UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

MARCOS NOPPER ALVES

2003.98.78

ALOCAÇÃO DE ALCALÓIDES TROPÂNICOS *EM* *Brugmansia suaveolens* (SOLANACEAE)

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)

Marcos Nopper Alves

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para a obtenção do Título de Doutor em Biologia Vegetal

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Trigo

2003

UNICAMP

UNIDADE BC
Nº CHAMADA unicamp
AL87a
V EX
TOMBO BC/ 55591
PROC. 16-124/03
C D
PREÇO R$ 11,00
DATA
Nº CPD

CM00188586-1

BIBID 300679

AL87a

Alves, Marcos Nopper

Alocação de alcalóides tropânicos em *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae) / Marcos Nopper Alves. Campinas, SP : [s.n.], 2003.

Orientador: José Roberto Trigo.

Tese (doutorado)) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Ecologia química. 2. Plantas - Resistência. 3. Plantas - Efeito dos alcalóides. 4. Solanaceae. I. Alves, Marcos Nopper. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

COMPOSIÇÃO DA BANCA

Data da defesa: 11 de julho de 2003

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Roberto Trigo _____

Prof. Dr. Paulo Mazaffera _____

Prof. Dr. Renato Crespo Pereira _____

Prof. Dr. Flávio Antonio Maes dos Santos _____

Prof. Dr. Glauco Machado _____

Profa. Dra. Mary Ann Foglio _____

Prof. Dr. João Semir _____

AGRADECIMENTOS

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas (CPQBA) - UNICAMP, pela oportunidade concedida.

Ao Prof. Dr. José Roberto Trigo, pela orientação, incentivo e amizade.

Aos meus colegas do Laboratório da Divisão de Agrotecnologia do CPQBA , Pedro M. de Magalhães, Ílio Montanari Junior, Glyn Mara Figueira, Benício Pereira e Moisés Donizete F. dos Santos e a todos os funcionários do campo experimental pelo apoio e ajuda recebida.

Ao químico Adilson Sartoratto pela ajuda nas análises cromatográficas.

À química Mary Ann Foglio, ao farmacêutico Rodney Alexandre Rodrigues e aos biólogos Alexandre Nunes Ponezi e Edilberto Princi Portugal, pela ajuda e colaboração em várias etapas do trabalho.

À estagiária Camila Pesce Cândido pela ajuda em todas etapas do trabalho.

Ao analista de sistemas André Luiz Lins da Silva pela sua colaboração sempre prontamente fornecida.

Aos meus colegas de pós graduação que sempre me incentivaram.

A todos que de uma maneira ou outra colaboraram para a realização deste trabalho.

Sinceros agradecimentos

Dedico este trabalho ao que eu mais amo na vida.

Minha família,

Nádia, Bruna, Ana Carolina e Rafaela.

ÍNDICE

Resumo xvi

Summary xviii

1. Introdução 1

1.1. Defesas químicas 2

1.2. Defesas químicas induzidas e constitutivas no contexto da teoria da otimização de defesas em plantas 3

1.3. Custos da defesa induzida 7

1.4. Alcalóides agindo como substâncias de defesa em plantas 8

1.4.1. Alcalóides tropânicos 9

2. Objetivos 11

3. Material e Métodos 15

3.1. Organismos 15

3.1.1. *Brugmansia suaveolens* 15

3.1.2. Outros organismos 16

3.1.2.1. *Spodoptera frugiperda* 16

3.1.2.2. *Ricinus communis* 16

3.2. Análises químicas 17

3.2.1. Extração e caracterização de alcalóides tropânicos 17

3.2.2. Obtenção de escopolamina padrão para utilização nos ensaios 19

3.3. Desenhos experimentais 19

3.3.1. Alocação de alcalóides tropânicos dentro de partes da planta 19

3.3.1.1. Em folhas 19

3.3.1.2. Em flores 21

3.3.1.3. Em frutos 21

3.3.2. Alocação de alcalóides tropânicos entre partes da planta em diferentes fenofases 21

3.3.3. Variação de alcalóides tropânicos ao longo do dia 22

3.3.4. Indução de alcalóides tropânicos por danos mecânicos 23

3.3.4.1. Em folhas maduras 23

3.3.4.2. Em folhas maduras visando alterações nos brotos apicais 25

3.3.4.3. Em flores 26

3.3.4.4. Em frutos 26

3.3.5. Efeito da escopolamina em *Spodoptera frugiperda* 27

3.3.5.1. *Ricinus communis* x *Brugmansia suaveolens* 28

3.3.5.2. *Ricinus communis* x *Brugmansia suaveolens* induzidas por danos mecânicos 28

3.3.5.3. Mortalidade de herbívoros generalistas submetidos a diferentes concentrações de alcalóides tropânicos 29

3.3.6. Indução de escopolamina através de jasmonato de metila. Efeito sobre a alocação de recursos para o crescimento das plantas de *Brugmansia suaveolens.* 30

4. Resultados 43

4.1. Alocação de alcalóides tropânicos dentro de partes da planta 43

4.1.1. Em folhas 43

4.1.2. Em flores 43

4.1.3. Em frutos 44

4.2. Alocação de alcalóides tropânicos entre partes da planta em diferentes fenofases 44

4.3. Variação de alcalóides tropânicos ao longo do dia 45

4.4. Ensaios de Indução por danos mecânicos 45

4.4.1. Em folhas 45

4.4.2. Em flores 46

4.4.3. Em frutos 46

4.4.4. Padrões gerais 46

4.5. Efeitos de alcalóides tropânicos em herbívoros generalistas 47

4.5.1. Relação entre taxa de consumo relativo (TC_sR) e taxa de crescimento relativo (TC_rR) entre *Ricinus communis* e *Brugmansia suaveolens* 47

4.5.2. Relação entre taxa de consumo relativo (TC_sR) e taxa de crescimento relativo (TC_rR) entre *Ricinus communis* e *Brugmansia suaveolens* induzidas por danos mecânicos 47

4.5.3. Desempenho de herbívoros generalistas submetidos a diferentes concentrações de alcalóides tropânicos. 48

4.6. Indução de escopolamina através da aplicação de jasmonato de metila. Efeito da indução sobre o crescimento vegetativo das plantas. 49

5.Discussão 68

5.1. Alocação de alcalóides tropânicos dentro de *B. suaveolens* 68

5.2. Indução de alcalóides tropânicos como estratégia de defesa 70

5.3. Indução por MeJa 73

5.4. Custos da indução 76

6. Conclusões 80

7. Bibliografia 82

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Alcalóides tropânicos mais abundantes em *Brugmansia suaveolens.* 14

Figura 2. Planta adulta de *Brugmansia suaveol*ens com aproximadamente 12 meses de idade, cultivada no campo experimental do CPQBA – UNICAMP. 32

Figura 3. Vista lateral de uma planta de *Brugmansia suaveolens* proveniente de estaquia, com aproximadamente 60 dias de idade. Notar as folhas 3 e 6 que foram utilizadas no ensaio de diferentes posições dentro da planta. 33

Figura 4. Discos coletados nas folhas de *Brugmansia suaveolens* no ensaio de microdistribuição de alcalóides tropânicos. 34

Figura 5. Folhas de *Brugmansia suaveol*ens submetidas ao tratamento de retirada de 50% da sua área foliar, através de corte transversal (P - parte proximal ; D – parte distal). 35

Figura 6. Vista superior de uma planta de *Brugmansia suaveolens* proveniente de estaquia com aproximadamente 60 dias de idade. Notar as folhas 5 e 6 que foram utilizadas como folhas maduras e o broto apical em emergência e a primeira folha, que foram utilizadas como folhas jovens, no ensaio de folhas maduras x folhas jovens. 36

Figura 7. Flor de *Brugmansia suaveolens* danificadas através da retirada de 50% da área das flores, através de corte transversal (P - parte proximal ; D – parte distal). 37

Figura 8. Planta de *Brugmansia suaveolens* com aproximadamente 9 meses de idade em fase de florescimento, sendo cultivada no campo experimental do CPQBA – UNICAMP. 38

Figura 9. Plantas de *Brugmansia suaveolens* em fase de frutificação no campo experimental do CPQBA – UNICAMP. 39

Figura 10. Fruto verde cortado ao meio. P - parte proximal ; D – parte distal. 40

Figura 11. Aspecto de sementes de *Brugmansia suaveolens* obtidas de frutos maduros. 41

Figura 12. Procedimento realizado no ensaio de indução mecânica. Plantas foram danificadas em estafeta. As partes retiradas através do dano mecânico das folhas em cada tempo (C_n) serviram como controle das partes proximais induzidas do tempo imediatamente anterior (I_n). 42

Figura 13. Distribuição da freqüência da concentração de alcalóides tropânicos em folhas de uma amostra aleatória de 17 indivíduos de uma população *Brugmansia suaveolens* coletada na Serra do Japi, Jundiaí, SP. 50

Figura 14. Concentração média (± erro padrão) de escopolamina em brotos apicais e folhas maduras (5ª e 6ª folhas) de plantas de *Brugmansia suaveolens*. 51

Figura 15. Concentração média (± erro padrão) de escopolamina em diferentes partes de frutos verdes de *Brugmansia suaveolens* e sua respectiva ANOVA de um fator. 52

Figura 16. Concentração média (± erro padrão) de escopolamina dentro de cada órgãos em cada estágio fenológico e sua respectiva ANOVA de dois fatores (com dados transformados em raiz quadrada da concentração). Ver **Apêndice 1** para teste *a posteriori* de Tukey. 53

Figura 17. Razão de indução média (± erro padrão) em diferentes tempos após o início do dano mecânico e sua respectiva ANOVA de um fator. Letras diferentes representam diferenças significativas (teste de Tukey, $\alpha = 0,05$). Os números dentro das barras representam o n amostral. 54

Figura 18. Razão de indução em função da concentração inicial de escopolamina em folhas de *Brugmansia suaveolens*. 55

Figura 19. Razão de indução média (± erro padrão) em função da concentração inicial média de escopolamina (± erro padrão) em diferentes partes de plantas de *Brugmansia suaveolens*. 56

Figura 20. Taxas de consumo relativo (TC_SR) e taxas de crescimento relativo (TC_RR) médias [±erro padrão (n amostral dentro das barras de TCsR)] em larvas de *Spodoptera frugiperda* submetidas a diferentes tratamentos e suas respectivas ANOVAS de um fator. Letras diferentes representam diferenças significativas (teste de Tukey, $\alpha = 0,05$). 57

Figura 21. Taxas de consumo relativo em função de taxas de crescimento relativo em larvas de 4° estádio de *Spodoptera frugiperda* alimentadas por 24 h em folhas de *Ricinus communis* (controle - •) e folhas de *Brugmansia suaveolens* genótipo 10 (0,1 mg escopolamina/g - ○). 58

Figura 22. Taxas de consumo relativo em função de taxas de crescimento relativo em larvas de 4° estádio de *Spodoptera frugiperda* alimentadas por 24 h em folhas de *Ricinus communis* (controle - •) e folhas de *Brugmansia suaveolens* genótipo 4 (2,0 mg escopolamina/g - ○). 59

Figura 23. Taxas de consumo relativo em função de taxas de crescimento relativo em larvas de 4° estádio de *Spodoptera frugiperda* alimentadas por 24 h em folhas de *Ricinus communis* (controle - •) e folhas de *Brugmansia suaveolens* genótipo 11 (5,0mg escopolamina/g - ○). 60

Figura 24. Taxas de consumo relativo (TC_SR) e taxas de crescimento relativo (TC_RR) médias [±erro padrão (n amostral dentro das barras de TCsR)] em larvas de *Spodoptera frugiperda* submetidas a diferentes tratamentos, e suas respectivas ANOVAS de um fator. Letras diferentes representam diferenças significativas (teste de Tukey, $\alpha = 0,05$). 61

Figura 25. Taxas de consumo relativo em função de taxas de crescimento relativo em larvas de 4° estádio de *Spodoptera frugiperda* alimentadas por 24 h em folhas de *Ricinus communis* (controle - •) e folhas de *Brugmansia suaveolens* genótipo 4 (2,0 mg escopolamina /g) antes (○) e depois de 24 h do dano foliar (▲). 62

Figura 26. Taxas de consumo relativo em função de taxas de crescimento relativo em larvas de 4° estádio de *Spodoptera frugiperda* alimentadas por 24 h em folhas de *Ricinus communis* (controle - •) e folhas de *Brugmansia suaveolens* genótipo 11 (5,0 mg escopolamina/g) antes (○) e depois de 24 h do dano foliar (▲). 63

Figura 27. Percentagem de sobrevivência de larvas de *Spodoptera frugiperda* em dietas com diferentes concentrações de escopolamina (em % de massa seca da dieta). Letras diferentes representam diferenças significativas na sobrevivência final (comparação múltipla de proporções, χ^2=40,873, gl=4, P<0,001). 64

Figura 28. Tempo de desenvolvimento médio para pupação em dias (± erro padrão), e a respectiva ANOVA de um fator, em larvas de *Spodoptera frugiperda* se alimentado de dieta artificial com diferentes concentrações de escopolamina. Os números dentro das barras representam o n amostral. Letras diferentes representam diferenças significativas (teste de Tukey, α = 0,05). 65

Figura 29. Peso de pupa médio em mg (± erro padrão), e a respectiva ANOVA de dois fatores, em larvas de *Spodoptera frugiperda* se alimentado de dieta artificial com diferentes concentrações de escopolamina. Os números dentro das barras representam o n amostral. 66

Figura 30. Concentração média (± erro padrão) de escopolamina e taxas de crescimento foliar relativas médias (± erro padrão) obtidos em ensaios utilizando folhas de plantas de *Brugmansia suaveolens* controle, tratadas com Metil Jasmonato (MeJa) e danificadas mecanicamente, e sua respectiva ANOVA. Para cada variável; letras diferentes representam diferenças significativas (teste de Tukey, α = 0,05). 67

RESUMO

Espécies do gênero *Brugmansia* apresentam alcalóides tropânicos, os quais podem ser utilizados como defesas químicas contra inimigos naturais. Pressões seletivas destes podem modular a alocação desses alcalóides dentro da planta. Neste trabalho verificamos: (1) a alocação do alcalóide tropânico escopolamina em diferentes órgãos da planta nos seus diferentes estágios fenológicos em cada fenofase; (2) mecanismos de indução desse alcalóide frente à herbívoria e danos mecânicos, e (3) se essa indução representa um custo metabólico para a planta. Os alcalóides tropânicos foram isolados através de extração ácido-base, e quantificados por cromatografia gasosa - detector de ionização de chamas. Na maioria das fenofases as folhas jovens alocam uma quantidade maior de escopolamina que outras partes da planta. Nas fenofases de florescimento e frutificação, as flores e frutos alocam a maior quantidade de escopolamina. Esses dados podem ser interpretados segundo a teoria de otimização de defesas em plantas, onde órgãos mais valiosos em termos de aptidão dentro de uma dado estágio fenológico alocariam uma maior quantidade de substâncias de defesa e, portanto, seriam mais protegidos contra inimigos naturais (defesas constitutivas). Os resultados de indução mostraram que quando 50% da área foliar de folhas de plantas de 90 dias de idade foram removidas mecanicamente, houve aumento de até 4 vezes na escopolamina presente 24 h após o dano. Este aumento perdura até 48 h após o dano, voltando aos seus níveis iniciais após 96 h. Sugere-se que esta resposta de indução pode ser um mecanismo relacionado com a defesa da planta contra ataque de seus inimigos naturais. Quando a indução foi promovida através de jasmonato de metila os resultados mostraram que as plantas que tiveram uma razão de indução maior, tiveram um crescimento menor. Por

outro lado, as plantas com a razão de indução menor investiram mais no crescimento vegetativo, aumentando em até 30% sua área foliar quando comparadas com as primeiras. Esses dados suportam a hipótese de que defesas são custosas e quando recursos são utilizados para defesa eles são retirados de outras atividades da planta como, por exemplo, crescimento e reprodução.

ABSTRACT

Tropanic alkaloid allocation in *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae)

Species of the *Brugmansia* genus contain tropanic alkaloids that can be used as chemical defenses against natural enemies. Their selective pressures might modulate the alkaloid allocation inside the plant. The present work aims at verifying: (1) The allocation of scopolamine in different plant organs in their diferent phenological stages; (2) The alkaloid induction mechanisms during herbivory and the processes of mechanical damages; (3) The possibility that such induction may result in a metabolic cost. The tropanic alkaloids were isolated by acid-base extraction and quantified by gas chromatografy – flame ionization detector. In most of the phenophases, young leaves allocate greater quantities of scopolamine than other parts of the plant. In both, flowering and frutification phenophases, the scopolamine is more abundant in the flowers and fruit, respectively. These data may be intepreted according to the theory of optimization of defenses in plants, in which more valuable organs regarding their fitness at a given phenologiacal stage allocate a greater quantity of defense substances, hence they are more protected against their natural enemies (constitutive defense). The induction results showed that the scopolamine increased four times as much as the original after 24 h, when 50% of the leaf area of 90-day-old plants were mechanically removed. The scopolamine increase lasted 48 h after the damage, lowering to its initial level after 96 h. This suggests that such induction response may be related to the plant defense against natural enemies. When the induction was promoted by Methyl Jasmonate, the results showed that the plant that presented a greater induction ratio had a lower relative growth rate. Conversely, the plants with lower

induction ratio invested more in vegetative growth, increasing their foliar area as much as 30% as compared with those of the former group. These data corroborate the hypothesis that the defenses are costly and defense resources are used at the expense of other plant activities, such as growth and reproduction

1. INTRODUÇÃO

Grande parte da superfície do planeta é ocupado por cobertura vegetal, e evidências fósseis indicam que essa condição tem persistido durante toda a história da vida multicelular na superfície da terra. Com esta simples observação, podemos deduzir que os herbívoros sempre estiveram em número pequeno quando comparados com a quantidade de alimento disponível na natureza (Hairston et al., 1960) e que, mesmo sendo uma fonte abundante de alimento, as plantas conseguiram se defender adequadamente destes herbívoros em potencial evitando assim o seu total consumo (Murdoch, 1966). A diversidade de ameaças em potencial contra as plantas é impressionante. Grandes mamíferos herbívoros podem remover, com uma única mordida, galhos e até plantas inteiras. Outros se alimentam apenas de brotos localizados no alto de pequenas árvores, enquanto outros se alimentam de plântulas recém emergidas ou mesmo de sementes localizadas no chão. Existem herbívoros especialistas em tecidos maduros, em senescência, bem como especialistas em brotos jovens e tecidos recém formados. Estes herbívoros também podem parasitar o sistema vascular destas plantas. Ainda podem consumir pólen, sementes, estruturas reprodutivas, raízes, ou seja, todos e quaisquer tecidos de plantas. Como herbívoros importantes podemos incluir mamíferos, aves, gastrópodos, vermes e artrópodos. Dentre estes, os insetos herbívoros compõem a maior fração de biomassa e diversidade de vida na terra e são também uma das maiores ameaças para as plantas (Strong et al., 1984). Plantas também são atacadas por uma diversidade de microorganismos tais como vírus, bactérias e fungos. Mesmo assim, elas persistem dentro de um mundo onde uma enorme diversidade de organismos sobrevive através

da utilização de seus tecidos. Desta forma, plantas que possuem mecanismos ou características que as protegem contra esses ataques, ou melhor dizendo, características que agem como defesa contra estes herbívoros, têm a chance de serem melhor representadas em gerações futuras do que as que não resistem a estes parasitas. Fica evidente, assim, que características que agem como agentes de defesa contra herbívoros são favorecidas pela seleção natural num ambiente onde estes inimigos naturais são uma ameaça.

1.1. Defesas químicas

Segundo Crawley (1983), as plantas protegem-se de herbívoros utilizando basicamente três modos de defesa: (1) tornando sua superfície inacessível através do desenvolvimento de dureza, espinhos ou tricomas; (2) atraindo os inimigos naturais de seus herbívoros, ou (3) impregnando seus tecidos com substâncias químicas que detêm herbívoros ou que são tóxicas e/ou redutoras de digestibilidade. Abordando somente esse último aspecto, uma vasta gama de substâncias do metabolismo secundário, como alcalóides, terpenos e flavonóides, podem estar relacionados à defesa de plantas contra herbívoros. Estas substâncias são biossinteticamente derivadas de metabólitos primários, porém, com distribuição limitada a certos taxa. Estas substâncias do metabolismo secundário, inicialmente assim chamados devido à aparente falta de função no metabolismo de vegetais, apresentam importantes funções fisiológicas e ecológicas (Raven, 1976). Segundo Fraenkel (1959), as substâncias do metabolismo secundário apresentam papel adaptativo, agindo como uma defesa química contra os insetos fitófagos. Além deste papel, outras funções podem ser citadas como, por exemplo, atrativos para polinizadores, defesas químicas contra

microorganismos, ou mesmo contra outras plantas, proteção contra radiação ultravioleta, suporte estrutural, estocagem temporária de nutrientes, regulação de fitohormônios, resistência à seca, proteção das raízes contra ambientes ácidos e redutores e mediadores de interações planta-bactérias fixadoras de nitrogênio (Harborne, 1972; Wallace & Mansel, 1976; Harborne, 1978; Rosenthal & Jansen, 1979; Hedin, 1983; Rice, 1984; Khan & Harborne, 1990, 1991; Herms & Mattson, 1992; Bruin et al, 1995; Baldwin, 1998; Kessler & Baldwin, 2001). Em comparação aos metabólitos primários, estes metabólitos são freqüentemente acumulados em pequenas quantidades nas plantas, sendo sintetizados em determinados tipos de células especializadas e em determinados estágios de desenvolvimento (Salisbury & Ross, 1985). Nenhuma espécie de planta possui o mesmo perfil de substâncias secundárias, conseqüentemente, estas são de profunda importância na seleção de hospedeiras por insetos. Essas substâncias podem atuar como atraentes, repelentes, estimulantes ou inibidores da alimentação ou oviposição em insetos fitófagos (Bernays & Chapman, 1994). As atraentes orientam o inseto em direção à fonte de estímulo, enquanto as repelentes causam ação contrária. As estimulantes desencadeiam a alimentação ou a oviposição enquanto os inibidores da alimentação retardam essas atividades (Hanson, 1983).

1.2. Defesas químicas induzidas e constitutivas no contexto da teoria da otimização de defesas em plantas

Do ponto de vista da teoria de otimização de defesas em plantas, as defesas químicas podem ser divididas em duas categorias, induzida e constitutiva. Esta teoria, originalmente postulada por McKey (1974) e logo depois rediscutida por Rhoades

(1979), se baseia em três fatores: (1) toda defesa tem um custo, ou seja, recursos alocados para a defesa não podem ser alocados para outras funções simultaneamente; (2) o impacto da perda de tecido da planta pelo ataque de algum herbívoro depende das características do tecido afetado, uma vez que nem todas as partes da planta têm o mesmo valor adaptativo dentro de cada fenofase; e (3) algumas partes e tecidos das plantas têm maior probabilidade de serem atacadas do que outras. Assim sendo, as substâncias de defesa devem ser preferencialmente alocadas para partes ou tecidos mais valiosos em cada fase de seu desenvolvimento e que tenham grande probabilidade de serem atacadas por herbívoros específicos.

As defesas induzidas podem estar relacionadas o com aumento do nível mínimo de defesa já presente (níveis constitutivos) ou podem iniciar-se diante de um quadro onde não havia substâncias de defesa presentes. O primeiro benefício da defesa induzida é que através dela, a utilização de recursos metabólicos, ocorre em função de uma pequena probabilidade de ataque. Assim, a defesa propriamente dita e o custo relacionado com esta defesa aumentam apenas quando os benefícios desta defesa resultam em vantagem para a planta. A grande desvantagem da utilização do sistema de defesa induzida é que existe um período de tempo entre o ataque e a resposta de defesa. Em alguns sistemas o tempo de resposta de defesa química é menor que 4 h, porém em outros, como a de defesas mecânicas, o tempo pode ser de até várias semanas levando a planta a correr riscos durante este período de espera (Dixon et al. 1994). Assim, mesmo a resposta da defesa induzida sendo em função de um ataque efetivo pontual, a confiabilidade neste tipo de defesa varia de acordo com o tempo da resposta induzida e a probabilidade de ataque. Populações que possuem uma alta probabilidade de sofrerem ataque e um longo período de resposta induzida, não têm

vantagens em lançar mão da defesa induzida, mas sim de uma defesa constitutiva mais potente. Já as populações que têm uma baixa probabilidade de serem atacadas devem utilizar a defesa induzida, economizando os custos de uma defesa que, na maioria do tempo, não seria utilizada.

