

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE BOTUCATU

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**EFEITO DA ASSIMETRIA FLUTUANTE NOS PADRÕES DE HERBIVORIA
DE UM MINADOR FOLIAR EM *Erythroxylum tortuosum* MART. (ERYTHROXYLACEAE)**

MARCOS NAKAMURA ISHINO

**Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências, Campus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas
(Botânica), AC: Morfologia e
Diversidade Vegetal**

BOTUCATU - SP

- 2007 -

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE BOTUCATU

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**EFEITO DA ASSIMETRIA FLUTUANTE NOS PADRÕES DE HERBIVORIA
DE UM MINADOR FOLIAR EM *Erythroxylum tortuosum* MART. (ERYTHROXYLACEAE)**

MARCOS NAKAMURA ISHINO

PROF. DR. MARCELO NOGUEIRA ROSSI

ORIENTADOR

**Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências, Campus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas
(Botânica), AC: Morfologia e
Diversidade Vegetal**

BOTUCATU - SP

- 2007 -

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Ishino, Marcos Nakamura.

Efeito da assimetria flutuante nos padrões de herbivoria de um minador foliar em *Erythroxylum tortuosum* Mart. (Erythroxylaceae) / Marcos Nakamura Ishino. – Botucatu : [s.n.], 2007.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2007.

Orientador: Marcelo Nogueira Rossi

Assunto CAPES: 20302002

1. Ecologia vegetal 2. Morfologia vegetal 3. Cerrado

CDD 581.4

Palavras-chave: Assimetria flutuante; *Erythroxylum tortuosum*; Herbivoria; Interações inseto-planta; Minador foliar; Qualidade da planta

Gratidão à

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)
- Processo 05/52569-0 -

pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

Dedicatória

*Ao meu filho
e a Deus,
por cuidar dele
e orar por todos nós ..*

Agradecimentos

Ao amigo e baixista da banda, Marcelo, que tive o prazer de conhecer no mestrado. E ao excepcional profissional e orientador Prof. Dr. Marcelo Nogueira Rossi, um exemplo de dedicação à pesquisa, que forneceu todo auxílio e todas condições de trabalho que um aluno possa precisar para fazer Ciência.

À Biologia, à Ciência e à Natureza, que nos deixa viver em seus domínios e permite gentilmente ser observada, utilizada e analisada, em alguns momentos ferida, mas também ser apreciada e cuidada. Ah, e ser plotada em gráficos também!

A todos os mestres professores que contribuem com suas experiências e seus ensinamentos, fazendo-o com amor à profissão, à formação intelectual e humana do ser aluno e ao bem da Ciência.

À Profa. Yuriko Yanagizawa pela amizade e por ter dado início ao meu contato com o sistema de estudo. E ao grupo de ecologia vegetal formado na época da graduação por terem estado no começo dessa empreitada (falando assim parece tão distante...): Clívia (Tchutchuca), Damon (Cerva), Leandro (Sula), Beatriz (Meia-Boca) e Maíra (Torrada).

À Profa. Silvia R. Machado por sempre incentivar o trabalho no Cerrado e por mostrar, com muito amor, a beleza dessa vegetação.

À Profa. Giuseppina Pace P. Lima (Fina) pela gentileza em permitir usufruir das instalações de seu laboratório chique do Depto. de Química e Bioquímica, e pela ajuda nas dúvidas bioquímicas.

Ao Prof. Francisco A. de Mello (Chico) do Depto. de Zoologia pelas dicas e pelo auxílio na montagem dos insetos enviados aos especialistas para identificação.

Aos especialistas estrangeiros pela determinação das espécies de insetos do sistema de estudo: Profs. Klaus Sattler (UK), Michael Sharkey (USA), Christer Hansson (SE) e John S. Noyes (UK).

Às Profas. Martha Mischan e Lídia (Depto. Bioestatística) pela ajuda nos sempre presentes dilemas estatísticos.

A todos do unido e crescente (exponencialmente) grupo do Laboratório de Ecologia de Interações Tróficas, Depto. de Botânica, IBB – UNESP, vulgo “Puxadinho da Gabi

e da Isabela” por ajudas, sorrisos, caras feias, idas ao campo, enfim, pela amizade e companhia no movimentado expediente: Débora (Loira), Paula (Sedada), Carol (Nhãinha), Luciana (Capitu), Lígia (Xilema), Cris (“Bola-gato”), Danilo (Lanhoso), Dália (Turista) e Jefferson (Agregado).

Aos funcionários do Depto. de Recursos Naturais (Ciência do Solo), FCA: Técnicos Dorival, Adilson e Zé Carlos, pelo auxílio em análises bioquímicas do projeto de pesquisa, e Profs. Dirceu e Lyra por permitirem o uso do laboratório.

Aos integrantes em geral do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica) e do Depto. de Botânica que demonstram empenho em fazer crescer cada vez mais este Programa. E aos docentes do Conselho do Programa que procuram entender e solucionar problemas e imprevistos com os projetos de pesquisa dos alunos, mas acabam ganhando uns cabelos brancos por isso.

Às esforçadas e competentes comissões organizadoras do Workshop da Pós-Graduação em Ciências Biológicas, IBB – UNESP, que com um pouquinho de si conseguiram fazer muito pela Pós-Graduação deste Instituto.

Aos neurônios perdidos, ao computador, à Internet, ao pen-drive, às cadeiras com assentos confortáveis, ao *Saccharomices cereviseae* e à churrasqueira, ao glorioso time de softbol “Botucatu Stars League”, e à saúde, porque sem ela realmente não fazemos nada!

Aos grandes e sempre presentes Amigos que sabem que o são e simplesmente são.

E,

A minha Família . . .

. . .que só me dá alegrias . . .

. . . e que me oferece com muito amor . . .

. . . um dia após o outro . . .

. . . mais razões para eu viver . . .

Ao meu Pai (Paulo), a minha Mãe (Neide), a meu irmão (Fernando) e
a minha querida Iana . . . um grande, forte e especial abraço!

E um beijo carinhoso na testa!

Bons ares a todos!

ISHINO, M. N. **EFEITO DA ASSIMETRIA FLUTUANTE NOS PADRÕES DE HERBIVORIA DE UM MINADOR FOLIAR EM *ERYTHROXYLUM TORTUOSUM* MART. (ERYTHROXYLACEAE).** 2007. 81 P. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

RESUMO - A assimetria flutuante (AF), uma pequena e aleatória variação da simetria em caracteres bilaterais simétricos, tem sido utilizada como indicativo de estresse e suscetibilidade à herbivoria em plantas. O Cerrado é um bioma que por possuir uma diversidade biológica elevada e, conseqüentemente, um alto potencial de ocorrência de interações populacionais entre plantas e insetos, fornece sistemas propícios para estudos de herbivoria. No presente trabalho foram investigados diversos aspectos ecológicos da interação entre *Erythroxylum tortuosum* Mart. (Erythroxylaceae), uma planta típica de Cerrado, e *Evippe* sp.2 (Lepidoptera: Gelechiidae), um inseto minador foliar. Estudou-se a relação entre AF das folhas e as seguintes variáveis: (1) intensidade de infestação do minador; (2) qualidade da planta; (3) preferência de oviposição; (4) quantidade de recurso (área foliar); (5) nível de dano da planta (área minada); (6) efeito de borda. Também foi estudada a fenologia reprodutiva e vegetativa de *E. tortuosum*, a morfologia da mina, a atividade dos minadores, bem como as fases de ocorrência do minador e das diferentes espécies de parasitóides. Plantas de *E. tortuosum* foram marcadas em fragmento de cerrado pertencente à reserva particular “Fazenda Palmeira-da-Serra”, Pratânia-SP. A partir de fotografias digitais de cada folha, medições para determinação da AF, da área foliar e da área minada foram feitas em software de análise de imagem. A infestação foi obtida pela porcentagem de folhas minadas, registrando-se o número de minas em ramos selecionados aleatoriamente. A qualidade nutricional foi avaliada pelo conteúdo de água, nitrogênio e taninos das folhas. Para a preferência de oviposição, foi feita a comparação de todas as variáveis entre folhas com e sem postura. Folhas minadas foram coletadas periodicamente, fotografadas para a avaliação de AF e do nível de dano, e armazenadas para registro de emergência de minadores e parasitóides. O efeito de borda foi avaliado comparando-se a AF e as outras variáveis entre plantas localizadas no interior e na borda do fragmento. A fenologia de *E. tortuosum* foi estudada pelo método de Fournier adaptado. As observações sobre a morfologia da mina e a atividade do minador basearam-se em registros a olho nu feitos no campo e no laboratório. Os minadores preferiram folhas maiores com baixo teor de água e menor nível de AF. Os minadores não causaram AF nas folhas, sendo outros fatores responsáveis pelo estresse das plantas. A AF mostrou ser um indicador da tolerância da planta ao estresse.

Palavras-chave: Assimetria flutuante, qualidade da planta, herbivoria, minador foliar, *Erythroxylum tortuosum*, interações inseto-planta, Cerrado.

ISHINO. M. N. EFFECT OF FLUCTUATING ASYMMETRY IN THE PATTERNS OF LEAFMINER HERBIVORY ON *ERYTHROXYLUM TORTUOSUM* MART. (ERYTHROXYLACEAE). 2007. 81 P. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) - INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

ABSTRACT - Fluctuating asymmetry (FA), a subtle random variation in symmetry of bilaterally symmetric characters, has been used as a stress indicator and plant susceptibility to herbivory. Cerrado is a Brazilian like-savannah biome that hosts a high biodiversity; therefore it has a great variety of population interactions between plants and insects, being a suitable system for herbivory studies. In this study, we investigated several ecological aspects from the interaction between *Erythroxylum tortuosum* Mart. (Erythroxylaceae), a typical plant from Cerrado, and *Evippe* sp.2 (Lepidoptera: Gelechiidae), a leafminer insect. We examined the relationship among leaf FA and the following variables: (1) leafminer infestation; (2) plant quality; (3) oviposition choice; (4) amount of resource (leaf area); (5) plant damage level (mined area); (6) edge effect. We also studied the reproductive and vegetative phenology of *E. tortuosum*, morphology of mines, leafminer activity, and the emergence times of the leafminer and its parasitoids. Plants were marked in four transects in a fragmented area of Cerrado located at the “Palmeira-da-Serra” farm, a private reserve located near Pratânia-SP. Digital pictures of each leaf were taken for FA, and leaf and mined area measurements by an image analysis software. Leafminer infestation was assessed calculating the proportion of mined leaves, calculated as the number of mines in random selected shoots in a given plant. Plant quality was examined for water, nitrogen and tannin contents of leaves. For oviposition choice, all variables were compared between leaves with and without eggs. Mined leaves were collected periodically, photographed to measure FA and damage level, and then kept in the laboratory to record the emergence of miners and their parasitoids. The edge effect was verified comparing FA and all variables between plants from the edge and the interior part of the fragment. Phenology of *E. tortuosum* was investigated by an adaptation of the Fournier’s method. Mine activity and morphology were taken by eye at field and laboratory observations. Leafminers preferred bigger leaves with low water content and FA levels. Miners did not cause FA on leaves, being other factors responsible for plant stress. FA was revealed as an indicator of tolerance of plants to stress.

Keywords: Fluctuating asymmetry, plant quality, herbivory, leafminer, *Erythroxylum tortuosum*, plant-insect interactions, Cerrado.

ÍNDICE

<i>Introdução Geral</i>	1
<i>Herbivoria: algumas considerações</i>	1
<i>Herbivoria no Cerrado: algumas considerações</i>	2
<i>Estresse em plantas e Qualidade Nutricional</i>	4
<i>Instabilidade no Desenvolvimento e Assimetria Flutuante</i>	6
<i>Efeito de borda: mais uma questão</i>	8
<i>Objetivos Gerais</i>	9
<i>Referências Bibliográficas</i>	10
<i>Capítulo 1</i>	15
<i>Interação tritrófica no Cerrado:</i> <i>Planta hospedeira, Minador foliar e Parasitóides</i>	
1.1 INTRODUÇÃO	16
1.2 MATERIAIS E MÉTODOS	18
1.2.1 Área de estudo	18
1.2.2 Fenologia dos indivíduos de <i>E. tortuosum</i>	18
1.2.3 Estudo da morfologia da mina e da atividade dos minadores foliares	19
1.2.4 Determinação das fases de ocorrências do minador foliar e dos parasitóides	19
1.2.5 Informação complementar: identificação dos espécimes de microlepidoptera	20
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
1.3.1 Fenologia dos indivíduos de <i>E. tortuosum</i>	25
1.3.2 Morfologia da mina	26
1.3.3 Atividade do minador foliar	26
1.3.4 Determinação das fases de ocorrência do minador foliar e dos parasitóides	27
1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

*Assimetria Flutuante, Qualidade nutricional e Herbivoria
em Erythroxylum tortuosum Mart. (Erythroxylaceae)*

2.1 INTRODUÇÃO	38
2.1.1 Relação entre assimetria flutuante, qualidade da planta, e herbivoria	38
2.1.2 Sistema de estudo	40
2.1.3 Hipóteses	42
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	43
2.2.1 Área de estudo	43
2.2.2 Relação entre AF e intensidade de infestação	43
2.2.3 Relação entre preferência de oviposição, AF, qualidade nutricional e área foliar	44
2.2.4 Relação entre qualidade nutricional, AF e área foliar	45
2.2.5 Herbívoros como agentes de estresse e causadores de AF	46
2.2.6 Efeito de borda	46
2.2.7 Análise de dados	47
2.3. RESULTADOS	50
2.3.1 Testes para AF e dependência do tamanho	50
2.3.2 Relação entre AF e intensidade de infestação	51
2.3.3 Relação entre preferência de oviposição, AF, qualidade nutricional e área foliar	52
2.3.4 Relação entre qualidade nutricional, AF e área foliar e comparações entre as fases de desenvolvimento das plantas	54
2.3.5 Herbívoros como agentes de estresse e causadores de AF	55
2.3.6 Efeito de borda	57
2.4 DISCUSSÃO	59
2.5 CONCLUSÕES	69
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

<i>Apêndice</i>	77
A. Modelo de planilha para as avaliações fenológicas	78
B. Protocolo da metodologia para quantificação de taninos	79
C. Análises exploratórias	81

Introdução Geral

Herbivoria: algumas considerações

As plantas são a base da maioria das cadeias alimentares terrestres, representando uma ampla disponibilidade de alimento para qualquer organismo capaz de explorá-las. Quando um organismo tem o contato com a planta e consome o todo ou parte dela, ocorre a chamada herbivoria. Geralmente, a herbivoria é uma ação não letal para os vegetais (Stiling, 1999), entretanto, quando a atividade do herbívoro causa a morte da planta, pode ser considerada uma predação (Ricklefs, 2003). O consumo de sementes e plântulas são exemplos de predação, pois inviabilizam qualquer sucesso no desenvolvimento dos indivíduos, enquanto que a alimentação por folhas e outras estruturas da planta pode ser considerada uma relação de parasitismo, uma vez que em raros casos, com a intensa pressão de herbivoria, as plantas não conseguem sobreviver (Strauss & Zangerl, 2002).

Estima-se que para a maioria dos sistemas naturais, não mais que 10% da produção primária seja retirada pelos herbívoros, sendo 90% retirada pela decomposição (Crawley, 1983). Pimentel (1988) revisou 93 casos de herbivoria em folhas e constatou que apenas 7% da área foliar era consumida por herbívoros. Por outro lado, Cyr & Pace (1993) revisaram diversos outros casos de herbivoria, mostrando que existiam níveis mais altos de retirada da produção primária pelos herbívoros do que se pensava, encontrando-se valores de 18% em sistemas terrestres (67 estudos) e 51% em sistemas aquáticos (44 estudos). As melhores evidências do impacto dos herbívoros são provenientes de exemplos de controle biológico de plantas daninhas. Um clássico exemplo seria o controle biológico do cacto *Opuntia stricta* pela mariposa *Cactoblastis cactorum*. Esta espécie de cacto foi importada das Américas e tornou-se uma praga importante na Austrália. No entanto, após a introdução de *C. cactorum*, proveniente da América do Sul, a densidade populacional de *O. stricta* diminuiu significativamente em todo país, estando atualmente presente apenas em áreas isoladas (Simberloff & Stiling, 1996). Esses relatos mostram a relativa proporção do impacto que a fauna de herbívoros pode causar às plantas.

Dentre os inúmeros organismos que interagem com as plantas, exercendo a pressão de herbivoria, os insetos merecem destaque. Strong (1984) estimou que 26% da biota é composta de insetos herbívoros e 22% de plantas, excluindo-se algas, fungos e micróbios da comparação. Esses valores revelam o domínio que os insetos herbívoros e as plantas detêm na

diversidade biológica mundial, propiciando uma infinidade de interações tróficas possíveis entre os dois grupos. Uma das mais impressionantes características dos insetos herbívoros é a variedade de modos pelos quais eles obtêm seu alimento e o alto grau de especialização a que essa relação pode chegar (Schoonhoven *et al.*, 2005). Insetos herbívoros podem alimentar-se de plantas externamente, atacando folhas, gemas ou flores (como os mastigadores), ou internamente, abrigando-se dentro de estruturas das plantas e consumindo tecidos internos (minadores foliares e galhadores) (Strauss & Zangerl, 2002). Devido ao seu pequeno tamanho, insetos freqüentemente têm uma íntima e duradoura associação com a planta hospedeira, e, além disso, seu período de vida geralmente bem curto leva-os a pré-disposição de rápidas taxas de evolução (Strauss & Zangerl, 2002).

As relações de herbivoria dos minadores foliares com as plantas hospedeiras são modelos de associação duradoura e de alta especialização. Minadores estão restritos à alimentação do tecido entre as superfícies foliares e não podem deslocar-se de uma folha para outra (Stiling, 1999). Essa “sessilidade” leva então a uma forte seleção por melhores plantas hospedeiras (Rice & Hostert, 1993) e conseqüente especialização na alimentação. Apesar de sua vagilidade (capacidade de migração por vôo), sabe-se também que alguns minadores tornaram-se localmente adaptados tendo uma estreita relação com plantas individuais (Mopper *et al.*, 1995; Mopper *et al.*, 2000). Enfim, os minadores foliares são apenas um grupo de insetos herbívoros dentre muitos existentes, mas podem funcionar, junto com as plantas, como importantes ferramentas para investigar relações de herbivoria em estudos envolvendo interações entre plantas e insetos.

Herbivoria no Cerrado: algumas considerações

O Bioma Cerrado compreende diversas variações de uma formação vegetal savânica tipicamente brasileira, sendo considerado um dos ecossistemas mais ricos do planeta (Felfili & Silva Júnior, 2001). Está incluído na lista mundial dos 25 “hotspots”, isto é, áreas com menos de 30% da vegetação original remanescente e com grande endemismo de espécies (Myers *et al.*, 2000). Embora atualmente seja um ambiente fragmentado e intensamente alterado pela ação antrópica, possui uma diversidade biológica elevada e, conseqüentemente, um alto potencial de ocorrência de interações populacionais entre plantas e insetos. Estudos iniciais de interações entre plantas e herbívoros em Cerrado têm sido descritivos, focando em informações básicas. Marquis *et al.* (2002) ressaltam as seguintes questões como as principais estudadas: Quantas espécies de herbívoros estão envolvidas nos estudos de interações tróficas,

e quais são suas abundâncias e dietas? Qual é a relação entre a abundância do inseto herbívoro e a fenologia da planta? Quanto dano os herbívoros causam, e que traços da planta podem ser importantes para observar diferenças interespecíficas no nível de dano? Apesar dessa potencialidade, entretanto, muitas questões ainda permanecem sem resposta. Assim, há a necessidade de maior direcionamento da atenção dos estudos entre plantas e herbívoros para o ambiente de cerrado, aliando as informações básicas existentes com outras questões mais específicas, que possam servir como parâmetros para futuras generalizações e entendimento dos processos globais que regem esse bioma.

Infelizmente, dados comparativos para interações entre plantas e herbívoros nas savanas do Velho Mundo parecem não estar disponíveis (Andersen & Lonsdale, 1990; Werner, 1991). Esse fato leva à comparação dos dados existentes com outras vegetações tropicais, sugerindo que os ecossistemas do Cerrado diferem das florestas de vários importantes modos. Marquis *et al.* (2002) citam alguns aspectos dessa distinção entre os tipos vegetacionais: o nível de dano causado pelos insetos herbívoros no Cerrado é muito menor do que o esperado baseando-se em modelos de perda de área foliar. Níveis de dano caem dentro da amplitude das regiões de baixo nível nutricional. Entretanto, estratégias de escape como alteração da fenologia (como a antecipação da produção de novas folhas antes da época de aumento da abundância dos insetos herbívoros) e manutenção de tecidos de baixa qualidade nutricional, podem ser responsáveis pelos níveis de dano relativamente reduzidos; para os Lepidoptera, a abundância de lagartas é maior no fim da época úmida e no começo da época seca, um padrão diferente do encontrado em qualquer outra vegetação tropical (ver também Diniz & Moraes, 1997); e os níveis de danos por patógenos, ao menos em uma região de cerrado (Fazenda Água Limpa, Brasília-DF), são muito maiores do que se pensava, dado o índice pluviométrico nele ocorrente.

Espera-se então que a herbivoria tenha um importante impacto no cerrado não só pela influência no crescimento e na reprodução das plantas, mas também pelo seu efeito potencial interagindo com os fatores abióticos (Marquis *et al.*, 2002). A longa época seca, a qualidade nutricional muito baixa do solo e as queimadas frequentes, podem ser citados como os fatores abióticos mais conhecidos e estudados dentre os vários que podem causar estresse e dificultar a vida para as plantas do Cerrado (Motta *et al.*, 2002; Miranda *et al.*, 2002; Hoffmann & Moreira, 2002). Em virtude da necessidade de estudos abordando interações entre plantas e herbívoros e, conseqüentemente, interações entre plantas e insetos no Cerrado, aliado ao fato de fatores abióticos terem sido alvo preferencial da linha de pesquisa de estresse em plantas, no presente trabalho tivemos o interesse maior em estudar relações de estresse entre um inseto herbívoro (fator biótico) e uma planta típica de Cerrado.

Para uma determinada planta, o estresse pode ser considerado como uma reação adversa a condições ambientais não favoráveis para seu crescimento e desenvolvimento. As plantas naturalmente evoluíram para existir em condições que são raramente ideais para manutenção normal da sua fisiologia, podendo até suportar limites extremos de sobrevivência (Sheperd & Griffiths, 2006). O estresse em plantas pode ser uma consequência da atuação de fatores abióticos como condições climáticas adversas, solo com deficiência nutricional e déficit hídrico (Freeman *et al.*, 2004; Hódar, 2002), e fatores bióticos como herbivoria e doenças (Møller, 1995; Zvereva *et al.*, 1997). Fatores antropogênicos como mudanças climáticas, poluição, contaminação com metais pesados, destruição de habitat, têm recebido bastante atenção nas pesquisas com estresse em plantas (Zvereva *et al.*, 1997; Cornelissen *et al.*, 2003). Por meio de vários mecanismos fisiológicos e bioquímicos, incluindo a evolução de um genótipo que confere resistência, plantas podem adaptar-se evitando e superando o estresse. Sheperd & Griffiths (2006) dividem os mecanismos de resistência ao estresse em duas categorias – capacidade de evitar e de tolerar – que podem ocorrer juntas. Evitar envolve o estabelecimento de condições internas onde as células das plantas não sofrem estresse pela capacidade de auto-regulação, por exemplo, a prevenção da seca pela conservação da água. Tolerar envolve resistir ao estresse, por exemplo, plantas que dessecam pela falta de água, mas se recuperam com nova hidratação.

White (1984) propôs a hipótese do estresse da planta argumentando que plantas sob estresse sofrem um desequilíbrio no metabolismo disponibilizando uma maior quantidade de nutrientes (como o nitrogênio) e sofrendo decréscimo na concentração de compostos de defesa. Conseqüentemente, plantas sob estresse demonstrariam maior suscetibilidade à herbivoria com aumento na abundância dos herbívoros ocorrentes. “Um ramo quebrado, um raio, o fogo, deficiências nutricionais e outras adversidades locais; tudo poderia levar a este efeito...incluindo pesticidas, irradiação, poluentes aéreos” (White, 1984). Então, estudar herbivoria e estresse em plantas envolve também avaliar a qualidade da planta.

O termo “qualidade da planta” refere-se aos componentes da planta hospedeira que afetam positiva ou negativamente a performance de insetos herbívoros, como os níveis de carbono, nitrogênio e compostos de defesa (Awmack & Leather, 2002). A qualidade da planta é uma questão crítica para os insetos, uma vez que os nutrientes adquiridos por meio da herbivoria são essenciais para o crescimento e sucesso reprodutivo dos insetos. Dentre as substâncias mais utilizadas para a avaliação do status nutricional de plantas, o conteúdo de nitrogênio (recurso para o inseto) e a concentração de taninos (defesa da planta contra a

herbivoria) merecem destaque. Schoonhoven *et al.* (2005) definem essas duas substâncias presentes nas plantas: o nitrogênio é um elemento base para formação de proteínas. As proteínas são as constituintes elementares das estruturas dos insetos, não somente dos tecidos moles, mas também do integumento. Os taninos são compostos fenólicos provenientes do metabolismo secundário e encontrados em todas as classes de plantas vasculares, freqüentemente, em altas concentrações. Eles possuem a propriedade de precipitar proteínas formando complexos que não são degradados pelas enzimas do trato digestivo, reduzindo assim a qualidade nutricional do tecido consumido. Naturalmente, a água também é um fator nutricional de grande importância nas interações entre plantas e insetos. Coley & Aide (1991) e Panda & Khush (1995) descrevem a água como um dos componentes essenciais para o crescimento, desenvolvimento e reprodução do herbívoro consumidor, principalmente pelos insetos que encontram na planta sua fonte exclusiva de obtenção de água.

