



UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**Aspectos Ecológicos de um Minador
Foliar em *Erythroxylum
tortuosum* Mart. (Erythroxylaceae):
Qualidade da Planta, Anatomia das
Minas e Variação Hierárquica de Traços
Vegetais.**



Paula Roberta De Sibio



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



BOTUCATU – SP
- 2008 -

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE BOTUCATU

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Aspectos Ecológicos de um Minador Foliar em *Erythroxylum tortuosum* Mart. (Erythroxylaceae): Qualidade da Planta, Anatomia das Minas e Variação Hierárquica de Traços Vegetais.

Paula Roberta De Sibio

PROF. DR. MARCELO NOGUEIRA ROSSI

ORIENTADOR

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

BOTUCATU – SP

- 2008 -

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Sibio, Paula Roberta.

Aspectos ecológicos de um minador foliar em *Erythroxylum tortuosum* Mart. (Erythroxylaceae): qualidade da planta, anatomia das minas e variação hierárquica de traços vegetais / Paula Roberta De Sibio. – Botucatu [s.n.], 2008.

Dissertação(mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2008.

Orientador: Marcelo Nogueira Rossi

Assunto CAPES: 20500009

1. Botânica 2. Ecologia vegetal 3. Interações Tróficas

CDD 581.5

Palavras-chave: Anatomia foliar; Cerrado; *Erythroxylum tortuosum*; Herbivoria; Interações inseto-planta; Minador foliar; Qualidade da planta; Variação hierárquica

Dedico

Aos meus pais, Antônio Roberto e Maria Inês

e a minha irmã Maria Teresa, em agradecimento ao incentivo

e compreensão durante toda a minha vida.

Antônio Claudio Gil (tio Claudio) pela imensa ajuda no campo

Ofereço

Agradecimentos

Ao Prof Dr Marcelo Nogueira Rossi, pela orientação, pela enorme paciência, amizade e pelos ensinamentos.

Ao Prof Dr Wesley Godoy pelas aulas na graduação, na pós-graduação e pela participação e dicas na banca de qualificação.

Ao Prof Dr Roberto Antonio Rodella pela ajuda na parte de anatomia do trabalho, por participar das bancas de qualificação e defesa.

À Capes pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

A todos os professores do departamento de Botânica

À Prof^a. Giuseppina Pace P. Lima (Fina) pela gentileza em permitir o uso das instalações de seu laboratório do Depto. de Química e Bioquímica.

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

Aos funcionários do Depto. de Botânica, em especial a secretária Adriana, e ao técnicos Kléber, José Eduardo e Inara, sempre pacientes e prontos para ajudar no que fosse preciso.

Aos funcionários da pós-graduação, Lu, Maria Helena e Serginho, sempre muito prestativos.

Aos especialistas Prof. Dr. Valmir Antônio Costa, Prof^a Dr^a Zuleide Alves Ramiro, ambos do Instituto Biológico, Campinas-SP, e a Prof^a Dr^a Angélica Maria Penteadó Martins Dias, da Univesidade Federal de São Carlos (Ufscar) pela identificação dos insetos parasitóides

À Prof^a. Martha Mischan (Depto. Bioestatística) pela ajuda nas dúvidas estatísticas.

Aos amigos da pós, Carol, Clívia, Dani, Daniel, Débora, Denise, Letícia, Ligia, Ligiane, Marina, Milena, Natalia, Paulinha, Shelly, Tatiane, Tati, Valdir.

A todos do Laboratório de Anatomia e Morfologia Vegetal, a Letícia, Natália e ao Kleber pelas dicas e ajudas, a Clívia por me ajudar com as fotos e a Dani Dias pela imprescindível ajuda na montagem da prancha.

À Gloria Catelan, por esses mais de dois anos de convivência, conversas, ajudas e principalmente pela paciência comigo.

Às amigas de república, Letícia, Lígia, Luciana e Milena por todo esse tempo de convivência e amizade e por entenderem e respeitarem o meu jeito de ser.

Aos amigos da Liga, Cabeça, Élen, Fabi, Fernanda, Giovana, João Junior, Jú Marino, Karininha, Léo, Luciano, Marcelo, Natália, Pedro, Rocco, Simone, Tosti, Vandinha, aprendi muito com todos.

Ao amigo Marcos Ishino, pelas idas ao campo, conversas, conselhos... "Aquele Abraço"

Às pessoas que mais convivi, e enchi a paciência durante todo o mestrado, Débora e Carol, minhas "mãezinhas", sempre me dando conselhos, ajudando no que fosse preciso, se não fossem vocês tudo seria mais difícil. E muito obrigado por me deixarem conviver com a família de vocês, principalmente com as "coisinhas" fofas, Gabriela e Isabela. E obrigada ao Jeferson e ao Hélio por me agüentarem também.

A todos os amigos da Água Nova, minha segunda família, obrigada pelos finais de semana animados, pelas festas e todo apoio.

Às amigas queridas, Carolzinha, Carol B. Élen, Eliriane, Érica, Everly, Gilsara, Letícia, Natália, muito obrigada pelos e-mails, que tornavam o meu dia mais alegre, pelas baladinhas, conversas, conselhos ... Amo vocês !!!

Às amigas, Amanda, Aninha, Ana Luisa, Ana Paula, Camila, Cassiane, Dani, Valéria, Vanessa, estamos um pouco afastadas agora, mas não me esqueço de vocês.

Aos amigos da XXXVII, aprendi muito com vocês durante todos esses anos de convivência e amizade.

Ao Anderson, pelo empréstimo da câmera fotográfica e por agüentar a minha irmãzinha.

À minha família que esteve sempre presente, Vô Abílio, Vó Maria, Vó Tereza e ao tio Cláudio que se não fosse ele eu não terminaria meu trabalho, obrigada pela ajuda e companhia nas coletas.

E as pessoas mais importantes na minha vida, minha base, Mãe, Pai e Maria Teresa, se não fossem vocês eu não chegaria até aqui.... Obrigada por tudo !!!

À Deus, que me permitiu passar por mais essa etapa na minha vida

"Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós."

Antoine de Saint-Exupéry

ASPECTOS ECOLÓGICOS DE UM MINADOR FOLIAR EM *ERYTHROXYLUM TORTUOSUM* MART. (ERYTHROXYLACEAE): QUALIDADE DA PLANTA, ANATOMIA DAS MINAS E VARIAÇÃO HIERÁRQUICA DE TRAÇOS VEGETAIS. 2008. 79 P DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

Resumo - No presente estudo foram investigados diversos aspectos ecológicos provenientes da interação entre *Evippe*, um microlepidóptero minador foliar, e *Erythroxylum tortuosum*, planta típica do Cerrado. Dentre as diversas questões investigadas, este estudo teve três objetivos principais: 1) verificar se a herbivoria provocada pelos minadores pode gerar diferenças na qualidade do recurso, causando variabilidade no sistema; 2) investigar em quais níveis hierárquicos ocorre variações significativas de determinados traços vegetais (químicos e físicos), com e sem a presença de minadores foliares, e 3) determinar se as fêmeas de *Evippe* apresentam preferência de oviposição por folhas de *E. tortuosum* com diferenças no teor de água, no nível de assimetria e na área foliar. O teor de nitrogênio decaiu ao longo das fases de desenvolvimento para todos os tipos de tecido (minado, não minado de folha minada e sadio de folha não minada). No caso dos diferentes tipos de folha, diferenças significativas nos valores médios do teor de nitrogênio nas fases intermediária e final foram observadas, em que o tecido minado apresentou os maiores valores médios. Na fase final, o teor de nitrogênio diferiu significativamente para todos os tipos de tecido, e o maior e menor valor médio foram obtidos para os tecidos minados e tecidos sadios de folhas minadas, respectivamente. No caso do conteúdo de taninos, só houve diferença significativa entre os tipos de tecido em folhas minadas. Constatou-se que a maior variabilidade do teor de nitrogênio ocorreu em nível de planta, seguida por tipo de folha, ficando a variável ‘amostras’ com a menor variabilidade. No caso do conteúdo de taninos, o inverso aconteceu, onde a maior variabilidade foi observada em nível de amostra e a menor variabilidade foi verificada em nível de planta. No caso do teor de água a maior variabilidade encontrada foi em nível de planta, seguida pela variabilidade em nível de folha. No caso da área foliar, a maior variabilidade foi encontrada em nível de folha, aparecendo em seguida o nível de planta; já a assimetria flutuante apresentou grande variabilidade em nível de folha. Portanto, conclui-se que plantas de *E. tortuosum* não podem ser consideradas como “ilhas” de qualidade homogênea, uma vez que variações consideráveis dentro das plantas foram observadas. Conseqüentemente, grandes variações internas devem ocorrer mesmo em plantas de pequeno/médio porte, influenciando o nível de resolução da escolha do recurso pelos herbívoros. Constatou-se também que houve preferência de oviposição em folhas com menores teores de água. No caso da área foliar e AF, não foram encontradas diferenças significativas entre folhas com e sem ovos. Os resultados do presente estudo também mostraram que *E. tortuosum* possui epiderme uniestratificada, células mucilaginosas e papilosas e bordo foliar acuminado. Devido ao exposto, estudos de preferência de oviposição e exploração de recursos devem levar em consideração diversos níveis hierárquicos, buscando-se padrões nas corretas escalas espaciais de observação.

Palavras-chave: Interação inseto-planta, herbivoria, qualidade da planta, níveis hierárquicos, minador foliar, Cerrado, *Erythroxylum tortuosum*.

ECOLOGICAL ASPECTS OF A LEAFMINER IN *ERYTHROXYLUM TORTUOSUM* MART. (ERYTHROXYLACEAE): PLANT QUALITY, MINE ANATOMY AND HIERARCHICAL VARIATION IN PLANT TRAIT. 2008. 79 P DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

Abstract – In this study we investigated several ecological questions from the interaction between the leafminer *Evippe* and *Erythroxylum tortuosum*, a typical plant from Cerrado. Among all aims, the main questions studied were to: 1) verify whether herbivory by leafminers produces variability in resource quality, causing variability into the system; 2) investigate in which hierarchical levels significant variations of some plant traits (physical and chemical) may occur, with and without leafminers, and 3) determine whether *Evippe* females show oviposition preference for *E. tortuosum* leaves with differences in water content, asymmetry levels and leaf area. Nitrogen content decreased throughout leaf development for all leaf tissues (mined, unmined in mined leaf, and healthy tissue in unmined leaf). For all leaf types, significant differences in nitrogen content in intermediary and final developmental phases were observed, in which the mined tissues presented the highest mean values. In the final phase, nitrogen content differed significantly for all types of tissues, and the highest and smallest mean values were verified for mined and healthy tissues from mined leaves, respectively. Tannin contents only presented significant differences between mined and unmined tissues in mines leaves. Large variation in nitrogen content was observed at the plant level, followed by leaf type, and the least variation occurred at the ‘samples’ resolution level. On the contrary, for tannin content large variation occurred at the sample level and least variation was verified at the plant level. For water content the large variability was demonstrated at the plant level, followed by leaf level, and for leaf area, the large variability occurred at the leaf level, followed by plant level. Fluctuating asymmetry was the plant trait that presented large variation at the leaf level. It was concluded that *E. tortuosum* plants cannot be considered as “islands” of homogeneous resource quality, since considerable variation within plants were observed. Hence, internal plant variation may occur even for medium or small plants, influencing the resolution level of resource choice by herbivores. Finally, it was verified that there was a choice for oviposition in leaves with less water content. For leaf area and fluctuating asymmetry differences in oviposition choice were not observed. Results also showed that *E. tortuosum* presents uniseriate epidermis, and mucilaginous and papillary cells, and acuminate leaf edge. Therefore, for studies of oviposition choice and resource exploitation, the hierarchical levels should be taken into account, searching for patterns in the correct spatial scales of observation.

Key-words: Insect-plant interaction, herbivory, plant quality, hierarchical levels, leafminers, Cerrado, *Erythroxylum tortuosum*.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| Introdução Geral | 1 |
| 1. <i>Efeito da qualidade nutricional das plantas em populações de insetos herbívoros</i> | 2 |
| 2. <i>Plantas, insetos herbívoros e parasitóides</i> | 6 |
| 2.1 <i>Considerações gerais sobre a ordem Lepidoptera</i> | 7 |
| 2.2 <i>Algumas considerações sobre insetos parasitóides</i> | 8 |
| 3. <i>Sistema de estudo</i> | 9 |
| 3.1 <i>Cerrado e herbivoria</i> | 9 |
| 3.2 <i>Planta</i> | 11 |
| Objetivos Gerais | 13 |
| Referências Bibliográficas | 14 |
| CAPÍTULO 1 | 22 |
| Biologia e Ecologia de um Minador Foliar em <i>Erythroxylum tortuosum</i> Mart. (Erythroxylaceae): Heterogeneidade do Recurso, Parasitóides Associados e Anatomia das Minas | |
| 1. INTRODUÇÃO | 23 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS | 26 |
| 2.1 <i>Área de estudo</i> | 26 |
| 2.2 <i>Determinação da qualidade nutricional dos tecidos foliares</i> | 26 |
| 2.3 <i>Quantificação do número de minas e ovos por folha</i> | 28 |
| 2.4 <i>Emergência de parasitóides</i> | 28 |
| 2.5 <i>Anatomia das folhas minadas e não minadas</i> | 29 |
| 2.6 <i>Análise de dados</i> | 29 |
| 3. RESULTADOS | 34 |
| 3.1 <i>Variabilidade da qualidade nutricional</i> | 34 |
| 3.2 <i>Observações do número de minas e de ovos por folha</i> | 35 |
| 3.3 <i>Ocorrência de parasitóides</i> | 35 |
| 3.4 <i>Anatomia foliar</i> | 35 |
| 4. DISCUSSÃO | 44 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 50 |

CAPÍTULO 2

55

Níveis Hierárquicos de Variação em Plantas de *Erythroxylum tortuosum* Mart.
(Erythroxylaceae): Traços Físicos e Preferência de Oviposição por um Minador Foliar

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 56 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS | 60 |
| 2.1 Área de estudo | 60 |
| 2.2 Níveis hierárquicos: marcação das plantas, determinação do teor de água, da <i>assimetria flutuante e da área foliar</i> | 60 |
| 2.3 Oviposição | 61 |
| 2.4 Determinação da taxa de crescimento das minas | 62 |
| 2.5 Análise de dados | 62 |
| 3. RESULTADOS | 66 |
| 4. DISCUSSÃO | 71 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 74 |

Introdução

Geral

Introdução Geral

1. Efeito da qualidade nutricional das plantas em populações de insetos herbívoros

Os insetos representam cerca de 57% das espécies existentes no planeta e são muito importantes ecológica e economicamente para o homem. Segundo Strong (1984) 26% da biota é constituída de insetos herbívoros e 22% de plantas. Desta forma, as relações tróficas entre insetos e plantas são fundamentais para a evolução e desenvolvimento dos dois grupos. Muitos aspectos na vida dos insetos tais como, comportamento, fisiologia e ecologia dependem da qualidade do alimento utilizado. Características físicas, morfológicas e químicas das plantas podem alterar o comportamento dos insetos e também interferir na sua biologia, reduzindo sua adaptação e conferindo proteção às plantas (Coley & Barone, 1996).

O processo de herbivoria foliar representa um dos processos funcionais mais importantes em ecossistemas vegetais (Dirzo & Dominguez, 1995; Coley & Barone, 1996). O herbívoro interfere no desempenho da planta através da redução da área de captura de luz, remoção de nutrientes e aumento da incidência de patógenos, ou até mesmo provocando a sua morte (Dirzo, 1984; Dirzo & Dominguez, 1995). De modo geral, plantas estabelecidas em ambientes de estresse hídrico ou nutricional, como nas savanas, tendem a sofrer elevadas taxas de herbivoria foliar (Coley & Barone, 1996), e outros fatores como distribuição e densidade da planta hospedeira, também alteram expressivamente a intensidade da herbivoria. O fogo no cerrado, por exemplo, pode beneficiar a herbivoria, pois induz a um novo crescimento levando a um aparecimento de folhas jovens e vigorosas (Seyffarth *et al.*, 1996).

Sabe-se que as populações de insetos freqüentemente apresentam flutuações em tamanho, e este fato tem gerado diversas especulações sobre quais fatores limitam o tamanho destas populações, principalmente em insetos que apresentam herbivoria. Em sistemas naturais os insetos herbívoros podem ter sua densidade populacional regulada e/ou controlada pela densidade das espécies vegetais e/ou pela ação de inimigos naturais (parasitóides, predadores ou mesmo agentes patogênicos) (Edwards & Wratten, 1981; Pizzamiglio, 1991). Hairston *et al.* (1960) argumentaram que como os herbívoros raramente consomem todos os recursos disponíveis (“o mundo é verde”), suas populações devem ser limitadas pelos inimigos naturais, e não pela abundância de recursos. No entanto, diversos estudos têm demonstrado que as populações de insetos herbívoros podem ser limitadas tanto pelo tipo de recurso disponível (forças do tipo ‘bottom-up’), como pela ação de inimigos naturais (forças

do tipo ‘top-down’) (ex. Roininem *et al.*, 1996; Hunter *et al.*, 1997; Stiling & Rossi, 1997; Turlings & Benrey, 1998; Turchin *et al.*, 1999). Assim, o sucesso no desenvolvimento dos insetos herbívoros está diretamente relacionado à qualidade nutricional das plantas utilizadas como recursos, sendo um exemplo importante de força do tipo ‘bottom-up’ em cadeias tróficas (Price, 1992; Crawley, 1996; Stiling & Rossi, 1997; Stiling, 1999; Gurevitch *et al.*, 2002).

A disponibilidade de nutrientes nas plantas pode influenciar a seleção do hospedeiro pelo inseto. Dentre os macronutrientes, o nitrogênio é considerado de grande importância para a síntese de aminoácidos e proteínas, que são limitantes para a sobrevivência dos insetos (Marschner, 1995). Segundo Kerpel *et al.* (2006), fêmeas de *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera: Nymphalidae) costumam escolher ramos de plantas com maior conteúdo de nitrogênio para oviposição, provocando também um melhor desempenho das larvas.

Considerando que tanto os macronutrientes como os micronutrientes são distribuídos de forma não uniforme entre as plantas, ou mesmo dentro de uma mesma planta, os insetos herbívoros são diferentemente adaptados a explorar as plantas hospedeiras, onde apenas uma parte do recurso disponível é geralmente utilizada como alimento (Strauss & Zangerl, 2002). A combinação do modo de alimentação e diferenças nutricionais entre plantas e partes das plantas implica que dificilmente os insetos herbívoros apresentarão um tempo de desenvolvimento exatamente igual, mesmo em casos de grande especialização entre a planta hospedeira e o inseto herbívoro. Conseqüentemente, tal variabilidade de desenvolvimento é agente causador de heterogeneidade espacial no desenvolvimento e desempenho dos herbívoros tendo, sem dúvida, conseqüências diretas na dinâmica da cadeia trófica (Jolivet, 1998; Herrera & Pellmyr, 2002).

Em particular, a heterogeneidade na qualidade nutricional das plantas pode afetar significativamente o tamanho corporal dos insetos herbívoros (Price, 1992; Teder & Tammaru, 2002; Kagata *et al.*, 2005). Em contrapartida, o tamanho corporal de um inseto adulto é freqüentemente um bom indicador dos parâmetros de história-de-vida (ex: fecundidade, longevidade e sobrevivência), tendo implicações diretas para a dinâmica populacional (Leather, 1988; Nylin & Gotthard, 1998; Awmack & Leather, 2002). No entanto, a maioria dos dados provenientes de estudos que investigam os efeitos da qualidade nutricional das plantas no desempenho de insetos herbívoros é proveniente de estudos conduzidos no laboratório. Conseqüentemente, pouco se sabe sobre os efeitos da variabilidade

da qualidade nutricional das plantas nas variações dos tamanhos corporais em populações naturais de insetos herbívoros (Kaitaniemi *et al.*, 1999). Além disso, Koricheva *et al.* (1998) demonstraram que, dependendo da condição ambiental estudada, tanto plantas vigorosas como plantas sob estresse podem fornecer fontes alimentares adequadas para o desenvolvimento de insetos herbívoros, sendo uma questão que ainda gera controvérsias.

No entanto, além de interferir de forma significativa no desempenho dos insetos herbívoros, a variação da qualidade nutricional das plantas também afeta o terceiro nível trófico, ou seja, os parasitóides e os predadores (Moon *et al.*, 2000; Moon & Stiling, 2002; Teder & Tammaru, 2002; Hunter, 2003; Kagata *et al.*, 2005). Lill *et al.* (2002) demonstraram que as taxas de parasitismo em diversas espécies de Lepidoptera ocorrentes em sistemas florestais do Canadá são fortemente dependentes da planta hospedeira. De fato, os dados analisados por Lill *et al.* (2002) fornecem importantes evidências de que a variação na qualidade nutricional das plantas é determinante para a ecologia populacional dos parasitóides. Por exemplo, plantas de qualidade nutricional inferior devem afetar de forma adversa o crescimento e desenvolvimento de insetos herbívoros. Assim, o longo tempo de desenvolvimento de insetos hospedeiros, associado à baixa qualidade nutricional das plantas, deve aumentar suas chances de exposição aos parasitóides (*slow-growth, high-mortality hypothesis*) (Benrey & Denno, 1997; Lill & Marquis, 2001; Awmack & Leather, 2002; Cornelissen & Stiling, 2005).

Segundo a hipótese de Ehrlich & Raven (1964), as angiospermas, através de mutações ou recombinações ocasionais, passaram a produzir substâncias além das relacionadas com seus processos metabólicos normais, como a fotossíntese e respiração. as quais foram denominadas substâncias secundárias. Algumas dessas substâncias tornavam as plantas menos palatáveis aos insetos herbívoros, constituindo um meio de defesa. As plantas podem estar indisponíveis tanto para o hospedeiro como para o parasitóide devido à ausência ou à baixa disponibilidade de certos componentes químicos (principalmente nitrogênio) necessários ao desenvolvimento destes insetos, bem como à presença de certos aleloquímicos tóxicos e compostos de baixa digestibilidade como os taninos (Barbosa, 1988; Fox *et al.*, 1996). As lesões nos tecidos vegetais causadas pela herbivoria podem desencadear a produção de certos compostos como os terpenóides que atuam nos insetos herbívoros, mas também podem atuar como atrativos para parasitóides, podendo assim ser uma proteção adicional para as plantas (Turlings, 1990). Mas em alguns casos, componentes químicos presentes nas plantas podem ser usados por insetos herbívoros como meio de defesa contra os parasitóides (Pasteels *et al.*,

1989; English-Loeb *et al.*, 1993). Alguns compostos podem servir como aleloquímicos ou como nutrientes, dependendo da sua concentração, da fisiologia do inseto e das condições ambientais, além disso, a distinção entre toxina e redutores de digestibilidade não é bem clara, podendo um aleloquímico afetar de diversas maneiras o desempenho dos insetos herbívoros (Scriber & Slansky, 1981).

As defesas químicas podem ser classificadas como qualitativas e quantitativas. As defesas qualitativas, como por exemplo, alcalóides e glicosídeos são caracterizadas pela toxicidade e estão presentes nos tecidos vegetais em baixas concentrações. As defesas quantitativas têm sua atuação no inseto dependendo da dosagem, geralmente são encontradas em altas concentrações, como por exemplo, o tanino que pode chegar a 60% do peso seco dos tecidos vegetais e atuam como inibidores digestivos, proporcionando proteção contra herbívoros e patógenos (Rhoades, 1979; Stiling, 1999). Os taninos e outros compostos fenólicos são os compostos de defesas mais encontrados nas plantas os quais têm a capacidade de precipitar proteínas e possuem sabor adstringente (Rhoades, 1979). A vegetação do cerrado, por exemplo, por apresentar baixa disponibilidade de nutrientes, investe mais em defesas químicas quantitativas a base de carbono como lignina e tanino (Salatino, 1993).

As plantas possuem também diversas defesas físicas, como cutícula dura ou lisa, espinhos, tricomas e fibras, as quais dificultam a fixação e a alimentação dos insetos. A digestibilidade de plantas fibrosas pelos insetos é geralmente baixa e a concentração de fibras costuma aumentar com a maturação foliar. Portanto, a baixa digestibilidade das folhas maduras pode estar relacionada à grande quantidade de fibras e à redução do conteúdo de nitrogênio e água (Mattson & Scriber, 1987). Segundo White (1984), plantas sob estresse são melhores fontes de alimento aos herbívoros, devido à menor produção de compostos secundários, como taninos e terpenos, que são utilizados como mecanismos de defesa pela planta. De fato, muitos insetos fitófagos freqüentemente alcançam maiores densidades populacionais em plantas que estão sob algum tipo de estresse (Ricklefs, 2003).

