamos que os indivíduos de *U. ornatrix* alimentados com as folhas novas das plantas danificadas apresentem menores taxas de consumo e crescimento que os indivíduos do controle.

MATERIAIS E MÉTODOS

Criação dos herbívoros. Os indivíduos de *U. ornatrix* foram criados em laboratório, sob condições de luminosidade e temperatura controladas, conforme descrito nos Materiais e Métodos do Capítulo 1.

Plantio de *Crotalaria paulina*. Indivíduos de *C. paulina* utilizados nos experimentos foram obtidos a partir de sementes das plantas existentes na casa de vegetação do Departamento de Zoologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, sem controle de luminosidade e temperatura, e molhadas diariamente. Plantas de *C. paulina* adultas (10 meses de idade) foram colocadas dentro de gaiolas (47x47x170 cm, Bioquip®) em casa de vegetação, em um total de 5 gaiolas com 3 indivíduos de *C. paulina* cada. Em três das cinco gaiolas foram colocadas 30 larvas de quarto instar de *U. ornatrix*, e foi permitido que se alimentassem livremente por 25 dias, até que as plantas estivessem quase totalmente consumidas (figura 8). As plantas das outras duas gaiolas foram mantidas intactas como grupo controle. Ao final de 25 dias, as larvas foram removidas e as plantas foram retiradas das gaiolas. Os indivíduos de *C. paulina* foram mantidos na casa de vegetação e molhados diariamente. Os experimentos foram conduzidos após a rebrota das plantas danificadas.

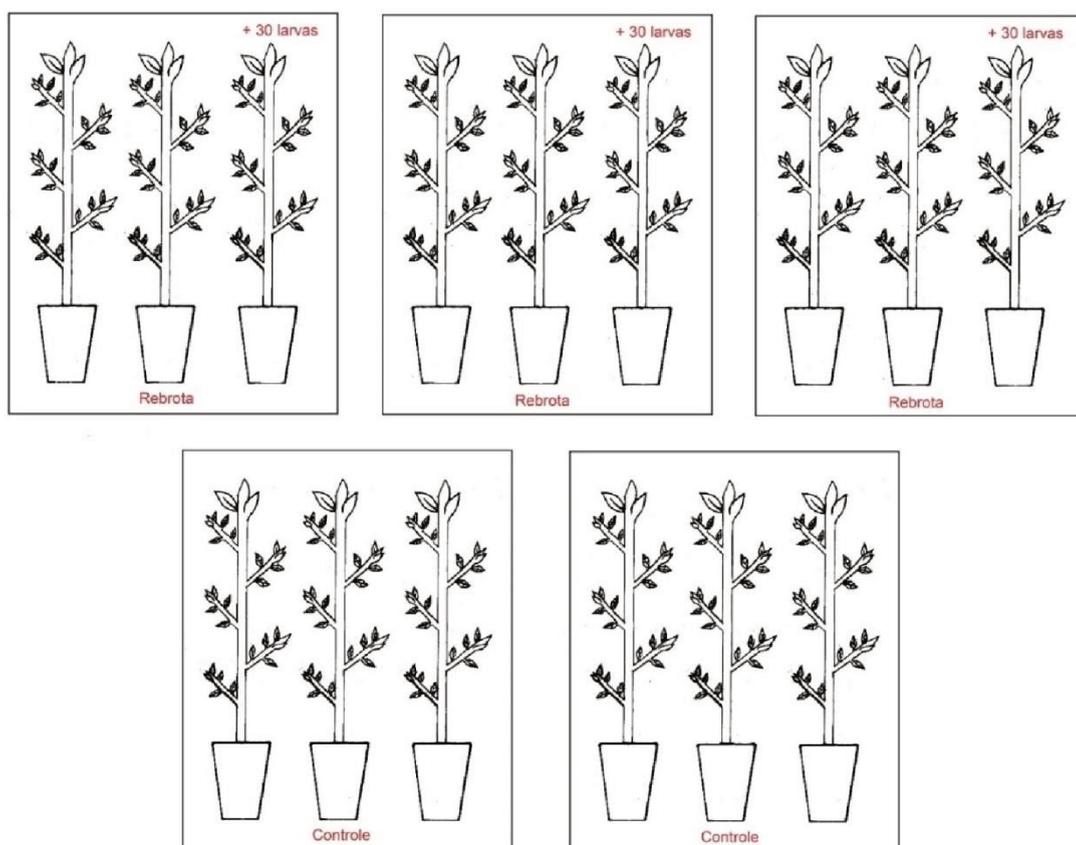


Figura 8. Esquema do sistema utilizado para a obtenção dos tratamentos para o experimento de desempenho de *Utetheisa ornatrix*.

Análises químicas. Folhas de *C. paulina* dos dois tratamentos foram coletadas, extraídas e submetidas a métodos colorimétricos para a quantificação de APs e fenólicos totais (uma folha de cada planta para cada tratamento, sendo rebrota: n=9; controle: n=6), como descrito nos Materiais e Métodos do Capítulo 1. A última folha de cada planta foi sinalizada com um barbante para podermos identificar posteriormente.

Desempenho de *Utetheisa ornatrix*. Larvas recém eclodidas de *U. ornatrix* foram individualizadas em potes plásticos cilíndricos (5 cm de diâmetro, 4 cm de altura) e submetidas a dois tratamentos. Um grupo (n=20) foi alimentado apenas com folhas rebrotadas dos indivíduos de *C. paulina* que foram danificados previamente por *U. ornatrix* (a partir de agora referido como grupo rebrota). O segundo grupo (n=20) foi alimentado com folhas novas das plantas controle. As folhas foram trocadas a cada 2 dias até o 9º dia de experimento, quando passaram a ser trocadas diariamente. Todas as folhas foram escaneadas antes e depois de serem oferecidas. A área consumida foi calculada pela diferença da área inicial e

final, como auxílio do programa Area Measure. As larvas foram criadas até a fase adulta. O peso das larvas foi medido no 6º, 9º e 12º dia, além do peso das pupas. Assume-se que ao nascer o peso das larvas não difere. Foi calculado o tempo de desenvolvimento larval, contado desde o primeiro instar até a emergência dos adultos. O sexo dos adultos foi identificado segundo Travassos (1946), e o peso das pupas foi analisado separadamente para machos e fêmeas, pois fêmeas podem apresentar peso médio maior que machos (Babaei et al. 2009, Marti & Carpenter 2008).

