



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

DIOMAR VERÇOSA

VARIAÇÃO GEOGRÁFICA E TEMPORAL DE DEFESAS EM *CROTALARIA PALLIDA*

(FABACEAE: PAPILIONOIDEAE: CROTALARIEAE)

CAMPINAS

2016

DIOMAR VERÇOSA

VARIAÇÃO GEOGRÁFICA E TEMPORAL DE DEFESAS EM *CROTALARIA PALLIDA*

(FABACEAE: PAPILIONOIDEAE: CROTALARIEAE)

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte
dos requisitos exigidos para a obtenção do título
de doutor em Biologia Vegetal

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ ROBERTO TRIGO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO
ALUNO DIOMAR VERÇOSA, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. JOSÉ ROBERTO TRIGO

CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 148184/2012-0

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

V582v Verçosa, Diomar, 1985-
Variação geográfica e temporal de defesas em *Crotalaria pallida*
(Fabaceae: Papilionoideae: Crotalarieae) / Diomar Verçosa. – Campinas, SP :
[s.n.], 2016.

Orientador: José Roberto Trigo.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. Defesa química. 2. Alcaloides. 3. *Utetheisa ornatrix*. 4. *Etiella zinckenella*.
I. Trigo, José Roberto, 1956-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto
de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Geographic and temporal variation of defenses in *Crotalaria pallida*
(Fabaceae: Papilionoideae: Crotalarieae)

Palavras-chave em inglês:

Chemical defense

Alkaloids

Utetheisa ornatrix

Etiella zinckenella

Área de concentração: Biologia Vegetal

Titulação: Doutor em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

José Roberto Trigo [Orientador]

Rodrigo Cogni

Fernando Roberto Martins

João Vasconcellos Neto

Sebastian Felipe Sendoya Echeverry

Data de defesa: 22-07-2016

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal

Campinas, 22 de julho de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Roberto Trigo

Prof. Dr. Rodrigo Cogni

Prof. Dr. Fernando Roberto Martins

Prof. Dr. João Vasconcellos Neto

Dr. Sebastian Felipe Sendoya Echeverry

A Ata de Defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao meu orientador Prof. Dr. José Roberto Trigo pela excelente orientação, amizade e ensinamentos.

À CAPES e CNPq pela concessão da bolsa.

Aos professores do Instituto de Biologia-UNICAMP que muito contribuíram com seus ensinamentos em suas disciplinas.

Aos membros da pré-banca e da banca examinadora, Prof. Dr. Rodrigo Cogni, Profa. Dra. Daniela Rodrigues, Prof. Dr. Fernando Roberto Martins, Prof. Dr. João Vasconcellos Neto, Dr. Anselmo Nogueira, Dr. Sebastian F. Sendoya Echeverry, Dra. Kamila F. Massuda Garcia, pelas correções e sugestões.

Ao pessoal do laboratório de Ecologia Química, Daniela Maria Guedes, Luis Mosquera, Milton Cordova, Fauzi El Kadri Filho, Danilo Reali, Wesley Monteiro, Rafael Abdala, e especialmente a Kamila F. Massuda Garcia e Carlos Henrique Z. Martins que me ajudaram muito no laboratório desde do início. Ao José Carlos da Silva pelo auxílio nos experimentos e manutenção das plantas na casa de vegetação e nas viagens a campo.

Ao Thiago Augusto França pela ajuda e companhia na empolgante viagem de Campinas ao Pantanal.

Aos meus pais pelo incentivo e por todo apoio que me deram ao longo dessa caminhada.

Aos amigos da república onde morei durante esse período, com os quais dividi muitos momentos de alegrias, dificuldades e trocas de ideias.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para concretização desta tese.

Muito Obrigado!!!

RESUMO

Algumas espécies de *Crotalaria* (Fabaceae: Papilionoideae: Crotalarieae) que ocorrem nos Neotrópicos apresentam duas características marcantes de defesa contra herbívoros: defesas químicas baseadas em alcaloides pirrolizidínicos (APs) e defesas extrínsecas baseadas na atração de inimigos naturais para seus nectários extraflorais (NEFs). Nos Neotrópicos espécies de *Crotalaria* geralmente são atacadas por larvas da mariposa especialista *Utetheisa ornatrix* (Erebidae: Arctiinae: Arctiini), adaptada ao consumo e sequestro de APs e muitas vezes por larvas da mariposa *Etiella zinckenella* (Pyralidae), não especializada no sequestro destes alcaloides. Ambas as espécies são predadoras de sementes verdes, sendo que *U. ornatrix* também pode se alimentar de folhas e flores. Plantas supostamente diferem na forma de resposta ao ataque de herbívoros especialistas e não especialistas, alterando os níveis de defesas químicas ou investindo em outras formas de defesas. Desta forma, diferenças na incidência dos herbívoros especialistas e não especialistas e, assim como em outros fatores bióticos e abióticos podem gerar uma grande variação nos resultados das interações entre as populações de plantas. Nesse cenário, levantamos a hipótese que populações com maior incidência relativa do herbívoro especialista *U. ornatrix* apresentariam uma menor concentração de APs do que populações com maior incidência relativa do não especialista *E. zinckenella*, enquanto que populações com uma incidência similar de ambos os herbívoros apresentariam uma concentração intermediária destas defesas. Especificamente, investigamos as seguintes questões: (1) há correlação entre defesas químicas de *C. pallida* e seus herbívoros (especialista e não especialista) no contexto geográfico e temporal? (2) *U. ornatrix* induz a produção de APs em *C. pallida*? Nós mostramos que não há correlação entre defesas químicas de *C. pallida* e seus herbívoros (especialista e não especialista) no contexto geográfico e temporal. Além disso, mostramos evidências que o herbívoro especialista não induz a produção de APs em sementes de *C. pallida*. Nós discutimos os aspectos de seis

possíveis cenários para explicar a ausência de correlação entre defesas químicas de *C. pallida* e seus herbívoros. No primeiro, sugerimos que a variação temporal na incidência dos herbívoros especialista e não especialista geraria um ambiente imprevisível tanto no tempo quanto no espaço em termos de risco de predação. No segundo, *C. pallida* estaria investindo em outras formas de defesas (p.e. NEFs) juntamente com defesas químicas, por estar sendo atacada por herbívoros com diferentes níveis de especialização. No terceiro, sugerimos que as concentrações de APs encontradas em sementes verdes de *C. pallida* não são deterrentes para *E. zinckenella* e que ela possa ser especialista. No quarto, sugerimos que como *C. pallida* é uma espécie introduzida, ela não seria coadaptada aos herbívoros nativos e, portanto, não apresentaria uma resposta induzida ao ataque por parte destes herbívoros. No quinto, a planta poderia estar respondendo ao ataque dos herbívoros, ao mesmo tempo que eles poderiam estar escolhendo as plantas de acordo com a concentração dos compostos químicos. No sexto, sugerimos que outros potenciais compostos de defesas estariam mediando as interações ou a presença de outros herbívoros.

Palavras-chave: alcaloides pirrolizidínicos, defesas químicas, *Etiella zinckenella*, *Utetheisa ornatrix*.

ABSTRACT

Some *Crotalaria* species (Fabaceae: Papilionoideae: Crotalarieae) that occur in the Neotropics show two striking characteristics of defense against herbivores: chemical defense based on pyrrolizidine alkaloids (PAs) and extrinsic defense based on attraction of natural enemies to extrafloral nectaries (EFNs). In the Neotropics *Crotalaria* species are generally attacked by larvae of the specialist moth *Utetheisa ornatrix* (Erebidae: Arctiinae: Arctiini), adapted to the consumption and sequestration of PAs and often by larvae of the moth *Etiella zinckenella* (Pyrilidae), not specialized on sequestration of these alkaloids. Both species are predators of unripe seeds, and *U. ornatrix* can also feed on leaves and flowers. Plants supposedly differ in the answer to the attack of specialist and non-specialist herbivores by altering the chemical defenses levels or investing in other forms of defenses. Thus, differences in incidence of specialist and non-specialist herbivores, as well as other biotic and abiotic factors can generate large variation in the results of interactions between the populations of plants. In this context, we hypothesized that populations with higher relative incidence of specialist *U. ornatrix* would have lower concentration of PAs than populations with higher relative incidence of non-specialist *E. zinckenella*, while populations with incidence similar of both herbivores would have intermediary concentration. Specifically, we investigated the follows questions: (1) Is there correlation between chemical defense of *C. pallida* and its herbivores (specialist and non-specialist) on geographic and temporal context? (2) *U. ornatrix* induces the production of PAs in *C. pallida*? We show that there is no correlation between chemical defense of *C. pallida* and its herbivores (specialist and non-specialist) on geographic and temporal context. Besides, we show evidence that the specialist herbivore does not induce the production of PAs in seeds of *C. pallida*. We discussed aspects of six possible scenarios to explain the absence of correlation between chemical defense of *C. pallida* and its herbivores. First, we suggest that the temporal variation on the

incidence specialist and non-specialist herbivores would create an unpredictable environment in both time and space in terms of predation risk. Second, *C. pallida* would be investing in other forms of defenses (e.g. EFNs) along with chemical defense, for being attacked by herbivores with different levels of specialization. Third, we suggest that PAs concentrations found in unripe pods of *C. pallida* are not deterrents for *E. zinckenella* and it can be a specialist. Fourth, we suggest that as *C. pallida* is an introduced species, it would not be coadapted to native herbivores and thus does not show induced response to the attack by these herbivores. Fifth, the plant could be responding to herbivore, while they could be selecting plants to accord to concentration of chemical compounds. Sixth, we suggest that other potential compounds defenses would mediate interactions or the presence of other herbivores.

Keywords: pyrrolizidine alkaloids, chemical defenses, *Etiella zinckenella*, *Utetheisa ornatrix*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Distribuição das vinte populações de *Crotalaria pallida* amostradas em dois períodos (janeiro e maio) nos estados do Paraná, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Rio de Janeiro. Os pontos azuis representam as três populações que foram amostradas inicialmente ao longo de um ano; posteriormente estas populações também foram amostradas em dois períodos. 26
- Figura 2. Fisionomia das áreas amostradas de *Crotalaria pallida*. Esta espécie geralmente cresce em campos abandonados cobertos de gramíneas. 28
- Figura 3. Indivíduo adulto de *Crotalaria pallida*, com flores e frutos (A). Estrutura química de seu principal alcaloide pirrolizidínico na forma *N*-óxido, a usaramina (B). Nectário extrafloral localizado na base do pedicelo, com gota de néctar secretado (C). 31
- Figura 4. Ovos agrupados (A), uma larva (B) e um adulto da mariposa *Utetheisa ornatrix* (C); um ovo (D), uma larva (E) e um adulto da mariposa *Etiella zinckenella* (F). 34
- Figura 5. Perfuração realizada por larva de *Utetheisa ornatrix* para entrar na vagem (A) e perfuração realizada por larva de *Etiella zinckenella* para sair da vagem (B) de *Crotalaria pallida*. 38
- Figura 6. Mecanismo das reações de Polonovsky e Ehrlich com alcaloides pirrolizidínicos resultando na formação do cromóforo. 41

Figura 7. Presença das fenofases: flores (branco), frutos verdes (preto) e frutos maduros (linha inclinada) (A) ao longo do ciclo de vida de *Crotalaria pallida*. Percentagem de vagens predadas por *Utetheisa ornatrix* (vermelho) e *Etiella zinckenella* (verde) ou ambos (azul) na população de *Crotalaria pallida* de Iperó (B), Martinho Prado (C) e Village (D) ao longo de um ano.

Populações e períodos marcados com zero, representam que não foram encontrados herbívoros nas plantas. Não foram encontrados indivíduos de *C. pallida* nos períodos marcados com “x”. Os dados estão expressos em mediana e amplitude interquartil. Os pontos representam os “outliers”.

..... 50

Figura 8. Concentração de alcaloides pirrolizidínicos em três populações de *Crotalaria pallida*, ao longo de oito períodos nas populações de Iperó (A), Martinho Prado (B), e Village (C). Não foram encontrados indivíduos de *Crotalaria pallida* nos períodos onde não há barras. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão (número amostral = 10). 54

Figura 9. Correlação entre a percentagem de vagens predadas por *Utetheisa ornatrix* (vermelho) e *Etiella zinckenella* (verde) ou ambos (azul) e a concentração média de alcaloides pirrolizidínicos das sementes verdes de *Crotalaria pallida* das 20 populações em janeiro (coluna da esquerda) e 16 em maio (coluna da direita) de 2014. 57

Figura 10. Percentagem de vagens predadas por *Utetheisa ornatrix* (vermelho) e *Etiella zinckenella* (verde) ou ambos (azul) nos meses de janeiro e maio nas 20 populações amostradas em 2014. 60

Figura 11. Percentagem de vagens predadas por *Utetheisa ornatatrix* (vermelho) e *Etiella zinckenella* (verde) ou ambos (azul) nas 20 populações de *Crotalaria pallida* em janeiro e maio de 2014. Não foram encontrados indivíduos em maio nas populações marcadas com “x”. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão. 61

Figura 12. Concentração de alcaloides pirrolizidínicos em 20 populações de *Crotalaria pallida* em janeiro (branco) e maio (preto) de 2014. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão (número amostral = 20). 63

Figura 13. Concentração de alcaloides pirrolizidínicos em vagens intactas e atacadas por larvas de *Utetheisa ornatatrix* no mesmo indivíduo (n = 28) e vagens dos indivíduos controle (n = 30). Os dados estão expressos em média \pm erro padrão. Letras diferentes acima de cada barra representam diferenças significativas ($P < 0,05$). 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Localização das vinte populações de <i>Crotalaria pallida</i> amostradas, nos estados do Paraná, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Rio de Janeiro.	27
Tabela 2. Resultado do teste de log-verossimilhança do tipo 1 para percentagem de vagens predadas por tipo de herbívoro, nos períodos de janeiro a fevereiro, março a abril e maio a junho em três populações de <i>Crotalaria pallida</i>	49
Tabela 3. Resultado da ANOVA de dois fatores para concentração de alcaloides pirrolizidínicos ($\mu\text{g/g}$ de peso seco da semente) em três populações de <i>Crotalaria pallida</i> , nos períodos de janeiro a fevereiro, março a abril e maio a junho. Para a análise, os dados foram transformados para \ln	53

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
MATERIAIS E MÉTODOS	25
1. Áreas de estudo.....	25
2. Organismos estudados	29
3. Interações entre <i>Crotalaria pallida</i> e seus herbívoros no contexto geográfico e temporal	35
3.1. Variação geográfica e temporal da percentagem de vagens predadas.....	35
3.2. Variação geográfica e temporal da concentração de alcaloides pirrolizidínicos	39
4. Há correlação entre defesas químicas de <i>Crotalaria pallida</i> e seus herbívoros (especialista e não especialista) no contexto geográfico e temporal?	42
5. <i>Utetheisa ornatrrix</i> induz a produção de alcaloides pirrolizidínicos em <i>Crotalaria pallida</i> ?	44
RESULTADOS	47
1. Interações entre <i>Crotalaria pallida</i> e seus herbívoros no contexto geográfico e temporal.....	47
1.1. Fenologia	47
1.2. Variação geográfica e temporal da percentagem de vagens predadas.....	47
1.3. Variação geográfica e temporal da concentração de alcaloides pirrolizidínicos	52
2. Há correlação entre defesas químicas de <i>Crotalaria pallida</i> e seus herbívoros (especialista e não especialista) no contexto geográfico e temporal?	56
3. <i>Utetheisa ornatrrix</i> induz a produção de alcaloides pirrolizidínicos em <i>Crotalaria pallida</i>	65

DISCUSSÃO	67
1. Interações entre <i>Crotalaria pallida</i> e seus herbívoros no contexto geográfico e temporal ..	67
2. Há correlação entre defesas químicas de <i>Crotalaria pallida</i> e seus herbívoros (especialista e não especialista) no contexto geográfico e temporal?	70
3. <i>Utetheisa ornatatrix</i> induz a produção de alcaloides pirrolizidínicos em <i>Crotalaria pallida</i> ?	78
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80
REFERÊNCIAS	81

INTRODUÇÃO

Plantas e insetos são reconhecidos como grupos com alta diversidade de espécies (Schoonhoven et al. 2005). Uma das principais causas da alta diversidade das plantas é a pressão seletiva imposta pelos insetos herbívoros, os quais consomem grande parte da biomassa vegetal em comunidades naturais; este consumo impacta enormemente a aptidão das plantas (Coley et al. 1985; Rausher 2001). Para evitar ou reduzir a perda de biomassa, plantas desenvolveram, ao longo do tempo evolutivo, diversas estratégias de defesas, tais como produção de compostos tóxicos e/ou deterrentes e barreiras físicas, como dureza foliar, espinhos e tricomas (Walters 2011), nomeadas como defesas diretas ou intrínsecas (Price 1986; Dicke & Sabelis 1988). Como resposta às defesas químicas, os insetos herbívoros desenvolveram uma ampla variedade de adaptações fisiológicas, morfológicas e comportamentais (Rausher 2001), que incluem evitar a ingestão, excretar, destoxificar ou sequestrar toxinas das plantas (Després et al. 2007). Um bom exemplo é o estudo de Berenbaum & Zangerl (1998) sobre a interação entre a planta hospedeira *Pastinaca sativa* (Apiaceae) e a mariposa *Depressaria pastinacella* (Oecophoridae). Neste caso a planta produz compostos químicos defensivos (furanocumarinas) e a mariposa responde com um mecanismo de destoxificação desses compostos, por meio do sistema enzimático do citocromo P450. Ao longo do tempo evolutivo, muitos herbívoros tornaram-se especializados em alguns grupos de plantas com compostos químicos similares, chegando ao ponto de não serem afetados negativamente por essas substâncias, conseguindo sequestrá-las e utilizá-las em sua própria defesa (Opitz & Müller 2009; Trigo 2011). Por exemplo, alcaloides pirrolizidínicos (APs) são compostos deterrentes ou tóxicos para vários herbívoros polípagos generalistas (Narberhaus et al. 2005; Trigo 2011; Wei et al. 2015). No

entanto, são sequestrados por herbívoros especialistas (sejam eles monófagos, oligófagos ou polífagos), armazenados nos tecidos em uma forma não tóxica (Hartmann 2004; Trigo 2011) e utilizados contra diversos predadores, ao longo dos seus ciclos de vida (Eisner & Meinwald 1995; Trigo 2011; Martins et al. 2015).

Outra forma de defesa encontrada em plantas é a atração de inimigos naturais dos herbívoros (por exemplo, formigas e vespas predadoras), por meio da produção de compostos nutritivos (açúcares e aminoácidos), em nectários extraflorais (NEFs) (Heil & McKey 2003; Heil 2015). Este tipo de defesa é nomeado como defesa indireta ou extrínseca (Price 1986; Dicke & Sabelis 1988). Os NEFs são estruturas secretoras, não envolvidas na polinização e que podem ser encontradas em todas as estruturas vegetativas ou reprodutivas (Koptur 1992). Geralmente as formigas são os principais visitantes dos NEFs. As formigas, ao visitarem os NEFs, na maioria das vezes, atacam os insetos herbívoros, predando ou expulsando-os da planta, diminuindo os danos por herbivoria e, conseqüentemente, aumentando a aptidão da planta (Heil & McKey 2003; Rosumek et al. 2009). Contudo, os benefícios desta associação são dependentes da abundância e agressividade das formigas presentes (Rudgers & Strauss 2004; Sendoya et al. 2009), de modo que variação na abundância e composição das espécies de formigas na comunidade pode afetar o resultado da interação (Heil & McKey 2003; Heil 2015).