Trabalhos de Mattson et al. (1988) e Herms & Mattson (1992) mostraram que plantas que já possuem níveis altos de defesas constitutivas têm pequenas vantagens sobre plantas que possuem defesas induzidas. Nestes casos, os sistemas de defesa induzida seriam redundantes e proveriam nenhuma ou quase nenhuma vantagem adicional para as plantas com defesa constitutiva. Plantas com alto nível de resistência constitutiva normalmente não possuem mecanismos efetivos de defesa induzida, porém as evidências de uma relação inversa de defesa constitutiva x induzida nem sempre são verdadeiras. Em coníferas, o acúmulo de monoterpenos através de indução é correlacionado negativamente com níveis constitutivos (Lewinsohn et al., 1991; Raffa, 1991; Lerdau et al., 1994). De forma igual, plantas perenes com altos níveis de resistência constitutiva (muitas espécies de *Pinus*) têm respostas de indução menores, enquanto que plantas com níveis menores de defesa constitutiva (pinheiros, cicutas e cedros) utilizam quase que exclusivamente as defesas induzidas (Lewinsohn et al., 1991; Raffa, 1991). Outro exemplo onde ocorre relação inversa na produção de substâncias secundárias para defesa induzida e constitutiva é na espécie *Pastinaca sativa* (Apiaceae). Zangerl & Rutledge (1996) demostraram que as folhas e raízes dessas plantas são bastante induzíveis na produção de furanocumarinas, porém estes órgãos são os que possuem os menores níveis constitutivos. Já os frutos destas plantas têm níveis constitutivos altos, mas não são induzíveis. Em outras plantas, observações demonstraram que a relação entre as defesas constitutivas e induzidas

não obedecem esse padrão. Folhas de plantas de tremoço (Leguminosae) com níveis iniciais altos de alcalóides são as que possuem maior capacidade de serem induzidas através de danos mecânicos, quando comparadas com controles não danificados (Johnson et al., 1989). Clones de batata que possuem expressões constitutivas de defesa também possuem respostas de indução a danos mecânicos (Hildmann et al., 1992). Stock et al. (1993) também descreveram que os níveis de resistência constitutiva são associados positivamente com o aumento de taninos através de indução mecânica em três espécies de arbustos africanos. O trabalho de van Dam & Vrieling (1994) indicou a falta de relação entre níveis constitutivos e induzidos de alcalóides pirrolizidinicos em *Cynoglossum officinale* (Boraginaceae).

Pode-se presumir, portanto, que o grande benefício para as plantas na utilização das defesas induzidas é o fato que a planta apenas utiliza os recursos necessários para a produção das substâncias de defesa quando o benefício da defesa será efetivamente utilizado. Desta forma, fica evidente que o custo da defesa é pontual e ocasional (Haukioja, 1980; Kogan & Paxton, 1983; Tuomi et al., 1991; Zangerl & Bazzaz, 1992). Estudos que estimam os custos da defesa associados com a indução de defesa são poucos (p.ex. Smedegaard-Petersen & Stolen, 1981; Baldwin, 1990, 1991) e nem sempre muito consistentes (Brown, 1998). Mais recentemente, Baldwin & Schmelz (1994) detectaram que a defesa induzida não sofreu alterações diante da redução da taxa fotossintética em *Nicotiana sylvestris* (Solanaceae). Outros trabalhos demonstraram que, diante de situações de danos mecânicos, a produção de furanocoumarinas em *Pastinaca sativa* (Apiaceae) leva à redução do crescimento das plantas, em função do gasto de energia necessário para a produção dos metabólitos de

defesa e não propriamente pela redução da capacidade fotossintética devido ao dano imposto às folhas (Zangerl et al., 1997).

1.3. Custos da defesa induzida

A hipótese de alocação de recursos é baseada na suposição de que as defesas são custosas. Poucos trabalhos quantificaram o custo dessa indução de defesa. Redman et al. (2001) utilizaram o ácido jasmônico como indutor de várias substâncias que também estão associadas a danos ocasionados por herbívoros e, dessa forma, puderam quantificar as atividades da polifenol oxidase e peroxidase (enzimas defensivas) sem ocasionar danos mecânicos, o que incorreria em custos próprios (gasto energético para cicatrização do local danificado). Esses pesquisadores compararam a produção dessas enzimas defensivas nas plantas induzidas e nas plantas controle, e examinaram as variáveis associadas com o sucesso reprodutivo das plantas de *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae). O trabalho concluiu que ocorreu um custo significativo para a planta na produção das enzimas de defesa, pois enquanto houve um aumento significativo das substâncias de defesa, houve paralelamente um decréscimo generalizado na quantidade de frutos, tempo de amadurecimento dos frutos, número de sementes por fruto, total de sementes por planta e sucesso da germinação das sementes nas plantas que foram induzidas.

Alguns exemplos mostram claramente o benefício da defesa induzida para a planta diante de ataque de herbívoros (Fowler & Lawton, 1985; Myers & Bazely, 1991; Karban, 1993). Todavia, se a teoria de otimização de defesas em plantas está correta, e as defesas têm custos e benefícios, o fator mais importante que governa o grau de confiabilidade na defesa induzida em plantas é a probabilidade de ataque. Assim,

plantas que têm alta probabilidade de serem atacadas devem ter níveis de substâncias de defesa não induzíveis altas, ou seja defesas constitutivas, uma vez que o potencial de economia de custo da defesa induzida poderia não compensar o dano na planta ocasionado pela demora no início da indução. Plantas que são raramente atacadas deveriam ter nenhum ou quase nenhum tipo de defesa constitutiva e deveriam utilizar predominantemente ou exclusivamente defesas induzidas (Zangerl & Bazzaz, 1992).

1.4. Alcalóides agindo como substâncias de defesa em plantas

Segundo Pelletier et al. (1983), "um alcalóide (termo derivado da palavra árabe *al-quali,* denominação vulgar da planta da qual a soda foi originalmente obtida) é uma substância orgânica cíclica contendo um nitrogênio em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos". Eles constituem-se num vasto grupo de metabólitos com grande diversidade estrutural, representando cerca de 20% das substâncias naturais descritas.

Inúmeros trabalhos relatam essas substâncias como tendo funções de defesa contra insetos herbívoros (Ehrlich & Raven, 1964; Fraenkel, 1969; Schoonhoven, 1972; Miller & Feeny, 1983; Wink, 1983, 1993; Baldwin, 1988a,b,c; Johnson et al., 1989; Karban & Myers (1989); Kahn & Harborne, 1990, 1991; Hartmann, 1991; Baldwin et al. 1990; Baldwin, 1991; Baldwin & Callahan, 1993; Baldwin & Ohnmeiss, 1993; Van Dam et al., 1993; Van Dam & Vrieling, 1994; Baldwin et al., 1998; Baldwin & Hamilton, 2000), porém, em inúmeras famílias de plantas faltam evidências para sustentar essa afirmação. Estudos que visam determinar os efeitos dessas substâncias em insetos herbívoros, bem como pesquisas que demonstram a sua toxicidade são de importância relevante para o entendimento dos processos envolvidos na defesa de plantas contra

insetos herbívoros. As propriedades inseticidas de alcalóides encontrados em plantas do grupo das Solanaceae são as mais bem documentadas e o metabolismo e modo de ação dessas substâncias em insetos são, talvez, os mais bem entendidos de todas as substâncias inseticidas que ocorrem naturalmente (Miller & Feeny, 1983). Além das Solanaceae, já foram determinados em outras famílias efeitos inibidores de alimentação de alcalóides sobre larvas de lepidópteros. Estas incluem substâncias oriundas da família Loganiaceae (estricnina e brucina), Rubiaceae (cafeína e quinina), Rutaceae (pilocarpina), Apocynaceae (conecina) e Leguminoseae (esparteína) (Buchanan, et al., 2000).

1.4.1. Alcalóides tropânicos

Os alcalóides tropânicos são produzidos por um número grande de plantas da família Solanaceae, e apresentam em comum a estrutura bicíclica, denominada tropano 8-metil-8azabiciclo[3,2,1]octano. O anel tropano é constituído pelos anéis pirrolidina e piperidina, podendo, conforme a orientação α ou β de um grupamento hidroxila na posição C-3, fornecer dois isômeros geométricos: tropanol (tropina) e pseudotropanol (ψ-tropanol ou pseudotropina). A esterificação do grupo hidroxila com ácidos aromáticos originam os alcalóides tropânicos de maior importância na medicina (atropina e, escopolamina) (**Figura 1**) (Mann, 1987) destacando-se por seu uso no tratamento de espasmos e cólicas, no tratamento de envenenamento com organofosforados e como anestésicos (Bacchi, 1999). As plantas mais importantes para a produção dessas substâncias são as solanáceas pertencentes aos gêneros *Hyoscyamus*, *Atropa* e *Duboisia* (Croteau et al., 2000).

Muitos estudos vêm sendo realizados com o intuito de esclarecer o papel dos alcalóides tropânicos nestas solanáceas (Evans et al., 1984; Brachet & Cosson, 1986; Parr et al., 1990; Griffin, 1992; Houmani et al., 1994), porém poucos trabalhos relatam a indução de alcalóides tropânicos abordando aspectos ecológicos. O trabalho de Khan & Harborne (1990) relata a presença dos três principais alcalóides tropânicos (hiosciamina, atropina e escopolamina) em diferentes partes de plantas de *A. belladonna* e *A. acuminata*. Esses pesquisadores verificaram que o efeito de dano mecânico em diferentes partes de plantas de *Atropa* levava a diferentes respostas quanto à produção de alcalóides tropânicos totais, sendo que os tecidos que mais responderam à indução foram os imediatamente adjacentes aos tecidos danificados. Esse aumento foi de até 150% maior que o encontrado nas plantas controle. Esses autores também verificaram que o período de 24 h após o dano mecânico era suficiente para a planta apresentar a resposta de indução. Também verificaram que danos sucessivos influenciavam o aumento da produção de alcalóides tropânicos, havendo efeito somatório que elevava os teores até 190% maiores que os do controle. O efeito desse aumento sobre insetos herbívoros não foi analisado. Os resultados também mostraram que os caules, quando danificados, tiveram os níveis de alcalóides tropânicos aumentados, chegando a valores similares aos encontrados nas raízes. Os mesmos autores demonstraram que o efeito de dano mecânico ou dano ocasionado por herbívoro generalista (*Heliothis virescens* – Noctuidae-Heliothinae) respondia de forma equivalente no que diz respeito à produção de alcalóides tropânicos. Os seus resultados mostraram que a quantidade de dano ocasionada era diretamente proporcional ao nível de alcalóides tropânicos presente nos tecidos adjacentes aos danificados e determinaram a quantidade mínima de dano mecânico e dano ocasionado

por inseto herbívoro necessária para iniciar o processo de indução. Dentro da família das Solanaceae, não há relatos do efeito da indução de alcalóides tropânicos (por dano mecânico ou herbivoria) sobre herbívoros especialistas ou generalistas.

O presente trabalho foi desenvolvido utilizando o gênero *Brugmansia* para o estudo da alocação de alcalóides tropânicos. Este gênero se originou como um subgênero de *Datura* (*D. suaveolens* e *D. arborea*) , sendo que a principal característica desta divisão, é a sua morfologia arbustiva em contraste com a morfologia herbácea das plantas do gênero *Datura.* Outras propriedades físicas, químicas e morfológicas também podem ser citadas como características de diferenciação com o gênero *Datura* (Lockwood,1963). Neste gênero incluem-se plantas chamadas popularmente de trombeta, aguadeira, trombeteira, buzina e lírio e apresentam vasta dispersão, sobretudo pela zona da mata pluvial da encosta atlântica, desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul. Sua origem vem dos países andinos e Amazonas ocidental onde vêm sendo usadas como alucinógenas a milênios pêlos povos destas regiões (Schultes & Hofmann, 1993).

2. OBJETIVOS

Foram objetivos deste trabalho verificar a alocação de alcalóides tropânicos *em B. suaveolens* bem como verificar o efeito da indução destes alcalóides, como teste da teoria de otimização de defesas em plantas. Como postula essa teoria, órgãos mais valiosos em termos de aptidão dentro de um dado estágio fenológico seriam mais protegidos, alocando maior quantidade de substâncias de defesa, seja por processos de defesa induzida ou constitutiva.

Para testar essa hipótese o trabalho foi dividido em várias etapas com objetivos específicos.

1. Padronização dos ensaios de acordo com resultados preliminares obtidos através da:

1.1. Verificação da ocorrência de variação quantitativa dos alcalóides tropânicos em diferentes posições dos órgãos dentro da mesma planta e em diferentes locais dentro do mesmo órgão.

1.2. Caracterização quantitativa dos alcalóides tropânicos em diferentes órgãos das plantas de *B. suaveolens* (folhas jovens, folhas maduras, caules, raízes, flores e frutos) em diferentes fenofases (plântulas, vegetativo, florescimento e frutificação).

1.3. Verificação das mudanças quantitativas dos alcalóides presentes nas plantas ao longo do dia (ritmo circadiano).

2. Verificar os efeitos da retirada de partes das folhas sobre a produção de alcalóides tropânicos em *B. suaveolens*, visando determinar se ocorrem ou não alterações nas concentrações dessas substâncias na planta durante o período que segue o dano mecânico (respostas de indução).

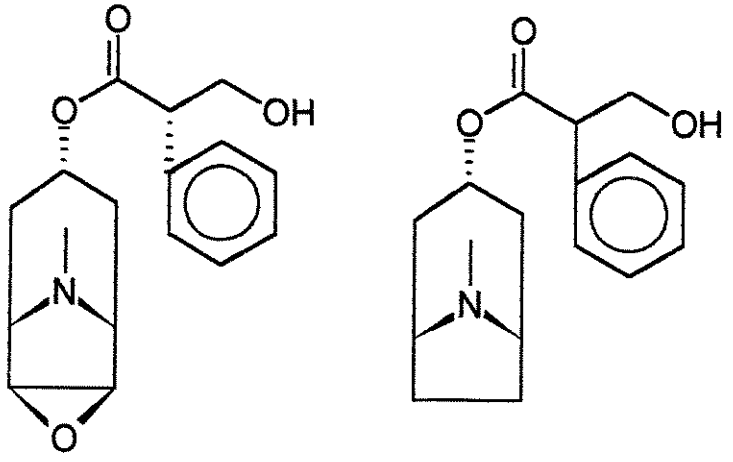
3. Verificar o efeito de alcalóides tropânicos sobre herbívoros generalistas através de três tipos de ensaios:

3.1. Ensaios de dupla escolha, nos quais verificou-se a preferência alimentar de herbívoros generalistas, comparando a alimentação dos herbívoros em plantas controle e em plantas de *B. suaveolens* contendo escopolamina como alcalóide tropânico majoritário.

3.2. Ensaios visando verificar a resistência de herbívoros a alcalóides tropânicos (escopolamina), através da relação entre a taxa de consumo relativo e taxa de crescimento relativo de larvas alimentadas em plantas controle e plantas *de B. suaveolens* com diferentes concentrações de escopolamina.

3.3. Ensaios visando verificar a taxa de sobrevivência de herbívoros generalistas submetidos a alimentação com dietas acrescidas de diferentes concentrações de escopolamina.

4. Verificar o efeito da indução sobre o crescimento das plantas (custo da indução), através da comparação das medidas de área foliar de plantas controle e plantas submetidas a tratamentos de indução através de dano mecânico ou por metil jasmonato.



1. (-)-Escopolamina
M^+ 303

2. (±)-Atropina
M+ 289

Figura 1. Alcalóides tropânicos mais abundantes em *Brugmansia suaveolens*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Organismos

3.1.1. *Brugmansia suaveolens*

Dezessete indivíduos de *Brugmansia suaveolens* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Bercht. & J. Presl. (**Figura 2**) foram coletados na região da Serra do Japi, Jundiaí, São Paulo, ao longo do riacho que nasce junto à represa do DAE (23°21'S; 46°56'W, 740 m de altitude). Os indivíduos foram propagados por estaquia e seus clones utilizados em todos os ensaios do trabalho. Estacas lenhosas de 10 a 20 cm foram retiradas da parte intermediária dos galhos de cada indivíduo, tiveram as suas folhas retiradas, foram mergulhadas em água e mantidas dentro de fitotrons com fotoperíodo de 12 h utilizando uma combinação de lâmpadas incandescentes e fluorescentes, intensidade luminosa de 40 $\mu mol/m^2.s$ e temperatura constante de 25±2°C. Após o enraizamento, as plantas foram transferidas para vasos plásticos de 5 L contendo terra:areia (2:1), colocadas em viveiro com sombrite 50% e tratadas com solução nutritiva de Hoagland (Gamborg & Wetter, 1975) por 2 dias; após esse período foram irrigadas normalmente. Dez plantas de cada indivíduo foram transferidas para o campo experimental do CPQBA, UNICAMP a fim de servirem como um banco de material vegetal de onde poderiam ser extraídas novas estacas para propagação. Excicatas foram depositadas no Herbário do CPQBA, UNICAMP (n° 197) e Herbário do Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, UNICAMP (UEC 35857). Todo o material coletado para análises foi desidratado durante dois dias à temperatura de 50°C. O material desidratado foi triturado, embalado em vidros herméticos e mantido a -10°C para futura utilização.

Dos 17 indivíduos coletados na Serra do Japi, obteve-se sucesso de propagação

de 10 (indivíduos 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13 e 15). Esses 10 indivíduos se aclimataram com facilidade à área do campo experimental do CPQBA e serviram durante todo o desenvolvimento do trabalho como fonte de estacas para propagação de clones de cada genótipo. Não ocorreram problemas de pragas e doenças em nenhum dos indivíduos estabelecidos no campo experimental.

3.1.2. Outros organismos

3.1.2.1. *Spodoptera frugiperda*

Em todos os ensaios onde houve a utilização de herbívoros generalistas, foram utilizadas larvas da mariposa *Spodoptera frugiperda* (Smith.) (Noctuidae). O início da criação de larvas de *S. frugiperda* se deu através da aquisição de ovos cedidos pelo Laboratório de Entomologia, Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia, UNICAMP. A criação das larvas foi realizada conforme descrito por Ferraz (1991), no interior de câmaras com temperatura constante de 25±1°C e fotoperíodo de 12 h.

3.1.2.2. *Ricinus communis*

Folhas de *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae), uma das plantas hospedeiras de larvas de *S. frugiperda* , tendo desempenho igual à sua planta hospedeira principal, *Zea mays* (Poaceae) (Ferraz, 1991), foram utilizadas como controle nos ensaios de alimentação das larvas com dietas naturais. As coletas dessa planta foram realizadas na região de Barão Geraldo, Campinas, sempre momentos antes da utilização de suas folhas. Os cortes foram realizados sempre na inserção dos galhos secundários com o caule principal. O material coletado foi acondicionado em papel de filtro úmido e colocado em sacos plásticos até a sua utilização.

3.2. Análises químicas

3.2.1. Extração e caracterização de alcalóides tropânicos

Partes de plantas secas (≅ 2,0 g) foram moídas em moinho de faca de bancada e extraídas por 3 min com 5,0 mL de EtOH em Politron à velocidade intermediária. Os extratos etanólicos foram centrifugados a 3.000 rpm por 8 min e os sobrenadantes coletados. O processo acima foi repetido três vezes a fim de assegurar completa extração dos alcalóides. Testes preliminares com *B. suaveolens* mostraram que este número de extrações é suficiente. Os três sobrenadantes etanólicos combinados foram evaporados em rotavapor à baixa pressão e temperatura de 50°C. O resíduo resultante foi acidificado com 10,0 mL de HCl aquoso 1 N e deixado em descanso por 10 min. A fase aquosa ácida foi extraída três vezes com 10,0 mL de $CHCl_3$. A fase orgânica, sem a presença de alcalóides, foi reunida e descartada. A fase aquosa ácida foi alcalinizada com NH_4OH 25% para pH 13-14, aplicada em coluna de Extrelut (Merck) contendo 15,0 g de Celite 545 e eluída com 100,0 mL de $CHCl_3$. Testes preliminares com *B. suaveolens* mostraram que este volume é suficiente para eluir totalmente os alcalóides. A solução clorofórmica foi tratada com Na_2SO_4 anidro, filtrada sob gravidade e evaporada como acima, originando uma fração de alcalóides totais presentes como base livre. Freitas et al. (1996) verificaram que alcalóides tropânicos em *B. suaveolens* se encontram somente na forma de bases livres.

Para a caracterização dos alcalóides tropânicos, os extratos de alcalóides totais foram redissolvidos em 200µl de MeOH e analisados por cromatografia gasosa-espectrometria de massas (GC-MS), em um cromatógrafo Hewlett Packard 5988, com coluna capilar SA-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µ, Sigma-Aldrich) acoplado diretamente a um detector de massa seletivo Hewlett Packard 5970. As condições utilizadas foram:

temperatura de injeção 250°C; temperatura do programa 150-300°C, 4°C/minuto; razão de divisão 1:100; gás de arraste He 1mL/min; 1,0 μL injetado (metodologia modificada de Freitas et al., 1996 e Trigo et al., 1996). Os padrões de fragmentação obtidos foram comparados com os obtidos por Ethier & Neville (1986) e Freitas et al. (1996). Escopolamina (**Figura 1**), um dos alcalóides tropânicos de *B. suaveolens* (Freitas et al., 1996), foi escolhida para ser quantificado ao longo de todos os experimentos. Para isso, os extratos de alcalóides totais foram redissolvidos em 200 μl de uma solução de 2,0 mg/mL de estearato de metila em MeOH (padrão interno), preparado pela metilação do ácido esteárico com diazometano (ver metodologia em Vogel, 1971) e analisados por cromatografia gasosa-detector de ionização de chamas (GC-FID), em um cromatógrafo a gás Hewlett Packard 5988, com coluna capilar SA-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ, Sigma-Aldrich). As condições utilizadas foram as mesmas acima. Os resultados foram expressos em mg de alcalóides/g de massa seca do material extraído. Os cálculos realizados para quantificar os alcalóides purificados foram baseados sempre na comparação entre estearato de metila e escopolamina, levando-se sempre em consideração um fator de correção F, devido à resposta do detector, pelo qual as áreas são multiplicadas (Trigo et al., 1993):

$$F = \frac{PM}{Cn.12}, \text{ sendo:}$$

F: fator de correção para a área integração no cromatógrafo de cada substância analisada; PM: massa molecular da substância analisada; C_n: número de carbonos da substância analisada.

3.2.2. Obtenção de escopolamina padrão para utilização nos ensaios

Em vários ensaios foi utilizada escopolamina padrão, adquirida comercialmente na forma de hidrobrometo de escopolamina. Para a obtenção da escopolamina na forma de base livre, o hidrobrometo de escopolamina foi tratado com NH_4OH aquoso 5% e extraído três vezes com $CHCl_3$. A fase orgânica foi tratada com Na_2SO_4 anidro, filtrada em gravidade e seca em rotavapor.

3.3. Desenhos experimentais

3.3.1. Alocação de alcalóides tropânicos dentro de partes da planta

Para se verificar a existência de variação da concentração de escopolamina dentro de diferentes partes da planta, foram realizados experimentos preliminares segundo os desenhos experimentais a segui.

3.3.1.1. Em folhas

3.3.1.1.1. Dentro da mesma folha

Dois ensaios foram realizados:

1. No primeiro, foi verificada a distribuição de escopolamina dentro de folhas de *B. suaveolens*. Discos (7 mm de diâmetro) da folha número 3 (ver **Figura 3**) de 10 indivíduos diferentes com 60 dias de idade foram retirados em diferentes locais dentro da mesma folha, conforme ilustrado na **Figura 4**. Foram realizadas coletas em quatro clones de cada indivíduo. Os discos dos quatro clones foram agrupados de acordo com o local do qual foram retirados e, após sua secagem, a concentração de escopolamina foi calculada e os dados foram analisados por ANOVA de um fator com teste *a posteriori* de Tukey para comparações múltiplas (Zar, 1999).

2. No segundo ensaio, foi verificada a concentração de escopolamina nas partes distal e proximal das folhas. Plantas com a mesma idade das descritas acima, foram utilizadas neste ensaio. Foram coletadas as folhas de número 4 (ver **Figura 3**) de 10 indivíduos. Estas foram cortadas ao meio transversalmente e a parte distal e proximal de cada folha, foram analisadas separadamente (**Figura 5**). Os resultados obtidos foram expressos conforme o ensaio anterior. A comparação entre a concentração de escopolamina nas partes proximais e distais foi realizada através de teste t pareado (Zar, 1999).

3.3.1.1.2. Folhas em diferentes posições na planta

A concentração de escopolamina foi verificada entre folhas de número 3 e 6 do mesmo indivíduo (**Figura 3**) usando uma amostragem de 10 indivíduos com aproximadamente 60 dias após o enraizamento. A comparação da concentração de escopolamina foi realizada através de teste t pareado (Zar, 1999).

3.3.1.1.3. Folhas em diferentes estágios de maturação

Neste ensaio, foram utilizadas plantas com aproximadamente 90 dias de idade, apresentando em média de 8 a 10 folhas. A concentração de escopolamina em folhas maduras (folhas de número 5 e 6) e folhas jovens (brotos em emergência e a menor folha jovem que os acompanha) foi analisada em 10 indivíduos diferentes (**Figura 6**). Os resultados foram comparados pelo teste t pareado (Zar, 1999).

3.3.1.2. Em flores

3.3.1.2.1. Dentro da mesma flor

A concentração de escopolamina foi mensurada nas partes distal e proximal de flores (**Figura 7**), coletadas de plantas de aproximadamente nove meses, cultivadas no campo experimental do CPQBA (**Figura 8**). Foram coletadas flores de cinco indivíduos diferentes. Os resultados foram comparados pelo teste t pareado (Zar, 1999).

3.3.1.3. Em frutos

3.3.1.3.1. Dentro do mesmo fruto

Foram realizados dois ensaios distintos para análises da concentração de escopolamina nos frutos de *B. suaveolens*. Plantas em fase de frutificação (aproximadamente 10 meses), cultivadas no campo experimental do CPQBA, foram utilizadas neste ensaio. Foram coletados três frutos de cada um de 10 indivíduos diferentes (**Figura 9**). No primeiro ensaio, os frutos verdes foram cortados ao meio e as partes distais e proximais (**Figura 10**) secas e extraídas conforme o método já descrito acima. No segundo, as sementes foram separadas da polpa (**Figura 11**) e analisadas separadamente, tanto para as partes distais como proximais. Os resultados foram comparados pelo teste t pareado (Zar, 1999).