Sabe-se que há uma grande variação sazonal na qualidade nutricional das plantas. Geralmente, os teores de água e nitrogênio são maiores em folhas jovens, e o conteúdo de taninos é mais elevado em folhas adultas (Schoonhoven *et al.*, 2005; Coley *et al.*, 2006). Feeny (1970), em estudo clássico, constatou que além dessa variação sazonal da qualidade nutricional, a maioria das espécies de insetos concentrava o período de alimentação em folhas mais novas. A menor proporção de estruturas rígidas que dificultam a herbivoria, conferindo o aspecto tenro às folhas novas, pode também ser responsável pela melhor qualidade do alimento para os insetos. Contudo, sabe-se que os insetos podem adaptar-se ao consumo de folhas nutricionalmente pobres, reduzindo a ação de defesas químicas. Por exemplo, Mauffette & Oechel (1989) constataram que o inseto *Phyrganidia californica* preferia alimentar-se de folhas mais velhas em uma determinada época do ano. Os autores sugeriram que o inseto reduzia, de alguma forma, a ação de defesas químicas (taninos condensados), compensando o baixo valor nutricional das folhas em estágio mais avançado de desenvolvimento.

Considerando essa variação sazonal da relação nutrientes/compostos de defesa, a variação inter e intra-específica da qualidade nutricional das plantas e a presença de inimigos naturais, para um herbívoro especialista como um minador foliar que não é capaz de trocar de sítio de alimentação (Stiling, 1999), a escolha inicial do recurso é essencial para o sucesso no seu desenvolvimento, e o inseto pode então exercer uma forte seleção por melhores plantas hospedeiras (Rice & Hostert, 1993). Essa seleção, que é a escolha dentre uma série de alternativas de plantas, se bem consolidada e freqüente, pode tornar-se uma preferência (Schoonhoven *et al.*, 2005). Assim, uma série de estímulos existentes mediando a interação planta-inseto, pode direcionar a escolha inicial do recurso, determinada no momento de

oviposição, dependendo da preferência do inseto e da relação custo/benefício do recurso oferecido pela planta.

Além da qualidade nutricional, outro fator que pode influenciar a seleção pelo inseto, é o aspecto vigoroso da planta ou a quantidade do recurso. Price (1991) propôs a hipótese do vigor da planta que prediz a preferência de alimentação de insetos herbívoros por plantas mais robustas, representadas por características como maior altura do indivíduo, maior disponibilização e duração das flores, elevado comprimento de ramos, maior número de folhas, tamanho do local de oviposição, entre outros. Vários estudos relatam relações positivas do vigor da planta com preferência por insetos (Seyffarth *et al.*, 1996; Juenger *et al.*, 2005; Meyer *et al.*, 2006). Entretanto, Stiling & Moon (2005) observaram que a qualidade da planta (quantidade de nitrogênio) influenciou significativamente a abundância dos insetos, em detrimento do vigor da planta. No presente trabalho, os conteúdos de nitrogênio e taninos foram quantificados como modo de avaliar a qualidade nutricional da planta de estudo e o tamanho da folha foi utilizado como medida da quantidade de recurso.

Instabilidade no desenvolvimento e Assimetria Flutuante

Diversos estudos têm sugerido que a instabilidade no desenvolvimento (ID) pode ser um indicativo de estresse, refletindo a incapacidade de os organismos controlarem seus processos de desenvolvimento durante a ontogenia e atingirem a expressão ótima do fenótipo pré-determinado (Møller & Swaddle, 1997). Sob estresse, não há energia suficiente disponível para os processos de regulação do fenótipo, resultando em erros no desenvolvimento, refletidos por alterações nos traços e padrões dentro de indivíduos (Escós *et al.*, 1997). Assim, em um determinado ambiente, as perturbações causadas por poluição, pelas variações climáticas, pela baixa disponibilidade de nutrientes, por fatores genéticos (ex. mutação e 'inbreeding') (Møller, 1995), entre outros, podem afetar a expressão do fenótipo ideal de várias maneiras como, por exemplo, alterando o crescimento, a biomassa e a produtividade das plantas, gerando variações morfológicas nos organismos.

Há várias medidas de ID, dentre as quais podem ser citadas a dimensão fractal (Escós *et al.*, 2000), a assimetria translacional (Escós *et al.*, 2000; Alados *et al.*, 2001; Sinclair & Hoffmann, 2003) e a assimetria flutuante (Møller, 1995; Møller & Shykoff, 1999; Palmer & Strobeck, 2003; Cornelissen & Stiling, 2005).

Para os vegetais, a assimetria flutuante (AF), uma pequena e aleatória variação da simetria em caracteres bilaterais simétricos, tem sido utilizada como indicativo de estresse

(Martel *et al.*, 1999; Roy & Stanton, 1999; Alados *et al.*, 2001) e suscetibilidade à herbivoria (Møller, 1995; Zvereva *et al.*, 1997). Plantas com maiores quantidades de folhas assimétricas ou altos níveis de assimetria foliar, devem apresentar aumento nos níveis de herbivoria devido a maior qualidade nutricional das folhas assimétricas comparadas às folhas simétricas (Sakai & Shimamoto, 1965; Lempa *et al.*, 2000). Pouco se sabe como as desordens de desenvolvimento estão conectadas com o metabolismo das plantas. No entanto, como os lados direito e esquerdo da simetria bilateral de uma folha se desenvolvem sob o controle dos mesmos genes, pequenos desvios da perfeita simetria representam ID e devem ser responsáveis pelas diferenças na qualidade nutricional e no metabolismo secundário entre folhas simétricas e assimétricas (Cornelissen *et al.*, 2003; Cornelissen & Stiling, 2005).

Møller & Shykoff (1999) em revisão dos padrões de assimetria flutuante em plantas, destacam que os vegetais são, particularmente, organismos bem convenientes para estudos de ID. Os autores apontam três razões principais: o contínuo processo de produção de estruturas repetidas pelo mesmo genótipo ao longo da vida de um indivíduo (crescimento modular), sob diferentes condições ambientais; a característica de heterofilia das plantas (produção de folhas de diferentes fenótipos), aparentemente originada por fatores ecológicos, genéticos e de desenvolvimento, indicando que mais do que um simples mecanismo do desenvolvimento controla a forma da folha; e a capacidade das plantas de gerar clones, representando réplicas do genótipo que podem ser submetidas a diferentes condições de desenvolvimento.

Correlações positivas entre AF e herbivoria indicam que plantas com folhas assimétricas são, em média, mais susceptíveis ao ataque por herbívoros, e/ou que a própria herbivoria atua como um agente de estresse, aumentando diretamente o nível de assimetria (Zvereva *et al.*, 1997). Entretanto, esta última correlação entre AF das folhas e herbivoria não é sempre causal (Lempa *et al.*, 2000), já que diferenças químicas e nutricionais entre folhas simétricas e assimétricas provavelmente influenciam a seleção de folhas pelos herbívoros (Lempa *et al.*, 2000), gerando correlações positivas entre herbivoria e AF (Cornelissen *et al.*, 2003; Cornelissen & Stiling, 2005).

Van Dongen (2006) argumenta que a despeito de meio século de pesquisa, o entendimento das relações entre AF e ID tem progredido relativamente pouco, havendo a necessidade de estudos focando em hipóteses específicas que pudessem explicar a heterogeneidade observada na literatura e os fatores que predissessem se e quando, a AF e a ID podem ser associadas na biologia evolutiva. Portanto, neste estudo diversas questões foram propostas para propiciar um melhor entendimento das relações entre estresse, AF e herbivoria, uma vez que o sistema de estudo fornece condições apropriadas para a investigação de tais questões.

Efeito de borda: mais uma questão

A fragmentação de sistemas inteiros em pequenas porções ou manchas é uma das maiores ameaças a muitos habitats naturais (Gurevitch *et al.*, 2002). Além de estarem sendo destruídos rapidamente, os habitats que anteriormente ocupavam grandes áreas, são freqüentemente divididos em pequenos pedaços, pelas estradas, cidades, pelos campos, e por várias outras atividades humanas, criando uma paisagem altamente modificada ou degradada (Primack & Rodrigues, 2002). O Projeto Dinâmica Biológica de Fragmentos Florestais (sigla em inglês, BDFFP) é um exemplo de estudo, sendo a mais importante fonte de informação sobre fragmentação de habitats, e iniciou-se em 1980 com o objetivo de avaliar os impactos ecológicos da fragmentação florestal na diversidade de espécies (Bierregaard *et al.*, 1992). Fatores primários que podem ser apontados como problemáticos em vista da fragmentação de áreas florestais são: a limitação da migração e dispersão das espécies; a redução da quantidade de recurso e intensa competição por alimento; e o efeito de borda (Primack & Rodrigues, 2002).

O chamado efeito de borda, diferenças sistemáticas entre áreas das bordas e áreas do interior das manchas de habitat (Gurevitch *et al.*, 2002), surge então como consequência inevitável da fragmentação de uma área natural. Comparados ao habitat original, os fragmentos possuem uma quantidade maior de borda por área e o centro de cada fragmento está mais próximo da borda (Primack & Rodrigues, 2002). Alterações microclimáticas, como aumento nos níveis de luz, temperatura, umidade e vento, mostram-se como os fatores de efeito de borda mais relevantes que podem afetar a composição das espécies do habitat original (Kapos, 1989; Bierregaard *et al.*, 1992; Rodrigues, 1998). Elevações nas taxas de herbivoria e doenças e declínios ou extinções de algumas espécies de plantas nativas também podem resultar do aumento do efeito de borda nos habitats (Gurevitch *et al.*, 2002).

O Bioma Cerrado, que abrange uma área de dois milhões de quilômetros quadrados, representando cerca de 22% do território brasileiro (Oliveira-Filho & Ratter, 2002), sofreu intensa ação antrópica tornando-se um ambiente altamente fragmentado. No estado de São Paulo, região sudeste do Brasil, a vegetação de cerrado foi reduzida de 14% a 1,2% da área do estado (Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo, 1997). No presente trabalho, a área de estudo consiste em um fragmento de cerrado, localizado nas proximidades do município de Pratânia-SP, representando uma pequena mancha (176,7 ha) das várias remanescentes do histórico de degradação desse ambiente. Considerando que na área delimitada para a realização deste trabalho parte das plantas selecionadas estava localizada na borda do

fragmento, todos os grupos de dados coletados foram comparados entre as plantas localizadas no interior e na borda do fragmento.

Objetivos Gerais

No presente trabalho foram investigados diversos aspectos ecológicos da interação entre *Erythroxylum tortuosum* Mart. (Erythroxylaceae), uma planta típica de Cerrado, e *Evippe* sp.2 (Lepidoptera: Gelechiidae), um inseto minador foliar. Estudou-se a relação entre a AF das folhas e as seguintes variáveis: (1) intensidade de infestação do minador; (2) qualidade da planta; (3) preferência de oviposição; (4) quantidade de recurso (área foliar); (5) nível de dano da planta (área minada); (6) efeito de borda. Também foi estudada a fenologia reprodutiva e vegetativa de *E. tortuosum*, a morfologia da mina, a atividade dos minadores, bem como as fases de ocorrência do minador e das diferentes espécies de parasitóides.

Referências Bibliográficas

- Alados C. L., Navarro T., Escós J., Cabezudo B., Emlen J. M. (2001) Translational and fluctuating asymmetry as tools to detect stress in stress-adapted and nonadapted plants. *Internacional Journal of Plant Sciences*, **162**, 607–616.
- Andersen, A. N. & Lonsdale, W. M. (1990) Herbivory by insects in Australian tropical savannahs: A review. *Journal of Biogeography*, **17**, 433–444.
- Awmack, C. S. & Leather, S. R. (2002) Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Annual Review of Entomology*, **47**, 817–844.
- Bierregaard, R. O., Jr., Lovejoy, T. E., Kapos, V., Santos, A. A. dos & Hutchings, R. W. (1992) The biological dynamics of tropical forest fragments. *Bioscience*, **42**, 859–866.
- Coley, P. D. & Aide, T. M. (1991) Comparison of herbivory and plant defenses in temperature and tropical broad-level forest. In: *Plant-animal interactions: evolutionary ecology in tropical and temperate regions* (Price, P. W., Lewinsohn, T. M., Fernandes, G. W. & Benson, W. W. eds.), pp. 25–49. John Wiley & Sons, Inc., USA.
- Coley, P. D., Bateman, M. L. & Kursar, T. A. (2006) The effects of plant quality on caterpillar growth and defense against natural enemies. *Oikos*, **115**, 219–228.
- Cornelissen, T., Stiling, P. & Drake, B. (2003) Elevated CO₂ decreases leaf fluctuating asymmetry and herbivory by leaf miners on two oak species. *Global Change Biology*, **10**, 27–36.
- Cornelissen, T. & Stiling, P. (2005) Perfect is best: low leaf fluctuating asymmetry reduces herbivory by leaf miners. *Oecologia*, **142**, 46–56.
- Crawley, M. J. (1983) *Herbivory, the dynamics of animal-plant interactions*. *Studies in Ecology*, Vol. 10. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Cyr, H. & Pace, M. L. (1993) Magnitude and patterns of herbivory in aquatic and terrestrial ecosystems. *Nature*, **361**, 148–150.
- Diniz, I. R. & Morais, H. C. (1997) Lepidopteran caterpillar fauna of cerrado host plants. *Biodiversity and Conservation*, **6**(6), 817–836.
- Escós, J., Alados, C. L. & Emlen, J. M. (1997) The impact of grazing on plant fractal architecture and fitness of a Mediterranean shrub *Anthyllis cytisoides* L. *Functional Ecology*, **11**, 66–78.
- Escós, J., Alados, C. L., Pugnaire, F. I., Puigdefábregas, J. & Emlen, J. (2000) Stress resistance strategy in an arid land shrub: interactions between developmental instability and fractal dimension. *Journal of Arid Environments*, **45**, 325–336.

- Feeny, P. (1970) Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars. *Ecology*, **51**, 565–581.
- Felfili, J. M. & Silva Júnior, M. C. (2001) *Biogeografia do bioma Cerrado: estudo fisionômico da Chapada do Espigão Mestre do São Francisco*. Departamento de Engenharia Florestal, Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília, Brasília.
- Freeman, D. C., Brown, M. L., Duda, J. J., Graham, J. H., Emlen, J. M., Krzysik, A. J., Balbach, H., Kovacic, D. A. & Zak, J. C. (2004) Developmental instability in *Rhus Copallinum* L.: multiple stressors, years, and responses. *International Journal of Plant Sciences*, **165** (1), 53–63.
- Gurevitch, J., Scheiner, S. M. & Fox, G. A. (2002) *The ecology of plants*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Hódar, J. A. (2002) Leaf fluctuating asymmetry of Holm oak in response to drought under contrasting climatic conditions. *Journal of Arid Environments*, **52**, 233–243.
- Hoffmann, W. A. & Moreira, A. G. (2002) The role of fire in population dynamics of woody plants. In: *The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna* (Oliveira, P. S. & Marquis, R. J. eds.), pp. 159–177. Columbia University Press, New York.
- Juenger, T., Morton, T. C., Miller, R. E. & Bergelson, J. (2005) Scarlet gilia resistance to insect herbivory: the effects of early season browsing, plant apparency, and phytochemistry on patterns of seed fly attack. *Evolutionary Ecology*, **19**, 79–101.
- Kapos, V. (1989) Effects of isolation on the water status of forest patches in the Brazilian Amazon. *Journal of Tropical Ecology*, **5**, 173–185.
- Lempa, K., Martel, J., Koricheva, J., Haukioja, E., Ossipov, V., Ossipova, S. & Pihlaja, K. (2000) Covariation of fluctuating asymmetry, herbivory, and chemistry during birch leaf expansion. *Oecologia*, **122**, 354–360.
- Marquis, R. J., Morais, H. C. & Diniz, I. R. (2002) Interactions among Cerrado plants and their herbivores: unique or typical? In: *The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna* (Oliveira, P. S. & Marquis, R. J. eds.), pp. 306–328. Columbia University Press, New York.
- Martel, J., Lempa, K., & Haukioja, E. (1999) Effects of stress and rapid growth on fluctuating asymmetry and insect damage in birch leaves. *Oikos*, **86**, 208–216.
- Maufette, Y. & Oechel W. C. (1989) Seasonal variation in leaf chemistry of the coast live oak *Quercus agrifolia* and implications for the California oak moth *Phyrganidia californica*. *Oecologia*, **79**, 439–445.

- Meyer, S. T., Roces, F. & Wirth, R. (2006) Selecting the drought stressed: effects of plant stress on intraspecific and within-plant herbivory patterns of the leaf-cutting ant *Atta colombica*. *Functional Ecology*, **20**, 973–981.
- Miranda, H. S., Bustamante, M. M. C. & Miranda, A. C. (2002) The fire factor. In: *The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna* (Oliveira, P. S. & Marquis, R. J. eds.), pp. 51–68. Columbia University Press, New York.
- Møller, A. P. (1995) Leaf-mining insects and fluctuating asymmetry in *Ulmus glabra* leaves. *Journal of Animal Ecology*, **64**, 697–707.
- Møller, A. P. & Shykoff, P. (1999) Morphological developmental stability in plants: patterns and causes. *International Journal of Plant Sciences*, **160**, S135–S146.
- Møller, A. P. & Swaddle, J. P. (1997) *Asymmetry, developmental stability and evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- Mopper, S., Beck, M., Simberloff, D. & Stiling P. (1995) Local adaptation and agents of selection in a mobile insect. *Evolution*, **49**, 810–815.
- Mopper, S., Stiling, P., Landau, K., Simberloff, D. & Van Zandt, P. (2000) Spatiotemporal variation in leafminer population structure and adaptation to individual oak trees. *Ecology*, **81**, 1577–1587.
- Motta, P. E. F., Curi, N. & Franzmeier, D. P. (2002) Relation of soils and geomorphic surfaces in the Brazilian Cerrado. In: *The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna* (Oliveira, P. S. & Marquis, R. J. eds.), pp. 13–32. Columbia University Press, New York.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., da Fonseca, G. A. B. & Kent, J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**, 853–858.
- Oliveira-Filho, A. T. & Ratter, J. A. (2002) Vegetation physiognomies and woody flora of the cerrado biome. In: *The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna* (Oliveira, P. S. & Marquis, R. J. eds.), pp. 91–120. Columbia University Press, New York.
- Palmer, A. R. & Strobeck, C. (2003) Fluctuating asymmetry analysis revisited. In: *Developmental Instability: Causes and Consequences* (Polak, M., ed.), pp. 279–319. Oxford University Press, Oxford.
- Panda, N. & Khush, G. S. (1995) *Host plant resistance to insects*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Pimentel, D. (1988) Herbivore population feeding pressure on plant hosts: feedback evolution and host conservation. *Oikos*, **53**, 289–302.
- Price, P.W. (1991) The plant vigor hypothesis and herbivore attack. *Oikos*, **62**, 244–251.

- Primack, R. B. & Rodrigues, E. (2002) *Biologia da Conservação*. Londrina, PR.
- Rice, W. R. & Hostert, E. E. (1993) Laboratory experiments on speciation: what have we learned in 40 years? *Evolution*, **47**, 1637–1653.
- Ricklefs, R. E. (2003) *A Economia da Natureza*. 5a. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Rodrigues, E. (1998) *Edge effects on the regeneration of forest fragments in North Paraná*. Tese de Ph.D. Harvard University.
- Roy, B. A. & Stanton, M. L. (1999) Asymmetry of wild mustard, *Sinapis arvensis* (Brassicaceae), in response to severe physiological stresses. *Journal of Evolutionary Biology*, **12**, 440–449.
- Sakai, K. I. & Shimamoto, Y. (1965) Developmental instability in leaves and flowers of *Nicotiana tabacum*. *Genetics*, **51**, 801–813.
- Schoonhoven, L. M., Van Loon, J. J. A. & Dicke, M. (2005) *Insect-Plant Biology*. 2nd edition. Oxford University Press Inc., New York.
- Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo (1997) *Cerrado: bases para conservação e uso sustentável das áreas de cerrado do estado de São Paulo*. Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, SP, Brazil.
- Seyffarth, J. A. S., Calouro, A. M. & Price, P. W. (1996) Leaf rollers in *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae): fire effect and the plant vigor hypothesis. *Revista Brasileira de Biologia*, **56**, 135–137.
- Shepherd, T. & Griffiths, D. W. (2006) The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytologist*, **171**, 469–499.
- Simberloff, D. & Stiling, P. D. (1996) How risky is biological control? *Ecology*, **77**, 1965–1974;
- Sinclair, C. & Hoffmann, A. A. (2003) Monitoring salt stress in grapevines: are measures of plant trait variability useful? *Journal of Applied Ecology*, **40**, 928–937.
- Stiling, P. D. (1999) *Ecology: theories and applications*. Prentice Hall, New Jersey, NJ.
- Stiling, P. & Moon, D. C. (2005) Quality or quantity: the direct and indirect effects of host plants on herbivores and their natural enemies. *Oecologia*, **142**, 413–420.
- Strauss, S. Y. & Zangerl, A. R. (2002) Plant-insect interactions in terrestrial ecosystems. In: *Plant-animal interactions: an evolutionary approach* (Herrera, C.M. & Pellmyr, O., eds.), pp. 77–106. Blackwell Science Ltd., Oxford, UK.
- Strong, D. R., Lawton, J. H. & Southwood, T. R. E. (1984) *Insects on plants: community patterns and mechanisms*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Van Dongen, S. (2006) Fluctuating asymmetry and developmental instability in evolutionary biology: past, present and future. *Journal of Evolutionary Biology*, **19**, 1727–1743.

- Werner, P. A. (1991) *Savanna Ecology and Management*. Blackwell Scientific, Oxford, UK.
- White, T. C. R. (1984) The abundance of invertebrate herbivory in relation to the availability of nitrogen in stressed food plants. *Oecologia*, **63**, 90–105.
- Zvereva, E., Kozlov, M. & Haukioja, E. (1997) Stress responses of *Salix borealis* to pollution and defoliation. *Journal of Applied Ecology*, **34**, 1387–1396.

CAPÍTULO 1

Interação tritrófica no Cerrado: Planta hospedeira, Minador foliar e Parasitóides

1.1 INTRODUÇÃO

O Bioma Cerrado compreende diversas variações de uma formação vegetal savânica tipicamente brasileira, sendo considerado um dos ecossistemas mais ricos do planeta (Felfili & Silva Júnior, 2001). Está incluído na lista mundial dos 25 “hotspots”, isto é, áreas com menos de 30% da vegetação original remanescente e com grande endemismo de espécies (Myers *et al.*, 2000). Embora atualmente seja um ambiente fragmentado e intensamente alterado pela ação antrópica, possui uma diversidade biológica elevada e, conseqüentemente, um alto potencial de ocorrência de interações populacionais entre plantas e insetos. Em muitas dessas interações, diversas espécies de plantas costumam ser hospedeiras de uma grande diversidade de insetos herbívoros, dentre os quais estão os minadores foliares. Algumas relações entre plantas e insetos ocorrem ao acaso, em pequena escala espacial e temporal, apresentando baixa estabilidade, dificultando o seu registro por estudos científicos. Outras, ao contrário, são bem sucedidas e permanecem por longos períodos, tornando-se especializadas (Ehrlich & Raven, 1964; Mopper *et al.*, 2000). Trabalhos científicos em Cerrado envolvendo fatores bióticos, como herbivoria, e interações entre plantas e animais em geral, são escassos quando comparados com outros estudos ecológicos nesse ambiente (Marquis *et al.*, 2002), gerando a necessidade de novos esforços para trabalhos nessa linha de pesquisa.

Erythroxylaceae é uma família de grande representatividade nos cerrados brasileiros, possuindo distribuição subtropical e pantropical, com um único gênero ocorrente na região neotropical: *Erythroxylum* P. Browne (Wanderley *et al.*, 2002). O gênero compreende cerca de 180 espécies neotropicais, sendo que para o Brasil foram listadas 130 espécies em ambientes florestais e de cerrado *sensu lato* (Ribeiro *et al.*, 1999). Reúne representantes arbóreos, arbustivos e subarbustivos com folhas inteiras, glabras, membranáceas a coriáceas, de filotaxia alterna ou oposta e portadoras de estípulas interpeciolares, geralmente persistentes e estriadas no sentido longitudinal (Ribeiro *et al.*, 1999). *Erythroxylum tortuosum* Mart., conhecida popularmente como mercúrio-do-campo, tanto pelo aspecto ferrugíneo do caule quando descascado como pela coloração avermelhada de seus frutos, é uma planta arbustiva-

arbórea típica dos cerrados (Amaral Jr., 1973), com pouca informação na literatura sobre os organismos ocorrentes e os padrões e processos populacionais naturais oriundos de interações tróficas.

Objetivando aprofundar o entendimento sobre relações de herbivoria ocorrentes em interações tróficas no Cerrado, o presente trabalho descreve um sistema tritrófico composto pela espécie vegetal *E. tortuosum*, um microlepidóptero, *Evippe* sp.2 (Lepidoptera: Gelechiidae), cuja lagarta é minadora foliar, específica de *E. tortuosum*, e os parasitóides associados. Os seguintes aspectos da interação foram estudados: 1) morfologia da mina foliar; 2) atividade dos minadores foliares; 3) determinação das fases de ocorrência do minador foliar e dos parasitóides. Além disso, investigou-se a fenologia vegetativa e reprodutiva para detalhamento das fases do ciclo de vida da planta e para conhecimento dos períodos de disponibilidade de recursos (folhas) para o minador foliar.

1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

1.2.1 Área de estudo

Foram observados indivíduos de *E. tortuosum* ocorrentes em fragmento de cerrado (176,7 ha) localizado nas proximidades do município de Pratânia – SP, pertencente à Fazenda Palmeira-da-Serra (22°48'50" S; 48°44'35" W). O local de estudo é circundado por áreas de ação antrópica, com cultivo de soja, milho, eucalipto, pinus e cana-de-açúcar. O clima da região é mesotérmico Cfa, classificação segundo Köppen, que significa clima temperado chuvoso, com total de chuvas no mês mais seco menor que 40,7 mm e onde o mês mais quente apresenta temperatura média de 23,8°C, e o mês mais frio de 17,5°C, com temperatura média anual de 21°C e precipitação média anual de 1445 mm (Domingues *et al.*, 2001).