Análises Estatísticas. As variáveis de desempenho medidas para *U. ornatrix* (peso das larvas, peso das pupas e tempo de desenvolvimento larval), a área foliar consumida, a concentração de alcaloides e a concentração de fenólicos totais foram comparadas entre os dois tratamentos através de um teste T.

RESULTADOS

Análises químicas. A concentração de alcaloides e de compostos fenólicos diferiu entre os tratamentos, e foi significativamente maior para as plantas do tratamento rebrota ($T = 5,424$, $p = 0,0002$; $T = 4,907$, $p = 0,0004$, alcaloides e fenólicos, respectivamente). Os indivíduos do tratamento rebrota apresentaram quase 5 vezes mais alcaloides que os indivíduos do grupo controle, e quase 2,5 vezes mais fenólicos (Figura 9).

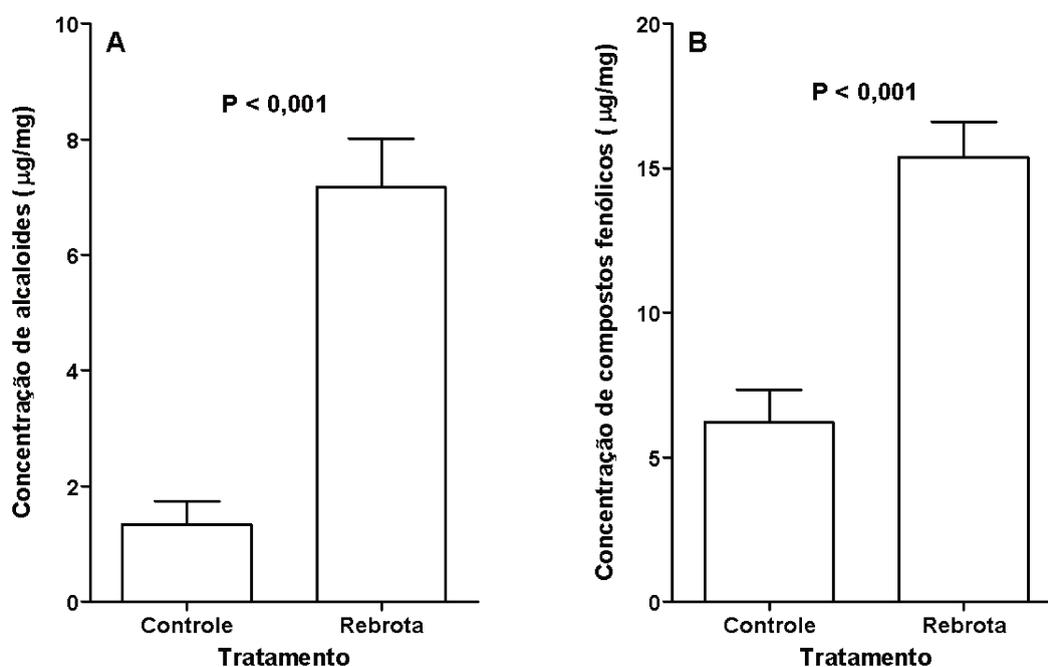


Figura 9. (A) Concentração de alcaloides pirrolizidínicos e (B) de compostos fenólicos em folhas dos grupos controle e rebrota.

Desempenho de *Utetheisa oratrix*. A área foliar consumida pelas larvas dos dois tratamentos diferiu significativamente entre os tratamentos, e foi maior para as larvas do grupo controle (Figura 10). O consumo foliar diferiu a partir do 9º dia (9º dia: $T=2,544$, $p=0,0152$, $gl=38$; 12º dia: $T=2,955$, $p=0,0053$, $gl=38$), sendo a maior diferença observada no último tempo.

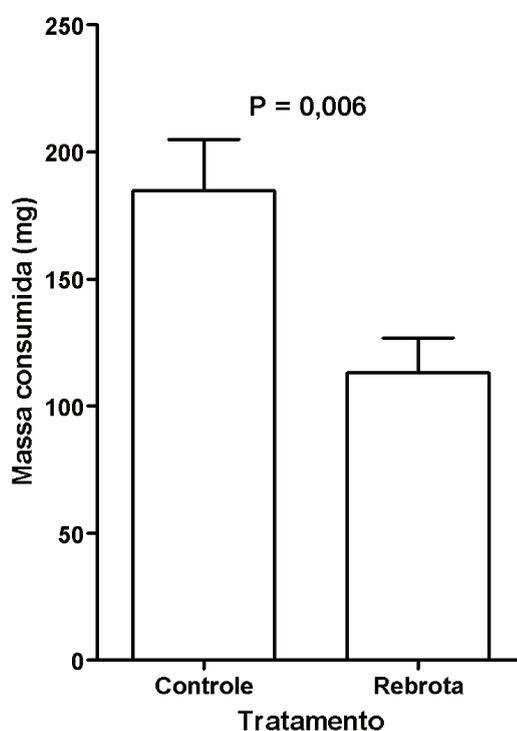


Figura 10. Área foliar consumida (mg) por larvas de *Utetheisa ornatrix* ao longo de 12 dias nos tratamentos controle e rebrota.

Larvas alimentadas com folhas novas do tratamento rebrota apresentaram peso significativamente menor que larvas alimentadas com folhas novas das plantas controle após 12 dias ($T=2,761$, $p=0,0088$, $gl=38$) (Figura 11b). Após 12 dias o peso médio das larvas alimentadas com folhas do tratamento rebrota foi 121,2 mg ($SE\pm 9,15$), enquanto o peso médio das larvas do grupo controle foi 160,7 mg ($SE\pm 11,02$). O tempo de desenvolvimento larval foi significativamente maior para larvas do grupo rebrota, que atingiram o estágio de pupa, em média, 2 dias depois das larvas do grupo controle ($t = 2,800$, $p = 0,009$, $gl = 29$) (Figura 11c). Não houve diferença na sobrevivência das larvas (Figura 11a) e entre os pesos das pupas entre os dois tratamentos (Figura 11d).