O nitrogênio (N) é um dos nutrientes necessários em maior quantidade às plantas superiores, sendo entre todos os elementos minerais o mais limitante ao crescimento. Esse elemento é um constituinte essencial de todos os seres vivos, representa de 1,3 a 6,0 % da massa seca da planta (Marschner, 1995). Aproximadamente 80 a 90% do nitrogênio vegetal estão sob forma de proteínas, definindo o estado nutricional das plantas. Mattson & Scriber (1987) consideram o nitrogênio e a água como importantes mediadores nas relações de

herbivoria. Scriber & Slansky (1981) propuseram que os níveis de água e nitrogênio encontrados nas plantas são correlacionados positivamente com a herbivoria, pois insetos fazem uso dessa fonte alimentar para seu desenvolvimento e sobrevivência. Pode-se ainda ressaltar que plantas que possuem baixo teor de nitrogênio e água tendem a apresentar uma maior riqueza de compostos secundários com base em carbono, como os fenóis e terpenóides (Mattson, 1980).

2. *Plantas, insetos herbívoros e parasitóides*

Nos ecossistemas naturais a grande variedade de estratégias pelas quais os insetos herbívoros obtêm o alimento e o alto grau de especialização que essa relação pode chegar, são aspectos muito importantes segundo Schoonhoven *et al.* (2005). Os insetos herbívoros podem explorar suas plantas hospedeiras de diversas formas; por exemplo, alguns se alimentam externamente, cortando e mastigando os tecidos, outros retiram o recurso por sucção em células individuais ou no sistema vascular das plantas, já outras espécies abrigam-se dentro de estruturas das plantas e consomem tecidos internos, como por exemplo, os minadores e galhadores (Strauss & Zangerl, 2002).

Um aspecto muito importante no estudo da ecologia de insetos minadores é a distribuição dos indivíduos entre as plantas e entre as folhas da espécie hospedeira. Esses estudos são de grande importância, pois revelam mecanismos de escolha do local de oviposição, o que é fundamental para a sobrevivência da progênie desses insetos, devido ao hábito sedentário das larvas (Diniz *et al.*, 2001). Muitos insetos das ordens Coleoptera, Diptera, Hymenoptera e Lepidoptera, possuem hábito minador e em geral a ordem Lepidoptera é a que possui maior diversidade de espécies minadoras, as quais são encontradas principalmente em árvores e arbustos, já os insetos da ordem díptera são mais encontrados em plantas herbáceas (Verdú, 1996). Larvas de insetos, principalmente da família Lepidoptera, são muito utilizadas como hospedeiras por insetos parasitóides, principalmente da ordem Hymenoptera (Onody, 2005)

2.1 Considerações gerais sobre a ordem *Lepidoptera*

É a segunda ordem de insetos em número de espécies descritas, superada apenas pela ordem Coleoptera, e compreende os insetos conhecidos como borboletas e mariposas (Gallo *et al.*, 2002; Lara, 1991). Segundo Buzzi (2002), aproximadamente 150.000 espécies já foram descritas para a fauna mundial e estima-se que o número total de lepidópteros deve chegar a 255.000 espécies. As formas jovens são denominadas larvas, lagartas ou mandruvãs. Os adultos do grupo apresentam asas membranosas cobertas por escamas; antenas alongadas de formas variáveis; olhos compostos grandes e ocelos; abdome cilíndrico, com dez segmentos, sem cercos; metamorfose completa, com número variável de mudas no estágio larval, sendo a maioria de quatro a oito. Seu papel ecológico é de grande importância, seja na fase de ovo ou na fase larval, por participarem de um conjunto de interações tritróficas nos ecossistemas, mediando interações entre o primeiro (plantas) e o terceiro nível trófico (parasitóides e predadores), resultando em sofisticadas relações de adaptação e coevolução, relacionadas às estratégias de ataque e defesa (Jones *et al.*, 2002, Estriga, 2007).

Evolutivamente, a interação planta-herbívoro é provavelmente responsável por grande parte da diversidade terrestre e os lepidópteros constituem a maior radiação entre os insetos fitófagos, com a quase totalidade das lagartas vivendo às expensas de plantas.

A fauna de lepidópteros em plantas do cerrado se insere no padrão da região tropical, ou seja, baixa abundância relativa de cada espécie (Price *et al.*, 1995). Sabe-se que a frequência das lagartas nas plantas é baixa e varia de acordo com a idade relativa das folhas e com a espécie hospedeira, e as espécies mais abundantes em determinada planta parecem ser aquelas com maior especificidade em sua dieta (Diniz & Morais, 1997).

No cerrado, 64% das espécies de lagartas apresentaram especificidade ao hospedeiro, consumindo apenas plantas da mesma família (Marquis *et al.*, 2002). Informações sobre a dieta de lagartas de lepidóptera são escassas. Por exemplo, Janzen (1995) estimou que cerca de 90% das espécies de lagartas da floresta seca no Parque Nacional de Santa Rosa (Costa Rica) estão restritas a uma única espécie de planta (monófagas) ou a espécies dentro de uma mesma família de planta (oligófagas), e as que se alimentam de várias famílias de plantas (polífagas) são bastante raras (Diniz *et al.*, 2001). A especificidade na utilização do recurso parece também estar associada ao hábito de alimentação. Por exemplo, lagartas que se alimentam internamente em tecidos vegetais (ex. minadores, galhadores e broqueadores) e as

que se utilizam de abrigos formados por folhas ou outros materiais, tendem a ter uma dieta mais restrita que as lagartas expostas (Gaston, 1992).

Diniz & Morais (2001) estudaram a composição da fauna e o grau de especificidade da dieta de lagartas de lepidópteros associadas a plantas hospedeiras do cerrado no Distrito Federal. Neste estudo os autores mostraram que cerca de 47% das espécies de lagartas folívoras foram encontradas em apenas uma espécie de planta (monófagas), enquanto 20% foram oligófagas ocorrendo em apenas uma família, e 33% foram polífagas. Os autores ainda ressaltaram que as maiores dificuldades nas análises do grau de especificidade de dieta nos diferentes grupos de mariposas ocorrem devido à escassez de informações sobre suas plantas hospedeiras. Um padrão já detectado no cerrado é a ocorrência do pico de abundância das lagartas na primeira metade da estação seca (maio a junho), quando a pluviosidade é bastante baixa, e bem antes do pico de produção de folhas, que ocorre entre setembro e novembro (Morais *et al.*, 1999, Marquis *et al.*, 2002).

2.2 Algumas considerações sobre insetos parasitóides

O termo parasitóide é utilizado para designar insetos cujas larvas se alimentam sobre ou no interior do corpo de um artrópodo hospedeiro, levando-o quase sempre à morte. O grupo dos parasitóides é constituído principalmente por insetos da ordem Hymenoptera, mas inclui também muitos dípteros. Os adultos são de vida livre, mas ovipositam em, sobre ou perto de outros insetos (Godfray, 1994; Begon *et al.*, 2007).

Os parasitóides podem ser classificados segundo seu crescimento larval em: ectoparasitóides (desenvolvimento externo, alimentando-se através de lesões no tegumento do hospedeiro); endoparasitóides (desenvolvimento e alimentação no interior de um hospedeiro); idiobiontes (a oviposição é feita próxima ou no hospedeiro, que é paralisado ou morto, e do qual a larva emergente se alimenta); e coinobiontes (a oviposição é feita em um hospedeiro que é imobilizado temporariamente). A maioria das espécies são endoparasitóides coinobiontes (Gauld *et al.*, 1992).

Os parasitóides possuem grande importância biológica e ecológica por participarem de mais de 50% das cadeias alimentares terrestres (LaSalle & Gauld, 1991), e estima-se que representam 10% ou mais de todas as espécies do mundo (Begon *et al.*, 2007). Inúmeras espécies de parasitóides têm sido estudadas e utilizadas em programas de controle biológico

de pragas (DeBach & Rosen, 1991; Ives & Hochberg, 2000), mas os estudos da relação entre parasitóides e hospedeiros em espécies nativas são escassos.

3. Sistema de estudo

3.1 Cerrado e herbivoria

Dos ecossistemas brasileiros o Cerrado é o segundo maior bioma, abrangendo mais de 20% da superfície do país, sendo considerado um dos ecossistemas mais ricos do planeta (Ribeiro & Walter, 1998). Durante muito tempo o cerrado foi considerado como área de expansão da fronteira agrícola e desconsiderado quanto à sua riqueza biológica. Com a necessidade de mais áreas de plantio, o cerrado passou a ser ocupado com frequência, ocasionando a fragmentação e a perda da sua biodiversidade (Durigan & Ratter, 2006). Apesar do seu tamanho e importância é um dos ecossistemas mais ameaçados, pois está incluído na lista dos 25 “hotspots”, isto é, áreas com menos de 30% da vegetação original remanescente e com grande endemismo de espécies (Myers *et al.*, 2000).

No Estado de São Paulo, o cerrado ocupava 14% do território no início do século, hoje remanescentes dessa vegetação cobrem menos de 1% do estado. Além de estar sofrendo perdas consideráveis em sua área, o cerrado do Estado de São Paulo vem sofrendo alterações de natureza qualitativa decorrentes da fragmentação e uso da terra, e apenas metade do que restou encontra-se protegida na forma de Unidade de Conservação (Bitencourt & Mendonça, 2004).

O Cerrado apresenta elevada riqueza de espécies, com valores que fazem deste bioma a mais diversificada savana tropical do mundo. Plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas e cipós somam mais de 7.000 espécies (Mendonça *et al.*, 1998), sendo 44% da flora endêmica. A atenção reservada para a conservação do cerrado tem sido baixa, de modo que apenas 2,2% do bioma estão legalmente protegidos em Unidades de Conservação, de proteção integral; e estimativas indicam que pelo menos 20% das espécies endêmicas e ameaçadas permanecem fora dos parques e reservas existentes. Desta forma, o cerrado encontra-se hoje num alto grau de fragmentação e os fragmentos remanescentes apresentam-se como “ilhas”, circundados por pastos ou grandes monoculturas, principalmente de grãos (sobretudo soja), cana-de-açúcar ou árvores exóticas fornecedoras de madeira e celulose (Felfili & Silva Júnior, 2001; Machado *et al.*, 2004; Klink & Machado, 2005). Embora seja um ambiente fragmentado e intensamente

alterado pela ação antrópica, o Cerrado possui uma diversidade biológica elevada e, conseqüentemente, um alto potencial de ocorrência de interações populacionais entre plantas e insetos.

Em muitas interações, diversas espécies de plantas costumam ser hospedeiras de uma grande diversidade de insetos herbívoros, dentre os quais estão os minadores foliares. Algumas relações entre plantas e insetos ocorrem ao acaso, em pequena escala espacial e temporal, apresentando baixa estabilidade, dificultando o seu registro por estudos científicos. Outras, ao contrário, são bem sucedidas e permanecem por longos períodos, tornando-se especializadas (Ehrlich & Raven, 1964; Mopper *et al.*, 2000).

Os insetos representam aproximadamente 28% de toda a biota do Cerrado, apresentando cerca de 90 mil espécies com distribuição complexa, dos quais a ordem Lepidoptera se destaca com aproximadamente 10 mil espécies (Camargo, 2001). Várias espécies de microlepidópteros, que constroem abrigos, são encontradas no cerrado e geralmente são da família Oecophoridae, Tortricidae e Gelechiidae. Esses abrigos levam a um aumento da qualidade da alimentação, proteção contra dessecação e contra predadores e parasitóides (Andrade *et al.*, 1995).

A herbivoria tem um importante impacto no cerrado não só pela influência sobre o crescimento e reprodução das plantas, mas também pela suas interações com os fatores abióticos (Marquis *et al.*, 2002). A longa época seca, a qualidade nutricional muito baixa do solo e as queimadas freqüentes, são fatores abióticos que podem causar estresse e dificultar a vida das plantas no Cerrado (Motta *et al.*, 2002; Miranda *et al.*, 2002; Hoffmann & Moreira, 2002). Sob estresse, não há energia suficiente disponível para os processos de regulação do fenótipo, resultando em erros no desenvolvimento, refletidos por alterações nos traços e padrões dentro dos indivíduos (Escós *et al.*, 1997). Assim, em um determinado ambiente, as perturbações causadas por poluição, pelas variações climáticas, pela baixa disponibilidade de nutrientes, por fatores genéticos (ex. mutação e 'inbreeding') (Møller, 1995), entre outros, podem afetar a expressão do fenótipo ideal de várias maneiras como, por exemplo, alterando o crescimento, a biomassa e a produtividade das plantas, gerando variações morfológicas nos organismos. Diversos estudos têm sugerido que a instabilidade no desenvolvimento (ID) pode ser um indicativo de estresse, refletindo a incapacidade de os organismos controlarem seus processos de desenvolvimento durante a ontogenia e atingirem a expressão ótima do fenótipo pré-determinado (Møller & Swaddle, 1997).

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

3.2 Planta

Erythroxylaceae é uma família de grande representatividade nos cerrados brasileiros, possuindo distribuição subtropical e pantropical, com um único gênero ocorrente na região neotropical: *Erythroxylum* P. Browne (Wanderley *et al.*, 2002). O gênero compreende cerca de 180 espécies neotropicais, sendo que para o Brasil foram listadas 130 espécies em ambientes florestais e de cerrado *sensu lato* (Ribeiro *et al.*, 1999). Reúne representantes arbóreos, arbustivos e subarbustivos com folhas inteiras, glabras, membranáceas a coriáceas, de filotaxia alterna ou oposta e portadoras de estípulas interpeciolares, geralmente persistentes e estriadas no sentido longitudinal (Ribeiro *et al.*, 1999). De acordo com Griffin & Lin. (2000), o interesse pelo gênero intensificou-se no século XIX, após a descoberta das atividades farmacológicas apresentadas pelas folhas de *Erythroxylum coca* Lam., que secularmente eram empregadas pelos indígenas da região andina da América do Sul. Quimicamente, o gênero caracteriza-se pela presença de alcalóides do grupo tropano, dentre os quais destaca-se a cocaína, um alcalóide natural produzido por *E. coca*, que foi empregado como anestésico local em pequenas cirurgias (Griffin & Lin, 2000). Porém, a cocaína ganhou notoriedade por sua atividade psicoativa no Sistema Nervoso Central (SNC), tornando-se um dos grandes problemas de saúde pública da atualidade.

Erythroxylum tortuosum Mart., caracteriza-se como uma planta decídua. A abscisão de folhas inicia-se em meados de junho e a queda total das folhas dá-se por volta de agosto até início de setembro. As folhas jovens expandem-se de forma acentuada principalmente do final de setembro à metade de novembro, quando a fase adulta inicia-se, tornando as folhas coriáceas (Ishino, 2007). *E. tortuosum*, conhecida popularmente como Mercúrio-do-Campo, tanto pelo aspecto ferrugíneo do caule quando descascado como pela coloração avermelhada de seus frutos, é uma planta arbustiva-arbórea típica dos cerrados (Amaral Jr., 1973). Recentemente, constatou-se nas folhas de *E. tortuosum* a ocorrência de um microlepidóptero, *Evippe* sp.2 * (Lepidoptera: Gelechiidae), cuja lagarta é minadora foliar, específica desta planta (Ishino, 2007). Considerando que pouco ainda se conhece sobre a biologia e ecologia destes organismos, estudos de interações tróficas com o sistema em questão são muito importantes para a determinação de padrões e entendimento de possíveis processos que determinam a abundância e distribuição dos insetos e suas plantas hospedeiras no cerrado.

* Este microlepidóptero foi identificado como sendo pertencente ao gênero *Evippe* Chambers, 1873. Como provavelmente se trata de uma nova espécie, o Prof. Dr. Klaus Sattler identificou-a como *Evippe* sp.2, sendo a referência, uma vez que se caracteriza a ocorrência desta espécie em plantas de *E. tortuosum* localizadas no Brasil (região Neotropical)

Objetivos Gerais

O presente estudo teve como objetivos: 1) verificar se a herbivoria provocada pelos minadores pode gerar diferenças na qualidade do recurso, gerando, desta forma, variabilidade no sistema; 2) avaliar se o ataque do minador pode provocar defesa induzida; 3) acompanhar o desenvolvimento das minas foliares com o objetivo de determinar em qual estágio de desenvolvimento ocorre maior variabilidade da qualidade nutricional das folhas; 4) investigar em quais níveis hierárquicos ocorre variações significativas de determinados traços vegetais (químicos e físicos), com e sem a presença de minadores foliares, e 5) determinar se as fêmeas de *Evippe* respondem significativamente as variações nos teores de água das folhas de *E. tortuosum*. Além disso, o presente estudo procurou quantificar a quantidade de minas estabelecidas nas folhas ao longo do desenvolvimento do minador, conhecer as espécies ocorrentes de parasitóides em *Evippe*, estudar a anatomia de folhas minadas e não minadas de *E. tortuosum* e avaliar se a taxa de crescimento das minas e o nível de dano causado por este inseto estão relacionados com os níveis de assimetria flutuante e com a área foliar.

Referências Bibliográficas

- Alados, C.L., Navarro, T., Escós, J., Cabezudo, B. & Emlen, J.M. (2001) Translational and fluctuating asymmetry as tools to detect stress in stress-adapted and nonadapted plants. *International Journal of Plant Sciences* **162**, 607–616.
- Amaral Jr., A. (1973) *O gênero Erythroxyllum no município de Botucatu, São Paulo*. Tese de doutorado em Ciências – Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, Botucatu, SP.
- Andrade, I., Diniz, I.R. & Morais, H.C. (1995) The larva of *Cerconata achatina* (Zeller) (Lepidoptera, Stenomatinae, Oecophoridae): Biology and occurrence on food plants of the genus *Byrsonima* rich. (Malpighiaceae). *Revista Brasileira de Zoologia* **12**, 735-741.
- Awmack, C.S. & Leather, S.R. (2002) Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Annual Review of Entomology* **47**, 817-844.
- Barbosa, P. (1988) Natural enemies and herbivore–plant interactions: influence of plant allelochemicals and host specificity. *Novel Aspects of Insect–Plant Interactions* (eds Barbosa, P. & Letourneau, D.K.), pp. 201–229. New York, Wiley
- Buzzi, Z.J. (2002) *Entomologia didática*. 4º Ed. UFPR editora, Curitiba.
- Begon, M., Townsend, C.R. & Harper, J.L. (2007) *Ecologia: de indivíduos a ecossistemas*. 4.ed. Porto Alegre. Artimed.
- Benrey, B. & Denno, R.F. (1997) The slow-growth-high-mortality hypothesis: a test using the cabbage butterfly. *Ecology* **78**, 987-999.
- Bitencourt, M.D. & Mendonça, R.R. (2004) *Viabilidade de conservação dos remanescentes de cerrado no Estado de São Paulo*. Fapesp.
- Camargo, A.J.A. (2001) Importância das Matas de Galeria para a conservação de lepidópteros do Cerrado. *Cerrado: caracterização e recuperação de matas de galeria*. (eds. J.F. Ribeiro, C.E.L. da Fonseca & J.C. Sousa-Silva), pp. 607-634. MMA, Planaltina: Embrapa Cerrados, Brasília.
- Coley, P.D. & Barone, J.A. (1996) Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**, 305-335.
- Cornelissen, T., Stiling, P. & Drake, B. (2003) Elevated CO₂ decreases leaf fluctuating asymmetry and herbivory by leaf miners on two oak species. *Global Change Biology* **10**, 27–36.
- Cornelissen, T. & Stiling, P. (2005) Perfect is best: low leaf fluctuating asymmetry reduces herbivory by leaf miners. *Oecologia* **142**, 46–56.

- Crawley, M.J. (1996) *Plant ecology*. Blackwell Science, Oxford, UK.
- DeBach, P. & Rosen, D. (1991) *Biological Control by Natural Enemies*, 2nd edn. Cambridge: Cambridge University Press.
- Diniz, I.R. & Morais, H.C. 1997. Lepidopteran caterpillar fauna of Cerrado host plants. *Biodiversity and Conservation* **6**, 817– 836.
- Diniz, I.R., Morais, H.C & Camargo, A.I.A. (2001) Host plant of lepidopteran Caterpillar in the cerrado of Distrito Federal, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia* **45**, 107-122.
- Dirzo, R. (1984) Insect-plant interactions: some ecophysiological consequences of herbivory. *Physiological ecology of plants of the wet tropics* (eds. E. Medina, H.A. Mooney & C. Vázquez-Yanes), pp. 209-224. Dr. Junk Publishers, The Hague.
- Dirzo, R. & Domínguez, C.A. (1995) Plant-herbivore interactions in Mesoamerican tropical dry forests. *Seasonally Dry Tropical Forests* (eds. S.H. Bullock, E. Medina & H.A. Mooney), pp. 304-325. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Durigan, G. & Ratter, J.A. (2006) Successional changes in cerrado and Cerrado/forest ecotonal vegetation in western São Paulo State, Brazil, 1962–2000. *Edinburgh Journal of Botany* **63**, 119–130.
- Edwards, P.J. & Wratten, S.D. (1981) *Ecologia das Interações entre insetos e plantas*. EPU-EDUSP. São Paulo.
- Ehrlich, P.R. & Raven, P.H. (1964) Butterflies and plants: A study in coevolution. *Evolution* **18**, 586–608.
- English-Loeb, G.M., Brody, A.K. & Karban, R. (1993) Host plant mediated interactions between a generalist folivore and its tachinid parasitoid. *Journal of Animal Ecology* **62**, 465-471.
- Escós, J., Alados, C.L. & Emlen, J.M. (1997) The impact of grazing on plant fractal architecture and fitness of a Mediterranean shrub *Anthyllis cytisoides* L. *Functional Ecology* **11**, 66–78.
- Estriga, L. (2007) *Aspectos bionômicos de Geometridae (Lepidoptera) associados à Rapanea umbellata (Mart). Mez. 1902 (Myrsinaceae) na região de São Carlos, SP*. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- Felfili, J.M. & Silva Júnior, M.C. (2001) *Biogeografia do bioma Cerrado: estudo fisionômico da Chapada do Espigão Mestre do São Francisco*. Departamento de Engenharia Florestal, Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília, Brasília.

- Fox, L.R., Kester, K.M. & Eisenbach, J. (1996) Direct and indirect responses of parasitoids to plants; sex ratio, plant quality and herbivore diet breadth. *Entomologia experimentalis et applicata* **80**, 289-292.
- Gallo, D., Nakano, O., Silveira, S., Neto, R.P.L. Carvalho, G.C. Baptista, E. Berti Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.C. Marchini, J.R.S. Lopes & Omoto, C. (2002) *Entomologia agrícola*. 3^o ed. FEALQ, Piracicaba.
- Gaston, K.J. (1992). Regional number of insects and plant species. *Functional Ecology*, **6**, 243–247.
- Gauld, I.D., Gastón, K.J. & Janzen, D.H. (1992) Plant allelochemical, tritrophic interactions and the anomalous diversity of tropical parasitoids: the ‘nasty’ host hypothesis. *Oikos* **75**, 353-357.
- Griffin, W.J. & Lin, G.D. (2000) Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochemistry* **53**, 623-637.
- Godfray, H.C.J. (1994) *Parasitoids, Behavioral and Evolutionary Ecology*. University Press Princeton, New Jersey: Princeton.
- Gurevitch, J., Scheiner, S.M. & Fox, G.A. (2002) *The ecology of plants*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Hairston, N.G., Smith, F.E. & Slobodkin, L.B. (1960) Community structure, population control and competition. *American Naturalist* **94**, 421-425.
- Herrera, C.M. & Pellmyr, O. (2002) Plant-Animal Interactions: An Evolutionary Approach. *Blackwell Publishing*, Oxford, UK.
- Hoffmann, W.A. & Moreira, A.G. (2002) The role of fire in population dynamics of woody plants. In: *The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna* (eds. P.S. Oliveira & R.J. Marquis), pp. 159–177. Columbia University Press, New York.
- Hunter, M.D., Varley, G.C. & Gradwell, G.R. (1997) Estimating the relative roles of top-down and bottom-up forces on insect herbivore populations: a classic study revisited. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **94**, 9176-9181.
- Hunter, M.D (2003) Effects of plant quality on the population ecology of parasitoids. *Agricultural and forest entomology* **5**, 1-8.
- Ishino, M.N. (2007) *Efeito da assimetria flutuante nos padrões de herbivoria de um minador foliar em Erythroxylum totuosum Mart. (Erythroxylaceae)*. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

- Ives, A.R. & Hochberg, M.E. (2000) Conclusions: debating parasitoid population biology over the next twenty years. *Parasitoid Population Biology*. (eds. M.E. Hochberg & A.R. Ives), pp. 278-304. Princeton University Press, New Jersey, U.S.A.
- Janzen, D.H. (1995) The caterpillars and their parasitoids of a tropical dry forest. *The Tachinid Times* **1**, 2-5.
- Jolivet, P. (1998) *Interrelationship Between Insects and Plants*. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.
- Jones, M.T., Castellanos, I. & Weiss, M.R. (2002) Do leaf shelters always protect caterpillars from invertebrate predators? *Ecological Entomology* **27**, 753–757.
- Kagata, H., Nakamura, M. & Ohgushi, T. (2005) Bottom-up cascade in a tri-trophic system: different impacts of host-plant regeneration on performance of a willow leaf beetle and its natural enemy. *Ecological Entomology* **30**, 58-62.
- Kaitaniemi, P., Ruohomäki K., Tammaru, T. & Haukioja, E. (1999) Induced resistance of host tree foliage during and after a natural insect outbreak. *Journal of Animal Ecology* **68**, 382-389.
- Kerpel, S.M., Soprano, E. & Moreira, G.R.P. (2006) Effect of Nitrogen on *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae) and Consequences for Larval Performance and Oviposition in *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera: Nymphalidae). *Neotropical Entomology* **35**, 192-200.
- Klink, C.A. & Machado, R.B. (2005) *A conservação do Cerrado brasileiro. Megadiversidade* **1**, 147-155.
- Koricheva, J., Larsson, S. & Haukioja, E. (1998) Insect performance on experimentally stressed wood plants: a meta-analysis. *Annual Review of Entomology* **43**, 195-216.
- Lara, F.M. (1991) *Princípios de resistência de plantas a insetos*. 2ed., Ícone, São Paulo.
- LaSalle, J. & Gauld, I.D. (1991) Parasitic Hymenoptera and biodiversity crisis. *Redia* **74**, 315-334.
- Leather, S.R. (1988) Size, reproductive potential and fecundity in insects: things aren't as simple as they seem. *Oikos* **51**, 386-389.
- Lempa, K., Martel, J., Koricheva, J., Haukioja, E., Ossipov, V., Ossipova, S. & Pihlaja, K. (2000) Covariation of fluctuating asymmetry, herbivory, and chemistry during birch leaf expansion. *Oecologia*, **122**, 354–360.
- Lill, J.T., & Marquis, R.J. (2001) The effects of leaf quality on herbivore performance and attack from natural enemies. *Oecologia* **126**, 418–428.