A Figura 1 apresenta duas fotografias, uma com vista parcial (Fig. 1A) e outra com vista aérea (Fig. 1B) do fragmento que foi utilizado para estudo. Cada planta foi devidamente marcada [numeradas em placas de metal (5 cm x 5 cm)], por meio da delimitação de quatro transectos (150 m para o interior do fragmento por 20 m de largura em cada transecto). Indivíduos de referência de *E. tortuosum* estão depositados no Herbário “Irina Delanova de Gemtchujnicov”, sob o número de registro BOTU 24256.

1.2.2 Fenologia dos indivíduos de *E. tortuosum*

Para análise fenológica, 20 indivíduos de *E. tortuosum* foram acompanhados quinzenalmente durante 15 meses de observações (agosto de 2005 a outubro de 2006). Benck & Morellato (2002), em estudo de metodologia para análises fenológicas, consideraram de 5 a 21 indivíduos por espécie, com avaliação fenológica mensal. Assim, a amostragem e a avaliação quinzenal de 20 plantas de *E. tortuosum* mostraram-se adequadas para o estudo. Para homogeneização da amostra, as plantas selecionadas estavam distribuídas entre os transectos.

As fenologias reprodutiva e vegetativa (Fig. 2) foram avaliadas realizando-se o acompanhamento das plantas com adaptação do método proposto por Fournier (1974): foram estimadas as quantidades relativas de botões florais (Fig. 2A), flores funcionais (Fig. 2B), frutos imaturos (Fig. 2C), frutos maduros, primórdios foliares (Fig. 2D), folhas jovens (Fig. 2E-F), adultas e velhas por planta, por meio de avaliação direta (estimativa visual direta e não

destrutiva) semi-quantitativa, isto é, utilizando uma escala de mensuração de 0 a 100%, com intervalos de amplitude de 5% durante a observação (ver Apêndice A para modelo de planilha das avaliações fenológicas). A adaptação do método de Fournier ocorreu na alteração dos intervalos de 25 % de amplitude de observação anteriormente propostos, de modo a permitir maior detalhamento na coleta de dados. Os dados relativos à fenologia reprodutiva e vegetativa foram apresentados na forma de gráficos, mostrando-se as porcentagens médias mensais de primórdios foliares, folhas jovens, adultas e velhas, botões florais, flores funcionais, frutos imaturos e frutos maduros por planta, destacando-se os picos dos eventos fenológicos (período de maior intensidade do evento) ao longo das avaliações.

1.2.3 Estudo da morfologia da mina e da atividade dos minadores foliares

Para este estudo, foram realizadas coletas quinzenais de folhas minadas desde a fase de início do desenvolvimento de minas (novembro) até o estágio final de desenvolvimento (julho). Por coleta, a média de 15 folhas foi aleatoriamente retirada de diferentes plantas distribuídas entre os transectos, configurando um *N* total de 316 folhas. Observações sobre a morfologia da mina e a atividade do minador basearam-se em registros a olho nu (com auxílio de lupa) e sob estereomicroscópio. Em laboratório, primeiramente o aspecto geral externo das minas foliares foi observado, tanto na face adaxial, quanto na face abaxial. Em seguida, as minas foram cuidadosamente dissecadas para examinar o aspecto interno e a atividade do minador. Para a morfologia da mina foram examinados, basicamente, padrões de coloração, rigidez, tamanho, formato, constituição e posição das diversas estruturas. Para a atividade dos minadores, foram avaliados padrões de mobilidade, coloração, tamanho, e alimentação e outros comportamentos em geral.

1.2.4 Determinação das fases de ocorrências dos parasitóides e do minador foliar

Para a determinação das fases de ocorrências dos parasitóides e do minador foliar, foram feitas coletas periódicas de folhas minadas de novembro de 2005 (minas foliares em estágio inicial de desenvolvimento; Fig. 3) a junho de 2006 (minas foliares em estágio final de desenvolvimento; Fig. 4). As coletas foram feitas em 10 plantas, diferentes daquelas utilizadas para as avaliações fenológicas, uma vez que se constatou que coletas constantes podem

interferir na estimativa visual da avaliação fenológica. Inicialmente, uma média de 10 folhas por planta foi adotada para a coleta. No entanto, esse número foi reduzido ajustando-se ao porte da planta, para que pudesse haver material suficiente até o final do período de desenvolvimento das minas foliares.

As folhas coletadas foram levadas ao laboratório e individualizadas em placas de Petri contendo algodão umedecido na extremidade do pecíolo (Fig. 5). A emergência de parasitóides (Figs. 6 e 7) e minadores foi observada e quantificada diariamente. Os parasitóides foram conservados em álcool 70 % e os adultos dos minadores, conservados a seco (Fig. 8). As mariposas emergidas foram identificadas pelo Prof. Dr. Klaus Sattler (Department of Entomology, Natural History Museum, UK) (ver subitem 1.2.5) e exemplares de parasitóides foram identificados pelos Profs. Drs. Michael Sharkey (Department of Entomology, University of Kentucky, USA), Christer Hansson (Lunds Universitet, inst. För cell - och organismbiologi, Zoologihuset, SE) e John S. Noyes (Department of Entomology, Natural History Museum, UK).

1.2.5 Informação complementar: identificação dos espécimes de microlepidoptera

Fotografias digitais ampliadas do microlepidóptero e indivíduos adultos conservados a seco [montados em alfinete entomológico e microalfinete (U. S. D. A., 1986)] foram enviados para o Prof. Dr. Klaus Sattler (Department of Entomology, Natural History Museum, UK) para identificação do material.

Após o período de estudo, o microlepidóptero foi identificado como sendo pertencente ao gênero *Evippe* Chambers, 1873. Uma lista mundial de espécies conhecidas do gênero *Evippe* Chambers, 1873, com informações do local de ocorrência e planta hospedeira, é apresentada na Tabela 1. Como provavelmente se trata de uma nova espécie para a Ciência, o Prof. Dr. Klaus Sattler identificou-a como *Evippe* sp.2, sendo a referência, uma vez que se caracteriza a ocorrência desta espécie em plantas de *E. tortuosum* localizadas no Brasil (região Neotropical). A atividade de identificação em nível específico requer uma revisão do gênero, pouco conhecido pela comunidade científica.

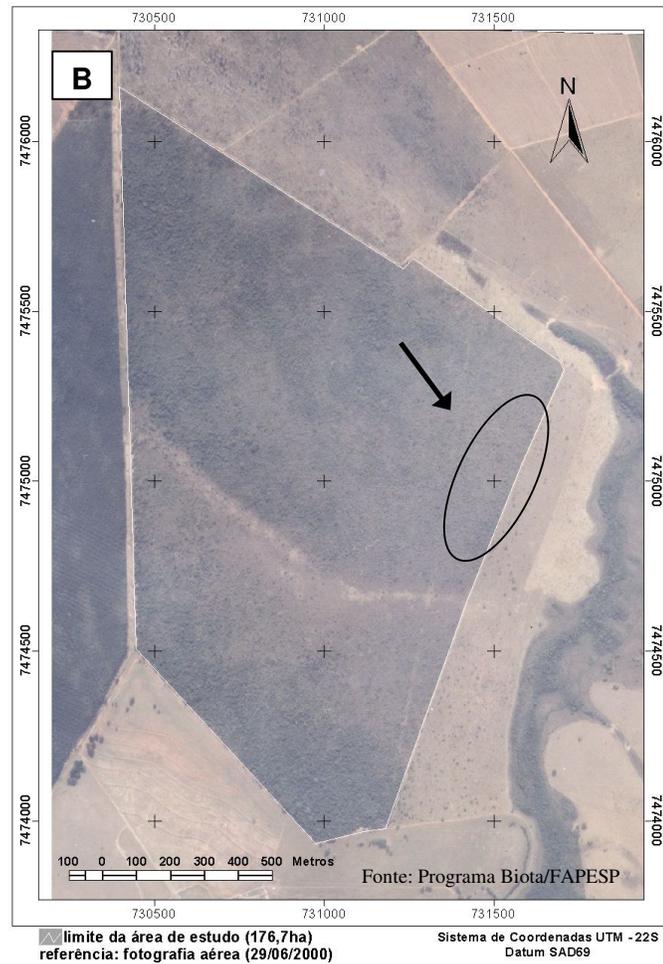


Fig. 1. Fragmento de cerrado utilizado no estudo pertencente à reserva particular “Fazenda Palmeira-da-Serra”, município de Pratânia-SP. **A** Vista parcial. **B** Vista aérea.

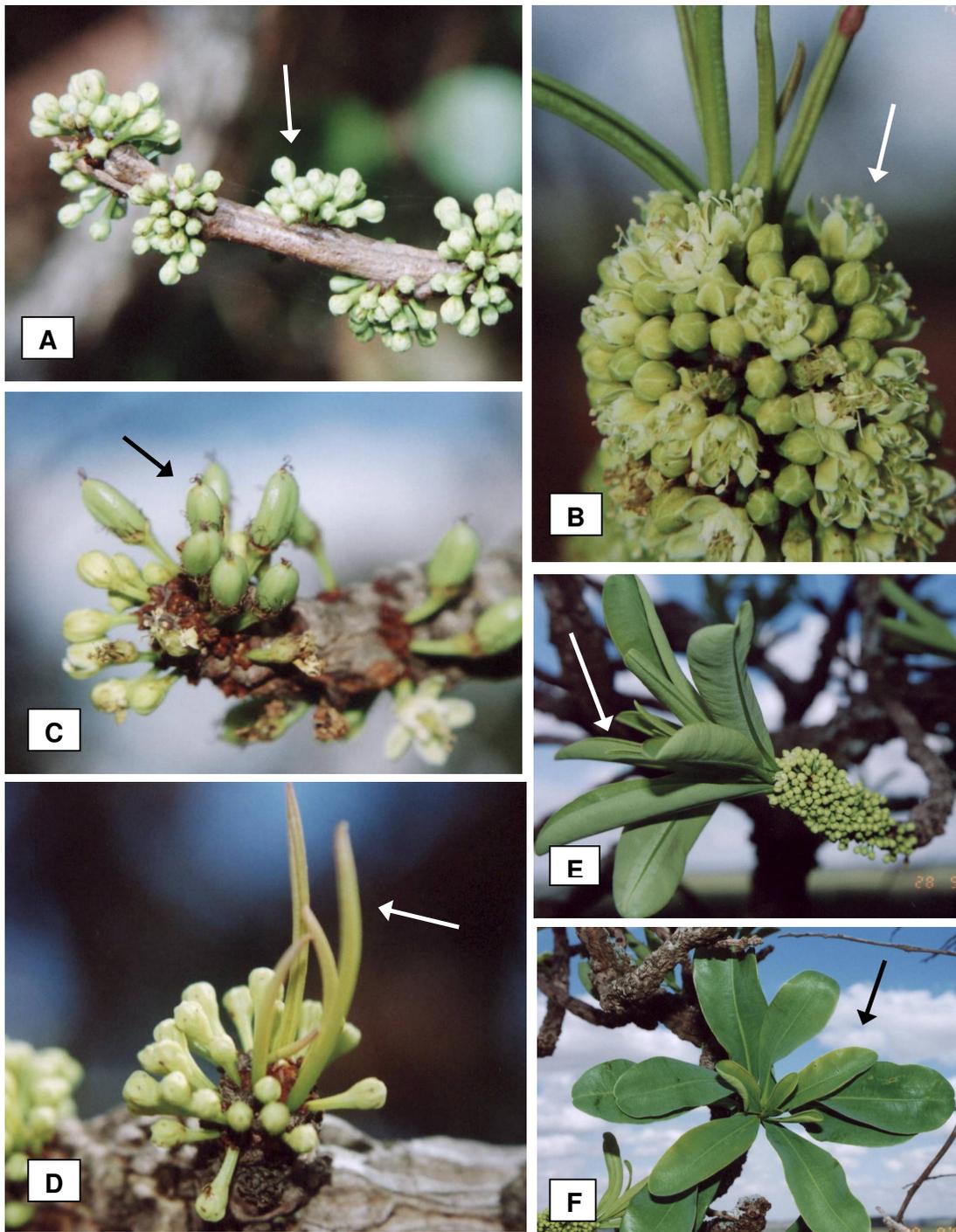


Fig. 2. Eventos fenológicos observados em *E. tortuosum*. **A** Botões florais. **B** Início de antese. **C** Frutos imaturos. **D** Primórdios foliares. **E-F** Folhas jovens.

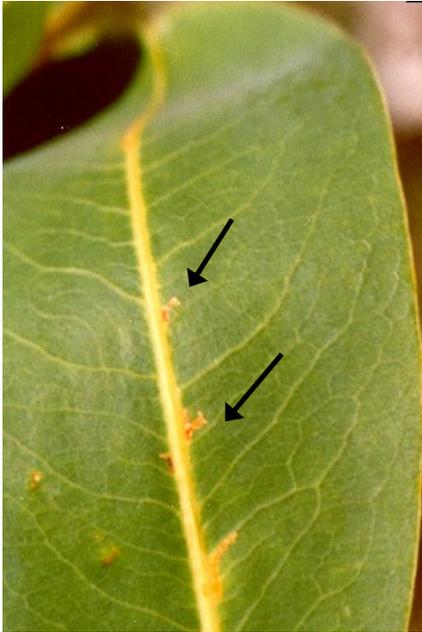


Fig. 3. Minas foliares de *E. tortuosum* em estágio inicial de desenvolvimento.

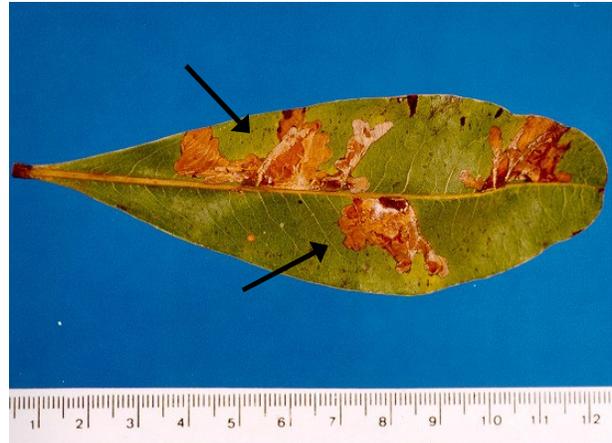


Fig. 4. Minas foliares de *E. tortuosum* em estágio final de desenvolvimento. Escala em cm.



Fig. 5. Folhas de *E. tortuosum* coletadas e individualizadas em placas de Petri com algodão umedecido na extremidade do pecíolo para monitoramento da emergência de insetos.

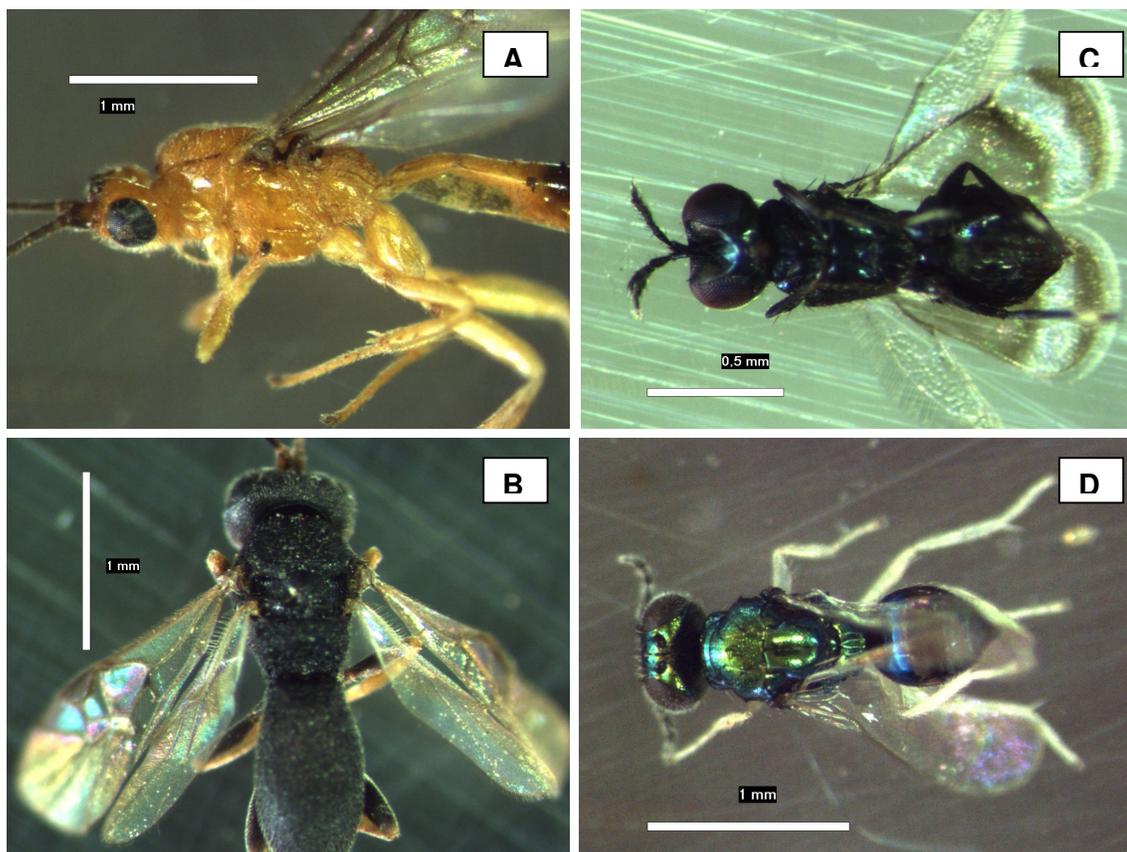


Fig. 6. Parasitóides emergidos de minas foliares de *E. tortuosum* em laboratório. **A** *Bracon* sp. **B** *Microchelonus* sp. **C** *Closterocerus coffeellae*. **D** *Horismenus aeneicollis*. Escala: 1,0 mm (A, B, D) e 0,5 mm (C).



Fig. 7. Orifício arredondado característico registrando emergência de parasitóides. Escala: 0,5 mm.

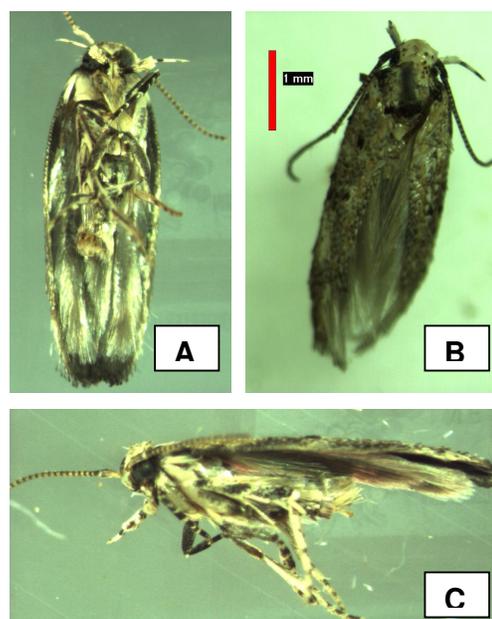


Fig. 8. Exemplos adultos obtidos de *Evippe* sp.2. **A** Vista ventral. **B** Vista dorsal. **C** Vista lateral. Escala: 1,0 mm.

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1 Fenologia dos indivíduos de *E. tortuosum*

Para os dados obtidos com as análises fenológicas, foram elaborados gráficos mostrando as intensidades dos eventos fenológicos ao longo dos meses de avaliação (Fig. 9). Apesar de alguns indivíduos ainda permanecerem com poucas folhas velhas em seus ramos na época seca, *E. tortuosum* caracteriza-se como uma planta decídua. A abscisão de folhas inicia-se em meados de junho, e a queda total das folhas dá-se por volta de agosto até início de setembro (Fig. 10). Em setembro ocorre tanto o pico de produção de primórdios foliares (Figs. 2D e 9A) como de produção de botões florais (Figs. 2A e 9B). Porém, como esperado, a produção de primórdios foliares estende-se ao longo dos meses subsequentes diminuindo gradativamente, enquanto os botões apresentam uma queda brusca, tal qual as outras fenofases reprodutivas. As folhas jovens expandem-se de forma acentuada principalmente do final de setembro à metade de novembro (Figs. 2E-F e 9A), quando a fase adulta inicia-se, tornando as folhas coriáceas. Há um leve pico de envelhecimento de folhas de dezembro a janeiro (Fig. 9A), devido, provavelmente, às chuvas frequentes desse período. Acompanhada da gradual ascensão do envelhecimento das folhas, a fase adulta persiste estável por cerca de cinco meses, até maio, quando se observa redução da intensidade do evento e aumento do envelhecimento, que tem seu pico em junho (Fig. 9A). Julho e agosto são os meses que se seguem com a diminuição da intensidade dos eventos vegetativos devido à senescência e abscisão das folhas (Fig. 11).

Retornando à fenologia reprodutiva, logo após o aparecimento de botões florais em agosto (Figs. 2A e 9B), inicia-se a antese expondo as flores funcionais de coloração creme-clara para polinização (Figs. 2B e 9B). A abertura das flores é observada com maior intensidade de setembro a novembro, com um leve pico em outubro. Seguindo a fase das flores funcionais, de outubro ao início de dezembro, a visualização de frutos verdes imaturos é predominante (Figs. 2C e 9B). Já em dezembro, o amadurecimento mostra-se intenso e os frutos avermelhados maduros têm o seu pico. A linha do gráfico representando as flores funcionais aparece com amplitude relativamente baixa quando comparada as demais fenofases (Fig. 9B). Esse fato pode ser explicado pela rápida duração da manutenção das flores na planta, o que não permitiu a visualização por um período maior das flores totais produzidas em cada planta, reduzindo, conseqüentemente, a intensidade do evento fenológico

apresentado. Em resumo, *E. tortuosum* pode ser encontrada em estágio reprodutivo de agosto a janeiro.

É interessante comentar que há variações graduais dos eventos da fenologia vegetativa, e ao contrário, há picos bem definidos e quedas bruscas dos eventos reprodutivos, quando se comparam ambas as fenologias, o que era esperado acontecer com uma planta decídua típica de Cerrado. A fragilidade do tronco, dos ramos e das hastes em geral (pedúnculos florais, pecíolos etc.) de *E. tortuosum*, assim como de diversas espécies do Cerrado, requer um cuidado especial para obtenção de dados durante as coletas, a fim de evitar danos representativos nas plantas, e observações, para que não haja estimativas equivocadas devido à perda de informações (pela queda de ramos, folhas e outras estruturas).

1.3.2 Morfologia da mina

As minas foliares são expandidas e limpas (sem resíduos da atividade do minador) (Fig. 4 e Fig. 12). Na face adaxial da folha, uma película (Fig. 12A), provavelmente epiderme ou restos de paredes celulares não danificadas (Hering, 1951), recobre toda a região minada que contém uma área rígida e enegrecida, justaposta longitudinalmente à nervura primária (Fig. 12B). Na face abaxial, áreas castanhas da epiderme, possivelmente necrosadas, definem a exata localização das minas (Fig. 13). Neste mesmo lado, cada mina porta um apêndice constituído por um par de valvas semicirculares que se tocam pelas margens, mantendo-o fechado; a localização dos apêndices (Figs. 11 e 13) corresponde exatamente à região abaixo da área enegrecida da face superior, situando-se ao lado da nervura primária a qual é proeminente na face inferior da folha. As valvas são constituídas por espessa e resistente camada de fios de seda. Internamente, a parte inferior da mina é forrada por delgada camada de fios de seda tecida pelas larvas minadoras (Fig. 12C); na parte superior, somente a região enegrecida é recoberta por seda. As valvas e as camadas de seda são interconectadas formando uma única estrutura. Não há conexão entre as minas localizadas de um lado e do outro da nervura central e a coalescência entre as minas do mesmo lado do limbo é incomum.

1.3.3 Atividade do minador foliar

As minas são galerias feitas pelas larvas no mesofilo (Torre-Bueno, 1989), resultantes do consumo do conteúdo celular da folha (Labandeira, 2002). Embora o início da atividade de

“escavação” não tenha sido observado, as evidências sugerem que as lagartas do primeiro *instar* penetram no interior da folha pela face abaxial. Dentro do mesofilo, os minadores constroem inicialmente o apêndice em direção ao meio externo; à medida que escavam, tecem a seda que forra as novas áreas minadas. A progressão das minas ocorre do centro para a periferia atingindo, em alguns casos, a margem foliar. Essa observação acompanha aquela vista por Mani (1964), que notou que em alguns casos, larvas minadoras fazem uma mina próxima à nervura central e a partir daí produzem várias galerias laterais. As lagartas são prognatas e alimentam-se do tecido parenquimático e vasos de fino calibre, deixando intactas nervuras secundárias e terciárias como “esqueleto” da folha (Jolivet, 1998) (Fig. 12D). Após o forrageamento, os minadores retornam à área enegrecida onde permanecem até o próximo forrageio. Observou-se também que as lagartas eliminam excrementos na periferia da mina, carregando-os com as mandíbulas até o apêndice, através do qual são removidos da folha. A remoção dos excrementos ocorre frequentemente, visto que em raros casos foram encontradas minas com resíduos. Até meados de maio, as atividades de forrageamento e de limpeza foram observadas regularmente. Mani (1964) comenta que em estágios mais avançados, as larvas minadoras retornam para região da mina central e alimentam-se de tecidos regenerados. De modo semelhante, em junho, as lagartas entram na fase de pré-pupa, deixando de se alimentar, exibindo lentidão, mudança de cor, redução do tamanho corporal e permanecendo na região enegrecida. Os minadores mantêm-se neste estado durante várias semanas, indicando um período relativamente longo de existência como pré-pupa.