3.3.2. Alocação de alcalóides tropânicos entre partes da planta em diferentes fenofases

Para verificar a alocação de alcalóides tropânicos nas diferentes fenofases de *B. suaveolens*, a concentração de escopolamina foi analisada em diferentes partes da planta, em diferentes fenofases, a saber: (1) estaca enraizada em início de brotação; (2)

plantas jovens em fase vegetativa; (3) plantas maduras em fase vegetativa; (4) plantas em floração e (5) plantas em frutificação.

Inicialmente, cinco grupos de estacas (referentes a cada fenofase) de cada um dos dezessete indivíduos coletados no campo foram transplantados em vasos nas condições descritas acima. Quando as estacas apresentavam 2 pares de folhas, coletaram-se brotos, folhas novas, raízes e caules de cada um dos 17 indivíduos. Plantas com aproximadamente 3 meses foram consideradas plantas jovens em fase vegetativa. Nessa fenofase foram coletados brotos, folhas novas, folhas maduras, raízes e caules. Os outros três grupos de estacas foram transplantados para o campo experimental do CPQBA, sendo que brotos, folhas novas, folhas maduras, raízes e caules foram coletados na fenofase planta madura em fase vegetativa; brotos, folhas novas, folhas maduras, raízes, caules e flores foram coletadas na fenofase flor; e brotos, folhas novas, folhas maduras, raízes, caules, flores e frutos foram coletados na fenofase fruto. No campo, foram cultivadas duas fileiras de plantas de *B. suaveolens* ao redor do cultivo experimental a fim de servir como bordadura, eliminando efeitos que pudessem ser ocasionados por fatores externos ao ensaio. Os dados de concentração foram transformados em raiz quadrada e analisados estatisticamente através de ANOVA de dois fatores (estágios fenológicos e partes da planta), com comparações múltiplas de Tukey (Zar, 1999).

3.3.3. Variação de alcalóides tropânicos ao longo do dia

Para se verificar a flutuação diária de escopolamina presente em folhas de plantas de *B. suaveolens*, foram utilizadas plantas obtidas por estaquia, com aproximadamente 3 meses de idade. Foram utilizadas 10 plantas de cada um de oito

indivíduos geneticamente diferentes. Estas foram colocadas em fitotrons com fotoperíodo de 12 h, intensidade luminosa de aproximadamente 40 µmol/m^2.s e temperatura de 25±2°C. Com início às 7:00 h as folhas dos 3° e 4° pares foram coletadas em intervalos de 3 h até atingir as primeiras 24 h. Após este período, foram realizadas coletas 48, 96 e 192 h após o início do ensaio. Os resultados foram analisados estatisticamente através do teste ANOVA com comparações múltiplas de Tukey (Zar, 1999).

3.3.4. Indução de alcalóides tropânicos por danos mecânicos

3.3.4.1. Em folhas maduras

Plantas de *B. suaveolens* obtidas por estaquia a partir de 10 indivíduos geneticamente diferentes foram cultivadas em viveiro até atingirem oito pares de folhas. As plantas foram transferidas para ambiente controlado com fotoperíodo de 12 h, intensidade luminosa de aproximadamente 40 µmol/m^2.s, temperatura de 25±2°C, umidade relativa de 60 a 70 % e irrigadas uma vez por semana com solução nutritiva de Hoagland. Após 14 dias o ensaio foi iniciado, sendo que o desenho experimental foi baseado no trabalho de van Dam et al. (1993). As plantas foram danificadas através da remoção de 50% da área foliar com o uso de tesoura, realizando-se cortes transversais nas folhas número 3, 4, 5, 6 e 7 dos indivíduos utilizados (**Figura 3**). As partes distais das folhas cortadas foram utilizadas como controle para flutuações diárias da variação de alcalóides. Como as partes distais das folhas foram usadas como controles, foi necessário testar se as concentrações naturais de alcalóides variavam entre as partes proximais e distais. Esse ensaio prévio foi realizado como descrito no segundo ensaio do ítem 3.3.1.1.1. Além deste controle onde foram utilizadas as partes distais das

folhas como parâmetro para verificar as flutuações diárias dos alcalóides, também foi realizado o ensaio de flutuação diária descrito no item 3.3.3.

No experimento, foram utilizadas 50 plantas, que foram divididas em cinco lotes de 10 plantas. As plantas correspondentes aos diferentes tempos de indução foram danificadas e coletadas em estafeta (**Figura 12**). Os tempos de indução escolhidos entre o dano e as coletas foram de 0, 24, 48, 96 e 192 h após do dano inicial das folhas. No tempo 0, o primeiro grupo de 10 plantas foi danificado através da retirada de 50% da área foliar. Após 24 h, as partes proximais das plantas danificadas foram coletadas e denominadas de I24 (referindo-se à indução de 24 h). Ao mesmo tempo, as partes distais de um segundo grupo de plantas foram coletadas e denominadas C24 (referindo-se ao controle do tempo de 24 h). A parte proximal das folhas danificadas neste horário foram coletadas 48 h após o dano e denominadas I48. Ao mesmo tempo da coleta das partes proximais de 48 h, foram danificadas mais um grupo de plantas as quais tiveram 50% de suas folhas retiradas e utilizadas como controle 48 h (C48). Após 96 h deste último dano foliar, as partes proximais das folhas foram coletadas e denominadas I96. Outro lote de plantas foi danificado e as partes distais denominadas de C96. Após 192 h, as folhas proximais danificadas foram coletadas (I192) e outro lote de plantas teve 50% da sua área foliar retirada para servir de controle do tempo de 192 h (192). As partes distais serviram de controle (comparando C0, C24, C48, C96 e C192) das flutuações diárias e as partes proximais, foram utilizadas para verificar as variações causadas pelos danos (comparando I0, I24, I48, I96 e I192). As diferentes folhas de cada indivíduo (folhas de número 3, 4, 5, 6, e 7) coletadas em cada tempo foram misturadas, secas e analisadas como descrito anteriormente. Os resultados foram expressos em razão de indução (mg de escopolamina por g massa seca da parte

proximal/mg de escopolamina por g massa seca da parte distal) e analisados estatisticamente através do teste ANOVA com comparações múltiplas de Tukey (Zar, 1999).

3.3.4.2. Em folhas maduras visando alterações nos brotos apicais

Diante dos resultados obtidos no ensaio visando quantificar a razão de indução de escopolamina por dano mecânico na própria folha danificada, foram realizados ensaios com o intuito de verificar se ocorre algum tipo de indução que fosse transmitida para outras partes da planta. Assim, este ensaio teve como objetivo verificar se danos em folhas maduras desencadeiam algum tipo de alteração relativa à produção de escopolamina nas folhas jovens em emergência. Foram utilizadas neste ensaio, plantas de *B. suaveolens* com 3 meses de idade. O ensaio foi conduzido dentro de viveiro no Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia, UNICAMP. Vinte plantas obtidas por estaquia foram divididas em dois lotes de 10 plantas cada. No primeiro lote de plantas as folhas de número 4 e 6 (folhas maduras) foram danificadas retirando-se 50 % da sua área foliar. O material vegetal retirado foi denominado controle 0 h (C_0). O segundo lote de 10 plantas teve os seus brotos apicais retirados. Esses foram denominados brotos 0 h (B_0). Após 24 h do início do ensaio (retirada de 50% da folha), as partes proximais das folhas danificadas foram coletadas e chamadas de induzidas 24 h (I_{24}). Ao mesmo tempo, os brotos apicais das plantas danificadas também foram coletados e chamados de brotos 24 h (B_{24}). Todas as amostras foram colocadas em estufa a 50±2°C por 2 dias e extraídas para escopolamina, como descrito anteriormente. Os resultados foram expressos através das razões de indução dos brotos apicais, calculadas através da divisão dos valores B_{24}/B_0 e os valores de razão

UNICAMP

de indução das folhas maduras, calculadas pela divisão I_{24}/C_0. Os resultados foram comparados pelo teste t pareado (Zar, 1999).

3.3.4.3. Em flores

Foram utilizadas plantas em estágio de florescimento com aproximadamente 1 ano. Os ensaios foram conduzidos, danificando três flores de cada um de oito indivíduos geneticamente diferentes através da retirada de 50% da sua área. As partes distais retiradas (**Figura 7**) foram utilizadas como controle. Após 24 h do dano mecânico, as partes proximais das flores foram retiradas das plantas e chamadas de induzidas. As amostras foram colocadas em estufa a 50±2°C por 2 dias e extraídas para escopolamina, como descrito anteriormente. Os resultados foram comparados pelo teste t pareado (Zar, 1999).

3.3.4.4. Em frutos

Foram utilizadas neste ensaio plantas em estágio de frutificação, com aproximadamente 1 ano e 2 meses. Os ensaios foram conduzidos danificando-se dois frutos de cada um de oito indivíduos geneticamente diferentes através da retirada de 50% da sua área. As partes distais retiradas (**Figura 10**) foram chamadas de controle. Após 24 h, as partes proximais dos frutos danificadas foram retiradas das plantas e chamados de induzidos. Todas as amostras foram colocadas em estufa a 50±2°C por 2 dias e extraídas para escopolamina como descrito anteriormente. Os resultados foram comparados pelo teste-t pareado (Zar, 1999).

3.3.5. Efeito da escopolamina em *Spodoptera frugiperda*

Estes ensaios foram realizados para verificar se a escopolamina, causa efeitos tóxicos ou inibidores de alimentação em larvas de *S. frugiperda* (inseto generalista comumente utilizado em ensaios desta natureza; p.ex. Hernández et al., 1999). Ensaios foram realizados através da relação entre as taxas de consumo relativa (TC_sR) e as taxas de crescimento relativo (TC_RR) (Blau et al., 1978, Miller & Feeny, 1983), os quais foram calculados como abaixo:

TC_sR = (massa inicial de folhas – massa final de folhas)/massa inicial da larva

TC_RR = (massa final da larva – massa inicial da larva)/massa inicial da larva

As massas secas iniciais de larvas e folhas foram estimadas através da regressão linear da massa seca em função da massa fresca. Os efeitos tóxicos e inibidores de alimentação da escopolamina foram observados através da regressão linear tendo como variável independente o TC_sR e como variável dependente o TC_RR controle, conforme o método de Blau et al. (1978) (ver também Rausher, 1982). Se a substância é tóxica, o organismo consome a mesma quantidade de alimento, diminuindo a sua TC_RR em relação ao controle. Se a substância é inibidora de alimentação, o organismo diminui a TC_sR quando comparado com o do controle e, conseqüentemente, a TC_RR. Uma ANOVA foi conduzida para testar se as inclinações das retas de regressão eram significativas. Como a maioria das inclinações não apresentou diferenças significativas, não foi possível conduzir uma comparação das inclinações e interceptos entre as retas através de uma ANCOVA. Portanto, os resultados de TC_sR e TC_RR foram analisados separadamente através de ANOVA de um fator com comparações múltiplas a posteriori de Tukey (Zar, 1999).

Foram medidos os efeitos de dietas a base de folhas de *B. suaveolens* contendo diferentes concentrações de escopolamina sobre o crescimento e consumo de larvas de

S. frugiperda. As dietas artificiais foram retiradas 24 h antes do início dos ensaios, período no qual as larvas ficaram em jejum. Nos ensaios foram utilizados, como controle, dietas a base de folhas de *Ricinus* e, como dietas experimentais, folhas de *B. suaveolens* apresentando diferentes concentrações de escopolamina. Durante todo o ensaio (duração de 24 h) as larvas foram alimentadas com folhas em abundância.

3.3.5.1. *Ricinus communis* x *Brugmansia suaveolens*

Cento e vinte larvas foram pesadas e divididas em quatro lotes de 30 larvas cada. O primeiro lote foi colocado dentro de frascos contendo folhas de *R. communis* previamente pesadas. O segundo, terceiro e quarto lotes foram colocados em frascos contendo folhas previamente pesadas de *B. suaveolens* com teores de 0,1, 2,0, e 5,0 mg de escopolamina/g massa seca de folhas, respectivamente. Após 24 h de alimentação, as folhas e as larvas foram novamente pesadas e as taxas de consumo relativo (TC_sR) e taxas de crescimento relativo (TC_RR) calculadas.

3.3.5.2. *Ricinus communis* x *Brugmansia suaveolens* induzidas por danos mecânicos

Cento e vinte e cinco larvas de *S. frugiperda* foram pesadas e divididas em cinco lotes de 25 larvas cada. O primeiro lote de larvas foi colocado dentro de frascos contendo folhas de *R. communis* previamente pesadas (controle). O segundo e terceiro lotes foram pesados e colocados em frascos contendo as partes distais de folhas de plantas de *B. suaveolens* (controle da indução). Estas foram obtidas através da retirada de 50% da área foliar das folhas de número 3, 4, 5 e 6 de plantas com baixos e altos teores de escopolamina (em média 0,1 e 5,0 mg de escopolamina/g massa seca de

folhas respectivamente – genótipos 4 e 11, respectivamente). Após 24 h de alimentação, as folhas e as larvas foram novamente pesadas. Concomitantemente, as partes proximais das folhas danificadas (induzidas) foram colocadas em frascos e serviram de alimento para o 4° e 5° lotes de larvas. Após 24 h, as larvas e folhas proximais comidas foram também pesadas e a TC_sR e a TC_RR calculadas como já descrito no item anterior.

3.3.5.3. Mortalidade de herbívoros generalistas submetidos a diferentes concentrações de alcalóides tropânicos

Neste ensaio, foi testado o efeito da escopolamina padrão sobre o desenvolvimento de larvas de *S. frugiperda*, do período larval até o empupamento. Durante todo o ensaio, as larvas de *S. frugiperda* foram mantidas em câmara controlada (27±2°C e 12 h de luz). Foi adicionada às dietas, escopolamina nas concentrações de 0, 0,025, 0,25, 0,5 e 2,5% da massa seca da dieta, concentrações estas similares às que ocorrem na natureza (ver Resultados & Bacchi, 1999).

Cento e vinte e cinco larvas no 2° instar foram divididas em cinco lotes de 25 larvas cada um. Cada lote foi alimentado *ad libidum* com dieta acrescida de cada uma das concentrações de escopolamina descritas acima. As dietas foram trocadas todos os dias. Ao mudarem de 3° para 4° instar, as larvas foram colocadas em frascos individuais para evitar canibalismo e as dietas continuaram a ser trocadas até a pupação. Para cada tratamento foi analisado, o número de larvas que sobreviveram até atingir a fase de pupa, o tempo necessário para atingir essa fase e o peso das pupas. A primeira variável foi analisada usando-se o teste de comparação múltipla para proporções. As duas últimas variáveis foram analisadas estatisticamente através de

ANOVA de um e dois fatores, respectivamente, usando teste de comparações múltiplas de Tukey (Zar, 1999).

3.3.6. Indução de escopolamina através de jasmonato de metila: Efeito sobre a alocação de recursos para o crescimento das plantas *de Brugmansia suaveolens*

A descoberta da utilização de sinais endógenos pelas plantas como ativadores de respostas induzidas ajudou muitos pesquisadores a utilizarem alguns métodos para ativar as defesas independentemente do ataque de herbívoros ou mesmo de danos mecânicos. A utilização de jasmonato de metila (MeJa) com o intuito de aumentar a síntese de alcalóides tropânicos, pode ser útil na determinação do custo envolvido nesta indução, uma vez que estaria levando ao aumento das substâncias induzíveis sem a necessidade de remoção de partes da planta, o que incorre em gastos energéticos próprios. Com o objetivo de verificar o impacto da defesa induzida sobre a alocação de recursos relacionados com o crescimento da planta diante da produção de metabólicos de defesa, este ensaio foi realizado comparando-se o aumento de área foliar de plantas submetidas a tratamentos com MeJa com plantas controle não tratadas. Foram também verificados se os aumentos nas concentrações de escopolamina nas plantas tratadas com MeJa correspondem aos aumentos obtidos através de danos mecânicos.

Foram utilizadas plantas de *B. suaveolens* com 3 meses de idade. O ensaio foi realizado dentro de ambiente controlado, com fotoperíodo de 12h, intensidade luminosa de aproximadamente 40 $\mu mol/m^2.s$ e temperatura de 25±2°C. Foram utilizadas 36 plantas divididas em quatro lotes de nove plantas cada. O primeiro lote de plantas foi

submetido a tratamento com H_2O servindo como controle. No segundo lote de plantas, foi aplicado MeJa na concentração de 5,0 μg, no terceiro 50 μg e no quarto lote as folhas foram danificadas através da retirada de 50% da sua área foliar (as partes das folhas retiradas foram utilizadas como controle da escopolamina presente no início do ensaio). A aplicação foi realizada através de injeção de 10 mL do MeJa (nas concentrações citadas acima) no solo perto da base das plantas (5 mL de cada lado da planta). Após 12 dias da aplicação do MeJa e da realização do dano foliar, as folhas foram coletadas, secas em estufa a 40°C durante 2 dias, extraídas para escopolamina e analisadas quantitativamente, como já descrito anteriormente.

Paralelamente, foram medidas as áreas foliares totais (cm^2) de todas as plantas submetidas aos tratamentos no tempo 0 h e após 12 dias, utilizando um medidor de área foliar Licor Li 3000. O tratamento controle também foi avaliado. A taxa de crescimento foliar relativa foi calculada a partir da fórmula TC_RFR = (área ao final do 12°dia – área inicial)/área inicial. As TC_RFRs das plantas submetidas aos tratamentos e das plantas controle foram comparadas com as concentrações de escopolamina obtidas para os mesmos tratamentos. As TC_RRFs e as concentrações de escopolamina foram analisadas estatisticamente através do teste ANOVA, com comparações múltiplas de Tukey (Zar, 1999).

Figura 2. Planta adulta de *Brugmansia suaveolens* com aproximadamente 12 meses de idade, cultivada no campo experimental do CPQBA – UNICAMP.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

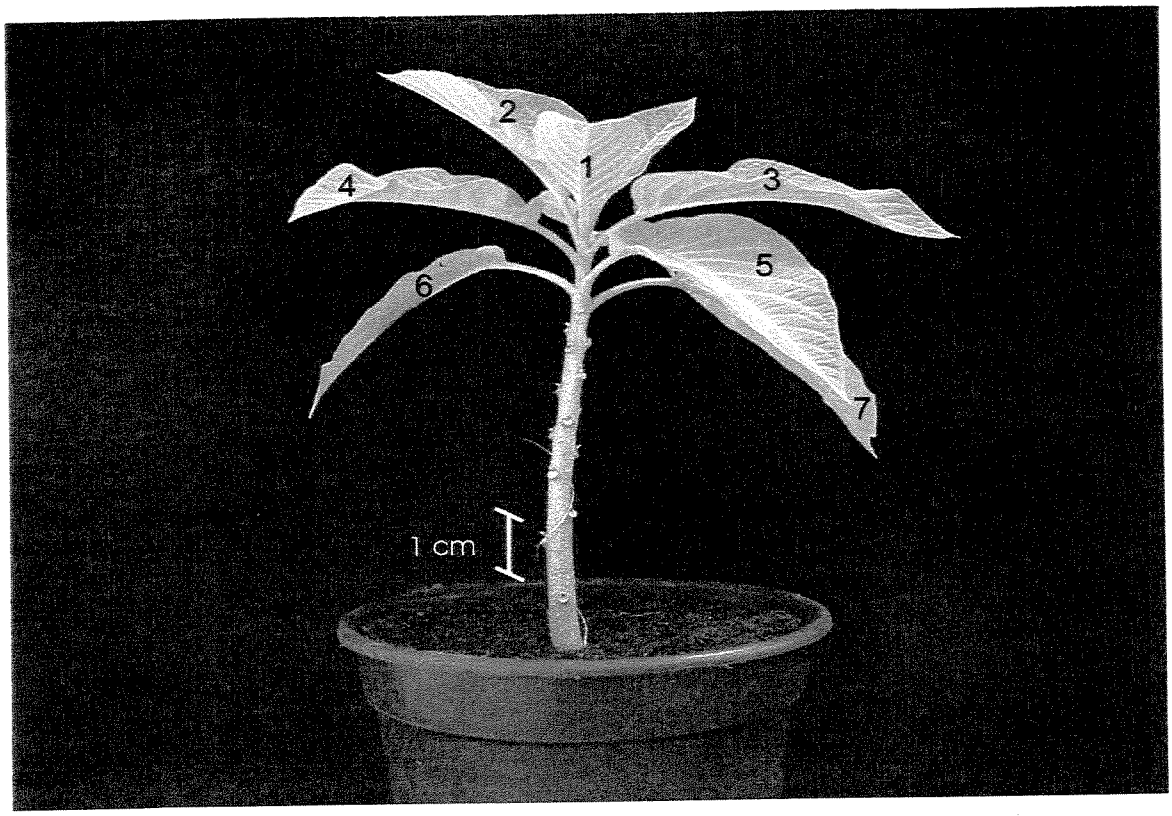


Figura 3. Vista lateral de uma planta de *Brugmansia suaveolens* proveniente de estaquia, com aproximadamente 60 dias de idade. Notar as folhas 3 e 6 que foram utilizadas no ensaio de diferentes posições dentro da planta.

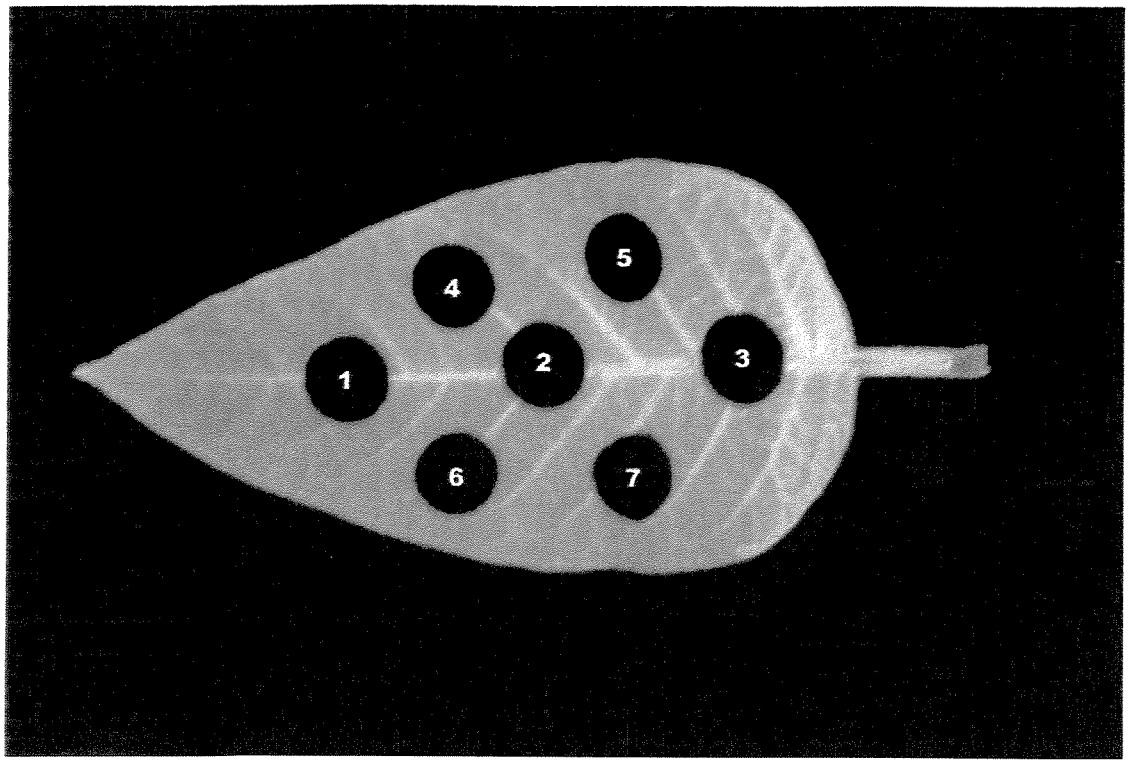


Figura 4. Discos coletados nas folhas de *Brugmansia suaveolens* no ensaio de microdistribuição de escopolamina.