Dentro desse cenário, a abundância e composição de espécies de herbívoros podem variar espacialmente e temporalmente em resposta a qualidade da planta em termos de nutrição e composição de compostos defensivos (Shoornhoven et al. 2005). Herbívoros podem estar presentes em alta densidade em algumas localidades e ausentes em outras. Além disso, o nível de especialização do herbívoro em relação à planta hospedeira pode atuar como um fator determinante no tipo de resposta da planta contra o ataque de

herbívoros e no rumo dos processos coevolutivos. Os níveis de especialização dos herbívoros são geralmente determinados com base na amplitude de espécies ou grupos de plantas que compõem a dieta. Insetos herbívoros que se alimentam de uma única espécie ou um único gênero de planta hospedeira são considerados monófagos, aqueles que se alimentam de uma família ou subfamília são oligófagos, e aqueles que usam um amplo espectro de plantas hospedeiras, geralmente pertencentes a diferentes famílias são polífagos (Bernays & Chapman 1994). De maneira geral, insetos polífagos são definidos como generalistas, enquanto que oligófagos e monófagos são definidos como especialistas (Bernays & Chapman 1994). Ali & Agrawal (2012) definem especialistas como insetos adaptados à química defensiva de sua planta hospedeira, destoxificando eficientemente e muitas vezes sequestrando os compostos defensivos em seu próprio benefício, enquanto que generalistas como não adaptados a defesa química da planta, sendo afetados negativamente por estes. Neste estudo seguiremos esta última definição, a qual também leva em conta que herbívoros polífagos podem ser especializados na química defensiva de suas plantas hospedeiras, como no caso de larvas de mariposas arctiíneas *Grammia geneura* e *Estigmene acrea*, que embora se alimentem de uma variedade de plantas hospedeiras, são especializadas em alcaloides pirrolizidínicos ou iridoides glicosilados (Singer 2008). Tomando a dicotomia especialista-generalista como um paradigma, vários autores postularam que o impacto das defesas das plantas sobre herbívoros generalistas ou especialistas é diferente (Van der Meijden 1996; Lankau 2007; Ali & Agrawal 2012): os herbívoros generalistas têm sua aptidão negativamente afetada pelos compostos de defesas das plantas e contrariamente os especialistas são atraídos por estes e não são negativamente afetados pelos mesmos. Consequentemente, os herbívoros generalistas e especialistas exerceriam pressões seletivas diferentes, muitas vezes antagônicas, sobre as estratégias de

defesas das plantas (Van der Meijden 1996; Lankau 2007). Plantas estariam, portanto, diante de um dilema evolutivo entre se defender quimicamente do ataque de herbívoros generalistas e fornecer esses mesmos compostos para herbívoros especialistas, para os quais essas defesas são inócuas (Van der Meijden 1996; Lankau 2007). A partir deste cenário, alguns autores levantaram a hipótese que plantas induzem compostos químicos defensivos diferencialmente frente ao ataque de herbívoros generalistas e especialistas (Van Zandt & Agrawal 2004; Zong & Wang 2007; Mooney et al. 2009; Volf et al. 2015). Esta hipótese tem como base a premissa que herbívoros generalistas seriam mais afetados pelas defesas químicas do que especialistas, assim, a intensidade da resposta induzida da planta seria mais forte diante do ataque do herbívoro generalista do que o especialista (Van Zandt & Agrawal 2004; Mooney et al. 2009; Volf et al. 2015). Por exemplo, Zong & Wang (2007) demonstraram que ambos, o especialista *Helicoverpa assulta* (Noctuidae) e o generalista *Helicoverpa armigera* (Noctuidae), induziram respostas similares em *Nicotinana tabacum* (Solanaceae), porém, a intensidade da resposta da planta foi maior contra o generalista do que o especialista. Lankau (2007) estudou em *Brassica nigra* (Brassicaceae) o efeito de um herbívoro especialista, o afídeo *Brevicoryne brassicae* (Aphididae) e de um herbívoro generalista, a lesma *Agriliomax reticulatus* (Agriolimacidae) na seleção do composto defensivo sinigrina. Ele verificou que na presença do herbívoro generalista a seleção favoreceu o aumento na concentração de sinigrina e na presença do especialista a concentração não mudou, demonstrando que somente o herbívoro generalista teve um efeito indutivo sobre essa defesa. Zangerl & Berenbaum (2005) também relataram que a ausência do herbívoro especialista, a mariposa *Depressaria pastinacella* (Oecophoridae), favorece seleção para alto nível de furanocumarinas, compostos defensivos da planta hospedeira *Pastinaca sativa* (Apiaceae). Por outro lado, poderia também não haver

indução de compostos defensivos por ocasião do ataque de especialistas, e sim, investimento em outras estratégias de defesas. Arab & Trigo (2011) demonstraram que quando atacada por larvas da borboleta especialista *Placidina euryanassa* (Danainae: Ithomiini), a planta hospedeira *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae) diminui a concentração do alcaloide defensivo escopolamina e investe em crescimento. Esses autores sugerem que investir em compostos defensivos frente ao um herbívoro especialista que sequestra e utiliza-os em sua própria defesa pode representar um custo para a planta, ao invés de benefício. Portanto o balanço de indução de defesas frente aos dois tipos de herbívoros pode ser determinante para entender o rumo da evolução das características defensivas das plantas.

Populações de espécies de plantas, que apresentam ampla área de ocorrência, estão expostas a diferentes pressões seletivas bióticas (p.e. competidores, predadores, parasitas e mutualistas) e abióticas (p.e. solo, pluviosidade e temperatura). Consequentemente, é provável que os resultados das interações variem geograficamente (Thompson 2005). Desse modo, o estudo de variação geográfica nos resultados das interações é considerado um componente essencial para entender como ocorrem os processos coevolutivos (Thompson 2005). Por exemplo, Toju & Sota (2006) estudaram a interação entre a planta *Camellia japonica* (Theaceae) e o seu predador de sementes, o besouro curculionídeo *Curculio camelliae*; eles demonstraram que a seleção dos caracteres, espessura do pericarpo do fruto de camélia e o comprimento do rostro do besouro, variam geograficamente.

Levando-se em conta os tipos de herbívoros que as atacam e sua ampla distribuição, leguminosas do gênero *Crotalaria* (Papilionoideae: Crotalarieae) oferecem uma ótima oportunidade para o estudo de estratégias de defesa contra diferentes herbívoros e da variação geográfica destas defesas. Este gênero apresenta compostos defensivos como

alcaloides pirrolizidínicos (APs) (Flores et al. 2009; Martins et al. 2015) e várias espécies apresentam defesas extrínsecas baseadas na atração de predadores (como formigas e vespas) para seus NEFs (Ferro et al. 2006; Guimarães et al. 2006; Franco & Cogni 2013; Pereira & Trigo 2013). Espécies de *Crotalaria* são atacadas pela mariposa monófaga *Utetheisa ornatrix* (Erebidae: Arctiinae) e a mariposa oligófaga *Etiella zinckenella* (Pyralidae), a qual se alimenta exclusivamente de espécies de Fabaceae (Whalley 1973). No Brasil, ocorrem 42 espécies de *Crotalaria*, sendo 31 espécies nativas e 11 introduzidas (Flores 2004). Dentre essas, *C. pallida* destaca-se por apresentar ampla distribuição, ocorrendo na maior parte do território, geralmente em locais perturbados, por exemplo, em terrenos baldios, beiras de estrada e em pastagens, convivendo com gramíneas (Flores 2004). Esta espécie é considerada por alguns autores como originária da África (Flores et al. 2006; le Roux 2011), embora sua distribuição Pantropical e rápida naturalização obscureça sua origem biogeográfica (Polhill 1982).

Utetheisa ornatrix se alimenta somente do gênero *Crotalaria*, utilizando folhas e sementes verdes dentro da vagem (Ferro et al. 2006). A larva sequestra APs de folhas ou sementes verdes e esses alcaloides protegem todos os estágios de desenvolvimento da mariposa (Eisner & Meinwald 1995; Martins et al. 2015). Além disso, os machos utilizam esses compostos como precursores na produção de feromônios sexuais (Eisner & Meinwald 1995). Em contrapartida, *E. zinckenella* é oligófaga, alimenta-se de sementes verdes de plantas de diversos gêneros de Fabaceae, incluindo algumas espécies de *Crotalaria* (Whalley 1973; Segarra-Carmona & Barbosa 1988). Esta espécie não sequestra APs (Eisner 2003), e usa várias espécies de Fabaceae que não apresentam este alcaloide. Espécies de Fabaceae apresentam uma ampla variedade de compostos, tais como: alcaloides, aminoácidos não proteicos, aminas, flavonoides, isoflavonoides, cumarinas,

fenilpropanoides, antraquinonas, di-, sesqui- e triterpenos, glicosídeos cianogênicos, inibidores de proteases e lectinas (Wink & Mohamed 2003). Portanto, nós assumimos que ela não é especializada no consumo de APs. Como não sabemos o status de *E. zinckenella* em termos de nível de especialização (generalista-especialista), neste estudo, nós a tratamos como um herbívoro não especialista em APs, em comparação ao especialista em APs *U. ornatix*.

Muitos estudos nesse sistema abordaram a interação entre o herbívoro especialista *U. ornatix* e sua principal planta hospedeira *C. pallida*. Ferro et al. (2006) observaram que ao se alimentarem dentro das vagens, as larvas estariam protegidas contra predadores como formigas ao mesmo tempo que sequestravam altas concentrações de APs que protegeriam os adultos. Martins et al. (2015) demonstraram que a concentração de APs da planta hospedeira, da qual a larva se alimenta, afeta o nível de proteção de adultos de *U. ornatix* na defesa contra predadores; se alimentado de plantas hospedeiras com alta concentração de APs conferiam uma proteção mais eficiente contra a aranha *Nephila clavipes*. Guimarães et al. (2006) demonstraram que os NEFs em *C. pallida* representam um mecanismo de proteção efetivo contra o ataque do herbívoro especialista *U. ornatix*. Estudos mais recentes neste sistema mostraram que o herbívoro especialista *U. ornatix* não é afetado negativamente pela concentração de APs, e o sequestro desses compostos não representa um custo (Cogni et al. 2012); inclusive as larvas preferem dietas com alta concentração do alcaloide (Hoina et al. 2012). O fato de não ser afetada pelos APs, além de se beneficiar destes, faz de *U. ornatix* um potencial agente de seleção para baixos níveis de compostos químicos defensivos em populações de sua planta hospedeira. A presença de outro herbívoro, *E. zinckenella*, que até o dado momento não teve seu efeito explorado nesse sistema, pode ser um determinante nos resultados das interações. Plantas diante de

herbívoros com diferentes níveis de especialização podem diferenciar nas estratégias de defesas.

A partir do cenário envolvendo a interação *C. pallida* e seus herbívoros e com base no estudo de Van der Meijden (1996), levantamos a hipótese que populações com maior incidência relativa do herbívoro especialista *U. ornatrix* apresentariam uma menor concentração de APs do que populações com maior incidência relativa do não especialista *E. zinckenella*, enquanto que populações com uma incidência similar de ambos os herbívoros apresentariam uma concentração intermediária destas defesas.

Para testar essa hipótese, inicialmente acompanhamos as interações entre defesas químicas de *C. pallida* e seus dois herbívoros, em três populações e ao longo de um ano (variação temporal). Este acompanhamento temporal exploratório nos permitiu escolher dois períodos no ano onde nestas populações o herbívoro não especialista era o mais abundante e o outro onde o herbívoro especialista era o mais abundante. Usando estes períodos, testamos a hipótese descrita acima, usando 20 populações de *C. pallida* distribuídas ao longo do Sudeste, Sul e Centro-Oeste do Brasil. Com essa abordagem no contexto temporal podemos verificar dentro de uma única geração se a planta apresentaria uma resposta plástica frente aos seus herbívoros. Especificamente investigamos as seguintes questões: (1) Há correlação entre defesas químicas de *Crotalaria pallida* e seus herbívoros (especialista e não especialista) no contexto geográfico e temporal? (2) *Utetheisa ornatrix* induz a produção de alcaloides pirrolizidínicos em *C. pallida*? Previmos que *C. pallida* não aumentaria a concentração de APs em suas sementes quando predada por *U. ornatrix*, desde que esses compostos não são efetivos para deter esse herbívoro especialista, o qual não é afetado negativamente por estes alcaloides.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Áreas de estudo

Este estudo foi conduzido em 20 localidades no Sudeste, Sul e Centro-Oeste do Brasil, nos estados do Paraná, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Rio de Janeiro (Figura 1, Tabela 1). Estas áreas foram escolhidas de acordo com a ocorrência de *C. pallida*, segundo os dados disponíveis no Species Link (<http://www.splink.org.br/>). As áreas apresentam fisionomia similar, caracterizadas pela presença predominantemente de gramíneas do gênero *Brachiaria* (Poaceae) (Figura 2).

As criações dos organismos, assim como as extrações e análises químicas foram realizadas no Laboratório de Ecologia Química, Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas, SP, Brasil. Conduzimos um experimento de indução de defesas por herbívoros em uma casa de vegetação, localizada próxima ao Departamento de Biologia Animal (22°49'15,38"S, 47° 04'8,87"W).

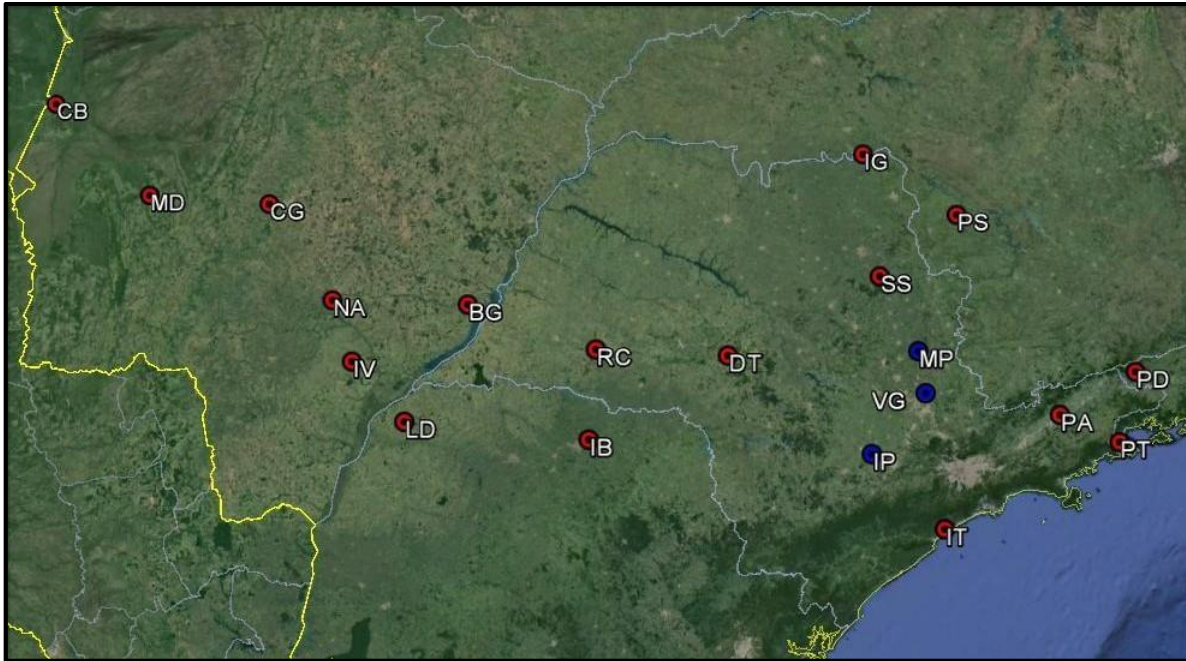


Figura 1. Distribuição das vinte populações de *Crotalaria pallida* amostradas em dois períodos (janeiro e maio) nos estados do Paraná, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Rio de Janeiro. Os pontos azuis representam as três populações que foram amostradas inicialmente ao longo de um ano; posteriormente estas populações também foram amostradas em dois períodos.

Tabela 1. Localização das vinte populações de *Crotalaria pallida* amostradas, nos estados do Paraná, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Rio de Janeiro.

Localidade, Estado	Abreviação	Latitude	Longitude
Bataguassu, MS	BG	21°43'50,49"S	52°25'58,24"O
Campo Grande, MS	CG	20°28'9,64"S	54°50'25,46"O
Corumbá, MS	CB	19°1'30,23"S	57°37'6,80"O
Duartina, SP	DT	22°20'50,48"S	49°22'51,92"O
Ibiporã, PR	IB	23°14'41,40"S	51°1'16,19"O
Igarapava, SP	IG	20°3'34,27"S	47°44'24,34"O
Iperó, SP	IP	23°24'43,93"S	47°42'34,95"O
Itanhaém, SP	IT	24°12'25,69"S	46°51'22,87"O
Ivinhema, MS	IV	22°18'49,44"S	53°49'2,24"O
Loanda, PR	LD	22°59'55,92"S	53°11'33,25"O
Martinho Prado, SP	MP	22°17'7,17"S	47°8'21,36"O
Miranda, MS	MD	20°15'27,94"S	56°20'50,17"O
Nova Alvorada do Sul, MS	NA	21°37'7,31"S	54°3'16,13"O
Paraty, RJ	PT	23°13'28,43"S	44°44'0,57"O
Passos, MG	PS	20°44'19,28"S	46°38'25,47"O
Penedo, RJ	PD	22°26'38,05"S	44°30'54,62"O
Pindamonhangaba, SP	PA	22°56'56,11"S	45°27'18,60"O
Rancharia, SP	RC	22°15'51,78"S	50°55'32,97"O
São Simão, SP	SS	21°27'28,76"S	47°34'37,59"O
Village, Campinas, SP	VG	22°44'41,22"S	47°3'42,29"O



Figura 2. Fisionomia das áreas amostradas de *Crotalaria pallida*. Esta espécie geralmente cresce em campos abandonados cobertos de gramíneas.

2. Organismos estudados

O gênero *Crotalaria* (Fabaceae: Papilionoideae: Crotalarieae) compreende aproximadamente 702 espécies, que ocorrem, principalmente, nos trópicos e subtrópicos, sendo que a África apresenta a maior riqueza de espécies (Polhill 1982; le Roux et al. 2013). No Brasil, ocorrem 42 espécies, sendo 31 nativas e 11 introduzidas (Flores 2004). Dentre estas, *C. pallida* (Figura 3A) apresenta uma ampla distribuição, ocorre em quase todo território, em locais perturbados, como por exemplo, em terrenos baldios, beiras de estrada e em pastagens, coocorrendo muitas vezes com gramíneas do gênero *Brachiaria* (Poaceae) (Flores 2004). *Crotalaria pallida* é uma planta herbácea ou arbustiva, anual, com a altura variando de 0,6 a 1,5 m de altura e apresenta distribuição Pantropical; a sua origem biogeográfica é obscurecida por sua ampla distribuição e rápida naturalização (Polhill 1982). Alguns autores consideram *C. pallida* como nativa da África (Flores et al. 2006; le Roux 2011); Cogni & Futuyma (2009) sugerem que esta espécie foi introduzida nos Neotrópicos por ocasião do tráfico de escravos entre os séculos 16 e 19. Além disso, suportando a origem africana McKee & Enlow (1931) reportam a introdução dessa espécie na Flórida em 1909 a partir da África Oriental. *Crotalaria pallida* é uma espécie com alto potencial invasivo nos biomas brasileiros, sendo considerada praga de pastagens (Fonseca et al. 2006). Esta espécie possui defesas químicas baseadas em APs, apresentando como alcaloide majoritário a usaramina (Flores et al. 2009); os APs estão presentes sempre na forma *N*-óxido (Martins et al. 2015) (Figura 3B). Esta espécie apresenta também defesas extrínsecas baseadas na atração de predadores como formigas e vespas predadoras para seus NEFs (Figura 3C) (Ferro et al. 2006; Guimarães et al. 2006; Franco & Cogni 2013), que estão localizados na base do pedicelo da flor (Edna Scremin Dias comunicação pessoal), como descrito por Díaz-Castelazo et al. (2005) para *C. incana*. Ramos com flores

e frutos de um espécime de *C. pallida* foram coletados, herborizados, identificados pela Dra. Andréia Silva Flores, Pesquisadora Botânica do Museu Integrado de Roraima, Boa Vista, Roraima, e depositados no herbário UEC da UNICAMP com o número de registro UEC106133.