1.3.4 Determinação das fases de ocorrência do minador foliar e dos parasitóides

Os dados referentes à emergência diária de insetos no laboratório foram computados e organizados mensalmente para determinação das fases de ocorrência (Fig. 14).

Mopper *et al.* (2000) comentam que a fenologia da planta pode ser uma das mais fortes forças de seleção em parasitas endófagos como os minadores foliares. Para o sucesso da sobrevivência, a oviposição do minador e o desenvolvimento larval devem estar estreitamente sincronizados com a produção foliar e com o momento de abscisão (Faeth *et al.*, 1981; Crawley & Akhteruzzaman, 1988; Hunter, 1990, 1992; Komatsu & Akimoto, 1995). Acompanhando a ordem cronológica do inseto no campo, ovos do microlepidóptero (Fig. 15) foram encontrados sobre folhas de *E. tortuosum* a partir da metade de outubro, tendo novembro como período mais intenso de oviposição. Nesta fase, as folhas são consideradas jovens com suas lâminas foliares na quase totalidade expandidas. O aspecto tenro dessas

folhas em relação às da fase adulta, de característica mais coriácea, indica o momento propício para as lagartas recém eclodidas penetrarem mais facilmente pela epiderme foliar, rumo ao mesofilo. Este evento de oviposição foi observado até abril, quando foram encontrados ovos com aspecto envelhecido, dos quais, aparentemente, não eclodiram lagartas.

Nas coletas de janeiro de 2006, foi observada a saída de lagartas do interior das folhas (através do apêndice da mina, tecido com seda do minador, que faz conexão com o exterior da folha) mantidas no laboratório (Fig. 16). Esse número aumentou em fevereiro, retornou à média de janeiro nos meses subsequentes e diminuiu em maio. Não se trata de uma emergência propriamente dita, mas foi considerada na elaboração do gráfico (Fig. 14), devido à elevada taxa de saída das lagartas que provavelmente se tornariam indivíduos adultos. Essa “fuga” de lagartas revelou como as condições fisiológicas da folha e o ambiente do interior da mina são extremamente necessários à sobrevivência do inseto, pois a mortalidade das lagartas que saíram antecipadamente da mina para o exterior da folha foi total, com exceção de uma lagarta, já que uma pupa foi encontrada no exterior da folha (Fig. 17), indicando, provavelmente, que o minador teve seu desenvolvimento adiantado. Alguns indivíduos de *Evippe* sp.2 foram observados em abril e maio de 2006, provavelmente pelo adiantamento no seu desenvolvimento devido ao estresse provocado pela retirada da folha da planta. Acompanhando a fenologia da planta, indivíduos de *Evippe* sp.2 emergiram de agosto a outubro, indicando uma sincronia com a produção de folhas novas em *E. tortuosum* ideais para colonização pelo minador. A alta taxa de mortalidade das lagartas em laboratório pela evasão da folha e a ação de parasitóides no campo levou ao pequeno registro de adultos do minador foliar.

Apesar de o hábito minador fornecer proteção contra inimigos naturais, parasitóides adaptaram-se e puderam se desenvolver no ambiente das minas (Jolivet, 1998). Gentry & Dyer (2002) estudando a eficácia de diferentes tipos de defesas de lagartas contra inimigos naturais, sugerem que os parasitóides têm preferência em atacar lagartas que estão protegidas de predadores, particularmente, as quimicamente protegidas e as que formam abrigos. Assim, minadores foliares acabam tornando-se alvos ideais para a oviposição de parasitóides. Das folhas minadas emergiram, no laboratório, vespas das famílias Braconidae, Encyrtidae e Eulophidae (Tabela 2; Fig. 6 e Fig. 7). Segundo Stiling (1999), os Hymenoptera, juntamente com os Diptera, possuem representantes parasitóides de maior interesse para entomologistas, e Price *et al.* (1980) destacam que os parasitóides dessas ordens podem representar cerca de 70% da fauna de insetos.

Em geral, os parasitóides emergiram em pequena proporção comparando-se com a quantidade total de folhas coletadas com minadores passíveis de serem hospedeiros. Acredita-

se que a evasão de lagartas das folhas armazenadas não interferiu no registro de possíveis parasitóides que poderiam emergir desses minadores, já que, normalmente, lagartas parasitadas demonstram baixa mobilidade, padrão oposto ao observado nas lagartas que saíram das folhas de *E. tortuosum* (alta mobilidade) (Marcos N. Ishino, observação pessoal). *Bracon* sp. e *Bassus* sp. foram observadas emergindo entre maio e abril com uma ocorrência no mês de agosto. *Microchelonus* sp. teve um registro em abril, mas maior frequência em agosto e setembro, e *Closterocerus coffeellae* e *Copidosoma* sp. emergiram entre agosto e setembro. *Horismenus aeneicollis* foi a espécie de parasitóide com maior ocorrência durante o ano, com registros em maio, julho, agosto e outubro. Nos meses de junho e os subsequentes à outubro de 2006, não houve registros de emergência de insetos. Devido à diversidade de parasitóides encontrada ocorrendo no sistema de estudo e à pequena quantidade de dados do registro da emergência, delimitações das fases de ocorrência devem ser feitas com cautela. Mas aparentemente, há uma sincronia de emergência entre as espécies de agosto a setembro. *Bracon* sp. e *Bassus* sp. mostram uma leve distinção de época de emergência entre as outras espécies de parasitóides, ocorrendo antes da época seca. *H. aeneicollis* parece ser a espécie mais versátil, aparentemente podendo parasitar novos hospedeiros em diferentes momentos ao longo do ano. Por fim, dados de ocorrência de outros insetos fitófagos também foram obtidos das folhas mantidas em laboratório e plotados no gráfico da Figura 14. Seu aparecimento pode ser explicado possivelmente pela presença de ovos já existentes sobre a superfície das folhas coletadas.

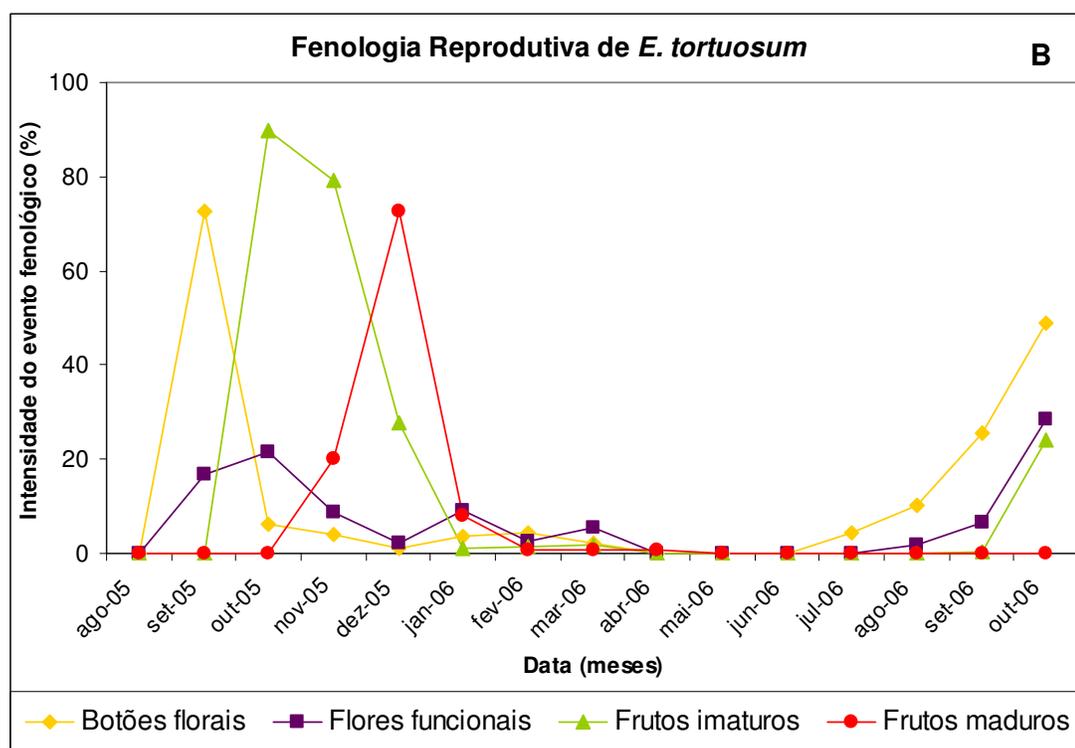
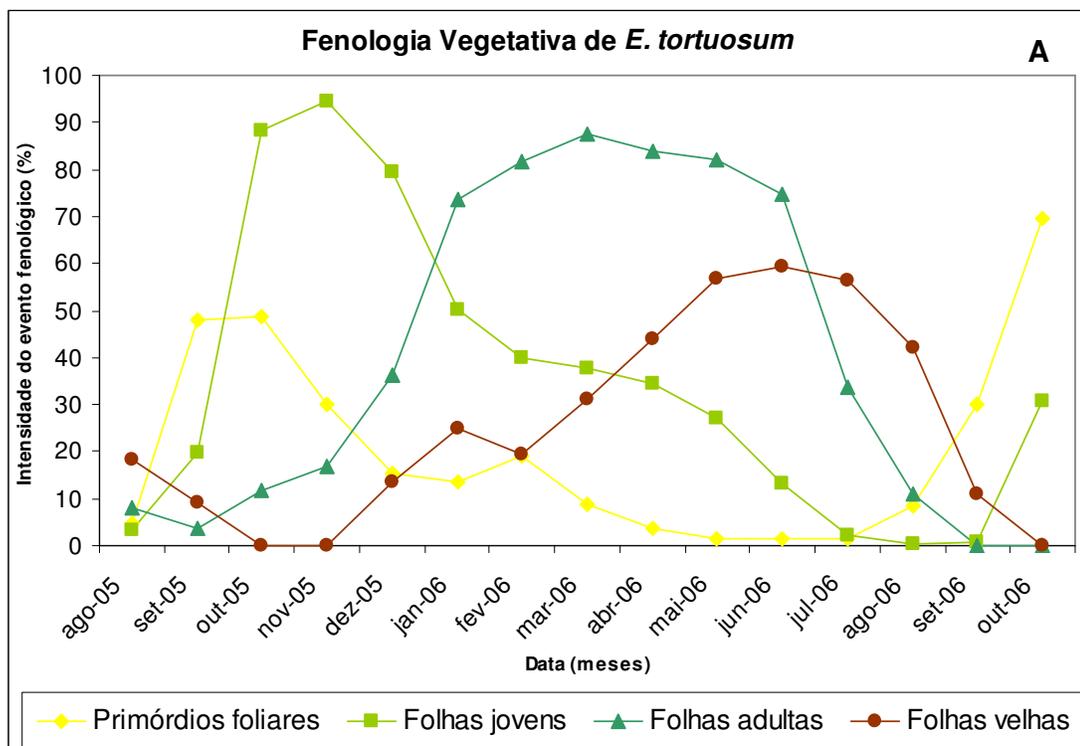


Fig. 9. Valores médios das intensidades dos eventos fenológicos observados ao longo dos meses de avaliação em *E. tortuosum* (agosto de 2005 a junho de 2006). **A** Fenologia vegetativa. **B** Fenologia reprodutiva.



Fig. 10. Indivíduo de *E. tortuosum* selecionado para estudo em época de abscisão foliar.

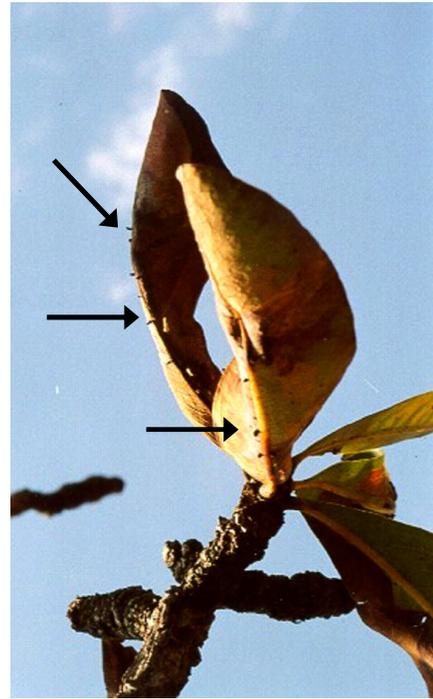


Fig. 11. Folhas velhas de *E. tortuosum*, retorcidas, de aspecto coriáceo e próximas à abscisão. Setas indicam os apêndices construídos pelos minadores.

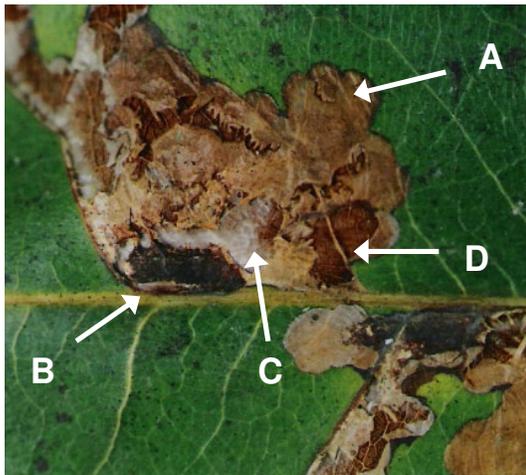


Fig. 12. Aspecto das minas foliares de *E. tortuosum* na face adaxial. **A** Película de restos de epiderme. **B** Região enegrecida e rígida. **C** Seda tecida pelo minador. **D** Nervura secundária remanescente da atividade de alimentação do minador.

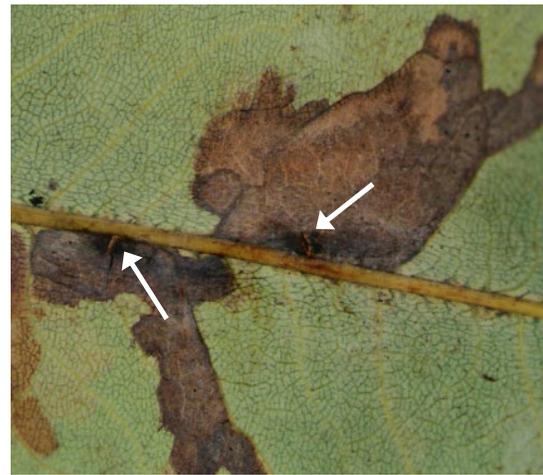


Fig. 13. Aspecto das minas foliares de *E. tortuosum* na face abaxial mostrando áreas castanhas necrosadas da epiderme que definem a exata localização das minas. Setas indicam os apêndices construídos pelos minadores.

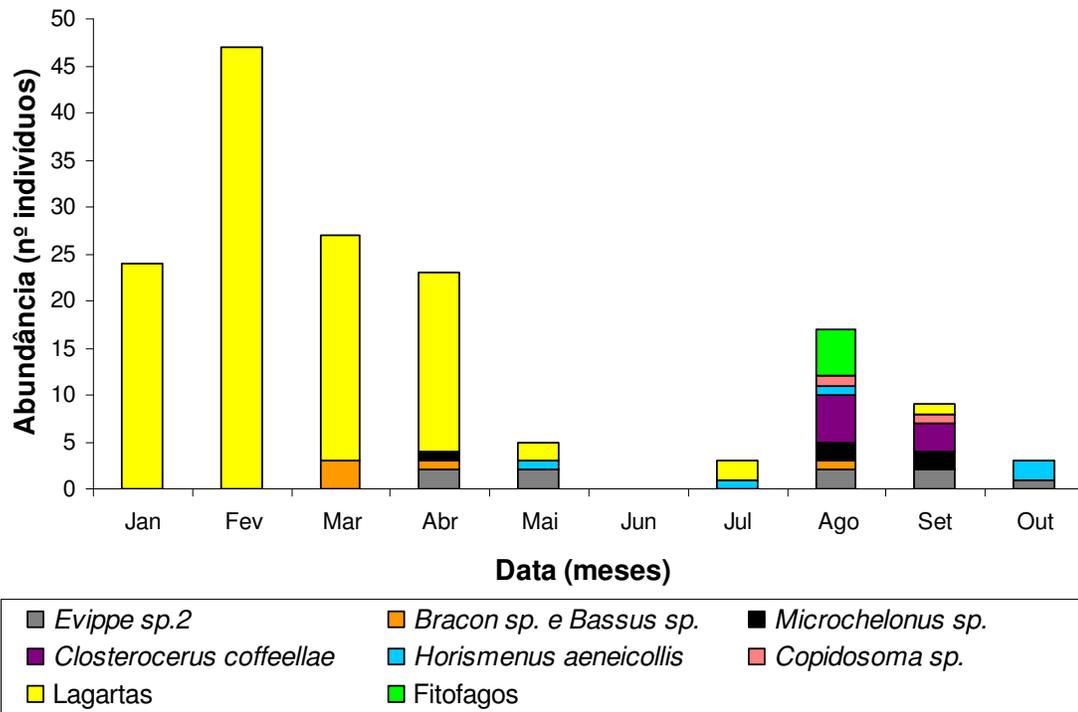


Fig. 14. Abundância e período de ocorrência de insetos encontrados em *E. tortuosum*.

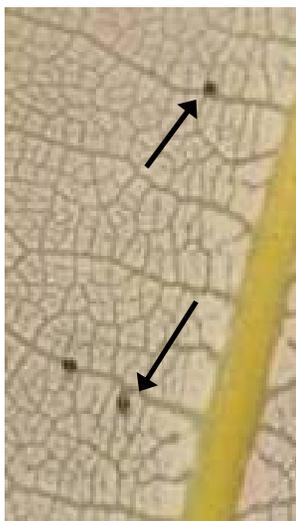


Fig. 15. Ovos de *Evippe* sp.2 depositados sobre a face abaxial de uma folha de *E. tortuosum*.



Fig. 16. Lagarta minadora de *Evippe* sp.2 sobre folha de *E. tortuosum*.



Fig. 17. Minador próximo à formação de pupa sobre folha de *E. tortuosum*. A saída precoce do interior da mina levou ao adiantamento no desenvolvimento.

Tabela 1. Lista de espécies conhecidas do gênero *Evippe* Chambers, 1873, com informações do local de ocorrência e planta hospedeira. Em destaque, as informações referentes a *Evippe* sp.2. Cortesia do Prof. Dr. Klaus Sattler (Department of Entomology, Natural History Museum, UK).

Evippe Chambers, 1873 - Espécie-tipo: *Evippe prunifoliella* Chambers, 1873 - Sinônimas: *Phaetusa* Chambers, 1875; *Tholerostola* Meyrick, 1917

Espécie	Autor	Ano	Região de ocorrência	Planta Hospedeira
<i>Abdita</i>	Braun	1925	Neoártico	Cercocarpus (Rosaceae)
<i>aequorea</i>	Meyrick	1917	Neotropical (Peru)	-
<i>albidorsella</i>	Snellen	1884	Paleártico Leste	<i>Lespedeza</i> (Leguminosae)
<i>aulonota</i>	Meyrick	1917	Neotropical (Equador)	-
<i>conjugella</i>	Caradja	1920	Paleártico	-
<i>dichotoma</i>	Li	1993	Paleártico	-
<i>echinulata</i>	Li	1993	Paleártico	-
<i>evippella</i>	Forbes	1931	Neotropical (Porto Rico)	<i>Aeschynomene</i> (Leguminosae)
<i>haberlandi</i>	Amsel	1961	Paleártico	<i>Alhagi</i> (Leguminosae)
<i>kuznetzovi</i>	Lvovsky & Piskunov	1989	Paleártico	-
<i>laudatella</i>	Walsingham	1907	Neoártico	-
<i>leuconota</i> - Sin.: <i>plutella</i> Chambers, 1875	Zeller	1873	Neoártico	-
<i>Lunaki</i>	Rebel	1940	Paleártico	-
<i>miniscula</i>	Li	1993	Paleártico	-
<i>novisyricis</i>	Li	1993	Paleártico	-
<i>omphalopa</i>	Meyrick	1917	Neotropical (Equador)	-
<i>penicillata</i>	Amsel	1961	Paleártico	-
<i>plumata</i>	Meyrick	1917	Neotropical (Guiana)	-
<i>postpallascens</i>	Walsingham	1897	Neotropical (<i>West Indies</i>)	-
<i>prunifoliella</i>	Chambers	1873	Neoártico	<i>Prunus</i> (Rosaceae)
<i>pseudolella</i> - Sin.: <i>cephalella</i> Caradja, 1920	Christoph	1888	Paleártico	-
<i>scoteropis</i>	Meyrick	1931	Neotropical (Paraguai)	-
<i>Syricis</i>	Meyrick	1936	Paleártico	<i>Prunus</i> (Rosaceae)
<i>yongdengensis</i>	Li	1993	Paleártico	-
<i>Zhengi</i>	Wang & Li	1994	Paleártico	-
<i>zhouziensis</i>	Li	1993	Paleártico	-
<i>sp. #1</i> (Introduzida na Austrália (1998-2000) para controle biológico de <i>Prosopis</i> spp.)	-	-	Neotropical (Argentina)	<i>Prosopis</i> (Leguminosae)
<i>sp. #2</i>	-	-	Neotropical (Brasil)	<i>Erythroxylum tortuosum</i> (Erythroxylaceae)

Tabela 2. Lista das espécies de parasitóides emergidos de minas foliares de *Erythroxylum tortuosum* Mart. (Erythroxylaceae) durante o período de novembro de 2005 a junho de 2006. Lagartas minadoras de *Evippe* sp.2 (Lepidoptera: Gelechiidae) foram hospedeiras da fauna de parasitóides.

Ordem	Família	Subfamília	Gênero	Espécie	Autor	Determinador	OBS:
HYMENOPTERA	Braconidae	Agathidinae	<i>Bassus</i>	sp	-	Michael Sharkey	-
		Braconinae	<i>Bracon</i>	sp	-	Michael Sharkey	-
		Cheloninae	<i>Chelonus</i>	sp	-	Michael Sharkey	- subgênero: <i>Microchelonus</i>
	Encyrtidae	Encyrtinae	<i>Copidosoma</i>	sp	Ratzeburg, 1844	John S. Noyes	- espécie próxima: <i>C. silvestrii</i> Costa Lima
	Eulophidae	Entedoninae	<i>Closterocerus</i>	<i>coffeellae</i>	Ihering	Christer Hansson	-
		<i>Horismenus</i>	<i>aeneicollis</i>	Ashmead	Christer Hansson	-	

Determinadores:

- Prof. Dr. Michael Sharkey (Department of Entomology, University of Kentucky, USA)
- Prof. Dr. John S. Noyes (Department of Entomology, Natural History Museum, UK)
- Prof. Dr. Christer Hansson (Lunds Universitet, inst. För cell - och organismbiologi, Zoologihuset, SE)

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral Jr., A. (1973) *O gênero Erythroxylum no município de Botucatu, São Paulo*. Tese de doutorado em Ciências – Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, Botucatu, SP.
- Bencke, C. S. C. & Morellato, L. P. C. (2002) Comparação de dois métodos de avaliação da fenologia de plantas, sua interpretação e representação. *Revista Brasileira de Botânica*, **25**, 269–275.
- Crawley, M. J. & Akhteruzzaman, M. (1988) Individual variation in the phenology of oak trees and its consequences for herbivorous insects. *Functional Ecology*, **2**, 409–415.
- Domingues, M. C. S., Ono, E. O. & Rodrigues, J. D. (2001) Plant growth regulators and 'Honey' orange fruit chemical thinning. *Scientia Agricola*, **58** (3), 487–490.
- Ehrlich, P. R. & Raven, P. H. (1964) Butterflies and plants: A study in coevolution. *Evolution*, **18**, 586–608.
- Faeth, S. H., Connor, E. F., & Simberloff, D. (1981) Early leaf abscission: a neglected source of mortality for folivores. *American Naturalist*, **117**, 409–415.
- Felfili, J. M. & Silva Júnior, M. C. (2001) *Biogeografia do bioma cerrado: estudo fisionômico da Chapada do Espigão Mestre do São Francisco*. Departamento de Engenharia Florestal, Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília, Brasília.
- Fournier, L. A. (1974) Um método cuantitativo para la medición de características fenológicas en árboles. *Turrialba*, **24**, 422–423.
- Gentry, G. L. & Dyer, L. A. (2002) On the conditional nature of neotropical caterpillar defenses against their natural enemies. *Ecology*, **83** (11), 3108–3119.
- Hering, M. (1951) *Biology of the Leaf Miners*. Junk, Den Haag.
- Hunter, M. D. (1990) Differential susceptibility to variable plant phenology and its role in competition between two insect herbivores on oak. *Ecological Entomology*, **15**, 401–408.
- Hunter, M. D. (1992) A variable insect–plant interaction: the relationship between tree budburst phenology and population levels of insect herbivores among trees. *Ecological Entomology*, **16**, 91–95.
- Jolivet, P. (1998) *Interrelationship Between Insects and Plants*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Komatsu, T. & Akimoto, S. (1995) Genetic differentiation as a result of adaptation to the phenologies of individual host trees in the galling aphid *Kaltenbachiella japonica*. *Ecological Entomology*, **20**, 33–42.