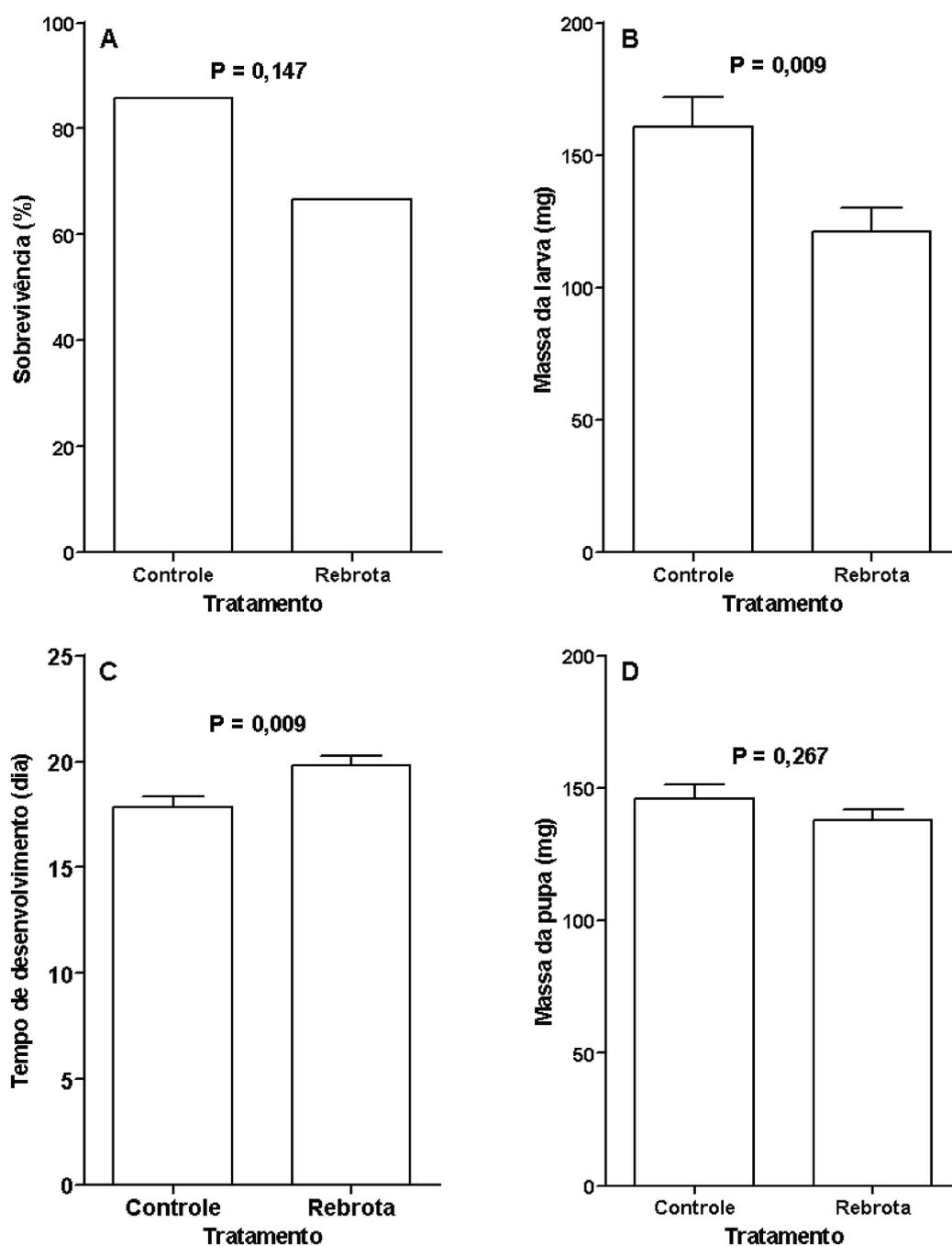


Figura 11. Desempenho de larvas *Utetheisa ornatrix* nos tratamentos controle e rebrota. Sobrevivência das larvas(A). Massa das larvas(B). Tempo de desenvolvimento até o estágio de pupa (C). Massa da pupa (D).

DISCUSSÃO

As folhas novas das plantas de *C. paulina* que foram previamente danificadas

por *U. ornatrix* apresentaram maiores concentrações de alcaloides pirrolizidínicos e compostos fenólicos que as plantas não danificadas. A herbivoria sofrida é considerada a pista mais direta sobre o risco de herbivoria futura de um ambiente (Karban et al. 1997, Karban et al. 1999). O dano sofrido por *C. paulina* é indicativo de um ambiente potencialmente perigoso, e a indução dos compostos químicos nas folhas a serem produzidas pode reduzir o dano futuro por herbívoros em um ambiente com alta probabilidade de ataque (Agrawal 1999, Anderson & Agrell 2005). Cornelissen et al. 2011 encontraram que as folhas de *Bauhinia brevipes* produzidas no início da temporada de rebrota, antes de qualquer dano, apresentaram menores concentrações de tanino que folhas produzidas mais tardiamente, quando as plantas já haviam sido atacadas por herbívoros. O aumento na concentração de tanino nas folhas foi acompanhado de um decréscimo na sobrevivência de herbívoros galhadores. Os autores atribuíram esses resultados a uma possível capacidade das plantas de, a partir do dano sofrido no início da temporada, avaliar o risco de herbivoria do ambiente e responder sistemicamente através do aumento de taninos no final da temporada.

As altas concentrações de compostos defensivos encontradas nas folhas do tratamento rebrota podem ainda estar relacionadas com o valor desses tecidos para a planta. A Teoria da Defesa Ótima postula que as plantas devem proteger as partes mais importantes para sua aptidão futura (McKey 1974). Dessa forma, é gerada uma variação da distribuição de defesas químicas entre as partes da planta, com estruturas reprodutivas e tecidos em desenvolvimento sendo mais fortemente protegidos (Faeth 1991, Anderson & Agrell 2005, McCall & Fordyce 2010). Folhas jovens possuem maior valor fotossintético que folhas velhas da mesma planta, além de vida útil maior e, por consequência, maior tempo de contribuição para a aptidão da planta (Harper 1989, Kitajima et al. 2002). Assim, o investimento em defesas dessas folhas pode ser vantajoso para as plantas, principalmente em um ambiente com alta probabilidade de dano. Além disso, os ciclos de vida de muitas espécies de insetos herbívoros são marcados por surtos de reprodução. Muitos estudos demonstraram que o desempenho de insetos herbívoros era pior quando alimentados com folhas de plantas que haviam sido danificadas na estação anterior. A esse fenômeno de indução, foi dado o nome de resistência induzida tardia (Neuvonen et al. 1987, Ruohomaki et al. 1996, Nykonen & Koricheva 2004). Quando a planta está sob alta intensidade de ataque, a indução de resistência tardia pode