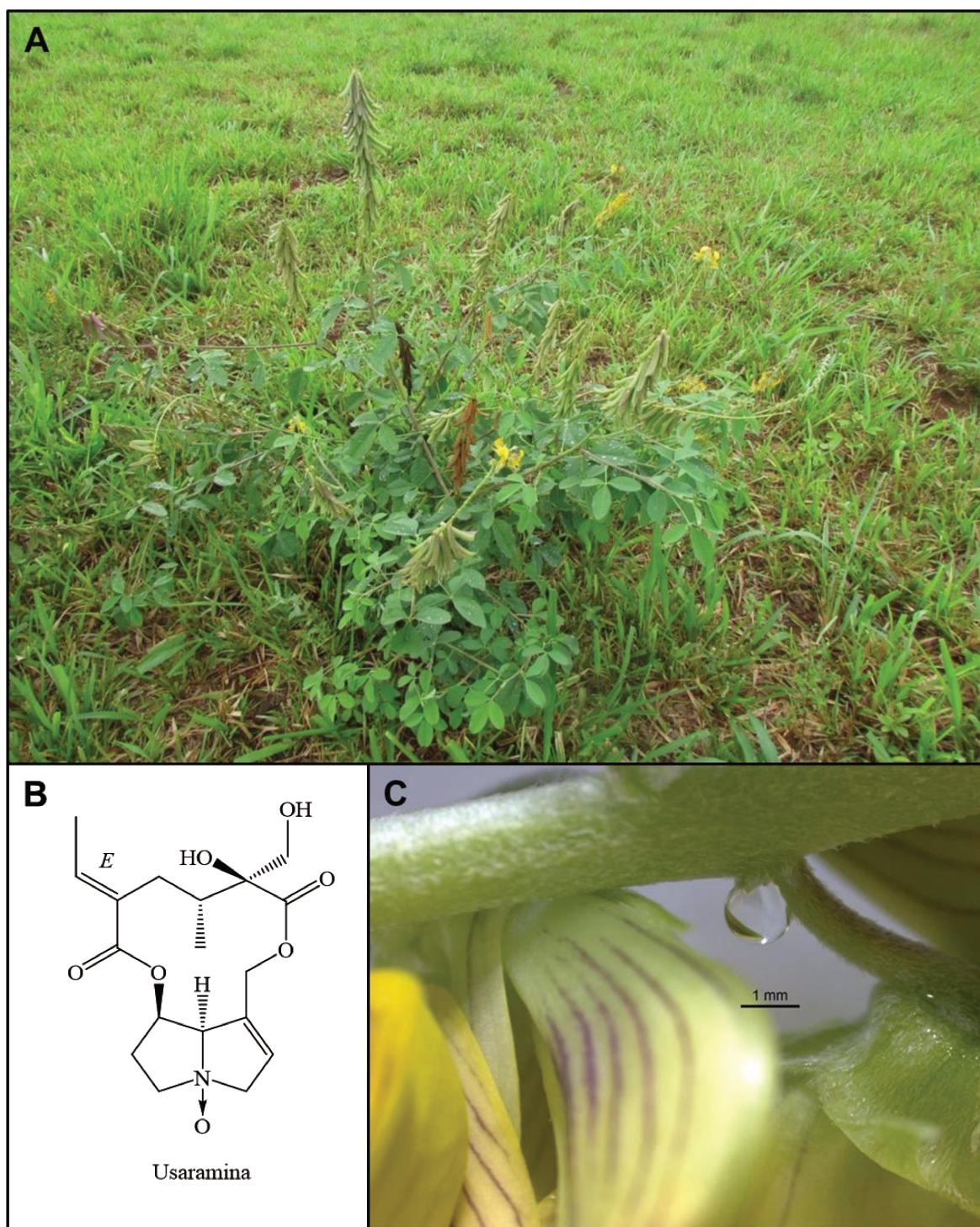


Figura 3. Indivíduo adulto de *Crotalaria pallida*, com flores e frutos (A). Estrutura química de seu principal alcaloide pirrolizidínico na forma *N*-óxido, a usaramina (B). Nectário extrafloral localizado na base do pedicelo, com gota de néctar secretado (C).

Geralmente, espécies do gênero *Crotalaria* são atacadas por larvas da mariposa especialista, *Utetheisa ornatrix* (Erebidae: Arctiinae) e da não especialista *Etiella zinckenella* (Pyralidae) (Figura 4). *Utetheisa ornatrix* é uma mariposa neotropical com hábito diurno, cujas larvas são monófagas, se alimentando de diferentes espécies do gênero *Crotalaria* (Eisner & Meinwald 1995; Conner 2009; Martins et al. 2015; Sourakov 2015). As fêmeas colocam seus ovos agrupados nas folhas. Quando as larvas eclodem, elas alimentam-se de folhas nos primeiros instares e depois perfuram a vagem, para alimentarem-se de sementes verdes (Ferro et al. 2006); se vagens muito novas estão disponíveis, a larva consegue penetrá-las ainda no primeiro instar (J.R. Trigo, comunicação pessoal). A larva perfura e consome, em média, três vagens de *C. pallida*, até atingir a fase adulta (D. Verçosa dados não publicados). Durante o estágio larval, os principais inimigos naturais são formigas e vespas, as quais são atraídas pelos NEFs (Guimarães et al. 2006; Pereira & Trigo 2013). Tanto as sementes quanto as folhas possuem APs, que são sequestrados pelas larvas e utilizados como compostos defensivos e precursores de feromônios sexuais (Eisner & Meinwald 1995; Martins et al. 2015). Larvas também são parasitoidadas por moscas taquíneas (Iyengar et al. 1999), vespas chalcidídeas, icneumonídeas e braconídeas (Rossini et al. 2000; Eisner 2003; J.R. Trigo comunicação pessoal).

Etiella zinckenella é uma mariposa de hábito noturno, com distribuição cosmopolita, cujas larvas são oligófagas, se alimentando de vários gêneros de Fabaceae (Whalley 1973). No Brasil, é citada como uma das principais responsáveis pelo prejuízo na produção de feijão (*Phaseolus vulgaris*) do Rio Grande do Sul, devido aos danos que causa as sementes, inviabilizando o consumo e a semeadura (Melo & Silveira 1998). Há relatos de ataque de *E. zinckenella* em 4 espécies de *Crotalaria*: *C. pallida*, *C. incana*, *C. micans* e

C. zanzibarica (= *C. trichotoma*) em Porto Rico, sendo *C. pallida* considerada uma das mais suscetíveis ao ataque (Segarra-Carmona & Barbosa 1988). No Brasil, Cogni (2010) observou as larvas se alimentando de *C. incana* e *C. pallida* e JR Trigo (comunicação pessoal) verificou a ocorrência em *C. micans* e *C. vitelina*. O ciclo de vida se completa por volta de 45 dias, conforme a temperatura (Edmonds et al. 2000; Taghizadeh et al. 2012). Na temperatura de 27°C, foram 4 dias de incubação dos ovos, 12 de estágio larval, 18 de pré-pupa e pupa e 11 como adultos (D. Verçosa dados não publicados). As fêmeas depositam seus ovos na vagem e, principalmente, no cálice; quando eclodem, as larvas perfuram a vagem e alimentam-se das sementes verdes. A larva desenvolve-se dentro de uma única vagem, saindo para pupar no solo (van der Berg et al. 1998; D. Verçosa comunicação pessoal). Seus principais inimigos naturais são as vespas parasitoides braconídeas e chalcidoídeas (Segarra-Carmona & Barbosa 1988; Lotfalizadeh & Hosseini 2014).

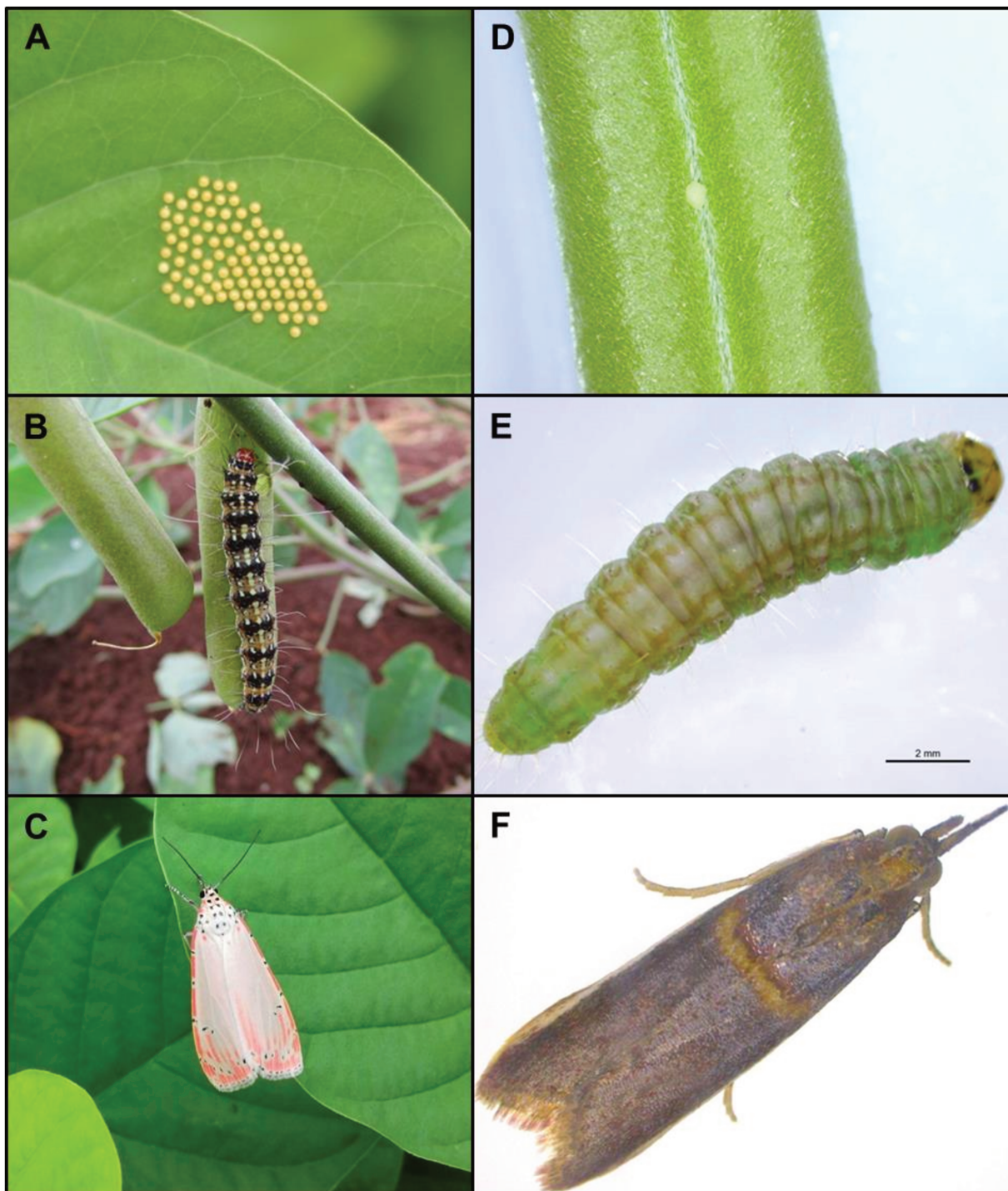


Figura 4. Ovos agrupados (A), uma larva (B) e um adulto da mariposa *Utetheisa ornatix* (C); um ovo (D), uma larva (E) e um adulto da mariposa *Etiella zinckenella* (F).

3. Interações entre *Crotalaria pallida* e seus herbívoros no contexto geográfico e temporal

Para realizarmos uma caracterização das interações entre *C. pallida* e seus herbívoros (especialista e não especialista), nós amostramos três populações, Iperó, Martinho Prado e Village (distantes por volta de 70 km entre si), ao longo de um ano (variação temporal), durante o período de janeiro de 2012 a janeiro de 2013. Dentro deste período, realizamos oito amostragens por população, a cada 45 dias. Em cada população realizamos uma amostragem assistemática de 10 plantas e de três ramos com vagens verdes por planta. A cada nova amostragem não necessariamente as mesmas 10 plantas eram amostradas. As oito amostragens foram realizadas dentro dos seguintes períodos: janeiro a fevereiro, março a abril, maio a junho, julho a agosto, agosto a setembro, setembro a outubro, novembro a dezembro e dezembro a janeiro.

Para caracterizarmos o ciclo de vida de *Crotalaria*, realizamos, em cada amostragem, uma avaliação fenológica, nas três localidades. Utilizamos o método de avaliação qualitativo direto (presença e ausência) da fenofase (d'Eça-Neves & Morellato 2004).

3.1. Variação geográfica e temporal da percentagem de vagens predadas

Em todas as amostragens, quantificamos a percentagem de vagens predadas nos três ramos coletados, usando como estimador vagens com sementes verdes atacadas por larvas de *U. ornatrix* ou *E. zinckenella* ou ambas. Consideramos vagens atacadas por *U. ornatrix*, as que continham larva do herbívoro em seu interior, e vagens com sementes predadas, sem larva, mas que apresentavam perfuração feita de fora para dentro (Figura 5A). Para *E.*

zinckenella, nós consideramos as vagens que continham larva em seu interior e vagens com sementes predadas que apresentavam perfuração feita de dentro para fora (Figura 5B).

Calculamos o estimador dividindo o número desses eventos pelo número total de vagens verdes amostradas, nos três ramos.

Usamos a percentagem de vagens atacadas por larvas de *U. ornatix* ou *E. zinckenella* ou ambas, como estimador, por ser o que melhor reflete o impacto do herbívoro sobre a planta. Além disso, a ocorrência de larvas de *E. zinckenella* apresenta uma forte correlação com a percentagem de vagens atacadas (Correlação de Spearman, $n = 448$, $\rho = 0,836$, $P < 0,001$), pois uma larva desenvolve-se dentro de uma única vagem. O mesmo não ocorre com a larva de *U. ornatix* que se alimenta de aproximadamente três vagens de *C. pallida*; esta é a razão pela qual a correlação entre a quantidade de larvas e a percentagem de vagens atacadas é menor do que em *E. zinckenella* (Correlação de Spearman, $n = 386$, $\rho = 0,577$, $P < 0,001$). Conforme a larva de *U. ornatix* cresce, a quantidade de vagens atacadas aumenta.

Separamos a percentagem de vagens predadas nas populações em três categorias: plantas atacadas por *U. ornatix*; plantas atacadas por *E. zinckenella* e plantas atacadas por ambos herbívoros (daqui em diante está variável será referida como tipo de herbívoro).

Para verificarmos se havia variação geográfica e temporal na percentagem de vagens predadas por tipo de herbívoro, comparamos a mesma entre as três populações e entre os períodos de janeiro a fevereiro, março a abril e maio a junho. Somente nestes períodos, as três populações apresentaram vagens verdes concomitantes, enquanto que nos demais períodos a produção de vagens variava. Fizemos essa comparação utilizando um modelo linear generalizado, usando distribuição de Poisson, com função de ligação log, teste de log-verossimilhança do tipo 1 e coeficiente de correção de desvio para corrigir a

superdispersão (McCullagh & Nelder 1989). Esta e as demais análises foram realizadas com o programa Statistic 7.0, StatSoft, Inc. 2004.

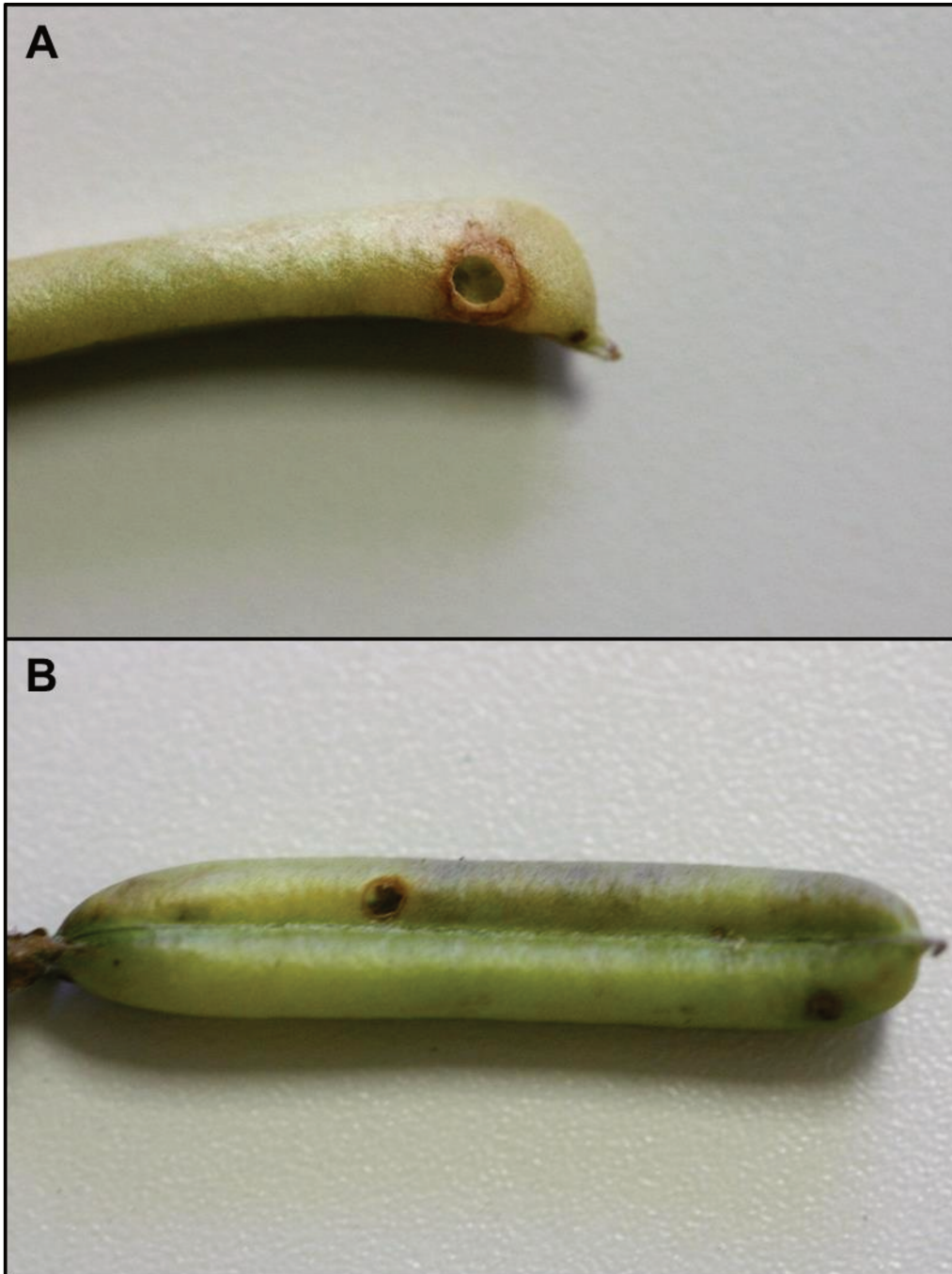


Figura 5. Perfuração realizada por larva de *Utetheisa ornatrix* para entrar na vagem (A) e perfuração realizada por larva de *Etiella zinckenella* para sair da vagem (B) de *Crotalaria pallida*.