- Labandeira, C. C. (2002) The history of associations between plants and animals. In: *Plant-animal interactions: an evolutionary approach* (Herrera, C.M. & Pellmyr, O., eds.), pp. 26–74. Blackwell Science Ltd., Oxford, UK.
- Mani, M. S. (1964) *Ecology of plant galls*. Dr. W. Junk Publishers, The Hague.
- Marquis, R. J., Morais, H. C. & Diniz, I. R. (2002) Interactions among Cerrado plants and their herbivores: unique or typical? In: *The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna* (Oliveira, P. S. & Marquis, R. J. eds.), pp. 306–328. Columbia University Press, New York.
- Mopper, S., Stiling, P., Landau, K., Simberloff, D. & Van Zandt, P. (2000) Spatiotemporal variation in leafminer population structure and adaptation to individual oak trees. *Ecology*, **81**, 1577–1587.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., da Fonseca, G. A. B. & Kent, J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**, 853–858.
- Price, P. W., Bouton, C. E., Gross, P., McPherson, B. A., Thompson, J. M. & Weiss, A. E. (1980) Interactions among three trophic levels: Influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **11**, 41–65.
- Ribeiro, J. E. L. da S., Hopkins, M. J. G., Vicentini, A., Sothers, C. A., Costa, M. A. da S., Brito, J. M. de, Souza, M. A. D. de, Martins, L. H. P., Lohmann, L. G., Assunção, P. A. C. L., Pereira, E. da C., Silva, C. F. da, Mesquita, M. R. & Procópio, L. C. (1999) *Flora da reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central*. IMPA, Manaus.
- Stiling, P. D. (1999) *Ecology: theories and applications*. Prentice Hall, New Jersey, NJ.
- Torre-Bueno, J. R. (1989) *The Torre-Bueno Glossary of Entomology*. American Museum of Natural History, New York: 840 pp.
- U. S. D. A. (1986) *Collecting and Preserving Insects and Mites: Techniques and Tools*. (Schauff, M. E., ed. – updated version). National Museum of Natural History, Washington, DC.
- Wanderley, M. G. L., Shepherd, G. J. & Giulietti, A. M. (2002) *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. Volume 2. HUCITEC/ FAPESP, São Paulo, SP.

CAPÍTULO 2

*Assimetria Flutuante, Qualidade Nutricional e
Herbivoria em Erythroxylum tortuosum Mart.
(Erythroxylaceae)*

2.1 INTRODUÇÃO

2.1.1 Relação entre assimetria flutuante, qualidade da planta, e herbivoria

Estudos sobre os efeitos da qualidade das plantas nas taxas de ataque dos insetos herbívoros têm sido feitos e muitas hipóteses têm sido propostas para explicar as variações da herbivoria entre plantas (Lewis, 1984; White, 1984; Mattson & Haack, 1987; Cornelissen & Stiling, 2005). Um fator que pode influenciar os níveis de herbivoria é o estresse, uma vez que pode afetar a qualidade nutricional das plantas para os herbívoros (White, 1984). Sob estresse, não há energia suficiente disponível para os processos de regulação do fenótipo, resultando em erros no desenvolvimento, refletidos por alterações nos traços e padrões dentro de indivíduos (Escós *et al.*, 1997). A hipótese do estresse da planta (HEP) proposta por White (1984) argumenta que a abundância dos herbívoros é alta em plantas em estresse devido a uma maior disponibilidade de nutrientes, decréscimo na concentração de compostos de defesa e/ou mudanças na relação nutrientes/defesas químicas. Evidências que corroboram a hipótese de que o estresse moderado beneficia os herbívoros devido ao aumento da qualidade nutricional são abundantes (ex. McClure, 1980; Lewis, 1984; Mattson & Haack, 1987), e relações positivas entre herbivoria provocada por insetos e estresse nas plantas têm sido encontradas em alguns estudos (ex. Mattson & Haack, 1987; Heinrichs, 1988).

No entanto, alguns autores alegam que os testes experimentais da HEP têm gerado resultados conflitantes (ex. Bultman & Faeth, 1987; Louda & Collinge, 1992; Koricheva *et al.*, 1998; DeBruyn *et al.*, 2002), e muitos autores (ex. Larson, 1989; Koricheva *et al.*, 1998) têm defendido o abandono da HEP, estimulando a procura por hipóteses alternativas. Segundo DeBruyn *et al.* (2002), a maior causa de inconsistência na sustentação da HEP está na metodologia utilizada para a medição do estresse. Dentre estas medidas estão diversas

estimativas de produtividade, crescimento da planta, biomassa, razão raiz/parte aérea e parâmetros fisiológicos, tais como déficit de água na folha e produção de compostos secundários. Como sugerido por Møller (1995), uma definição objetiva de estresse ambiental auxiliaria o entendimento da relação entre o estresse apresentado pelas plantas e a herbivoria.

Recentemente, tem-se sugerido que a instabilidade no desenvolvimento (ID) reflete a incapacidade de os organismos controlarem seus processos de desenvolvimento durante a ontogenia e atingir a expressão ótima do fenótipo pré-determinado (Møller & Swaddle, 1997). Uma medida da ID é a assimetria flutuante (AF). A assimetria flutuante, uma pequena e aleatória variação da simetria em caracteres bilaterais simétricos, tem sido utilizada como indicativo de estresse (Martel *et al.*, 1999; Roy & Stanton, 1999; Alados *et al.*, 2001) e suscetibilidade à herbivoria (Møller, 1995; Zvereva *et al.*, 1997). Plantas com maiores quantidades de folhas assimétricas ou altos níveis de assimetria foliar, devem apresentar aumento nos níveis de herbivoria devido a maior qualidade nutricional das folhas assimétricas comparadas às folhas simétricas (Sakai & Shimamoto, 1965; Lempa *et al.*, 2000). Pouco se sabe como as desordens de desenvolvimento estão conectadas com o metabolismo das plantas. No entanto, como os lados direito e esquerdo da simetria bilateral de uma folha se desenvolvem sob o controle dos mesmos genes, pequenos desvios da perfeita simetria, representam ID e devem ser responsáveis pelas diferenças na qualidade nutricional e no metabolismo secundário em folhas simétricas e assimétricas (Cornelissen *et al.*, 2003; Cornelissen & Stiling, 2005; Cronk, 2005).

Correlações positivas entre AF e herbivoria indicam que plantas com folhas assimétricas são, em média, mais susceptíveis ao ataque por herbívoros, e/ou que a própria herbivoria atua como um agente de estresse, aumentando diretamente o nível de assimetria (Zvereva *et al.*, 1997). Entretanto, esta última correlação entre AF das folhas e herbivoria não é sempre causal (Lempa *et al.*, 2000), já que diferenças químicas e nutricionais entre folhas simétricas e assimétricas provavelmente influenciam a seleção de folhas pelos herbívoros (Lempa *et al.*, 2000), gerando correlações positivas entre herbivoria e AF (Cornelissen *et al.*, 2003; Cornelissen & Stiling, 2005).

Apesar da existência de estudos enfocando as relações entre ID e AF, esta questão ainda não tem sido adequadamente investigada em plantas. Até 1997 menos de 20 estudos eram encontrados na literatura (Møller & de Lope, 1998), onde um pequeno aumento foi observado desde então [revisão feita por Møller & Shykoff (1999)]. E segundo Cornelissen & Stiling (2005), embora a literatura sobre os efeitos da qualidade da planta na abundância de herbívoros seja ampla, poucos estudos têm investigado os efeitos das variações aleatórias da

morfologia foliar na qualidade da folha e na variação das taxas de herbivoria em plantas individuais (mas veja Wiggins, 1997 e Martel *et al.*, 1999).

Portanto, neste estudo diversas questões foram propostas para propiciar um melhor entendimento das relações entre estresse, AF e herbivoria, uma vez que o sistema de estudo fornece condições apropriadas para a investigação de tais questões.

2.1.2 Sistema de estudo

O Bioma Cerrado, que compreende diversas variações de uma formação vegetal savânica tipicamente brasileira, é considerado um dos ecossistemas mais ricos do planeta (Felfili & Silva Júnior, 2001). Está incluído na lista mundial dos 25 “hotspots”, isto é, áreas com menos de 30% da vegetação original remanescente e com grande endemismo de espécies (Myers *et al.*, 2000). Embora atualmente seja um ambiente fragmentado e intensamente alterado pela ação antrópica, possui uma diversidade biológica elevada e, conseqüentemente, um alto potencial de ocorrência de interações populacionais entre plantas e insetos. Em muitas dessas interações, diversas espécies de plantas costumam ser hospedeiras de uma grande diversidade de insetos herbívoros, dentre os quais estão os minadores foliares. Algumas relações entre plantas e insetos ocorrem ao acaso, em pequena escala espacial e temporal, apresentando baixa estabilidade, dificultando o seu registro por estudos científicos. Outras, ao contrário, são bem sucedidas e permanecem por longos períodos, tornando-se especializadas (Ehrlich & Raven, 1964; Mopper *et al.*, 2000).

Erythroxylaceae é uma família de grande representatividade nos cerrados brasileiros, possuindo distribuição subtropical e pantropical, com um único gênero ocorrente na região neotropical: *Erythroxylum* P. Browne (Wanderley *et al.*, 2002). O gênero compreende cerca de 180 espécies neotropicais, sendo que para o Brasil foram listadas 130 espécies em ambientes florestais e de cerrado *sensu lato* (Ribeiro *et al.*, 1999). Reúne representantes arbóreos, arbustivos e subarbustivos com folhas inteiras, glabras, membranáceas a coriáceas, de filotaxia alterna ou oposta e portadoras de estípulas interpeciolares, geralmente persistentes e estriadas no sentido longitudinal (Ribeiro *et al.*, 1999). *Erythroxylum tortuosum* Mart., conhecida popularmente como mercúrio-do-campo, tanto pelo aspecto ferrugíneo do caule quando descascado como pela coloração avermelhada de seus frutos, é uma planta arbustiva-arbórea típica dos cerrados (Amaral Jr., 1973), com pouca informação na literatura sobre os organismos ocorrentes e os padrões e processos populacionais naturais oriundos de interações tróficas.

No presente estudo foram investigados diversos aspectos ecológicos provenientes da interação entre *E. tortuosum* e *Evippe* sp.2 (Lepidoptera: Gelechiidae), um microlepidóptero (micro-mariposa), cuja lagarta é minadora foliar, específica de *E. tortuosum*. O alto grau de especialização da interação inseto-planta em questão forma um sistema propício para a elaboração de experimentos destinados ao estudo de interações populacionais, apesar da complexidade dos processos e interações interespecíficas que ocorrem simultaneamente.

2.1.3 Hipóteses

As seguintes hipóteses foram investigadas:

- 1) Assimetria flutuante (AF) entre plantas e intensidade de infestação (herbivoria): se a AF em folhas prediz susceptibilidade das plantas a insetos herbívoros, as plantas com maiores níveis de AF devem estar sujeitas a maiores graus de herbivoria do que plantas com menores incidências de AF.
- 2) AF, qualidade nutricional e preferência de oviposição: considerando que folhas com maiores níveis de AF provavelmente apresentam maior qualidade nutricional, insetos herbívoros devem ovipor preferencialmente nessas folhas, oferecendo melhor fonte de alimentação para a prole, reduzindo assim o tempo de desenvolvimento no interior das minas e exposição a inimigos naturais.
- 3) AF, qualidade nutricional e quantidade de recurso (área foliar): considerando que um sítio maior de oviposição signifique maior quantidade de recurso para os minadores, se os herbívoros conseguem distinguir folhas de diferentes qualidades nutricionais e tamanhos, folhas maiores devem ser preferidas para a postura, apresentando também elevada qualidade nutricional e, conseqüentemente, alto grau de AF.
- 4) AF, estresse da planta e qualidade nutricional: uma variação aleatória da simetria em caracteres bilaterais simétricos tem sido utilizada como indicativo de estresse. Plantas sob estresse teriam um desequilíbrio no metabolismo gerando aumento na qualidade nutricional de suas folhas. Portanto, altos graus de AF devem estar relacionados com melhor qualidade nutricional de folhas para os herbívoros.
- 5) AF, estresse da planta e herbivoria: considerando que os herbívoros causam estresse nas plantas, a ação de herbívoros pode causar AF. Então, minadores foliares devem causar aumento da AF ao longo do desenvolvimento das folhas. Assim, maiores níveis de AF são esperados em folhas minadas adultas em relação a folhas minadas jovens e a folhas saudáveis, sem traços de herbivoria.
- 6) AF e efeito de borda: as bordas dos fragmentos de vegetações são geralmente ambientes perturbados e podem promover estresse nas plantas (Gurevitch *et al.*, 2002). Conseqüentemente, plantas localizadas na borda devem apresentar maiores níveis de AF, podendo gerar diferenças na qualidade nutricional das folhas, na intensidade de infestação, na área foliar e no dano foliar (área minada) entre plantas localizadas no interior e na borda do fragmento.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Área de estudo

Vide item 1.2.1 do capítulo 1.

2.2.2 Relação entre AF e intensidade de infestação

Para a determinação dos níveis de assimetria foram coletadas 15 folhas adultas por planta em 11 indivíduos de *E. tortuosum* no ano de 2005 (esse conjunto de folhas será denominado “AF2005”). As folhas, sem traços de herbivoria, foram retiradas ao acaso de cada indivíduo e o material coletado foi então levado ao laboratório, onde imagens digitais (resolução: 2048 x 1536 pixels) foram geradas fotografando-se cada folha a uma distância padrão de 20 cm, por meio de câmera digital (Canon Powershot A400). Um cuidado tomado para minimizar o erro na obtenção das imagens foi pressionar sobre a folha e o anteparo da fotografia, uma placa transparente para deixar as superfícies das lâminas foliares totalmente planas (Sinclair & Hoffman, 2003).

Para se determinar o nível de assimetria, as respectivas larguras do lado direito e esquerdo foram medidas nas folhas fotografadas partindo-se perpendicularmente da nervura central até a borda, na porção mediana da folha, utilizando-se software de análise de imagem (MetaVue Version 6.3r4) (Fig. 1). A assimetria absoluta de uma determinada folha foi definida como a diferença (módulo) entre a largura direita (*LD*) e a largura esquerda (*LE*), sendo o nível de assimetria foliar de uma planta dado pela média das assimetrias individuais de cada folha (Palmer & Strobeck, 2003):

$$\text{Assimetria Flutuante de uma folha: } AF_{\text{folha}} = |LD - LE|$$

$$\text{Assimetria Flutuante de uma planta: } AF_{\text{planta}} = \text{média } |LD - LE|$$

Um importante fator a ser considerado nos estudos de assimetria é o erro de mensuração. Palmer (1996) relata que é importante as diferenças de simetria serem maiores que os erros de mensuração ou que medições subsequentes feitas nas mesmas folhas sejam altamente correlacionadas, uma vez que o erro pode parecer assimetria. Portanto, cerca de

10% das folhas coletadas (Cornelissen & Stiling, 2005) foram submetidas a uma segunda mensuração para a investigação de possíveis erros, correlacionando-se as duas medições.

Para estudar a relação entre os níveis de assimetria e a herbivoria, cinco ramos foram selecionados ao acaso no momento da coleta das folhas, e a quantidade de minas existentes nestes ramos foi registrada no campo, tendo-se então conhecimento da intensidade de infestação do minador pela proporção de folhas minadas (n° de folhas minadas/ n° de folhas observadas) em cada planta. A área total das folhas coletadas também foi mensurada e utilizada para estudar a relação com a herbivoria.

2.2.3 Relação entre preferência de oviposição, AF, qualidade nutricional, e área foliar

Para estudar o momento da escolha inicial do recurso, isto é, saber se os minadores ovipõem preferencialmente em folhas com maior grau de assimetria e de maior qualidade nutricional, 30 plantas foram utilizadas. Em ramos marcados ao acaso em cada planta, foi observada semanalmente a ocorrência de ovos do minador no período mais intenso de oviposição (outubro-novembro - 2005). No momento das observações, folhas jovens com e sem postura foram coletadas, levadas ao laboratório e fotografadas para a determinação dos níveis de assimetria e da área foliar, como descrito anteriormente (subitem 2.2.2). O número de folhas coletadas sem postura foi dependente do número de folhas coletadas contendo postura. Por exemplo, quando observadas três folhas contendo postura em uma dada planta em um determinado dia de observação, outras três folhas sem postura foram retiradas ao acaso. Foram coletados de 7 a 15 pares de folhas por planta, dependendo da capacidade amostral (número de folhas / indivíduo) (esse conjunto de folhas será denominado de “Ovip”, sendo as folhas sem ovos o conjunto das folhas jovens sadias).

No laboratório, após serem fotografadas, as folhas foram examinadas quanto ao conteúdo de água, nitrogênio, e concentração de taninos*. O conteúdo de água foi quantificado pela diferença de peso (balança semi-analítica) entre folhas úmidas e secas (matéria seca) após desidratação em estufa a 45° C por 72 horas. O teor de água das folhas, que considera a proporção (%) de água da folha, foi usado para as análises estatísticas. As folhas foram trituradas em pó sendo os taninos extraídos de 10 mg e o nitrogênio de 100 mg

* - O conteúdo de água foi avaliado no laboratório de Ecologia de Interações Tróficas, Depto. de Botânica, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP.

- O nitrogênio foi quantificado em laboratório do Depto. de Recursos Naturais (Ciência do Solo), Faculdade de Ciências Agrônomicas, UNESP – Botucatu, com supervisão do Prof. Dr. José Roberto Lyra Villas-Boas.

- As análises de taninos foram realizadas em laboratório do Depto. de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, com supervisão da Profa. Dra. Giuseppina Pace Pereira Lima.

do tecido seco. A concentração de taninos foi quantificada por espectrofotometria com adaptação do método proposto por Stevanato *et al.* (2004) (vide também Folin-Ciocalteu Index, 1992) e o conteúdo de nitrogênio foi determinado segundo metodologia descrita em AOAC (1995), conhecida como “método de Kjeldahl” (Malavolta *et al.*, 1997). A curva-padrão de quantificação de taninos para a espécie vegetal é mostrada na Figura 2, estando os protocolos da metodologia contidos no Apêndice B. A pesagem inicial das folhas (peso úmido) e a obtenção das fotografias foram feitas imediatamente após a coleta. Um procedimento adotado foi a lavagem das folhas (esfregaço em água de torneira corrente, seguido por passagem em água destilada) antes da secagem a fim de reduzir impurezas que interferissem nas análises bioquímicas.

Apesar do acompanhamento periódico dos momentos de oviposição no campo, para que não fosse selecionado apenas um momento de oviposição, é possível que folhas coletadas caracterizadas como “sem ovos” recebessem postura futuramente se ainda fossem deixadas nas plantas. Entretanto, é esperado também que mesmo com a capacidade de seleção por sítios melhores de oviposição, sejam eles mais nutritivos ou com abrigo contra intempéries e inimigos naturais, escolhas indesejadas e/ou insucessos no desenvolvimento dos ovos aconteçam (Larsson & Ekblom, 1995). Assim, acredita-se na fidedignidade dos dados em amostrar o evento natural.

2.2.4 Relação entre qualidade nutricional, AF e área foliar

Para estudar a relação entre qualidade nutricional, assimetria flutuante e área foliar, 9 indivíduos de *E. tortuosum* foram selecionados, sendo coletadas 15 folhas adultas por planta sem traços de herbivoria, em meados de junho de 2006 (esse conjunto de folhas será denominado como “AF2006” para diferenciar das folhas da “AF2005”). Como anteriormente descrito, após serem fotografadas para determinação dos níveis de assimetria (subitem 2.2.2) e da área total, as folhas foram examinadas quanto ao conteúdo de água, nitrogênio e concentração de taninos (subitem 2.2.3). Como a composição bioquímica pode mudar ao longo do desenvolvimento das plantas (Gurevitch *et al.*, 2002), comparações da bioquímica das folhas em dois estágios de desenvolvimento diferentes (folhas jovens sadias – sem ovos da Ovip – e folhas adultas sadias – AF2006) foram feitas, uma vez que as folhas utilizadas nesta etapa do estudo foram mais velhas do que aquelas utilizadas na etapa anterior (subitem 2.2.3).

2.2.5 Herbívoros como agentes de estresse e causadores de AF

Para verificar se os herbívoros podem causar estresse nas plantas aumentando o nível de assimetria ao longo do desenvolvimento das folhas, foram feitas coletas periódicas de folhas minadas de novembro de 2005 (minas foliares em estágio inicial de desenvolvimento) a junho de 2006 (minas foliares em estágio final de desenvolvimento). As coletas foram realizadas em 35 plantas, com uma média de 10 folhas por planta inicialmente adotada para a coleta. Devido à freqüente queda de ramos e folhas, o número coletado foi reduzido ajustando-se ao porte da planta e ao número de plantas disponíveis nas sucessivas coletas, para que pudesse haver material suficiente até o final do período de desenvolvimento das minas foliares, justificando a desigualdade no n amostral.

Registros fotográficos de todas as folhas coletadas foram obtidos para a determinação da AF (ver subitem 2.2.2). Comparações da AF de folhas minadas entre os meses de coleta foram feitas, permitindo analisar a variação ao longo do tempo em folhas sujeitas à ação de minadores foliares. Considerando a hipótese de que os minadores foliares são agentes de estresse causando aumento da AF ao longo do desenvolvimento de folhas minadas, comparações entre folhas adultas sadias (conjunto AF2006) e adultas minadas (coleta do mês de junho de 2006, sendo o mesmo período das folhas adultas sadias) também foram realizadas para avaliar se as folhas adultas minadas, além de possuírem maior nível de AF em relação às folhas jovens minadas, também retinham alto grau de AF em relação às folhas adultas sadias. Análises da área minada e da área foliar também foram feitas para as folhas minadas. A fim de verificar se os herbívoros são causadores de AF, Cornelissen & Stiling (2005) testaram a hipótese de que os lados minados seriam maiores que os lados não-minados quando uma mina estivesse em apenas um lado em particular de uma folha (direito ou esquerdo). Portanto, foram realizadas comparações das larguras entre os lados minados e os lados não-minados de todas as folhas minadas, excluindo-se da análise as folhas que possuíam minas em ambos os lados.

2.2.6 Efeito de borda

Considerando que parte das plantas selecionadas está localizada na borda do fragmento (até 10m para o interior), foram feitas comparações da intensidade de infestação, da qualidade nutricional das folhas, da área foliar, da AF e da área minada entre plantas localizadas no interior e na borda do fragmento.

2.2.7 Análise de dados

Para poder considerar a diferença na simetria das folhas em *E. tortuosum* como Assimetria Flutuante verdadeira, é necessário verificar se os valores de LD-LE possuem distribuição normal com média zero (Palmer & Strobeck, 1986). Normalidade com média diferente de zero pode significar Assimetria Direcional (AD), isto é, uma tendência de assimetria em uma direção em particular (para ex: ver Ducher *et al.*, 2005). Desvios da normalidade podem representar Anti-Simetria (AS), que é o padrão onde cerca de metade da população possui o lado esquerdo maior de uma estrutura e a outra metade tem o lado direito mais desenvolvido (para ex: ver Graham *et al.*, 1998). Ambas AD e AS não têm sido consideradas estimativas da instabilidade no desenvolvimento por terem uma base adaptativa e/ou serem determinadas por componentes genéticos ainda desconhecidos, refletindo um desenvolvimento normal dos organismos (Palmer & Strobeck, 1986; Palmer, 1994; Van Dongen, 2006). Além disso, AD e AS podem ser ambientalmente induzidas quando um lado é utilizado diferencialmente em relação ao outro ou quando está sob pressão de diferentes condições ambientais (Van Dongen, 2006), ou ainda ser resultado de medições sistemáticas tendenciosas (Helm & Albrecht, 2000). Portanto, para checar uma possível AS, os valores de LD-LE foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Para verificar se os valores de LD-LE diferem significativamente de zero e representam uma AD, foi aplicado o teste *t*-Student de uma amostra.

Para estimar o erro de mensuração e verificar se as medições foram confiáveis, a primeira e segunda medições de 10% das folhas coletadas foram submetidas à correlação de Pearson (Hódar, 2002). Considerando que durante o crescimento normal de um caractere, a variabilidade tende a aumentar com o tamanho do caractere (Lande, 1977; Van Valen, 1978), e que o tamanho das folhas coletadas em alguns casos não foi semelhante, foram conduzidos testes para verificar se o nível de AF depende do tamanho da folha. Portanto, análises de regressão linear entre |LD-LE| (variável dependente) e LD+LE (variável independente) foram adotadas, método tipicamente usado para acessar a dependência do tamanho do caractere (Graham *et al.*, 2003). Em alguns casos foi necessário fazer a transformação dos dados para raiz quadrada, a fim de ajustarem-se à normalidade. No entanto, para facilitar a compreensão na visualização de gráficos, as médias e os eixos mostram os dados não transformados.

Na comparação da AF e da intensidade de infestação entre plantas, uma análise de regressão entre a proporção de folhas minadas (variável dependente) e as médias de AF por planta (variável independente) foi aplicada. Uma nova regressão foi aplicada entre a proporção de folhas minadas (variável dependente) e as médias das áreas foliares (variável

independente). Uma correlação de Pearson também foi feita entre as médias de AF e as médias das áreas foliares.

Para analisar a preferência de oviposição, as médias da concentração de taninos, do conteúdo de nitrogênio, do teor de água, do nível de AF e da área foliar foram comparadas entre folhas sem ovos e com ovos pelo teste *t*-Student pareado (considerando as amostras como dependentes, já que pares de folhas foram retirados das plantas).

Para examinar a relação entre qualidade nutricional, AF e área foliar, os valores médios por planta do conteúdo de taninos, nitrogênio e água, do nível de AF e da área foliar, foram submetidos a correlações de Pearson. Para verificar diferenças na qualidade nutricional, no nível de AF e na área foliar entre folhas jovens sadias e adultas sadias, o teste *t*-Student (para amostras independentes) foi aplicado para comparação dos valores médios por planta. No caso dos taninos, os dados foram transformados em raiz quadrada de modo a obter homogeneidade de variância.

Para verificar se os herbívoros podem causar estresse na plantas aumentando o nível de assimetria ao longo do desenvolvimento das folhas, as medianas dos graus de AF por planta entre as subseqüentes coletas foram comparadas pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Este mesmo teste foi utilizado para a comparação das medianas das áreas minadas e das áreas foliares entre as coletas periódicas. Para comparação entre folhas adultas sadias e adultas minadas quanto à AF e à área foliar, os valores médios de AF por planta e das áreas foliares foram submetidos ao teste *t*-Student (para amostras independentes). Para testar a hipótese de possíveis diferenças dos lados minados em relação aos lados não-minados, os valores das medianas por planta das larguras dos lados minados e dos lados não-minados de todas as folhas minadas foram analisados pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon.