garantir que a planta escape desses “outbreaks”, e não invista em folhas já danificadas em um ambiente com grandes populações de herbívoros. Alguns estudos reportaram a preferência de herbívoros por folhas jovens e em expansão, em comparação a folhas mais velhas (Rodrigues & Moreira 1999, Kursar & Coley 2003, Pinto et al. 2009). Por exemplo, larvas jovens de *Heliconius erato*, quando posicionadas em folhas maduras, procuravam os ramos terminais para começar a se alimentar (Rodrigues & Moreira 1999). Pinto et al. (2009) observaram que fêmeas de *Battus polydamas archidamas* preferiam depositar os ovos em folhas jovens de *Aristolochia chilensis*, ao invés de folhas maduras e ramos. Em florestas tropicais, as taxas de consumo de folhas jovens podem ser mais de vinte vezes maiores que de folhas maduras (Coley & Barone 1996). Folhas jovens apresentam menor dureza e maior conteúdo de proteínas, e essas características as tornam mais atrativas para os herbívoros (Rausher 1980, Kursar & Coley 2003, Pinto et al. 2009). O elevado risco de herbivoria do ambiente em conjunto com o alto valor dos tecidos de folhas jovens e a preferência dos herbívoros por esses tecidos podem explicar o padrão de alocação de defesas nas plantas (Stamp 2003).

Os indivíduos de *U. ornatix* alimentados com plantas que haviam sido previamente danificadas consumiram menos tecido foliar e ganharam menos peso que os indivíduos alimentados com plantas controle. Além disso, os indivíduos alimentados com folhas do tratamento rebrota apresentaram maior tempo de desenvolvimento. Esse atraso para entrar no estágio de pupa expõe a larva por mais tempo a predadores e parasitoides, podendo aumentar a taxa de parasitismo entre indivíduos (Benrey & Denno 1997, Thaler 1999). É possível que a diferença no desempenho dos herbívoros esteja relacionada com a diferença na concentração de compostos químicos observada. *U. ornatix* é uma mariposa especialista em APs, portanto, provavelmente o efeito negativo no desempenho dos indivíduos não se deve ao aumento na concentração desses compostos isoladamente. Hoina et al. 2012 encontraram que indivíduos de *U. ornatix* previamente alimentados em dietas com baixos níveis de APs apresentaram, posteriormente, preferência por dietas artificiais com altas concentrações de APs. Os indivíduos alimentados previamente em dietas com alta concentração de APs não apresentaram preferência, e consumiram igualmente as dietas com baixos e altos níveis de APs. Dessa forma, os APs sozinhos não devem ser responsáveis pelo comportamento alimentar observado no experimento.

Além dos APs, as plantas do tratamento rebrota apresentaram maiores concentrações de compostos fenólicos. Os compostos fenólicos constituem um dos grupos de metabólitos secundários mais comuns e dispersos filogeneticamente em plantas (War et al. 2012, Fürstenberg-Hägg et al. 2013). Seus efeitos defensivos são bastante gerais, e são eficazes não só contra herbívoros, mas também contra patógenos e plantas competidoras vizinhas (Bennet & Wallsgrave 1994, Cheynier et al. 2013). Os mecanismos de indução desses compostos também são bastante gerais e apresentam baixa especificidade. Diferentes herbívoros se alimentando de uma mesma planta podem gerar o mesmo padrão de resposta química (Moreira et al. 2015). Sendo assim, é provável que os compostos fenólicos sejam defesas químicas eficazes contra um amplo espectro de herbívoros, inclusive insetos especializados em determinadas classes de compostos, como é o caso de *U. ornatix*.

A indução de respostas contra herbivoria pode envolver a produção de várias classes de compostos simultaneamente (Hartley & Lawton 1987, Tschardt et al. 2001). É possível que, além de APs e CFs, *C. paulina* produza outros compostos defensivos que não foram medidos no experimento, mas que também influenciam o comportamento alimentar de *U. ornatix*. O efeito desses compostos no desempenho dos herbívoros pode variar quando atuam isoladamente ou em conjunto com outros compostos (Bloem & Duffey 1989, Duffey & Stout 1996, Steppuhn & Baldwin 2007). Duffey & Stout (1996) encontraram que alcaloides, inibidores de protease e compostos fenólicos tem um efeito mais negativo no crescimento de larvas de noctuídeos quando ocorrem em conjunto, em comparação aos seus efeitos isolados. Os compostos defensivos das plantas também podem interagir com outras substâncias, como proteínas ou colesterol, e assim ter seu efeito alterado (Bloem et al. 1989, Bloem & Duffey 1989). Os efeitos sinérgicos entre os diferentes compostos químicos das plantas contribuem para melhorar o sistema de defesa contra herbívoros (Wittstock & Gershenzon 2002). O desempenho reduzido de *U. ornatix* pode não ser resultado da ação de apenas um composto, mas da combinação de vários componentes de defesa do metabolismo de *C. paulina*, como por exemplo lectinas e inibidores de proteases.

CONCLUSÕES GERAIS

A indução de respostas em *Crotalaria paulina* após o dano por herbívoros especialistas e não especialistas evidenciaram que as plantas podem ser capazes de responder de forma diferente de acordo com o agente do ataque. O dano pelo herbívoro não especialista *Spodoptera eridania* gerou maior intensidade na resposta que o dano pelo herbívoro especialista *Utetheisa ornatix*. Esses resultados fornecem fortes evidências que a indução de compostos do metabolismo secundário em plantas pode ter surgido em resposta ao ataque por herbívoros, e que as plantas podem responder diferencialmente a esses ataques. A partir desse experimento, sugerimos que as plantas são capazes de discriminar os agentes do ataque, ainda que os mecanismos através dos quais as plantas realizam essa identificação não tenham sido avaliados.

Concluimos ainda que as estratégias de resposta podem variar temporalmente. *C. paulina* respondeu ao ataque sofrido por *U. ornatix* produzindo folhas novas com maiores concentrações de compostos defensivos, em relação ao controle não danificado. Essas alterações nas folhas de plantas previamente danificadas tiveram efeitos negativos diretos no desempenho de larvas de *U. ornatix*, reforçando o papel desses compostos e a importância da indução de repostas para o sistema de defesa das plantas.