3.2. Variação geográfica e temporal da concentração de alcaloides pirrolizidínicos

Verificamos se a concentração de APs em sementes verdes de plantas atacadas pelos herbívoros varia entre as três populações de *C. pallida*. Para isso, liofilizamos as sementes verdes, por 48 horas, em um liofilizador Labconco Freezone 6 Liter Freeze Dry System, Model 77530. Homogeneizamos, aproximadamente, 100 mg de sementes verdes liofilizadas de cada planta amostrada. A homogeneização, durante 1 minuto, foi feita em tubo de ensaio (1,3 cm de diâmetro x 10 cm de altura), com areia do mar superpura (J. T. Baker) e 2,0 mL de EtOH, utilizando um bastão de vidro. Centrifugamos o homogenato por 5 minutos, a 805 xg, em uma Centrífuga Excelsa II Modelo 205-N, FANEM. Retiramos o sobrenadante, com o auxílio de uma pipeta de vidro Pasteur, e extraímos o resíduo das sementes mais duas vezes, repetindo o procedimento acima. Reunimos os três sobrenadantes em um balão volumétrico de 10 mL e completamos o volume para essa medida com EtOH. Retiramos uma alíquota de 1 mL da solução de 10 mL para quantificação por colorimetria, como descrito a seguir.

Para quantificação dos APs usamos o método colorimétrico modificado de Bingley (1968) e Mattocks (1967, 1968). Transferimos a alíquota de 1 mL para um tubo de ensaio (0,9 cm de diâmetro x 10 cm de altura - tampa com rosca) e evaporamos o EtOH em banho à 90°C por 25 minutos. Após o tubo atingir a temperatura ambiente, N-oxidamos os APs da alíquota com 0,5 mL de reagente de oxidação [solução de 1,0 mL de peróxido de hidrogênio mais 5,0 mg de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (pirofosfato de sódio) diluído em 200 mL de MeOH] por 25 min à 100°C (Figura 6); neste procedimento o tubo de ensaio foi mantido aberto. Após a oxidação, deixamos o tubo atingir a temperatura ambiente e secamos o seu interior, cuidadosamente, em fluxo de N_2 , já que água pode interferir nas reações a seguir. Adicionamos 1,0 mL de acetato de isoamila e 0,1 mL de anidrido acético e aquecemos a

reação a 100°C por 2 minutos; nesse procedimento o tubo foi mantido fechado para evitar a contaminação por água. Essa reação (Reação de Polonovsky - Grierson 1990) transforma os APs N-óxidos em diidropirrolizinas (Figura 6). Após o tubo atingir a temperatura ambiente, adicionamos 1 mL de reagente de Ehrlich modificado (8,0 mL de BF₃ metanólico (14%) e 1,4 g de dimetilaminobenzaldeído diluídos em 72 mL de EtOH). Tampamos o tubo e aquecemos a reação, por 5 minutos, à 60°C. A reação das diidropirrolizinas com o ácido de Lewis BF₃ e o dimetilaminobenzaldeído gera um cromóforo (Figura 6). Após o término da reação, deixamos o tubo atingir a temperatura ambiente, adicionamos 1,9 mL de acetona. Realizamos a leitura da absorbância das amostras em triplicata, no comprimento de onda 561 nm, utilizando um espectrofotômetro digital, modelo SP-22, marca Biospectro (faixa de leitura 325-1000 nm) com resolução de $\pm 0,078$ A. Quantificamos os APs convertendo os valores médios de absorbância em μg , com base em uma curva de calibração, preparada com padrão do alcaloide pirrolizidínico monocrotalina (absorbância = $0,0389 \times \mu\text{g}$ de monocrotalina, $r^2 = 0,980$). Assumimos que o coeficiente de extinção molar não varia entre os APs. A concentração dos alcaloides foi expressa em $\mu\text{g/g}$ do peso seco das sementes.

Nós comparamos a concentração de APs nas sementes verdes, nas três populações, em três períodos diferentes. Fizemos essa comparação utilizando uma ANOVA de dois fatores, onde os fatores independentes foram população e período. Transformamos a concentração de APs em \ln para atender aos pressupostos de normalidade da ANOVA.

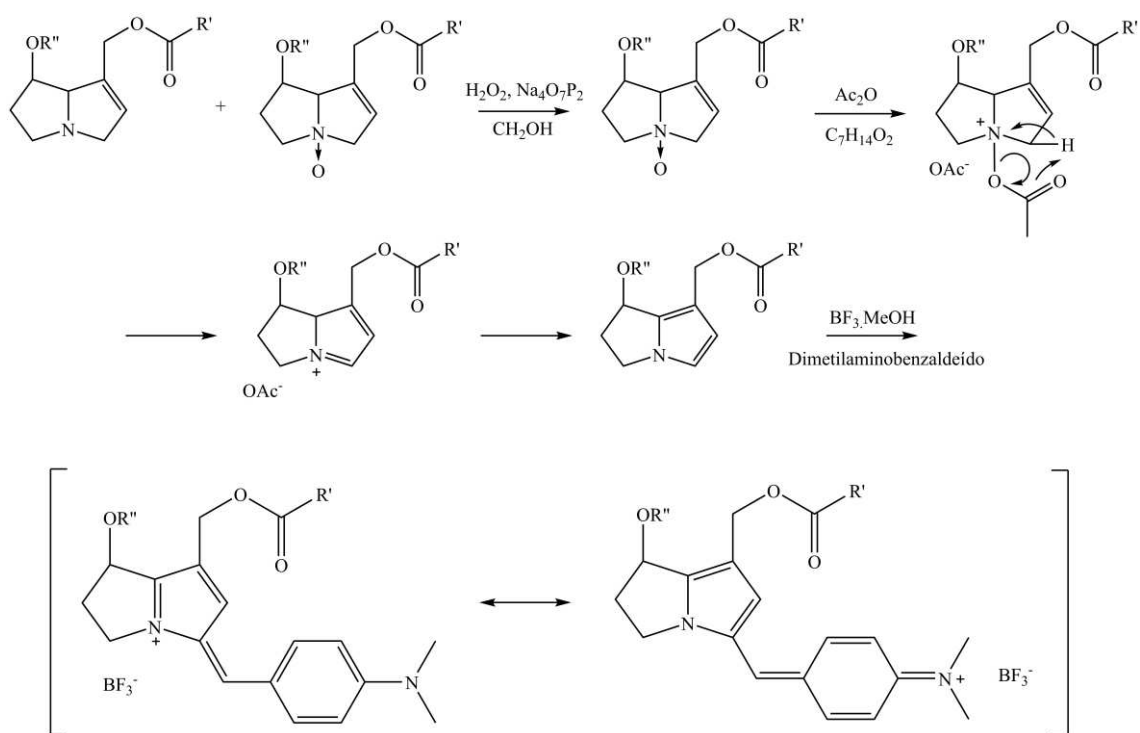


Figura 6. Mecanismo das reações de Polonovsky e Ehrlich com alcaloides pirrolizidínicos resultando na formação do cromóforo.

4. Há correlação entre defesas químicas de *Crotalaria pallida* e seus herbívoros (especialista e não especialista) no contexto geográfico e temporal?

Para investigarmos se havia correlação entre defesas químicas de *C. pallida* e seus herbívoros em um contexto geográfico, realizamos coletas em janeiro de 2014, de 20 populações de *C. pallida*, com distância entre si acima de 70 km, localizadas nas regiões do Paraná, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Rio de Janeiro, com a menor distância entre as populações sendo 80 km e a maior 1416 km (Tabela 1). Realizamos uma amostragem assistemática de 20 plantas, em cada população. De cada planta amostrada, coletamos três ramos com vagens verdes, nos quais medimos a percentagem de vagens predadas por cada tipo de herbívoro e usamos as sementes intactas para extrair os APs. Em maio, realizamos as coletas nas mesmas localidades, usando o mesmo método de amostragem, sendo que em Bataguassu, Corumbá, Itanhaém e Miranda, não foi possível encontrar populações. Realizamos amostragens em janeiro e maio porque nossos resultados do estudo em escala local demonstraram haver maior incidência do herbívoro não especialista em dezembro-janeiro e maior incidência do herbívoro especialista em abril-maio (ver em Resultados item 1.2).

Utilizamos outro método de extração para as amostras de sementes verdes das 20 populações, devido à distância do laboratório de Ecologia Química, Unicamp, que impossibilitou que as amostras pudessem ser levadas para a liofilização. Sendo assim, acondicionamos as sementes verdes, de cada planta amostrada, em frascos de vidro (volume 15 mL) com EtOH. Para extração dos APs, primeiramente, retiramos a solução alcoólica e a transferimos para um tubo Falcon de 50 mL, com tampa de rosca. Transferimos as sementes para um tubo de ensaio (2,5 cm de diâmetro x 12,6 cm de altura) e adicionamos 10 mL de EtOH. Em seguida, homogeneizamos, por 30 segundos, no

homogeneizador (Marconi, modelo: MA 102). Lavamos a haste do homogeneizador e o tubo com 10 mL de EtOH e transferimos o extrato para um tubo Falcon, para centrifugação por 15 minutos, a 10416 xg, em uma Centrífuga Beckman Coulter, Allegra X-30R.

Retiramos o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta. Adicionamos 20 mL de EtOH no tubo Falcon, agitamos por 30 segundos, no agitador de tubos (Cetomart), centrifugamos novamente e repetimos esse passo mais uma vez. Reunimos os três sobrenadantes em um balão volumétrico de 100 mL e completamos o volume para essa medida com EtOH.

Retiramos uma alíquota de 3 mL da solução de 100 mL para quantificação por colorimetria, como descrito acima no item 3.2.

Para testarmos a hipótese que populações com maior incidência do herbívoro especialista *U. ornatatrix* apresentariam uma menor concentração de APs, enquanto que aquelas com uma incidência relativa maior do herbívoro não especialista *E. zinckenella* apresentariam uma maior concentração desses alcaloides. Em populações onde ambos os herbívoros tivessem uma incidência similar, esperaríamos uma concentração intermediária. Utilizamos a correlação não paramétrica de Spearman, com os dados não transformados, para verificarmos se a concentração média de APs apresentava correlação com a percentagem média de vagens predadas por tipo de herbívoro em cada uma das 20 populações em janeiro e das 16 em maio. Além disso, verificamos a amplitude de variação da percentagem de vagens predadas por tipo de herbívoro, como também da concentração de APs em janeiro e maio entre as 20 populações.

5. *Utetheisa ornatrix* induz a produção de alcaloides pirrolizidínicos em *Crotalaria pallida*?

Para investigarmos se o herbívoro especialista *U. ornatrix* induz a produção de APs em sementes verdes de *C. pallida*, realizamos um bioensaio, em casa de vegetação onde somente o herbívoro em estudo atacaria a planta.

Para o cultivo das plantas, primeiramente, realizamos um tratamento de quebra de dormência das sementes, oriundas da população do Village. Colocamos as sementes em um recipiente com água, a 60 °C, durante 15 minutos. Em seguida, semeamos em bandejas com substrato Genesolo e acondicionamos em uma sala, com condições controladas de fotoperíodo (12h claro/12h escuro) e temperatura 27°C. Após a germinação, transplantamos as plântulas para tubos (5 cm de diâmetro x 15 cm de altura) com terra vegetal e mantivemos na casa de vegetação, com irrigação controlada, por 2 meses e meio, até a formação das raízes. Posteriormente, transplantamos as mudas para vasos (20 cm de diâmetro x 20 cm de altura, volume 5 L). Quando as plantas apresentaram o primeiro ramo com vagens verdes, iniciamos o experimento.

Para obtenção de larvas para realização do experimento, mantivemos adultos de *U. ornatrix*, coletados da população do Village, em laboratório, em um tubo cilíndrico de papel (9 cm de diâmetro x 20 cm de altura), com as extremidades vedadas por placas de Petri de plástico. Os adultos foram alimentados com solução aquosa de mel 20%. Neste sistema, os adultos acasalavam e as fêmeas depositavam os ovos na parede do cilindro de papel. Os ovos foram coletados, acondicionados em um recipiente plástico (4 cm de diâmetro x 5 cm de altura) e mantidos sob condições controladas de fotoperíodo (12h

claro/12h escuro) e temperatura 27°C. As larvas recém eclodidas foram alimentadas com folhas de *C. paulina* até atingirem o 2º instar, estágio utilizado no experimento.

Em uma casa de vegetação (6,5 m de comprimento x 4,5 m de largura x 2,8 m de altura), colocamos 60 indivíduos de *C. pallida* com um número similar de vagens verdes ($16,60 \pm 2,80$, média \pm desvio padrão), distante entre si o suficiente para não haver contato entre os ramos (cerca de 1 m). Aplicamos aleatoriamente dois tratamentos nesses indivíduos. No primeiro tratamento, onde o herbívoro está presente (daqui em diante tratamento com herbívoro), contamos a quantidade de vagens em cada planta e a cada 10 vagens colocamos uma larva de 2º instar de *U. ornatix*. Esta quantidade de larva por vagem corresponde à média observada no campo (média \pm erro padrão, $10,97 \pm 2,15\%$, $n = 40$). Aplicamos a resina (Tanglefoot®) na base do caule, para evitar que formigas acessassem as plantas e removessem as larvas. No segundo tratamento, onde o herbívoro está ausente (daqui em diante controle), o mesmo procedimento foi aplicado, sem a presença do herbívoro.

Nos primeiros dias de experimento, no tratamento com o herbívoro, as larvas muitas vezes se moviam das vagens para as folhas, onde se alimentavam. A cada dia, observávamos se as larvas estavam na planta e se estavam nas vagens ou nas folhas. Se as larvas não estivessem na planta, colocávamos outra larva da mesma idade e se estivessem nas folhas, as colocávamos, novamente, sobre as vagens. A partir do quarto dia de experimento, cobrimos as vagens com um saco de tule (20 cm de comprimento x 9 cm de largura), para forçar as larvas a permanecerem sobre as vagens. O recobrimento das vagens, com um saco de tule, foi aplicado também nas plantas controle, a partir do quarto dia do experimento. Quando as larvas atingiram o último instar, nós as retiramos das vagens e encerramos o experimento após 10 dias.

Coletamos os ramos com vagens para quantificarmos a concentração dos APs nas sementes verdes, como descrito acima no item 3.2. Para verificarmos se o ataque pelo herbívoro afeta a alocação de defesa química, nós comparamos a concentração de APs em sementes verdes de vagens intactas (resposta sistêmica) e vagens atacadas (resposta local) dentro do tratamento com herbívoro usando um teste t para amostras dependentes. Para verificarmos se existem diferenças na concentração de APs entre o tratamento com herbívoro (vagens intactas e vagens atacadas) e o controle, nós usamos um teste t para amostras independentes. Usamos a correção de Bonferroni, onde o nível de significância é dado por $\alpha/\text{número de comparações}$ ($0.05/3 = 0.017$) (Gotelli & Ellison 2004).

Nós não realizamos o bioensaio em casa de vegetação com o herbívoro não especialista *E. zinckenella*, pois até o momento não conseguimos estabelecer uma criação desse herbívoro em laboratório. Esse herbívoro apresenta algumas características em seu ciclo de vida que dificulta a criação. Por exemplo, a quantidade de ovos colocada é muito pequena e a larva recém-eclodida é de cerca de 2 mm, o que dificulta o manuseio.

RESULTADOS

1. Interações entre *Crotalaria pallida* e seus herbívoros no contexto geográfico e temporal

1.1. Fenologia

Crotalaria pallida apresentou ser uma espécie anual, frutificando durante a maior parte de seu ciclo de vida, porém com diferentes intensidades. Em janeiro e fevereiro, ocorreu o florescimento. Em março e abril, houve maior número de ramos com vagens verdes, em maio e junho, as vagens secaram e, em julho, as plantas morreram. A partir de novembro, começaram a surgir novos indivíduos (Figura 7). Este período de frutificação foi variável entre as populações amostradas. Por exemplo, a população de Martinho Prado permaneceu mais tempo com vagens verdes, em comparação com as populações de Iperó e Village. Em contrapartida, não apresentou novos indivíduos entre novembro e dezembro, período em que começou a surgir novos indivíduos nas outras duas populações. Desta forma, neste estudo durante o ano observamos duas gerações de plantas.

1.2. Variação geográfica e temporal da percentagem de vagens predadas

Nas três populações de *C. pallida*, Iperó, Martinho Prado e Village, verificamos a ocorrência de larvas de *U. ornatatrix* e *E. zinckenella* predando vagens com sementes verdes. Analisando somente os períodos de janeiro a fevereiro, março a abril e maio a junho, quando as três populações possuem vagens verdes, nós verificamos que a percentagem de vagens predadas é significativamente diferente entre as três populações, bem como entre os

tipos de herbívoros, mas não entre os períodos considerados; todas as interações entre estes três fatores também são significativas (Tabela 2). Uma inspeção visual (Figura 7), pois não fizemos um teste *post hoc* para a GLM, sugere que a população do Village apresentou uma maior percentagem de vagens predadas (mediana 20,00%, amplitude 9,25 - 34,50%), seguida pela população de Iperó (mediana 11,00%, amplitude 0,25 - 31,50%) e Martinho Prado (mediana 11,50%, amplitude 4,25 - 17,75%). Em relação ao tipo de herbívoro, as percentagens de vagens predadas por *U. ornatix* e por ambos foram similares enquanto que *E. zinckenella* apresentou a menor percentagem de vagens predadas. A percentagem de vagens predadas por *U. ornatix* foi maior em Iperó, no período de maio a junho e no Village no período de março a abril (Figura 7).

Além disso, ao longo do ano, nos períodos de agosto a setembro e de setembro a outubro, as três populações não apresentaram vagens disponíveis, e, portanto, nenhum herbívoro foi amostrado. Nos períodos de novembro a dezembro e de dezembro a janeiro, as populações de Iperó e Village começaram a ser atacadas principalmente por *E. zinckenella* (Figura 7). Nós observamos que ocorre maior percentagem de vagens predadas por *U. ornatix* nos períodos de janeiro a fevereiro e março a abril, e por *E. zinckenella* nos períodos de novembro a dezembro e de dezembro a janeiro (Figura 7). Assim, observamos duas coortes de herbívoros.

Tabela 2. Resultado do teste de log-verossimilhança do tipo 1 para percentagem de vagens predadas por tipo de herbívoro, nos períodos de janeiro a fevereiro, março a abril e maio a junho em três populações de *Crotalaria pallida*.