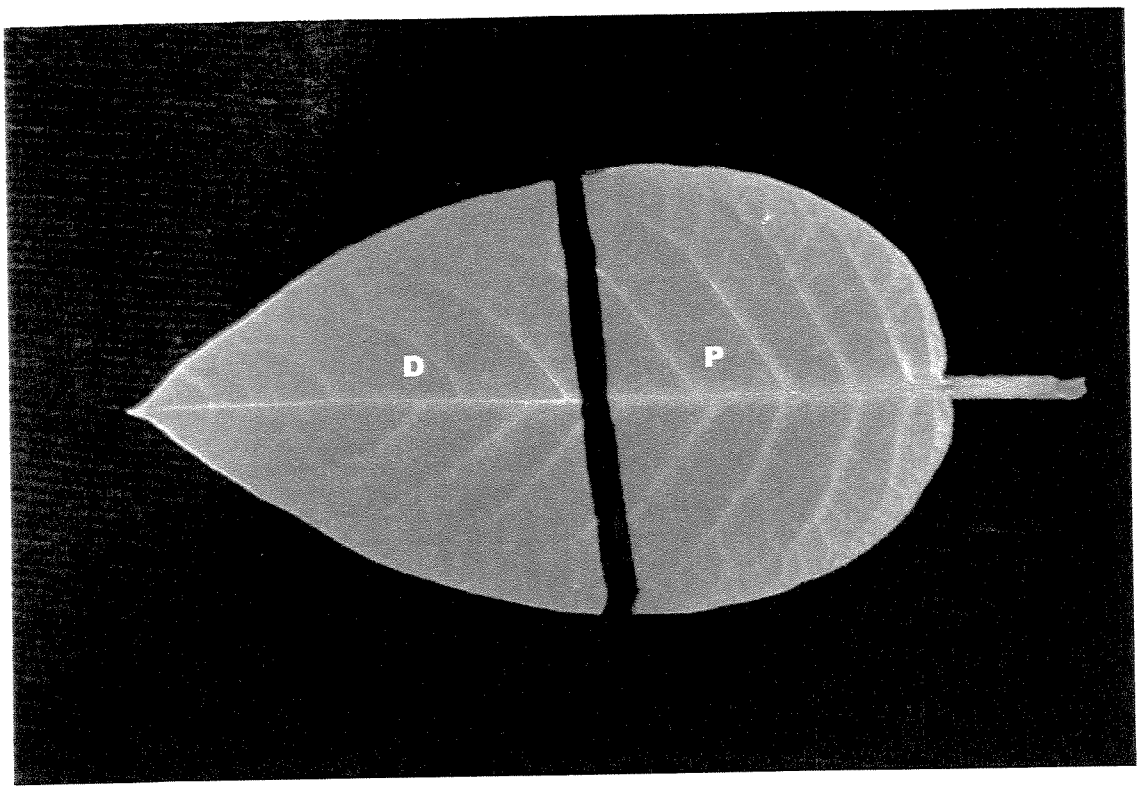


Figura 5. Folhas de *Brugmansia suaveolens* submetidas ao tratamento de retirada de 50% da sua área foliar, através de corte transversal (P - parte proximal, induzida; D – parte distal, controle).

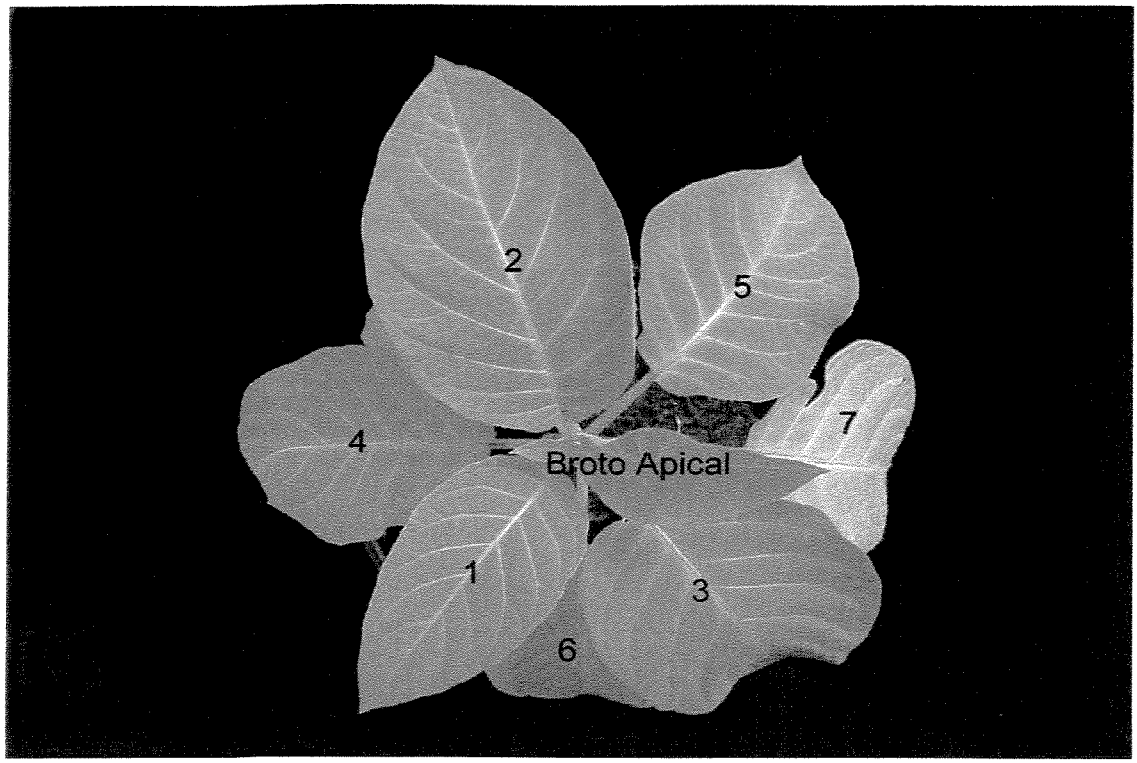


Figura 6. Vista superior de uma planta de *Brugmansia suaveolens* proveniente de estaquia com aproximadamente 60 dias de idade. Notar as folhas 5 e 6 que foram utilizadas como folhas maduras e o broto apical em emergência e a primeira folha, que foram utilizadas como folhas jovens, no ensaio de folhas maduras x folhas jovens.

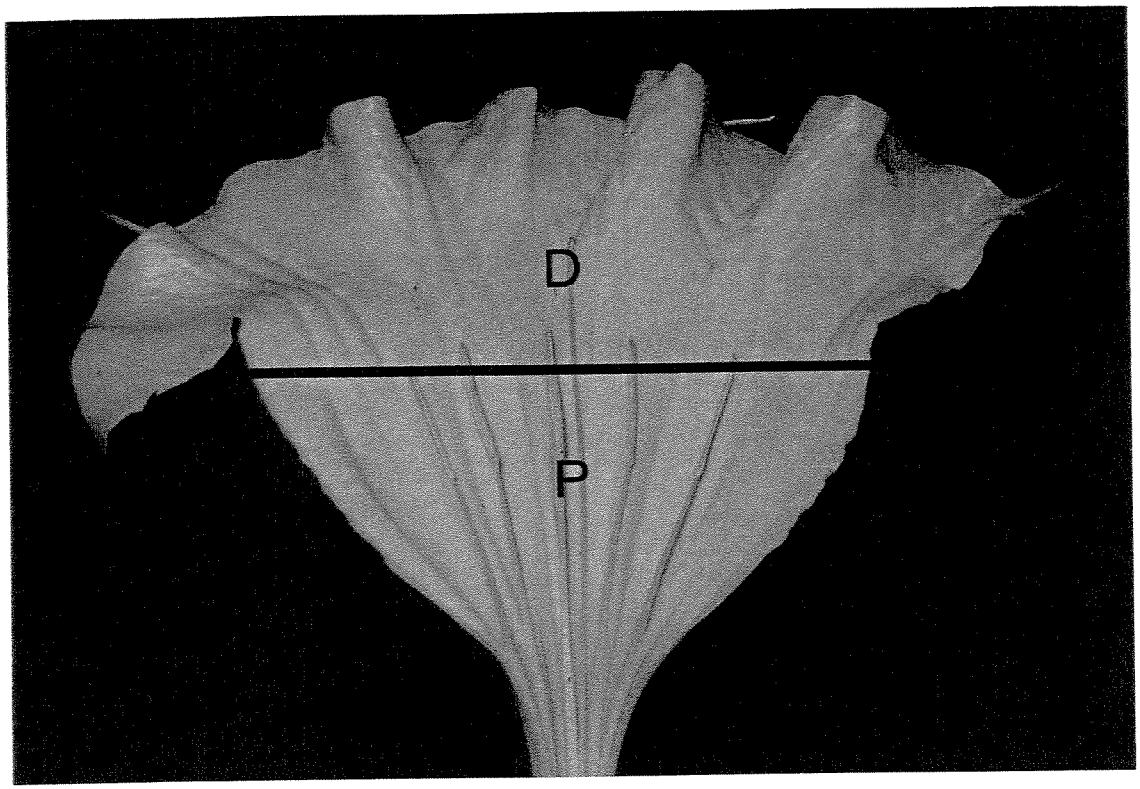


Figura 7. Flor de *Brugmansia suaveolens* danificadas através da retirada de 50% de sua área, através de corte transversal (P - parte proximal, induzida; D – parte distal, controle).

Figura 8. Planta de *Brugmansia suaveolens* com aproximadamente 9 meses de idade em fase de florescimento, sendo cultivada no campo experimental do CPQBA – UNICAMP.

Figura 9. Plantas de *Brugmansia suaveolens* em fase de frutificação no campo experimental do CPQBA – UNICAMP.

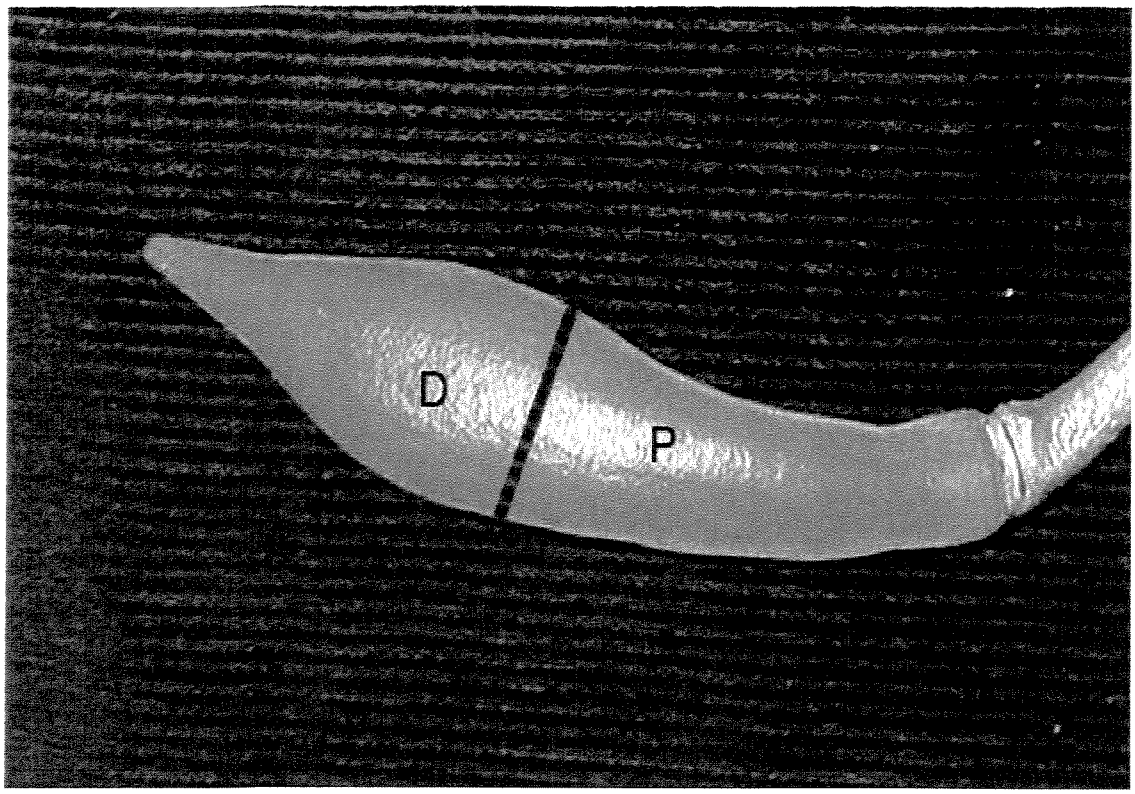


Figura 10. Fruto verde cortado ao meio. P - parte proximal - induzida; D – parte distal - controle.

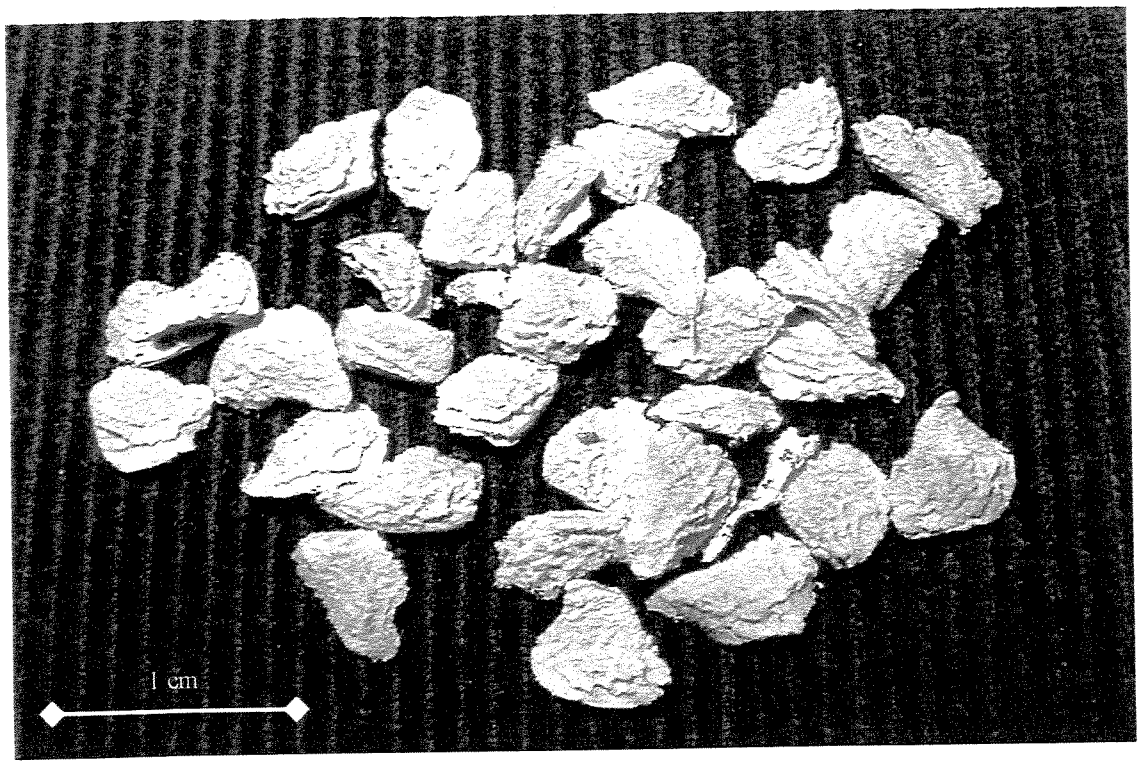


Figura 11. Sementes de *Brugmansia suaveolens* obtidas de frutos maduros.

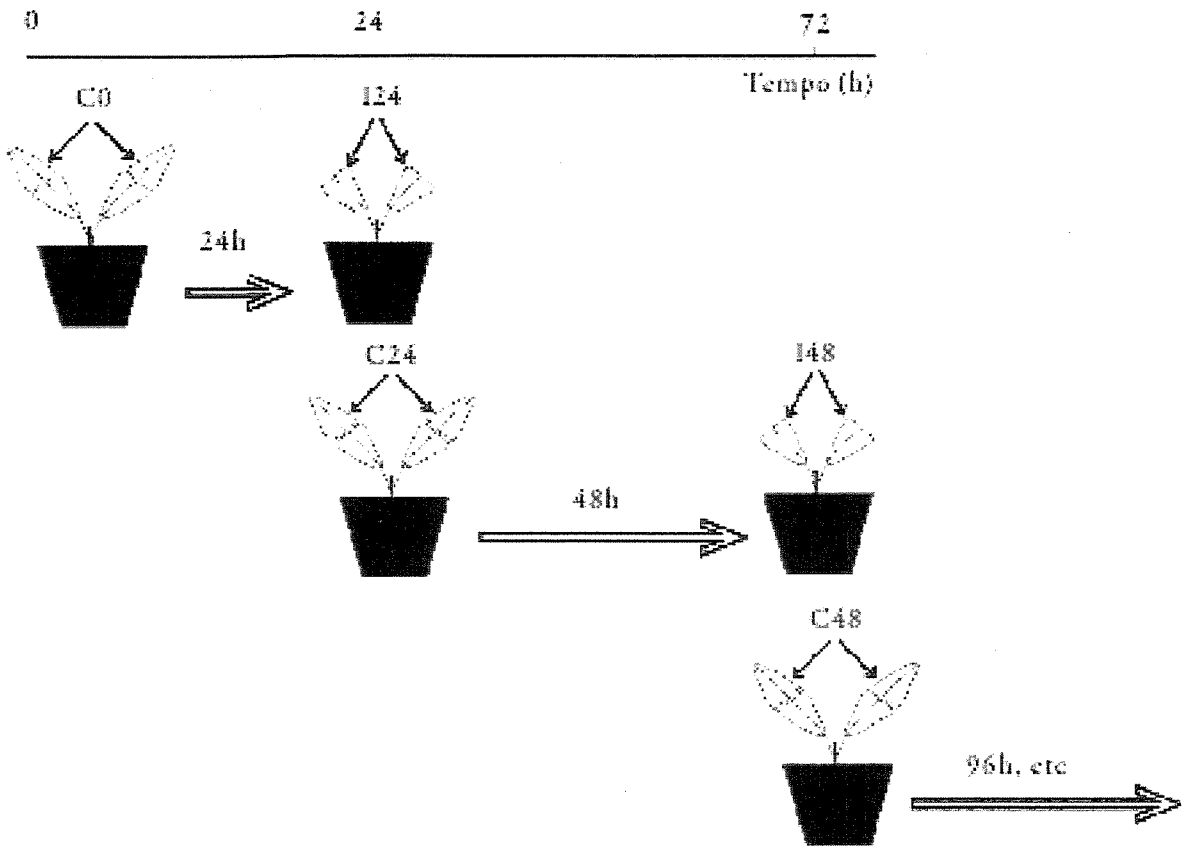


Figura 12. Procedimento realizado no ensaio de indução mecânica. Plantas foram danificadas em estafeta. As partes distais retiradas através do dano mecânico das folhas em cada tempo (C_n) serviram como controle das partes proximais induzidas do tempo imediatamente anterior (I_n).

4. RESULTADOS

4.1. Alocação de alcalóides tropânicos dentro de partes da planta

4.1.1. Em folhas

Foi observada uma grande variação na concentração de escopolamina em folhas na pequena população de *B. suaveolens* coletada na mata da Serra do Japi. Foi observado que poucos indivíduos possuem altas concentrações de alcalóides tropânicos totais enquanto muitos possuem concentrações baixas, levando a uma freqüência de distribuição do tipo log-normal (**Figura 13**).

Não foram encontradas diferenças significativas na concentração de escopolamina entre a parte distal (1,71 ± 0,16 mg/g, média ± erro padrão) e proximal (1,76 ± 0,15 mg/g) das folhas (teste t pareado, t=0,3620; n=10; $P_{bicauldal}$=0,726). Também não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de escopolamina entre diferentes partes da mesma folha (ANOVA de um fator, $F_{6,21}$ = 2,158, p = 0,089, n = 7. Ver diferentes partes da folha na **Figura 4**). Não há diferenças significativas entre a concentração de escopolamina presente nas folhas de número 3 (0,97 ± 0,11 mg/g) e 6 (0,85 ± 0,04 mg/g) (teste t pareado, t=0,948, n=11, $P_{bicaudal}$=0,365). Brotos apicais apresentaram concentrações de escopolamina significativamente maiores que folhas maduras (**Figura 14**).

4.1.2. Em flores

A parte distal (1,42 ± 0,10 mg/g) e proximal (1,62 ± 0,10 mg/g) das flores apresentam diferenças significativas na concentração de escopolamina sendo que a parte proximal apresenta em média, 1,08 vezes a concentração da parte distal

teste (t pareado, t=5,7517, n=9, $P_{unilateral}$<0,001).

4.1.3. Em frutos

Em frutos verdes, a parte distal não difere significativamente da parte proximal quanto à concentração de escopolamina. Esse quadro não muda mesmo quando são realizadas análises separadas do conteúdo de escopolamina na polpa e nas sementes (**Figura 15**).

4.2. Alocação de alcalóides tropânicos entre partes da planta em diferentes fenofases

A concentração de escopolamina varia de acordo com o órgão analisado bem como com o estágio fenológico em que a planta se encontra (**Figura 16**). Observamos que no estágio fenológico de estaca, o caule é o órgão que concentra a maior quantidade de escopolamina, diferindo dos valores encontrados para raízes e folhas. Neste estágio, as plantas ainda não apresentavam folhas maduras. No estágio vegetativo, as folhas jovens possuem valores absolutos de concentração de escopolamina maiores que nos caules, porém estes valores não diferem estatisticamente. A escopolamina presente nestes dois órgãos (folhas jovens e caules) diferem da concentração presente nas folhas maduras e raízes. No estágio de florescimento, as maiores concentrações de escopolamina são encontradas nas flores, folhas jovens e caule. Não ocorrem diferenças significativas entre a escopolamina presente nestes três órgãos, porém estes valores diferiram dos valores de escopolamina presentes nas folhas maduras e raízes. No estágio de frutificação, a escopolamina se concentra principalmente nos frutos, diferindo da concentração

presente em todos os outros órgãos. Neste estágio, ocorreu um decréscimo da escopolamina das flores e das folhas jovens, quando comparados com o estágio de florescimento, porém os valores dentro destes dois órgãos não diferem. A escopolamina presente no caule, raízes e folhas maduras neste estágio, foram inferiores às encontradas nos outros órgãos, não diferindo entre si. A quantidade de escopolamina encontrada nas raízes em todos os estágios foi a menor de todos os órgãos. Comparando-se os diferentes órgãos dentro dos diferentes estágios fenológicos, observamos que sempre as folhas jovens possuem quantidades de escopolamina superiores às folhas maduras, raízes e caule, porém nos estágios de florescimento e frutificação, as flores e frutos, respectivamente, apresentam concentrações estatisticamente superiores às encontradas nos outros órgãos (Apêndice 1).

4.3. Variação de alcalóides tropânicos ao longo do dia

Não houve flutuação diária significativa na concentração de escopolamina nas plantas de *B. suaveolens* no decorrer das 192 h nas quais elas foram monitoradas (ANOVA de um fator, $F_{11,72} = 0,324$, $p = 0,977$, $n = 12$).

4.4. Indução por danos mecânicos

4.4.1. Em folhas

A razão de indução obtida no tempo de 24 h após o dano inicial é significativamente maior do que as razões obtidas nos outros tempos, decaindo até voltar a aproximadamente 1 em 96 h. O valor da razão de indução obtido no tempo de 48 h é significativamente maior que o encontrado em 0 h, porém, não difere dos valores encontrados para 96 e 192 h (**Figura 17**). A razão de indução média em brotos

apicais de indivíduos de *B. suaveolens* submetidos a dano mecânico nas suas folhas maduras (1,09 ± 0,09) é significativamente menor do que das próprias folhas maduras (2,49 ± 0,63) (teste t pareado, t = 2,1047, n=10, $P_{unicaudal}$=0,0323). Os brotos apicais não parecem apresentar resposta induzida.

4.4.2. Em flores

A concentração de escopolamina encontrada 24 horas após as flores serem danificadas mecanicamente (1,69 ± 0,24 mg/g) é significativamente maior que a concentração encontrada nas flores controle (1,12 ± 0,23 mg/g; valores corrigidos pelo fator de 1,08, verificado na diferença entre as partes proximais e distais das flores) (teste t pareado, t=1,9352, n=8, $P_{unicaudal}$=0,0471).

4.4.3. Em frutos

Após os danos mecânicos ocasionados pela retirada da parte distal dos frutos (50% da área dos frutos estabelecidos em plantas no campo experimental), as partes proximais danificadas, incluindo as sementes, necrosaram em 24 h, ocasionando uma queda brusca de até 80% da escopolamina (0,36 ± 0,08 mg/g) que inicialmente estava presente nos frutos (2,02 ± 0,22 mg/g) (teste t pareado, t=7,045, n=8, $P_{unicaudal}$<0,001).

4.4.4. Padrões gerais

Folhas de *B. suaveolens* induzidas mecanicamente apresentam um padrão de resposta induzida que está diretamente relacionada à concentração inicial de escopolamina presente nas folhas. Folhas de plantas que apresentam níveis mais

baixos de escopolamina inicial, apresentam razão de indução maiores enquanto que folhas com valores altos de escopolamina inicial, apresentam razão de indução menores (**Figura 18**). Neste sentido, foi observado que os frutos e brotos apicais, possuem razão de indução significativamente mais baixa que flores e folhas maduras. As flores, quando comparadas com as folhas maduras, brotos apicais e frutos, possuem valores iniciais de escopolamina intermediários, apresentando razão de indução intermediária entre as folhas maduras e brotos apicais (**Figura 19**).

4.5. Efeitos de alcalóides tropânicos em herbívoros generalistas

4.5.1. Relação entre taxa de consumo relativo (TC_SR) e taxa de crescimento relativo (TC_RR) entre *Ricinus communis* e *Brugmansia suaveolens*

Apenas o genótipo 4 de *B. suaveolens* apresentou consumo maior que o controle de *R. communis*. As taxas de consumo dos genótipos 10 e 11 de *B. suaveolens* não diferiram significativamente da taxa encontrada para o controle. Nos três genótipos de *B. suaveolens* (genótipo 10 = 0,2 mg escopolamina/g folha seca; genótipo 4 = 2,0 mg escopolamina/g; genótipo 11 = 5,0 mg escopolamina/g) houve diminuição significativa nas taxas de crescimento relativos em relação ao controle (**Figuras 20-23**).