C. paulina mostrou responder diferencialmente ao ataque de herbívoros especialistas e não especialistas em relação à produção de alcaloides pirrolizidínicos, mas não houve diferença em relação à produção de compostos fenólicos. Além disso, *C. paulina* induziu tanto respostas em curto prazo, após três dias, como em longo prazo, na produção das próximas folhas. As estratégias e mecanismos que garantem às plantas proteção contra seus inimigos naturais são muito diversos. As plantas podem contar com um conjunto dessas estratégias em seu sistema de defesa, que confere melhor desempenho e explica melhor a história evolutiva de cada espécie. Portanto, estudos acerca da produção de compostos do metabolismo secundário em plantas continuam revelando a diversidade dos sistemas de defesa, e são necessários para fundamentar o debate que pretende esclarecer a relação de insetos herbívoros e suas plantas hospedeiras.

LITERATURA CITADA

- Aerts RJ, Gisi D, Carolis E, et al. (1994) Methy ljasmonate vapor increases the developmentally controlled synthesis of alkaloids in *Catharanthus* and *Cinchona* seedlings. *Plant J*5:635-643.
- Agrawal AA (1998) Induced responses to herbivory and increased plant performance. *Science* 279:1201-1202.
- Agrawal AA (1999) Induced responses to herbivory in wild radish: effects on several herbivores and plant fitness. *Ecology* 80:1713-1723.
- Agrawal AA, Karban R (1999) Why induced defenses may be favored over constitutive strategies in plants. p.45-61. In: The ecology and evolution of inducible defenses. R. Tollrian and C.D. Harvell (eds.). Princeton University Press, Princeton.
- Ali JG, Agrawal AA (2012) Specialist versus generalist insect herbivores and plant defense. *Trend Plant Sci*17:293-302.
- Alves MN, Sartoratto A, Trigo JR (2007) Scopolamine in *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae): Defense, allocation, costs, and induced response. *J Chem Ecol* 33:297-309.
- Anderson P, Agrell J (2005) Within-plant variation in induced defense in developing leaves of cotton plants. *Oecologia* 104:427-434.
- Arab A, Trigo JR (2011) Host plants invest in growth rather than chemical defense when attacked by a specialist herbivore. *J Chem Ecol*37:492-495
- Augner M, Fagerström T, Tuomi J (1991) Competition, defense and games between plants. *Behav Ecol Sociobiol* 29:231-234.
- Babaei MR, Barari H, Kara K (2009) Weight differences of male and female pupae of gypsy moth (*Lymantria dispar*) and host-sex preference by two parasitoid species *Lymantrichneumon disparis* and *Exorista larvarum*. *Pak J Biol Sci* 12:443-446.
- Babst BA, Sjödin A, Jansson S, Orians CM (2009) Local and systemic transcriptome responses to herbivory and jasmonic acid in *Populus*. *Tree Genet Genomes* 5:459-474.
- Baldwin IT, Schultz JC (1983) Rapid changes in tree leaf chemistry induced by damage: evidence for communication between plants. *Science* 221:277- 279.
- Bandoly M, Grichnik R, Hilker M, Steppuhn A (2016) Priming of anti-herbivore

- defence in *Nicotiana attenuata* by insect oviposition : herbivore-specific effects. *Plant Cell Environ* 39:848-859.
- Becerra JX (1997) Insects on plants: macroevolutionary chemical trends in host use. *Science* 276:253-256.
- Benrey B, Denno RF (1997) The slow-growth-high-mortality hypothesis: a test using the cabbage butterfly. *Ecology* 78:987-999.
- Bernays EA, Chapman RF (1994) Host-plant selection by phytophagous insects. Chapman & Hall, New York.
- Bennett RN, Wallsgrave RM (1994) Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol* 127:617-633.
- Bergelson J, Purrington CB (1996) Surveying patterns in the cost of resistance in plants. *Am Nat* 148:536-558.
- Bezzarides A, Young T, Bezzarides J, Hussein J, Ladau J, Eisner M, Eisner T (2004) Plant-derived pyrrolizidine alkaloid protect eggs of a moth (*Utetheisa ornatrix*) against a parasitoid wasp (*Trichogramma ostrinae*). *Proc Natl Acad Sci USA* 101:9029-9032.
- Biere A, Marak HB, Damme JMM Van (2016) Plant chemical defense against herbivores and pathogens: generalized defense or trade-offs? *Oecologia* 140:430-441.
- Blau PA, Fenny P, Contardo L, Robson DS (1978) Allylglucosinolate and herbivorous caterpillars: A contrast in toxicity and tolerance. *Science* 200:1296-1298.
- Bloem KA, Duffey SS (1989): Interactive effect of protein and rutin on larval growth of *Heliothis zea* and the endoparasitoid *Hyposoter exiguae*. *Entomol Exp Appl* 54:149-160.
- Bloem KA, Kelley KC, Duffey SS (1989) Differential effect of tomatine and its alleviation by cholesterol on larval growth and efficiency of food utilization in *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *J Chem Ecol* 15:387-398.
- Boege K, Marquis RJ (2005) Facing herbivory as you grow up: the ontogeny of resistance in plants. *Trends Ecol Evol* 20:441-448.
- Bowers MD, Stamp NE (1993) Effects of plantage, genotype and herbivory on *Plantago* performance and chemistry. *Ecology* 74 :1778-1791.
- Brown KS (1984) Adult-obtained pyrrolizidine alkaloids defend ithomiine butterflies against a spider predator. *Nature* 309:707-709

- Brown B, Allen T (1989) The importance of scale in evaluating herbivory impacts. *Oikos* 54:189-194.
- Bruin J, Dicke M, Sabelis MW (1992) Plants are better protected against spider-mites after exposure to volatiles from infested conspecifics. *Experientia* 48:525-529.
- Bukovinsky T, Poelman EH, Gols R, Prekatsakis G, Vet LEM, Harvey JA, Marcel D (2009) Consequences of constitutive and induced variation in plant nutritional quality for immunodefence of a herbivore against parasitism. *Oecologia* 160:299-308.
- Cheynier V, Comte G, Davies KM, Lattanzio V, Martens S (2013) Plantphenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiol Biochem* 72:1-20.
- Chiari BG, Severi JA, De Pauli-Credendio PA, de Sylos CM, Vilegas W, Correa MA, Isaac VLB (2012) Assessment of the chemical profile, polyphenol content and antioxidant activity in extracts of *Psidium guajava* L. fruits. *IntJ Pharm Pharm Sci* 4:331-336.
- CogniR (2010) Resistance to plant invasion? A native specialist herbivore shows preference for and higher fitness on an introduced host. *Biotropica* 42:188-193.
- Cogni R, Trigo JR, Futuyma DJ (2012) A free lunch? No cost for acquiring defensive plant pyrrolizidine alkaloids in a specialist arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). *Mol Ecol* 21:6152-6162.
- Cogni R, Trigo JR (2016) Pyrrolizidine alkaloids negatively affect a generalist herbivore feeding on the chemically protected legume *Crotalaria pallida*. *Neotrop Entomol* 252-257.
- Coley PD, Barone JA (1996) Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Ann Rev Ecol Syst* 27:305-335.
- Cornelissen T, Fernandes GH, Coelho MS (2011) Induced responses in neotropical shrub *Bauhinia brevipes* Vogel: does early season herbivory function as cue to plant resistance? *Arthropod Plant Interact* 5:245-253.
- de Bruxelles G (2001) Signals regulating multiple responses to wounding and herbivores. *Crit Rev Plant Sci* 20:487-521.
- Dolch R, Tschardt T (2000) Defoliation of alders (*Alnus glutinosa*) affects herbivory