Fonte de Variação	gl	log-verossimilhança	χ^2	P
População	2	-4049,84	6,727	0,035
Período	2	-4047,59	4,509	0,105
Tipo de herbívoro	2	-3996,40	102,376	< 0,001
População x Período	4	-3981,50	29,797	< 0,001
População x Tipo de herbívoro	4	-3967,87	27,276	< 0,001
Período x Tipo de herbívoro	4	-3950,94	33,843	< 0,001
População x Período x Tipo de herbívoro	8	-3930,41	41,063	< 0,001

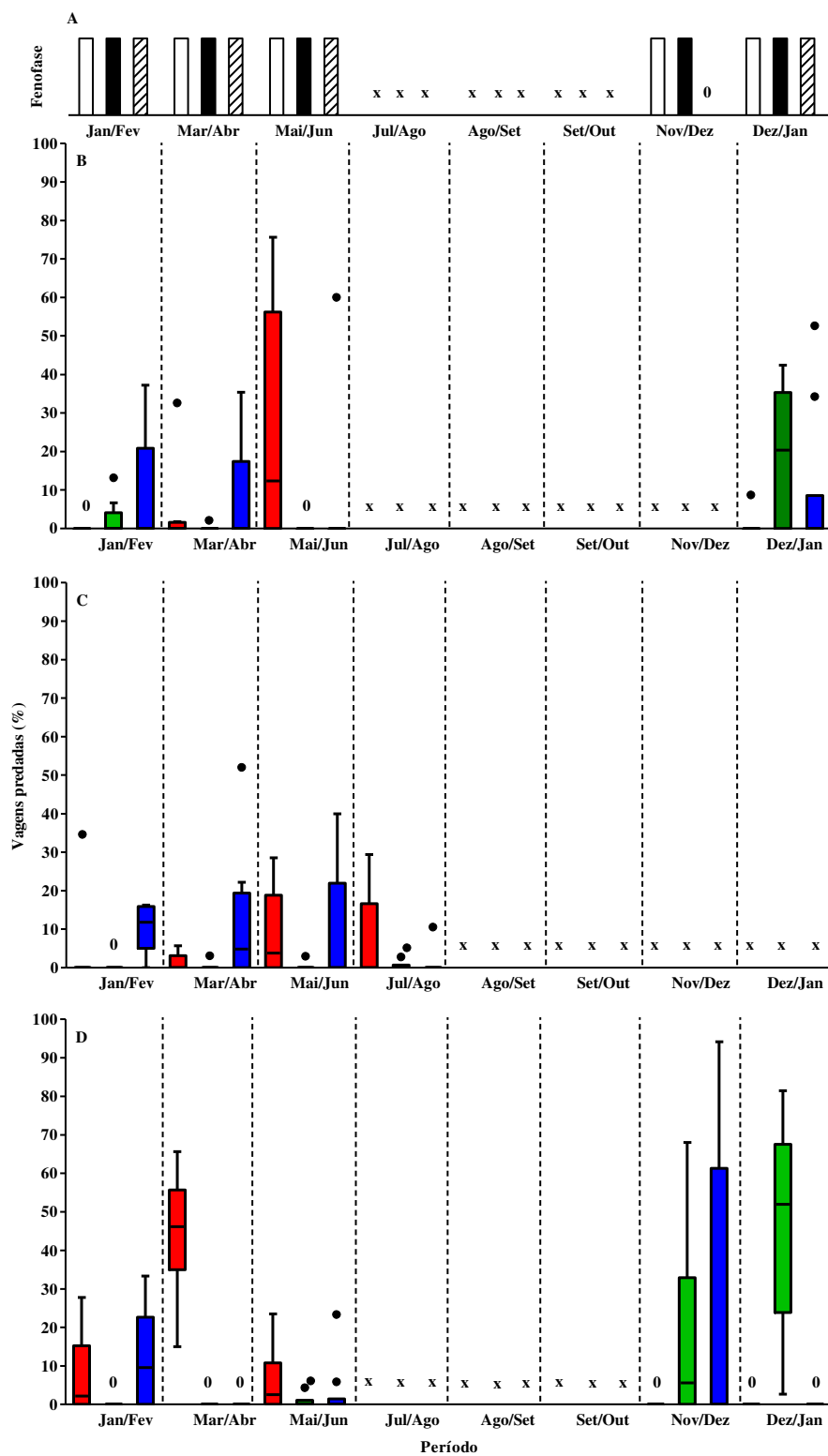


Figura 7. Presença das fenofases: flores (branco), frutos verdes (preto) e frutos maduros (linha inclinada) (A) ao longo do ciclo de vida de *Crotalaria pallida*. Percentagem de vagens predadas por *Utetheisa ornatrix* (vermelho) e *Etiella zinckenella* (verde) ou ambos (azul) na população de *Crotalaria pallida* de Iperó (B), Martinho Prado (C) e Village (D) ao longo de um ano. Populações e períodos marcados com zero, representam que não foram encontrados herbívoros nas plantas. Não foram encontrados indivíduos de *C. pallida* nos períodos marcados com “x”. Os dados estão expressos em mediana e amplitude interquartil. Os pontos representam os “outliers”.

1.3. Variação geográfica e temporal da concentração de alcaloides pirrolizidínicos

Nas mesmas três populações e períodos onde amostramos a percentagem de vagens predadas, verificamos a concentração de APs de sementes verdes. Nós observamos que a concentração de APs difere significativamente entre as três populações, períodos e interação entre esses dois fatores também é significativa (Tabela 3). A população de Iperó apresentou a maior concentração de APs, cerca de três vezes maior do que a menor concentração apresentada pela população de Martinho Prado (Figura 8). A concentração de APs variou entre os três períodos dependendo da população; em Iperó, a concentração de APs foi maior no período de maio a junho do que no período de janeiro a fevereiro e março a abril.

Ao longo do ano, a concentração de APs variou entre as populações na faixa de $254,10 \pm 30,60$ a $2614,39 \pm 184,76$ $\mu\text{g/g}$. Na população de Iperó, variou de $1029,38 \pm 191,37$ a $2614,39 \pm 184,76$ $\mu\text{g/g}$, seguida pela população do Village que apresentou variação de $279,77 \pm 30,63$ a $1152,17 \pm 286,25$ $\mu\text{g/g}$ e a população de Martinho Prado que apresentou a menor variação na concentração de APs ($254,10 \pm 30,60$ a $458,79 \pm 98,85$ $\mu\text{g/g}$) (Figura 8).

Tabela 3. Resultado da ANOVA de dois fatores para concentração de alcaloides pirrolizidínicos ($\mu\text{g/g}$ de peso seco da semente) em três populações de *Crotalaria pallida*, nos períodos de janeiro a fevereiro, março a abril e maio a junho. Para a análise, os dados foram transformados para \ln .

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	P
População	15,802	2	7,901	36,987	< 0,001
Período	4,444	2	2,222	10,402	< 0,001
População x Período	7,513	4	1,878	8,793	< 0,001
Resíduo	17,089	80	0,214		

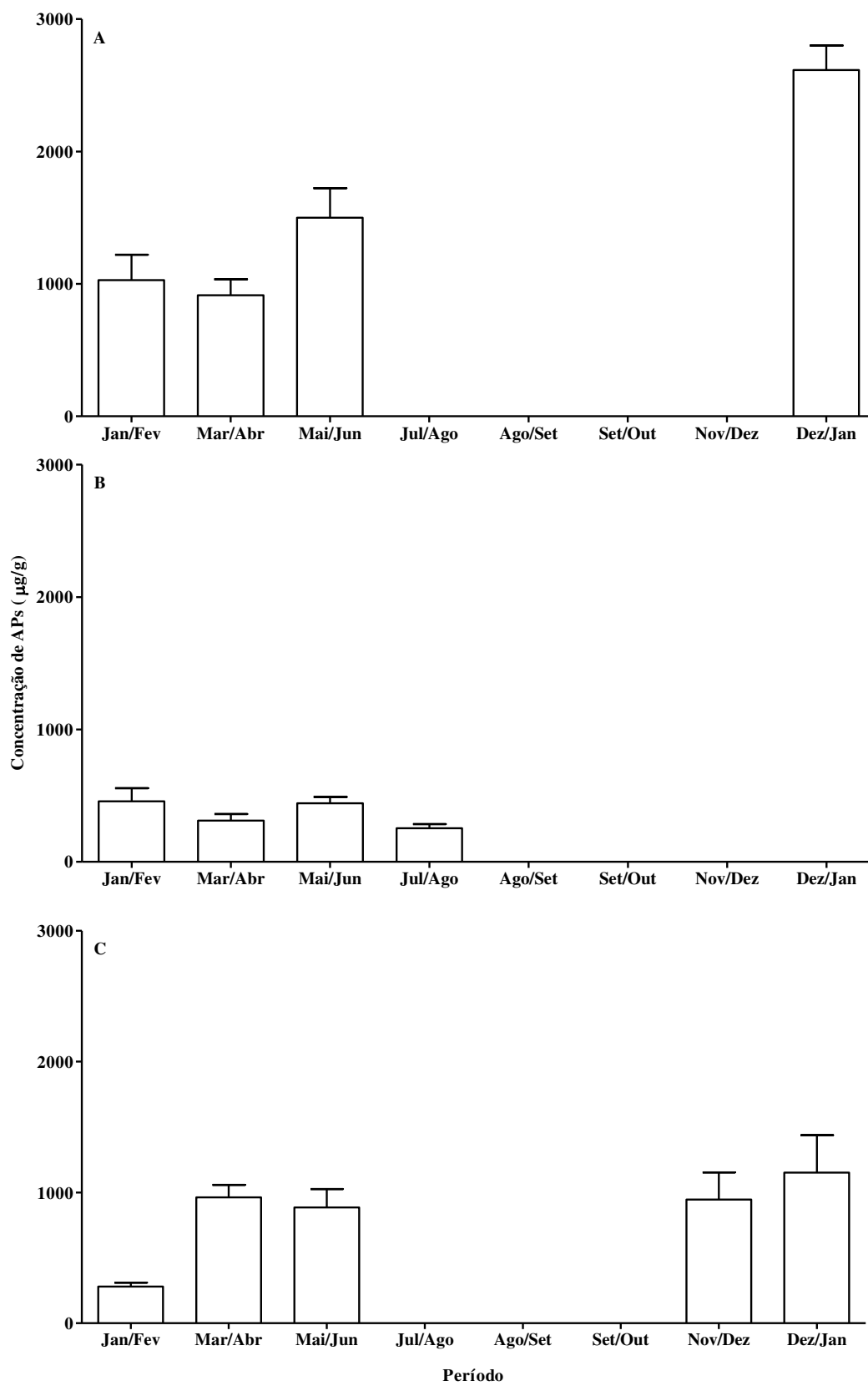


Figura 8. Concentração de alcaloides pirrolizidínicos em três populações de *Crotalaria pallida*, ao longo de oito períodos nas populações de Iperó (A), Martinho Prado (B), e Village(C). Não foram encontrados indivíduos de *Crotalaria pallida* nos períodos onde não há barras. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão (número amostral = 10).

2. Há correlação entre defesas químicas de *Crotalaria pallida* e seus herbívoros (especialista e não especialista) no contexto geográfico e temporal?

A amostragem geográfica em uma área de abrangência de 1416 km, na qual foram amostradas 20 populações, revelou que não há correlação entre defesas químicas de *C. pallida* e seus herbívoros. Embora, a percentagem de vagens predadas por *U. ornatrix* ($0,00 - 28,08 \pm 5,11\%$, mínimo e máximo), *E. zinckenella* ($0,00 - 72,06 \pm 3,52\%$) e ambos ($0,00 - 27,54 \pm 4,47\%$) tenha variado, bem como a concentração de APs ($217,79 \pm 25,02 - 1072,06 \pm 168,78 \mu\text{g/g}$), não encontramos uma correlação entre a percentagem de vagens predadas por tipo de herbívoro e a concentração de APs média de cada população (Figura 9).

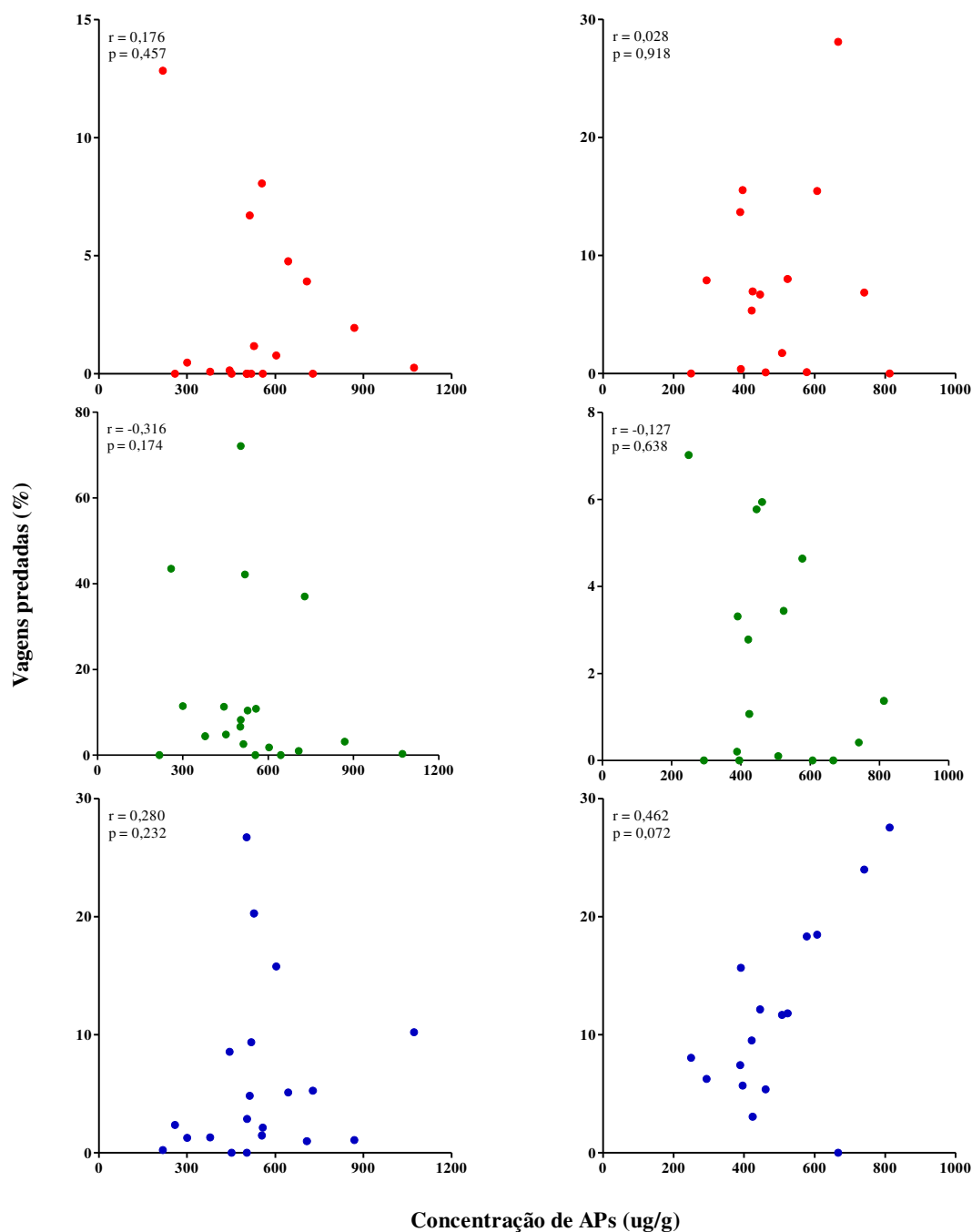


Figura 9. Correlação entre a percentagem de vagens predadas por *Utetheisa ornatrix* (vermelho) e *Etiella zinckenella* (verde) ou ambos (azul) e a concentração média de alcaloides pirrolizidínicos das sementes verdes de *Crotalaria pallida* das 20 populações em janeiro (coluna da esquerda) e 16 em maio (coluna da direita) de 2014.

Nós observamos que a separação temporal entre os herbívoros se mantém na escala geográfica regional. De modo geral, ou seja, considerando as 20 populações, observamos que em janeiro ocorreu maior percentagem de vagens predadas por *E. zinckenella*; a qual diminuiu de janeiro para maio, enquanto que a percentagem de vagens predadas por *U. ornatix* aumentou de janeiro para maio. A percentagem de vagens predadas por ambos herbívoros também aumentou de janeiro para maio (Figura 10). Em janeiro 18% das plantas amostradas não foram atacadas por nenhum herbívoro, já em maio a percentagem de plantas intactas diminuiu para 7%. Em janeiro 50% das plantas foram atacadas por *E. zinckenella* e em maio diminuiu para 25%. Enquanto que *U. ornatix* atacou 18% das plantas em janeiro e aumentou para 36% em maio. Em janeiro 13% das plantas foram atacadas por ambos, a qual aumentou para 31% em maio.

Etiella zinckenella foi predominante na maioria das populações em janeiro (Figura 11). Dentre as 20 populações amostradas, 10 delas foram dominadas por *E. zinckenella*, sendo que em Corumbá e Iporã encontramos vagens predadas somente por este herbívoro (Figura 11). As maiores percentagens de vagens predadas por esse herbívoro foram encontradas nas populações de Iperó, Bataguassu, Rancharia e Corumbá (Figura 11). Na população de Corumbá, houve indivíduos que tiveram cerca 97% de suas vagens predadas por *E. zinckenella*. Em contraste, a população que apresentou maior percentagem de vagens predadas por *U. ornatix*, Ivinhema, teve em média 13% das vagens predadas (Figura 11). Nessa população houve predação somente por *U. ornatix*.

Comparando a percentagem de vagens predadas entre janeiro e maio, nós verificamos que, em algumas populações, a percentagem de vagens predadas por *E. zinckenella* diminuiu em maio e por *U. ornatix* aumentou. Entretanto, em outras populações, o tipo de herbívoro se manteve de janeiro para maio (Figura 11). Além disso,

houve populações como a de Ibiporã, onde encontramos somente *E. zinckenella* em janeiro, mas que apresentou uma das maiores percentagens de vagens predadas por *U. ornatix* em maio (Figura 11). A maior percentagem de vagens predadas por ambos herbívoros foi encontrada na população de Martinho Prado e Nova Alvorada do Sul (Figura 11). As demais populações apresentaram percentagem de vagens predadas similares pelos dois herbívoros (Figura 11).

A concentração de APs variou entre as populações na faixa de $217,79 \pm 25,02 - 1072,06 \pm 168,78 \mu\text{g/g}$ (Figura 12). As populações de Loanda, Iperó e Igarapava apresentaram as maiores concentrações de APs, em comparação com as populações de Ibiporã, Ivinhema, Penedo, São Simão e Passos (Figura 12). A concentração de APs da população de Bataguassu foi similar à população de Ivinhema que apresentou a menor concentração de APs, uma média de $260\mu\text{g/g}$ de peso seco de sementes. A maioria das populações, tais como Corumbá, Itanhaém, Miranda e Duartina apresentaram concentrações de APs similares, variando entorno de $520\mu\text{g/g}$ (Figura 12).

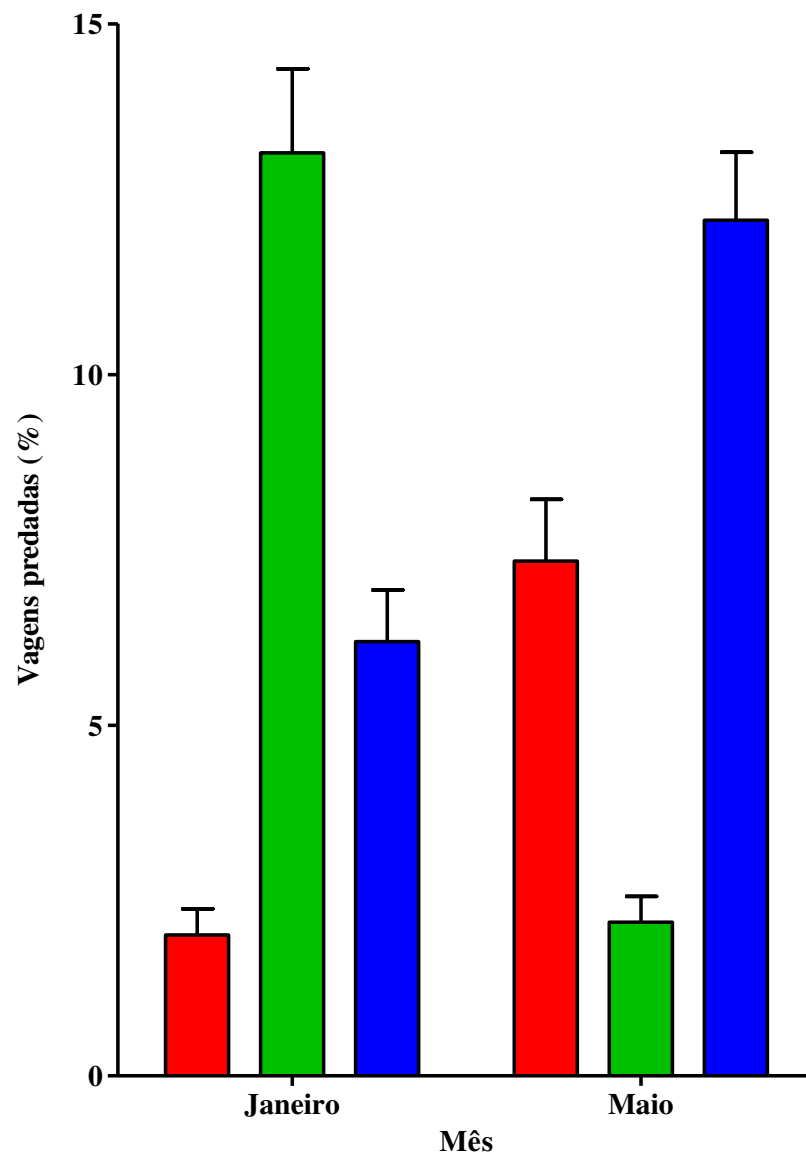


Figura 10. Percentagem de vagens predadas por *Utetheisa ornatrix* (vermelho) e *Etiella zinckenella* (verde) ou ambos (azul) nos meses de janeiro e maio nas 20 populações amostradas em 2014.