4.5.2. Relação entre taxa de consumo relativo (TC_SR) e taxa de crescimento relativo (TC_RR) entre *Ricinus communis* e *Brugmansia suaveolens* induzidas por danos mecânicos

Para todas as plantas de *B. suaveolens*, houve aumento significativo das taxas de consumo pelas larvas de *S. frugiperda* quando comparadas com os controles de *R.*

communis. As taxas de crescimento relativo das larvas de *S. frugiperda* que se alimentaram com folhas de *B. suaveolens* 4 proximal (controle da indução), 4 distal (induzido) e 11 proximal (controle da indução) diminuiram significativamente em relação aos controles de *R. communis*. Desta forma, nas plantas de *B. suaveolens* 4, não ocorreram diferenças significativas entre as taxas de crescimento das larvas alimentadas com folhas de plantas antes e depois dos danos foliares. As taxas de consumo também não diferiram entre si. Nas plantas de *B. suaveolens* 11, ocorreram diferenças significativas entre o crescimento das larvas alimentadas com folhas antes e depois dos danos (**Figuras 24-26**).

4.5.3. Desempenho de herbívoros generalistas submetidos a diferentes concentrações de alcalóides tropânicos

Larvas mantidas em dietas controle ou acrescidas de escopolamina 0,05 sobreviveram em média 96%, conseguindo se desenvolver até a fase de pupa. Concentrações de 0,25 mg/g de dieta seca, levaram à morte de 16% das larvas antes de conseguirem atingir a fase de pupa. Nas concentrações de 0,5 e 2,5 mg/g dieta seca, as larvas não conseguem sobreviver até a fase de pupa em 46% e 68% dos casos, respectivamente. (**Figura 27**). Verificou-se que houve uma diferença significativa do tempo médio para o desenvolvimento das larvas entre o controle e todos os outros tratamentos. O tempo para o controle foi em média de 15 dias enquanto que para os tratamentos de 0,05 e 0,25% foi de 19 e 21 dias, respectivamente, diferindo significativamente entre si. As larvas tratadas com escopolamina 0,5 e 2,5% demoraram até 24 dias para empupar, diferindo significativamente de todos os outros tratamentos (**Figura 28**). Não houve diferenças significativas entre a massa média das

pupas alimentadas em todos os tratamentos. Verificou-se diferenças entre a massa de pupas de sexos diferentes, sendo que as fêmeas sempre apresentaram massas maiores (**Figura 29**).

4.6. Indução de escopolamina através da aplicação de jamonato de metila: Efeito da indução sobre o crescimento vegetativo das plantas

Há razão de indução nas folhas das plantas tratadas com MeJa 50 µg/ml, diferindo significativamente dos outros tratamentos. Esse aumento foi, em média, de até quatro vezes a escopolamina produzida pelas folhas das plantas controle. Não houve diferenças significativas entre a razão de indução encontrada nas folhas controle, no tratamento de MeJa 5,0 µg/ml e o tratamento com dano mecânico após 10 dias da retirada de 50% das suas folhas.

As plantas controle e as plantas tratadas com MeJa 5,0 ug/ml tiveram um aumento de área foliar seis vezes maior do que as plantas tratadas com MeJa 50 ug/ml diferindo significativamente. Ao compararmos a produção de escopolamina com o aumento de área foliar total das plantas durante os 10 dias de tratamento, podemos observar que as plantas que produziram mais escopolamina tiveram uma taxa de crescimento relativo menor que as plantas controle e as tratadas com MeJa 5,0 ug/ml ou as danificadas mecanicamente (**Figura 30**).

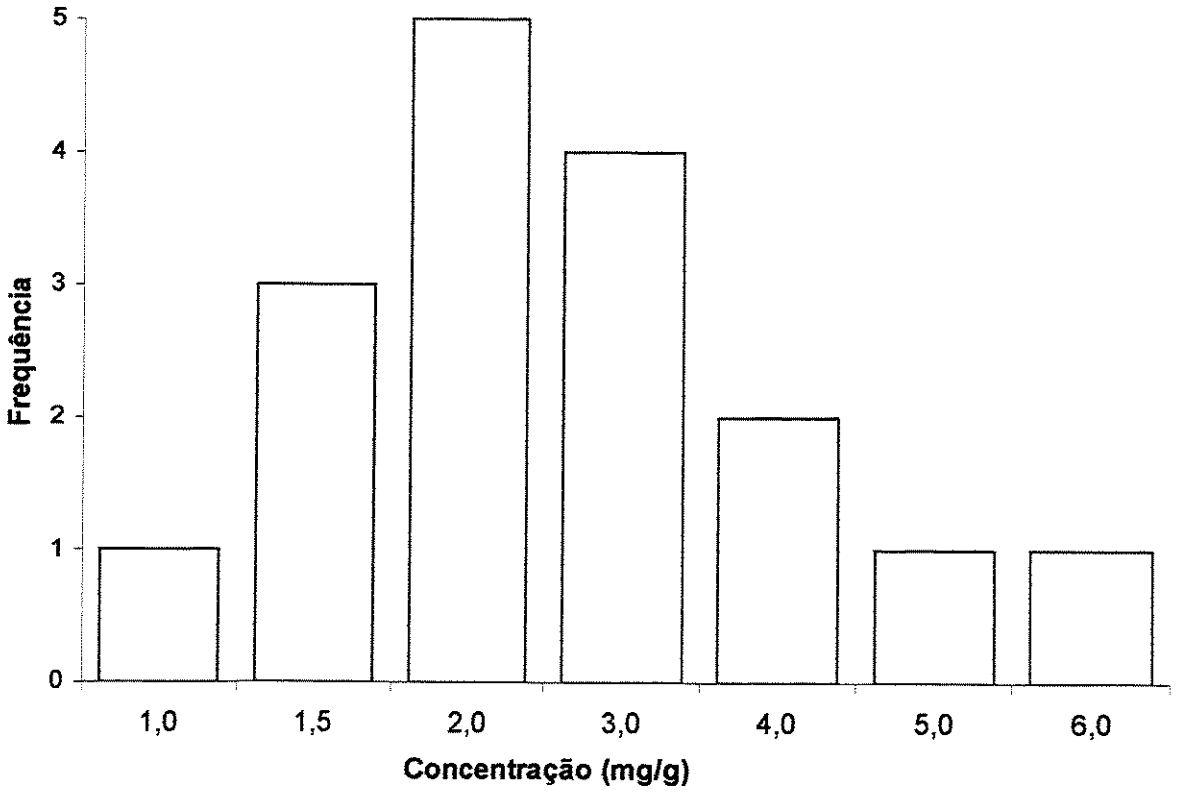


Figura 13. Distribuição de freqüência da concentração de escopolamina em folhas de uma amostra aleatória de 17 indivíduos de uma população *Brugmansia suaveolens* coletada na Serra do Japi, Jundiaí, SP.

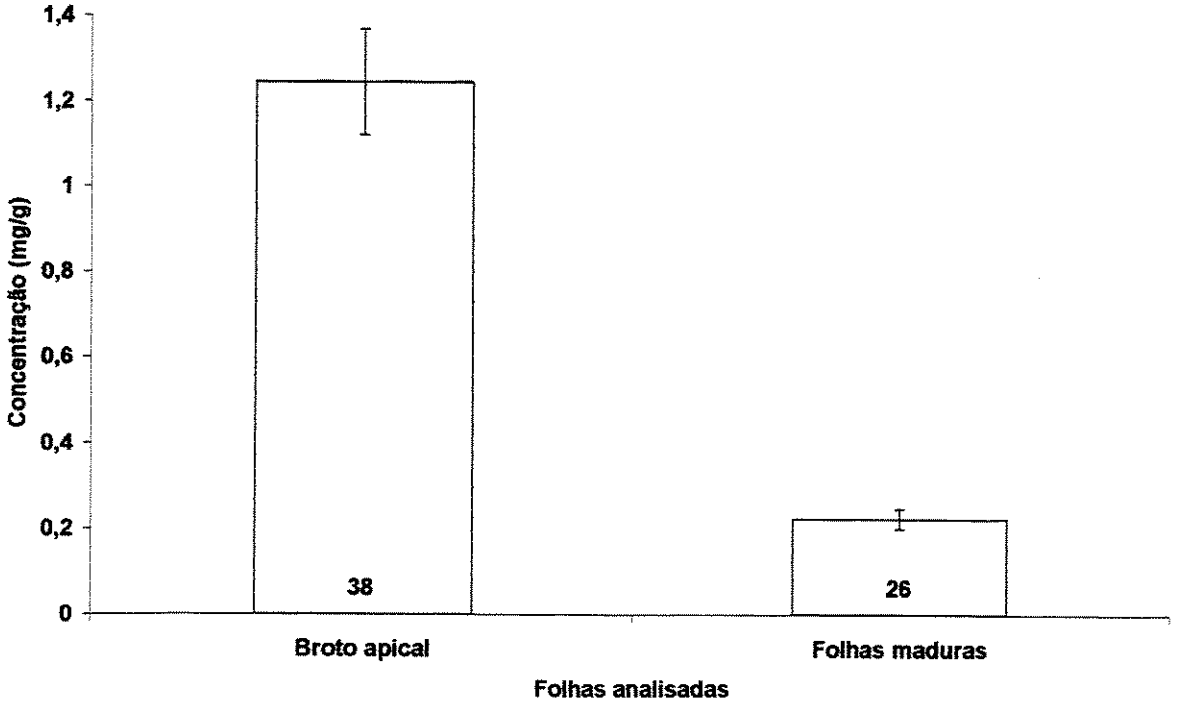
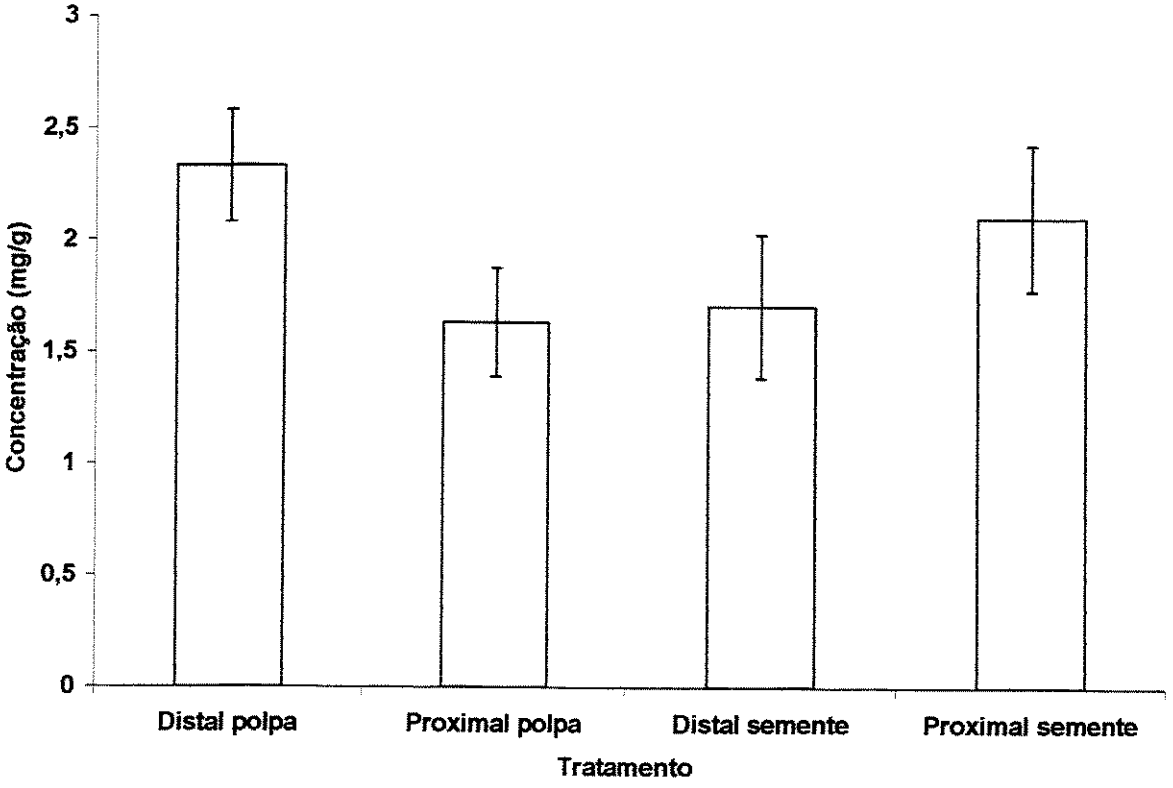


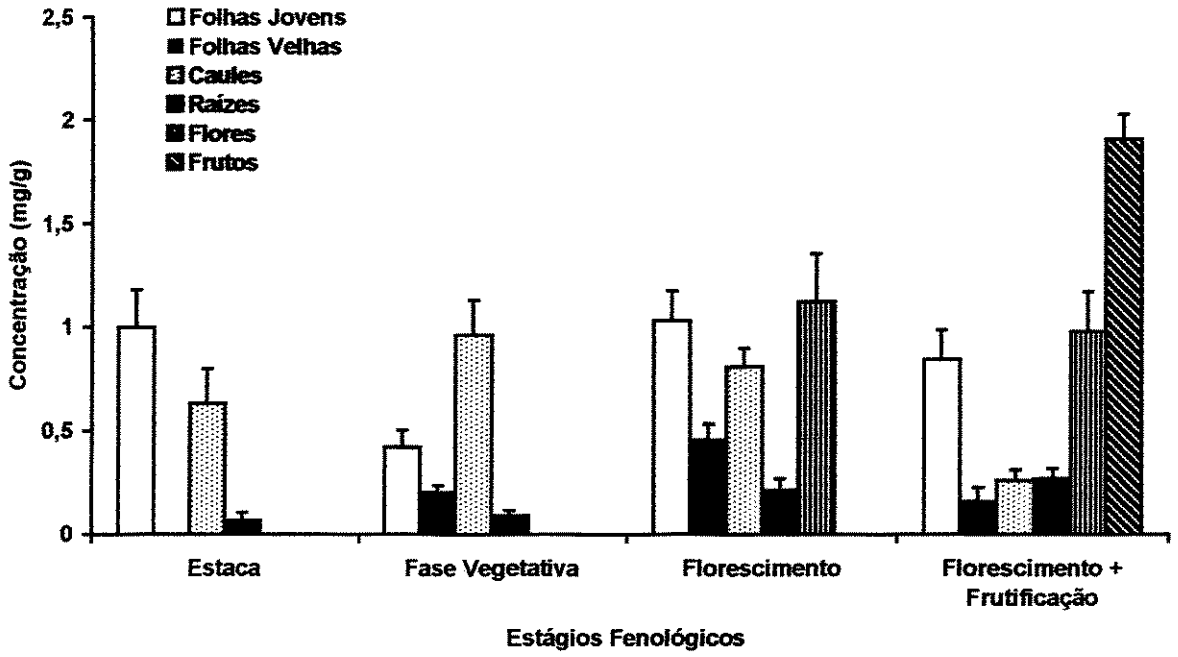
Figura 14. Concentração média (± erro padrão) de escopolamina em brotos apicais e folhas maduras (5ª e 6ª folhas) de plantas de *Brugmansia suaveolens* (teste t para amostras independentes com variâncias desiguais, t=8,073, $P_{unicaudal}$<0,001). Os números dentro das barras representam o n amostral.



ANOVA

Fonte	SQ	GL	QM	F	P
Entre partes dos frutos	0,564	3	0,188	1,243	0,337
Erro	1,815	12	0,151		

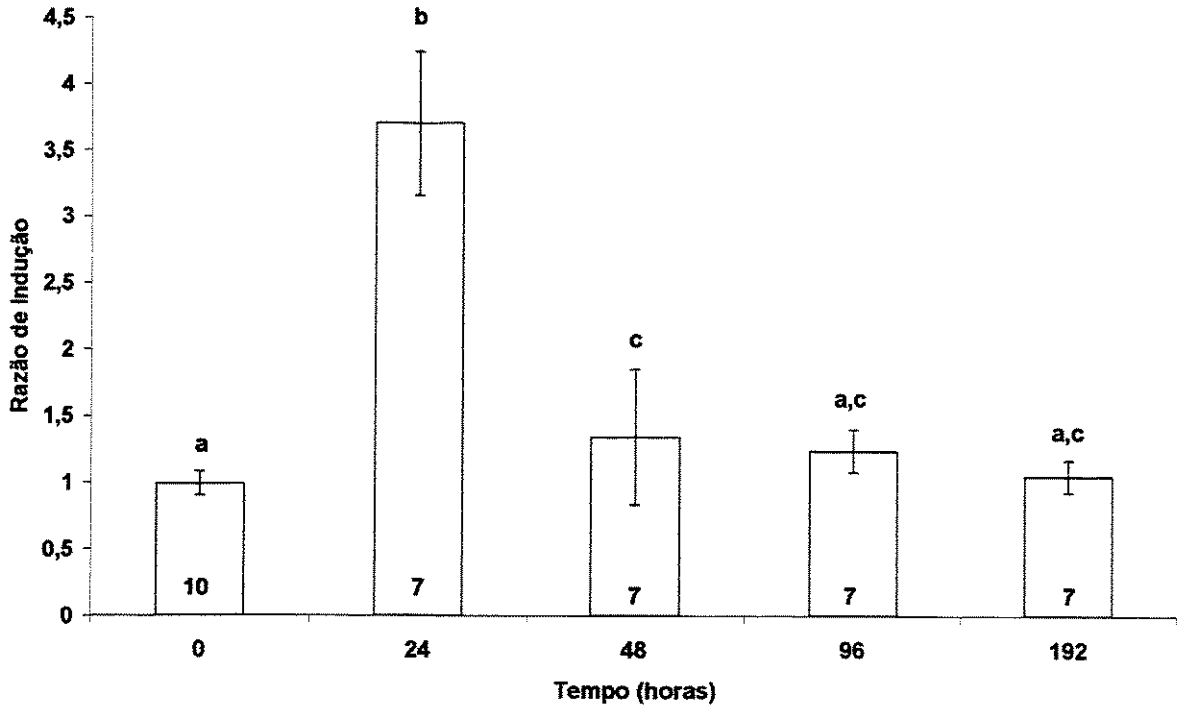
Figura 15. Concentração média (± erro padrão) de escopolamina em diferentes partes de frutos verdes de *Brugmansia suaveolens* e sua respectiva ANOVA de um fator.



ANOVA

Fonte	SQ	GL	QM	F	P
Entre estágios fenológicos	8,048	3	2,683	69,455	<0,001
Entre partes da planta	8,985	5	1,797	46,523	<0,001
Estágios fenológicos x partes da planta	18,591	15	1,239	32,088	<0,001
Erro	7,416	192	0,039		

Figura 16. Concentração média (± erro padrão) de escopolamina dentro de cada órgãos em cada estágio fenológico e sua respectiva ANOVA de dois fatores (com dados transformados em raiz quadrada da concentração). Ver **Apêndice 1** para teste *a posteriori* de Tukey.



ANOVA

Fonte	SQ	GL	QM	F	P
Entre tempos	39,019	4	9,755	12,666	<0,001
Erro	25,415	33	0,770		

Figura 17. Razão de indução média (± erro padrão) em diferentes tempos após o início do dano mecânico e sua respectiva ANOVA de um fator. Letras diferentes representam diferenças significativas (teste de Tukey, α = 0,05). Os números dentro das barras representam o n amostral.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

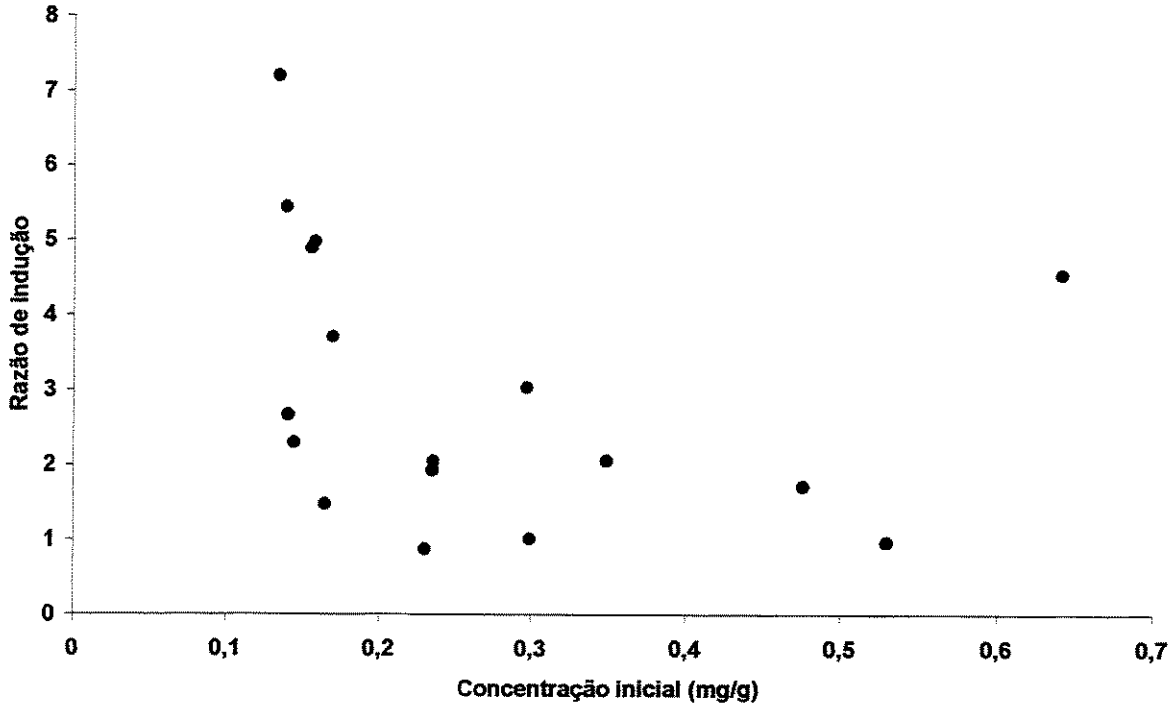


Figura 18. Razão de indução em função da concentração inicial de escopolamina em folhas de *Brugmansia suaveolens*.

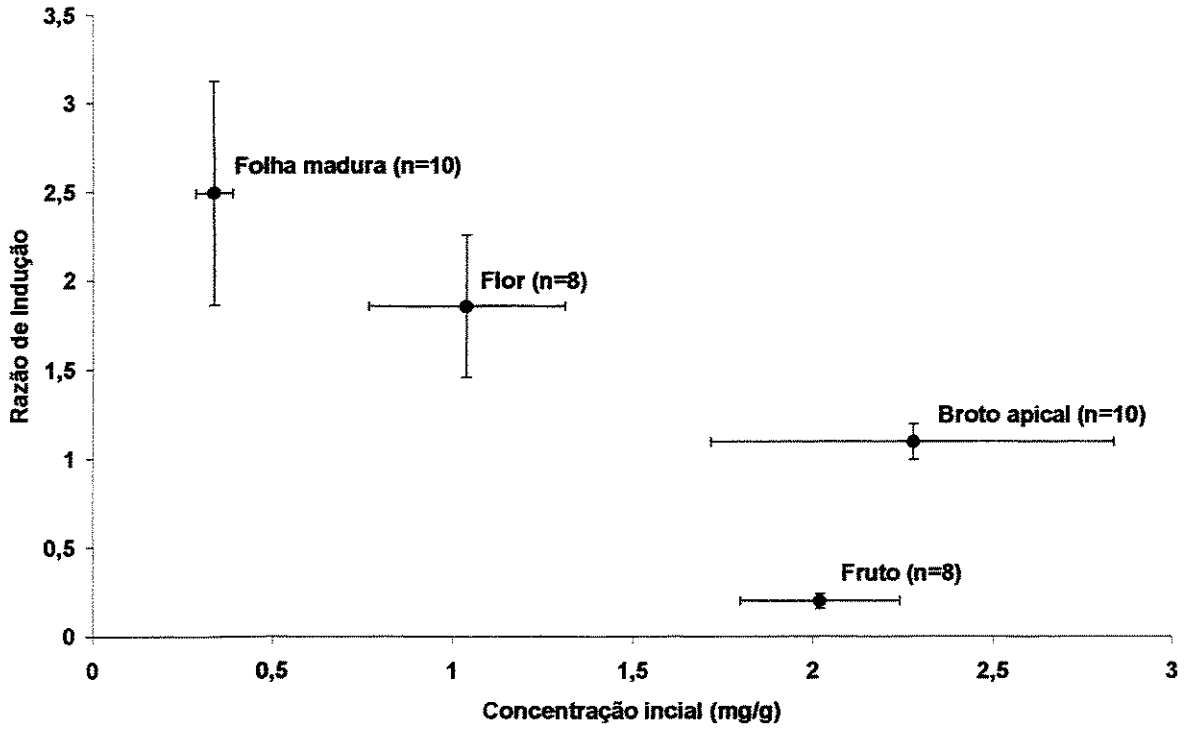


Figura 19. Razão de indução média (± erro padrão) em função da concentração inicial média de escopolamina (± erro padrão) em diferentes partes de plantas de *Brugmansia suaveolens*.