- Lill, J.T., Marquis, R.J. & Ricklefs, R.E. (2002) Host plants influence parasitism of Forest caterpillars. *Nature* **417**, 170-173.
- Machado, R.B., Ramos Neto, M.B., Pereira, P.G.P., Caldas, E.F., Gonçalves, D.A., Santos, N.S., Tabor, K. & Steininger, E.M. (2004) *Estimativas De Perda Da Área Do Cerrado Brasileiro*. Relatório Técnico Não Publicado. Conservação Internacional, Brasília, DF.
- Marquis, R.J., Morais, H.C. & Diniz, I.R. (2002) Interactions among cerrado plants and their herbivores: Unique or typical? *The cerrado of Brazil: Ecology and natural history of a neotropical savanna* (eds. P.S. Oliveira & R.J. Marquis), pp.306- 328. Columbia University Press, New York.
- Marschner, H. (1995) *Mineral nutrition of higher plants*. 2ed. San Diego.
- Martel, J., Lempa, K., & Haukioja, E. (1999) Effects of stress and rapid growth on fluctuating asymmetry and insect damage in birch leaves. *Oikos* **86**, 208–216.
- Mattson, W.J. (1980) Herbivory in relations to plant nitrogen content. *Annual review of ecology evolution and systematics* **11**, 119-161.
- Mattson, W.J. & Scriber, J.M. (1987) Nutricional ecology of insects folivores of wood plants: nitrogen, water, fiber and mineral considerations. *Nutricional ecology of insects, mites, spiders and related invertebrates*. (eds. F. Slansky & J.G. Rodriguez), pp. 105-145. 'Wiley-Interscience Publication, CIDADE.
- Mendonça, R.C., Felfili, J.M., Walter, B.M.T., Silva Júnior, M.C., Rezende, A.V., Filgueiras, T.S. & Nogueira, P.E. (1998) Flora Vascular do cerrado. *Cerrado: Ambiente e Flora*. (eds. S.P Almeida & S.M. Sano), pp. 289-306. Embrapa. Planaltina, DF.
- Miranda, H.S., Bustamante, M.M. C. & Miranda, A.C. (2002) The fire factor. *The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna* (eds. P.S. Oliveira & R. J. Marquis), pp. 51–68. Columbia University Press, New York.
- Møller, A.P. (1995) Leaf-mining insects and fluctuating asymmetry in *Ulmus glabra* leaves. *Journal of Animal Ecology* **64**, 697–707.
- Møller, A.P. & Swaddle, J.P. (1997) *Asymmetry, developmental stability and evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- Moon, D.C., Rossi, A.M. & Stiling, P. (2000) The effects of abiotically induced changes in host plant quality (and morphology) on a salt marsh planthopper and its parasitoid. *Ecological Entomology* **25**, 325-331.
- Moon, D.C. & Stiling, P. (2002). The effects of salinity and nutrients on a tritrophic salt-marsh system. *Ecology* **83**, 2465-2476.

- Mopper, S., Stiling, P., Landau, K., Simberloff, D. & Van Zandt, P. (2000) Spatiotemporal variation in leafminer population structure and adaptation to individual oak trees. *Ecology* **81**, 1577–1587.
- Morais, H.C., Diniz, I.R. & Silva, D.M.S. (1999) Caterpillar seasonality in a central Brazilian cerrado. *Revista de Biologia Tropical* **74**, 1025-1033.
- Motta, P.E.F., Curi, N. & Franzmeier, D.P. (2002) Relation of soils and geomorphic surfaces in the Brazilian Cerrado. *The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna* (eds. P.S. Oliveira & R.J. Marquis), pp. 13–32. Columbia University Press, New York.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B. & Kent, J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**, 853–858.
- Nylin, S. & Gotthard, K. (1998) Plasticity in life-history traits. *Annual Review of Entomology* **43**, 63-83.
- Onody, H.C. (2005) Estudo dos Campopleginae (Hymenoptera: Ichneumonidea) neotropicas com ênfase na fauna da Mata Atlântica, Brasil. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais). Universidade Federal de São Carlos, SP.
- Pasteels, J.M., Rowell-Rahier, M. & Raupp, M.J. (1989) Plant-derived defense in chrysomelid beetles. *Novel Aspects of Insect-Plant Interactions* (eds. P. Barbosa & D. Letourneau), pp. 235–272. Wiley New York.
- Pizzamiglio, M.A. (1991) Ecologia das interações inseto-planta. *Ecologia Nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas*. (eds. A. Panizzi & J.R. Parra), pp. 101-121. Manole Ltda., São Paulo.
- Price, P. (1992) Plant resources as the mechanistic basis for insect herbivore population dynamics. *Effects of Resource Distribution on Animal-Plant Interactions* (eds. M.D. Hunter, T. Ohgushi & P.W. Price), pp. 139-173. Academic Press, San Diego, California.
- Price, P.W., Diniz, I.R., Morais, H.C. & Marques, E.S.A. (1995) The abundance of insect herbivore species in the tropics: the high local richness of rare species. *Biotropica* **27**, 468–478.
- Ricklefs, R.E. (2003) *A Economia da Natureza*. 5a. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Ribeiro, J.F. & Walter, B.M.T. (1998) Fitofisionomias do bioma Cerrado. *Cerrado ambiente e flora. Planaltina* (eds. S.M. Sano & S.P. Almeida), pp. 89-166. EMBRAPA/CPAC, Distrito Federal.

- Ribeiro, J.E.L.da S., Hopkins, M.J.G., Vicentini, A., Sothers, C.A., Costa, M.A. da S., Brito, J.M. de, Souza, M.A.D. de, Martins, L.H.P., Lohmann, L.G., Assunção, P.A. C.L., Pereira, E. da C., Silva, C.F. da, Mesquita, M.R. & Procópio, L.C. (1999) *Flora da reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central*. IMPA, Manaus.
- Rhoades, D.F. (1979) Evolution of plant chemical defense against herbivores. *Herbivores their interaction with Secondary Plant Metabolites*. (eds. R.A. Rosenthal & D.H. Jansen), pp. 4-45. Academic Press. New York.
- Roininem, H., Price, P.W. & Tahvanainen, J. (1996) Bottom-up and top-down influences in the trophic system of a willow, a galling sawfly, parasitoids and inquilines. *Oikos* **77**, 44-50.
- Roy, B.A. & Stanton, M.L. (1999) Asymmetry of wild mustard, *Sinapis arvensis* (Brassicaceae), in response to severe physiological stresses. *Journal of Evolutionary Biology* **12**, 440-449.
- Sakai, K.I. & Shimamoto, Y. (1965) Developmental instability in leaves and flowers of *Nicotiana tabacum*. *Genetics*, **51**, 801-813.
- Salatino, A. (1993) Chemical ecology and the theory of oligotrophic escleremorfism. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **65**, 1-13.
- Schoonhoven, L.M., Van Loon, J.J.A. & Dicke, M. (2005) *Insect-Plant Biology*. 2nd edition. Oxford University Press Inc., New York.
- Scriber, J.M. & Slansky J.R.F. (1981) The nutritional ecology of immatures artropods. *Annual Review Entomology* **26**, 183-211.
- Seyffarth, J.A., Calouro, A.M. & Price, P.W. (1996) Leaf roller in *Ouratea hexasperma* (Ochanaceae): Fire effect and the plant vigor hypothesis. *Revista Brasileira de Biologia* **56**, 135-137.
- Souza, V.C. & Lorenzi, H. (2005) *Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da Flora Brasileira, baseado em APG II*. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Stiling, P.D. (1999) *Ecology: theories and applications*. Prentice Hall, New Jersey, NJ.
- Stiling, P & Rossi, A.M. (1997) Experimental manipulations of top-down and bottom-up factors in a tri-trophic system. *Ecology* **78**, 1602-1606.

- Strauss, S.Y. & Zangerl, A.R. (2002) Plant-insect interactions in terrestrial ecosystems. *Plant-Animal Interactions: An Evolutionary Approach* (eds. C.M. Herrera & O. Pellmyr), pp. 77-106. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Strong, D.R., Lawton, J.H. & Southwood, S.R. 1984. Insect on plants, Community patterns and mechanisms. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Teder, T. & Tammaru, T. (2002) Cascading effects of variation in plant vigour on the relative performance of insect herbivores and their parasitoids. *Ecological Entomology* **27**, 94-104.
- Townsend, C.R., Begon, M. & Harper, J.L. (2006) *Fundamentos em Ecologia*. 2. ed. Artmed, Porto Alegre.
- Turchin, P., Taylor, A.D. & Reeve, J.D. (1999) Dynamical role of predators in population cycles of a forest insect: an experimental test. *Science* **285**, 1068-1071.
- Turlings, T.C.J., Tumlinson, J.H. & Lewis, W.J. (1990) Exploitation of herbivore-induced plant odors by host seeking parasitic wasps. *Science* **250**, 1251-1253.
- Turlings, T.C.J. & Benrey, B. (1998) Effects of plant metabolites on the behavior and development of parasitic wasps. *Ecoscience* **5**, 321-333.
- Ueno, H. (1994) Fluctuating asymmetry in relation to two fitness components, adult longevity and male mating success in a ladybird beetle, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Journal Ecology Entomology* **19**, 87-88.
- Verdú, M.J. (1996). Chalcidoidea (Hymenoptera), parásitos del minador de los cítricos *Phyllocnistis citrella* (Stainton). *Levante Agrícola* **335**, 227-230.
- Vinson, S.B. & Barbosa, P. (1987) Interrelationships of nutritional ecology of parasitoids. *Nutritional Ecology of Insects, Mites and Spiders and Related Invertebrates* (eds. F. Slansky & J.G. Rodrigues), pp. 673-695. Wiley, New York.
- Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J. & Giuliatti, A.M. (2002) *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. Volume 2. HUCITEC/ FAPESP, São Paulo, SP.
- White, T.C.R. (1984) The abundance of invertebrate herbivory in relation to the availability of nitrogen in stressed food plants. *Oecologia* **63**, 90-105.
- Zvereva, E.L., Kozlov, M. & Haukioja, E. (1997) Stress responses of *Salix borealis* to pollution and defoliation. *Journal of Applied Ecology* **34**, 1387-1396.
- Zvereva, E.L. & Rank, N.E. (2003) Host plant effects on parasitoid attack on the leaf beetle *Chrysomela lapponica*. *Oecologia* **135**, 258-266.

CAPÍTULO 1

Biologia e Ecologia de um Minador Foliar em *Erythroxylum tortuosum* Mart. (Erythroxylaceae): Heterogeneidade do Recurso, Parasitóides Associados e Anatomia das Minas

1. Introdução

Dos ecossistemas brasileiros, o Cerrado é o segundo maior bioma abrangendo mais de 20% da superfície do país (Ribeiro & Walter, 1998), sendo também considerado um dos ecossistemas mais ricos do planeta. Embora seja um ambiente fragmentado e intensamente alterado pela ação antrópica (Felfili & Silva Júnior, 2001), o Cerrado possui uma diversidade biológica elevada e, conseqüentemente, um alto potencial de ocorrência de interações populacionais entre plantas e insetos.

As relações tróficas entre insetos e plantas são fundamentais para a evolução e desenvolvimento dos dois grupos, pois muitos aspectos na vida dos insetos, tais como comportamento, fisiologia e ecologia, dependem da qualidade do recurso (Pizzamiglio, 1991). O termo “qualidade da planta” refere-se aos componentes da planta hospedeira que afetam positiva ou negativamente o desempenho de insetos herbívoros, como os níveis de carbono, nitrogênio e compostos de defesa (Awmack & Leather, 2002).

Os insetos minadores geralmente não são capazes de trocar de sítio de alimentação (Stiling, 1999), portanto, a escolha inicial do recurso é essencial para o sucesso no seu desenvolvimento, e o inseto pode então exercer uma forte seleção por melhores plantas hospedeiras (Rice & Hostert, 1993). O nitrogênio (N) é um dos nutrientes necessários em maior quantidade às plantas superiores (Tischner, 2000), sendo entre todos os elementos minerais o mais limitante ao crescimento (Williams & Miller, 2001), já que é de grande importância para a síntese de aminoácidos e proteínas, que são limitantes para a sobrevivência dos insetos (Marschner, 1995).

A resistência das plantas ao ataque por insetos é devida às características nutritivas, morfo-anatômicas e às substâncias secundárias (Edwards & Wratten, 1981). A vegetação do cerrado, por se deparar com baixa disponibilidade de nutrientes, investe mais em defesas químicas quantitativas com base em carbono como lignina e taninos. Uma das características dos taninos é a capacidade de precipitar proteínas e o sabor adstringente (Salatino, 1993). A herbivoria é comumente maior em folhas jovens que apresentam concentração alta de nutrientes e baixa de compostos secundários, sendo atrativas a herbívoros (Coley & Barone, 1996). Além de interferir de forma significativa no desempenho dos insetos herbívoros, a variação da qualidade nutricional das plantas também afeta o terceiro nível trófico, ou seja, os parasitóides e os predadores (Moon *et al.*, 2000; Moon & Stiling, 2002; Teder & Tammaru, 2002; Hunter, 2003; Kagata *et al.*, 2005). Os parasitóides podem ser utilizados como grupo

indicador do grau de preservação ambiental, para avaliar os efeitos das atividades antropogênicas nos ecossistemas e para estimar a riqueza de espécies em uma determinada região; entretanto, para um organismo tornar-se um bioindicador, é necessário um bom conhecimento de sua biologia, do ecossistema ao qual está associado e das interações que o envolvem (Whitfield & Lewis, 1999).

Sabe-se que variações na concentração de certos compostos químicos nas plantas podem ocorrer devido à herbivoria por insetos (ex. Sagers, 1992; Denno *et al.*, 2000; Ohgushi, 2005; Sugiura *et al.*, 2006). Portanto, durante o desenvolvimento dos insetos herbívoros modificações nas concentrações de determinados compostos químicos podem ocorrer nas plantas hospedeiras, uma vez que recursos são adquiridos pelos insetos e a produção de compostos de defesa pelas plantas pode ser intensificada em resposta à herbivoria, concentrando, em alguns casos, mais compostos de defesa nas partes mais atacadas, processo este conhecido como defesa induzida (Denno *et al.*, 2000; Ohgushi, 2005; Stout *et al.*, 1996; Karban & Baldwin, 1997). Desta forma, durante o desenvolvimento dos insetos minadores espera-se um aumento da variabilidade das características químicas das folhas na população, gerando heterogeneidade ambiental em pequenas escalas espaciais. No entanto, pouco se sabe sobre o nível de variabilidade no habitat causado por estes insetos.

Erythroxylum tortuosum Mart. caracteriza-se como uma planta decídua e a abscisão de folhas inicia-se em meados de junho, e a queda total das folhas dá-se por volta de agosto até início de setembro. Nas folhas desta planta ocorre a formação de minas provocadas pela infestação das lagartas do microlepidóptero *Evippe* (Lepidoptera: Gelechiidae), sendo este minador específico para esta planta (Ishino, 2007). Considerando que os minadores foliares são organismos sésseis (Stiling, 1999), ou seja, que permanecem no interior de suas minas até a emergência do adulto, sistemas formados por minadores e suas plantas hospedeiras são apropriados para testar hipóteses relacionadas a variações na qualidade nutricional do recurso ao longo do desenvolvimento destes insetos.

Hipóteses:

As seguintes hipóteses foram investigadas:

- 1) Diferenças na concentração de nutrientes entre folhas minadas e não minadas, podem estar associadas ao consumo de recursos pelos minadores, aumentando a concentração destes recursos em folhas não minadas, causando variabilidade (Strauss & Zangerl, 2002).
- 2) Defesa induzida e heterogeneidade: devido ao ataque de minadores, folhas contendo minas podem apresentar maiores concentrações de taninos do que folhas sem minas (Stout *et al.*, 1996; Karban & Baldwin, 1997; Stiling, 1999), gerando heterogeneidade.
- 3) Mudanças na qualidade nutricional das folhas ao longo do desenvolvimento dos minadores: maiores níveis de variabilidade na qualidade nutricional das folhas devem ocorrer em fases mais avançadas de desenvolvimento do minador, pois uma quantidade maior de recurso já foi consumida e o tempo de resposta da planta para produzir mais defesas é maior.
- 4) Nível de variabilidade: traços químicos das plantas devem variar consideravelmente em magnitude quando comparados com outras fontes de variabilidade ambiental, as quais pertencem a diversos níveis de resolução espacial.

Objetivos específicos

Os seguintes objetivos específicos, relacionados a aspectos básicos da biologia e ecologia dos organismos envolvidos, foram determinados: 1) investigar a quantidade de minas estabelecidas nas folhas ao longo do desenvolvimento do minador; 2) conhecer as espécies ocorrentes de parasitóides em *Evippe* e 3) estudar a anatomia de folhas minadas e não minadas de *E. tortuosum*.

2. Materiais e Métodos

2.1 Área de estudo

Foram observados indivíduos de *E. tortuosum* (Fig. 1) ocorrentes em fragmento de cerrado *sensu stricto* (176,7 ha) pertencente à Fazenda Palmeira-da-Serra (22°48'50" S; 48°44'35" W). O fragmento está localizado na altura do km 218 da rodovia João Mellão (SP-255), nas proximidades do município de Pratânia, Estado de São Paulo. O local de estudo está circundado por áreas de ação antrópica, com cultivo de soja, eucalipto, *Pinus* e cana-de-açúcar (Fig. 2).

A figura 3 apresenta uma foto mostrando parte do fragmento que foi utilizado para estudo. As plantas foram marcadas ao acaso através da delimitação de quatro transectos (150m para o interior do fragmento por 20m de largura). Cada planta foi devidamente marcada [numeradas em placas de metal (5cm x 5cm)], permitindo o conhecimento da origem de todo o material biológico analisado e coletado para estudo. Indivíduos de referência de *E. tortuosum* estão depositados no Herbário "Irina Delanova de Gemtchujnicov", sob o número de registro BOTU 16869.

2.2 Determinação da qualidade nutricional dos tecidos foliares

Folhas minadas (Fig. 4) e a mesma quantidade de folhas não minadas foram retiradas ao acaso de cada planta com as minas em fase inicial de desenvolvimento. As folhas foram colocadas individualmente em sacos de papel e levadas ao laboratório, onde as folhas minadas foram dissecadas sob estereomicroscópio (Nikon SMZ 800 equipado com câmera de vídeo digital). Os tecidos minados e os tecidos não minados provenientes de folhas minadas foram separados e homogeneizados em duas amostras distintas. As folhas não minadas foram então homogeneizadas em uma terceira amostra. Portanto, três tipos de amostra foram obtidos: 1) tecidos minados; 2) tecidos sadios de folhas minadas, e 3) tecidos sadios de folhas não minadas. Após secagem em estufa, as amostras foram pesadas (balança analítica) para a obtenção do peso seco. No momento da retirada dos tecidos minados, as lagartas do minador, quando presentes, eram também retiradas e descartadas para não influenciarem nas análises bioquímicas.

Após a determinação da matéria seca, cada amostra foi triturada até a obtenção de um pó fino e 250 mg de tecido seco foi utilizado para a extração de taninos (50 mg) e determinação do conteúdo de nitrogênio (200 mg). A concentração de taninos foi quantificada por espectrofotometria (Giner-Chavez *et al.*, 1997) e o conteúdo de nitrogênio determinado utilizando-se o método de "Kjeldahl" (AOAC, 1995). Uma média de três réplicas por amostra foi utilizada para todas as análises bioquímicas e, conseqüentemente, para as análises estatísticas. Portanto, valores médios dos conteúdos de nitrogênio e taninos* foram obtidos. Todo o procedimento descrito acima foi repetido mais duas vezes, ou seja, para folhas minadas coletadas em fase intermediária e em fase final de desenvolvimento. Para padronizar as fases inicial, intermediária e final de desenvolvimento da mina, a fenologia e a oviposição foram consideradas. Logo após a oviposição que teve início em novembro, as folhas foram acompanhadas periodicamente até a constatação dos primeiros sinais da mina, sendo esta considerada como a fase inicial de desenvolvimento, que ocorreu em meados de janeiro e estendeu-se até fevereiro. Conhecendo-se a fenologia da planta era sabido que as plantas começavam a abscisão foliar em meados de junho e que o minador tem seu desenvolvimento larval sincronizado com a fenologia da planta. Assim, os meses de março e abril foram considerados como período de desenvolvimento intermediário. Nos dois meses subsequentes notou-se que as minas praticamente não desenvolviam-se mais e esse período foi considerado como de estágio final de desenvolvimento da mina, pois provavelmente a lagarta já tinha parado de se alimentar e entrado no estágio de pré pupa. Para efeito comparativo, nestas coletas também foram coletadas folhas sadias, ou seja, sem a presença de minas. Foram coletadas 179, 128 e 46 folhas minadas e a mesma quantidade de folhas não minadas, para as fases inicial, intermediária e final, respectivamente, as quais foram utilizadas para as análises bioquímicas.

Na mesma população de plantas da etapa descrita acima, 14 folhas minadas e a mesma quantidade de folhas não minadas foram coletas de cada planta, de um total de oito plantas selecionadas ao acaso. Essa coleta foi feita quando as minas já se encontravam estabelecidas nas plantas, ou seja, quando possuíam tamanho semelhante às minas caracterizadas na etapa anterior como em estágio intermediário. Este procedimento foi adotado justamente porque já se verificava uma tendência de aumento da variabilidade da qualidade do recurso nos estágios mais avançados de desenvolvimento do minador (ver Resultados). Pretendia-se fazer uma

* As análises bioquímicas foram realizadas no laboratório do Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu, com auxílio da Profa. Dra. Giuseppina Pace Pereira Lima.

nova coleta de folhas em fase final de desenvolvimento, mas a queda de folhas e o desbaste provocado pela própria coleta inviabilizaram a obtenção de uma quantidade suficiente de folhas para as análises bioquímicas. Como acima, as folhas foram colocadas individualmente em sacos de papel e levadas ao laboratório, onde as folhas minadas foram dissecadas sob estereomicroscópio (Nikon SMZ 800 equipado com câmera de vídeo digital). Os tecidos não minados provenientes de folhas minadas e não minadas foram separados e homogeneizados em duas amostras distintas. Neste caso não foi possível obter tecidos minados, uma vez que a quantidade de tecido seco foi insuficiente para a realização das análises bioquímicas em nível de planta. Assim, dois tipos de amostra foram obtidos para cada planta: 1) tecidos sadios de folhas minadas, e 2) tecidos sadios de folhas não minadas. Após secagem em estufa, as amostras foram pesadas (balança analítica) para a obtenção do peso seco e os conteúdos de nitrogênio e taninos foram determinados como descrito anteriormente, com três réplicas por amostra.