Para a comparação dos valores médios da intensidade de infestação, do conteúdo de taninos, nitrogênio e água, do nível de AF, da área foliar e da área minada entre plantas localizadas na borda e no interior do fragmento, o teste *t*-Student (para amostras independentes) foi empregado. Em alguns casos, foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

As análises estatísticas foram realizadas segundo Zar (1999) e por meio do uso dos programas SigmaStat (1995) e Statistica (1993).



Fig. 1. Análise de imagem de folha de *E. tortuosum* para medições do nível de assimetria flutuante, da área foliar e área minada.

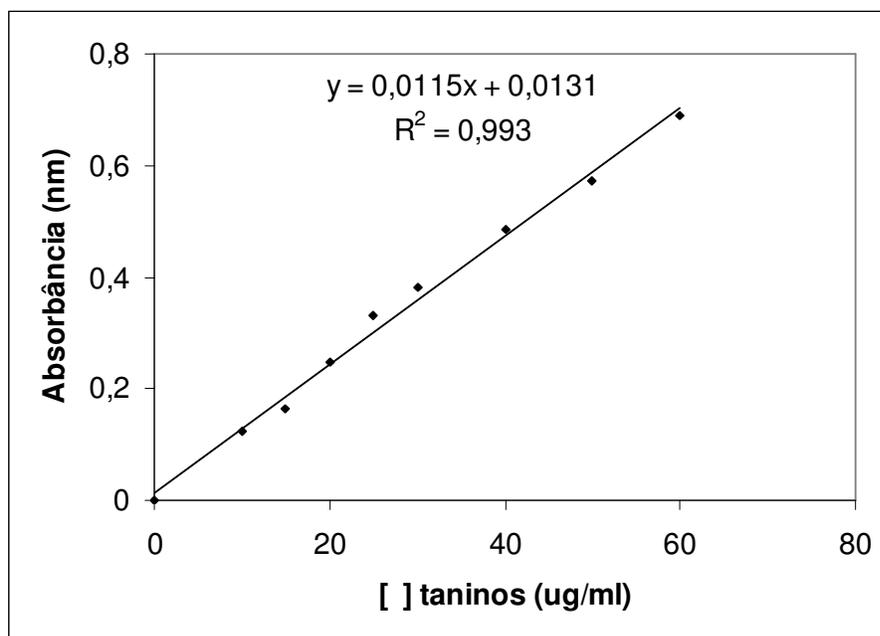


Fig. 2. Curva-padrão para quantificação de taninos em *E. tortuosum*. Protocolos da metodologia e da montagem da curva-padrão estão contidos no Apêndice B.

2.3. RESULTADOS

2.3.1 Testes para AF e dependência do tamanho

Os dados para os testes de assimetria em *E. tortuosum* podem ser considerados AF real. Os valores de LD-LE para todos os conjuntos de dados foram normalmente distribuídos (Kolmogorov-Smirnov, $P > 0,05$) não indicando indícios de anti-simetria. Os valores de LD-LE também não desviaram significativamente de zero (*t*-Student, $P > 0,05$), com a única exceção dos dados relativos à Ovip ($t = -2,176$; $P = 0,038$), indicando nesse caso, uma leve assimetria direcional. Apesar de alguns estudos usarem cálculos de correção de AF para o tamanho da característica avaliada (Hódar, 2002; Freeman *et al.*, 2004; Cornelissen & Stiling, 2005), neste trabalho não foi necessário utilizar correção, pois as folhas de *E. tortuosum* não mostraram evidências de dependência do tamanho, com $P > 0,05$ em todos os conjuntos de dados a partir das análises de regressão. A Tabela 1 apresenta uma síntese dos resultados de todos os testes para AF real e dependência do tamanho.

Tabela 1. Testes para assimetria flutuante e dependência do tamanho (DT). Para checar indícios de anti-simetria, a normalidade dos valores de LD-LE foi acessada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S); para verificar se os valores de LD-LE diferiram significativamente de zero (presença de simetria direcional), o teste *t*-Student foi aplicado; e para testar a dependência do tamanho, análises de regressão entre |LD-LE| e LD+LE foram realizadas.

Conjunto de dados	K-S	<i>t</i> -Student		DT	
	<i>P</i>	<i>t</i>	<i>P</i>	r^2	<i>P</i>
1) AF2005	0,628	0,798	0,444	0,312	0,074
2) Ovip	0,349	-2,176	0,038*	0,009	0,611
3) F. Jovens Sadias	0,127	-1,444	0,159	<0,001	0,935
4) AF2006	0,739	2,086	0,070	0,245	0,176
5) F.M.T.	0,356	-1,966	0,053	0,002	0,870
6) F.M.1	0,385	-0,237	0,816	<0,001	0,986
7) F.M.2	0,131	-1,496	0,154	0,123	0,168
8) F.M.3	0,226	-0,267	0,795	0,002	0,983
9) F.M.4	0,582	-1,220	0,254	0,016	0,725
10) F.M.5	0,642	-1,363	0,231	0,169	0,418
11) F.M.6	0,557	-0,696	0,509	0,062	0,552
12) F.M.7	0,141	2,349	0,079	0,129	0,552

* Diferença significativa ($P < 0,05$).

Conjuntos de dados:

- 1) folhas da coleta de 2005 (para comparação da AF com intensidade de infestação)
- 2) folhas jovens (para os testes de preferência de oviposição)
- 3) folhas sem ovos da Ovip (para a comparação com folhas adultas)
- 4) folhas adultas da coleta de 2006 (para teste de qualidade nutricional, AF e área foliar)
- 5) folhas minadas das coletas de todos os meses para testes de AF, área foliar e área minada
- 6) folhas minadas das coletas de novembro-dezembro
- 7) folhas minadas das coletas de janeiro
- 8) folhas minadas das coletas de fevereiro
- 9) folhas minadas das coletas de março
- 10) folhas minadas das coletas de abril
- 11) folhas minadas das coletas de maio
- 12) folhas minadas das coletas de junho (conjunto das folhas minadas adultas)

2.3.2 Relação entre AF e intensidade de infestação

A intensidade de infestação não mostrou relação com AF e área foliar (conjunto de folhas AF2005). As regressões por planta entre a proporção de folhas minadas e o nível de AF ($r^2=0,068$; $P=0,437$; $N=11$), e entre proporção de folhas minadas e a área foliar média ($r^2=0,267$; $P=0,103$; $N=11$) não foram significativas. No entanto, quando AF e área foliar foram comparadas, houve uma correlação positiva significativa ($r=0,645$; $P=0,032$; $N=11$) como mostrada na Figura 3, indicando que áreas foliares maiores compreendem maiores níveis de AF.

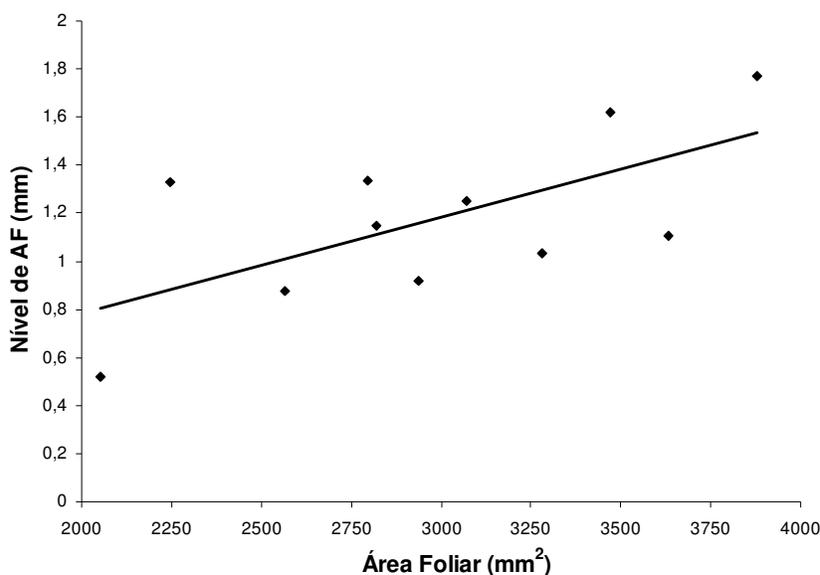


Fig. 3. Correlação entre assimetria flutuante (AF) (mm) e área foliar (mm²) em *E. tortuosum* ($r=0,645$; $P=0,032$; $N=11$). A AF foi calculada como a média da diferença absoluta entre as larguras direita (LD) e esquerda (LE) das folhas de uma planta.

2.3.3 Relação entre preferência de oviposição, AF, qualidade nutricional, e área foliar

Dentre os fatores avaliados para comparar a qualidade nutricional entre folhas com ovos e sem ovos, somente o teor de água apresentou diferença significativa ($t=9,336$; $P<0,001$), verificando-se uma preferência de oviposição em folhas com menor teor de água (Fig. 4). Apesar de folhas com ovos apresentarem maior conteúdo de nitrogênio e menor concentração de taninos quando comparados os valores médios entre folhas com e sem postura, estatisticamente as diferenças não foram significativas (nitrogênio: $t= -1,284$; $P=0,209$; taninos: $t=0,441$; $P=0,663$), mostrando que, para esse sistema, o teor de água pode ser um fator nutricional fundamental na escolha inicial do recurso.

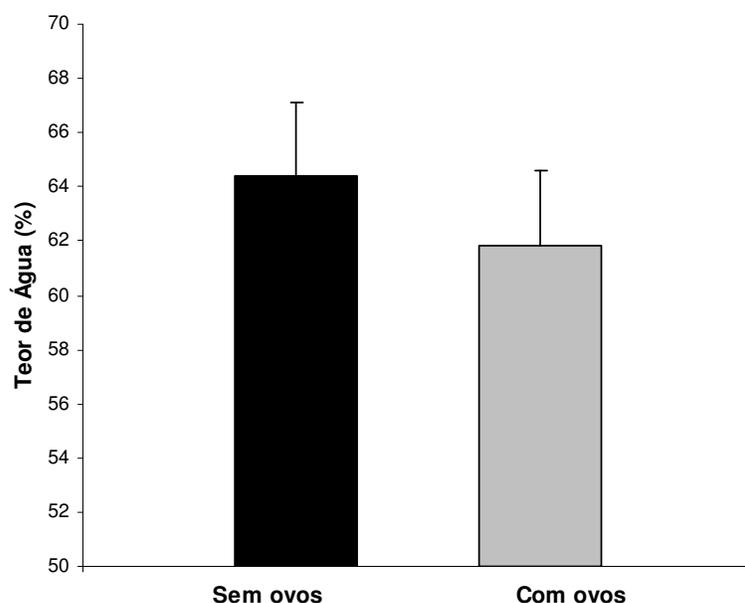


Fig. 4. Comparação dos valores médios do teor de água (%) entre folhas sem ovos e com ovos. Os valores médios diferiram significativamente pelo teste *t*-Student pareado ($t=9,336$; $P<0,001$). As barras indicam a média \pm desvio-padrão.

Quando comparados os valores médios do grau de AF entre folhas sem postura (média= $1,477\pm 0,471$ mm) e com postura (média= $1,309\pm 0,534$ mm), não houve diferença significativa ($t=1,843$; $P=0,076$). Apesar disso, pode-se dizer que houve uma tendência de as folhas escolhidas para a oviposição terem um nível de assimetria menor, ao contrário do esperado. Na comparação dos valores médios da área foliar entre folhas sem ovos e com ovos houve diferença significativa ($t= -3,521$; $P=0,001$), sendo preferidas para oviposição folhas com as áreas do limbo maiores (Fig. 5). A Tabela 2 apresenta uma síntese dos resultados relativos à preferência de oviposição por *Evippe* sp.2 em folhas de *E. tortuosum*.

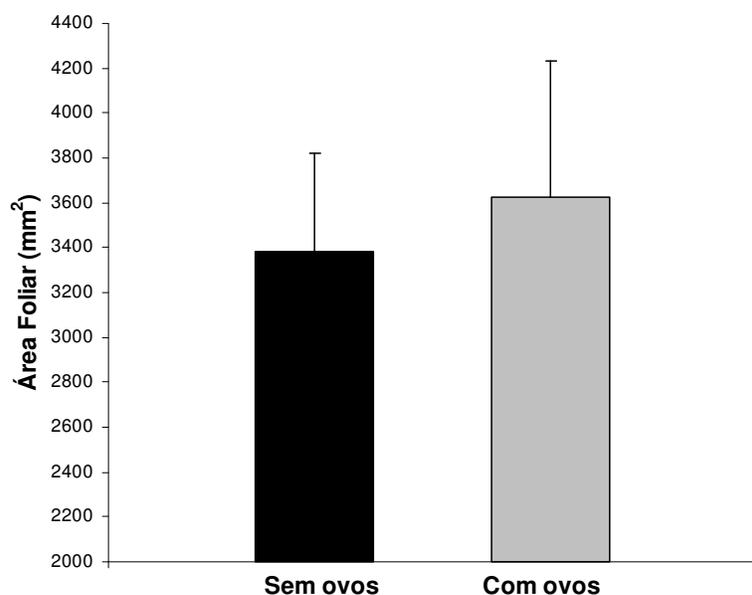


Fig. 5. Comparação dos valores médios das áreas foliares (mm^2) entre folhas sem ovos e com ovos. Os valores médios diferiram significativamente pelo teste *t*-Student pareado ($t = -3,521$; $P = 0,001$). As barras indicam as médias \pm desvio-padrão.

Tabela 2. Comparação dos valores médios da concentração de taninos (mg/g massa seca), do conteúdo de nitrogênio (g/kg massa seca), do teor de água (%), da área foliar (mm^2) e do nível de assimetria flutuante (AF) (mm) entre folhas sem ovos e com ovos pelo teste *t*-Student pareado.

Fonte de variação	Média \pm Desvio Padrão		GL	<i>t</i>	<i>P</i>
	Folhas sem ovos	Folhas com ovos			
Taninos	155,029 \pm 31,855	150,214 \pm 41,688	29	0,441	0,663
Nitrogênio	19,537 \pm 1,333	19,774 \pm 1,331	29	-1,284	0,209
Teor de água	64,376 \pm 2,748	61,823 \pm 2,769	29	9,336	< 0,001*
Área foliar	3380,408 \pm 440,417	3625,993 \pm 603,726	29	-3,521	0,001*
AF	1,477 \pm 0,471	1,309 \pm 0,534	29	1,843	0,076

* Diferença significativa ($P < 0,05$).

2.3.4 Relação entre qualidade nutricional, AF e área foliar e comparações entre as fases de desenvolvimento das folhas.

A comparação entre qualidade nutricional, área foliar e AF para as folhas de *E. tortuosum* não mostraram significância nas análises de correlação, com exceção da comparação entre concentração de taninos e área foliar que apresentou uma relação positiva significativa ($r=0,714$; $P=0,031$) (Tabela 3), indicando que plantas com nível de AF maior possuem maiores quantidades de taninos.

Tabela 3. Resultados de todas as análises de correlação quando comparados os valores médios do conteúdo de taninos e nitrogênio, do teor de água, da área foliar e da assimetria flutuante (AF) para as folhas adultas sadias (AF2006).

Fatores comparados	GL	<i>r</i>	<i>P</i>
Taninos x Nitrogênio	8	0,273	0,477
Taninos x Teor de água	8	0,216	0,577
Taninos x Área foliar	8	0,125	0,749
Taninos x AF	8	0,714	0,031*
Nitrogênio x Teor de água	8	0,188	0,627
Nitrogênio x Área foliar	8	0,104	0,791
Nitrogênio x AF	8	0,061	0,876
Teor de água x Área foliar	8	0,332	0,383
Teor de água x AF	8	0,156	0,688
Área foliar x AF	8	0,191	0,623

* Diferença significativa ($P < 0,05$).

Comparações da bioquímica entre os dois estágios de desenvolvimento, folhas jovens sadias (sem ovos da Ovip) e folhas adultas sadias (AF2006), revelaram diferenças significativas para os três fatores analisados (Tabela 4). Folhas jovens tiveram menores concentrações de taninos e maiores teores de nitrogênio e água em relação às folhas adultas, revelando que ao longo do desenvolvimento das folhas, a composição bioquímica é bastante alterada. Por outro lado, comparações da área foliar e do nível de AF entre folhas jovens e adultas não mostraram diferenças significativas (Tabela 4).

Tabela 4. Comparação dos valores médios da concentração de taninos (mg/g massa seca), do conteúdo de nitrogênio (g/kg massa seca), do teor de água (%), da área foliar (mm²) e do nível de assimetria flutuante (AF) (mm) entre folhas jovens saudáveis e folhas adultas saudáveis pelo teste *t*-Student.

Fonte de variação	Média ± Desvio Padrão		GL	<i>t</i>	<i>P</i>
	Folhas jovens	Folhas adultas			
Taninos	155,029 ± 31,855	227,646 ± 58,298	37	-4,517	< 0,001*
Nitrogênio	19,537 ± 1,333	10,409 ± 1,310	37	18,087	< 0,001*
Teor de água	64,376 ± 2,748	50,693 ± 2,113	37	13,722	< 0,001*
Área foliar	3380,408 ± 440,417	3508,536 ± 367,096	37	-0,792	0,433
AF	1,477 ± 0,471	1,385 ± 0,323	37	0,544	0,590

* Diferença significativa ($P < 0,05$).

2.3.5 Herbívoros como agentes de estresse e causadores de AF

Nas comparações das folhas minadas ao longo dos subseqüentes meses de coleta, somente a área minada sofreu variação significativa ($H=54,826$; $P<0,001$) (Tabela 5; Fig. 6), aumentando seu valor ao longo do tempo. As medianas da área foliar e do nível de AF por planta não diferiram entre as coletas periódicas de folhas minadas (Tabela 5). Esses resultados revelaram não haver diferença significativa no crescimento das folhas ao longo das coletas de folhas minadas (medida pela área foliar), nem variação significativa no nível de AF pela atividade do herbívoro, mas sim um aumento significativo na área foliar perdida pela ação de consumo do minador.

Quando relacionadas às folhas adultas saudáveis, folhas adultas minadas não mostraram diferenças significativas para área foliar (Tabela 6), indicando que na fase adulta, ambos os tipos de folha possuem um tamanho semelhante. Contudo, o nível de AF revelou diferença significativa ($t=2,840$; $P=0,015$) (Tabela 6; Fig.7), revelando que folhas saudáveis possuíam um grau de AF maior do que folhas sob a ação de herbivoria na fase adulta.

As comparações das larguras (mm) entre os lados minados (LM) e os lados não-minados (LN) de folhas minadas não tiveram diferenças significativas (LM=18,035 (3,345); LN=17,592 (3,710) – mediana (intervalo do quartil); $W=142,000$; $P=0,248$), indicando novamente uma falta de relação entre a ação de minadores e a variação no nível de AF.

Tabela 5. Comparação das medianas da área minada (mm²), da área foliar (mm²) e do nível de assimetria flutuante (AF) (mm) das folhas minadas entre os subsequentes meses de coleta, pelo teste de Kruskal-Wallis.

Meses	Fonte de Variação - mediana (intervalo do quartil)			N
	Área Minada	Área foliar	AF	
1	3,153 (3,205)	3026,514 (572,446)	1,105 (0,656)	17
2	33,507 (13,279)	3711,996 (1437,497)	1,321 (0,743)	17
3	43,122 (12,002)	3086,416 (1790,438)	1,339 (1,17)	11
4	75,384 (33,434)	2979,25 (2460,654)	1,299 (0,875)	10
5	70,964 (43,104)	3866,506 (2615,72)	1,613 (1,263)	6
6	90,434 (26,854)	3835,37 (2552,282)	1,669 (1,788)	8
7	93,128 (35,264)	3980,307 (1300,729)	0,863 (0,311)	5
H	54,826	4,736	5,409	
GL	6	6	6	
P	<0,001*	0,578	0,493	

* Diferença significativa ($P < 0,05$).

Meses (Coletas): (1) novembro-dezembro. (2) janeiro. (3) fevereiro. (4) março. (5) abril. (6) maio. (7) junho.

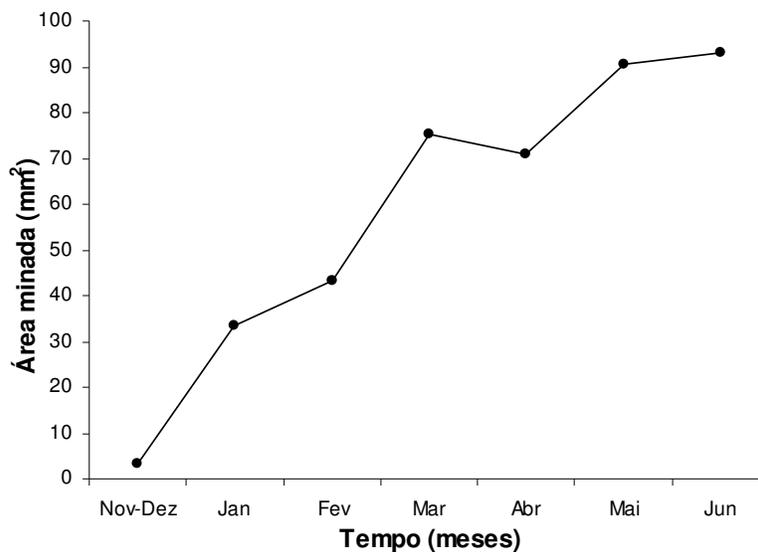


Fig. 6. Comparação das medianas das áreas minadas entre as coletas de novembro de 2005 a junho de 2006. Houve diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis ($H=54,826$; $P < 0,001$).

Tabela 6. Comparações dos valores médios das áreas foliares (mm²) e dos níveis de assimetria flutuante (AF) (mm) entre folhas adultas sadias e folhas adultas minadas pelo teste *t*-Student.

Fonte de variação	Média ± Desvio Padrão		GL	<i>t</i>	<i>P</i>
	Folhas sadias	Folhas minadas			
Área foliar	3508,536 ± 367,096	3629,164 ± 1242,748	12	-0,278	0,786
AF	1,385 ± 0,323	0,916 ± 0,232	12	2,840	0,015*

* Diferença significativa ($P < 0,05$).

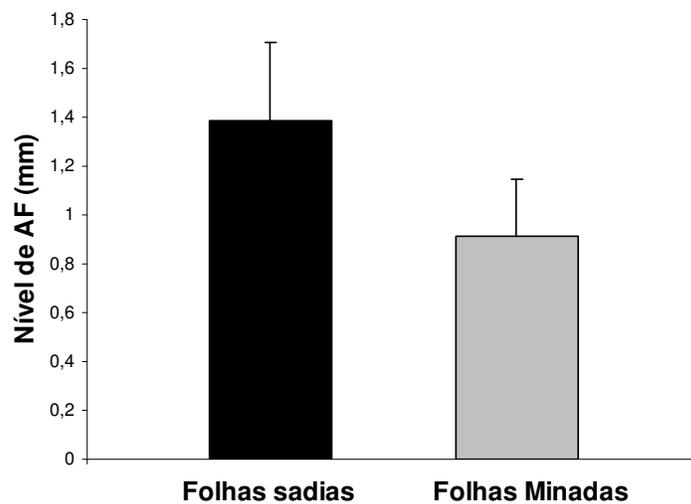


Fig. 7. Comparação dos valores médios dos níveis de assimetria flutuante (AF) entre folhas adultas sadias e folhas adultas minadas. Houve diferença significativa pelo teste *t*-Student ($t=2,840$; $P=0,015$). As barras indicam a média ± desvio-padrão.

2.3.6 Efeito de borda

A comparação da qualidade nutricional, herbivoria, AF e área foliar entre plantas localizadas na borda e no interior do fragmento não apresentou diferenças significativas para todos os conjuntos de dados (AF2005, Ovip, AF2006 e Folhas Minadas) ($P > 0,05$ para todos os dados) (Tabela 7).

Tabela 7. Comparações da intensidade de infestação (%), do conteúdo de taninos (mg/g massa seca), nitrogênio (g/kg massa seca) e água (%), da área foliar (mm²), do nível de assimetria flutuante (AF) (mm) e da área minada (mm²) entre plantas localizadas no interior (i) e na borda (b) do fragmento de cerrado.

Conjunto de dados ¹	Fonte de variação	Interior		Borda		GL	t	P*
		Média ± Desv. Pad.	N _i	Média ± Desv. Pad.	N _b			
AF2005	Infestação	5,579 ± 5,043	5	5,620 ± 3,543	6	9	-0,016	0,988
	Área foliar	3171,389 ± 737,64	5	2815,81 ± 370,251	6	9	1,041	0,325
Ovip	Taninos	153,033 ± 23,282	25	150,562 ± 15,239	5	28	0,226	0,823
	Nitrogênio	19,572 ± 1,136	25	20,076 ± 1,730	5	28	-0,831	0,413
	Teor de água	63,235 ± 2,840	25	62,415 ± 1,424	5	28	0,623	0,538
	Área foliar	3501,453 ± 519,431	25	3511,934 ± 375,433	5	28	-0,043	0,966
AF2006	AF	0,316 ± 0,220	25	0,197 ± 0,183	5	28	1,124	0,271
	Taninos	243,322 ± 40,378	4	215,104 ± 71,639	5	7	0,698	0,508
	Nitrogênio	10,430 ± 1,456	4	10,393 ± 1,357	5	7	0,040	0,969
	Teor de água	51,451 ± 2,295	4	50,087 ± 1,985	5	7	0,958	0,370
	Área foliar	3431,688 ± 431,262	4	3570,014 ± 345,541	5	7	-0,536	0,608
F. M. 2	AF	1,397 ± 0,231	4	1,376 ± 0,411	5	7	0,092	0,929
	Área Minada	31,600 ± 11,098	11	32,103 ± 6,425	6	15	-0,101	0,921
	Área foliar	3584,055 ± 756,927	11	3281,928 ± 1196,959	6	15	0,642	0,530
F. M. 3	AF	1,364 ± 0,880	11	1,206 ± 0,447	6	15	0,408	0,689
	Área Minada	47,437 ± 8,242	6	47,425 ± 12,832	5	9	0,002	0,998
	Área foliar	3337,309 ± 791,757	6	2755,044 ± 955,526	5	9	1,107	0,297
F. M. 4	AF	1,327 ± 0,663	6	2,179 ± 1,773	5	9	-1,098	0,301
	Área Minada	79,143 ± 20,397	5	65,029 ± 14,486	5	8	1,262	0,243
	Área foliar	3606,044 ± 790,959	5	2446,220 ± 1222,314	5	8	1,781	0,113
F. M. 5	Área Minada	107,242 ± 34,350	3	50,555 ± 27,988	3	4	2,216	0,091
	Área foliar	4132,483 ± 710,257	3	3007,246 ± 1678,107	3	4	1,070	0,345
	AF	1,880 ± 0,823	3	1,359 ± 0,796	3	4	0,788	0,475
F. M. 6	Área Minada	90,976 ± 25,517	4	66,550 ± 43,744	4	6	0,965	0,372
	Área foliar	4222,548 ± 493,688	4	2712,651 ± 1850,105	4	6	1,577	0,166
	AF	1,902 ± 0,968	4	1,871 ± 1,778	4	6	0,030	0,977
F. M. 7	Área Minada	89,126 ± 18,939	3	74,246 ± 26,704	2	3	0,747	0,510
Conjunto de dados ²	Fonte de variação	Soma dos Ranks	N _i	Soma dos Ranks	N _b	U	Z	P*
AF2005	AF	33	5	33	6	12	-0,548	0,584
F. M. 4	AF	32	5	23	5	8	-0,940	0,347
F. M. 7	Área foliar	9	3	6	2	3	0	1
	AF	10	3	5	2	2	-0,577	0,564

* Não houve diferenças significativas ($P > 0,05$ para todos os conjuntos de dados).