- by leaf beetles on undamaged neighbours. *Oecologia* 125:504- 511.
- Duffey SS, Stout MJ (1996) Antinutritive and toxic components of plant defense against insects. *Arch Insect Biochem Physiol* 32:3-37.
- Eisner T, Meinwald J (1995) The chemistry of sexual selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:50-55.
- Erbilgin N, Colgan LJ (2012) Differential effects of plant ontogeny and damage type on phloem and foliage monoterpenes in jackpine (*Pinus banksiana*). *Tree Physiol* 32:946-957.
- Ehrlich PR, Raven PH (1964) Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* 18:586-608.
- Faeth SH (1991) Do defoliation and subsequent phytochemical responses reduce future herbivory on oak trees? *J Chem Ecol* 18:915-925.
- Ferro VG, Guimarães PR, Trigo JR (2006) Why do larvae of *Utetheisa ornatrix* penetrate and feed in pods of *Crotalaria* species? Larval performance vs. chemical and physical constraints. *Entomol Exp Appl* 121:23-29.
- Fine PVA, Mesones I, Coley PD (2004) Herbivores promote habitat specialization by trees in Amazonian forests. *Science* 305:663-665.
- Fine PVA, Miller ZJ, Mesones I, Irazuzta S, Appel HM, Stevens MHH, Sääksjärvi, Schultz JC, Coley PD (2006) The growth-defense trade-off and habitat specialization by plant in amazonian forests. *Ecology* 87:150-162.
- Flores AS (2004) Taxonomia, número cromossômico e química de espécies de *Crotalaria* L. (Leguminosae: Papilionideae) no Brasil. Dissertação de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.
- Fürstenberg-Hägg J, Zagrobelny M, Bak S (2013) Plant defense against insect herbivores. *Int J Mol Sci* 14:10242-10297
- Gormley AM, Holland EP, Pech RP, Thomson C, Reddiex B (2012) Impacts of an invasive herbivore on indigenous forests. *J Appl Ecol* 49:1296-1305.
- Govind G, Mittapalli O, Griebel T, Allmann S, Böcker S, Baldwin IT (2010) Unbiased transcriptional comparisons of generalist and specialist herbivores feeding on progressively defenseless *Nicotiana attenuata* plants. *PLoS ONE* 5:e8735
- Hanley ME, Lamont BB, Fairbanks MM, Rafferty CM (2007) Plant structural traits and

- their role in anti-herbivore defence. *Perspect Plant Ecol Evol Syst* 27:547-568.
- Harper JL (1989) The value of a leaf. *Oecologia* 80:53-58.
- Hartley SE, Lawton JH (1987) Effects of different types of damage on the chemistry of birch foliage, and the responses of birch feeding insects. *Oecologia* 74:432-437.
- Hartmann T, Theuring C, Beuerle T, Ernst L, Singer MS, Bernays EA (2004) Acquired and partially de novo synthesized pyrrolizidine alkaloids in two polyphagous arctiids and the alkaloid profiles of their larval food-plants. *J Chem Ecol* 30:229-254.
- Haukioja E, Hanhimäki S (1985) Rapid wound-induced resistance in white birch (*Betula pubescens*) foliage to the geometrid *Epirrita autumnata*: a comparison of trees and moths within and outside the outbreak range of the moth. *Oecologia* 65:223-228.
- Haukioja E, Neuvonen S (1985) Induced long-term resistance of birch foliage against defoliators: defensive or incidental? *Ecology* 66:1303-1308.
- Havill NP, Raffa KF (1999) Effects of elicitation treatment and genotypic variation on induced resistance in *Populus*: impacts on gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) development and feeding behavior. *Oecologia* 295-303.
- Heil M, Bueno JCS (2007a) Herbivore-induced volatiles as rapid signals in systemic plant responses: how to quickly move the information? *Plant Signal Behav* 2:191-193.
- Heil M, Silva Bueno JC (2007b) Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:5467- 5472.
- Hoina A, Martins CHZ, Trigo JR, Cogni R (2012) Preference for high concentrations of plant pyrrolizidine alkaloids in the specialist arctiid moth *Utetheisa ornatrix* depends on previous experience. *Arthropod Plant Interact* 7:169-175.
- Holland EP, Gormley AM, Pech RP (2016) Species- and site-specific impacts of an invasive herbivore on tree survival in mixed forests. *Ecol Evol* 6:1954-1966.