2.3 Quantificação do número de minas e ovos por folha

Durante a dissecção das minas para a retirada dos tecidos que foram utilizados nas análises bioquímicas, registrou-se o número de minas por folha. Em seguida, as proporções de folhas com os respectivos números de minas foram calculadas. Estes dados foram obtidos para folhas em fase inicial, intermediária e final de desenvolvimento. No ciclo seguinte do minador, no início do período de oviposição, 149 folhas contendo ovos foram selecionadas ao acaso na população, registrando-se, no campo, o número de ovos por folha. Em seguida, a distribuição de frequência do número de ovos por folha foi observada. A quantificação do número de ovos foi feita com o objetivo de fornecer uma estimativa da mortalidade do minador na fase inicial de desenvolvimento, através da comparação entre a quantidade média de ovos por folha e as proporções de folhas com as respectivas quantidades de minas.

2.4 Emergência de parasitóides

Para a determinação das fases de ocorrências dos parasitóides, foram feitas coletas quinzenais de folhas minadas de novembro de 2006 (minas foliares em estágio inicial de desenvolvimento) a junho de 2007 (minas foliares em estágio final de desenvolvimento), totalizando um total de 332 folhas minadas coletadas. Após as coletas as folhas foram levadas

ao laboratório e individualizadas em potes plásticos [$28 \pm 1^\circ \text{C}$ (fotofase de 12 horas)], contendo algodão umedecido na extremidade do pecíolo, (Fig. 5) A emergência de parasitóides foi observada e quantificada periodicamente. Os parasitóides foram conservados em álcool 70% e, quando observada a emergência de minadores adultos, estes foram conservados a seco. Os parasitóides foram identificados pelo Prof. Dr. Valmir Antônio Costa, pela Prof^a Dr^a Zuleide Alves Ramiro, ambos do Instituto Biológico, Campinas-SP, e pela Prof^a Dr^a Angélica Maria Penteado Martins Dias, da Universidade Federal de São Carlos (Ufscar). Os períodos de ocorrência dos parasitóides foram então apresentados graficamente.

2.5 Anatomia das folhas minadas e não minadas

Três plantas foram selecionadas ao acaso na área de estudo, cinco folhas minadas e cinco folhas não minadas de cada planta foram coletadas. As folhas foram levadas ao laboratório e fixadas em solução de FAA 50 (Johansen, 1940), sendo armazenadas em etanol 70%. As amostras foram desidratadas em série etílica, infiltradas em metacrilato (Leica®) segundo o protocolo do fabricante. Os cortes foram feitos em micrótomo rotatório (espessura de $8\mu\text{m}$), corados com azul de toluidina 0,05%, pH 4,7 (O'Brien *et al.*, 1964), as lâminas permanentes foram montadas em resina sintética (Permout), analisadas em microscopia de luz e fotografadas através de fotomicroscópio, Com as fotos obtidas foi elaborada uma prancha com as principais características das folhas minadas e não minadas.

2.6 Análise de dados

Comparações dos valores médios dos conteúdos de nitrogênio e taninos entre tecidos sadios de folhas minadas, tecidos minados e tecidos sadios de folhas não minadas, foram feitas através de Análises de Variância com uma classificação hierárquica de um dos fatores, tipo de tecido, agrupado dentro de outro fator, tipo de folha (*nested design*) (Gotelli & Ellison, 2004). Este agrupamento foi feito apenas para as folhas minadas, uma vez que os dois tipos de tecido só poderiam estar presentes neste tipo de folha. Considerando que a variável 'tipo de tecido' foi agrupada na variável 'tipo de folha', análises das interações entre os fatores foram feitas apenas entre as variáveis 'fase de desenvolvimento das minas' e 'tipo de tecido' (com agrupamento no tipo de folha), possibilitando comparações pareadas de nove valores médios. Quando diferenças significativas foram encontradas, o teste para comparação de médias de

Tukey (HSD *post hoc*) foi aplicado (Zar, 1999). Um Modelo Linear Generalizado (GLM) foi aplicado ajustando as variáveis de resposta (nitrogênio e taninos) às variáveis explicativas. Estas análises foram feitas usando o sistema SAS para Windows (SAS, 2001).

O modelo empregado corresponde ao de uma análise conjunta de ensaios, “fases”, cada ensaio seguindo um delineamento em classificações hierárquicas, com os fatores “folhas” e “tecidos dentro de folhas”. Cada dado experimental obtido (y_{ijkl}) pode ser representado pelo modelo:

$$y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \lambda_{k(j)} + (\alpha\lambda)_{ik(j)} + e_{ijkl}$$

onde,

μ = média geral,

α_i = efeito da i -ésima fase,

β_j = efeito da j -ésima folha,

$\lambda_{k(j)}$ = efeito do k -ésimo tecido dentro da j -ésima folha,

$(\alpha\lambda)_{ik(j)}$ = efeito da interação fase x tecido dentro de folha,

e_{ijkl} = erro experimental associado à parcela ($ijkl$).

A coleta de folhas em nível de planta teve como objetivo principal comparar a variação em três níveis hierárquicos, ou seja, verificou-se a variação dos conteúdos de nitrogênio e taninos entre plantas, entre folhas e entre as diferentes amostras. Desta forma, foi possível saber qual a contribuição de cada nível hierárquico para a variabilidade dos conteúdos de nitrogênio e taninos. Para tanto, foi feita a análise dos componentes da variância para efeitos randômicos (níveis hierárquicos de variação) (Gotelli & Ellison, 2004; Crawley, 2005), promovendo assim a repartição da variância. A variável ‘tipo de folha’ (com ou sem minas) foi agrupada (*nested design*) na variável planta, sendo que esta última foi considerada como variável randômica. Através da repartição da variância, a proporção com que cada nível hierárquico contribui para a variância total é conhecida. A proporção da variância (PV) é calculada por $PV = S^2_E / (S^2_E + S^2_D)$, em que S^2_D representa a variância dentro de um grupo, e S^2_E representa a variância entre os grupos (Gotelli & Ellison, 2004). Um alto valor de PV, também conhecido como coeficiente de correlação intraclass (Zar, 1999), representa o caso onde a maior parte da variância está entre os grupos e não dentro destes. Estas análises foram feitas usando o sistema R para Windows, versão 2.7.1 (R, 2008). Após a estimativa da

proporção da variância para cada nível hierárquico, os respectivos intervalos de confiança (95%) foram obtidos por *bootstrap* (1000 simulações) pelo programa BioEstat 5.0 (Ayres, 2007).

Por fim, as proporções de folhas contendo uma, duas ou três minas em cada fase de desenvolvimento foram comparadas pelo teste-*G* com correção de Williams (Gotelli & Ellison, 2004).



Fig. 1. Indivíduos de *E.tortuosum* em fragmento de cerrado. **A.** Indivíduo com primórdios foliares e botões florais. **B.** Indivíduos com folhas adultas.



Fig. 2. Fragmento de cerrado, circundado por área de ação antrópica (cultivo de cana-de-açúcar)



Fig. 3. Vista parcial do fragmento de cerrado utilizado no estudo pertencente à reserva particular “Fazenda Palmeira-da-Serra”, município de Pratânia-SP.



Fig. 4. Folha minada de *E. tortuosum*, seta indicando a mina.

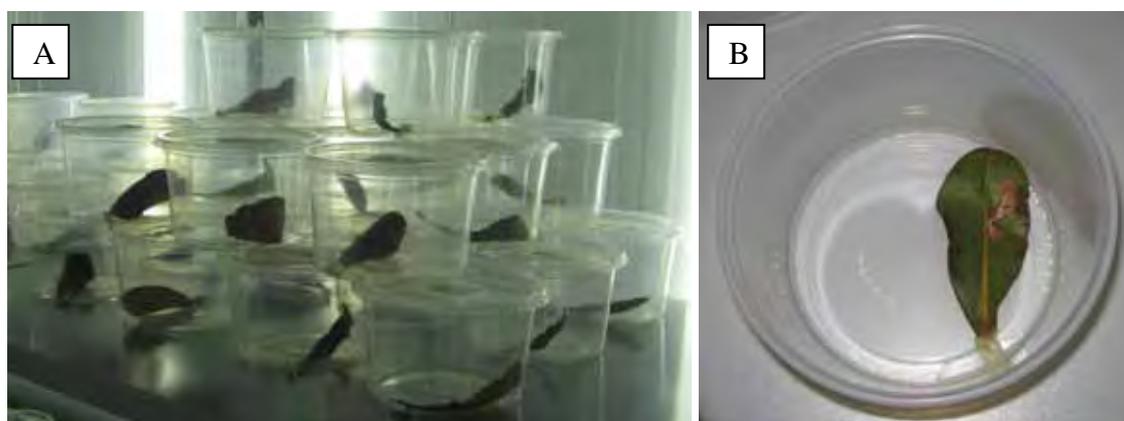


Fig. 5. A. Folhas individualizadas em potes plásticos B. Folha contendo algodão umidecido na extremidade do pecíolo

3. Resultados

3.1 Variabilidade da qualidade nutricional

Os resultados das análises mostraram que o teor (%) de nitrogênio diferiu significativamente entre as fases de desenvolvimento das minas, entre os diferentes tipos de folha, entre os tipos de tecido e quando a interação “fases de desenvolvimento e tipos de tecido” foi considerada (Tabela 1 e Fig. 6). Constatou-se que o teor médio de nitrogênio decaiu ao longo das fases de desenvolvimento para todos os tipos de tecido, embora o teor de nitrogênio dos tecidos minados tenha caído muito pouco da fase intermediária para a final (Fig. 6). No caso dos diferentes tipos de folha, diferenças significativas nos valores médios do teor de nitrogênio nas fases intermediária e final foram observadas, em que o tecido minado apresentou os maiores valores médios (Fig. 6). Na fase intermediária, o teor de nitrogênio foi significativamente maior nos tecidos minados do que nos tecidos sadios das folhas minadas, sendo esta a única diferença encontrada (Fig. 6). No entanto, na fase final, o teor de nitrogênio diferiu significativamente para todos os tipos de tecido, e o maior e menor valor médio foram obtidos para os tecidos minados e tecidos sadios de folhas minadas, respectivamente (Fig. 6). No caso do conteúdo de taninos, só houve diferença significativa entre os tipos de tecido em folhas minadas (Tabela 2; Fig. 7). Neste caso, o tecido sadio apresentou maior valor médio do que o tecido minado (Fig. 7).

No caso das análises das proporções da variância, constatou-se que a maior variabilidade do teor de nitrogênio ocorreu em nível de planta, seguida por tipo de folha, ficando as amostras (resíduo) com a menor variabilidade (Fig. 8). No caso do conteúdo de taninos, o inverso aconteceu, onde a maior variabilidade foi observada em nível de amostra e a menor variabilidade foi verificada em nível de planta, a qual foi considerada nula (Fig. 9). Semelhante ao teor de nitrogênio, a variabilidade da variável tipo de folha apresentou níveis intermediários, representando menos de 40% da variância (Figs. 8 e 9).

3.2 Observações do número de minas e de ovos por folha

As observações de folhas minadas mostraram folhas com uma, duas ou três minas apenas, e a proporção de folhas minadas contendo uma mina foi muito maior do que as proporções de folhas com duas ou três minas, para todas as fases de desenvolvimento (Tabela 3). As proporções de folhas contendo duas minas também foram consideravelmente maiores do que as proporções de folhas com apenas uma mina, e verifica-se que as proporções de folhas com uma, duas ou três minas foram bem similares em cada fase de desenvolvimento, não havendo diferença significativa entre as proporções esperadas e observadas (Tabela 3). A quantidade média de ovos por folha foi de 5,2 ($\pm 4,66$), com o mínimo de 1 e máximo de 22 ovos por folha (Fig. 10). Apesar da variabilidade no número de ovos ter sido grande, constatou-se uma predominância de folhas com 1, 2, ou 3 ovos, representando, quando somados, 51,68% das observações (Fig. 10).

3.3 Ocorrência de parasitóides

Para o acompanhamento da emergência dos parasitóides, foi coletado um total de 332 folhas minadas durante os meses de janeiro a junho de 2007. Nos meses de fevereiro, março e abril, constatou-se a saída de um número representativo de lagartas do minador; em maio a saída de lagartas teve um declínio e não foi mais observada nos meses seguintes (Fig. 11). A emergência de parasitóides foi observada nos meses de março, maio, junho e julho (Fig. 11 e Tabela 4). Emergiram no laboratório parasitóides de três famílias da ordem Hymenoptera: Eupelmidae, Eulophidae e Braconidae (Fig. 12), esta última com maior ocorrência de indivíduos (Fig. 11 e Tabela 4). Houve uma baixa taxa de emergência do minador (Fig. 13), os quais foram observados nos meses de julho e setembro (Fig. 11).

3.4 Anatomia foliar

Cortes transversais na região da mina mostram que a lagarta consome o parênquima paliçádico e algumas nervuras de menor calibre (nervuras de 3^a ou 4^a ordem), deixando a epiderme intacta; observa-se também células com substâncias fenólicas próximas a cavidade da mina, a qual apresenta uma película contornando o seu interior (Fig.14B e 14D). As folhas

minadas e não minadas possuem epiderme uniestratificada, com presença de células mucilaginosas na face adaxial (Fig. 14A) e de células papilares (Fig. 14A) e estômatos na face abaxial. A figura 14C mostra um detalhe do feixe vascular da nervura central que permanece intacto. Na folha minada foi possível observar a presença de uma lagarta na cavidade da mina (Fig.14B e 14D).

Tabela 1. Análise de variância via Modelo Linear Generalizado (GLM), comparando os valores médios do teor (%) de nitrogênio entre as diferentes fases de desenvolvimento, tipos de folha, tipos de tecido e interação entre as fases de desenvolvimento e tipos de tecido, este último agrupado em tipos de folha (*nested design*).

| Fonte de variação | GL | QM | F | P |
|---|----|--------|--------|---------|
| Fases de desenvolvimento | 2 | 53,207 | 296,54 | < 0,001 |
| Tipos de folha | 1 | 1,838 | 10,24 | 0,005 |
| Tecidos (Tipos de folha) | 1 | 20,984 | 116,95 | < 0,001 |
| Fases de desenvolvimento x Tecidos (Tipos de folha) | 4 | 4,495 | 25,05 | < 0,001 |

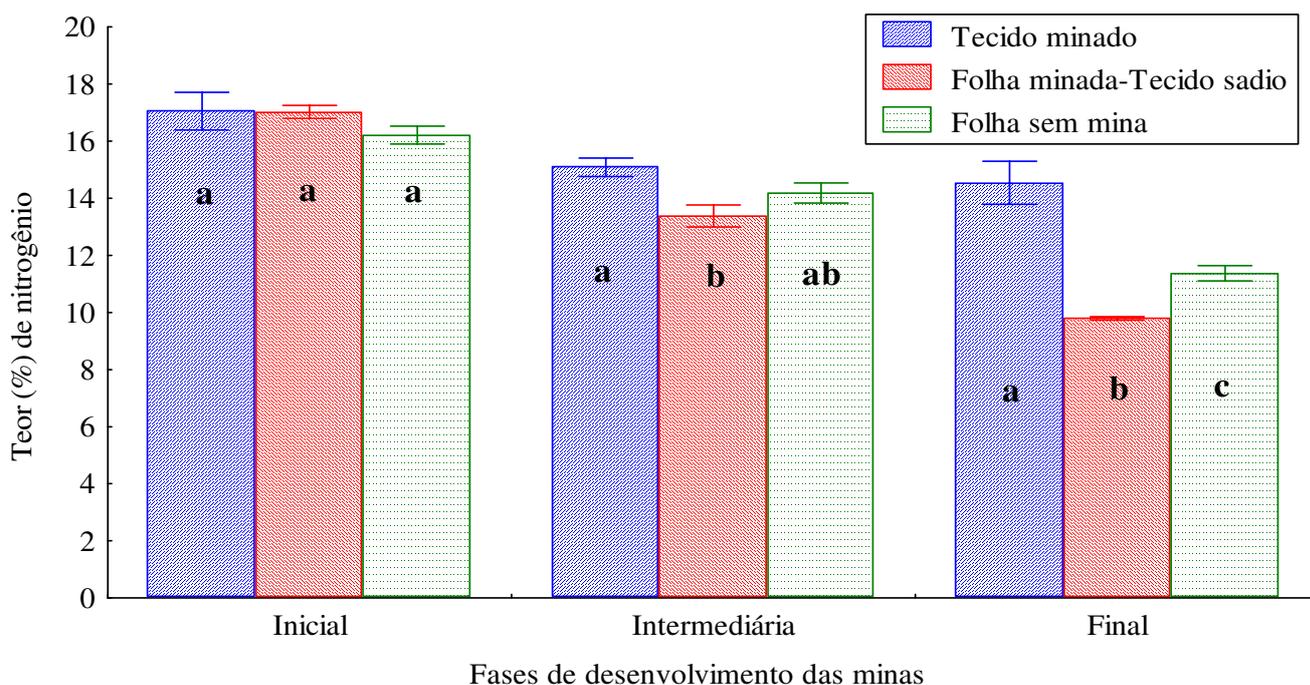


Fig. 6. Comparações dos valores médios (\pm DP) do teor (%) de nitrogênio entre os diferentes tipos de folha (tecido) em cada fase de desenvolvimento. Médias seguidas de letras distintas diferiram significativamente pelo teste Tukey (*HSD*) ($P < 0,05$) dentro de cada fase de desenvolvimento.

Tabela 2. Análise de variância via Modelo Linear Generalizado (GLM), comparando os valores médios do conteúdo de taninos (mg ac. tânico/g mat. seca) entre as diferentes fases de desenvolvimento, tipos de folha, tipos de tecido e interação entre as fases de desenvolvimento e tipos de tecido, este último agrupado em tipos de folha (*nested design*).

| Fonte de variação | GL | QM | F | P |
|---|----|-----------|------|-------|
| Fases de desenvolvimento | 2 | 2721,219 | 1,94 | 0,172 |
| Tipos de folha | 1 | 125,252 | 0,09 | 0,768 |
| Tecidos (Tipos de folha) | 1 | 11195,241 | 7,99 | 0,011 |
| Fases de desenvolvimento x Tecidos (Tipos de folha) | 4 | 3529,353 | 2,52 | 0,077 |

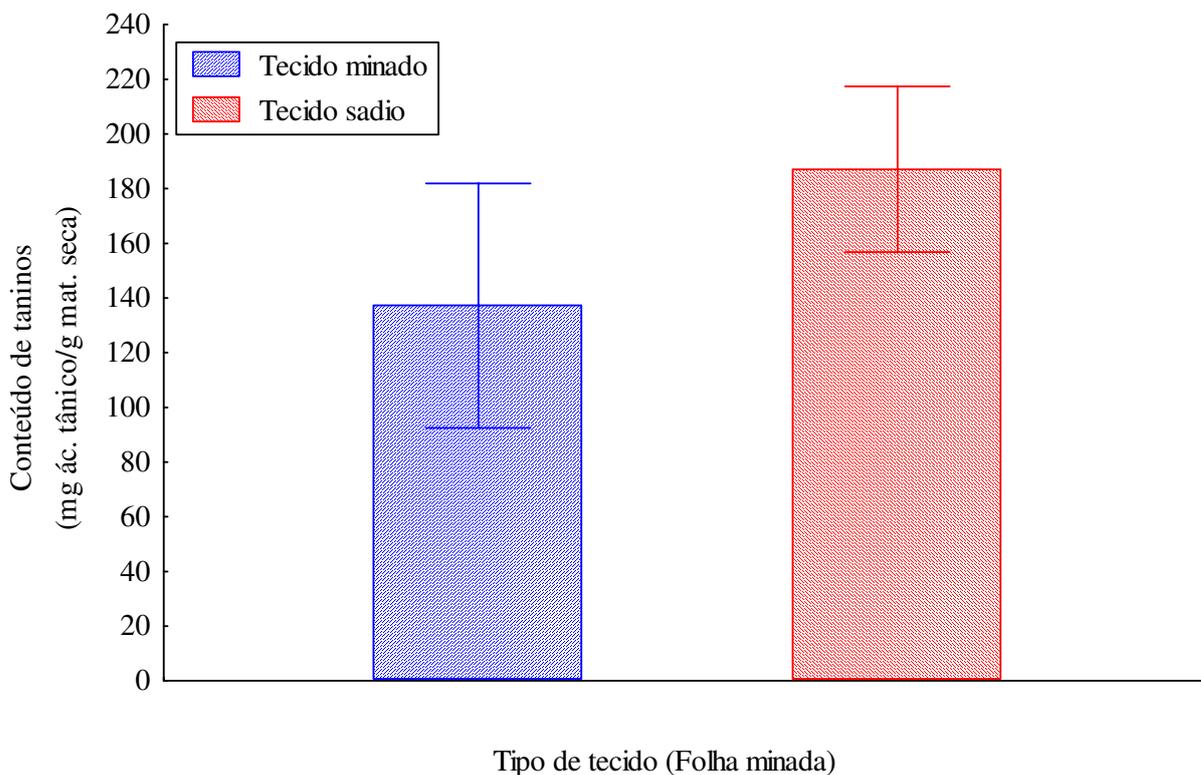


Fig. 7. Comparação dos valores médios (\pm DP) do conteúdo de taninos (mg ac. tânico/g mat. seca) entre os tipos de tecido (minado e sadio) em folhas minadas. As médias diferiram significativamente pela Análise de Variância (GLM) ($P = 0,011$; ver Tabela 2).

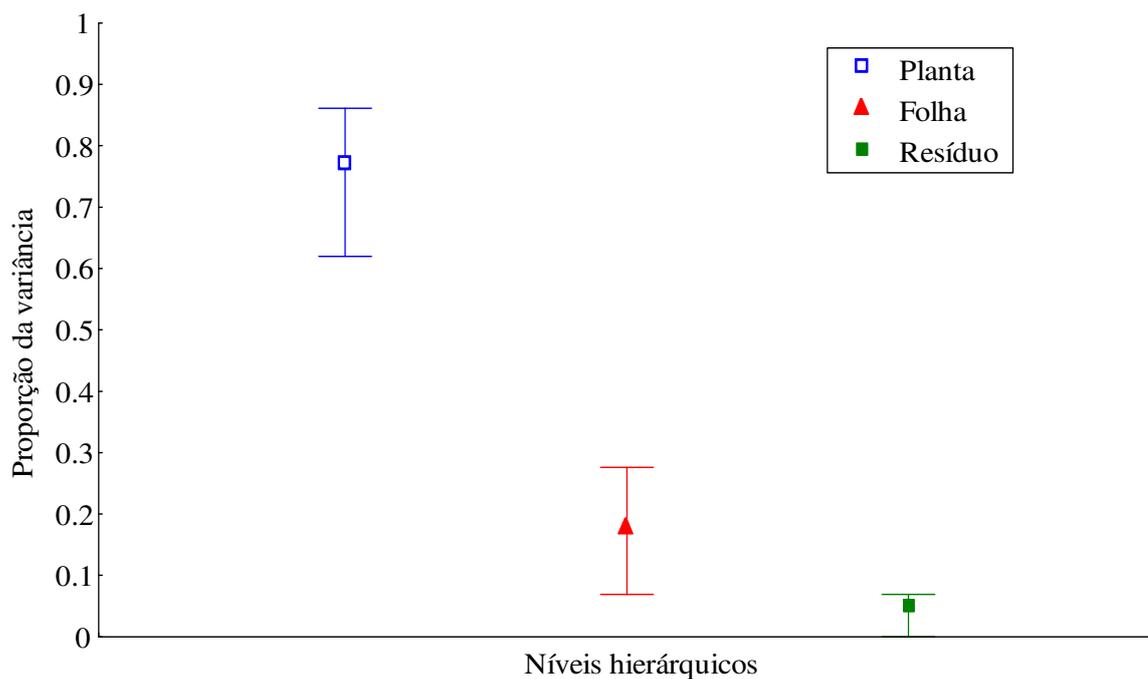


Fig. 8. Componentes da variância para determinação da variação do conteúdo (%) de nitrogênio entre plantas, folhas e amostras. As barras representam 95% de intervalo de confiança.