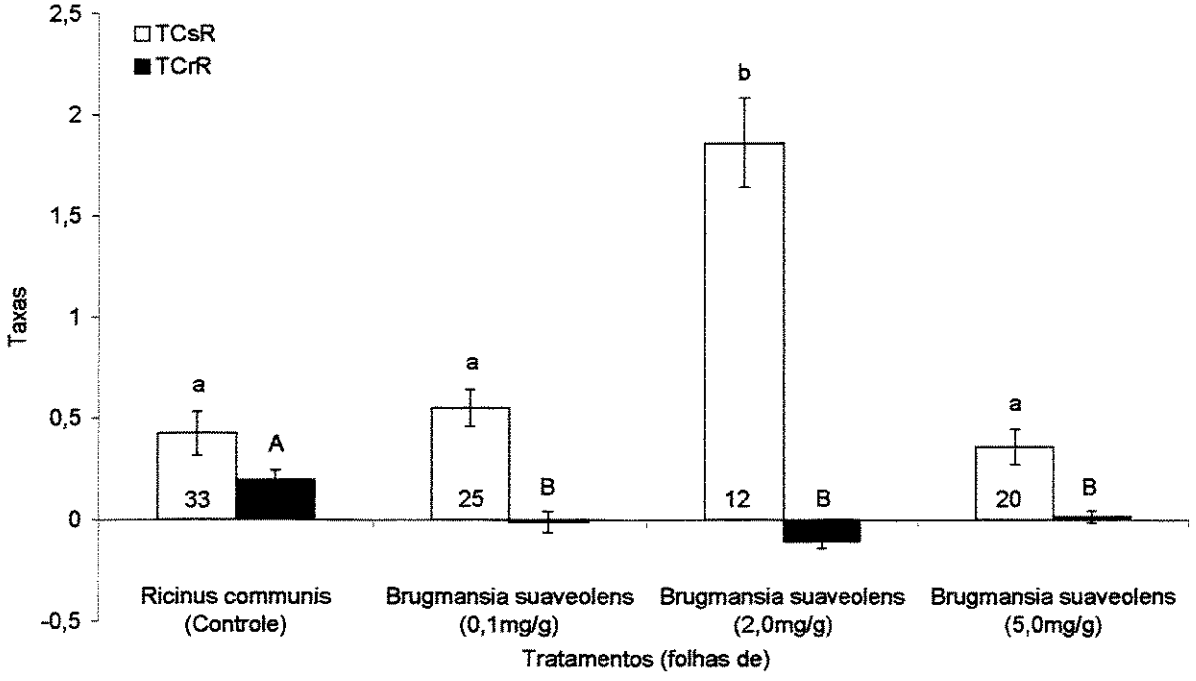


Figura 20. Taxas de consumo relativo (TC_SR) e taxas de crescimento relativo (TC_RR) médias [±erro padrão (n amostral dentro das barras de TCsR)] em larvas de *Spodoptera frugiperda* submetidas a diferentes tratamentos e suas respectivas ANOVAS de um fator. Letras diferentes representam diferenças significativas (teste de Tukey, $\alpha = 0,05$).

ANOVA (TC_SR)

Fonte	SQ	GL	QM	F	P
Entre índices de consumo	21,196	3	7,065	22,492	<0,001
Erro	27,015	86	0,314		

ANOVA (TC_RR)

Fonte	SQ	GL	QM	F	P
Entre índices de crescimento	1,093	3	0,364	6,996	<0,001
Erro	4,479	86	0,052		

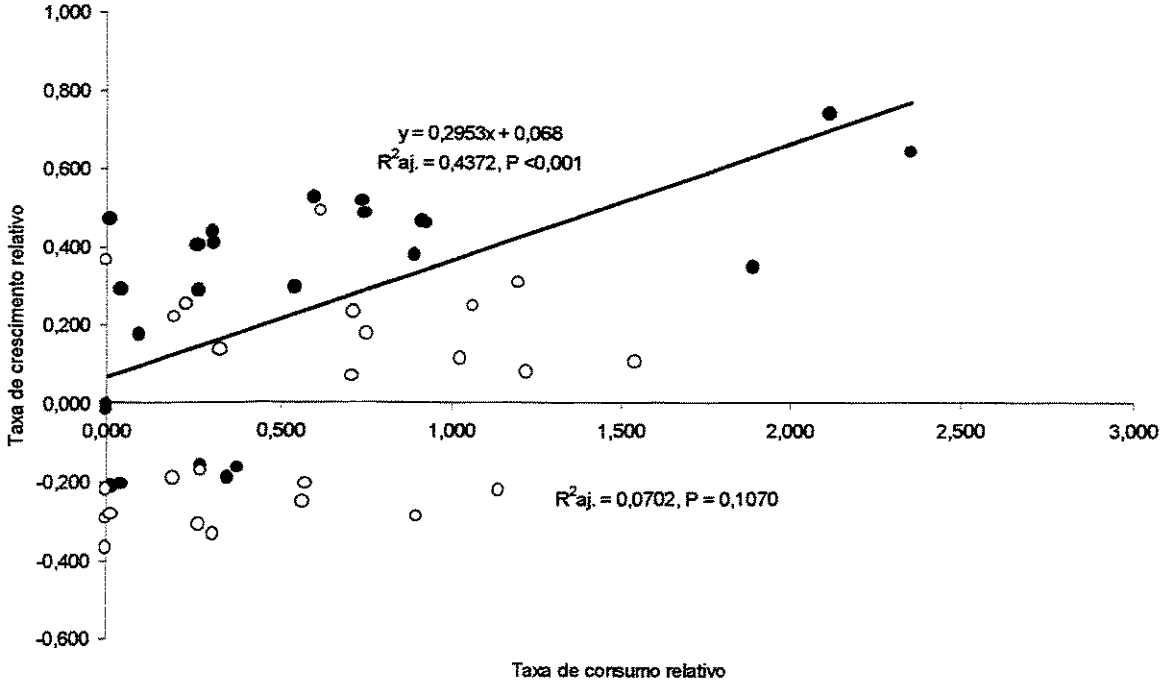


Figura 21. Taxas de consumo relativo em função de taxas de crescimento relativo em larvas de 4° estádio de *Spodoptera frugiperda* alimentadas por 24 h em folhas de *Ricinus communis* (controle - •) e folhas de *Brugmansia suaveolens* genótipo 10 (0,1 mg escopolamina/g - ○).

BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

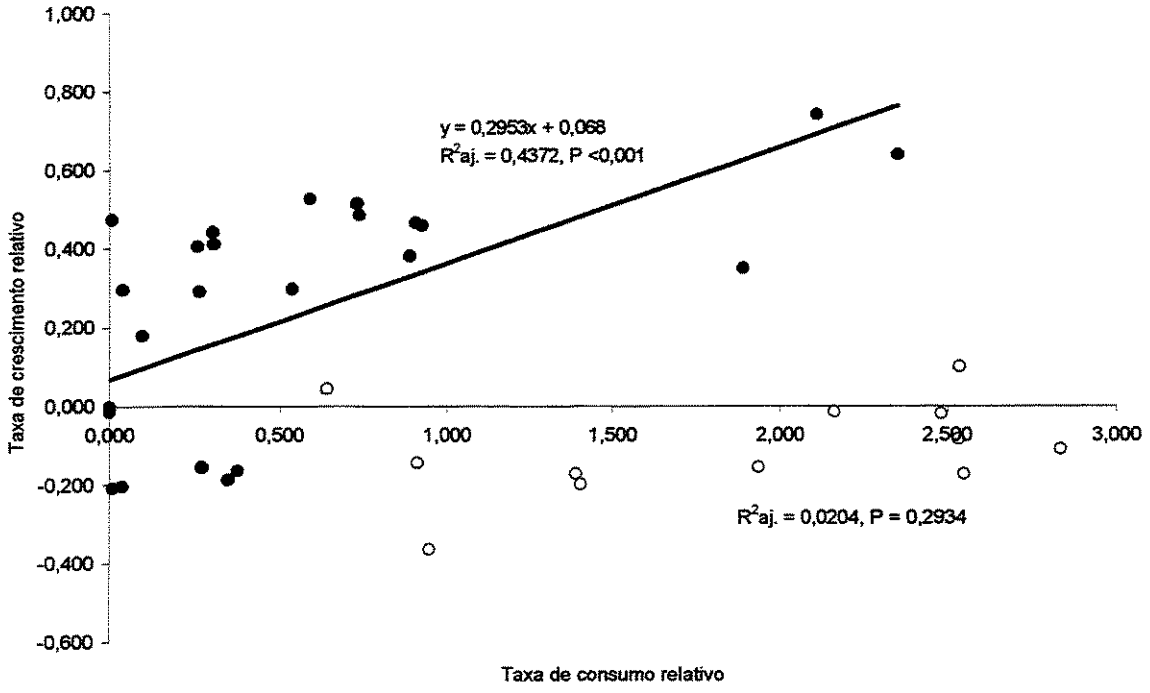


Figura 22. Taxas de consumo relativo em função de taxas de crescimento relativo em larvas de 4° estádio de *Spodoptera frugiperda* alimentadas por 24 h em folhas de *Ricinus communis* (controle - •) e folhas de *Brugmansia suaveolens* genótipo 4 (2,0 mg escopolamina/g - ○).

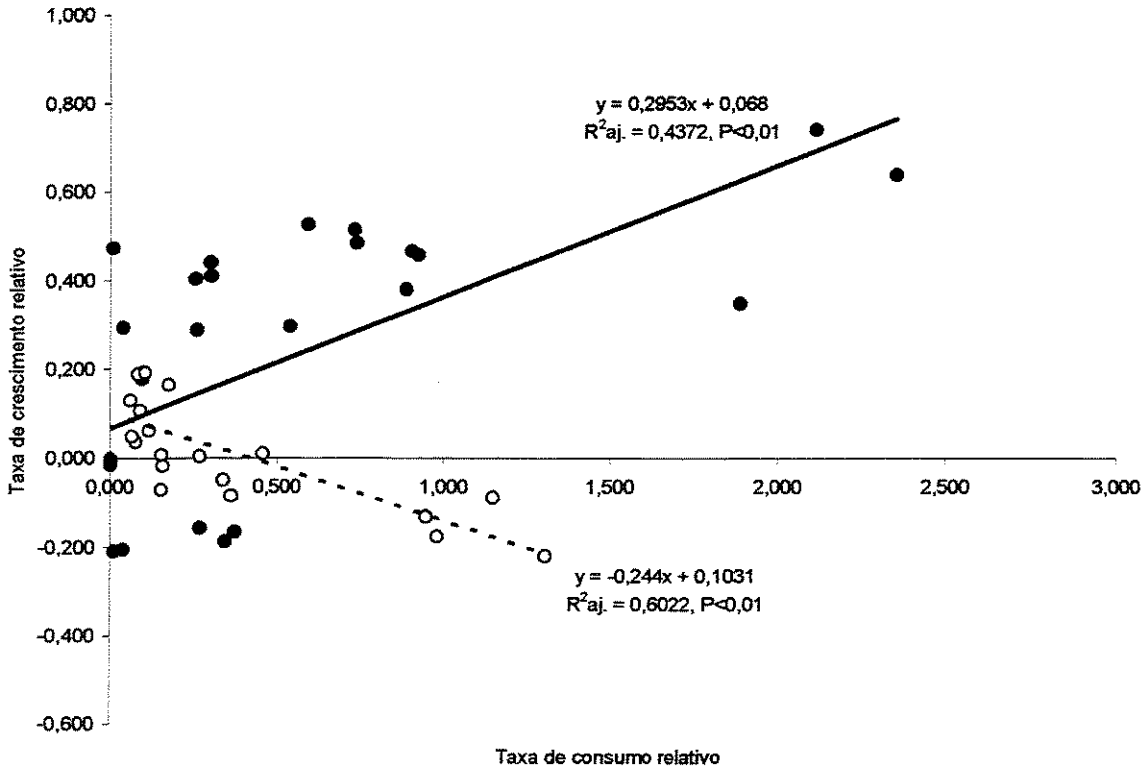


Figura 23. Taxas de consumo relativo em função de taxas de crescimento relativo em larvas de 4° estádio de *Spodoptera frugiperda* alimentadas por 24 h em folhas de *Ricinus communis* (controle - •) e folhas de *Brugmansia suaveolens* genótipo 11 (5,0mg escopolamina/g - ○).

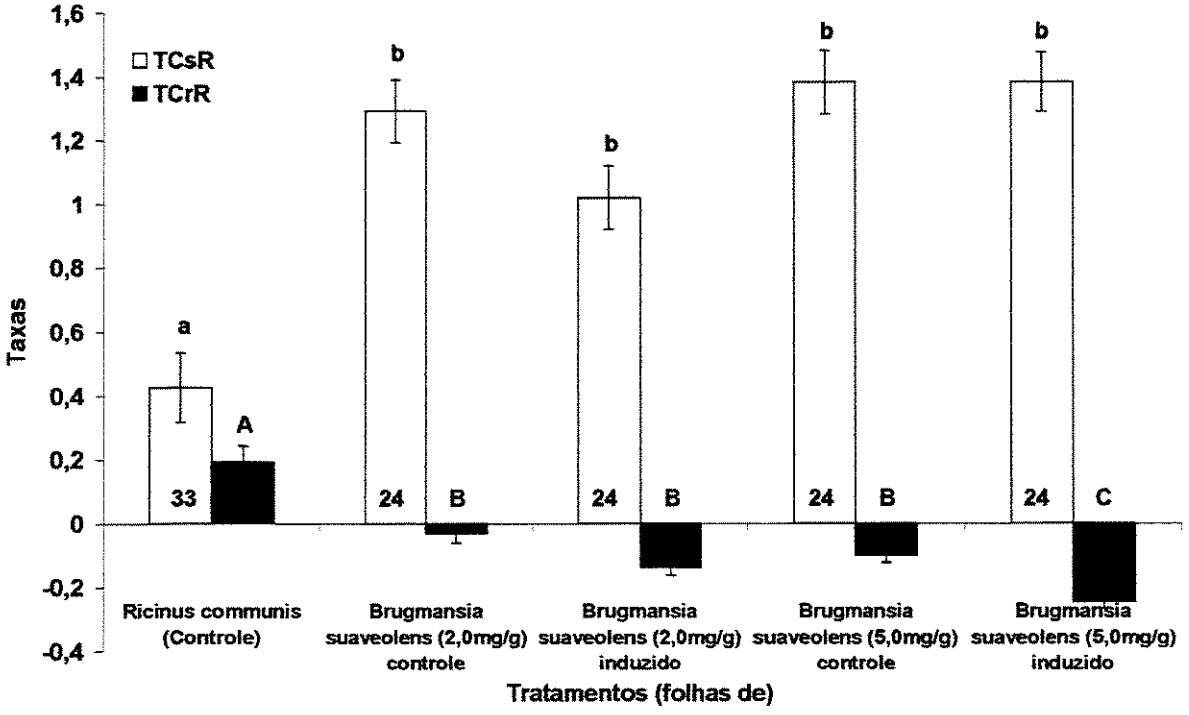


Figura 24. Taxas de consumo relativo (TC_SR) e taxas de crescimento relativo (TC_RR) médias [±erro padrão (n amostral dentro das barras de TCsR)] em larvas de *Spodoptera frugiperda* submetidas a diferentes tratamentos, e suas respectivas ANOVAS de um fator. Letras diferentes representam diferenças significativas (teste de Tukey, $\alpha = 0,05$).

ANOVA (TC_SR)

Fonte	SQ	GL	QM	F	P
Entre índices de consumo	19,555	4	4,889	17,580	<0,001
Erro	34,482	124	0,278		

ANOVA (TC_RR)

Fonte	SQ	GL	QM	F	P
Entre índices de consumo	3,126	4	0,781	25,726	<0,001
Erro	3,767	124	0,030		

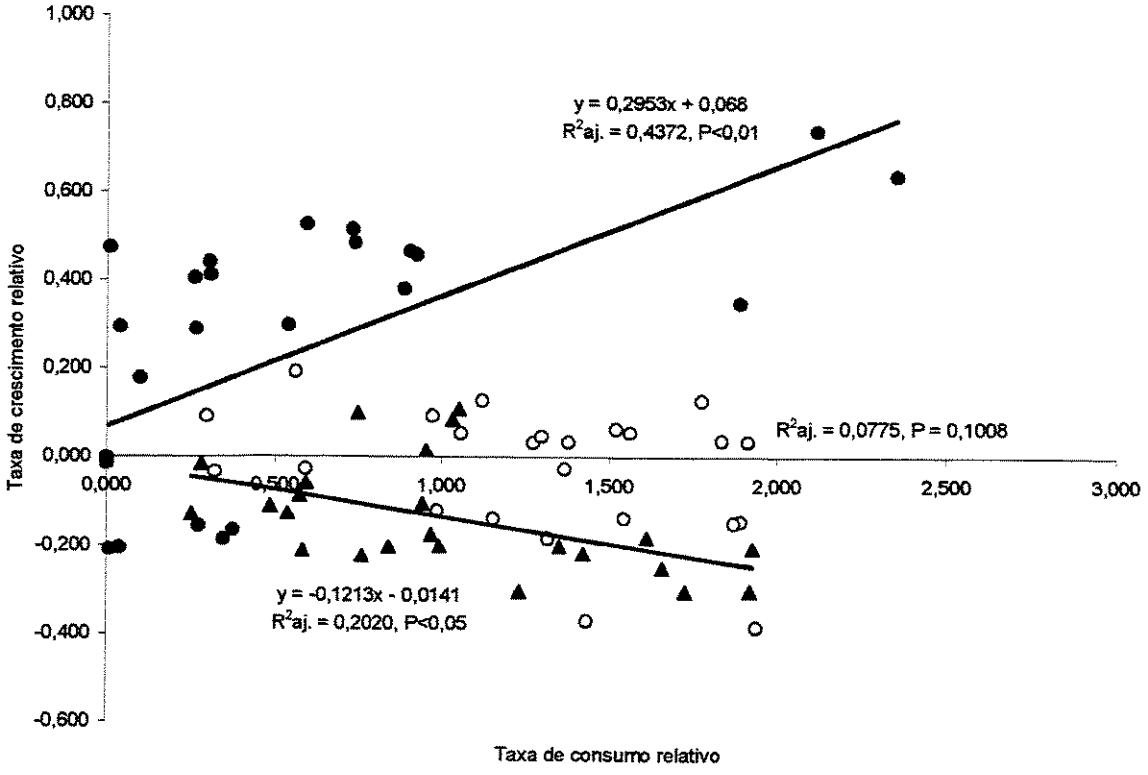


Figura 25. Taxas de consumo relativo em função de taxas de crescimento relativo em larvas de 4° estádio de *Spodoptera frugiperda* alimentadas por 24 h em folhas de *Ricinus communis* (controle - •) e folhas de *Brugmansia suaveolens* genótipo 4 (2,0 mg escopolamina /g) antes (○) e depois de 24 h do dano foliar (▲).

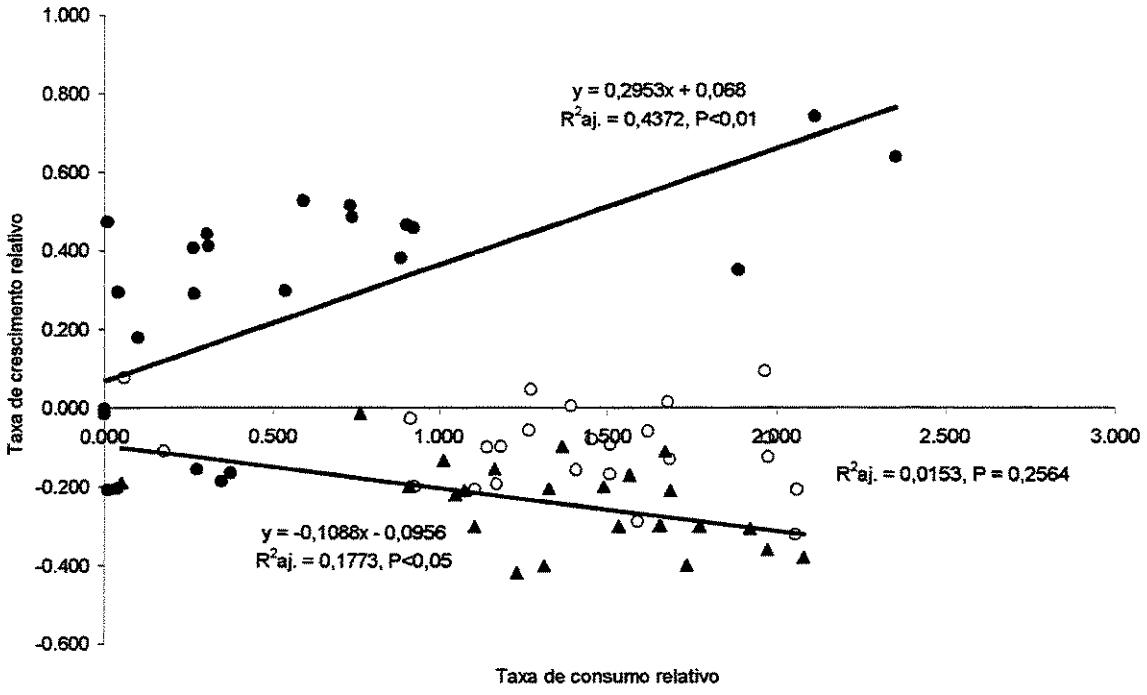


Figura 26. Taxas de consumo relativo em função de taxas de crescimento relativo em larvas de 4° estádio de *Spodoptera frugiperda* alimentadas por 24 h em folhas de *Ricinus communis* (controle - •) e folhas de *Brugmansia suaveolens* genótipo 11 (5,0 mg escopolamina/g) antes (○) e depois de 24 h do dano foliar (▲).

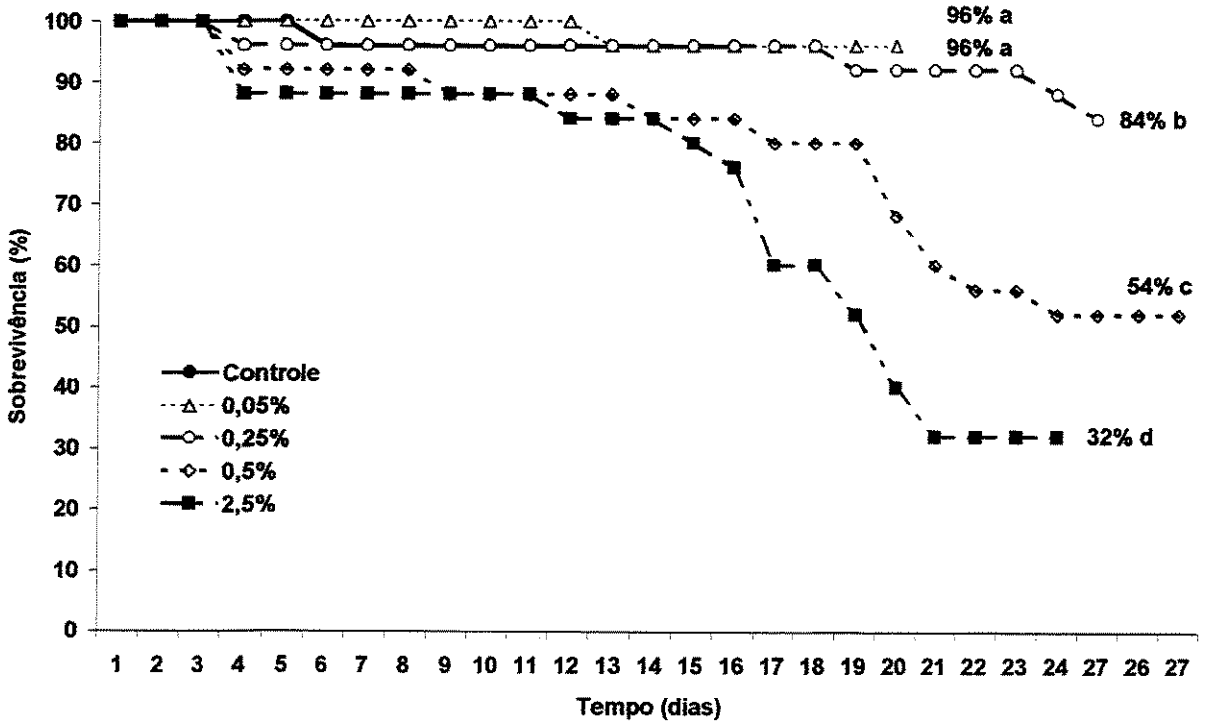
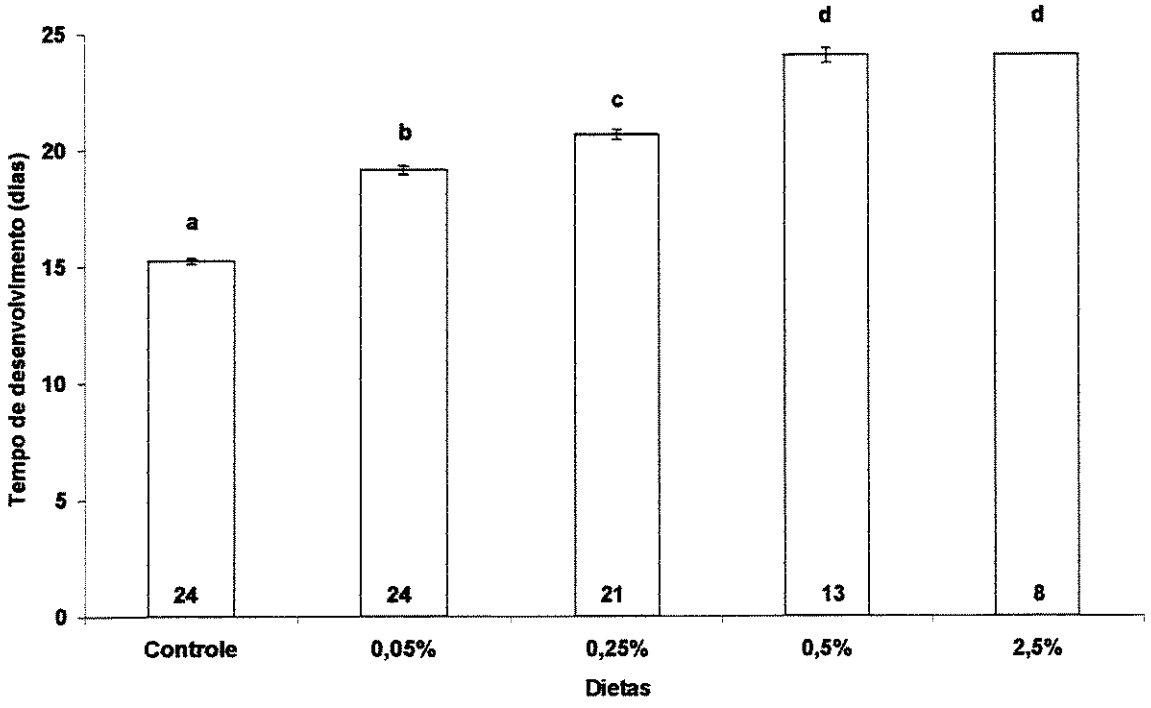


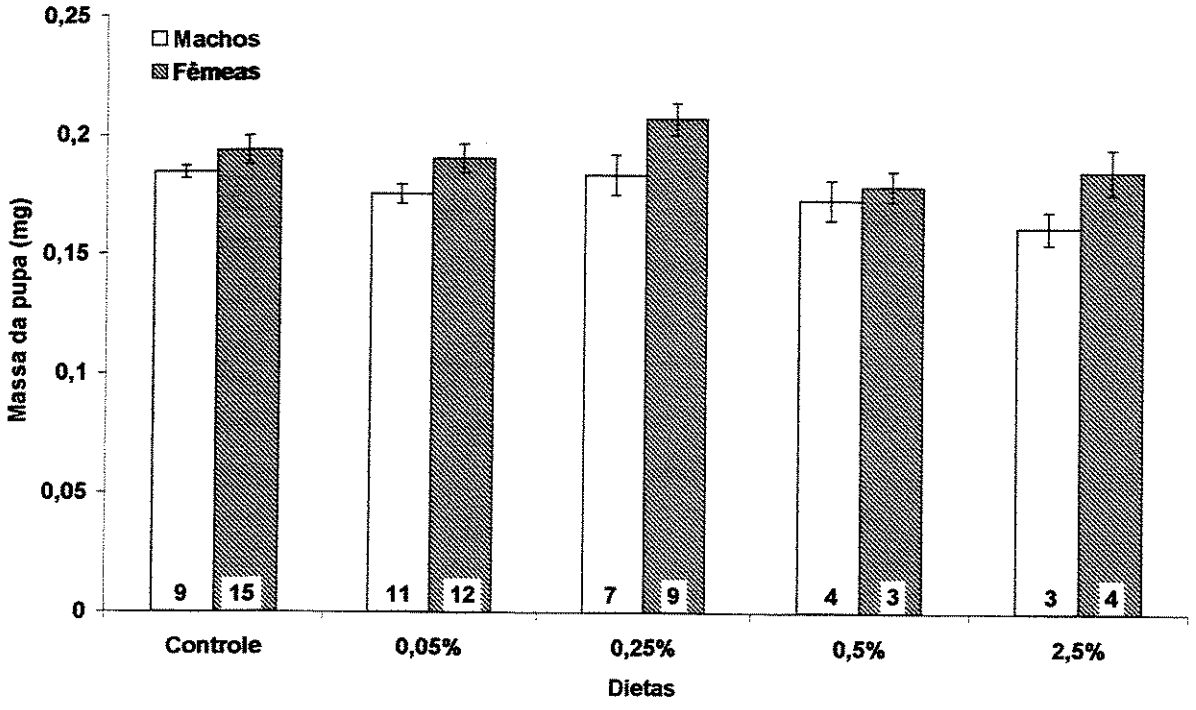
Figura 27. Percentagem de sobrevivência de larvas de *Spodoptera frugiperda* em dietas com diferentes concentrações de escopolamina (em % de massa seca da dieta). Letras diferentes representam diferenças significativas na sobrevivência final (comparação múltipla de proporções, χ^2=40,873, gl=4, P<0,001).