¹ Conjuntos de dados analisados pelo teste *t*-Student. ² Conjuntos de dados analisados pelo teste de Mann-Whitney. Para detalhamento dos conjuntos de dados, ver a legenda da Tabela 1.

2.4 DISCUSSÃO

A assimetria flutuante têm sido amplamente utilizada como medida de avaliação da instabilidade no desenvolvimento (ID) e, conseqüentemente, do nível do estresse de um organismo. A partir do pressuposto de que plantas sob estresse, com alto grau de AF teriam maior suscetibilidade ao ataque de herbívoros e, conseqüentemente, aumento dos índices de herbivoria (Møller, 1995; Wiggins, 1997; Zvereva *et al.*, 1997; Cornelissen *et al.*, 2003; Cornelissen & Stiling, 2005), foi avaliada a intensidade de infestação por um minador foliar em *E. tortuosum*. Entretanto, correlações positivas entre AF e herbivoria (intensidade de infestação pelo minador) não foram encontradas, indicando que neste sistema de estudo, esse pressuposto aparentemente não pode ser empregado. Bañuelos *et al.* (2004) estudando herbivoria, conteúdo de um composto secundário, dimorfismo sexual e ID na planta dióica *Rhamnus alpinus*, não encontraram relações da AF com qualquer uma das variáveis, sugerindo que a AF não era um indicador da suscetibilidade ao dano por herbívoros ou da habilidade de induzir a produção de compostos de defesa. Apesar de existir uma AF real em *E. tortuosum*, as fêmeas de *Evippe* sp.2 talvez não consigam perceber essas diferenças na simetria das folhas e/ou utilizem outros aspectos para a seleção de sítios de oviposição.

A ausência de relação entre AF e intensidade de infestação instigou o questionamento sobre o método de avaliação da herbivoria pela proporção de folhas minadas. Apesar de evidências de que a ação de herbívoros pode levar à abscisão antecipada das folhas das plantas (Williams & Whitam, 1986; Stiling & Simberloff, 1989), a fragilidade natural dos ramos e folhas de *E. tortuosum*, principalmente próximo à época seca, leva à perda de muitas informações com as constantes quedas de folhas. Assim, como a estimativa de herbivoria adotada poderia não representar com eficácia a natureza do sistema, o estudo da preferência de oviposição, que é a escolha inicial do recurso, mostrou-se adequada para revelar a confiabilidade dos dados.

Wiggins (1997), estudando as relações entre AF em folhas de *Colophospermum mopane* e preferência de oviposição da mariposa *Imbrasia belina*, não encontrou relação significativa entre o grau de AF das plantas e os locais escolhidos para oviposição. O autor atribuiu essa falta de relação significativa a pressões impostas por traços da história de vida de *I. Belina* e à abundância do hospedeiro, em detrimento da falta de benefícios potenciais da discriminação do hospedeiro baseada na AF da folha. Contudo, no caso da oviposição em *E. tortuosum*, houve a tendência (diferença não significativa) de preferência de postura em folhas mais perfeitas, isto é, com grau de AF menor, ao contrário do esperado. Além disso, na fase adulta, folhas sadias tinham nível de AF maior que folhas minadas, levando à confirmação de

que para esse sistema de estudo a relação positiva entre AF e herbivoria não pode ser empregada.

Em publicação recente, Velickovic & Perisic (2006) constataram que indivíduos de *Plantago major* vivendo em locais mais poluídos (com maior nível de estresse) possuíam grau de assimetria menor do que aqueles vivendo em áreas não poluídas (com menor nível de estresse). Os autores argumentam que a possibilidade de adaptação local das plantas a condições de estresse pode sugerir o uso da AF como uma boa característica diagnóstica para acessar a tolerância ao estresse, e que a AF para espécies de plantas com ampla distribuição ecológica como *P. major*, deveria ser considerada como um “índice de qualidade do habitat”.

Painter (1958) ressalta que tolerância é a habilidade de uma planta em sustentar o dano sem maiores conseqüências. Então, o menor grau de AF em folhas adultas minadas de *E. tortuosum* pode ser um indicativo de tolerância ao estresse causado pelo herbívoro ao longo do período de desenvolvimento da folha. Considerando que sob estresse ocorra abscisão antecipada, folhas mais tolerantes ao estresse podem permanecer mais tempo na planta evitando a queda precoce. Para o minador isso é interessante, visto que no solo as larvas das folhas caídas podem sofrer maior predação e dessecação (Stiling & Simberloff, 1989, Stiling *et al.* 1991, Mopper & Simberloff 1995), a ação de microorganismos pode ser mais intensa e o distanciamento da planta de origem pode ser maior. Tais fatores que aumentariam a mortalidade, reduzindo a capacidade reprodutiva da espécie. Talvez a habilidade de tolerância ao estresse seja um indício da qualidade da planta para o minador foliar, sugerindo o uso da AF como característica diagnóstica para acessar esse tipo de informação, como apontado por Velickovic & Perisic (2006). A conclusão destes autores sobre o uso da AF como índice de qualidade do habitat para plantas de ampla distribuição, no entanto, ainda deve ser melhor estudada com outras espécies de plantas cosmopolitas para afirmações mais confiáveis.

Estudos sobre os mecanismos de tolerância ainda são escassos, mas provavelmente o processo envolve uma maximização da taxa fotossintética para compensar as perdas, ou o rearranjo e a disponibilização de uma gama de recursos após o estresse causado pelo dano (Strauss & Agrawal, 1999; Strauss & Zangerl, 2002). Em *E. tortuosum*, a tolerância pode estar atuando como forma de minimizar o estresse, sendo representada na forma do equilíbrio nutricional (por ex: balanço normal entre nitrogênio e taninos), do controle da simetria da folha e da resistência ao herbívoro, expressando ao longo do tempo de desenvolvimento das folhas, o fenótipo de nível de AF menor em folhas minadas em relação às folhas sadias (teoricamente menos tolerantes). Ainda, a diferença no nível de AF entre folhas com e sem postura, mostrando uma tendência à significância, pode representar em parte o “early warning paradigm” (algo como o “paradigma do alerta precoce”), que é a idéia de que os níveis de AF

aumentarão com o estresse antes que conseqüências para o desempenho da espécie possam ser reconhecidas (Clarke, 1995). Então, as condições de estresse proporcionadas pelo ambiente do Cerrado podem ocasionar alterações na morfologia das folhas desde os primórdios foliares, impondo pressões seletivas e levando ao sobressalto da capacidade de tolerância ao estresse de algumas folhas em detrimento de outras. Assim, essa tendência de postura pode ser um indicativo para seleção de plantas hospedeiras melhores para os minadores futuramente. Outros estudos utilizando diferentes espécies, investigando o momento da oviposição podem ajudar no esclarecimento dessas questões. A relação entre tolerância e AF também surge como uma linha de pesquisa a ser melhor explorada.

Quanto à qualidade nutricional, as análises bioquímicas de taninos, como um composto de defesa da planta, e de nitrogênio, como um recurso para o minador foliar, tipos de conteúdo da folha amplamente utilizados nos estudos de interações entre plantas e herbívoros, não apresentaram diferenças significativas para explicar a preferência de oviposição de *Evippe* sp.2. Apesar de a qualidade da planta ser bastante empregada como fator que prediz ou induz a herbivoria por insetos (Awmack & Leather, 2002), no sistema de estudo essa afirmação não pôde ser aplicada para a fase de oviposição.

Com relação ao nitrogênio, Fischer & Fiedler (2000) em amplo estudo com espécies de lepidópteros, não encontraram correlação entre melhor performance dos insetos e plantas mais nutritivas. Os autores observaram que o rápido crescimento larval em plantas ricas em nitrogênio caminhou junto com a alta mortalidade de pupas e redução do tamanho adulto. Schoonhoven *et al.* (2005) destacam que embora muitos estudos descrevam correlações positivas entre performance do inseto e conteúdo de nitrogênio da planta hospedeira, é necessário cautela em generalizar resultados que avaliem os benefícios somente para a fase larval. Talvez a baixa qualidade nutricional natural das folhas de *E. tortuosum*, representada pelo alto conteúdo de taninos e pelo reduzido teor de nitrogênio encontrado, seja um fator que dificulte a distinção de folhas com melhor relação custo-benefício (alta relação nutrientes/compostos de defesa) na oviposição.

Em *E. tortuosum*, a quantidade de taninos foi em média 17,10% do peso seco da folha, chegando a representar o máximo de 29,21% (folha adulta) e um mínimo de 7,30% (folha jovem), enquanto que o conteúdo de nitrogênio, teve média de 1,77%, com um máximo de 2,25% (folha jovem) e um mínimo de 0,80% (folha adulta) do peso seco da folha. Para fins comparativos, Salatino (1993) encontrou a média de 2,1% de nitrogênio trabalhando com 11 espécies de leguminosas do Cerrado e Oki (2000) obteve teores variando entre 1,1% e 9,67%, valores relativamente bem acima daqueles encontrados para *E. tortuosum*, justificando assim o baixo valor nutricional de suas folhas.

Entretanto, na fase de desenvolvimento de insetos como minadores foliares, defesas secundárias como os compostos fenólicos podem ser ineficientes (Faeth, 1995) e o consumo seletivo de tecidos específicos pode evitar a intoxicação, melhorando o valor nutricional da folha (Cornell, 1989; Connor & Taverner, 1997). Portanto, apesar do baixo valor nutricional das folhas de *E. tortuosum* e da ausência de distinção entre folhas com maior ou menor conteúdo de taninos e nitrogênio, o minador pode maximizar sua alimentação fazendo uso das estratégias anteriormente citadas. Um estudo envolvendo qualidade nutricional de *E. tortuosum* e performance de *Evippe* sp.2 na oviposição (representada por ex. por tamanho, quantidade e qualidade de ovos), na fase larval (por ex. taxa de crescimento) e na fase adulta (por ex. tamanho), seria esclarecedor para esta questão da escolha do recurso.

Como o nível de AF, o conteúdo de nitrogênio e a concentração de taninos não diferiram entre folhas com ovos e sem ovos, outros fatores podem ser utilizados como determinantes na oviposição pela mariposa. No sistema de estudo, a avaliação do teor de água como outro componente nutricional da folha mostrou resultado interessante. Embora estudos indiquem que folhas com maior teor de água são preferidas pelos insetos herbívoros, sendo a água um fator fundamental para sua performance (Scriber & Slansky, 1981; Holton *et al.*, 2003; Coley *et al.*, 2006), os resultados aqui encontrados contrastam com a literatura, pois a oviposição foi preferencial por folhas com menor teor de água. É possível que os minadores utilizem esse fator nutricional como referência para selecionar folhas mais propícias ao desenvolvimento das lagartas. Jolivet (1998) expõe que uma mina é um abrigo com umidade e temperatura favoráveis para desenvolver um complexo de associações entre insetos, parasitas, inquilinos e fungos. Visto que nas minas foliares em *E. tortuosum* foi constatada a presença de ácaros e fungos, que em alguns casos levava à mortalidade de lagartas (Marcos N. Ishino, observação pessoal), um maior teor de água nas folhas poderia criar um meio com alta umidade, favorecendo a proliferação desses tipos de organismos na mina, o que poderia reduzir o desempenho dos minadores. Uma maior quantidade de água também poderia interferir na absorção de nutrientes da folha pelo minador, uma vez que o conteúdo nutricional baixo seria mais diluído.

Um outro argumento que poderia explicar a preferência por folhas com menor teor de água na oviposição é que o tipo de alimentação ideal da larva não seria o mesmo da mariposa adulta, que estaria selecionando um local não ideal na oviposição para o desenvolvimento da prole. Apesar de uma boa associação em geral ser comum, com as fêmeas preferindo ovipor em plantas onde sua prole poderá ter melhor desempenho (Leather & Awmack, 2002), Schoonhoven *et al.* (2005) ressaltam que o tipo de alimentação dos adultos e das larvas não é sempre idêntico, embora seja esperada uma alta similaridade na dieta. Gratton & Welter

(1998) argumentam que o conjunto da dieta da larva é freqüentemente mais amplo do que a gama de plantas aceitáveis como substrato de oviposição para a fêmea adulta. Assim, talvez a escolha de *Evippe* sp.2 seja guiada pela sua percepção de folhas mais secas das quais houve a emergência, e não tanto pelo melhor valor nutricional da folha para a larva. Estas observações podem indicar que o comportamento de seleção de hospedeiro das fêmeas adultas é governado por diferentes partes do genoma em comparação àquelas codificadas para o comportamento de seleção de alimento das larvas (Wiklund, 1975).

Outro fator que pode ser determinante na oviposição para *Evippe* sp.2 é a quantidade de recurso. Prokopy *et al.* (1983) e Roessingh *et al.* (1990) testaram o comportamento de oviposição da mosca do repolho *Delia radicum* e verificaram que o inseto conseguiu distinguir o tamanho das folhas oferecidas e preferiu as maiores para oviposição, fazendo inclusive a postura de um maior número de ovos nessas folhas. Boecklen *et al.* (1990) demonstraram que o comprimento do ramo foi um forte preditor da variação nas densidades de *Salix lasiolepis*. Wolfe (1997) observou que determinados galhadores tinham preferência de oviposição por indivíduos machos, que eram plantas maiores e, conseqüentemente, geravam galhas maiores e poderiam propiciar o aumento da sobrevivência larval pelo decréscimo nas taxas de parasitismo. Cornelissen & Stiling (2005a), utilizando-se de meta-análise, constataram que em plantas dióicas, os indivíduos machos eram preferidos pelos herbívoros, possuindo maior número de folhas, folhas maiores, poucas flores e ramos mais longos. Heisswolf *et al.* (2006) obtiveram um excepcional resultado estudando a distribuição de ovos do besouro foliar *Cassida canaliculata* em *Salvia pratensis*. Os autores encontraram uma influência positiva do tamanho, da porcentagem de cobertura e da densidade da planta hospedeira na probabilidade de encontrar grupos de ovos do besouro em três de quatro escalas espaciais estudadas, que foi explicada pelo comportamento monófago do herbívoro.

Em *E. tortuosum*, dentre várias escalas de observação possíveis, foi utilizada uma escala mais fina, representada pelo tamanho da folha. A hipótese de que os herbívoros conseguem distinguir entre os tamanhos dos locais de oviposição, considerando que um sítio maior de oviposição signifique maior quantidade de recurso para os minadores, sendo folhas maiores preferidas para a postura, foi sustentada pelos resultados do comportamento de oviposição de *Evippe* sp.2. A preferência de postura da mariposa em folhas com área do limbo maior foi mais um resultado interessante deste trabalho. Para um herbívoro especialista, de relação íntima com a planta como um minador, que não troca de folha, permanecendo na mesma mina até o final de seu ciclo reprodutivo, a escolha da folha com maior quantidade de recurso seria benéfico para o desenvolvimento da larva. Talvez também, para compensar a

baixa qualidade nutricional das folhas de *E. tortuosum*, a mariposa selecione folhas maiores para o desenvolvimento da prole.

Price (1991) propôs a hipótese do vigor da planta que prediz que insetos herbívoros alimentar-se-ão, preferencialmente, de plantas mais robustas, com maior vigor aparente, que seriam locais ideais para oviposição dos adultos e para a alimentação das larvas. Juenger *et al.* (2005) sustentaram a hipótese do vigor da planta demonstrando o potencial de uso do tamanho da planta e da data de floração como indicativos para oviposição por moscas consumidoras de semente. Os autores constataram que as moscas preferiram ovipor em plantas mais altas e que floresceram mais cedo, sugerindo assim, que essas plantas receberiam maior visitação de polinizadores e assim forneceriam recurso mais apropriado para o desenvolvimento das larvas. Entretanto, em um recente estudo, Stiling & Moon (2005) estudaram a interferência da qualidade e da quantidade da planta hospedeira *Borrchia frutescens* no galhador *Asphondylia borrichiae*, no sugador *Pissonotus quadripustulatus* e nos seus inimigos naturais. Os autores observaram que a qualidade da planta (nitrogênio) afetou significativamente a densidade dos herbívoros, não ocorrendo o mesmo para a quantidade da planta (densidade de hastes, altura das hastes, área foliar e número de folhas), concluindo que, no estudo, a qualidade foi mais importante.

Em suma, várias medidas diferentes de vigor são citadas na literatura, como altura da planta, data de floração, comprimento de ramos, tamanho do local de oviposição, entre outros, relatando sua influência na preferência por insetos herbívoros. O tamanho da folha, representado pela área foliar, mostrou grande potencial como fator para acessar a quantidade de recurso (vigor) no estudo da preferência de oviposição em *E. tortuosum*. Trabalhos relacionando qualidade nutricional da planta hospedeira, quantidade de recurso (usando como uma das medidas o tamanho da folha), preferência de oviposição e performance do inseto, podem ampliar o entendimento desse tipo de interação ecológica abundante na literatura, mas pouco estudada em vegetação de cerrado.

Para complementar as análises da relação entre nível de AF das plantas de *E. tortuosum*, área foliar e intensidade de infestação (folhas adultas sadias, AF2005) e das relações entre preferência de oviposição, qualidade nutricional e área foliar (folhas jovens com e sem postura, Ovip), foi feito o estudo da relação entre qualidade nutricional, AF e área foliar em folhas adultas sadias (AF2006), permitindo a comparação da evolução dessas características ao longo de uma geração da planta e do minador foliar. A coleta periódica de folhas minadas também foi essencial para as comparações de AF, área foliar e dano foliar (área minada) com as folhas sadias, embora para este trabalho não tenha sido avaliada a característica nutricional de folhas adultas minadas para comparações com a fase jovem de

postura. As análises para o teste da hipótese de que a AF, qualidade nutricional e área foliar estariam positivamente correlacionadas entre si, não mostraram significância para nenhuma das correlações, com exceção da comparação entre taninos e AF. Apesar de a correlação positiva encontrada entre nível de AF e conteúdo de taninos ser contrastante com a literatura, sugerindo que maior AF represente baixa qualidade nutricional, esse fato pode estar relacionado com o maior grau de AF encontrado em folhas adultas sadias em relação às folhas adultas minadas, indicando que folhas adultas sadias (não colonizadas pelos minadores) seriam piores nutricionalmente que as folhas minadas adultas (escolhidas pelos minadores). Assim, novamente se sugere que a AF possa ser usada como um indicativo de tolerância ao estresse e qualidade da planta para o minador foliar.

Quando avaliada no tempo, a área foliar, tanto para folhas sadias quanto para folhas minadas, não mostrou alteração significativa desde o pico de oviposição em novembro até meados de junho, época de minas em estágio final de desenvolvimento. Isso revela que as mariposas escolhem folhas jovens para postura que retêm um tamanho muito próximo de uma folha adulta. Esse resultado corrobora com o fato de *Evippe* sp.2 selecionar sítios de oviposição maiores. Do mesmo modo, o nível de AF não apresentou alteração significativa entre a fase jovem e adulta, tanto para folhas sadias, quanto para folhas minadas, deixando claro que a regulação do fenótipo da bilateralidade em *E. tortuosum* é constante ao longo do tempo de desenvolvimento das folhas em condições naturais. Esse fato revela a manutenção ao longo do tempo do nível de AF de uma folha, seja ele baixo ou elevado, sugerindo que os desvios da perfeita simetria aconteçam na ontogenia do caractere ou em fases muito novas de desenvolvimento do caractere (Chippindale & Palmer, 1993). Entretanto, para as comparações do dano foliar, representado pela área minada, houve diferença significativa entre as subseqüentes coletas, ocorrendo um aumento do dano ao longo do tempo, como era esperado. Essa análise mostra que o minador, desde o início da mina, causa progressivos danos na folha e, conseqüentemente para a planta, já que a área fotossintética é reduzida.

Com relação às folhas sadias, diferenças da bioquímica entre os dois estágios de desenvolvimento, folhas jovens (sem ovos da Ovip) e folhas adultas (AF2006), ocorreram como esperado. Os teores de água e nitrogênio foram maiores em folhas jovens, e o conteúdo de taninos foi mais elevado em folhas adultas de *E. tortuosum*, concordando com os relatos da literatura (Schoonhoven *et al.*, 2005; Coley *et al.*, 2006). Feeny (1970), em estudo clássico, constatou essa variação sazonal, com o valor nutricional maior de folhas jovens em relação às adultas, e observou que a maioria das espécies de insetos concentrava o seu período de alimentação em folhas mais novas. Considerando essa variação sazonal, para um herbívoro especialista sésil como o minador *Evippe* sp.2, novamente a escolha inicial do recurso é

essencial para o sucesso no seu desenvolvimento, sendo que a oviposição acontece em folhas mais jovens. Maufette & Oechel (1989) também encontraram resultados semelhantes quando estudaram a variação sazonal da bioquímica foliar em plantas de carvalho, onde o nitrogênio diminuiu com a idade e os taninos condensados aumentaram. Nesse mesmo trabalho, os autores constataram que a mariposa *Phyrganidia californica* preferia alimentar-se de folhas mais velhas em uma determinada época do ano, sugerindo que o inseto está adaptado a alimentar-se de folhas nutricionalmente pobres, e é capaz de reduzir a ação de defesas químicas como os taninos condensados. Dessa forma, apesar de *E. tortuosum* apresentar conteúdo nutricional relativamente baixo, o minador foliar obteve sucesso na interação com a planta adaptando-se à herbivoria das folhas, talvez, por alimentação compensatória. Justamente a qualidade nutricional relativamente baixa das folhas de *E. tortuosum* pode levar o herbívoro a selecionar sítios maiores de oviposição, como já comentado, indicando uma alimentação compensatória.

Durante o envelhecimento, as folhas naturalmente sofrem desidratação, perdem a turgidez, reduzem o metabolismo, têm a relação Carbono/Nitrogênio aumentada (levando à redução de nitrogênio da planta, e a maior concentração de compostos químicos à base de carbono, como os taninos), restando estruturas mais esclerificadas, como vasos condutores e paredes celulares, gerando o típico aspecto coriáceo. Assim, a queda do teor de água ao longo do tempo observada nas folhas de *E. tortuosum* acompanha essa tendência natural de desidratação. Gurevitch *et al.* (2002) afirmam que quando a planta passa pelo déficit hídrico, uma série de eventos fisiológicos são acionados, causando alterações em funções da planta: o crescimento celular e a síntese de proteínas diminuem e cessam; a alocação de substâncias entre raízes e ramos sofre um rearranjo; os estômatos começam a fechar e a fotossíntese é inibida; folhas começam a senescer, e em espécies decíduas, folhas velhas secam, morrem e disponibilizam água para que as folhas novas sejam preservadas por longos períodos na planta. Em *E. tortuosum*, esses eventos devem estar regulando essa variação na composição nutricional das folhas, sendo mais afetadas ainda com a prolongada época seca particular do Cerrado.

Os resultados sobre o estudo da relação entre herbivoria e AF ser causal não sustentaram a idéia de Møller (1995), Zvereva *et al.* (1997) e Møller & de Lope (1998). No presente trabalho, a comparação do nível de AF entre as subseqüentes coletas e da largura entre os lados minados e não-minados de folhas minadas não apresentaram diferenças significativas, mostrando que mesmo com a atividade de alimentação dos minadores, o grau de AF não aumentou com o tempo e nem o lado minado foi significativamente maior que o lado não-minado. Os trabalhos de Lempa *et al.* (2000), Bañuelos *et al.* (2004) e Cornelissen &

Stiling (2005) também não apóiam a hipótese de que os herbívoros são causadores de assimetria foliar atuando como agentes de estresse na planta. Outros fatores, como perturbações baseadas em componentes ambientais e genéticos (Møller & Swaddle, 1997) devem originar o nível de AF em *E. tortuosum*. Propomos a hipótese de que no Cerrado, a longa e bem definida época seca, a qualidade nutricional muito baixa do solo e as queimadas freqüentes, fatores de estresse que dificultam a vida para as plantas desse bioma (Marquis *et al.*, 2002), associados ao aumento do efeito de borda devido à intensa fragmentação desse habitat, podem conduzir a elevados índices de AF de suas espécies de plantas. Deve-se considerar, no entanto, que algumas delas apresentem grande tolerância ao estresse e, conseqüentemente, um nível menor de AF, idéia apoiada pelos resultados deste trabalho. O Cerrado concentra em um único bioma diversos agentes de estresse bastante estudados nos trabalhos com AF em plantas. Desse modo, este sistema de estudo, assim como inúmeros outros existentes na rica diversidade biológica do Cerrado, podem fornecer relevantes informações na avaliação de estresse, instabilidade no desenvolvimento e AF em plantas.