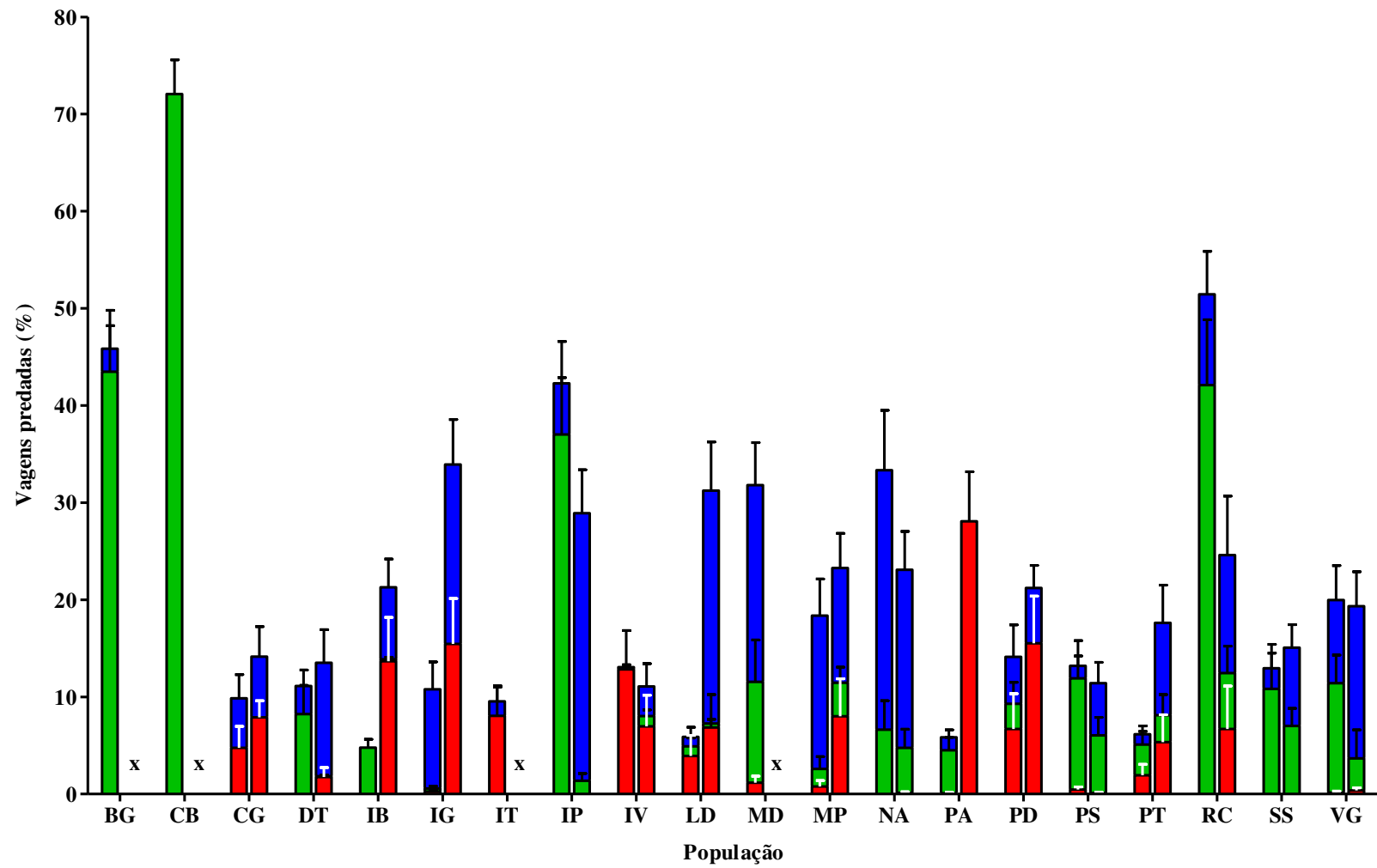


Figura 11. Percentagem de vagens predadas por *Utetheisa ornatatrix* (vermelho) e *Etiella zinckenella* (verde) ou ambos (azul) nas 20 populações de *Crotalaria pallida* em janeiro e maio de 2014. Não foram encontrados indivíduos em maio nas populações marcadas com “x”. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão.

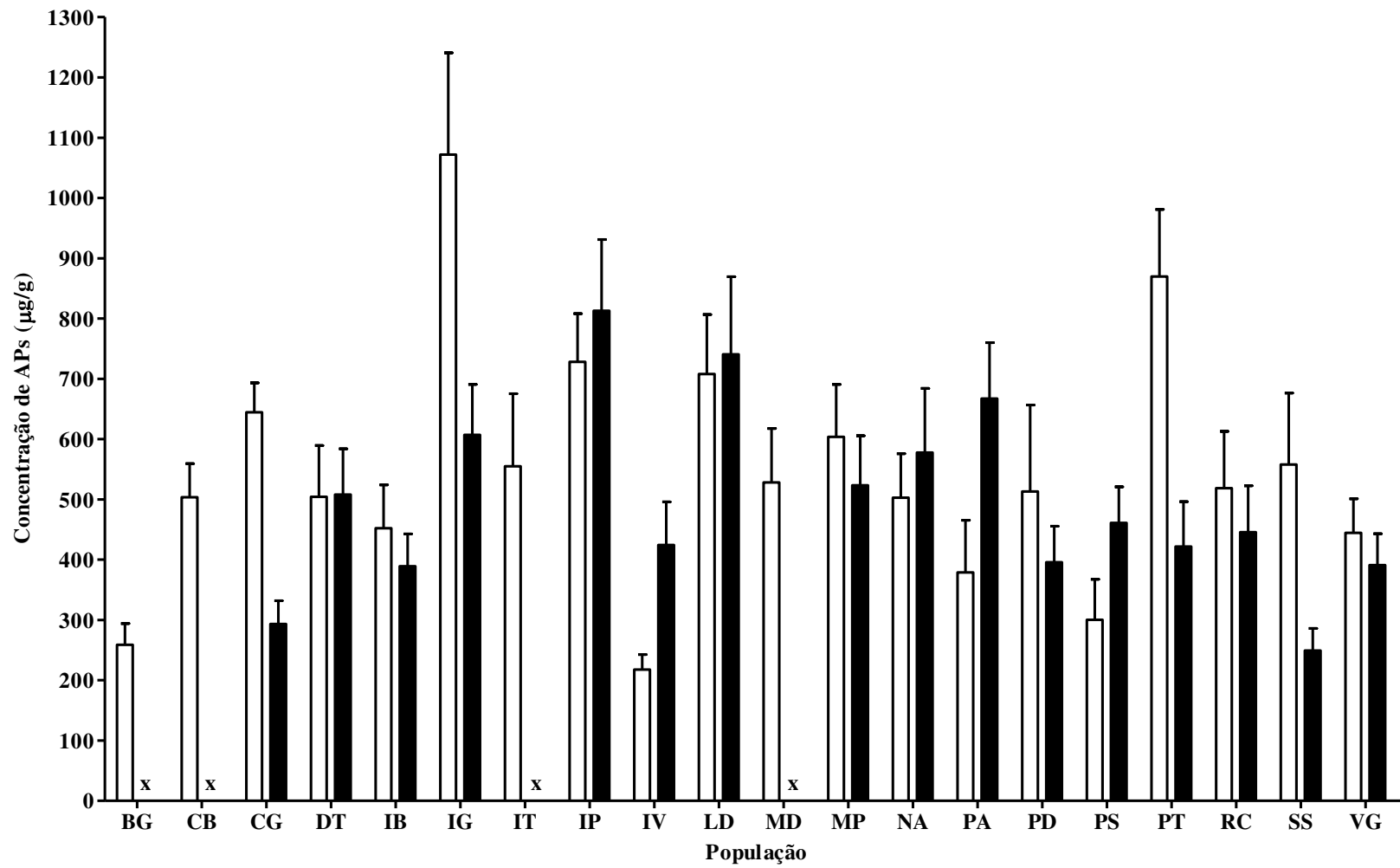


Figura 12. Concentração de alcaloides pirrolizidínicos em 20 populações de *Crotalaria pallida* em janeiro (branco) e maio (preto) de 2014. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão (número amostral = 20).

3. *Utetheisa ornatrix* induz a produção de alcaloides pirrolizidínicos em *Crotalaria pallida*?

Indivíduos atacados por larva de *U. ornatrix* apresentaram em média $28,07 \pm 1,79\%$ de suas vagens atacadas, sendo que o número médio de vagens atacadas por larvas foi de $2,35 \pm 0,19$ vagens. Verificamos que larvas de *U. ornatrix* não induzem o aumento da concentração de APs em sementes verdes de *C. pallida* (Figura 13). Pelo contrário, observamos dentro do mesmo indivíduo uma menor concentração de APs em vagens atacadas em comparação com a concentração das vagens intactas (teste *t* entre duas amostras dependentes, $t = 2,946$, $gl = 27$, $P = 0,007$). Além disso, observamos que há diferenças significativas entre concentração de APs das vagens atacadas e as vagens controle (teste *t* entre duas amostras independentes, $t = -2,935$, $gl = 56$, $P = 0,005$), mas não entre as vagens intactas e as vagens controle (teste *t* entre duas amostras independentes, $t = -0,679$, $gl = 56$, $P = 0,499$, Figura 13).

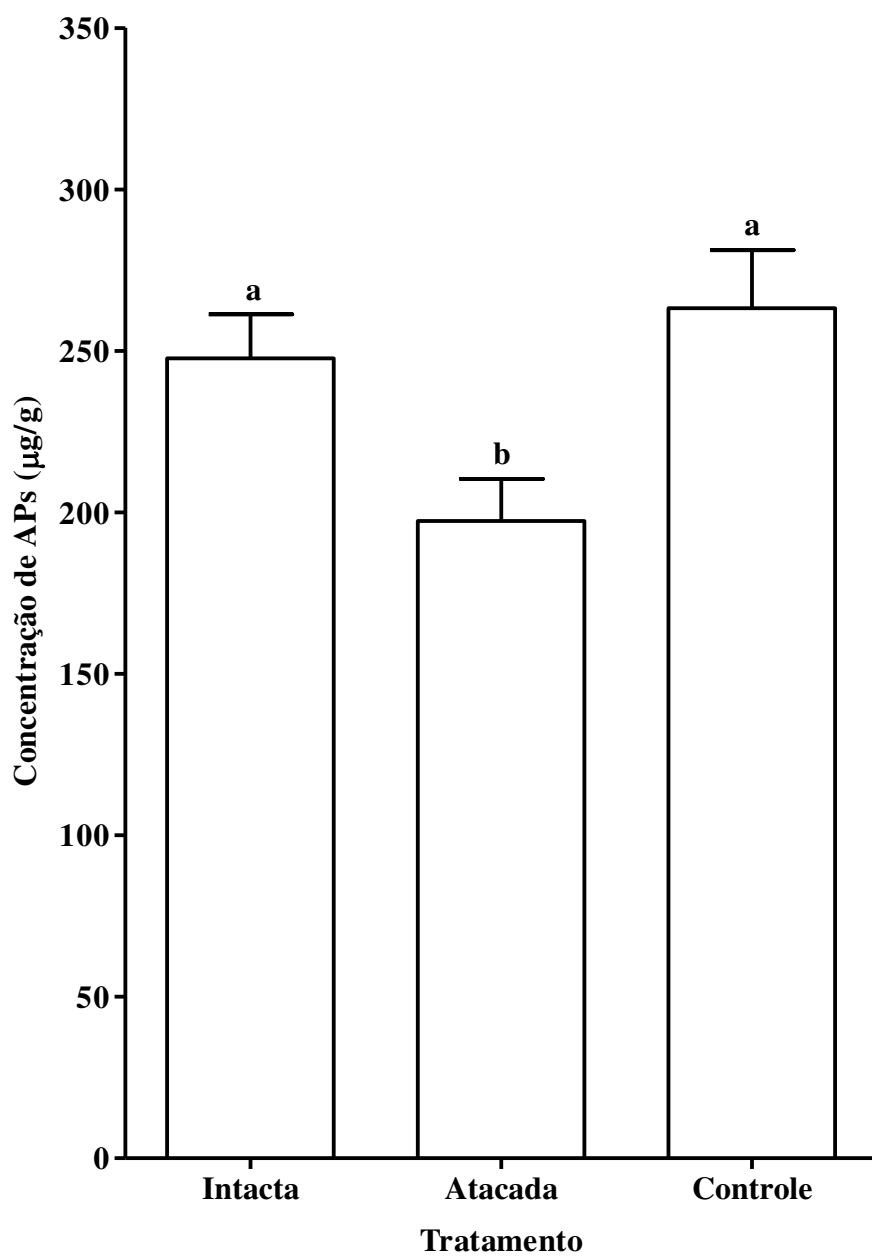


Figura 13. Concentração de alcaloides pirrolizidínicos em vagens intactas e atacadas por larvas de *Utetheisa ornatrix* no mesmo indivíduo ($n = 28$) e vagens dos indivíduos controle ($n = 30$). Os dados estão expressos em média \pm erro padrão. Letras diferentes acima de cada barra representam diferenças significativas ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

1. Interações entre *Crotalaria pallida* e seus herbívoros no contexto geográfico e temporal

Quando estudamos as interações entre *Crotalaria pallida* e seus herbívoros em três populações ao longo do ano, verificamos que esta espécie apresenta flores e vagens verdes durante sete meses, isto é, durante a maior parte do seu ciclo de vida. Este é um longo período de frutificação comparado ao de outras espécies de *Crotalaria*, tal como *C. micans* que frutifica uma única vez no período de um mês (D. Verçosa, observação pessoal). Este resultado sugere que *C. pallida* seja um recurso disponível ao longo do ano para populações de *U. ornatrix* e *E. zinckenella*. Esta característica de *C. pallida*, assim como a sua ampla distribuição geográfica, resultante de seu alto potencial invasivo (Fonseca et al. 2006), é uma possível explicação para essa espécie ser considerada a principal planta hospedeira do herbívoro especialista *U. ornatrix* (Ferro et al. 2006; Cogni & Futuyma 2009; Cogni 2010).

Uma vez que a fenologia da planta hospedeira pode afetar o desenvolvimento do herbívoro (Peterson 1997; van Asch & Visser 2007), um curto período de frutificação implica na necessidade do herbívoro sincronizar seu ciclo de vida à fenologia da planta hospedeira, pois o desenvolvimento fora desse período pode gerar sérias consequências em termos de redução de sobrevivência e fecundidade (van Asch & Visser 2007). Por exemplo, se alimentar fora das vagens verdes implica em uma maior mortalidade para larvas de *U. ornatrix* usando *Crotalaria pallida* como planta hospedeira; essa maior mortalidade é devida à predação por formigas (Ferro et al. 2006). Além disso, adultos de *U. ornatrix* cujas larvas se alimentaram das sementes verdes de *Crotalaria* foram mais defendidos contra a aranha *Nephila clavipes*, em comparação com aqueles que alimentaram

de folhas (Martins et al. 2015). Portanto se vagens verdes não estão disponíveis ao longo do ano, ou pelo menos em grande parte dele, a aptidão de *U. ornatrix* seria comprometida.

Em relação à predação de vagens pelo herbívoro especialista e pelo não especialista, os nossos resultados mostraram que ela varia tanto no contexto geográfico quanto temporal. No presente estudo, nós encontramos uma ampla variação na percentagem de vagens predadas pelos dois herbívoros, entre as três populações, em comparação aos estudos anteriores. Cogni et al. (2011) mostraram que a incidência dos herbívoros no campo varia entre as populações de *C. pallida*, onde verificaram que a percentagem de vagens predadas por *U. ornatrix* variou de 1,5 a 13% e por *E. zinckenella* de 2 a 9%. Em Porto Rico, Segarra-Carmona & Barbosa (1988) verificaram que 20 a 40% das vagens de *C. pallida* foram atacadas por larvas de *E. zinckenella*. Neste estudo, nós encontramos uma alta variação na percentagem de vagens predadas: *U. ornatrix* (0 a 44%) e *E. zinckenella* (0 a 47%). Além disso, nós observamos que a incidência dos herbívoros varia temporalmente. Nos períodos 7 (novembro a dezembro) e 8 (dezembro a janeiro) ocorreu maior percentagem de vagens predadas por *E. zinckenella*, já nos períodos 2 (março a abril) e 3 (maio a junho) ocorreu maior percentagem de vagens predadas por *U. ornatrix*. É importante frisar que os estudos realizados nesse sistema, em relação à predação de vagens, sempre focaram na interação *Crotalaria* e seu herbívoro especialista *U. ornatrix* (Ferro et al. 2006; Cogni & Futuyma 2009; Cogni 2010; Cogni et al. 2011). Contudo, este estudo mostrou que o herbívoro não especialista *E. zinckenella* é responsável por uma grande parte da percentagem de vagens predadas de *C. pallida*. Isto o torna um possível agente seletivo influenciando as defesas químicas em populações dessa espécie.

A concentração de APs das sementes verdes de *C. pallida* também variou entre as populações e ao longo do ano. A população de Iperó apresentou a maior concentração de

APs, cerca de três vezes maior do que a menor concentração apresentada pela população de Martinho Prado. Muitos estudos encontraram variação geográfica nos níveis de herbivoria e defesas químicas (Castells et al. 2005; Castillo et al. 2014). Por exemplo, Castells et al. (2005) encontraram variação geográfica na concentração de alcaloides piperidínicos em folhas de *Conium maculatum* (Apiaceae), assim como nos níveis de herbivoria por larvas da mariposa *Agonopterix alstroemeriana* (Oecophoridae). Similarmente, Castillo et al. (2014) encontraram variação geográfica na concentração de alcaloides tropanos (atropina e escopolamina) de *Datura stramonium* (Solanaceae) e na herbivoria pelos herbívoros especialistas (os besouros crisomélídeos *Lema daturaphila* e *Epitrix parvula*) e o generalista (gafanhoto pirgomorfídeo *Sphenarium purpurascens*).

Além das duas espécies de mariposas, nós registramos a presença de hemípteros sugadores pentatomídeos sobre as vagens amostradas em algumas populações, entretanto não quantificamos a percentagem de ataque por que eles possuem alta mobilidade, podendo se deslocarem rapidamente de uma planta para outra ou entre ramos. Este resultado corrobora com estudos anteriores que relataram a presença de pentatomídeos sobre plantas de *Crotalaria* (Cogni et al. 2011; Smaniotto & Panizzi 2015). Também encontramos parasitoides himenópteros pertencentes às famílias Braconidae e Chalcididae atacando larvas de *E. zinckenella* em 70% das populações amostradas. Em Porto Rico, Segarra-Carmona & Barbosa (1988) encontraram 6 espécies de parasitoides himenópteros atacando larvas de *E. zinckenella*, sendo o mais abundante o braconídeo *Heterospilus etiellae* que parasitou 74,2% das larvas. Larvas de *U. ornatrix* também são parasitoidadas por vespas braconídeas, chalcidídeas, icneumonídeas e moscas taquíndeas (Iyengar et al. 1999; Rossini et al. 2000; Eisner 2003; J.R. Trigo comunicação pessoal). Contudo, não

encontramos parasitoides em larvas de *U. ornatrix* porque eles emergem somente no estágio de pupa, momento em que a larva não está mais na vagem.