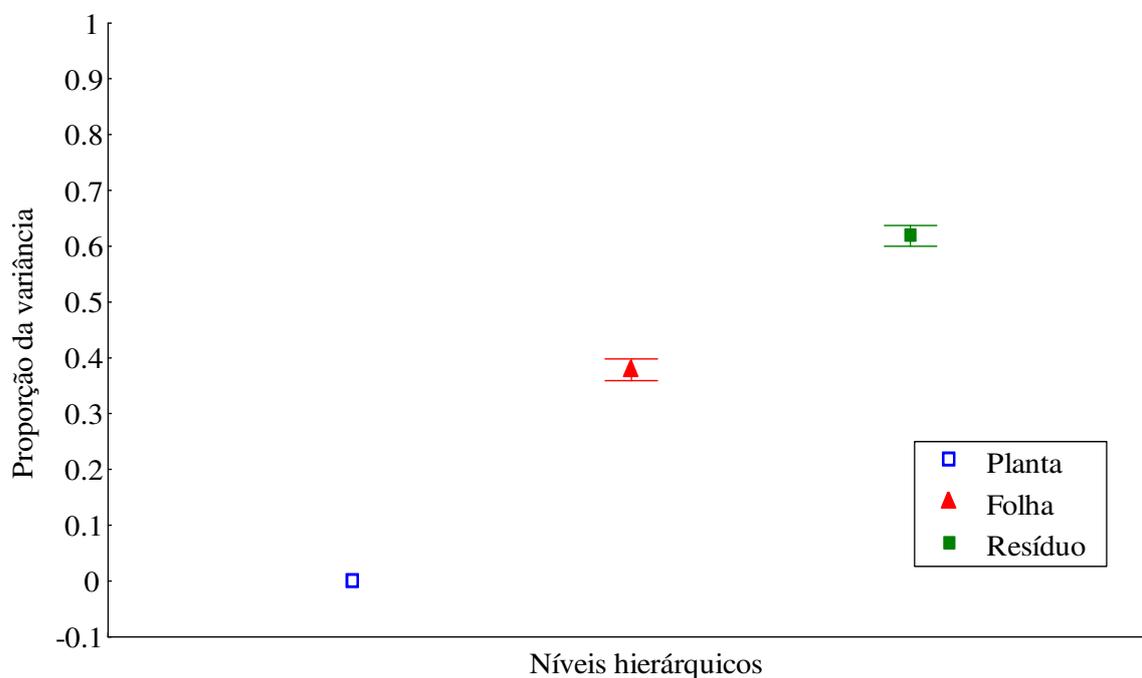


Fig. 9. Componentes da variância para determinação da variação do conteúdo de taninos (mg ác. tânico/g mat seca) entre plantas, folhas e amostras. No caso do nível de planta, as variações foram pequenas o suficiente para serem estimadas como zero. As barras representam 95% de intervalo de confiança.

Tabela 3. Proporção de folhas de *E. tortuosum* contendo uma, duas ou três minas de acordo com a fase de desenvolvimento das minas.

| Número de minas/folha | Fases de desenvolvimento* | | |
|-----------------------|---------------------------|---------------|------------|
| | Inicial | Intermediária | Final |
| 3 | 6 (3,35%) | 2 (1,56%) | 0 |
| 2 | 14 (7,82%) | 18 (14,06%) | 5 (10,87%) |
| 1 | 159 (88,83%) | 108 (84,38%) | 41 (89,13) |

*Não houve diferença significativa entre as frequências esperadas e observadas pelo teste *G* (*G*-Williams = 5,7318; *P* = 0,2201).

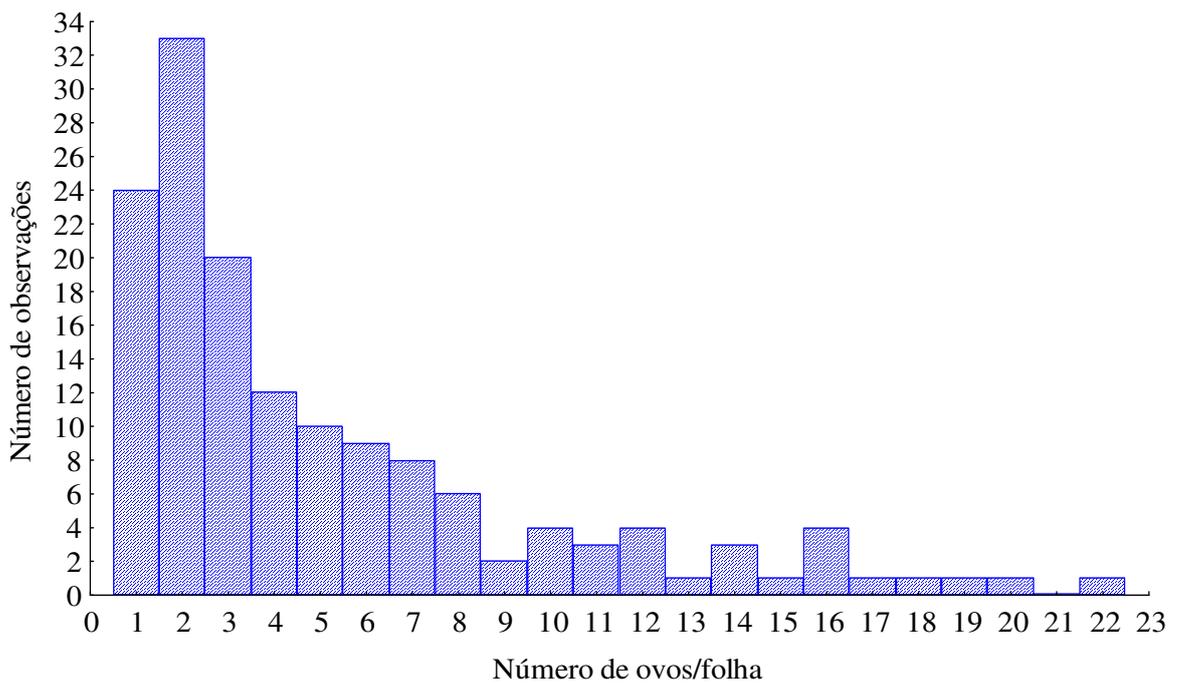


Fig. 10. Distribuição de frequência do número de ovos por folha, obtida de 149 folhas de *E. tortuosum*.

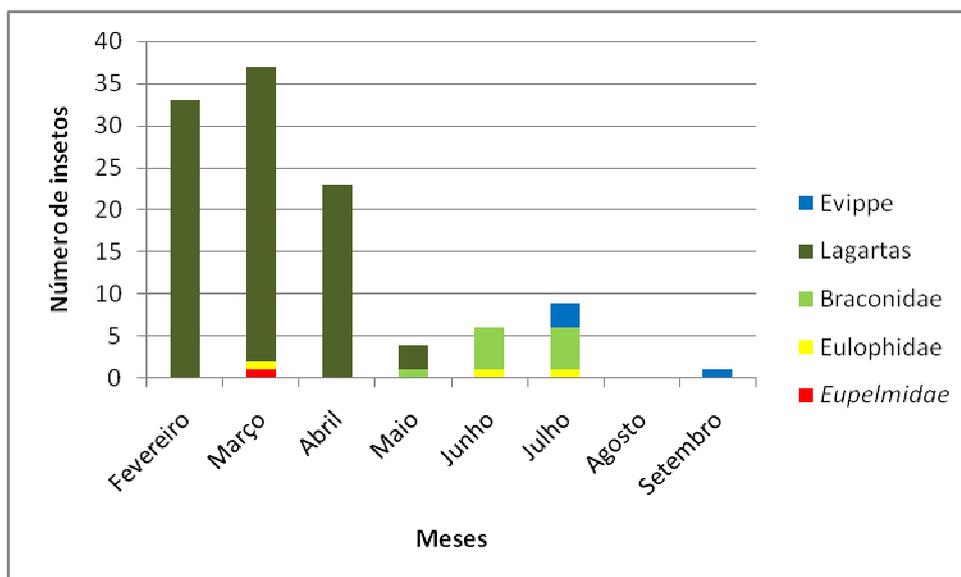


Fig. 11. Abundância e período de ocorrência de adultos (*Evippe*) e lagartas do minador foliar e seus parasitóides (famílias Braconidae, Eulophidae e Eupelmidae) em *E. tortuosum*.

Tabela 4. Lista das espécies de parasitóides de lagartas de *Evippe* em *E. tortuosum*¹.

| Ordem | Superfamília | Família | Subfamília | Gênero | Subgênero |
|-------------|-----------------|------------|-------------|---------------------|----------------------|
| Hymenoptera | Ichneumonoidea* | Braconidae | Braconinae | <i>Bracon</i> | |
| | | | Cheloninae | <i>Chelonus</i> | <i>Microchelonus</i> |
| | | Eupelmidae | Eupelminae | <i>Brasema</i> | |
| | Chalidoidea** | Eulophidae | | <i>Chrysocharis</i> | |
| | | | Entedoninae | <i>Horismenus</i> | |

¹Determinadores:

*Prof^a Dr^a Zuleide Alves Ramiro (Instituto Biológico, Campinas-SP) e Prof^a Dr^a Angélica Maria Penteadó Martins Dias (Ufscar, Universidade Federal de São Carlos).

**Prof. Dr. Valmir Antônio Costa (Instituto Biológico, Campinas-SP).



Fig.12. Parasitóides emergidos de minas foliares de *E. tortuosum* em laboratório. **A e B.** Braconidae, **B.** *Microchelonus* sp. **C.** Eulophidae **D.** Eupelmidae. Escalas: 1,0 mm

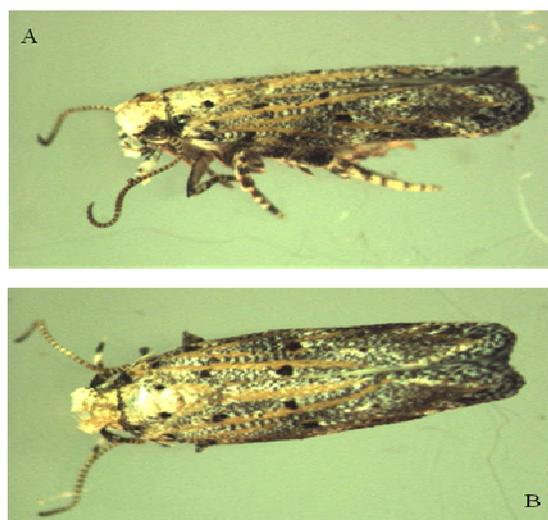


Fig. 13. Exemplos adultos de *Evippe*.
A. Vista lateral. **B** Vista dorsal.

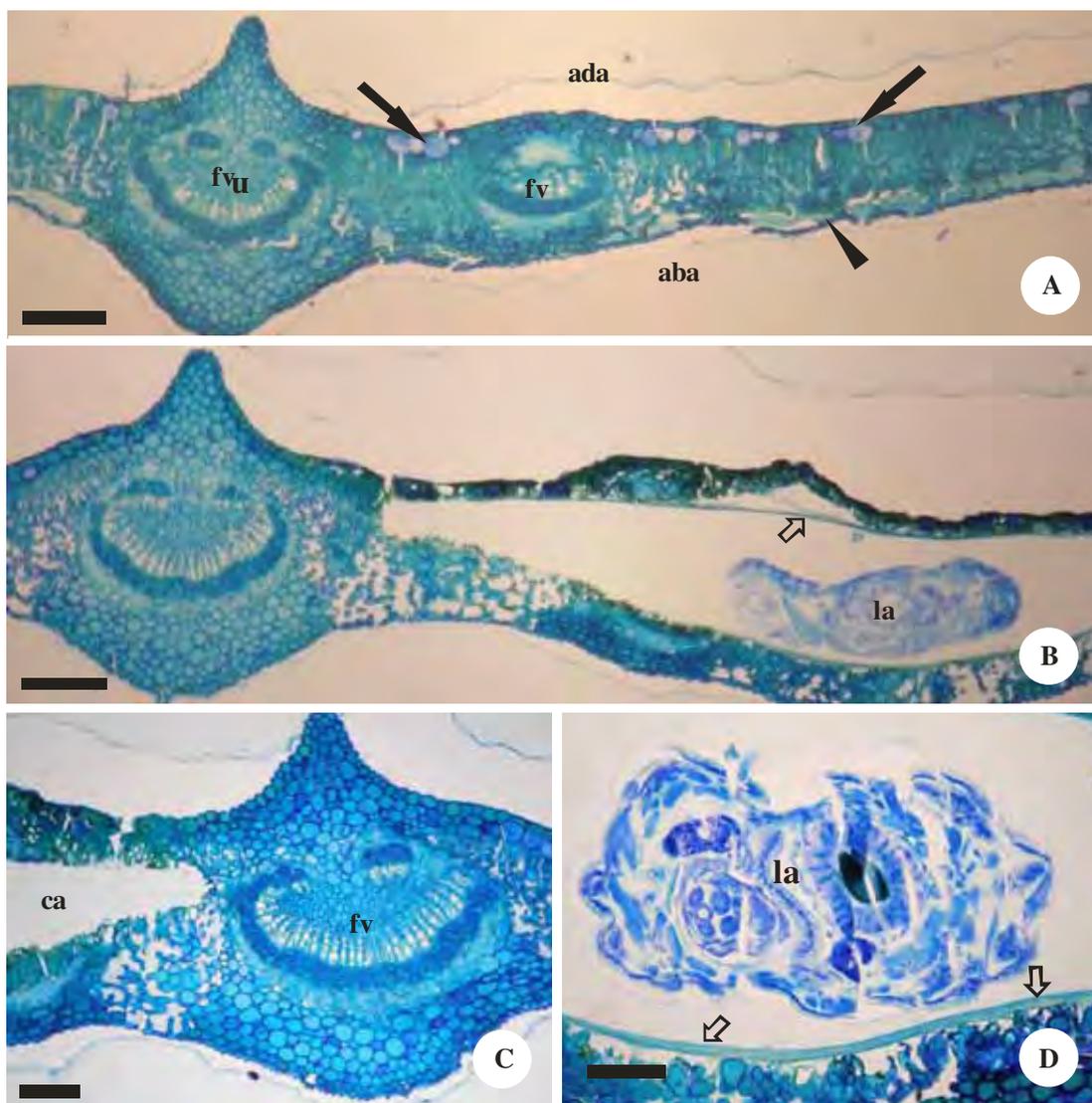


Figura. 14. A-D. Secção transversal da folha de *Erythroxylum tortuosum* nas regiões da nervura central e internervural. A. Sem a presença da cavidade da mina, evidenciando o feixe vascular, a epiderme adaxial com presença de células mucilaginosas (seta) e a epiderme abaxial com células papilares (ponta de seta). B-D. Com a presença da cavidade da mina. B) apresentando em seu interior a lagarta de *Evippe* e evidenciando a película (seta vazia) no interior da cavidade. C) evidenciando a cavidade e o feixe vascular. D) Detalhada cavidade da mina evidenciando a lagarta de *Evippe*, e a película no interior da cavidade (seta vazia). ada= adaxial; aba= abaxial; fv= feixe vascular; la= lagarta; ca= cavidade; barras: A e B = 250µm; C= 150µm; D= 100µm

4. Discussão

Sabe-se que a disponibilidade de nutrientes nas plantas pode influenciar a seleção do hospedeiro pelo inseto. Dentre os macronutrientes, o nitrogênio é considerado de grande importância para a síntese de aminoácidos e proteínas, que são limitantes para a sobrevivência dos insetos (Marschner, 1995). A qualidade nutricional da folha pode afetar a abundância de insetos herbívoros, afetando o comportamento de oviposição das fêmeas, afetando a sobrevivência e o desenvolvimento larval, o que pode afetar o número de adultos e a taxa de fecundidade da próxima geração (Aide, 1993). Segundo Kerpel *et al.* (2006), fêmeas de *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera: Nymphalidae) costumam escolher ramos de plantas com maior conteúdo de nitrogênio para oviposição, provocando também um melhor desempenho das larvas. Geralmente os insetos minadores não são capazes de trocar de sítio de alimentação (Stiling, 1999), portanto, a escolha inicial do recurso é essencial para o sucesso no seu desenvolvimento, e o inseto pode então exercer uma forte seleção por melhores plantas hospedeiras.

Cates (1980) associou a amplitude da dieta dos herbívoros com a idade da folha, sugerindo que os herbívoros especialistas mostram preferência pelas folhas novas, que possuem geralmente uma maior concentração de nutrientes, como o nitrogênio e ainda uma baixa concentração de compostos de defesa. No presente estudo, não se constatou uma maior porcentagem de nitrogênio nas folhas minadas em fase inicial de desenvolvimento, sugerindo que a escolha por folhas mais ricas em nitrogênio por parte do minador não deve ocorrer. Também não se verificou baixa concentração de taninos nos tecidos não minados das folhas minadas, independente da fase de desenvolvimento. Estes resultados corroboram com as observações de Ishino (2007), que estudou a preferência de oviposição de mariposas *Evippe* em *E. tortuosum* e não encontrou preferência de oviposição por folhas mais ricas em nitrogênio ou com baixas concentrações de taninos. No presente estudo, constatou-se que ao longo do processo de desenvolvimento das minas, os tecidos não minados de folhas minadas tornaram-se mais deficientes em nitrogênio, justamente pela utilização deste recurso pelo minador. A perda de área foliar pela ação do minador também deve ter reduzido a fixação de nitrogênio nas folhas minadas. Schile & Mopper (2006) encontraram uma redução de até 40% na concentração de nitrogênio em tecidos não minados de folhas minadas em *Iris hexagona*,

quando atacada pelo minador *Cerodontha iridiphora*, fornecendo um mecanismo para a morte prematura das folhas. Assim, é possível que as folhas minadas de *E. tortuosum* apresentem alta mortalidade com queda prematura, mas esta hipótese ainda precisa ser investigada.

Alguns autores argumentam que os insetos minadores devem selecionar tecidos mais ricos nutricionalmente e com menores concentrações de compostos de defesa ou defesas estruturais (hipótese de alimentação seletiva) (Kimmerer & Potter, 1987; Trier & Mattson, 1997). Desta forma, se a larva retira tecidos mais nutritivos, a qualidade nutricional do tecido minado deve ser menor que do tecido não minado em uma mesma folha, como encontrado por Scheirs *et al.* (2001). Curiosamente, o maior conteúdo de nitrogênio foi encontrado em tecidos minados principalmente na fase final de desenvolvimento. É possível que parte do nitrogênio consumido pela lagarta fique dentro da própria mina. Por exemplo, as exúvias (exoesqueleto perdido durante o crescimento do inseto) perdidas durante as ecdises larvais ficam no interior das minas e também material fecal, embora a quantidade de material fecal dentro das minas deve ser pequena, pois segundo Ishino (1997), as fezes são eliminadas das minas por um apêndice foliar. Considerando que o mesofilo é um tecido com alto teor de água (Kimmerer & Potter, 1987), é possível que sua remoção pelo minador aumente a concentração de nitrogênio no tecido minado. Ainda, é provável que as lagartas de *Evippe* não retirem os tecidos mais ricos nutricionalmente.

Não foi constatado um aumento da concentração de taninos em tecidos não minados das folhas minadas em comparação com as folhas não minadas, não ocorrendo defesa induzida. Na verdade ocorreu apenas um decréscimo na concentração destes compostos nos tecidos minados em comparação com os tecidos não minados das folhas minadas, provavelmente devido a maiores concentrações de taninos no mesofilo, o qual foi consumido pelo inseto. Apesar de alguns insetos evitarem tecidos com maiores concentrações de defesas químicas (Kimmerer & Potter, 1987; Trier & Mattson, 1997), as lagartas de *Evippe* parecem estar bem adaptadas a estes compostos, ou mais especificamente, aos taninos, pois aparentemente não houve uma preferência por tecidos com menores concentrações destes compostos, já que muitas plantas de cerrado costumam ter altas concentrações de taninos (Oki, 2000).

Além de alterações físicas nas plantas através da formação de minas, os minadores também podem provocar alterações nas concentrações de certos compostos, principalmente de nitrogênio, como demonstrado pelas análises bioquímicas. No entanto, as análises dos componentes da variância podem mostrar em qual nível hierárquico estas variações podem ser de fato percebidas (Roslin *et al.*, 2006). No presente estudo, constatou-se que a maior

variabilidade do teor de nitrogênio ocorreu entre as plantas e pouca variabilidade deste traço foi verificada entre os tipos de folha e entre as amostras, ocorrendo o oposto para os taninos. Alguns estudos clássicos de interações inseto-planta consideram as plantas como unidades discretas homogêneas, responsáveis pelas variações populacionais ou comportamentais dos herbívoros (Edmunds & Alstad, 1978; Schultz & Baldwin, 1982; Crawley, 1985). No entanto, variações no interior das plantas também são esperadas, bem como em escalas maiores do que plantas individuais, criando níveis hierárquicos de variabilidade, aos quais os insetos herbívoros devem responder diferentemente (Denno & McClure, 1983; Neeman, 1993; Hwang & Lindroth, 1997; Fortin & Mauffette, 2002). No caso da variabilidade do teor de nitrogênio, os resultados aqui encontrados corroboram com estudos clássicos, mostrando que a maior variabilidade ocorre em nível de planta. No entanto, a variabilidade encontrada entre os tipos de folha não deve ser desprezada. Por exemplo, ao se estabelecer em uma planta de melhor qualidade nutricional, um inseto pode se deparar com variações dentro da própria planta, que podem influenciar a escolha do recurso neste nível de resolução. Este tipo de resposta pode ser mais freqüente em insetos de pequeno porte, como os microlepdópteros, nos quais variações em menores escalas podem ser mais significativas. Já para os conteúdos de taninos, os resultados deste estudo não corroboram com os estudos clássicos, uma vez que grande variabilidade foi encontrada entre as amostras, ou seja, em pequena escala, e praticamente nenhuma variabilidade foi encontrada entre as plantas. Portanto, neste caso, os insetos se depararão com variações destes compostos de defesa no interior de cada planta, sem haver uma distinção prévia de qual planta apresenta mais ou menos taninos. Apesar dos resultados terem mostrado que os minadores provocam variações químicas nas folhas, dentro de um contexto hierárquico, estas variações indicam que a ação dos minadores gerou uma variabilidade intermediária no sistema. Apesar destas constatações, não foi possível incluir análises de tecidos minados, os quais diferiram no teor de nitrogênio dos demais tecidos em fase final de desenvolvimento, o que poderia aumentar o nível de variabilidade entre as folhas.

Com relação a proporção de folhas contendo uma, duas ou três minas, constatou-se que a grande maioria das folhas continha apenas uma mina, independente da fase de desenvolvimento, já que as proporções não diferiram estatisticamente. Almeida-Cortez *et al.* (2006) também observaram em *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy (Clusiaceae), uma maior predominância de folhas com uma mina, correspondendo a 67% das folhas coletadas, 22% das folhas continham duas minas, 8% três minas e 3% das folhas possuíam quatro minas.

Como mencionado anteriormente, verificou-se a predominância de 1, 2 ou 3 ovos por folha, uma vez que corresponderam com mais de 50% das observações. Portanto, devido a maior ocorrência de apenas uma mina por folha, conclui-se que a mortalidade não é tão intensa da fase de ovo para a fase larval. Porém, um alto número de ovos também foi observado nas folhas, chegando até 22 ovos por folha, embora a frequência tenha sido baixa (Fig. 10). Nestes casos espera-se uma alta mortalidade de ovos, aumentando muito a taxa de mortalidade durante o estabelecimento das minas.

Por não apresentarem alta mobilidade e por ficarem expostas ao ataque de inimigos naturais, algumas lagartas desenvolveram estratégias de defesa, como defesas físicas (espinhos, pelos), químicas (odores, não palatável) e defesas comportamentais como, por exemplo, agregação, dobramento e enrolamento foliar, formação de minas, e barreira de espuma (Weiss, 2003). Mas alguns parasitóides adaptaram-se e conseguem se desenvolver no interior das minas, Gentry & Dyer (2002) sugerem que os parasitóides têm preferência em atacar lagartas que estão protegidas de predadores, particularmente as quimicamente protegidas e as que formam abrigos. Assim, minadores foliares acabam tornando-se alvos ideais para a oviposição de parasitóides. No presente estudo constatou-se a presença de apenas uma espécie de inseto herbívoro minador (*Evippe*) e vários parasitóides que puderam ser identificados somente até gênero. Os gêneros dos parasitóides observados no presente estudo foram *Bracon*, *Chelonus* (*Microchelonus*), *Brasema*, *Chrysocharis* e *Horismenus*. *Bracon* foi o gênero com maior ocorrência durante o ano, com registros nos meses de maio, junho e julho, diferentemente do encontrado por Ishino (2007), que observou maior ocorrência do gênero *Horismenus*, com registros em maio, julho, agosto e outubro. Ishino (2007) também observou a presença de parasitóides dos gêneros *Microchelonus*, *Copidosoma*, *Bassus*, e da espécie *Closterocerus coffeela*. Portanto, sabe-se que existem pelo menos oito espécies de parasitóides em *Evippe* em *E. tortuosum*. Não houve registro de parasitóides nos meses seguintes a julho. O registro de adultos *Evippe* no laboratório foi baixo, pois houve uma alta taxa de evasão das lagartas das folhas de *E. tortuosum*; isso provavelmente ocorreu devido a falta de condições essenciais para o desenvolvimento do inseto na mina. Adultos emergiram de julho a setembro e segundo Ishino (2007), a emergência dos adultos do minador coincide com a produção de folhas novas em *E. tortuosum*, sendo essas folhas ideais para a colonização pelo minador.