Dentre as análises deste trabalho, quando houve comparação entre área foliar e AF, dois resultados contrastantes foram obtidos, um para o conjunto de dados AF2005 e outro para AF2006, ambos de folhas adultas sadias. Para as folhas de AF2005, foi encontrada uma correlação positiva entre AF e área foliar, indicando que o nível de AF é mais elevado em folhas com área foliar maior. Em AF2006, entretanto, essa correlação positiva não foi encontrada. Quando foi realizada uma análise exploratória dos dados AF2005 e AF2006 juntos (apesar de não ser usual, pois se tratam de conjuntos de dados de anos diferentes) e de todos os dados de AF2005, Ovip, AF2006 e Folhas Minadas juntos, a correlação entre AF e área foliar foi mais significativa (Apêndice C). Embora tenha sido constatada essa tendência real de o nível de AF ser mais elevado em folhas maiores, isso não significa, contudo, que deva ser aplicada alguma correção para dependência do tamanho nos cálculos de AF. A regressão entre $|LD-LE|$ e $LD+LE$, como realizada neste trabalho, é usual para os testes de dependência do tamanho (Graham *et al.*, 2003), sendo lógico o fato de ser comparada a diferença entre as larguras de cada lado da folha com a largura total da folha na mesma linha de medição adotada (linha perpendicular à nervura central na porção mediana da folha). Entretanto, no caso da correlação positiva observada entre AF e área foliar, não há um significado biológico aparente, pois seria o mesmo que acessar a dependência do tamanho pela regressão entre $|LD-LE|$ e $AD+AE$, isto é, comparar a diferença entre as larguras de cada lado da folha com a área total (e não a largura total) da folha, medidas de grandezas totalmente diferentes. Se existe diferença entre as larguras dos lados de uma folha em uma dada linha de medição, por exemplo, utilizando a linha média perpendicular à nervura central,

a soma das diferenças de todas as linhas de medição existentes em uma folha, poderia ser comparável à área total, conforme a regressão entre $|AD-AE|$ e $AD+AE$. Estudos explorando as diferentes formas de medida de um mesmo caractere poderiam gerar melhor entendimento sobre essa questão.

Finalmente, quanto ao estudo do efeito de borda, uma explicação para a ausência de significância nas comparações, pode ser o tamanho reduzido da área amostral dos transectos montados (1,2 ha), que representou menos de 1% da área total do fragmento (176,7 ha). Trabalhos de maior capacidade amostral, com transectos mais longos em direção ao interior do fragmento, poderiam gerar interpretações mais precisas acerca da influência do efeito de borda no nível de estresse da planta, na sua qualidade nutricional e na intensidade de herbivoria. Além disso, a fragmentação do habitat pode levar à formação de manchas de tamanho muito reduzido, dificultando qualquer distinção entre interior e borda.

2.5 CONCLUSÕES

Em uma recente mini-revisão sobre assimetria flutuante (AF) e instabilidade no desenvolvimento (ID), Van Dongen (2006) enumera várias razões da problemática de se estudar AF, entretanto, conclui que não há outros traços morfológicos ou fisiológicos que reflitam com confiança o desempenho de uma espécie, devendo assim, a AF ser vista como um de muitos potenciais indicadores de desempenho. Van Dongen (2006) ainda discute que são necessários estudos cuidadosamente controlados visando ao melhor entendimento dos processos que governam a AF e podem ser aplicados à compreensão da ID de um organismo. Concordando com o autor, acreditamos que a AF, se observada e avaliada de modo controlado e sistemático, e comparada com outros parâmetros de forma imparcial, evitando as publicações seletivas (Palmer, 1999; Palmer, 2000), seja uma ferramenta com alto potencial nos estudos de ID. Neste trabalho, apesar de resultados contrastantes com a maioria daqueles relacionando AF e estresse da planta, constatou-se que a AF pode ser um importante indicador da tolerância ao estresse. Assim, mesmo sob estresse, plantas mais tolerantes apresentariam um menor nível de AF das folhas, sendo preferidas pelos minadores foliares. Ainda, a herbivoria provocada pelos minadores não pode ser usada como uma prerrogativa do aumento da AF das folhas. Outros fatores ambientais ou genéticos devem ser responsáveis pela AF observada em *E. tortuosum*.

Os resultados também sugerem que os minadores foliares podem utilizar o status hídrico da folha para selecionar sítios de oviposição, uma vez que folhas com menor teor de água foram preferidas. A quantidade de recurso, representada pelo tamanho da folha (área foliar), em detrimento da qualidade nutricional, pode influenciar a seleção do herbívoro, que teria preferência por sítios de oviposição maiores. Desse modo, a baixa qualidade nutricional de um hospedeiro pode ser compensada com a quantidade mais abundante do recurso.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alados, C. L., Navarro, T., Escós, J., Cabezudo, B. & Emlen, J. M. (2001) Translational and fluctuating asymmetry as tools to detect stress in stress-adapted and nonadapted plants. *International Journal of Plant Sciences*, **162**, 607–616.
- Amaral Jr., A. (1973) *O gênero Erythroxylum no município de Botucatu, São Paulo*. Tese de doutorado em Ciências – Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, Botucatu, SP.
- A.O.A.C. (1995) *Official methods of analysis of AOAC Internacional* (Cuniff, P. Z. ed.). 16 ed., v.1, cap. 3, p. 24. Arlington, Virginia.
- Awmack, C. S. & Leather, S. R. (2002) Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Annual Review of Entomology*, **47**, 817–844.
- Bañuelos, M. J., Sierra, M. & Obeso, J. R. (2004) Sex, secondary compounds and asymmetry. Effects on plant–herbivore interaction in a dioecious shrub. *Acta Oecologica*, **25**, 151–157.
- Boecklen, W. J., Price, P. W. and Mopper, S. (1990) Sex and drugs and herbivores: sex-biased herbivory in arroyo willow (*Salix lasiolepis*). *Ecology*, **71**, 581–588.
- Bultman, T. L. & Faeth, S. H. (1987) Impact of irrigation and experimental drought stress on leaf-mining insects on Emory oak. *Oikos*, **48**, 5–10.
- Chippindale, A. K., Palmer, A. R. (1993) Persistence of subtle departures from symmetry over multiple molts in individual brachyuran crabs: relevance to developmental stability. *Genetica*, **89**, 185–199.
- Clarke, G.M. (1995) Relationships between developmental stability and fitness: application for conservation biology. *Conservation Biology*, **9**, 18–24.
- Coley, P. D., Bateman, M. L. & Kursar, T. A. (2006) The effects of plant quality on caterpillar growth and defense against natural enemies. *Oikos*, **115**, 219–228.
- Connor, E. F., & Taverner, M. P. (1997) The evolution and adaptive significance of the leaf-mining habit. *Oikos*, **79**, 6–25.
- Cornelissen, T. & Stiling, P. (2005) Perfect is best: low leaf fluctuating asymmetry reduces herbivory by leaf miners. *Oecologia*, **142**, 46–56.
- Cornelissen, T. & Stiling, P. (2005a) Sex-biased herbivory: a meta-analysis of the effects of gender on plant-herbivore interactions. *Oikos*, **111**, 488–500.
- Cornelissen, T., Stiling, P. & Drake, B. (2003) Elevated CO₂ decreases leaf fluctuating asymmetry and herbivory by leaf miners on two oak species. *Global Change Biology*, **10**, 27–36.

- Cornell, H. V. (1989) Endophage–ectophage ratios and plant defense. *Evolutionary Ecology*, **3**, 64–76.
- Cronk, Q. C. B. (2005) Plant eco-devo: the potential of poplar as a model organism. *New Phytologist*, **166**, 39–48.
- DeBruyn, L., Scheirs, J. & Verhagen, R. (2002) Nutrient stress, host plant quality and herbivore performance of a leaf-mining fly on grass. *Oecologia*, **130**, 594–599.
- Domingues, M. C. S., Ono, E. O. & Rodrigues, J. D. (2001) Plant growth regulators and 'Honey' orange fruit chemical thinning. *Scientia Agricola*, **58** (3), 487–490.
- Ducher, G., Courteix, D., Meme, S., Magni, C., Viala, J.F. & Benhamou, C.L. (2005) Bone geometry in response to longterm tennis playing and its relationship with muscle volume: a quantitative magnetic resonance imaging study in tennis players. *Bone*, **37**, 457–466.
- Ehrlich, P. R. & Raven, P. H. (1964) Butterflies and plants: A study in coevolution. *Evolution*, **18**, 586–608.
- Escós, J., Alados, C. L. & Emlen, J. M. (1997) The impact of grazing on plant fractal architecture and fitness of a Mediterranean shrub *Anthyllis cytisoides* L. *Functional Ecology*, **11**, 66–78.
- Faeth, S. H. (1995) Quantitative defense theory and patterns of feeding by oak insects. *Oecologia*, **68**, 34–40.
- Feeny, P. (1970) Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars. *Ecology*, **51**, 565–581.
- Felfili, J. M. & Silva Júnior, M. C. (2001) *Biogeografia do bioma Cerrado: estudo fisionômico da Chapada do Espigão Mestre do São Francisco*. Departamento de Engenharia Florestal, Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília, Brasília.
- Fischer, K. & Fiedler, K. (2000) Response of the copper butterfly *Lycaena tityrus* to increased leaf nitrogen in natural food plants: evidence against the nitrogen limitation hypothesis. *Oecologia*, **124**, 235–241.
- Folin-Ciocalteu Index (1992) *Official Journal of the European Communities*, 178–179.
- Freeman, D. C., Brown, M. L., Duda, J. J., Graham, J. H., Emlen, J. M., Krzysik, A. J., Balbach, H., Kovacic, D. A. & Zak, J. C. (2004) Developmental instability in *Rhus Copallinum* L.: multiple stressors, years, and responses. *International Journal of Plant Sciences*, **165** (1), 53–63.
- Graham, J. H., Emlen, J. M., Freeman, D.C., Leamy, L. J. & Kieser, J. A. (1998) Directional asymmetry and the measurement of developmental instability. *Biological Journal of the Linnean Society*, **64**, 1–16.

- Graham, J.H., Shimizu, K., Emlen, J.M., Freeman, D.C. & Merkel, J. (2003) Growth model and the expected distribution of fluctuating asymmetry. *Biological Journal of the Linnean Society*, **80**, 57–65.
- Gratton, C. & Welter, S. C. (1998) Oviposition preference and larval performance of *Lyriomyza helianthi* (Diptera: Agromyzidae) on normal and novel host plants. *Environmental Entomology*, **27**, 926–935.
- Gurevitch, J., Scheiner, S. M. & Fox, G. A. (2002) *The ecology of plants*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Heinrichs, E. A. (1988) *Plant stress-insect interactions*. Wiley, New York.
- Heisswolf, A., Poethke, H. J. & Obermaier, E. (2006) Multitrophic influences on egg distribution in a specialized leaf beetle at multiple spatial scales. *Basic and Applied Ecology*, **7**, 565–576.
- Helm, B. & Albrecht, H. (2000) Human handedness causes directional asymmetry in avian wing length measurements. *Animal Behaviour*, **60**, 899–902.
- Hódar, J. A. (2002) Leaf fluctuating asymmetry of Holm oak in response to drought under contrasting climatic conditions. *Journal of Arid Environments*, **52**, 233–243.
- Holton, M. K., Lindroth, R. L. & Nordheim, E. V. (2003) Foliar quality influences tree-herbivore-parasitoid interactions: effects of elevated CO₂, O₃, and plant genotype. *Oecologia*, **137**, 233–244.
- Jolivet, P. (1998) *Interrelationship Between Insects and Plants*. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.
- Juenger, T., Morton, T. C., Miller, R. E. & Bergelson, J. (2005) Scarlet gilia resistance to insect herbivory: the effects of early season browsing, plant apparency, and phytochemistry on patterns of seed fly attack. *Evolutionary Ecology*, **19**, 79–101.
- Koricheva, J., Larsson, S. & Haukioja, E. (1998) Insect performance on experimentally stressed woody plants: a meta-analysis. *Annual Review of Entomology*, **43**, 192–216.
- Lande, R. (1977) On comparing coefficients of variation. *Systematic Zoology*, **26**, 214–217.
- Larson, S. (1989) Stressful times for the plant stress-insect performance hypothesis. *Oikos*, **56**, 277–283.
- Larsson, S. & Ekbom, B. (1995) Oviposition mistakes in herbivorous insects – confusion or a step towards a new host giant. *Oikos*, **72**(1), 155–160.
- Leather, S. R. & Awmack, C. S. (2002) Does variation in offspring size reflect strength of preference performance index in herbivorous insects? *Oikos*, **96**, 192–195.

- Lempa, K., Martel, J., Koricheva, J., Haukioja, E., Ossipov, V., Ossipova, S. & Pihlaja, K. (2000) Covariation of fluctuating asymmetry, herbivory, and chemistry during birch leaf expansion. *Oecologia*, **122**, 354–360.
- Lewis, A. C. (1984) Plant quality and grasshopper feeding: effects of sunflower condition on preference and performance in *Melanoplus differentialis*. *Ecology*, **65**, 836–843.
- Louda, S. M. & Collinge, S. K. (1992) Plant resistance to insect herbivores: a field test of the environmental stress hypothesis. *Ecology*, **73**, 153–169.
- Malavolta, E., Vitti, G. C., Oliveira, S. A. (1997) *Avaliação do Estado Nutricional das Plantas*. 2. ed. Piracicaba: Potafos.
- Marquis, R. J., Morais, H. C. & Diniz, I. R. (2002) Interactions among Cerrado plants and their herbivores: unique or typical? In: *The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna* (Oliveira, P. S. & Marquis, R. J. eds.), pp. 306–328. Columbia University Press, New York.
- Martel, J., Lempa, K., & Haukioja, E. (1999) Effects of stress and rapid growth on fluctuating asymmetry and insect damage in birch leaves. *Oikos*, **86**, 208–216.
- Mattson, W. J. & Haack, R. A. (1987) The role of drought stress in provoking outbreaks of phytophagous insects. In: *Insect outbreaks: ecological and evolutionary perspectives* (Barbosa, P. & Schultz, J. eds.), pp. 365–407. Academic, Orlando.
- Maufette, Y. & Oechel W. C. (1989) Seasonal variation in leaf chemistry of the coast live oak *Quercus agrifolia* and implications for the California oak moth *Phyrganidia californica*. *Oecologia*, **79**, 439–445.
- McClure, M. S. (1980) Foliar nitrogen: a basis for host suitability for elongate hemlock scale, *Fiorinia externa* (Homoptera: Diaspididae). *Ecology*, **61**, 72–79.
- Møller, A. P. (1995) Leaf-mining insects and fluctuating asymmetry in *Ulmus glabra* leaves. *Journal of Animal Ecology*, **64**, 697–707.
- Møller, A. P. & de Lope, F. (1998) Herbivory affects developmental instability of stone oak, *Quercus rotundifolia*. *Oikos*, **82**, 246–252.
- Møller, A. P. & Shykoff, P. (1999) Morphological developmental stability in plants: patterns and causes. *International Journal of Plant Sciences*, **160**, S135–S146.
- Møller, A. P. & Swaddle, J. P. (1997) *Asymmetry, developmental stability and evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- Mopper, S., & Simberloff, D. (1995) Differential herbivory in an oak population: the role of plant phenology and insect performance. *Ecology*, **76**, 1233–1241.

- Mopper, S., Stiling, P., Landau, K., Simberloff, D. & Van Zandt, P. (2000) Spatiotemporal variation in leafminer population structure and adaptation to individual oak trees. *Ecology*, **81**, 1577–1587.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., da Fonseca, G. A. B. & Kent, J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**, 853–858.
- Oki, Y. (2000) Herbivoria por lepidópteros em *Byrsonima intermedia* Juss. (Malpighiaceae) na ARIE Pé-de-gigante, Santa Rita do Passa Quatro SP. Dissertação de mestrado. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Painter, R. H. (1958) Resistance of plants to insects. *Annual Review of Entomology*, **3**, 267–290.
- Palmer, A. R. (1994) Fluctuating asymmetry analyses: a primer. In: *Developmental instability: its origins and evolutionary implications* (Markow, T.A., ed.), pp. 335–364. Kluwer, Dordrecht, Netherlands.
- Palmer, A. R. (1996) Waltzing with asymmetry. *Bioscience*, **46**, 518–532.
- Palmer, A. R. (1999) Detecting publication bias in meta-analyses: A case study of fluctuating asymmetry and sexual selection. *American Naturalist*, **154**, 220–233.
- Palmer, A. R. (2000) Quasireplication and the contract of error: Lessons from sex ratios, heritabilities and fluctuating asymmetry. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **31**, 441–480.
- Palmer, A. R. & Strobeck, C. (1986) Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **17**, 391–421.
- Palmer, A. R. & Strobeck, C. (2003) Fluctuating asymmetry analysis revisited. In: *Developmental Instability: Causes and Consequences* (Polak, M., ed.), pp. 279–319. Oxford University Press, Oxford.
- Price, P.W. (1991) The plant vigor hypothesis and herbivore attack. *Oikos*, **62**, 244–251.
- Prokopy, R. J., Collier, R. & Finch, S. (1983) Visual detection of host plants by cabbage root flies. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **34**, 85–89.
- Ribeiro, J. E. L.da S., Hopkins, M. J. G., Vicentini, A., Sothers, C. A., Costa, M. A. da S., Brito, J. M. de, Souza, M. A. D. de, Martins, L. H. P., Lohmann, L. G., Assunção, P. A. C. L., Pereira, E. da C., Silva, C. F. da, Mesquita, M. R. & Procópio, L. C. (1999) *Flora da reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central*. IMPA, Manaus.

- Roessingh, P. & Städler, E. (1990) Foliar form, colour and surface characteristics influence oviposition behaviour in the cabbage root fly *Delia radicum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **57**, 93–100.
- Roy, B. A. & Stanton, M. L. (1999) Asymmetry of wild mustard, *Sinapis arvensis* (Brassicaceae), in response to severe physiological stresses. *Journal of Evolutionary Biology*, **12**, 440–449.
- Sakai, K. I. & Shimamoto, Y. (1965) Developmental instability in leaves and flowers of *Nicotiana tabacum*. *Genetics*, **51**, 801–813.
- Salatino, A. (1993) Chemical ecology and the theory of oligotrophic escleromorfism. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **65**(1), 1–13.
- Schoonhoven, L. M., Van Loon, J. J. A. & Dicke, M. (2005) *Insect-Plant Biology*. 2nd edition. Oxford University Press Inc., New York.
- Scriber, J. M. & Slansky, F. J. (1981) The nutritional ecology of immature arthropods. *Annual Review of Entomology*, **26**, 183–211.
- SigmaStat (1995) Jandel Corporation, Softek, Inc., version 2.0.
- Sinclair, C. & Hoffmann, A. A. (2003) Monitoring salt stress in grapevines: are measures of plant trait variability useful? *Journal of Applied Ecology*, **40**, 928–937.
- Statistica (1993) StarSoft, Inc., version 4.2.
- Stevanato, R., Fabris S. & Momo F. (2004) New enzymatic method for the determination of total phenolic content in tea and wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 6287–6293.
- Stiling, P. & Moon, D. C. (2005) Quality or quantity: the direct and indirect effects of host plants on herbivores and their natural enemies. *Oecologia*, **142**, 413–420.
- Stiling, P. & Simberloff, D. (1989) Leaf abscission: induced defense against pests or response to damage? *Oikos*, **55**, 43–49.
- Stiling, P., Simberloff, D. & Brodbeck, B. (1991) Variation in rates of leaf abscission between plants may affect the distribution patterns of sessile insects. *Oecologia*, **88**, 367–370.
- Strauss, S. Y. & Agrawal, A. A. (1999) The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends in Ecology and Evolution*, **14**, 179–185.
- Strauss, S. Y. & Zangerl, A. R. (2002) Plant-insect interactions in terrestrial ecosystems. In: *Plant-animal interactions: an evolutionary approach* (Herrera, C.M. & Pellmyr, O., eds.), pp. 77–106. Blackwell Science Ltd., Oxford, UK.
- Van Dongen, S. (2006) Fluctuating asymmetry and developmental instability in evolutionary biology: past, present and future. *Journal of Evolutionary Biology*, **19**, 1727–1743.

- Velickovic, M. & Perisic, S. (2006) Leaf fluctuating asymmetry of common plantain as an indicator of habitat quality. *Plant Biosystems*, **140** (2), 138–145.
- Van Valen, L. (1978) The statistics of variation. *Evolutionary Theory*, **4**, 33–43.
- Wanderley, M. G. L., Shepherd, G. J. & Giulietti, A. M. (2002) *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. Volume 2. HUCITEC/ FAPESP, São Paulo, SP.
- White, T. C. R. (1984) The abundance of invertebrate herbivory in relation to the availability of nitrogen in stressed food plants. *Oecologia*, **63**, 90–105.
- Wiggins, D. A. (1997) Fluctuating asymmetry in *Colophospermum mopane* leaves and oviposition preference in an African silk moth *Imbrasia belina*. *Oikos*, **79**, 484–488.
- Wiklund, C. (1975) The evolutionary relationship between adult oviposition preferences and larval host plant range in *Papilio machaon* L. *Oecologia*, **18**, 186–197.
- Williams, A. G. & Whitam, T. G. (1986) Premature leaf abscission: an induced plant defense against gall aphids. *Ecology*, **67**, 1619–1627.
- Wolfe, L. M. (1997) Differential flower herbivory and gall formation in male and females of *Neea psychotrioides*, a dioecious tree. *Biotropica*, **29**, 169–174.
- Zar, J. H. (1999) *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Zvereva, E., Kozlov, M. & Haukioja, E. (1997) Stress responses of *Salix borealis* to pollution and defoliation. *Journal of Applied Ecology*, **34**, 1387–1396.

APÊNDICE

Apêndice A

– Modelo de planilha para avaliações fenológicas –

Fenologia de <i>Erythroxylum tortuosum</i> - Avaliação Visual Semi-quantitativa (escalas de 5%)																					
DATA: <u>07/ 09/ 2005</u>		Observações: _____																			
Fenofase \ Plantas	80	79	88	96	133	50	55	59	70	134	135	136	15	32	104	116	117	127	128	137	138
primórdios foliares	10	5	0	0	5	5	0	10	5	0	5	0	10	5	0	10	30	20	10	0	0
folhas jovens	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	60	0	0	0	0
folhas adultas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	5	0	0	0	0	0	0	0	0	60	0
folhas velhas	0	0	0	0	0	0	20	0	5	30	5	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0
botões florais	80	30	30	5	10	60	0	50	5	10	80	40	20	15	50	70	0	25	80	5	70
flores funcionais	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
frutos imaturos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
frutos maduros	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Apêndice B

– Protocolo da metodologia da quantificação de taninos –

Metodologia: Extração de Fenóis Totais e Quantificação de Taninos

Espécie vegetal: *Erythroxylum tortuosum* Mart. (Erythroxylaceae)

EXTRAÇÃO:

1. Pesar 10 mg de material seco
2. Em cada tudo adicionar 7,0 ml de acetona 70% + 3,0 ml de H₂O destilada
3. Passar no agitador de tubos para misturar bem a amostra
4. Deixar no banho ultrassônico por 20 min.
5. Levar para centrífuga por 10 min. a 4° C
6. Guardar o sobrenadante

OBS: Caso a reação não seja feita imediatamente, congelar as amostras em freezer.

REAÇÃO:

1. Adicionar em um tubo de ensaio:
 - 20 µL da amostra (sobrenadante) |
 - 150 µL do reagente de Folin-Ciocalteu } 3 ml
 - 600 µL de Na₂CO₃ 15% |
 - 2230 µL de H₂O destilada |
2. Agitar os tubos
3. Deixar em repouso por 45 min.
4. Fazer leitura em espectrofotômetro a 725 nm
5. Branco:
 - 20 µL de acetona 70% |
 - 150 µL do reagente de Folin-Ciocalteu } 3 ml
 - 600 µL de Na₂CO₃ 15% |
 - 2230 µL de H₂O destilada |

REAGENTES:

1. Carbonato de Sódio (Na_2CO_3) 15%:
 - Juntar 15 g de Na_2CO_3 em 100 ml de H_2O destilada
 - Aquecer em banho-maria, mexendo até dissolver
2. Folin-Ciocalteu:
 - Para 500 ml do reagente, juntar:
 - 375 ml de H_2O destilada
 - 50 g de Tungstato de Sódio ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)
 - 10 g de ácido fosfomolibdico
 - 25 ml H_3PO_4
 - Deixar em refluxo por 2h e resfriar
 - Diluir para 500 ml com H_2O destilada

CURVA-PADRÃO (Ácido Tânico):

1. Dissolver 25 mg de ácido tânico puríssimo em 50 ml de H_2O destilada
[] = 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ solução
2. Pipetar alíquotas conforme tabela a seguir
3. Agitar os tubos
4. Deixar em repouso por 45 min.
5. Fazer leitura em espectrofotômetro a 725 nm

Tabela de alíquotas para montagem da curva-padrão para quantificação de taninos.

Tubos	Solução Ácido Tânico (μL)	H_2O (μL)	Folin (μL)	Na_2CO_3 (μL)
Branco	0	2250	150	600
1	0,5	2249,5	150	600
2	1	2249	150	600
3	2	2248	150	600
4	3	2247	150	600
5	4	2246	150	600
6	5	2245	150	600

Apêndice C

– Análises exploratórias –

Tabela de resultados de análises de correlação entre o nível de assimetria flutuante (AF) e a área foliar para os dados AF2005 e AF2006 juntos (Grupo 1) e para os dados AF2005, Ovip, AF2006 e Folhas Minadas juntos (Grupo 2).

Conjuntos de dados	GL	<i>r</i>	<i>P</i>
Grupo 1	19	0,560	0,010*
Grupo 2	123	0,364	<0,001*

* Diferença significativa ($P < 0,05$).