2. Há correlação entre defesas químicas de *Crotalaria pallida* e seus herbívoros (especialista e não especialista) no contexto geográfico e temporal?

Nossos resultados revelaram que não há correlação significativa entre *U. ornatrix*, *E. zinckenella* ou ambos e a concentração de APs. Tanto a percentagem de vagens predadas quanto a concentração de APs variou enormemente entre as 20 populações, não apresentando qualquer padrão consistente com a nossa hipótese inicial, onde herbívoros especialistas e não especialistas exerceriam diferentes pressões sobre a planta hospedeira e isto se refletiria na defesa química das plantas. Estudos anteriores demonstraram que os principais compostos químicos defensivos de *C. pallida*, os APs, atuam como deterrentes contra diversos generalistas (Narberhaus et al. 2005; Macel et al. 2005; Wei et al. 2015), mas não afetam o herbívoro especialista *U. ornatrix* (Cogni et al. 2012). Este herbívoro é capaz de sequestrar os APs e utilizá-los em sua própria defesa contra inimigos naturais e como precursor do feromônio sexual de machos, o hidroxidanaidal (Eisner & Meinwald 1995; Hartmann & Ober 2000; Cogni et al. 2011; Macel 2011; Trigo 2011; Martins et al. 2015). Além disso, larvas de *U. ornatrix* apresentam preferência por dieta com alta concentração de APs (Hoina et al. 2012). Neste cenário esperávamos encontrar um padrão de interação ao longo da área de abrangência de *C. pallida*, onde teríamos em populações com maior incidência do herbívoro especialista baixa concentração de APs e em populações com alta incidência do herbívoro não especialista uma alta concentração de APs. Contudo, nossos resultados revelaram que não há correlação entre defesas químicas

de *C. pallida* e os herbívoros considerados ao longo de sua área de abrangência. A variação na concentração de APs entre as 20 populações não explica a percentagem de vagens predadas. Resultados similares foram obtidos por Poelman et al. (2008a) que observaram que a concentração de glicosinolatos não explica o desempenho de herbívoros generalistas (a mariposa noctuídea *Mamestra brassicae*) e especialistas (a borboleta pierídea *Pieris rapae* e a mariposa yponomeutídea *Plutella xylostella*) em cultivares de *Brassica oleracea* (Brassicaceae). Esses autores sugeriram que outros compostos ou diferentes níveis de nutrientes afetam o desempenho das espécies estudadas. A ausência de correlação entre a concentração de defesas de *C. pallida* e a abundância de seus herbívoros ao longo de sua área de abrangência, pode ser resultante da combinação de diversos fatores tanto biótico quanto abióticos que pode influenciar o resultado da interação. Aqui consideraremos seis possíveis cenários para explicar a ausência de correlação entre a percentagem de vagens predadas e defesas químicas.

No primeiro cenário, sugerimos que a variação temporal na incidência dos herbívoros especialista e não especialista seria responsável pela ausência de correlação. Em geral, ocorreu uma maior incidência de *E. zinckenella* em janeiro e de *U. ornatatrix* em maio. Contudo, houve populações como a de Ibioporã, onde encontramos somente o herbívoro não especialista em janeiro, mas que apresentou uma das maiores percentagens de vagens predadas pelo especialista em maio. Essa inversão de abundância de herbívoros dentro da população indica que há alto risco de ataque iminente por outra espécie de herbívoro, com diferente nível de especialização. O ambiente em termos de risco de predação por especialistas ou não especialistas é imprevisível tanto no tempo quanto no espaço. Portanto, adotar uma estratégia em função do ataque inicial por parte de um dos herbívoros poderia implicar em alto custo para *C. pallida*. Além disso, na maioria das

populações amostradas, encontramos predação de vagens por ambos herbívoros. Esses resultados sugerem que a planta pode estar diante de um dilema entre se defender quimicamente do ataque do herbívoro não especialista e fornecer esses mesmos compostos para o herbívoro especialista (Van der Meijden 1996; Lankau 2007). A presença de um herbívoro pode afetar a intensidade da interação ou seleção exercida por outro em sua planta hospedeira dentro da comunidade (Benkman 1999; Strauss & Irwin 2004). Por exemplo, Benkman (1999) observou que conforme a presença ou ausência do predador de sementes, o esquilo *Tamiasciurus hudsonicus* (Sciuridae), diferentes resultados são encontrados na seleção da estrutura morfológica dos cones de pinheiros *Pinus contorta* (Pinaceae). Em locais onde *Tamiasciurus hudsonicus* estava presente a seleção favoreceu para o aumento da largura da base dos cones e menores quantidade de sementes. Entretanto, na sua ausência, os autores observaram que ocorre o aumento na abundância do competidor, o pássaro *Loxia curvirostra* (Fringillidae) que coevolui com *Pinus contorta* selecionando tamanho do cone proporcionalmente ao tamanho do bico. Joshi & Vrieling (2005) investigaram o sistema de interação entre a planta *Senecio jacobaea* e seus herbívoros, a mariposa noctuídea generalista *Mamestra brassicae* e o arctííneo especialista *Tyria jacobaeae*, em populações de áreas nativas e introduzidas. Os autores encontraram maior concentração de APs em populações de áreas introduzidas, onde havia somente herbívoros generalistas, em comparação com áreas nativas. Nesta última, havia ambos os herbívoros e as defesas foram mantidas em níveis intermediários, devido a seleção oposta do especialista e do generalista.

No segundo cenário, o investimento em múltiplas estratégias de defesas por estar sendo atacada por herbívoros especialistas e não especialistas seria responsável pela falta de correlação. Plantas, dependendo do local onde ocorrem, podem ser atacadas por diversos

herbívoros e a pressão seletiva de herbívoros juntos difere da seleção exercida por esses herbívoros separadamente (Strauss 1991). Neste caso, o investimento em múltiplas estratégias de defesas pode favorecer a resistência da planta em frente ao ataque de herbívoros com diferentes níveis de especialização (Carmona & Fornoni 2013). Desta forma, um mecanismo deterrente baseado na atração de inimigos naturais, como NEFs, poderia ser complementar a defesas químicas para essas plantas na defesa contra herbívoros especialista (Guimarães et al. 2006). As formigas demonstraram serem efetivas nesse sistema, defendendo as plantas do herbívoro especialista, atacando larvas de *U. ornatrix* e expulsando-as da planta (Guimarães et al. 2006). Em consequência ao efeito das formigas algumas larvas se jogam das plantas, outras movimentam rapidamente e descem da planta ou muda para outro ramo (Guimarães et al. 2006; Franco & Cogni 2013). O fato da larva de *U. ornatrix* alimentar-se dentro da vagem lhe confere proteção do ataque das formigas, além de adquirir maior concentração de APs (Ferro et al. 2006). Porém, *U. ornatrix* não completa seu estágio larval em uma única vagem, mas depende, em média, de se alimentar de sementes de três vagens de *C. pallida*, tornando assim, vulnerável ao ataque das formigas no momento de mudança de uma vagem para a outra. Por outro lado, o herbívoro não especialista *E. zinckenella* completa seu estágio larval, se alimentando de sementes, dentro de uma única vagem de *C. pallida*, o qual sai da vagem somente para pupar no solo (Whalley 1973). Assim, provavelmente, este mecanismo de defesa (atração de inimigos naturais) não afetaria o herbívoro não especialista, reforçando a manutenção do investimento em defesas químicas. Por exemplo, um estudo anterior demonstrou que formigas *Solenopsis geminata* não afetam a quantidade de ovos de *E. zinckenella* sobre *C. pallida* (Segarra-Carmona & Barbosa 1988).

O terceiro cenário envolve a concentração de APs: será que as concentrações dos alcaloides encontradas em sementes verdes de *C. pallida* são suficientes para deter o herbívoro *E. zinckenella*? Estudos anteriores demonstraram que espécies de herbívoros generalistas respondem de forma diferencial a concentração de APs (Macel et al. 2005; Volf et al. 2015). Os APs em dieta reduziram a sobrevivência de larvas de *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera, Thripidae) apenas na concentração de 5000µg/g, concentração que é 10 vezes acima daquela encontrada em plantas de *Senecio jacobaea* atacada pelos tisanópteros. Entretanto, 5000µg/g foi suficiente para reduzir a sobrevivência de ninfas do pulgão *Myzus persicae* (Macel et al. 2005). A concentração de APs, em dieta, reduziu a sobrevivência de larvas da mariposa generalista *Heliothis virescens* (Noctuidae) somente a partir de 1200µg/g (Cogni & Trigo 2016). Neste estudo, nós encontramos uma variação na concentração de APs entre as 20 populações na faixa de 217,79±25,02 até 1072,06±168,78µg/g; encontramos somente em uma população um valor acima desse, somente uma vez, na população de Iperó, no estudo anterior (2614,39 ± 184,76 µg/g). Adicionalmente, larvas de *E. zinckenella* se alimentam de sementes verdes de outras espécies de *Crotalaria* que possuem maiores concentrações de APs (*C. micans* com 2770µg/g e *C. paulina* com 24320µg/g) sem apresentarem uma redução significativa no desempenho quando comparadas com aquelas que se alimentaram em *C. pallida* que apresenta 400 µg/g (D Verçosa, dados não publicados). Este conjunto de resultados sugere que as concentrações de APs encontradas em sementes verdes de *C. pallida* nas populações amostradas não são deterrentes ou tóxicas para *E. zinckenella*. Este herbívoro, embora o consideremos inicialmente como não especialista, parece não ser afetado negativamente por esses alcaloides. Neste cenário, surge a pergunta: qual o “status” de *E. zinckenella*? Seria este herbívoro não especialista ou especialista. O fato de larvas de *E. zinckenella* não

apresentarem redução em seu desempenho se alimentando de sementes de planta com alta concentração de APs sugere que provavelmente *E. zinckenella* seja um herbívoro especialista, capaz de destoxificar os APs, sem sequestra-los. Herbívoros especialistas que não sequestram compostos defensivos são conhecidos na literatura. Por exemplo, a mariposa *Depressaria pastinacella* (Oecophoridae) é especialista em plantas com furanocumarinas, apresentando um mecanismo de destoxificação baseado no sistema enzimático do citocromo P450 (Berenbaum & Zangerl 1998). Neste caso, *C. pallida* estaria sendo atacada por dois herbívoros especialistas, o que explicaria a ausência de correlação de defesas químicas e percentagem de vagens predadas observada neste estudo.

O quarto cenário sugere que como *C. pallida* é uma espécie introduzida, ela não seria coadaptada aos herbívoros nativos e, portanto, não apresentaria uma resposta induzida ao ataque por parte destes herbívoros; isto resultaria na ausência de correlação entre percentagem de vagens predadas e defesas químicas. *C. pallida* é considerada por alguns autores como nativa da África (Flores et al. 2006; le Roux 2011); apresentando um alto potencial invasivo nos biomas brasileiros (Fonseca et al. 2006). Cogni & Futuyma (2009) inclusive sugerem que esta espécie foi introduzida nos Neotrópicos por ocasião do tráfico de escravos entre os séculos 16 e 19. Dentro deste cenário e os estudos de ecologia de plantas invasoras a principal hipótese testada para explicar o sucesso de invasão é a hipótese de liberação de inimigos naturais (Keane & Crawley 2002; Orians & Ward 2010). Essa hipótese prediz que plantas quando introduzidas em uma nova área, levam vantagens por estarem livres da pressão de seus herbívoros especialistas e sofrem menos danos pelos herbívoros nativos da nova área, resultando em aumento de distribuição e abundância (Keane & Crawley 2002). Cogni (2010) testou essa hipótese comparando a preferência de alimentação de um herbívoro nativo *U. ornatatrix* entre a espécie introduzida *C. pallida* e a

nativa *C. incana*. Ele observou que *U. ornatrix* prefere se alimentar de sementes de *C. pallida* do que da nativa *C. incana*. A taxa de predação de sementes de *C. pallida* foi alta comparada a *C. incana*. Similarmente, em nosso estudo, também encontramos alta predação de sementes de *C. pallida*, tanto por *U. ornatrix* quanto por *E. zinckenella*. Os resultados obtidos por Cogni (2010) assim como os obtidos neste estudo contradizem a hipótese de liberação de inimigos naturais, pois *C. pallida* sofre alta taxa de predação de sementes pelos herbívoros locais e é atacada por um herbívoro especialista no consumo de APs. Por outro lado, esses resultados suportam a hipótese de aumento da suscetibilidade. Esta hipótese prediz que plantas introduzidas são mais suscetíveis ao ataque dos herbívoros nativos, pois não teria desenvolvido defesas efetivas contra eles (Colautti et al. 2004; Parker & Hay 2005). Outros estudos têm demonstrado evidências que suportam essa hipótese (Agrawal & Kotanen 2003; Parker & Hay 2005). Por exemplo, Agrawal & Kotanen (2003) encontraram maior nível de herbivoria por herbívoros nativos sobre plantas invasoras do que nativas.

Nem sempre espécies invasoras escapam de herbívoros especialistas. Em áreas invadidas, herbívoros nativos podem usar plantas invasoras como recurso por apresentar similares compostos químicos de plantas nativas, assim os herbívoros podem rapidamente acrescentar em sua dieta a nova espécie (Bezemer et al. 2014). Esse é o caso de *C. pallida* que é atacada pelo herbívoro nativo especialista no consumo de APs, *U. ornatrix*. O fato de *C. pallida* não ter compartilhado uma história evolutiva com os herbívoros nativos pode ser uma possível explicação para a ausência de correlação. Pode ser que o tempo de interação entre essa espécie e os herbívoros nativos não seja o suficiente para evolução de estratégias de defesas, principalmente em relação ao herbívoro *E. zinckenella* que até pouco tempo não tinha sido registrado ataque sobre *Crotalaria*.

O quinto cenário está relacionado com o fator causa e efeito. A planta estaria respondendo ao ataque do herbívoro ou os herbívoros que estariam escolhendo as plantas de acordo com a presença e concentração dos compostos defensivos? A nossa hipótese foi elaborada baseando-se na ideia que a planta responderia ao herbívoro, assim, populações com maior incidência relativa do herbívoro especialista apresentariam uma menor concentração de APs e as populações com uma maior incidência do não especialista maior concentração de APs e populações com incidência similares dos dois herbívoros apresentariam níveis intermediários de APs. Entretanto, se os herbívoros estivessem escolhendo as plantas de acordo com a concentração de APs, poderíamos encontrar o inverso: populações com maior incidência do especialista maior concentração de APs e em populações com maior incidência do não especialista menor concentração de APs e populações com incidência similares dos dois herbívoros níveis intermediários de APs. Portanto, se isso estiver ocorrendo ao mesmo tempo pode ser que não seja possível encontrar correlação entre defesas químicas e percentagens de vagens predadas.

No sexto cenário, essa espécie poderia estar investindo em outras formas de defesas que não foram abordadas neste estudo. Espécies de *Crotalaria* possuem outros potenciais compostos defensivos contra herbívoros, tais como: aminoácidos não proteicos (Pilbeam & Bell 1979), lectinas (Rego et al. 2002) e inibidores de protease (Gomes et al. 2005). Além disso, registramos a ocorrência de hemípteros sugadores pentatomídeos, não identificados, em 11 das 20 populações amostradas em janeiro e 14 das 16 em maio. Os pentatomídeos exploram uma variedade de plantas hospedeiras de diversas famílias, principalmente Fabaceae (Panizzi et al. 2012; Smaniotto & Panizzi 2015). Eles são bem conhecidos pela sua importância econômica, devido aos danos causados as culturas de plantas de importância econômica, tais como soja e feijão (Panizzi et al. 2012). Ao atingir as

sementes, os pentatomídeos danificam diretamente os tecidos, tornando-as chochas e enrugadas (Panizzi et al. 2012). Smaniotto & Panizzi (2015) relataram a presença de pentatomídeos se alimentando sobre sementes de espécies de *Crotalaria* dos Neotrópicos, principalmente no Brasil. Contudo, não sabemos se, e como, estes insetos afetam a alocação de defesas químicas e extrínsecas de *Crotalaria*, e nem se são afetados por elas.

3. *Utetheisa ornatrix* induz a produção de alcaloides pirrolizidínicos em *Crotalaria pallida*?

O experimento com o herbívoro especialista *U. ornatrix* revelou evidências que esse herbívoro não induz a produção de APs em sementes verdes de *C. pallida*. Plantas atacadas por larva de *U. ornatrix* não apresentaram maior concentração de APs em comparação ao controle. Estes resultados suportam a nossa hipótese que *C. pallida* não aumentaria a concentração de APs em suas sementes quando predada por *U. ornatrix*, desde que esse herbívoro especialista não é afetado negativamente por estes alcaloides. Arab & Trigo (2011) verificaram que plantas de *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae), quando atacadas por larvas da borboleta especialista *Placidina euryanassa* (Nymphalidae: Danainae: Ithomiini), apresentam baixa concentração de alcaloides tropanos. Esses autores sugeriram que plantas atacadas por especialistas investem preferencialmente em crescimento do que em defesas químicas. Defesas são custosas para plantas, produzi-las somente quando são efetivas pode ser uma forma de poupar recurso que poderá ser usado para crescimento e reprodução (Karban & Baldwin 1997; Strauss et al. 2002). No caso do herbívoro especialista *U. ornatrix*, aumentar o nível de defesa química após um ataque poderia ser atrativo, visto que este herbívoro não é afetado por esses compostos e são capazes de

sequestrar e utilizar em sua própria defesa contra inimigos naturais, além de lhe proporcionar benefício na reprodução (Eisner & Meinwald 1995; Hartmann & Ober 2000; Trigo 2011; Martins et al. 2015). Além disso, *U. ornatatrix* apresenta preferência por alimenta de alta concentração de APs (Hoina et al. 2012). Por exemplo, Poelman et al. (2008b) observaram que herbivoria inicial em *Brassica oleracea* (Brassicaceae), a qual induziu o aumento de defesas químicas, resultou no aumento de tamanho da população do herbívoro subsequente: a mariposa especialista *Plutella xylostella* (Plutellidae). Wei et al. (2015) mostraram que a concentração de APs em espécies de *Jacobaea* não afeta os especialistas *Longitarsus jacobaeae* e *Tyria jacobaeae*. Similarmente, Lankau (2007) observou que o aumento na concentração de sinigrina está correlacionado positivamente com a densidade do herbívoro especialista. Contudo, em contraste aos nossos resultados, Kos et al. (2012) encontraram que o herbívoro especialista *Pieris rapae* induz o aumento na concentração de glicosinolato em *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). Diferenças entre estes dois estudos pode ser explicada pelo efeito da defesa química sobre os herbívoros. *U. ornatatrix* não é afetada pelos APs, enquanto que *Pieris rapae* é afetado negativamente, mas possui mecanismo de detoxificação que lhe garante tolerância aos glicosinolatos (Kos et al. 2012).

Nossos resultados fornecem suporte para a ideia que o impacto das defesas das plantas sobre herbívoros generalistas e especialistas é diferente, e que consequentemente, eles exercem pressões seletivas diferentes sobre as estratégias de defesas das plantas (Van der Meijden 1996; Lankau 2007; Ali & Agrawal 2012).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo é o primeiro neste sistema a investigar as variações nas interações entre *Crotalaria* e seus herbívoros em múltiplas populações e ao longo do ciclo de vida de *C. pallida*. Com isso revelamos que o herbívoro *E. zinckenella* causa tanto dano quanto *U. ornatix* em plantas de *C. pallida*, dependendo da localidade e da época do ano. Além disso, este estudo ressalta a importância da realização de estudos com múltiplas populações, considerando a dinâmica dos herbívoros no contexto temporal.