Geralmente a fauna de lepidópteros em plantas do cerrado se insere no padrão da região tropical, ou seja, apresenta baixa abundância em cada espécie (Gonçalves, 2007). Sabe-se que

a frequência das lagartas nas plantas é geralmente baixa e varia de acordo com a idade relativa das folhas e com a espécie hospedeira, de forma que as espécies mais abundantes em determinada planta parecem ser aquelas com maior especificidade em sua dieta (Diniz & Morais, 1997). A proporção de lagartas pode variar em plantas do mesmo gênero devido às características das espécies como arquitetura e distribuição espacial. Gonçalves (2007) verificou uma maior proporção de plantas com lagartas em *E. tortuosum* do que em *E. deciduum*. Diniz *et al.* (2001) observaram que 48% das espécies de lagartas encontradas em *Erythroxylum* eram folívoras externas e eram restritas as plantas dessa família. Apesar da existência de alguns estudos relacionados a interação entre lagartas e plantas do cerrado (Price *et al.*, 1995; Diniz & Morais, 1997, 2005; Gonçalves, 2007), os estudos sobre a interação entre lagartas minadoras e plantas nativas são escassos.

A análise de características anatômicas de folhas minadas e não minadas foi utilizada para complementar este estudo, pois características físicas da planta também podem influenciar a taxa de herbivoria. A análise da anatomia foliar evidenciou que a maioria das espécies de *Erythroxylum* possui epiderme uniestratificada, que é comum a presença de células mucilaginosas e epidermes papilosas; os bordos foliares podem ser arredondados ou acuminados (Beiras & Sajo, 2004). Os resultados do presente estudo mostram que *E. tortuosum* possui epiderme uniestratificada, células mucilaginosas e papilosas e bordo foliar acuminado, corroborando com o trabalho de Beiras & Sajo (2004).

Minas ou hiponomas são canais causados pelo consumo de tecidos internos da planta por larvas minadoras que habitam a folha e se alimentam desses tecidos. Minas são frequentemente visíveis em forma de serpentina, manchas ou outras formas características de tecido descolorido. (Connor & Taverner, 1997). Lagartas de *Leucoptera coffeella* (Guérin-Méneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) alimentam-se exclusivamente do parênquima paliçádico (Ramiro *et al.*, 2004). Segundo Melo-de-Pinna *et al.* (2002), a larva durante a formação da mina, consome o clorênquima do mesofilo, bem como os tecidos vasculares de menor porte, as nervuras de terceira e quarta ordem. Não ocorreram alterações estruturais em relação ao tecido da planta hospedeira, exceto a formação do meristema de cicatrização e o aumento do teor de substâncias fenólicas nas células da mina. Almeida-Cortez *et al.* (2006) observaram que a larva consome o tecido parenquimático de *V. guianensis*, deixando a epiderme intacta, mas não consome nenhum tipo de nervura. As lagartas de *Evippe* também consomem o tecido parenquimático e nervuras de menor porte, corroborando assim com o trabalho de Melo-de-Pinna *et al.* (2002). Nos cortes da região minada pode-se observar uma

película no interior da cavidade da mina. Segundo Ishino (2007), internamente a parte inferior da mina é forrada por delgada camada de fios de seda tecidos pelas larvas minadoras. Possivelmente essa película possa ser formada por tais fios de seda, no entanto, uma análise mais detalhada precisaria ser feita para se confirmar a natureza dessa película.

5. Referências Bibliográficas

- Aide, T.M. (1993) Patterns of leaf development and herbivory in a tropical understory community. *Ecology* **74**, 455-466.
- Almeida-Cortez, J.S & Melo-de-Pinna, G.F.A. (2006) Morphology and anatomy of a leaf miner in *Vismia guianensis* (AUBL.) Choisy (Clusiaceae) in fragment of Brazilian Atlantic Forest. *Brazilian Journal of Biology* **66**, 759-763.
- A.O.A.C. (1995) *Official methods of analysis of AOAC Internacional* (ed.Cuniff, P.Z.), Arlington, Virginia.
- Ayres, M., Ayres Jr., M., Ayres, D.L. & dos Santos, A.S. (2007) *BioStat: Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas*; versão 5.0. Instituto de Desenvolvimento sustentável Mamirauá, IDS/MCT/CNPq, Belém-PA, Brasil.
- Awmack, C.S. & Leather, S.R. (2002) Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Annual Review of Entomology* **47**, 817-844.
- Beiras, A.C. & Sajo, M.G. (2004) Anatomia foliar de *Erythroxylum* P. Browne (Erythroxylaceae) do Cerrado do Estado de São Paulo, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* **18**, 601-612.
- Cates, R.G. (1980) Feeding patterns of monophagous, oligophagous, and polyphagous insect herbivores: The effect of resource abundance and plant chemistry. *Oecologia* **46**, 22-31.
- Coley, P.D. & Barone, J.A. (1996) Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**, 305-335.
- Connor, E.F. & Taverner, M.P. (1997) The evolution and adaptative significance of leaf-mining habit. *Oikos* **79**, 6-25.
- Crawley, M.J. (1985) Reduction of oak fecundity by low-density herbivore populations. *Nature* **314**, 163-164.
- Crawley, M.J (2005) Are grazing increaser species better tolerators than decreaseers? An experimental assessment of defoliation tolerance in eight british grassland species. *Journal of Ecology* **93**, 1005-1016.
- Denno, R.F. & McClure, M.S. (1983) Variable plants and herbivores in natural and managed systems. Academic Press.
- Denno, R.F., Peterson, M.A., Gratton, C., Cheng, J.A., Langellotto, G.A., Huberty, A.F. & Finke, D.L. (2000) Feeding-induced changes in plant quality mediate inter-specific competition between sap-feeding herbivores. *Ecology* **81**, 1814-1827.

- Diniz, I.R. & Morais, H.C. (1997) Lepidopteran caterpillar fauna of Cerrado host plants. *Biodiversity and Conservation* **6**, 817– 836.
- Diniz, I.R., Morais, H.C & Camargo, A.I.A. (2001) Host plant of lepidopteran Caterpillar in the cerrado of Distrito Federal, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia* **45**, 107-122.
- Diniz, I.R. & Morais, H.C. (2005) Abundância e amplitude de dieta de lagartas (Lepidoptera) no cerrado de Brasília (DF). *Cerrado: Ecologia, Biodiversidade e Conservação* (eds. A. Scariot, J.C. Sousa-Silva & J.M. Felfili), pp.305-318 Ministério do Meio Ambiente, Brasília.
- Edmunds, G.F.Jr. & Alstad, D.N. (1978) Coevolution in insect herbivores and conifers. *Science* **199**, 941-945.
- Edwards, P.J. & Wratten, S.D. (1981) *Ecologia das Interações entre insetos e plantas*. EPU-EDUSP. São Paulo.
- Felfili, J. M. & Silva Júnior, M.C. (2001) *Biogeografia do bioma Cerrado: estudo fisionômico da Chapada do Espigão Mestre do São Francisco*. Departamento de Engenharia Florestal, Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília, Brasília.
- Fortin, M. & Mauffette, Y. (2002) The suitability of leaves from different canopy layers for a generalist herbivore (Lepidoptera: Lasiocampidae) foraging on sugar maple. *Canadian Journal of Forest Research* **32**, 379-389.
- Gentry, G.L. & Dyer, L.A. (2002) On the conditional nature of neotropical caterpillar defenses against their natural enemies. *Ecology* **83**, 3108–3119
- Giner-Chavez, B.I., Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lascano, C., Reed, J.D. & Pell, A.N. (1997) A method for isolating condensed tannins from crude plant extracts with ytterbium. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **74**, 359-368.
- Gonçalves, C.P. (2007) *Larvas de Lepidoptera em duas espécies de Erythroxylum em um cerrado de Brasília, DF: Fogo e Fenologia Foliar*. Dissertação (mestrado) Universidade de Brasília, DF.
- Gotelli, N.J. & Ellison, A.M. (2004) *A Primer of Ecological Statistics*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Hunter, M.D. (2003) Effects of plant quality on the population ecology of parasitoids. *Agricultural and Forest Entomology* **5**, 1-8.
- Hwang, S.Y. & Lindroth, R.L. (1997) Clonal variation in foliar chemistry of aspen: effects on gypsy moths and forest tent caterpillars. *Oecologia* **111**, 99-108.

- Ishino, M.N. (2007) *Efeito da assimetria flutuante nos padrões de herbivoria de um minador foliar em Erythroxylum totuosum Mart. (Erythroxylaceae)*. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.
- Johansen, D.A. (1940) *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Company Inc., New York
- Kagata, H., Nakamura, M. & Ohgushi, T. (2005) Bottom-up cascade in a tri-trophic system: different impacts of host-plant regeneration on performance of a willow leaf beetle and its natural enemy. *Ecological Entomology* **30**, 58-62.
- Karban, R. & Baldwin, I.T. (1997) *Induced response to herbivory*. University of Chicago Press, Chicago.
- Kerpel, S.M., Soprano, E. & Moreira, G.R.P. (2006) Effect of Nitrogen on *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae) and Consequences for Larval Performance and Oviposition in *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera: Nymphalidae). *Neotropical Entomology* **35**, 192-200
- Kimmerer, T.W. & Potter, D.A. (1987) Nutritional quality of specific leaf tissues and selective feeding by a specialist leafminer. *Oecologia* **71**, 548-551.
- Marschner, H. (1995) *Mineral nutrition of higher plants*. 2ed. Academic Press San Diego.
- Melo-de-Pinna, G.F.A., Kraus, J.E. & Menezes, N.L. (2002) Morphology and anatomy of leaf mine in *Richterago riparia* Roque (Asteraceae) in the Campos Rupestres of Serra do Cipó. *Brazilian Journal of Biology* **62**, 179-185.
- Moon, D.C., Rossi, A.M. & Stiling, P. (2000) The effects of abiotically induced changes in host plant quality (and morphology) on a salt marsh planthopper and its parasitoid. *Ecological Entomology* **25**, 325-331.
- Moon, D.C. & Stiling, P. (2002) The effects of salinity and nutrients on a tritrophic salt-marsh system. *Ecology* **83**, 2465-2476.
- Neeman, G. (1993) Variation in leaf phenology and habit in *Quercus ithaburensis*, a Mediterranean deciduous tree. *Journal of Ecology* **81**, 627-634.
- O'Brien, T.P., Feder, N., McCully, M.E. (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *O Protozoology* **59**, 368-373.
- Ohgushi, T. (2005) Indirect interaction webs: Herbivore-induced effects through trait change in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **36**, 81-105.
- Oki, Y. (2000) *Herbivoria por lepidópteros em Byrsonima intermedia Juss. (Malpighiaceae) na ARIE Pé-de-gigante, Santa Rita do Passa Quatro SP*. Dissertação de mestrado.

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

- Pizzamiglio, M.A. (1991) Ecologia das interações inseto-planta. *Ecologia Nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas*. (eds. A. Panizzi & J.R. Parra), pp. 101-121. Manole Ltda., São Paulo.
- Price, P.W., Diniz, I.R., Morais, H.C. & Marques, E.S.A. (1995) The abundance of insect herbivore species in the tropics: the high local richness of rare species. *Biotropica* **27**, 468–478.
- R (2008) The R Foundation for Statistical Computing, version 2.7.1.
- Ramiro, D.A., Guerreiro-Filho, O., Queiroz-Voltan, R.B. & Matthiesen, S.C. (2004) Caracterização anatômica de folhas de cafeeiros resistentes e suscetíveis ao bicho-mineiro. *Bragantia* **3**, 363-372.
- Ribeiro, J.F. & Walter, B.M.T. (1998) Fitofisionomias do bioma Cerrado. *Cerrado ambiente e flora. Planaltina* (eds. S.M. Sano & S.P. Almeida), pp. 89-166. EMBRAPA/CPAC, Distrito Federal.
- Rice, W.R. & Hostert, E.E. (1993) Laboratory experiments on speciation: what have we learned in 40 years? *Evolution* **47**, 1637–1653.
- Roslin, T., Gripenberg, S., Salminen, J.P., Karonen, M., O'Hara, R.B., Pihlaja, K. & Pulkkinen, P. (2006) Seeing the trees for the leaves - oaks as mosaics for a host-specific moth. *Oikos* **113**, 106-120.
- Sagers, C.L. (1992) Manipulation of host plant quality: herbivores keep leaves in the dark. *Functional Ecology* **6**, 741-743.
- Salatino, A. (1993) Chemical ecology and the theory of oligotrophic escleromorfism. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **65**, 1-13.
- SAS (2001) SAS/STAT software; version 8.2. SAS Institute, Cary, North Carolina.
- Scheirs, J., DeBruyn, L. & Verhagen, R. (2001) Nutritional benefits of the leaf-mining behaviour of two grass miners: a test of the selective feeding hypothesis. *Ecological Entomology* **26**, 509-516.
- Schile, L. & Mopper, S. (2006) The deleterious effects of salinity stress on leafminers and their freshwater host. *Ecological Entomology* **31**, 345–351.
- Schultz, J.C. & Baldwin, I.T. (1982) Oak leaf quality declines in response to defoliation by gypsy moth larvae. *Science* **217**, 149-151.
- Stiling, P.D. (1999) *Ecology: theories and applications*. Prentice Hall, New Jersey, NJ.

- Stout, M.J., Workman, K.V. & Duffey, S.S. (1996) Identity, spatial distribution, and variability of induced chemical responses in tomato plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **79**, 255-271.
- Strauss, S.Y. & Zangerl, A.R. (2002) Plant-insect interactions in terrestrial ecosystems. *Plant-Animal Interactions: An Evolutionary Approach* (eds. C.M. Herrera & O. Pellmyr), pp. 77-106. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Sugiura, S., Yamazaki, K. & Osono, T. (2006) Consequences of gall tissues as a food resource for a tortricid moth attacking cecidomyiid galls. *Canadian Entomologist* **138**, 390-398.
- Teder, T. & Tammaru, T. (2002) Cascading effects of variation in plant vigour on the relative performance of insect herbivores and their parasitoids. *Ecological Entomology* **27**, 94-104.
- Tischner, R. (2000) Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. *Plant, Cell and Environment* **23**, 1005-1024.
- Trier, T.M. & Mattson, W.J. (1997) Needle mining by the spruce budworm provides sustenance in the midst of privation. *Oikos* **79**, 241-246.
- Weiss, M.R. (2003) Good housekeeping: why do shelter-dwelling caterpillars fling their frass? *Ecology Letters* **6**, 361-370.
- Williams, L.E. & Miller, A.J. (2001) Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 659-688.
- Whitfield, J.B. & Lewis, C.N. (1999) Braconid Wasp (Hymenoptera: Braconidae) Diversity in Forest Plots Under Different Silvicultural Methods. *Environmental Entomology* **28**, 986-997.
- Zar, J.H. (1999) *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.

CAPÍTULO 2

Níveis Hierárquicos de Variação em Plantas de *Erythroxylum tortuosum* Mart. (Erythroxylaceae): Traços Físicos e Preferência de Oviposição por um Minador Foliar

1. Introdução

Alguns estudos clássicos de interações inseto-planta consideram as plantas como unidades discretas homogêneas, como se fossem “ilhas” de recursos, capazes de causar variações nas densidades populacionais dos herbívoros, bem como em características comportamentais. (Edmunds & Alstad, 1978; Schultz & Baldwin, 1982; Crawley, 1985). No entanto, sabe-se que variações de certos traços vegetais podem ocorrer em diversas escalas espaciais, ou seja, variações são esperadas em escalas maiores do que plantas e no interior das plantas, criando níveis hierárquicos de variabilidade, aos quais os insetos herbívoros devem responder diferentemente (Denno & McClure, 1983; Neeman, 1993; Hwang & Lindroth, 1997; Fortin & Mauffette, 2002; Roslin *et al.*, 2006). Dependendo da variável de interesse, o entendimento do nível de variabilidade através de um gradiente hierárquico é muito importante para o estabelecimento de estratégias corretas de amostragem (Roslin *et al.*, 2006). Por exemplo, se grande variabilidade é encontrada num nível de resolução espacial muito pequeno (variações em pequenas escalas), amostragens tomadas em plantas como unidades discretas não seriam apropriadas, podendo conduzir a erros interpretativos no fenômeno estudado.

Tamanho e forma são características de grande variação entre os diversos grupos de organismos. Dentro do padrão morfológico comum a cada espécie, existe uma grande variedade de adaptações (Begon *et al.*, 1996). Variações no tamanho e forma dos organismos refletem determinadas condições ambientais, podendo ser uma resposta ao estresse experimentado por esses indivíduos (Sposito & Santos 2001). Um fator que pode influenciar os níveis de herbivoria é o estresse, uma vez que pode afetar a qualidade nutricional das plantas para os herbívoros (White, 1984). Sob estresse, não há energia suficiente disponível para os processos de regulação do fenótipo, resultando em erros no desenvolvimento, refletidos por alterações nos traços e padrões dentro de indivíduos (Escós *et al.*, 1997). A Assimetria flutuante (AF) é uma forma particular de assimetria biológica, caracterizada por desvios sutis e aleatórios da perfeita simetria, podendo ser utilizada como um índice de instabilidade de desenvolvimento (ID) de um órgão ou organismo bilateral e estresse ambiental (Tomkins & Kotiaho 2001, Palmer & Strobeck 1986, Palmer 1996).

Um mecanismo possível para explicar as relações entre AF e estresse é o fato dos organismos requererem energia para compensar o estresse, reduzindo a energia para crescimento e reprodução (Koehn & Bayne, 1989), o que pode eventualmente influenciar as

populações. Além disso, o estresse pode reduzir a energia disponível para manter a precisão do desenvolvimento (Sommer, 1996), aumentando a AF em função do estresse. A assimetria flutuante pode oferecer vantagens em relação a outros bioindicadores de estresse, uma vez que sua medição é fácil e de baixo custo (Clarke, 1993). Por exemplo, em plantas foi demonstrado que a AF foliar aumenta com a poluição (Kozlov *et al.*, 1996, Zvereva *et al.*, 1997), competição (Retting *et al.*, 1997) e altitude (Wilsey *et al.*, 1998). Alguns estudos têm encontrado correlações positivas entre AF foliar e herbivoria. Correlações positivas entre AF e herbivoria indicam que plantas com folhas assimétricas são, em média, mais susceptíveis ao ataque por herbívoros, e/ou que a própria herbivoria atua como um agente de estresse, aumentando diretamente o nível de assimetria (Zvereva *et al.*, 1997; Cornelissen & Stiling, 2005). Entretanto, correlação entre AF das folhas e herbivoria não é sempre causal (Lempa *et al.*, 2000), já que diferenças químicas e nutricionais entre folhas simétricas e assimétricas provavelmente influenciam a seleção de folhas pelos herbívoros (Lempa *et al.*, 2000), gerando correlações positivas entre herbivoria e AF (Cornelissen *et al.*, 2003; Cornelissen & Stiling, 2005).

Floate & Fox (2000), acreditam que o uso da AF como um bioindicador de qualidade ambiental pode ter ampla aplicação, mas sugerem que muitas outras questões precisam ser discutidas antes que possam ser usadas com confiança. Isto pode ser melhor solucionado através de estudos que relacionam estresse populacional, assimetria flutuante e adaptabilidade populacional.

Um aspecto muito importante no estudo da ecologia de insetos minadores é a distribuição dos indivíduos entre as plantas e entre as folhas da espécie hospedeira (Tuomi *et al.*, 1981; Stiling *et al.*, 1982; Bultman & Faeth 1986; Simberloff & Stiling, 1987; Faeth, 1990). Estudos dessa natureza são de grande importância, pois revelam mecanismos de escolha do local de oviposição, o que é fundamental para a sobrevivência da progênie desses insetos devido ao hábito sedentário das larvas (Ohgushi, 1992) Alguns estudos indicam que folhas com maior teor de água são geralmente preferidas pelos insetos herbívoros, sendo a água, portanto, um fator fundamental para sua performance (Scriber & Slansky, 1981; Holton *et al.*, 2003; Coley *et al.*, 2006). Outro fator que pode influenciar significativamente a escolha do recurso pelos insetos herbívoros é a quantidade de recurso, podendo influenciar a preferência de oviposição (Prokopy *et al.*, 1983; Roessingh *et al.*, 1990; Wolfe, 1997; Heisswolf *et al.*, 2006). Segundo Ishino (2007), no momento da oviposição, fêmeas de *Evippe* selecionam folhas de *Erythroxylum tortuosum* Mart. com menores teores de água e de maiores

tamanhos, e relações significativas entre preferência de oviposição e AF não foram encontradas. Apesar da grande importância destas variáveis na determinação de certos padrões em interações entre insetos e plantas (Roslin *et al.*, 2006), pouco se sabe sobre seus níveis de variação através de diversas escalas espaciais, e a definição da correta escala de observação é fundamental para se detectar padrões ecológicos (Levin, 1992). Portanto, para um melhor entendimento das interações entre *Evippe* e *E. tortuosum*, informações sobre os níveis hierárquicos de variação de certos traços vegetais são fundamentais, e ainda não existem estudos com este enfoque para o sistema de estudo.

As plantas de *E. tortuosum* caracterizam-se por serem decíduas, com as folhas aglomeradas no ápice do ramo. A abscisão foliar inicia-se em meados de junho, e a queda total das folhas dá-se por volta de agosto até início de setembro. As folhas jovens expandem-se de forma acentuada principalmente do final de setembro à metade de novembro, quando a fase adulta inicia-se, tornando as folhas coriáceas (Ishino, 2007). *E. tortuosum* é uma planta arbustiva-arbórea típica dos cerrados (Amaral Jr., 1973), onde pouco se conhece sobre os organismos ocorrentes e os padrões e processos populacionais naturais oriundos de interações tróficas. O alto grau de especialização da interação inseto-planta em questão forma um sistema propício para a elaboração de experimentos destinados ao estudo de interações populacionais. Além disso, uma característica das folhas desta planta é que estas formam aglomerados nas extremidades de pequenos ramos, formando claras unidades discretas dentro de um contexto espacial. Portanto, a hipótese e o objetivo específico propostos no presente estudo são apresentados a seguir:

Hipótese:

A seguinte hipótese foi investigada:

- 1) Traços vegetais e plantas como “organismos homogêneos”: considerando que traços de características diversas variam tanto entre plantas como entre diferentes partes dentro de uma mesma planta (ex. Fortin & Mauffette, 2002; Roslin *et al.*, 2006), traços vegetais como teor de água, área foliar e assimetria flutuante (AF) devem variar através das diferentes escalas espaciais de observação, ou seja, através de diferentes níveis hierárquicos.

Objetivos específicos

Investigar se as fêmeas de *Evippe* respondem significativamente a variações no teor de água, no nível de assimetria e na área foliar em *E. tortuosum*, dentro do nível de resolução espacial de maior variabilidade de cada traço; 2) avaliar se a taxa de crescimento das minas e o nível de dano causado por este inseto estão relacionados com os níveis de assimetria flutuante e com a área foliar de *E. tortuosum*.

2. Materiais e Métodos

2.1 Área de estudo

Foram observados indivíduos de *E. tortuosum* (Fig. 1) ocorrentes em fragmento de cerrado *sensu stricto* (176,7 ha) pertencente à Fazenda Palmeira-da-Serra (22°48'50" S; 48°44'35" W). O fragmento está localizado na altura do km 218 da rodovia João Mellão (SP-255), nas proximidades do município de Pratânia, Estado de São Paulo. O local de estudo está circundado por áreas de ação antrópica, com cultivo de soja, eucalipto, *Pinus* e cana-de-açúcar.

A figura 2 apresenta uma foto mostrando parte do fragmento que foi utilizado para estudo. As plantas foram marcadas ao acaso através da delimitação de quatro transectos (150 m para o interior do fragmento por 20 m de largura). Cada planta foi devidamente marcada [numeradas em placas de metal (5 cm x 5 cm)], permitindo o conhecimento da origem de todo o material biológico analisado e coletado para estudo. Indivíduos de referência de *E. tortuosum* estão depositados no Herbário "Irina Delanova de Gemtchujnicov", sob o número de registro BOTU 16869.

2.2 Níveis hierárquicos: marcação das plantas, determinação do teor de água, da assimetria flutuante e da área foliar

Para estudar a variação hierárquica dos traços vegetais, cinco plantas foram marcadas ao acaso nos transectos. Em cada planta foram marcados dois ramos, de cada ramo foram marcadas duas bifurcações e de cada bifurcação foram marcados três aglomerados de folhas (Fig.3). Todas as folhas de cada aglomerado foram coletadas, individualizadas em sacos de papel e identificadas. As folhas foram coletadas quando estavam bem desenvolvidas, porém ainda jovens sem a presença de minas. Após a coleta as folhas foram levadas ao laboratório e pesadas individualmente (peso fresco- PF) e colocadas em estufa a 50⁰C por 72 horas. Após a secagem, as folhas foram novamente pesadas, obtendo-se o peso seco (PS), calculando-se o teor de água para cada folha.

$$\text{Teor de água (\%)} = (\text{PF}-\text{PS}) * 100/\text{PF}$$

Depois de mensurado o peso fresco, imagens digitais (resolução: 2048 x 1536 pixels) foram geradas fotografando-se cada folha a uma distância padrão de 30 cm, por meio de câmera digital (Canon Powershot A400). Um cuidado tomado para minimizar o erro na obtenção das imagens foi pressionar sobre a folha e o anteparo da fotografia, uma placa transparente para deixar as superfícies das lâminas foliares totalmente planas (Sinclair & Hoffman, 2003).