ANOVA

Fonte	SQ	GL	QM	F	P
Entre dietas	896,564	4	224,141	299,863	<0,001
Erro	63,536	85	0,747		

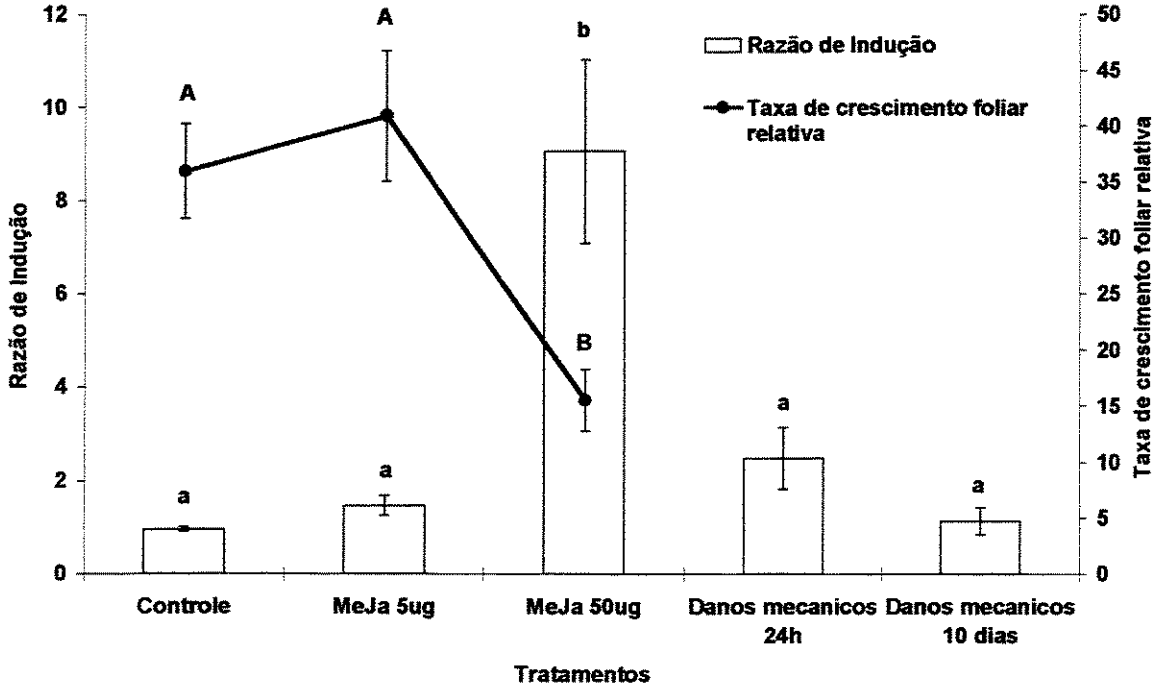
Figura 28. Tempo de desenvolvimento médio para pupação em dias (± erro padrão), e a respectiva ANOVA de um fator, em larvas de *Spodoptera frugiperda* se alimentado de dieta artificial com diferentes concentrações de escopolamina. Os números dentro das barras representam o n amostral. Letras diferentes representam diferenças significativas (teste de Tukey, $\alpha = 0,05$).



ANOVA

Fonte	SQ	GL	QM	F	P
Entre dietas	0,003	4	0,001	2,188	0,080
Entre sexos	0,003	1	0,003	9,606	0,003
Dietas x sexos	0,001	4	0,0003	0,657	0,624
Erro	0,024	68	0,0004		

Figura 29. Peso de pupa médio em mg (± erro padrão), e a respectiva ANOVA de dois fatores, em larvas de *Spodoptera frugiperda* se alimentado de dieta artificial com diferentes concentrações de escopolamina. Os números dentro das barras representam o n amostral.



ANOVA (Razão de Indução)

Fonte	SQ	GL	QM	F	P
Entre tratamentos	421,390	4	105,348	13.036	<0,001
Erro	323,245	40	8,081		

ANOVA (Taxa de Crescimento Foliar Relativa)

Fonte	SQ	GL	QM	F	P
Entre tratamentos	3267,966	2	1633,983	9,142	0,001
Erro	4289,601	24	178,733		

Figura 30. Concentração média (± erro padrão) de escopolamina e taxas de crescimento foliar relativas médias (± erro padrão) obtidos em ensaios utilizando folhas de plantas de *Brugmansia suaveolens* controle, tratadas com Metil Jasmonato (MeJa) e danificadas mecanicamente, e sua respectiva ANOVA. Para cada variável; letras diferentes representam diferenças significativas (teste de Tukey, $\alpha = 0,05$).

5. DISCUSSÃO

5.1. Alocação de alcalóides tropânicos dentro de *B. suaveolens*

A presença da escopolamina em cada órgão durante as fenofases do ciclo de vida de *B. suaveolens*, está relacionada com o valor desses órgãos em cada fenofase. Vários ensaios preliminares foram realizados para que pudéssemos ter uma visão geral de como *B. suaveolens* aloca a escopolamina durante o seu ciclo de vida, dando embasamento suficiente para realizar ensaios futuros de indução e de herbivoria. Nos resultados dos ensaios preliminares para *B. suaveolens* mostraram que não houve diferença significativa entre o conteúdo de escopolamina da parte distal e proximal das folhas. Da mesma maneira, os resultados obtidos nos ensaios onde se analisou a variação da escopolamina ao longo do dia (24 h) mostraram que não ocorreram flutuações dos seus níveis. A análise das diferenças nos níveis de escopolamina em diferentes folhas dentro da mesma planta de *B. suaveolens,* indicaram que não havia diferenças dos níveis de escopolamina dentre as folhas maduras, porém as folhas jovens (brotos) sempre possuíam níveis significativamente mais altos, e as folhas senescentes possuíam níveis muito baixos. Desta forma, as folhas utilizadas nos ensaios sempre foram as folhas situadas entre as de número 3 e 6, evitando assim qualquer diferença ocasionada por idade ou diferentes locais na planta.

Os resultados dos ensaios de microdistribuição de escopolamina em folhas de *B. suaveolens,* mostraram que também não haviam diferenças significativas nos níveis dessa substância em diferentes posições dentro das folhas. Esses resultados são contrários aos obtidos por Zangerl & Rutledge (1996), nos quais foram dosadas as concentrações de furanocumarinas em discos de folhas provenientes de

diferentes posições em plantas de *Pastinaca sativa* L. e foram encontradas diferenças significativas no conteúdo dessas substâncias. No caso de *B. suaveolens* pudemos utilizar nos ensaios qualquer parte das folhas, sem alteração nos resultados devido a essas diferenças.

Os resultados obtidos por van Dam et al. (1993), utilizando a técnica de indução em estafeta, mostraram que houve a necessidade de efetuar correções nos valores de indução obtidos, devido a diferenças encontradas nas concentrações de alcalóides nas partes proximais e distais das folhas das três espécies de plantas por eles estudadas, uma vez que foram utilizadas as partes distais removidas das folhas para promover o dano mecânico, como controle dos tempos de indução seguintes. Esses autores também relataram diferenças entre as partes distais ao longo do ensaio, fator que os levou à necessidade de novamente corrigir os dados de indução obtidos, a fim de expressar apenas o aumento ocasionado pela indução e evitar erros ocasionados por flutuações naturais dos níveis de metabólitos. Diante dos resultados preliminares, vimos que a técnica de Van Dam, et al. (1993) poderia ser utilizada para *B. suaveolens*, sem necessidade de realizar correções, uma vez que não ocorreram alterações nos níveis de escopolamina entre locais diferentes na mesma folha, entre folhas maduras em diferentes posições dentro da planta e durante o ciclo circadiano em folhas na mesma posição na planta. Estes fatores eram de extrema importância para que pudessem ser comparadas as folhas controle (distais) com as induzidas (proximais), sem perigo de haver alterações dos resultados devido a diferenças que não fossem as ocasionadas pelos danos mecânicos.

Os últimos ensaios preliminares foram realizados com flores e frutos. Nas análises dos níveis de escopolamina em diferentes posições dentro do mesmo fruto

ou flor, ou frutos e flores em diferentes posições dentro da mesma planta, foram constatadas diferenças significativas apenas entre as partes proximais e distais das flores. Essas diferenças, levaram à necessidade de efetuar correções nos valores obtidos de indução em flores, utilizando-se o fator de 1,08 sobre as flores controle. Nos frutos não ocorreu variação. Provavelmente as concentrações mais elevadas de escopolamina nas partes proximais das flores esteja relacionada com a proteção destas contra predadores, uma vez que a parte reprodutora feminina se encontra na parte proximal.

5.2. Indução de alcalóides tropânicos como estratégia de defesa

A escassez de trabalhos relacionados com a elucidação de mecanismos de defesa envolvendo alcalóides tropânicos nos levou a necessidade de realizar uma série de ensaios visando determinar como estes alcalóides se distribuem nas diferentes partes das plantas de *B. suaveolens,* sempre tendo uma visão do valor adaptativo da planta ao seu ambiente. Uma maneira de se medir a importância de uma certa parte da planta seria removê-la e observar a resposta da planta na sua ausência (McKey, 1979; Krishik & Denno, 1983). Porém, este método acarreta inúmeras dificuldades no que diz respeito à metodologia usada para comparação entre a resposta da planta diante da ausência do órgão em cada caso.

Diante do acompanhamento da distribuição da escopolamina durante as diferentes fases fenológicas do ciclo de vida da *B. suaveolens*, pôde-se demonstrar que durante a fase vegetativa da planta, os locais onde os alcalóides tropânicos (especialmente a escopolamina) apareciam em quantidades maiores eram nas folhas jovens seguidas em menor quantidade, no caule. Nas outras fases fenológicas, esta distribuição foi mudando em função da importância dos órgãos envolvidos em cada

fase, sendo sempre mantidos os níveis nas folhas jovens. Na fase de florescimento, as flores foram os órgãos que possuem maior concentração enquanto que na fase de frutificação, foram os frutos. Dentro das flores, foi visto que as partes proximais possuem concentrações mais elevadas que as distais, provavelmente devido à importância desta região dentro da flor, para a reprodução. As folhas maduras sempre apresentaram níveis menores de escopolamina que as jovens. Os estudos de Raupp & Denno (1984), demonstraram que as folhas jovens são mais suscetíveis aos herbívoros do que as folhas mais maduras. Estas folhas maduras, uma vez que estão fotossinteticamente operando em níveis máximos, teriam quantidades elevadas de nitrogênio e água, recursos estes importantes para o crescimento dos herbívoros, sendo assim mais procuradas. No caso de *B. suaveolens*, a presença de níveis altos de escopolamina nas folhas jovens e de altos níveis de indução nas folhas maduras, provavelmente estão relacionados com diferentes tipos de defesa, características estas que estariam relacionadas à resposta da planta diante de ataques de herbívoros em freqüências distintas para cada parte da planta.

Claramente, todas as partes das plantas contribuem para a sua adaptação ao meio ambiente, porém, pode-se dizer que a perda de certa parte em particular, pode levar a conseqüências mais ou menos importantes do que outra parte. Da mesma forma, a perda de certo órgão pode ter um efeito mais severo na adaptação se removido em um estágio específico de desenvolvimento do que outro órgão (Mooney & Gulman, 1982). Normalmente, partes vegetativas perdidas são mais facilmente repostas do que partes reprodutivas. Em muitos casos, como por exemplo em plantas monocárpicas, a perda de frutos pode representar danos irreparáveis, levando ao desperdício de toda a energia gasta na sua formação, diante das atividades de desenvolvimento do órgão reprodutivo. Sementes e frutos têm grandes

probabilidades de serem atacados por herbívoros, pois possuem nutrientes de forma concentrada e são compostos de complexos de proteínas e carbohidratos bastante atrativos para herbívoros que os consumam. No estudo com *B. suaveolens*, os níveis de escopolamina encontrados foram altos nos frutos e sementes, provavelmente em decorrência de respostas da planta no sentido de se defender desse tipo de ataque.

Em *B. suaveolens*, o nível de escopolamina nos ensaios de indução mecânica de folhas maduras aumentou 3,5 vezes, após 24 h de indução (0,5 mg/g de folha seca), quando comparado com o nível do controle (0,15 mg/g folha seca). Quando comparamos esses resultados, com os obtidos para folhas jovens sem tratamentos de indução, podemos observar que estas possuem nível cinco vezes maior que as folhas maduras induzidas, sugerindo a importância da escopolamina, em concentrações altas, nos brotos e folhas jovens (provavelmente funcionando como defesa constitutiva). O mesmo ocorre com os teores de escopolamina encontrada nas flores (1,35 mg/g flor seca) e nos frutos (1,96 mg/g fruto seco). Esses resultados, e a não indução de folhas jovens, corroboram os resultados obtidos por Zangerl (1990), que constatou a indução de furanocumarinas em folhas maduras danificadas mecanicamente, e o trabalho de Nitao & Zangerl (1987), que não detectou indução nas flores e frutos que já possuíam quantidades elevadas de furanocumarinas (níveis constitutivos). As razões de indução obtidas no trabalho, apoiam essa teoria, uma vez que estas, são inversamente proporcionais aos níveis iniciais de escopolamina presentes nos órgãos analisados.

5.3. Indução por MeJa

Baseado nos trabalhos de Baldwin, (1998), Zangerl et al. (1997), Baldwin & Callahan (1993) e Zabetakis et al. (1999), os ensaios de indução de escopolamina através da aplicação de MeJa 50 ug revelaram que as plantas de *B. suaveolens* diminuíram significativamente o seu crescimento por um período de 10 dias logo após a indução, quando comparadas com plantas controle não tratadas. Esses resultados corroboram os resultados obtidos por Zabetakis et al. (1999), que observaram aumento significativo de até duas vezes na concentração de alcalóides tropânicos em cultura de raízes de *Datura stramonium* L. (Solanaceae) tratadas com MeJa. O aumento observado em *B. suaveolens* foi bastante superior, chegando a quatro vezes o valor inicial encontrado. Claramente, pode-se verificar que ocorreu significativa queda no crescimento das plantas tratadas (tiveram seis vezes menos acréscimo na área foliar que as controle) provavelmente devido ao investimento que a planta realizou na produção ou translocação da escopolamina no tratamento de indução. Baldwin & Hamilton (2000) verificaram que em *Nicotiana sylvestris* L. (Solanaceae) ocorreu a mesma redução no crescimento, acompanhada de uma redução no processo reprodutivo e na habilidade das plantas competirem por NO_3. Verificou-se que o sistema de produção ou translocação de metabólitos leva a um gasto energético que reduz, no caso de *B. suaveolens*, o gasto de energia para o crescimento vegetativo, por exemplo. Redman et al. (2001) obtiveram resultados semelhantes com *Lycopersicon esculentum* L. (Solanaceae). Neste trabalho, através da aplicação de MeJa, induziu-se a atividade de duas enzimas envolvidas em processos de defesa através da aplicação do MeJa e observou-se uma queda significativa no crescimento, número e tamanho de frutos, tempo de amadurecimento e decréscimo do número de sementes produzidas pelas plantas tratadas. Concluiu-

se que a defesa induzida impôs um custo significativo para a planta. De grande importância é verificar que as plantas de *B. suaveolens* que sofreram o tratamento com dano mecânico foram analisadas 10 dias após o início da indução. Nos ensaios verificamos que o máximo de indução ocorre 24 h após o dano mecânico e os níveis voltam ao normal 96 h após o início. Sendo assim, era de se esperar que, após 10 dias, os níveis de escopolamina já estivessem equivalentes ao do controle, fato este que foi verificado.

Todos os ensaios discutidos até o momento indicaram que, em *B. suaveolens,* ocorrem os processos de indução mecânica, indução pela aplicação de MeJa, e que a indução acarreta custos que podem levar a diminuições nos processos do metabolismo primário da planta. Testes realizados utilizando herbívoros generalistas (*Spodoptera frugiperda)* esclareceram, em parte, se esta indução está realmente relacionada com a defesa. Testes de inibição de alimentação utilizando dietas acrescidas de escopolamina ou dietas a base de folhas de *B. suaveolens* para a alimentação de larvas de *S. frugiperda*, revelaram claramente a preferência das larvas pelas dietas controle (dietas sem escopolamina ou folhas de *Ricinus*).

O efeito inibidor de alimentação da escopolamina, testado através de ensaios onde esta foi incorporada às dietas específicas, foi marcante em dosagens superiores a 0,5 mg/g de dieta seca. Os resultados se assemelham com os obtidos nos trabalhos de Hernandez et al. (1999), no qual observou-se redução drástica da alimentação de larvas de *S. frugiperda* em dietas acrescidas de extratos de folhas de *Vitex trifolia* L. (Verbenaceae), e ao trabalho de Hosozawa et al. (1974) no qual se observou o mesmo efeito sobre larvas de *Spodoptera litura* alimentadas com extratos de sementes. Também foram observadas taxas de mortalidade altas quando os extratos de *Vitex* ultrapassavam 1,0 mg/g de dieta seca. Observamos que os efeitos

da escopolamina sobre as larvas de *S. frugiperda* são dose dependentes, uma vez que a taxa de mortalidade das larvas foi aumentando proporcionalmente em relação ao aumento da sua concentração. A escopolamina oferecida às larvas em concentrações intermediárias (0,25 e 0,5 mg/g de dieta seca) estão na faixa da concentração encontrada em diversos órgãos das plantas de *B. suaveolens* na natureza. A concentração mais elevada (2,5 mg/g de folha seca) corresponde aproximadamente a valores encontrados em folhas jovens, flores, frutos e em folhas maduras induzidas e pode estar relacionada com o processo de defesa da planta, uma vez que diminui a chance de sobrevivência das larvas que as consumiram.

Os testes de consumo e crescimento relativo de larvas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas de *B. suaveolens* foram fundamentais para elucidar dúvidas relativas aos efeitos tóxico e repelente da escopolamina entre *B. suaveolens* e *S. frugiperda*. Os ensaios demonstraram que os efeitos estão intimamente associados a concentração de escopolamina encontrada nas folhas das plantas de *B. suaveolens*. As três concentrações de escopolamina encontradas nas folhas das três plantas de *B. suaveolens*, levaram as larvas a reagirem de forma diferente. As folhas dos três genótipos (4, 10 e 11) contendo respectivamente 2,0, 0,2 e 5,0 mg/g de folha seca de escopolamina levaram a um aumento das taxas de consumo, porém levaram as larvas a perder peso, indicando o efeito tóxico dessa substância. Esse efeito tóxico ficou mais evidente quando as larvas foram alimentadas com folhas de *B. suaveolens* submetidas ao processo de indução mecânica. As larvas submetidas a esse tratamento apresentaram os efeitos tóxicos mais evidentes, chegando a perder até 0,3 mg de massa por cada mg de folha consumida.

5.4. Custos da indução

Em geral, aceita-se que as defesas das plantas contra herbívoros deveriam ocorrer, na maioria dos casos, em plantas com crescimento lento. Isso porque estas plantas teriam menos condições de reagir através do crescimento, compensando a perda de tecido ocorrida após os ataques de herbívoros. Em contraposição, Herms & Mattson (1992) descreveram que plantas com crescimento rápido teriam respostas induzidas de resistência muito mais fortes. Segundo esses pesquisadores, esses tipos de respostas podem estar relacionadas com vários fatores, entre eles:

1. A grande maioria dos mecanismos que levam à resistência induzida são associados com o processo de crescimento. Muitos dos metabólitos secundários envolvidos na resistência de plantas a herbívoros são sintetizados em proporções maiores em plantas com crescimento rápido. Desta forma, poderia-se dizer que plantas com crescimento lento não teriam os mecanismos adequados para utilizar a resistência induzida.

2. Mudanças metabólicas que levam a resultados positivos quanto à resistência diante de ataque de herbívoros provavelmente dependem da velocidade da resposta induzida. Plantas com crescimento lento não teriam condições de ativar seu metabolismo a tempo de se defender do ataque.

A seleção natural para plantas com crescimento rápido resulta em espécies que são altamente competitivas em capturar luz e outros recursos, porém, geralmente possuem sistemas de defesa bastante pobres (Bryant et al., 1983; Coley et al., 1985). Em resposta ao ataque contra herbívoros, essas plantas alocam recursos para o crescimento e não para se defender constitutivamente. Quando atacadas, essas plantas têm habilidade para crescer rapidamente (Louda et al., 1990) ou para responder ao ataque através da resistência induzida (Coley, 1987).

Esses argumentos levam a crer que ocorre competição por recursos que a planta pode alocar entre o processo de crescimento e o de defesa (Coley et al., 1985; van der Meijden et al., 1988; Herms & Mattson, 1992). Porém, a defesa induzida representa uma alternativa menos custosa para estas plantas de crescimento rápido, as quais estariam sob forte pressão para alocar recursos para o crescimento. A grande essência deste argumento é que a resistência induzida levaria a planta a economizar os custos relacionados à defesa quando esta não é necessária, no lugar de gastar recursos para o crescimento em ambientes onde há grande recompensa para o crescimento rápido. *Brugmansia suaveolens* pode ser considerada uma planta de crescimento rápido na fase vegetativa e responde de acordo com a teoria de Herms & Mattson (1992) quando submetida a danos foliares, aumentando os níveis de escopolamina no local adjacente ao dano. Ao atingir uma fase de florescimento e frutificação, as respostas induzidas parecem não exercer um papel tão importante como o papel das defesas constitutivas encontradas nas folhas jovens (brotos), flores e frutos.