Podemos concluir que a percentagem de vagens predadas pelo herbívoro especialista *U. ornatix* e o não especialista *E. zinckenella*, assim como as defesas químicas variam tanto no contexto geográfico quanto temporal, entretanto não encontramos correlação da variação de defesa de *C. pallida* com seus herbívoros no contexto geográfico e temporal. As variações nos níveis de defesas química entre as populações de *C. pallida* não são explicadas pela pressão dos herbívoros e nós sugerimos que elas podem ser relacionadas a diferenças nas condições ambientais de cada localidade. Por fim, concluímos que o herbívoro especialista não induz a produção de APs em sementes de *C. pallida*.

REFERÊNCIAS

- Agrawal AA, Kotanen PM (2003) Herbivores and the success of exotic plants: a phylogenetically controlled experiment. *Ecol Lett* 6:712-715
- Ali JG, Agrawal AA (2012) Specialist versus generalist insect herbivores and plant defense. *Trends Plant Sci* 17:293-302
- Arab A, Trigo JR (2011) Host plant invests in growth rather than chemical defense when attacked by a specialist herbivore. *J Chem Ecol* 37:492-495
- Benkman CW (1999) The selection mosaic and diversifying coevolution between crossbills and lodgepole pine. *Am Nat* 153:75-91
- Berenbaum MR, Zangerl AR (1998) Chemical phenotype matching between a plant and its insect herbivore. *Proc Natl Acad Sci* 95:13743-13748
- Bernays EA, Chapman RF (1994) Host-plant selection by phytophagous insects. Chapman and Hall, New York
- Bezemer TM, Harvey JA, Cronin JT (2014) Response of native insect communities to invasive plants. *Annu Rev Entomol* 59:119-141
- Bingley J (1968) Solvent and temperature effects in determination of pyrrolizidine alkaloids with 4-dimethylaminobenzaldehyde. *Anal Chem* 40:1166-1167
- Carmona D, Fornoni J (2013) Herbivores can select for mixed defensive strategies in plants. *New Phytol* 197:576-585
- Castells E, Berhow MA, Vaughn SF, Berenbaum MR (2005) Geographic variation in alkaloid production in *Conium maculatum* populations experiencing differential herbivory by *Agonopterix alstroemeriana*. *J Chem Ecol* 31:1693-1709

- Castillo G, Cruz LL, Tapia-López R, Olmedo-Vicente E, Carmona D, Anaya-Lang AL, et al. (2014) Selection mosaic exerted by specialist and generalist herbivores on chemical and physical defense of *Datura stramonium*. PLoS One 9:e102478
- Cogni R (2010) Resistance to plant invasion? A native specialist herbivore shows preference for and higher fitness on an introduced host. Biotropica 42:188-193
- Cogni R, Futuyma DJ (2009) Local adaptation in a plant herbivore interaction depends on the spatial scale. Biol J Linn Soc 97:494-502
- Cogni R, Trigo JR (2016) Pyrrolizidine alkaloids negatively affect a generalist herbivore feeding on the chemically protected legume *Crotalaria pallida*. Neotrop Entomol DOI 10.1007/s13744-016-0361-6
- Cogni R, Trigo JR, Futuyma DJ (2011) Varying herbivore population structure correlates with lack of local adaptation in a geographic variable plant-herbivore interaction. PLoS One 6:e29220
- Cogni R, Trigo JR, Futuyma DJ (2012) A free lunch? No cost for acquiring defensive plant pyrrolizidine alkaloids in a specialist arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). Mol Ecol 21:6152-6162
- Colautti RI, Ricciardi A, Grigorovich IA, MacIsaac HJ (2004) Is invasion success explained by the enemy release hypothesis? Ecol Lett 7:721-733
- Coley PD, Bryant JP, Chapin FS (1985) Resource availability and plant antiherbivore defense. Science 230:895-899
- Conner WE (2009) *Utetheisa ornatrix*, the ornate arctiid. In: Conner WE (ed) Tiger moths and woolly bears. Behavior, ecology, and evolution of the Arctiidae. Oxford University Press, New York, pp 1-10

- d'Eça-Neves FF, Morellato LPC (2004) Métodos de amostragem e avaliação utilizados em estudos fenológicos de florestas tropicais. *Acta Bot Bras* 18:99-108
- Després L, David JP, Gallet C (2007) The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends Ecol Evol* 22:298-307
- Díaz-Castelazo C, Rico-Gray C, Ortega F, Ángeles G (2005) Morphological and secretory characterization of extrafloral nectaries in plants of coastal Veracruz, Mexico. *Ann Bot* 96:1175-1189
- Dicke M, Sabelis MW (1988) How plants obtain predatory mites as bodyguards. *Neth J Zool* 38:148-165
- Edmonds RP, Borden JH, Angerilli NPD, Rauf A (2000) A comparison of the developmental and reproductive biology of two soybean pod borers, *Etiella* spp. in Indonesia. *Entomol Exp Appl* 97:137-147
- Eisner T (2003) For love of insects. Harvard University Press, Cambridge
- Eisner T, Meinwald J (1995) The chemistry of sexual selection. *Proc Natl Acad Sci* 92:50-55
- Ferro VG, Guimarães PR, Trigo JR (2006) Why do larvae of *Utetheisa ornatrix* penetrate and feed in pods of *Crotalaria* species? Larval performance vs. chemical and physical constraints. *Entomol Exp Appl* 121:23-29
- Flores AS (2004) Taxonomia, números cromossômicos e química das espécies de *Crotalaria* L. (Leguminosae, Papilionoideae) no Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas
- Flores AS, Corrêa AM, Forni-Martins ER, Tozzi AMGA (2006) Chromosome numbers in Brazilian species of *Crotalaria* (Leguminosae, Papilionoideae) and their taxonomic significance. *Bot J Linn Soc* 151:271-277

- Flores AS, Tozzi AMGA, Trigo JR (2009) Pyrrolizidine alkaloid profiles in *Crotalaria* species from Brazil: Chemotaxonomic significance. *Biochem Syst Ecol* 37:459-469
- Fonseca RL, Guimarães PR, Morbiolo SR, Scachetti-Pereira R, Peterson AT (2006) Predicting invasive potential of smooth crotalaria (*Crotalaria pallida*) in Brazilian National Parks based on African records. *Weed Sci* 54:458-463
- Franco MS, Cogni R (2013) Common garden experiments reveal geographical variation in the interaction among *Crotalaria pallida* (Leguminosae: Papilionideae), *Utetheisa ornatatrix* L. (Lepidoptera: Arctiidae), and extrafloral nectary visiting ants. *Neotrop Entomol* 42:223-229
- Gomes CEM, Barbosa AEAD, Macedo LLP, Pitanga JCM, Moura FT, Oliveira AS, et al. (2005) Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitidis capitata* (fruit fly). *Plant Physiol Biochem* 43:1095-1102
- Gotelli NJ, Ellison AM (2004) A primer of ecological statistics. Sinauer Associates, Sunderland, MA
- Grierson D (1990) The Polonovsky reaction. In: Paquette LA (ed) Organic reactions, volume 39. New Jersey, John Wiley and Sons, Inc, pp 85-295
- Guimarães PR, Raimundo RLG, Bottcher C, Silva RR, Trigo JR (2006) Extrafloral nectaries as a deterrent mechanism against seed predators in the chemically protected weed *Crotalaria pallida* (Leguminosae). *Austral Ecol* 31:776-782
- Hartmann T (2004) Plant derived secondary metabolites as defensive chemicals in herbivorous insects: a case study in chemical ecology. *Planta* 219:1-4
- Hartmann T, Ober D (2000) Biosynthesis and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in plants and specialized insect herbivores. *Top Curr Chem* 209:208-231

- Heil M (2015) Extrafloral nectar at the plant-insect interface: a spotlight on chemical ecology, phenotypic plasticity, and food webs. *Annu Rev Entomol* 60:213-32
- Heil M, McKey D (2003) Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 34:425-453
- Hoina A, Martins CHZ, Trigo JR, Cogni R (2012) Preference for high concentrations of plant pyrrolizidine alkaloids in the specialist arctiid moth *Utetheisa ornatrix* depends on previous experience. *Arthropod-Plant Inte* 7:169-175
- Iyengar VK, Rossini C, Hoebeke ER, Conner WE, Eisner T (1999) First record of the parasitoid *Archytas aterrimus* (Diptera: Tachinidae) from *Utetheisa ornatrix* (Lepidoptera: Arctiidae). *Ent News* 110:144-146
- Joshi J, Vrieling K (2005) The enemy release and EICA hypothesis revisited: incorporating the fundamental difference between specialist and generalist herbivores. *Ecol Lett* 8:704-714
- Karban R, Baldwin IT (1997) Induced responses to herbivory. The University of Chicago Press, Chicago
- Keane RM, Crawley MJ (2002) Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. *Trends Ecol Evol* 17:164-170
- Koptur S (1992) Extrafloral nectary-mediated interactions between insects and plants. In: Bernays E (ed) *Insect-plant interactions*, volume IV. CRC Press, London, pp 81-129
- Kos M, Houshyani B, Wietsma R, Kabouw P, Vet LEM, van Loon JJA, Dicke M (2012) Effects of glucosinolates on a generalist and specialist leaf-chewing herbivore and an associated parasitoid. *Phytochemistry* 77:162-170
- Lankau RA (2007) Specialist and generalist herbivores exert opposing selection on a chemical defense. *New Phytol* 175:176-184

- le Roux MM (2011) A taxonomic study of the genus *Crotalaria* L. (Fabaceae, tribe Crotalariaeae) and a modified infrageneric classification system. Thesis, University of Johannesburg, South Africa
- le Roux MM, Boatwright JS, van Wyk BE (2013) A global infrageneric classification system for the genus *Crotalaria* (Leguminosae) based on molecular and morphological evidence. *Taxon* 62:957-971
- Lotfalizadeh H, Hosseini F (2014) Chalcidoid parasitoids (Hymenoptera) of *Etiella zinckenella* (Treitschke) (Lep.: Pyralidae) on *Sophora alopecuroides* L. in Iran. *North-West J Zool* 10:251-258
- Macel M (2011) Attract and deter: a dual role for pyrrolizidine alkaloids in plant-insect interactions. *Phytochem Rev* 10:75-82
- Macel M, Bruinsma M, Dijkstra SM, Ooijendijk T, Niemeyer HM, Klinkhamer PGL (2005) Differences in effects of pyrrolizidine alkaloids on five generalist insect herbivore species. *J Chem Ecol* 31:1493-1508
- Martins CHZ, Cunha BP, Solferini VN, Trigo JR (2015) Feeding on host plants with different concentrations and structures of pyrrolizidine alkaloids impacts the chemical-defense effectiveness of a specialist herbivore. *Plos One* 10: e0141480
- Mattocks A (1967) Spectrophotometric determination of unsaturated pyrrolizidine alkaloids. *Anal Chem* 39:443-447
- Mattocks A (1968) Spectrophotometric determination of pyrrolizidine alkaloids - some improvements. *Anal Chem* 40:1749-1750
- McCullagh P, Nelder JA (1989) Generalized linear models. 2nd Ed. Chapman and Hall, London

- McKee R, Enlow CR (1931) *Crotalaria*, a new legume for the South. USDA Circular 137.
Washington, DC
- Melo M, Silveira EP (1998) Danos da broca-da-vagem *Etiella zinckenella* (Treit.) (Lepidoptera: Pyralidae) em feijoeiro. An Soc Entomol Brasil 27:477-479
- Mooney EH, Tiedeken EJ, Muth NZ, Niesenbaum RA (2009) Differential induced response to generalist and specialist herbivores by *Lindera benzoin* (Lauraceae) in sun and shade. Oikos 118:1181-1189
- Narberhaus I, Zintgraf V, Dobler S (2005) Pyrrolizidine alkaloids on three trophic levels - evidence for toxic and deterrent effects on phytophages and predators. Chemoecology 15:121-125
- Opitz SEW, Müller C (2009) Plant chemistry and insect sequestration. Chemoecology 19:117-154
- Orians CM, Ward D (2010) Evolution of plant defenses in nonindigenous environments. Annu Rev Entomol 55:439-459
- Panizzi AR, Bueno AF, Silva FAC (2012) Insetos que atacam vagens e grãos. In: Hoffman-Campo CB, Corrêa-Ferreira BS, Moscardi F (eds) Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga. Embrapa, Brasília, pp 335-420
- Parker JD, Hay ME (2005) Biotic resistance to plant invasions? Native herbivores prefer non-native plants. Ecol Lett 8:959-967
- Pereira MF, Trigo JR (2013) Ants have a negative rather than a positive effect on extrafloral nectaried *Crotalaria pallida* performance. Acta Oecol 51:49-53
- Peterson M (1997) Host plant phenology and butterfly dispersal: causes and consequences of uphill movement. Ecology 78:167-180

- Pilbeam DJ, Bell EA (1979) Free amino acids in *Crotalaria* seeds. *Phytochemistry* 18:973-985
- Poelman EH, Broekgaarden C, Van Loon JJA, Dicke M (2008b) Early season herbivore differentially affects plant defence responses to subsequently colonizing herbivores and their abundance in the field. *Mol Ecol* 17:3352-3365
- Poelman EH, Galiart RJFH, Raaijmakers CE, van Loon JJA, van Dam NM (2008a) Performance of specialist and generalist herbivores feeding on cabbage cultivars is not explained by glucosinolate profiles. *Entomol Exp Appl* 127:218-228
- Polhill RM (1982) *Crotalaria* in Africa and Madagascar. A. A. Balkema, Rotterdam
- Price PW (1986) Ecological aspects of host plant resistance and biological control: Interactions among three trophic levels. In: Boethel DJ, Eikenbary RD (eds) Interactions of plant resistance and parasitoids and predators of insects. Chichester, Ellis Horwood, pp 11-30
- Rausher MD (2001) Co-evolution and plant resistance to natural enemies. *Nature* 411:857-864
- Rego EJJ, Carvalho DD, Marangoni S, Oliveira B, Novello JC (2002) Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (smooth rattlebox). *Phytochemistry* 60:441-446
- Rossini C, Hoebeke ER, Iyengar VK, Conner WE, Eisner M, Eisner T (2000) Alkaloid content of parasitoids reared from pupae of an alkaloid-sequestering arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). *Ent News* 111:287-290
- Rosumek FB, Silveira FAO, Neves FS, Barbosa NPU, Diniz L, Oki Y, Pezzini F, Fernandes GW, Cornelissen T (2009) Ants on plants: a meta-analysis of the role of ants as plant biotic defenses. *Oecologia* 160:537-549

- Rudgers JA, Strauss SY (2004) A selection mosaic in the facultative mutualism between ants and wild cotton. *Proc R Soc Lond B* 271:2481-2488
- Schoonhoven LM, van Loon JJA, Dicke M (2005) *Insect-plant biology*. Oxford University Press, Oxford
- Segarra-Carmona AE, Barbosa P (1988) Notes on the natural enemies of *Etiella zinckenella* in Puerto Rico. *J Agr U Puerto Rico* 72:152-159
- Sendoya SF, Freitas AVL, Oliveira PS (2009) Egg-laying butterflies distinguish predaceous ants by sight. *Am Nat* 174:134-140
- Singer MS (2008) Evolutionary ecology of polyphagy. In Tilmon K (ed.) *Specialization, speciation, and radiation-evolutionary biology of herbivorous insects*. University of California Press, pp. 29-42
- Smaniotto LF, Panizzi AR (2015) Interactions of selected species of stink bugs (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae) from leguminous crops with plants in the Neotropics. *Fla Entomol* 98:7-17
- Sourakov A (2015) You are what you eat: native versus exotic *Crotalaria* species (Fabaceae) as host plants of the Ornate Bella Moth, *Utetheisa ornatrix* (Lepidoptera: Erebiidae: Arctiinae). *J Nat Hist* 49:2397-2415
- Statsoft, Inc. 2004. Statistica (data analysis software system), version 7. www.statsoft.com.
- Strauss SY (1991) Direct, indirect, and cumulative effects of three native herbivores on a shared host plant. *Ecology* 72:543-558
- Strauss SY, Irwin RE (2004) Ecological and evolutionary consequences of multispecies plant-animal interactions. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 35:435-466
- Strauss SY, Rudgers JA, Lau JA, Irwin RE (2002) Direct and ecological costs of resistance to herbivory. *Trends Ecol Evol* 17:278-285

- Taghizadeh R, Talebi AA, Fathipour Y, Khalghani J (2012) Effect of ten soybean cultivars on development and reproduction of lima bean pod borer, *Etiella zinckenella* (Lepidoptera: Pyralidae) under laboratory conditions. *Appl Ent Phytopath* 79:15-28
- Thompson JN (2005) The Geographic mosaic of coevolution. The University of Chicago Press, Chicago
- Toju H, Sota T (2006) Imbalance of predator and prey armament: geographic clines in phenotypic interface and natural selection. *Am Nat* 167:105-117
- Trigo JR (2011) Effects of pyrrolizidine alkaloids through different trophic levels. *Phytochem Rev* 10:83-98
- van Asch M, Visser ME (2007) Phenology of forest caterpillars and their host trees: the importance of synchrony. *Annu Rev Entomol* 52:37-55
- van der Berg H, Shepard BM, Nasikin (1998) Damage by *Etiella zinckenella* in soybean in East Java, Indonesia. *Int J Pest Manage* 44:153-159
- van der Meijden E (1996) Plant defence, an evolutionary dilemma: contrasting effects of (specialist and generalist) herbivores and natural enemies. *Entomol Exp Appl* 80:307-310
- Van Zandt PA, Agrawal AA (2004) Specificity of induced plant responses to specialist herbivores of the common milkweed *Asclepias syriaca*. *Oikos* 104:401-409
- Volf M, Hreck J, Julkunen-Tiitto R, Novotny V (2015) To each its own: differential response of specialist and generalist herbivores to plant defence in willows. *J Anim Ecol* 84:1123-1132
- Walters DL (2011) Plant defense. Warding off attack by pathogens, herbivores and parasitic plants. Blackwell Publishing Ltd, Oxford

- Wei X, Vrieling K, Mulder PPJ, Klinkhamer PGL (2015) Testing the generalist-specialist dilemma: The role of pyrrolizidine alkaloids in resistance to invertebrate herbivores in *Jacobaea* species. *J Chem Ecol* 41:159-167
- Whalley PES (1973) The genus *Etiella* Zeller (Lepidoptera:Pyralidae): a zoogeographic and taxonomic study. *Bull br Mus nat Hist Entomol* 28:1-58
- Wink M, Mohamed GIA (2003) Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the *rbcL* gene. *Biochem Syst Ecol* 31:897-917
- Zangerl AR, Berenbaum MR (2005) Increase in toxicity of an invasive weed after re-association with its coevolved herbivore. *Proc Natl Acad Sci* 102:15529-15532
- Zong N, Wang C-Z (2007) Larval feeding induced defensive responses in tobacco: comparison of two sibling species of *Helicoverpa* with different diet breadths. *Planta* 226:215-224



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada "**VARIAÇÃO GEOGRÁFICA E TEMPORAL DE DEFESAS EM *Crotalaria pallida* (FABACEAE: PAPILIONOIDEAE: CROTALARIEAE)**", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: Diomar Verçosa
Nome do(a) aluno(a): Diomar Verçosa


Assinatura: José Roberto Trigo
Nome do(a) orientador(a): José Roberto Trigo

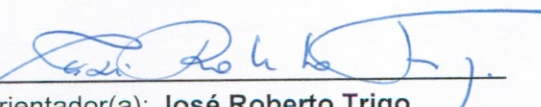
Data: 13/06/2016

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **VARIAÇÃO GEOGRÁFICA E TEMPORAL DE DEFESAS EM *Crotalaria pallida* (FABACEAE: PAPILIONOIDEAE: CROTALARIEAE)**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 13/06/2016

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Diomar Verçosa**
RG n.º 1530491

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **José Roberto Trigo**
RG n.º 9449286