Para se determinar o nível de assimetria, as respectivas larguras do lado direito e esquerdo foram medidas nas folhas fotografadas partindo-se perpendicularmente da nervura central até a borda, na porção mediana da folha, utilizando-se software de análise de imagem (MetaVue Version 6.3r4) (Fig.4). A assimetria absoluta de uma determinada folha foi definida como a diferença (módulo) entre a largura direita (*LD*) e a largura esquerda (*LE*) (Palmer & Strobeck, 2003):

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

Um importante fator a ser considerado nos estudos de assimetria é o erro de mensuração. Palmer (1996) relata que é importante as diferenças de simetria serem maiores que os erros de mensuração ou que medições subseqüentes feitas nas mesmas folhas sejam altamente correlacionadas, uma vez que o erro pode parecer assimetria. Portanto, cerca de 10% das folhas coletadas (Cornelissen & Stiling, 2005) foram submetidas a uma segunda mensuração para a investigação de possíveis erros, correlacionando-se as duas medições.

Após a determinação da Assimetria Flutuante (AF), as mesmas fotografias foram utilizadas para a estimativa da área de cada folha, novamente utilizando-se software de análise de imagem (MetaVue Version 6.3r4).

2.3 Oviposição

Para a realização desta etapa de estudo, foram selecionadas nove plantas. Foi observada a ocorrência de ovos do minador no período mais intenso de oviposição (novembro-dezembro - 2007), em dois momentos distintos. Quando ocorria o aparecimento de ovos em determinada folha, esta era coletada juntamente com uma folha sem ovos nas proximidades. Após a coleta, as folhas com e sem postura eram levadas ao laboratório, onde se determinava o teor de água, o nível de assimetria e a área foliar de cada folha, como descrito no subitem 2.2. Pretendia-se

coletar as folhas com e sem ovos em cada aglomerado de folhas em cada planta para comparações do padrão de oviposição através dos diferentes níveis hierárquicos. No entanto, poucos ovos foram observados em cada aglomerado de folhas, uma vez que estes estavam mais dispersos na copa das plantas. Assim, as coletas foram feitas apenas registrando-se a planta de origem.

2.4 Determinação da taxa de crescimento das minas

Foram selecionadas sete plantas ao acaso contendo folhas com minas em estágio inicial de desenvolvimento. Cada folha continha apenas uma mina. No campo, cada folha foi marcada permanentemente com caneta *Sharpie* no momento do aparecimento das minas. Com auxílio de papel acetato, a cada quinze dias foi traçado o contorno das minas de *Evippe* ainda no campo. No laboratório, os desenhos obtidos foram fotografados (Canon Powershot A400) a uma distância padrão de 30 cm, e o tamanho das minas medido através de software de análise de imagem (MetaVue Software, Version 6.3r4). A taxa de crescimento das minas foi então calculada: Taxa de crescimento = (Tamanho final - Tamanho inicial)/Período total (dias) de crescimento das minas. Em cada folha também foi calculada uma porcentagem de dano foliar (%NF): %NF = (tamanho final da mina/tamanho da folha) x 100.

2.5 Análise de dados

A coleta de folhas em nível de aglomerado de folhas teve como objetivo verificar a variabilidade de cinco níveis hierárquicos, ou seja, verificou-se a variação do teor de água, dos níveis de assimetria e da área foliar entre as plantas, entre os ramos, entre as bifurcações, entre os diferentes aglomerados de folhas e entre as folhas. Desta forma, foi possível saber qual a contribuição de cada nível hierárquico para a variabilidade das variáveis investigadas. Como descrito no subitem 2.6 do Capítulo 1 foi feita a análise dos componentes da variância para efeitos randômicos (níveis hierárquicos de variação) (Gotelli & Ellison, 2004; Crawley, 2005), promovendo assim a repartição da variância. A variável aglomerado de folhas foi agrupada (*nested design*) na variável bifurcação, a qual foi agrupada na variável ramos, a qual, por sua vez, foi agrupada na variável planta. Todas as variáveis foram consideradas como randômicas. Através da repartição da variância, a proporção com que cada nível hierárquico contribui para a variância total é conhecida. A proporção da variância (PV) é

calculada por $PV = S^2_E / (S^2_E + S^2_D)$, em que S^2_D representa a variância dentro de um grupo, e S^2_E representa a variância entre os grupos (Gotelli & Ellison, 2004). Um alto valor de PV, também conhecido como coeficiente de correlação intraclassa (Zar, 1999), representa o caso onde a maior parte da variância está entre os grupos e não dentro destes. Estas análises foram feitas usando o sistema R para Windows, versão 2.7.1 (R, 2008). Após a estimativa da proporção da variância para cada nível hierárquico, os respectivos intervalos de confiança (95%) foram obtidos por *Bootstrap* (1000 simulações) pelo programa BioEstat 5.0 (Ayres, 2007).

Após a determinação da variabilidade dos níveis hierárquicos, comparações dos valores médios do teor de água, da AF e da área foliar foram feitas entre folhas com e sem ovos. No entanto, no caso da comparação do teor de água, uma Análise de Variância com dois fatores (Two-Way ANOVA) (Zar, 1999) foi empregada, com nove plantas e cada planta com folhas com e sem ovos (design 9 x 2). Utilizou-se neste caso a análise de variância com dois fatores, considerando plantas e tipos de folha, porque as maiores variabilidades foram encontradas nos níveis de planta e folha, respectivamente (ver Resultados). As variáveis planta e tipo de folha foram consideradas de efeito randômico e de efeito fixo, respectivamente. No caso da área foliar e AF, a variável planta não foi considerada nas análises, sendo as comparações feitas considerando apenas o tipo de folha, uma vez que a maior variabilidade foi encontrada entre as folhas (ver Resultados). No entanto, como folhas de cada tipo, com e sem ovos, foram obtidas de cada planta, caracterizando um agrupamento (*nested design*), as comparações foram feitas por *Bootstrap* para fins de análise de variância (um critério), ou seja, foram feitas reamostragens dos dados (amostras numerosas são retiradas de uma pequena amostra, com reposição) com 10000 simulações. Este procedimento reduziu o efeito “planta” nestas análises. As simulações foram feitas pelo programa BioEstat 5.0 (Ayres, 2007), e as variáveis teor de água, área foliar e AF foram transformadas em $\arcsen\sqrt{\text{prop}}$, raiz quadrada e $\log(x + 1)$, respectivamente, para atender a normalidade.

Para verificar a relação entre a taxa de crescimento das minas e AF e área foliar, bem como entre a porcentagem de dano e AF e área foliar, análises de regressão múltipla (Zar, 1999) foram empregadas, tendo como variáveis independentes AF e área foliar. Para a aplicação destas análises as variáveis independentes não devem ser correlacionadas, evitando-se a multicolinearidade (Gotelli & Ellison, 2004). Portanto, uma análise de correlação entre AF e área foliar foi empregada, novamente através da reamostragem via *Bootstrap* (10000 simulações).



Fig. 1. Indivíduos de *E.tortuosum* em fragmento de cerrado. **A.** Indivíduo com primórdios foliares e botões florais. **B.** Indivíduos com folhas adultas.



Fig. 2. Vista parcial do fragmento de cerrado utilizado no estudo pertencente à reserva particular “Fazenda Palmeira-da-Serra”, município de Pratânia-SP.



Fig. 3. Aglomerado de folhas, no ápice do ramo de *E. tortuosum*

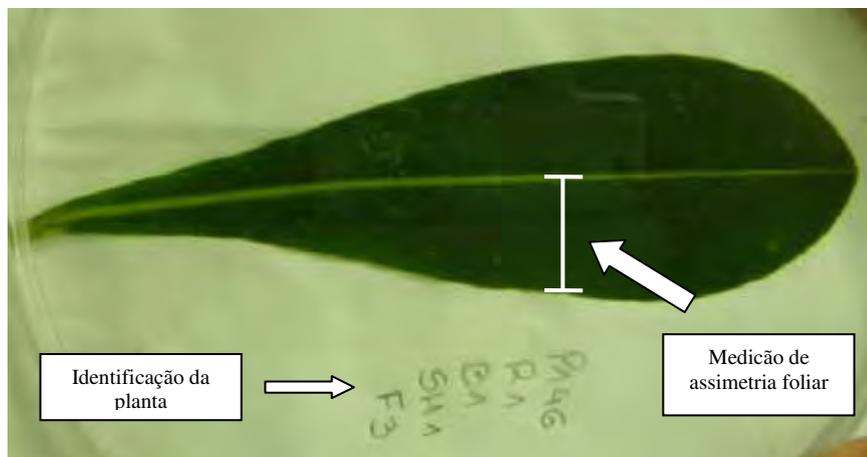


Fig. 4. Análise de imagem de folha de *E. tortuosum* para medições do nível de assimetria flutuante, da área foliar

3. Resultados

Pela análise de repartição da variância constatou-se que o nível de variabilidade dependeu de cada traço investigado (Figs. 5-7). No caso do teor de água a maior variabilidade encontrada foi em nível de planta, seguida pela variabilidade em nível de folha, representada pelo resíduo (Fig. 5). No caso da área foliar, a maior variabilidade foi encontrada em nível de folha, aparecendo em seguida o nível de planta, com menos de 30% da variabilidade (Fig. 6). A AF apresentou grande variabilidade em nível de folha, representando 90% de toda a variabilidade (Fig. 7).

Após a determinação dos níveis de variabilidade de cada traço vegetal, as comparações entre os valores médios do teor de água, da área foliar e do nível de assimetria foram feitas entre folhas com e sem ovos. Portanto as comparações do teor de água demonstraram diferenças significativas entre plantas (Fig. 8) e entre tipo de folha (Tabela 1). Apesar de não ter havido diferença significativa para efeito de interação (Tabela 1), comparação pareadas dos valores médios do teor de água das folhas com e sem ovos em cada planta foram feitas, verificando-se que a diferença mais marcante ocorreu na planta 47, uma vez que houve diferença significativa entre os valores médios pelo teste *LSD* (*Least Significant Difference*; $P = 0,001$) (Fig. 9). Constata-se também pela figura 9 que na maioria das vezes as folhas com ovos apresentavam menores teores de água. No caso da área foliar e AF, não foram encontradas diferenças significativas entre folhas com e sem ovos (Tabela 2). Constatou-se que a maioria dos ovos foi depositada de novembro e dezembro de 2007 (Fig. 10).

O resultado da correlação linear, através da reamostragem via *Bootstrap* (10000 simulações), demonstrou que as variáveis AF e área foliar não são correlacionadas significativamente (r (Pearson) = 0,096; r (simulação) = -0,1417; P (simulação) = 0,278). Portanto, estas variáveis foram consideradas como independentes, pois não apresentaram multicolinearidade (Gotelli & Ellison, 2004). No caso da análise de regressão múltipla entre a taxa de crescimento das minas (variável dependente) e a AF e a área foliar (variáveis independentes) não foi constatada diferença significativa ($F(2, 32) = 0,029$; $r^2 = 0,0018$; $P = 0,972$); no entanto, para a análise de regressão múltipla entre a porcentagem de dano (variável dependente) e a AF e a área foliar, houve diferença significativa ($F(2, 32) = 8,739$; $r^2 = 0,353$; $P = 0,012$). No entanto, somente o coeficiente de regressão para área foliar foi significativo ($b = -0,0036$; $t = -4,159$; $P = 0,0002$), o qual foi negativo, indicando que os maiores danos ocorreram nas folhas menores.

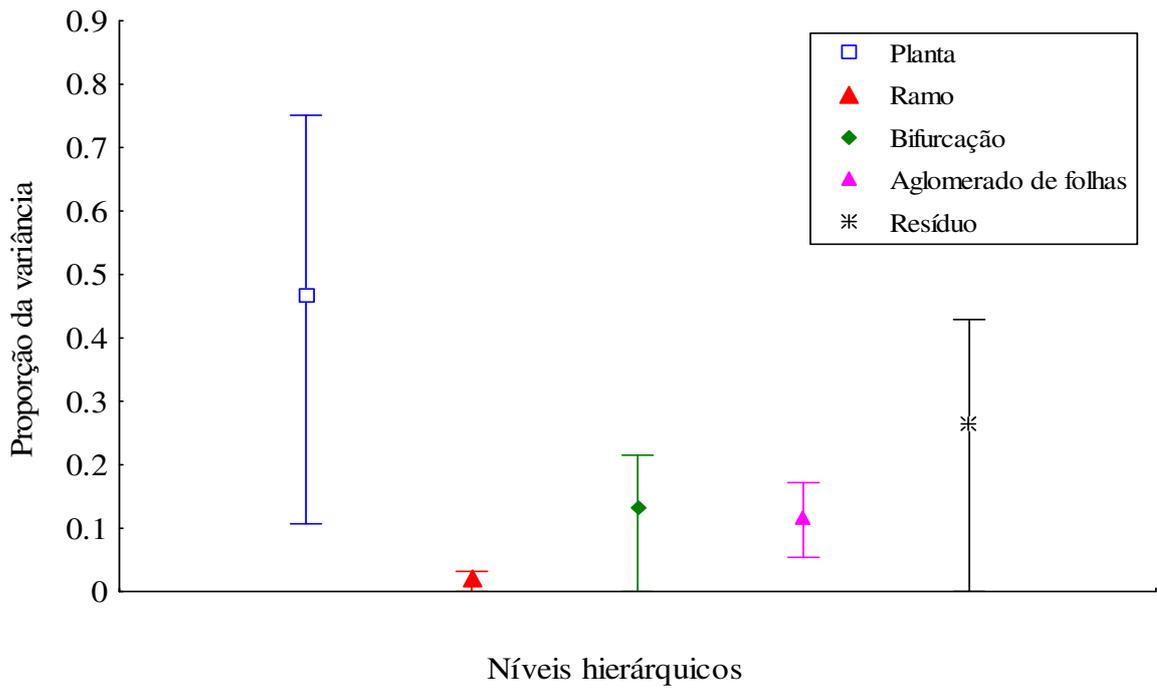


Fig. 5. Componentes da variância para determinação da variação do teor de água entre plantas, ramos, bifurcações e aglomerado de folhas. As barras representam 95% de intervalo de confiança.

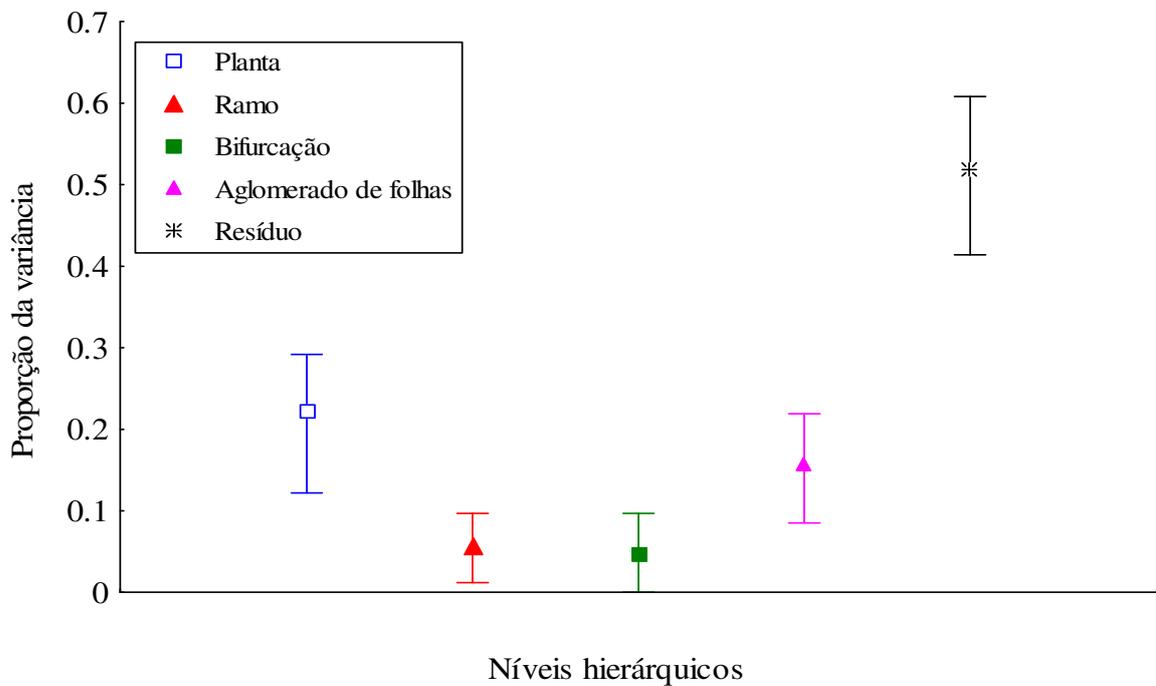


Fig. 6. Componentes da variância para determinação da variação da área foliar entre plantas, ramos, bifurcações e aglomerado de folhas. As barras representam 95% de intervalo de confiança.

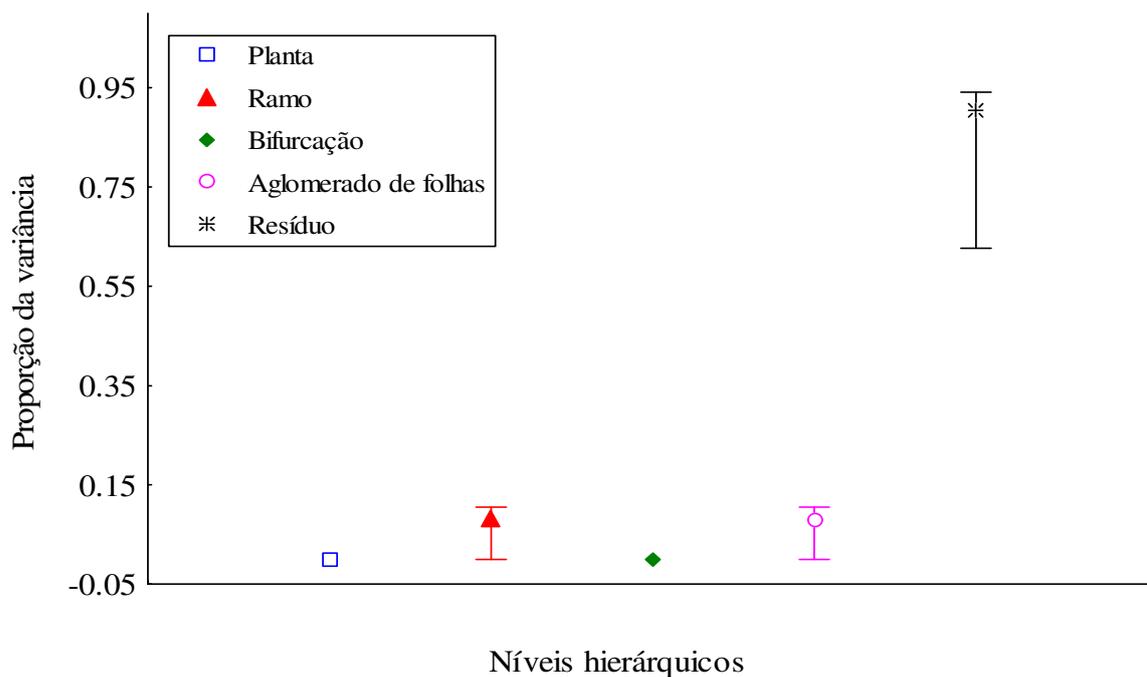


Fig. 7. Componentes da variância para determinação da variação do nível de assimetria flutuante (AF) entre plantas, ramos, bifurcações e aglomerado de folhas. No caso dos níveis de planta e bifurcação, as variações foram pequenas o suficiente para serem estimadas como zero. As barras representam 95% de intervalo de confiança.

Tabela 1. Resultados da Análise de Variância (Two-Way ANOVA) comparando os valores médios do teor de água (%) das folhas entre plantas, tipo de folha (com ou sem ovos) e interação entre os fatores.

| Fonte de variação* | GL | QM | F | P |
|---------------------------------|----|-------|--------|---------|
| Planta | 8 | 0,072 | 38,850 | <0,0001 |
| Tipo de folha (com ou sem ovos) | 1 | 0,013 | 5,776 | 0,043 |
| Planta x Tipo de folha | 8 | 0,002 | 1,222 | 0,287 |

*As variáveis Planta e Tipo de folha foram consideradas de efeito randômico e fixo, respectivamente.

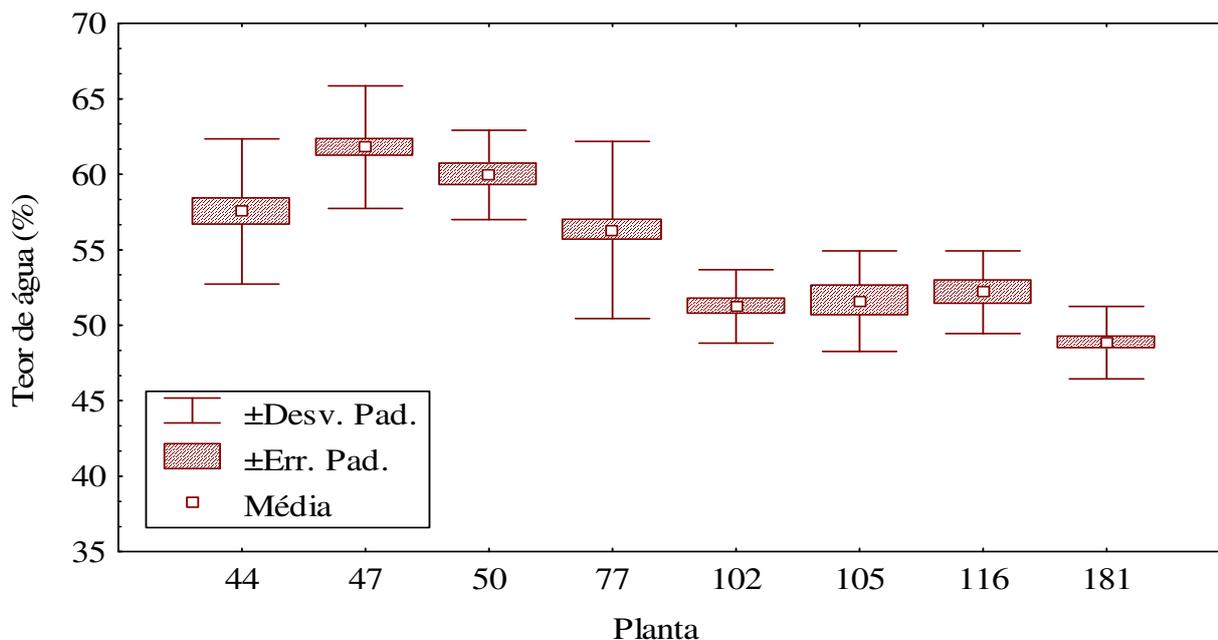


Fig. 8. Distribuição dos valores médios do teor de água (%) das folhas entre as diferentes plantas. Os valores diferiram estatisticamente através da Análise de Variância (ver resultados na Tabela 1).