- Howe GA, Schaller A (2008) Direct defenses in plants and their induction by wounding and insect herbivores. p. 7-29 In: Induced plant resistance to herbivory. Springer Science+Business.
- Ishida A., Yazaki K., Hoe AL (2005) Ontogenetic changes of leaf physiology and anatomy from seedlings to mature trees of a rain forest pioneer tree, *Macaranga gigantea*. *Tree Physiol.* 25:513-522.
- Kaplan I, Halitschke R, Kessler A, Sardanelli S, Denno RF (2008) Constitutive and induced defenses to herbivory in above and belowground plant tissues. *Ecology* 89:392-406.
- Karban R, Adler FR (1996) Induced resistance to herbivores and the information content of early season attack. *Oecologia* 107:379-385.
- Karban R, Agrawal AA, Mangel M (1997) The benefits of induced defenses against herbivores. *Ecology* 78:1351-1355.
- Karban R, Agrawal AA, Thaler JS, Adler LS (1999) Induced plant responses and information content about risk of herbivory. *Trends Ecol Evol* 14:443-447.
- Karban R, Baldwin IT (1997) Induced responses to herbivory. University of Chicago Press, Chicago.
- Karban R, Carey JR (1984) Induced resistance of cotton seedlings to mites. *Science* 225:53-54.
- Karban R, Myers JH (1989) Induced plant responses to herbivory. *Ann Rev Ecol Syst* 20:331- 348.
- Kitajima K, Mulkey SS, Samaniego M, Wright SJ (2002) Decline of photosynthetic capacity with leaf age and position in two tropical pioneer tree species. *Am J Bot* 89:1925-1932.
- Krug E, Proksch P (1993) Influence of dietary alkaloids in survival and growth of *Spodoptera littoralis*. *Biochem Syst Ecol* 21:749-756.
- Kursar TA, Coley PD (2003) Convergence in defense syndromes of young leaves in tropical rainforests. *Biochem Syst Ecol* 31:929-949.
- Lankau RA (2007) Specialist and generalist herbivores exert opposing selection on a chemical defense. *New Phytol* 175:176-184.
- le Roux M, Boatwright JS, van Wyk BE (2013) A global infrageneric classification system for the genus *Crotalaria* (Leguminosae) based on molecular and morphological evidence. *Taxon* 62:957-971.

- Lloyd DG (1984) Variation strategies of plants in heterogeneous environments. *Biol J Linn Soc* 21:357-385.
- Louda SM, Potvin MA (1995) Effect of inflorescence-feeding insects on the demography and lifetime of a native plant. *Ecology* 76:229-245.
- Macel M, Bruinsma M, Dijkstra SM, Ooijendijk T, Niemeyer HM, Klinkhamer PGL (2005) Differences in effects of pyrrolizidine alkaloids on five generalist insect species. *J Chem Ecol* 31:1493-1508.
- Magalhães AE, Martins CHZ, Verçosa D, Massuda KF, Trigo JR (2017) Ants visiting extrafloral nectaries and pyrrolizidine alkaloids may shape how a specialist herbivore feeds on its host plants. *Artrop-Plant Interac* DOI 10.1007/s11829-017-9510-z.
- Marquis RJ (1984) Leaf herbivores decrease fitness of a tropical plant. *Science* (80) 226:537- 539.
- Marti OG, Carpenter JE (2008) Rearing *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae) on a factitious meridic diet at different temperatures and larval densities. *Fla Entomol* 91:679-685.
- Martins CHZ (2015) Alcaloides pirrolizidínicos em mariposas Arctiinae Neotropicais: efeitos sobre o desempenho, sequestro, metabolismo e defesa química contra predadores. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP.
- Martins CHZ, Cunha BP, Solferini VN, Trigo JR (2015) Feeding on host plants with different concentrations and structures of pyrrolizidine alkaloids impacts the chemical-defense effectiveness of a specialist herbivore. *PLoS One* 10:e0141480.
- Mathur V, Ganta S, Raaijmakers CE, Reddy AS, Vet LEM, van Dam NM (2011) Temporal dynamics of herbivore-induced responses in *Brassica juncea* and their effect on generalist and specialist herbivores. *Entomol Exp Appl* 139:215-225.
- Mauricio R, Rausher MD (1997) Experimental manipulation of putative selective agents provides evidence for the role of natural enemies in the evolution of plant defense. *Evolution* 51:1435-1444.
- McArt SH, Halitschke R, Salminen J-P, Thaler JS (2013) Leaf herbivory increases plant fitness via induced resistance to seed predators. *Ecology* 94:966-975.

- McCall AC, Fordyce JA (2010) Can optimal defence theory be used to predict the distribution of plant chemical defences? *J Ecol* 98:985-992.
- McKey D (1974) Adaptive patterns in alkaloid physiology. *Am Nat* 108:306-320.
- McKey DB (1979) The distribution of secondary compounds within plants. *G.A.*
- Rosenthal, D.H. Janzen (Eds.), *Herbivores: their Interactions with Secondary Plant Metabolites*, Academic Press (1979), pp. 55–133.
- Montezano DG, Specht A, Sosa-Gomez DR, Roque-Specht VF, de Barros NM (2014) Immature stages of *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae): developmental parameters and host plants. *J Insect Sci* 14, doi: 10.1093/jisesa/ieu100.
- Mooney EH, Tiedeken EJ, Muth NZ, Niesenbaum RA (2009) Differential induced responses to generalist and specialist herbivores by *Lindera benzoin* (Lauraceae) in sun and shade. *Oikos* 118:1181-1189.
- Moreira X, Abdala-Roberts L, Hernández-Cumplido Johnattan, Cuny MAC, Glauser G, Benrey Betty (2015) Specificity of induced defenses, growth and reproduction in lima bean (*Phaseolus lunatus*) in response to multispecies herbivory. *Am J Bot* 102:1300- 1308.
- Mothershead K, Marquis RJ (2000) Fitness impacts of herbivory through indirect effects on plant-pollinator interactions in *Oenothera macrocarpa*. *Ecology* 81:30-40.
- Mun'im A, Negishi O, Ozawa T (2003) Antioxidative compounds from *Crotalaria sessiliflora*. *Biosci Biotechnol Biochem* 67:410-414.
- Nabity PD, Zavala JA, Delucia EH (2009) Indirect suppression of photosynthesis on individual leaves by arthropod herbivory. *Ann Bot* 103:655-663.
- Neuvonen S, Haukioja E, Molarius A (1987) Delayed induced resistance against a leaf-chewing insect in four deciduous tree species. *Oecologia* 74:363-369.
- Nykanen H, Koricheva J (2004) Damage-induced changes in woody plants and their effects on insect herbivore performance: a meta-analysis. *Oikos* 104:247-268.
- Ohnmeiss TE, Baldwin IT (2000) Optimal Defense Theory predicts the ontogeny of an induced nicotine defense. *Ecology* 81:1765-1783.
- Pichersky E, Lewinson T (2011) Convergent evolution in plant specialized