A distribuição de escopolamina encontrada em *B. suaveolens* está muito próxima do que prediz a teoria da defesa ótima postulada por McKey (1974) e Rhoades (1979) e nos parece estar relacionada a dois tipos de defesa: (1). a defesa induzida quando ocorrem danos nas folhas maduras; (2). A defesa através de níveis constitutivos de alcalóides nos órgãos mais importantes em cada fenofase da planta. Os resultados também demonstraram que nos órgãos nos quais a quantidade de escopolamina se apresenta em níveis mais altos (constitutivos), não ocorre uma indução significativa diante de danos mecânicos, concordando também com a teoria da defesa ótima, uma vez que não há necessidade de gastar energia para a

produção de substâncias de defesa, uma vez que os níveis constitutivos já estão estabelecidos.

Alguns trabalhos demonstraram mecanismos de defesa de plantas contra herbívoros mediados por inibidores de proteinases (Ryan, 1979; Nelson et al., 1983; Hilder et al., 1987). Esses autores, detectaram a presença destes compostos em mais de 40 espécies representando 20 famílias. O processo mediado por um fator indutor, que é liberado no sistema vascular das plantas atacadas, leva essa substância até o local do ataque inibindo o predador por seus efeitos antialimentantes. Provavelmente, em *B. suaveolens,* os mecanismos de defesa induzida e ou de defesa constitutiva funcionam através deste modelo. Os órgãos que necessitam de defesas instantâneas, possuindo níveis constitutivos de defesa, possuem acúmulo de substâncias de defesa devido aos genes se expressarem continuamente. Na defesa induzida, ocorrem sinais (por exemplo, perda de massa foliar por herbivoria) para que sejam liberadas substâncias que levem esses genes a se expressarem. Os resultados obtidos demonstraram, claramente, que ocorre um aumento significativo de escopolamina 24 h após folhas maduras de plantas de *B. suaveolens* serem submetidas a danos mecânicos. Esse aumento, aliado ao efeito tóxico e repelente observado nos ensaios específicos utilizando escopolamina (discutidos adiante), pode ser interpretado como um processo de indução e, provavelmente, está relacionado com mecanismos adaptativos da planta em resposta à quantidade e tipo de herbivoria que ela sofre em seu ambiente natural. Resultados semelhantes foram obtidos por Khan & Harborne (1990, 1991), através da indução de folhas de *Atropa acuminata* L. (Solanaceae) por danos mecânicos e por herbivoria. van Dam et al. (1993) e van Dam & Vrieling (1994) também obtiveram

indução após 24 h, quando folhas de *Cynoglossum officinale* L. (Boraginaceae) foram submetidas a tratamentos de dano mecânico.

Também observou-se a presença de concentrações altas de escopolamina nos órgãos mais importantes em cada fenofase da planta. Pressupondo que as defesas são custosas e cada tipo de resposta a diferentes tipos de danos estão relacionados com a maneira das plantas otimizarem o balanço custo-benefício (Karban & Myers, 1989), podemos inferir alguns fatores. De acordo com o trabalho de van der Meijden et al., (1988) e van der Meijden, (1990), as estratégias de defesa das plantas estão relacionadas diretamente com a probabilidade destas serem atacadas. Defesas constitutivas estariam relacionadas com plantas que possuem alto risco de serem atacadas por insetos generalistas, enquanto que as defesas induzidas seriam mais vantajosas para plantas que sofrem baixo risco de ataque e pressões ocasionadas por ataques imprevisíveis de herbívoros. No caso de plantas que são atacadas principalmente por herbívoros especialistas (aqueles que já se adaptaram às defesas químicas da planta hospedeira), o aumento da produção de substâncias de defesa provavelmente não levaria à diminuição do ataque e, nestes casos, uma rebrota rápida e eficiente poderia ser o mecanismo que levaria a um maior sucesso.

Os resultados demonstram, claramente, que a escopolamina tem influência negativa sobre herbívoros e a sua presença nas folhas de *B. suaveolens* está relacionada com a defesa da planta contra esses herbívoros. A sua presença em altas concentrações nos órgãos reprodutivos e nos brotos (meristemas) e a indução nas folhas maduras provavelmente representam uma forma de defesa, conferindo à planta importantes características de respostas aos ataques de inimigos naturais.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que, em folhas de *B. suaveolens*, somente ocorrem diferenças no conteúdo de escopolamina entre as jovens e as maduras. Nos outros órgãos (caule, raízes, flores e frutos), os níveis acompanham a importância do órgão em relação à fenofase estudada. Esses dados podem ser interpretados segundo a teoria de otimização de defesas em plantas, pela qual órgãos mais valiosos em termos de aptidão dentro de um dado estágio fenológico alocariam maior quantidade de substâncias de defesa e, portanto, seriam mais protegidos contra inimigos naturais.

Os resultados de indução mostraram que, quando 50% da área foliar de folhas de plantas de 90 dias de idade foram removidas mecanicamente, houve aumento de até quatro vezes na escopolamina presente 24 h após o dano. Este aumento perdura até 48 h após o dano, voltando aos seus níveis iniciais após 96 h. Sugere-se que esta resposta de indução pode ser um mecanismo relacionado com a defesa da planta contra ataque de seus inimigos naturais.

Quando esta indução foi promovida através de jasmonato de metila, os resultados mostraram que as plantas que tiveram uma razão de indução maior tiveram um crescimento menor, e as plantas com uma razão de indução menor investiram mais no crescimento vegetativo, aumentando em até 30% sua área foliar quando comparadas com as primeiras. Esses dados suportam a hipótese de que defesas são custosas e quando recursos são utilizados para defesa eles são retirados de outras atividades da planta como por exemplo, crescimento e reprodução.

O consumo de folhas, contendo diferentes concentrações de escopolamina, por larvas de *S. frugiperda*, mostrou-se tóxico, uma vez que diante do seu consumo, podem ocorrer perdas consideráveis de massa, dificultando a sua reprodução, levando ao atraso da pupação e, em certos casos, ocasionando a mortalidade das larvas.

Até o momento, somente ocorreram relatos da influência de danos mecânicos sobre a produção de alcalóides tropânicos, não sendo esclarecidos a sua influência sobre inimigos naturais. É sabido pela literatura (Kahn & Harborne, 1991) que os efeitos de danos artificiais e naturais nem sempre podem ser comparados entre si. Pode-se sempre presumir que substâncias químicas que não foram medidas podem estar mudando como resposta aos danos realizados. Este trabalho foi o primeiro a relatar o efeito de um alcalóide tropânico sobre inimigos naturais de plantas. O trabalho se iniciou de forma a obter base de informação preliminar suficiente para saber quais os alcalóides tropânicos estavam presentes nas plantas de *B. suaveolens*. Diante dos resultados nos quais a escopolamina sempre aparecia como alcalóide principal (em quantidade), foram realizados ensaios para verificar a sua distribuição natural nas plantas durante o seu ciclo de vida. Após essas informações preliminares, pudemos realizar os ensaios de indução que, sempre acompanhados de controles rigorosos, nos levaram a resultados quanto a elevação da concentração da escopolamina diante de danos mecânicos. Os ensaios com herbívoros generalistas completaram um ciclo onde pode ser demonstrado que a escopolamina produzida por *B. suaveolens* teve influência sobre as larvas de *S. frugiperda*, levando-as, em certos casos, até a morte. Esses resultados nos levam a concluir que a escopolamina age como agente de defesa contra este herbívoro generalista.

7. BIBLIOGRAFIA

Bacchi, E.M. (1999) Alcalóides tropânicos. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. UFSC. pp. 657-678.

Baldwin, I.T. (1988a) The alkaloidal responses of wild tobacco to real and simulated herbivory. Oecologia 77:378-381.

Baldwin, I.T. (1988b) Damage-induced alkaloids in tobacco - pot-bound plants are not inducible. J. Chem. Ecol. 14:1113-1120.

Baldwin, I.T. (1988c) Short-term damage-induced increases in tobacco alkaloids protect plants. Oecologia 75:367-370.

Baldwin, I.T. (1990) The reproductive consequences associated with inducible alkaloidal responses in wild tobacco. Ecology 71:252-262.

Baldwin, I.T. (1991) Damage-induced alkaloids in wild tobacco. In: Tallamy, D.W. & Raupp, M.J., eds. Phytochemiclal induction by herbivores. Wiley, New York.pp.47-69.

Baldwin, I.T. (1998) Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations. Proc. Nat. Acad. Sci. 95:8113-8118.

Baldwin, I.T. & Callahan, P. (1993) Autotoxicity and chemical defense - nicotine accumulation and carbon gain in solanaceous plants. Oecologia 94:534-541.

Baldwin, I.T. & Hamilton, W. (2000) Jasmonate-induced responses of *Nicotiana sylvestris* results in fitness costs due to impaired competitive ability for nitrogen. J. Chem. Ecol. 26:915-952.

Baldwin, I.T. & Ohnmeiss, T.E. (1993) Alkaloidal responses to damage in *Nicotiana*

native to north-america. J. Chem. Ecol. 19:1143-1153.

Baldwin, I.T. & Schmelz, E.A. (1994) Constraints on an induced defense: the role of leaf area. Oecologia 97:424-430.

Baldwin, I.T.; Sims, C.L. & Kean, S.E. (1990) The reproductive consequences associated with inducible alkaloidal responses in wild tobacco. Ecology 71: 252-262.

Baldwin, I.T.; Gorham, D. & Schmelz, E.A. (1998) Allocation of nitrogen to an inducible defense and seed production in *Nicotiana attenuata*. Oecologia 115: 541-552.

Bernays, E.A. & Chapman, R.F. (1994) Host plant selection by phytophagous insects. Chapman & Hall, New York.

Blau, P.A.; Feeny, P.; Contardo, L. & Robson, D.S. (1978) Allylglucosinolate and herbivore caterpillars: a contrast in toxicity and tolerance. Science 200: 1296-1298.

Brachet, J. & Cosson, L. (1986) Changes in the total alkaloid content of *Datura innoxia* Mill. subjected to salt stress. J. Exp. Bot. 37:650-656.

Brown, D.G. (1998) The cost of plant defense: an experimental analysis with inducible proteinase inhibitors in tomato. Oecologia 76:467-470.

Bruin, J.; Sabelis, M.W. & Dicke, M. (1995) Do plants tap SOS signals from their infested neighbours? Trends Ecol. Evol. 10:167-170.

Bryant, J.P.; Chapin, F.S. & Klein, D.R. (1983) Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. Oikos 40:357-368.

Buchanan, B.; Gruissem, W. & Jones, R (2000) Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Gruissem, W.; Jones, R., Eds. American Soc. Plant Physiol.,

Washington D.C.

Coley, P.D. (1987) Anti-herbivore properties: The hole of habitat quality and rate of disturbance. New Phytol. 106:251-263.

Coley, P.D. & Barone, J.A. (1996) Herbivory and plant defenses in tropical forest. Ann. Rev. Ecol. Syst. 27:305-335.

Coley, P.D; Bryant, J.P. & Chapin, F.S. (1985) Resource availability and plant antiherbivore defense. Science 230:895-899.

Crawley, M.J. (1983) Herbivory: the dinamics of animal-plant interactions. Berkeley: University of California Press.

Croteau, R; Kutchan, T.M. & Lewis, N.G. (2000) Natural Products (Secondary Metabolites). In: Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R., Eds. American Soc. Plant Physiol., Washington D.C. pp. 1250-1318.

Dixon, R.A.; Harrison, M.J. & Lamb, D.J. (1994) Early events in the activation of plant defense responses. Ann. Rev. of Phytopathol. 32:479-501.

Ehrlich, P.R. & Raven P.H. (1964) Butterflies and plants - a study in coevolution. Evolution 18:586-608.

Eigenbrode, S.D. & Espelie, K.E. (1995) Effects of plant epicuticular lipids on insect herbivores. Annu. Rev. Entomol. 40:171-194.

Ethier, J.C. & Neville, G.A. (1986) Quadrupole EI and CI mass spectra of some principal tropane alkaloids. Can. J. Spectr. 31:81-88.

Evans, W.C.; Grout, R.J. & Mensah, M.L.K. (1984) Withanolides of *Datura* spp. And hybrids. Phytochemistry 23:1717-1720.

Ferraz, J.M.G. (1991) Estudos bioecológicos sobre *Spodoptera frugiperda* (Abbot e

Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) como subsdio ao manejo integrado de pragas na cultura do milho. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, SP, Brasil.

Fowler, S.V. & Lawton, J.H. (1985) Rapidly induced defenses and talking trees: The devil's advocate position. Am. Nat. 126:181-195.

Fraenkel, G.S.(1959) The raison d'être of secondary substances. Science 129:1966-1970.

Fraenkel, G.S. (1969) Evaluation of our thoughts on secondary plant substances Entomol. Exp. Appl. 12: 473-478.

Freitas, A.V.L.; Trigo, J.R.; Brown, K.S.; Witte, L.; Hartmann, T. & Barata, L.E.S. (1996) Tropane and pyrrolizidine alkaloids in the ithomiines *Placidula euryanassa* and *Miraleria cymothoe* (Lepidoptera: Nymphalidae). Chemoecology 7:61-67.

Gamborg, O. L.; Wetter, L.R. (1975) Plant Tissue Culture Methods. Saskatoon: Natl. Res. Council of Canada.

Griffin, W.J. (1992) Alkaloids of a *Datura candida* cultivar. Phytochemistry 31:367-368.

Hairston, N.G.; Smith, F.E. & Slobodkin, L.B. (1960) Community structure, population control, and competition. Am. Nat. 94:421-425.

Hanson, F.E. (1983) The behavioral and neurophysiological basis of food plant selection by lepidopterous larvae. In: Ahmad S (ed) Herbivorous insects: host seeking behavior and mechanisms. Academic Press, New York, pp:3-23.

Harborne, J.B. (1972) Phytochemical ecology. Academic Press, NewYork, 571p.

Harborne, J.B. (1978) Biochemical aspects of plant and animal coevolution.

Academic Press, New York.

Harborne, J.B. (1990) Role of secondary metabolites in chemical defense-mechanisms in plants Ciba F. Symp. 154:126-139.

Hartmann, T. (1991) Alkaloids. In: Herbivores. Their interaction with secondary plant metabolites. G.A. Rosenthal, M.R. Berenbaum (eds). Academic Press, San Diego, pp. 79-121.

Haukioja, E. (1980) On the role of plant defences in the fluctuation of herbivore populations. Oikos 35:202-213.

Hedin, P.A. (1983) Plant resistance to insects. Am. Chem. Soc. 4:27-35.

Herms, D.A. & Mattson, W.J. (1992) The dilemma of plants: to grow or defend. Q. Rev. Biol. 67:283-335.

Hernandez, M.M.; Heraso, C. & Villarreal, M.L. (1999) Biological activities of crude plant extracts from *Vitex trifolia* L. (Verbenaceae) J. Ethnopharmacol. 67(1): 37-44.

Hilder, V.A.; Gatehouse, A.M.R.; Sheerman, S.E.; Barker, R.F.; & Boulter, D. (1987) A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. Nature 330:160-163.

Hildmann, T.; Ebneth, M.; Peña-Cortés, H.; Sánches-Serrano, J.J.; Willmitzer, L. & Prat, S. (1992) General froles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. Plant Cell 4:1157-1170.

Hosozawa, S.; Kato, N.; Munakata, K. & Chen, Y.L. (1974) Antifeeding active substances for insects in plants. Agric. Biol. Chem. 38:1045-1048.

Houmani, Z.; Cosson, L.; Corbineau,F. & Côme, D. (1994) Étude de la teneur en hyoscyamine et scopolamine dúne population sauvage de *Datura stramonium*

L. en Algérie. Acta bot. Gallica 141:61-66.

Johnson, N.D.; Rigney, L.P. & Bentley, B.L. (1989) Short term induction of alkaloid production in lupines. J. Chem. Ecol. 15:2424-2435.

Karban, R. (1993) Induced resistance and plant density of a native shrub, *Gossypium thurberi*, affect its herbivores. Ecology 74:1-8.

Karban, R. & Myers J.H. (1989) Induced plant responses to herbivory. Annu. Rev. Ecol. Syst. 20:331-348.

Kessler, A. & Baldwin, I.T. (2001) Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. Science 291: 2141-2144.

Khan, M.B. & Harborne, J.B. (1990) Induced alkaloid defence in *Atropa acuminata* in response to mechanical and herbivore leaf damage. Chemoecology 1:77-80.

Khan, M.B. & Harborne, J.B. (1991) A comparison of the effect of mechanical and insect damage on alkaloid levels in *Atropa cuminata*. Biochem. Syst. Ecol. 19: 529-534.

Kogan, M. & Paxton, J. (1983) Natural inducers of plant resistance to insects. In: Plant resistance to insects. P.A. Hedin, ed. Washington, D.C: American Chemical Society, 153-171.

Krischik, V.A. & Denno, R.F. (1983) Individual, population, and geographic patterns in plant defense. In: Variable plants and herbivores in natural and managed systems, ed. R.F. Denno & M.S. McClure. New York, Academic Press, pp.463-512.

Lerdau, M., Litvak, M. & Monson, R. (1994) Plant chemical defense: Monoterpenes and the growth-differentiation balance hypothesis. Trends Ecol. Evol. 9:58-61.

Levin, D.A. (1973) The role of trichomes in plant defense. Q. Rev. of Biol. 48:3-15.

Lewinsohn, E.; Gijzen, M. & Croteau, R. (1991) Defense mechanisms of conifers: Differences in constitutive and wound-induced monoterpene biosynthesis among species. Plant Physiol. 96:44-49.

Lockwood, T.E. - 1963 - A taxonomic revision of *Brugmansia*, PH. D. thesis, Harvard University, Cambridge, Mass.

Louda, S.M.. Keeler, K.H. & Holt, R.D. (1990) Herbivore influences on plant performace and competitive interactions. In: Perspectives in plant competition, ed. J.B. Grace & Tilman, D. New York, Academic Press, pp.413-444.

Mann, J. (1987) Secondary metabolism. Clarendon Press, Oxford.

Mattson, W.J.; Lawrence, R.K.; Haack, R.A.; Herms, D.A. & Charles, P. (1988) Defensive strategies of woody plants against different insect-feeding guilds in relation to plant ecological strategies and intimacy of association with insects. In: Mechanisms of woody plant defenses against insects, ed. W.J. Mattson, J. Levrieux & C. Bernard-Dagan. New York, Springer-Verlag, pp.3-38.

McKey, D. (1974) Adaptive patterns in alkaloid physiology. Am. Nat. 108: 305-320.

McKey, D. (1979) The distribution of secondary compounds within plants. In: Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites, ed. S.A. Rosenthal & D.H. Janzen. New York, Academic Press, pp.56-133.

Miller, J.S. & Feeny, P. (1983) effects of benzylisoquinoline alkaloids on the larvae of polyphagous Lepidoptera. Oecologia 58:332-339.

Mooney, H.A. & Gulmon (1982) Constraints on leaf structure and function in reference to herbivory. Bioscience 32:198-206.

Murkoch, W.W. (1966) Community structure, population control, and competition: A critique. Am. Nat. 100:219-226.

Myers,J.H. & Bazely, D. (1991) Thorns, spines, prickles, and hairs: Are they stimulatd by herbivory and do they deter herbivores? In: Phytochemical induction by herbivores, ed. D.W. Tallamy & M.J. Raupp New York, John Wiley, pp.325-344.

Nelson, E.B.; Kuter G.A. & Hoitink, H. (1983) Effect of compost maturity on the induction of suppression to rhizoctonia damping-off of radish by *Trichoderma harzianum.* Phytopathology 73:822

Nitao, J.K. & Zangerl, A.R. (1987) Floral development and chemical defense allocation in wild parsnip (*Pastinaca sativa*). Ecology 68:521-529.

Parr, A.J.; Payne, J.; Eagles, J.; Chapman, B.T.; Robins, R.J. & Rhodes, M.J.C. (1990) Variation in tropane alkaloid accumulation within the solanaceae and strategies for its exploitation. Phytochemistry 29:2545-2550.

Pelletier, S.W.; Glinski, J.A.; Joshi, B.S. & Chen, S. (1983) The diterpenoid alkaloids of delphinium-tatsienense franch. Heterocycles 20:1347-1354.

Raffa, K.F. (1991) Induced defensive reactions in conifer-bark beetle systems. In: Phytochemical induction by herbivores, ed. D.W. Tallamy & M.J. Raupp. New York, John Wiley, pp.245-276.

Rausher, M.D. (1982) Population differentation in *Euphydryas edit*ha butterflies: larval adaptation to different hosts. Evolution 36:581-590.

Raupp, M.J. & Denno, R.F. (1984) The suitability of damaged willow leaves as food for the leaf beetle, *Plagiodera versicolora*. Ecol. Entomol. 9:443-448.

Raven, P.H.; Evert, R. & Curtis, H. (1976) Biologia Vegetal. Editora Guanabara, Rio de Janeiro, RJ.

Redman, A.M.; Cipollini, D.F. & Schultz, J.C. (2001) Fitness costs of jasmonic acid-

induced defense in tomato, *Lycopersicon esculentum*. Oecologia 126:380-385.

Rhoades, D.F. (1979) Evolution of plant chemical defense against herbivores. In: Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites, ed. G.A. Rosenthal & D.H. Janzen. New York, Accademic Press, pp. 3-54.

Rice, E.L. (1984) Allelopathy. Acad. Press, New York, 894p.

Rosenthal, G.A. & Janzen, D.H. (1979) Herbivores. Their interaction with secondary plant metabolites. Academic Press, New York.

Ryan, C.A. (1983) Insect-induced chemical signals regulating natural plant protection responses. In: Variable plants and herbivores in natural and managed systems, ed. R.F. Denno & M.S. McClure, New York, Academic Press, pp.43-60.

Salisbury, F.B. & Ross, C.W. (1985) Lipids and other natural products. In: Salisbury, F.B. & Ross, C.R. (eds). Plant Physiology. Wadsworth Publishing Company, Belmont, California 94002. pp 268-287.

Schoonhoven, L.M. (1972) Secondary plant substances and insects. In: Runeckles, V.C. & Tso, T.C. (eds) Structural and functional aspects of phytochemistry. Academic Press, New York, pp 197-224.

Schultes, R. E.; Hofmann, A. (1993) In :Plantas de los Dioses (Schultes, R.E. & Hoffmann, A. eds) p. 36, EMB service for Publishers, Lucerne, Switzerland.

Smedegaard-Petersen, V. & Stolen, O. (1981) Effect of energy-requiring defense reaction on yield and grain quality in a powdery mildew resistant barley cultivar. Phytopathology 71:396-399.

Stock, W.D.; Le Roux, D. & Van der Heyden, F. (1993) Regrowth and tannin production in woody and succulent karoo shrubs in response to simulated

browsing. Oecologia 96:562-568.

Strong, D.R.; Lawton, J.H. & Southwood, R. (1984) Insects on plants: Community patterns and mechanisms. Cambridge, Harvard University Press.

Trigo, J.R.; Witte, L.; Brown Jr K.S.; Hartmann, T. & Barata, L.E.S. (1993) Pyrrolizidine alkaloids in the arctiid moth *Hyalurga syma*. J. Chem. Ecol. 19:669-679.

Tuomi, J.; Fagerstrom, T. & Buenakam, P. (1991) Carbon allocation, phenotypic plasticity, and induced defenses. In: Tallamy, D.W. & Raupp, M.J., eds. Phytochemical induction by herbivores. Wiley, New York.

van Dam, N.M. & Vrieling K. (1994) Genetic variation in constitutive and inducible pyrrolizidine alkaloid levels in *Cynoglossum officinale* L. Oecologia 99:374-378.

van Dam, N.M.; Meijden, E.V.D. & Verpoorte, R. (1993) Induced responses in three alkaloid containing plant species. Oecologia 95:425-430.

van den Dool, H. &; Kratz, P.D. (1963) A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatografy. J. Chromatogr. 11:463-471.

van der Meijden, E. (1990) Herbivory as a trigger for growth. Funct Ecol. 4:597-598.

van der Meijden, E.; Wijn, M. & Verkaar, H.J. (1988) Defense and regrowth: Alternative plant strategies in the struggle against herbivores. Oikos 51:355-363.

Vogel, A.I. (1971) Química Orgânica.Ed. USP. Reagentes Orgânicos. Pp. 1017-1023.

Wallace, J.W.& Mansell, M.L. (eds) (1976) Biochemical interactions between plants and insects. Recent Advances in Phytochemistry, Plenum Press, New York. Vol 10:785-894.

Wink, M. (1983) Wounding-induced increase of quinolizidine alkaloid accumulation in lupin leaves. Z. Naturforscht. 38:905-909.

Wink, M. (1993) Allelochemical properties or the raison d'être of alkaloids. In: Cordell, G.A. (ed) the alkaloids, vol 43. Academic Press, San Diego, pp.1-118.

Zabetakis, I.; Edwards, R. & O'hagan, D. (1999) Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*. Phytochemistry 50:53-56.

Zangerl, A.R. (1990) Furanocoumarin induction in wild parsnip: evidence of na induced defense aginst herbivores. Ecology 71:1933-1940.

Zangerl, A.R. & Bazzaz, F.A. (1992) Theory and pattern in plant defense allocation. In: Simms, E.L. & Fritz, R.S. (eds) Plant resistance to herbivores and pathogens. Ecology, evolution, and genetics. The University of Chicago Press, Chicago, pp. 363-361.

Zangerl, A.R. & Rutledge, C.E. (1996) The probability of attack and patterns of constitutive and induced defense: A test of optimal defense theory. Am. Nat. 147:599-608.

Zangerl, A.R.; Michele Arntz, A. & Berenbaum May, R. (1997) Physiological price of na induced chemical defense: photosynthesis, respiration, biosynthesis, and growth. Oecologia 109:433-441.

Zar, J.H. (1999) Biostatistical Analysis 4ª Ed. Prentice Hall, Upper Saddle River.