- metabolism. *Annu Rev Plant Biol* 62:549-566.
- Pinto CF, Troncoso AJ, Urzúa A, Niemeyer HM (2009) Aristolochic acids affect the feeding behaviour and development of *Battus polydamas archidamas* larvae. *Eur J Entomol* 106:357-361.
- Pogue MG (2002) A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). The American Entomological Society, Philadelphia.
- Purrington CB (2000) Costs of resistance. *Curr Opin Plant Biol* 3:305-308.
- Rausher MD (1980) Host abundance, juvenile survival, and oviposition preference in *Battus philenor*. *Evolution* 34:342-355.
- Rhoades DF (1979) Evolution of plant chemical defence against herbivores. In: Rosenthal GA, Janzen DH (eds) *Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites*. Academic, New York.
- Risch SJ (1985) Effects of induced chemical changes on interpretation of feeding preference tests. *Entomol Exp Appl* 39:81-84.
- Rodrigues D, Moreira GRD (1999) Feeding preference of *Heliconius erato* in relation to leaf age and consequences for larval performance. *J Lep Soc* 53:108-113. Ruohomaki K,
- Chapin FS, Haukioja E, Neuvonen S, Suomela J (1996) Delayed induced resistance in mountain birch in response to fertilization and shade. *Ecology* 77:2302-2311.
- Schoonhoven, L.M., J.J.A. van Loon & M. Dicke. 2005. *Insect-Plant Biology*. Oxford, University Press, Oxford.
- Sime KR, Feeny PP, Haribal MM (2000) Sequestration of aristolochic acids by the pipevine swallowtail *Battus philenor* (L.): evidence and ecological implications. *Chemoecology* 10:169-178.
- Smith DM, Nufio CR (2004) Levels of herbivory in two Costa Rican rain forests: implications for studies of fossil herbivory. *Biotropica* 36:318-326.
- Sourakov A (2015) You are what you eat: native versus exotic *Crotalaria* species (Fabaceae) as host plants of the Ornate Bella Moth, *Utetheisa ornatrix* (Lepidoptera: Erebidae: Arctiinae). *J Nat Hist* 49: 2397-2415.
- Stamp N (2003) Out of the quagmire of plant defense hypothesis. *Q Rev Biol* 78:23-55. Stephens DW (1989) Variance and the value of information. *Am Nat* 134:128-140.
- Steppuhn A, Baldwin IT (2007) Resistance management in a native plant: nicotine

- prevents herbivores from compensating for plant protease inhibitors. *Ecology Letters* 10:499-511.
- Strauss SY, Conner JK, Rush SL (1996) Foliar herbivory affects floral characters and plant attractiveness to pollinators : implications for male and female plant fitness. *Am Nat* 147:1098-1107.
- Strauss SY, Siemens DH, Decher MB, Mitchel-Olds T (1999) Ecological costs of plant resistance to herbivores in the currency of pollination. *Evolution* 53:1105-1113.
- Thaler JS (1999) Jasmonate-inducible plant defences causes increased parasitism of herbivores. *Nature* 399:686-688.
- Travassos L (1946) Contribuição ao conhecimento dos 'Arctiidae'. XI. Gênero 'Utetheisa' Hübner, 1819. Verificação de 'U. pulchella' (L., 1758) Kirby, 1892, no Nordeste do Brasil. *Rev Bras Biol* 6:343-35.
- Trigo JR (2011) Effects of pyrrolizidine alkaloids through different trophic levels. *Phytochem Rev* 10:83-98.
- Trigo JR, Witte L, Brown KS, Hartmann T, Ernst L, Barata LES (1996) Pyrrolizidine alkaloids: different acquisition and use patterns in Apocynaceae and Solanaceae feeding ithomiine butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biol J Linn Soc* 58:99-123.
- Tscharntke T, Thiessen S, Dolch R, Boland W (2001) Herbivory, induced resistance, and interplant signal transfer in *Alnus glutinosa*. *Biochem Syst Ecol* 29:1025-1047.
- Uraguchi S, Watanabe I, Yoshitomi A, Kiyono M, Kuno K (2006) Characteristics of cadmium accumulation and tolerance in novel Cd-accumulating crops, *Avena strigosa* and *Crotalaria juncea*. *J Exp Bot* 57:2955-2965.
- Van Dam NM, Horn M, Mares M, Baldwin IT (2001) Ontogeny constrains systemic protease inhibitor response in *Nicotiana attenuata*. *J Chem Ecol* 27:547-568.
- Van Zandt PA, Agrawal AA (2004) Specificity of induced plant response to specialist herbivores of the common milkweed *Asclepias syriaca*. *Oikos* 104:401-409.
- VoECKEL C, Baldwin IT (2004) Generalist and specialist lepidopteran larvae elicit different transcriptional responses in *Nicotiana attenuata*, which correlate with larval FAC profiles. *Ecology Letters* 7: 770-775.

- Volf M, Hrcek J, Julkunen-Tiitto R, Novotny V (2015) To each its own: differential response of specialist and generalist herbivores to plant defence in willows. *J Anim Ecol* 84:1123-1132.
- War AR, Paulraj MG, Ahmad T, Buhroo AA, Hussain B, Ignacimuthu S, Sharma HC (2012) Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal Behav* 7:1306- 1320.
- Warner PJ, Cushman JH (2002) International association for ecology influence of herbivores on a perennial plant : variation with life history stage and herbivore species. *Oecologia* 132:77–85.
- Weisser WW, Siemann E (2008) *Insects and ecosystem function*. Springer, Berlin.
- Wittstock U, Gershenson J (2002) Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Curr Opin Plant Biol* 5:1-8.
- Young TP, Okello BD (1998) Relaxation of an induced defense after exclusion of herbivores: spines on *Acacia drepanolobium*. *Oecologia* 115:508-513.
- Zangerl AR, Hamilton JG, Miller TJ, Oxborough K, Berenbaum MR, de Lucia EH (2002) Impact of folivory on photosynthesis is greater than the sum of its holes. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:1088-1091.

Anexo 1 - Declaração referente à Bioética e Biossegurança



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil Fone
(19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada “**Respostas induzidas em *Crotalaria paulina* (Fabaceae) frente ao ataque de um herbívoro especialista e um não especialista**”, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Ecologia do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: *Júlia Cabral Teresa*

Nome do(a) aluno(a): Júlia Cabral Teresa

Assinatura: *M. Francisco Pareja Piaggio*

Nome do(a) orientador(a): Martin Francisco Pareja Piaggio

Data: 14/10/2020

Anexo 2 - Declaração referente aos direitos autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Respostas induzidas em *Crotalaria paulina* (Fabaceae) frente ao ataque de um herbívoro especialista e um não especialista**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 14 de outubro de 2020

Assinatura : 

Nome do(a) autor(a): **Júlia Cabral Teresa**
RG n.º 468446448

Assinatura : 

Nome do(a) orientador(a): **Martin Francisco Pareja Paggio**
RG n.º (RNE) V563761-P