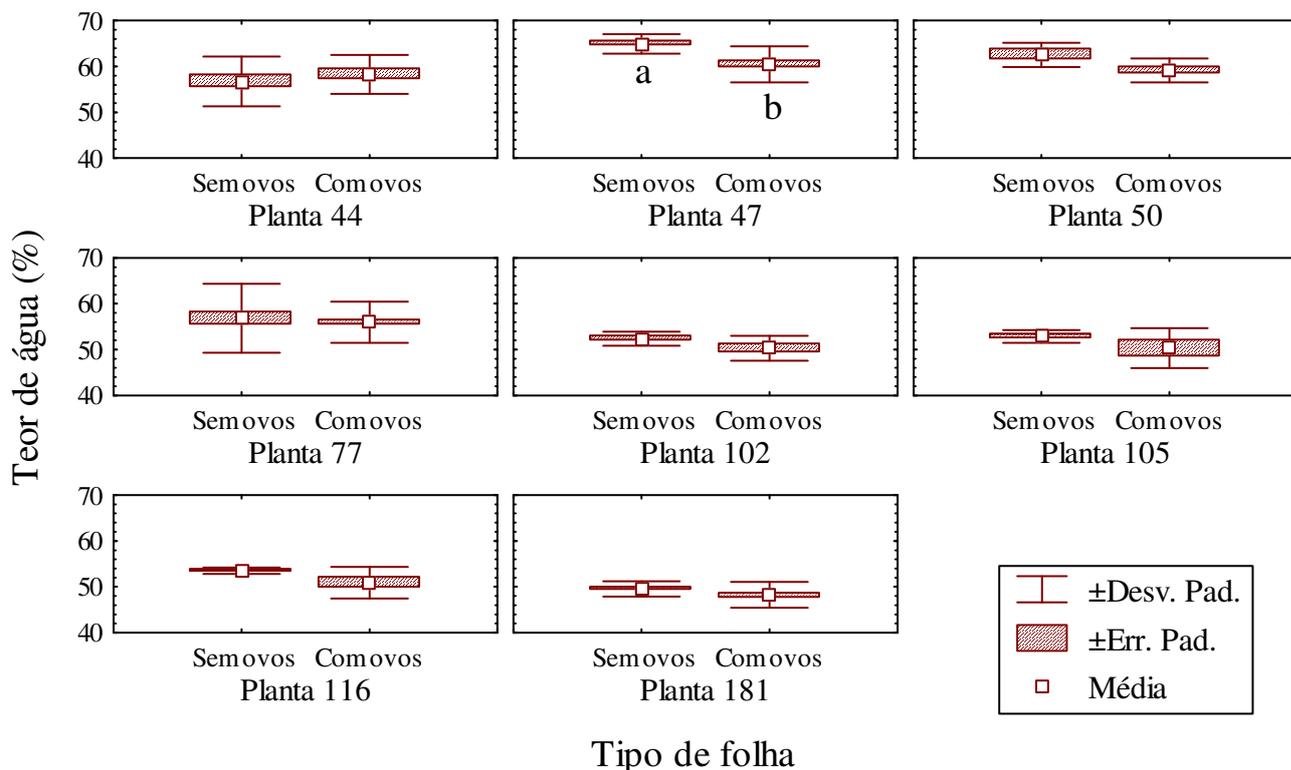


Fig. 9. Comparação dos valores médios do teor de água (%) das folhas com e sem ovos em cada planta. Apesar de não haver diferença significativa para efeito de interação (Tabela 1), verifica-se que a diferença mais marcante ocorreu na planta 47, uma vez que houve diferença significativa entre os valores médios pelo teste *LSD* (*Least Significant Difference*; $P = 0,001$).

Tabela 2. Resultados das comparações por *Bootstrap* (10000 simulações) para fins de Análise de Variância (um critério), comparando os valores médios da área foliar (mm^2) e da AF entre os tipos de folha (com ou sem ovos).

| Variável resposta | Média geral (simulação) | Desvio (simulação) | <i>P</i> |
|-------------------|-------------------------|--------------------|----------|
| Área foliar | 52,548 | 0,330 | 0,487 |
| Simetria | 0,2018 | 0,009 | 0,202 |

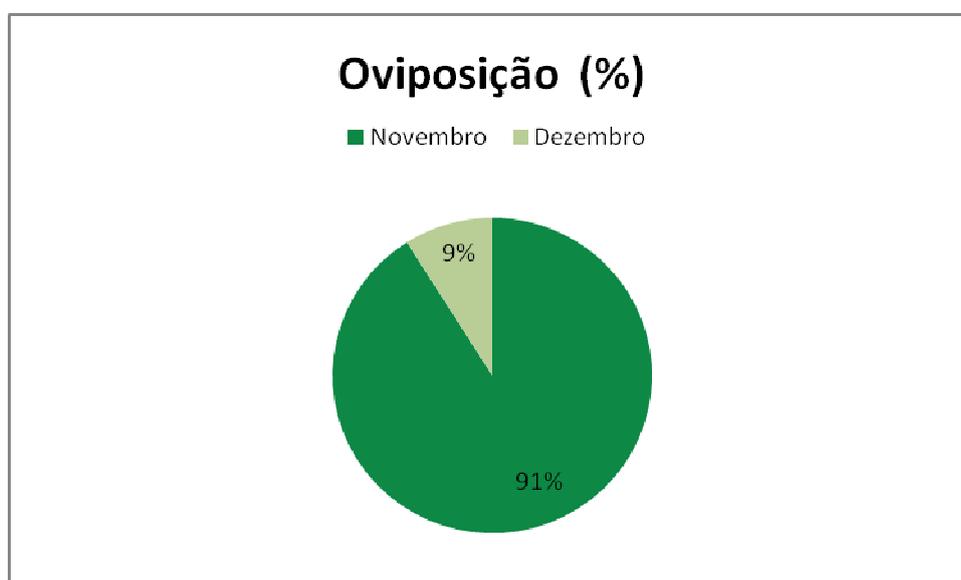


Fig. 10. Porcentagem de ocorrência de ovos do minador no período mais intenso de oviposição (novembro-dezembro/2007).

4. Discussão

Os resultados apresentados neste estudo mostram que as plantas de *E. tortuosum* não são uniformes para a maioria dos traços investigados. Portanto, cada planta pode ser considerada como um mosaico de características heterogêneas. As plantas de *E. tortuosum* podem ser consideradas como unidades discretas de recurso apenas para o teor de água, o qual parece ser importante para o minador no momento da escolha do recurso. Alguns estudos mostram que folhas com maior teor de água são preferidas por muitos insetos herbívoros, sendo um fator fundamental para o desempenho (Scriber & Slansky, 1981; Holton *et al.*, 2003; Coley *et al.*, 2006). No entanto, Ishino (2007) encontrou que no momento da oviposição as fêmeas de *Evippe* preferiram ovipor em folhas com menores teores de água. Este autor sugere que a alta umidade poderia conferir maior mortalidade às lagartas, favorecendo a proliferação de microrganismos entomopatogênicos nas minas, aumentando a mortalidade dos minadores. Outro argumento apresentado por Ishino (2007) é que o alimento ideal para as larvas não seria o mesmo para as mariposas adultas, as quais não estariam selecionando um recurso ideal na oviposição para o desenvolvimento dos seus descendentes.

Apesar de em geral as fêmeas preferirem ovipor em plantas onde a prole apresentará um bom desenvolvimento (Awmack & Leather, 2002), Schoonhoven *et al.* (2005) ressaltam que os recursos utilizados pelos adultos e pelas larvas nem sempre são idênticos. Portanto, é possível que as fêmeas tenham preferência por folhas mais secas, das quais houve a emergência dos adultos. Os resultados do presente estudo corroboram com os achados de Ishino (2007), uma vez que diferenças significativas foram encontradas entre folhas com e sem ovos, verificando-se um menor teor de água nas folhas com ovos. Estes resultados também mostram que o fator “planta” foi importante para demonstrar variação do teor de água entre as folhas, pois exatamente neste nível de resolução espacial é onde se espera uma maior variabilidade deste traço. E justamente a variabilidade entre folhas ocupou o segundo lugar nos níveis hierárquicos, o que sugere que estes insetos selecionam plantas de menor teor de água e, uma vez dentro da planta, uma nova seleção por folhas pode ocorrer para a oviposição.

Um fator que também é muito importante para a escolha do local de oviposição pelos insetos herbívoros é o tamanho do recurso (Prokopy *et al.*, 1983; Roessingh *et al.*, 1990; Wolfe, 1997; Heisswolf *et al.*, 2006). Além da preferência por folhas com menor teor de água como sítios de oviposição, Ishino (2007) encontrou que as fêmeas de *Evippe* tinham

preferência por folhas maiores, utilizando-se, de forma similar ao presente estudo, a menor escala espacial de investigação para análise de dados, ou seja, a escala de folha. No entanto, esta preferência não foi verificada no presente estudo. Uma possível explicação para esta diferença é que no trabalho de Ishino (2007) foram utilizadas 30 plantas para esta comparação, enquanto que neste estudo foram utilizadas nove, demonstrando grande diferença no “N” amostral.

A assimetria flutuante tem sido utilizada como medida de avaliação da instabilidade do desenvolvimento (ID), avaliando desta forma o nível de stress de um organismo. Alguns estudos mostram que plantas sob stress, com alto grau de AF, teriam maior suscetibilidade ao ataque de herbívoros (Møller, 1995; Zvereva *et al.*, 1997; Cornelissen *et al.*, 2003; Cornelissen & Stiling, 2005). No entanto, Bañuelos *et al.* (2004) não encontraram relações significativas entre AF e herbivoria, conteúdo de um composto secundário, dimorfismo sexual e ID, para a planta *Rhamnus alpinus*. Wiggins (1997) também não encontrou relações significativas entre a preferência de oviposição da mariposa *Imbrasia Belina* e o grau de AF das plantas de *Colophospermum mopane*. No presente estudo não foi verificada a preferência de oviposição de *Evippe* por folhas com diferentes níveis de assimetria, o mesmo acontecendo no estudo de Ishino (2007), indicando que as fêmeas de *Evippe* talvez não consigam perceber diferenças nos níveis de assimetria das folhas de *E. tortuosum*, utilizando outros traços vegetais para a seleção de sítios de oviposição.

Roslin *et al.* (2006) investigou a variação espacial de um sistema considerado clássico no que diz respeito a interações inseto-planta: o carvalho *Quercus robur* L. (Crawley, 1985; Faeth, 1986; Tikkanen & Julkunen-Tiitto, 2003). Segundo os autores, a repartição da variância de plantas hospedeiras em diferentes níveis hierárquicos é fundamental para um entendimento satisfatório das interações entre herbívoros e plantas, tanto dentro de uma perspectiva ecológica como evolutiva. Por exemplo, a distribuição espacial da qualidade da planta hospedeira tem implicações profundas para a teoria ecológica moderna, uma vez que o nível no qual um grupo (população) de insetos deve se adaptar a sua planta hospedeira dependerá do nível de diferenciação entre as plantas como indivíduos. Se diferentes partes da mesma planta variam consideravelmente em qualidade, pressões de seleção devem ser muito inconsistentes para permitir adaptações locais (“hipótese de heterogeneidade do hospedeiro”, Whithan, 1983; Whithan *et al.*, 1984; Cobb & Whithan, 1993, 1998). Roslin *et al.* (2006) encontraram grande variação entre carvalhos individuais no que diz respeito a compostos fenólicos, e em escalas espaciais bem finas estes compostos variaram muito pouco, sendo bem

consistentes. Já a área foliar e o teor de água, diferiram consideravelmente dentro das plantas. Os autores concluem que a idéia de um carvalho como uma “ilha” de qualidade internamente homogênea é equivocada. Diferentemente do estudo de Roslin *et al.* (2006), neste estudo verificou-se que os taninos variavam mais nas menores escalas espaciais (Fig. 9, Capítulo 1) e o teor de água variou mais entre plantas individuais (Fig. 5). No entanto, similar ao estudo de Roslin *et al.* (2006), a área foliar variou mais entre as folhas (Fig. 6). Portanto, plantas de *E. tortuosum* também não podem ser consideradas como “ilhas” de qualidade homogênea, uma vez variações consideráveis dentro das plantas foram observadas. Conseqüentemente, variações internas consideráveis devem ocorrer mesmo em plantas de pequeno/médio porte, influenciando o nível de resolução da escolha do recurso pelos herbívoros (Fritz & Nobel, 1989; Thompson, 1988; Mayhew, 1997; Awmack & Leather, 2002).

Constatou-se neste estudo uma relação não significativa entre a taxa de crescimento das minas e AF e a área foliar. A porcentagem de dano também não teve qualquer relação com a AF, mostrando novamente que a AF não deve ser importante neste sistema, apesar deste traço ser muito variável dentro de cada planta. Portanto, os minadores não devem estar causando assimetria nas folhas de *E. tortuosum* e os diferentes níveis de assimetria também não devem estar influenciando o desempenho destes insetos. Embora os insetos herbívoros possam ser agentes causadores de estresse, aumentando diretamente o nível de assimetria (Zvereva *et al.*, 1997), este padrão não foi observado neste estudo, o que corrobora com os resultados de Ishino (2007), que sugerem que *Evippe* não é causador de assimetria em folhas de *E. tortuosum*. A porcentagem de dano foi inversamente relacionada com a área foliar, mostrando que as menores folhas possuíam maiores danos. Considerando que após o estabelecimento das minas a área das folhas de *E. tortuosum* praticamente não se altera (Ishino, 2007), os maiores danos nas folhas menores se justifica pelo crescimento das minas apenas, e não por um comprometimento do desenvolvimento das folhas após a infestação. Além disso, como a taxa de crescimento das minas não variou em função da área foliar, as minas cresceram de forma similar entre as folhas, assim, as folhas menores tiveram maior área consumida (relativa ao total da folha) por intervalo de tempo.

5. Referências Bibliográficas

- Amaral Jr., A. (1973) *O gênero Erythroxyllum no município de Botucatu, São Paulo*. Tese de doutorado em Ciências – Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, Botucatu, SP.
- Ayres, M., Ayres Jr., M., Ayres, D.L. & dos Santos, A.S. (2007) *BioStat: Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas*; versão 5.0. Instituto de Desenvolvimento sustentável Mamirauá, IDSM/MCT/CNPq, Belém-PA, Brasil.
- Awmack, C.S. & Leather, S.R. (2002) Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Annual Review of Entomology* **47**, 817-844.
- Bañuelos, M.J., Sierra, M. & Obeso, J.R. (2004). Sex, secondary compounds and asymmetry: Effects on plant-herbivore interaction in a dioecious shrub. *Acta Oecologia* **25**, 151-157.
- Begon, M., Harper, J.L & Townsend, C.R. (1996). *Ecology. Individuals, populations, and communities*. Second edition Oxford: Blackwell Scientific Publications. London.
- Bultman, T.L. & Faeth, S.H. (1986) Leaf size selection by leaf-mining insects on *Quercus emoryi* (Fagaceae). *Oikos* **46**, 311-316.
- Clarke, G.M. (1993). Fluctuating asymmetry of invertebrate populations as a biological indicator of environmental quality. *Environmental Pollution* **82**, 207-211.
- Cobb, N.S. & Whitham, T.G. (1993). Herbivore deme formation on individual trees: a test case. *Oecologia* **94**, 496-502.
- Cobb, N.S. & Whitham, T.G. (1998). Prevention of deme formation by the pinion needle scale: problems of specializing in a dynamic system. *Genetic structure and local adaptation in natural insect populations: effects of ecology, life history, and behavior*. (eds S. Mopper, & S.Y. Strauss), pp. 37-63. Chapman and Hall
- Coley, P.D., Bateman, M.L. & Kursar, T.A. (2006) The effects of plant quality on caterpillar growth and defense against natural enemies. *Oikos* **115**, 219–228.
- Cornelissen, T., Stiling, P. & Drake, B. (2003) Elevated CO₂ decreases leaf fluctuating asymmetry and herbivory by leaf miners on two oak species. *Global Change Biology* **10**, 27–36.
- Cornelissen, T. & Stiling, P. (2005) Perfect is best: low leaf fluctuating asymmetry reduces herbivory by leaf miners. *Oecologia* **142**, 46–56
- Crawley, M.J. (1985) Reduction of oak fecundity by low-density herbivore populations. *Nature* **314**, 163-164.

- Crawley, M.J. (2005) Are grazing increaser species better tolerators than decreasers? An experimental assessment of defoliation tolerance in eight British grassland species. *Journal of Ecology* **93**, 1005-1016.
- Denno, R.F. & McClure, M.S. (1983) Variable plants and herbivores in natural and managed systems. Academic Press
- Escós, J., Alados, C.L. & Emlen, J.M. (1997) The impact of grazing on plant fractal architecture and fitness of a Mediterranean shrub *Anthyllis cytisoides* L. *Functional Ecology* **11**, 66–78.
- Edmunds, G.F.Jr. & Alstad, D.N. (1978) Coevolution in insect herbivores and conifers. *Science* **199**, 941-945.
- Faeth, S. H. (1986). Indirect interactions between temporally separated herbivores mediated by the host plant. *Ecology* **67**, 479-494.
- Faeth, S.H. (1990) Aggregation of leafminer, *Cameraria* sp. nov. (Davis): Consequences and causes. *Journal Animal Ecology* **59**, 569-586.
- Floate, K.D. & Fox, A.S.(2000) Flies under stress: a test of fluctuating asymmetry as a biomonitor of environmental quality. *Journal of Applied Ecology* **10**. 1541-1550.
- Fortin, M. & Mauffette, Y. (2002) The suitability of leaves from different canopy layers for a generalist herbivore (Lepidoptera: Lasiocampidae) foraging on sugar maple *Canadian Journal of Forest Research* **32**, 379-389.
- Fritz, R.S. & Nobel, J. (1989). Plant resistance, plant traits, and host plant choice of the leaf-folding sawfly on the arroyo willow. *Ecology. Entomology* **14**, 393-401.
- Gotelli, N.J. & Ellison, A.M. (2004) *A Primer of Ecological Statistics*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Heisswolf, A., Poethke, H.J. & Obermaier, E. (2006) Multitrophic influences on egg distribution in a specialized leaf beetle at multiple spatial scales. *Basic and Applied Ecology* **7**, 565–576.
- Holton, M.K., Lindroth, R.L. & Nordheim, E.V. (2003) Foliar quality influences tree-herbivore-parasitoid interactions: effects of elevated CO₂, O₃, and plant genotype. *Oecologia* **137**, 233–244.
- Hwang, S.Y. & Lindroth, R.L. (1997) Clonal variation in foliar chemistry of aspen: effects on gypsy moths and forest tent caterpillars. *Oecologia* **111**, 99-108.

- Ishino, M.N. (2007) *Efeito da assimetria flutuante nos padrões de herbivoria de um minador foliar em Erythroxylum totuosum Mart. (Erythroxylaceae)*. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.
- Koehn, R.K. & Bayne, B.L. (1989) Towards a physiological and genetical understanding of the energetics of the stress response. *Biological Journal of the Linnean Society* **37**, 157–171.
- Kozlov, M., Wilsey, B., Koricheva, J. & Haukioja, E. (1996) Fluctuating asymmetry of birch leaves increases under pollution impact. *Journal of Applied Ecology* **33**, 1489–1495.
- Lempa, K., Martel, J., Koricheva, J., Haukioja, E., Ossipov, V., Ossipova, S. & Pihlaja, K. (2000) Covariation of fluctuating asymmetry, herbivory, and chemistry during birch leaf expansion. *Oecologia* **122**, 354–360.
- Levin, S.A. (1992) The problem of pattern and scale in ecology. *Ecology* **73**, 1943–1967
- Mayhew, P.J. (1997) Adaptive patterns of host-plant selection by phytophagous insects. *Oikos* **79**, 417–428.
- Møller, A.P. (1995) Leaf-mining insects and fluctuating asymmetry in *Ulmus glabra* leaves. *Journal of Animal Ecology* **64**, 697–707.
- Neeman, G. (1993) Variation in leaf phenology and habit in *Quercus ithaburensis*, a Mediterranean deciduous tree. *Journal of Ecology* **81**, 627–634.
- Ohgushi, T. (1992). Resource limitation on insect herbivore populations. *Effects of resource distribution on animal plant-insect interactions* (eds. M.D., Hunter, T., Ohgushi & P.W., Price), pp. 200–243. Academic Press, New York.
- Palmer, A.R. & Strobeck, C. (1986) Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Annual Review of Ecology and Systematics* **17**, 391–421.
- Palmer, A.R. (1996) Waltzing with asymmetry. *Bioscience* **46**, 518–532.
- Prokopy, R.J., Collier, R. & Finch, S. (1983) Visual detection of host plants by cabbage root flies. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **34**, 85–89.
- R (2008) The R Foundation for Statistical Computing, version 2.7.1.
- Retting, J.E., Fuller, R.C., Corbett, A.L. & Getty, T. (1997) Fluctuating asymmetry indicates levels of competition in an even-aged poplar clone. *Oikos* **80**, 123–127.
- Roessingh, P. & Städler, E. (1990) Foliar form, colour and surface characteristics influence oviposition behaviour in the cabbage root fly *Delia radicum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **57**, 93–100.

- Roslin, T., Gripenberg, S., Salminen, J.P., Karonen, M., O'Hara, R.B., Pihlaja, K. & Pulkkinen, P. (2006) Seeing the trees for the leaves - oaks as mosaics for a host-specific moth. *Oikos* **113**, 106-120.
- Schoonhoven, L.M., Van Loon, J.J.A. & Dicke, M. (2005) *Insect-Plant Biology*. 2nd edition. Oxford University Press Inc., New York.
- Schultz, J.C. & Baldwin, I.T. (1982) Oak leaf quality declines in response to defoliation by gypsy moth larvae. *Science* **217**, 149-151.
- Scriber, J. M. & Slansky, F. J. (1981) The nutritional ecology of immature arthropods. *Annual Review of Entomology*, **26**, 183–211.
- Simberloff, D. & Stiling, P. (1987) Larval dispersion and survivorship in a leaf-mining moth. *Ecology* **68**, 1647-1657.
- Sposito, T.C. & Santos, F.A.M. (2001) Sactling of stem and crown in eight *Cecropia* (Cecropiaceae) species of Brazil. *American Journal of Botany* **88**, 939-949
- Sinclair, C. & Hoffmann, A.A. (2003) Monitoring salt stress in grapevines: are measures of plant trait variability useful? *Journal of Applied Ecology* **40**, 928–937.
- Stiling, P. Brodbeck, B.V. & Strong, D.R. (1982) Foliar nitrogen and larval parasitism as determinants of leafminer distribution patterns on *Spartina alterniflora*. *Ecological Entomology* **7**, 447-452.
- Tikkanen, O.P. & Julkunen-Tiitto, R. (2003) Phenological variation as protection against defoliating insects: the case of *Quercus robur* and *Operophtera brumata*. *Oecologia* **136**, 244-251.
- Tomkins, L.J. & Kotiano, J.S (2001). *Fluctuating asymmetry*. Encyclopedia of Life Sciences. Macmillan Publishers Ltda, Nature Publishing Group.
- Thompson, J.N. (1988). Evolutionary ecology of the relationship between oviposition preference and performance of offspring in phytophagous insects. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **47**, 3-14.
- Tuomi, J., Niemelä, P. & Mannila, R. (1981) Leaves as islands: interactions of *Scolioneura betuleti* (Hymenoptera) miners in birch leaves. *Oikos* **37**, 146-152.
- Wiggins, D.A. (1997) Fluctuating asymmetry in *Colophospermum mopane* leaves and oviposition preference in an African silk moth *Imbrasia belina*. *Oikos* **79**, 484–488.
- Wilsey, B.J., Haukioja, E., Koricheva, J. & Sulkinoja, M. (1998) Leaf fluctuating asymmetry increases with hybridization and elevation in tree-line birches. *Ecology* **79**, 2092-2099.

- White, T.C.R. (1984) The abundance of invertebrate herbivory in relation to the availability of nitrogen in stressed food plants. *Oecologia* **63**, 90–105.
- Whitham, T.G. (1983). Host manipulation of parasites: withinplant variation as a defense against rapidly evolving pests. *Variable plants and herbivores in natural and managed systems*. (eds. R.F., Denno & M.S., McClure), pp. 15-41. Academic Press,
- Whitham, T.G., Williams, A.G. & Robinson, A.M. (1984). The variation principle: Individual plants as temporal and spatial mosaics of resistance to rapidly evolving pests. *A new ecology: novel approaches to interactive systems*. (eds. P.W., Price; C.N., Slobodchikoff & W.S., Gaud), pp. 15-51. New York Wiley.
- Wolfe, L.M. (1997) Differential flower herbivory and gall formation in male and females of *Neea psychotrioides*, a dioecious tree. *Biotropica* **29**, 169–174.
- Zar, J.H. (1999) *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Zvereva, E.L., Kozlov, M. & Haukioja, E. (1997) Stress responses of *Salix borealis* to pollution and defoliation. *Journal of Applied Ecology* **34**, 1387–1396.

Conclusões

- 1) Infestações de *Evippe* geram variabilidade intermediária em populações de *E. tortuosum* no que diz respeito aos conteúdos de taninos e nitrogênio, sendo esta variabilidade mais intensa na fase final de desenvolvimento das minas;
- 2) A grande maioria das folhas apresentou apenas uma mina, mostrando mortalidade relativamente baixa do estágio de ovos para o estágio larval, uma vez que a maioria das folhas continha de 1 a 3 ovos;
- 3) As fêmeas de *Evippe* apresentaram preferência de oviposição por folhas com menores teores de água;
- 4) A assimetria flutuante e a área foliar não tiveram relação com a taxa de crescimento das minas e com a porcentagem de dano. No entanto, os maiores danos ocorreram nas menores folhas;
- 5) Traços vegetais como assimetria flutuante, área foliar e teor de água apresentaram variabilidade diferenciada dependendo do nível de resolução espacial investigado;
- 6) Plantas de *E. tortuosum* não podem ser consideradas como “ilhas” de qualidade homogênea, uma vez variações consideráveis dentro das plantas foram observadas, influenciando o nível de resolução da escolha do recurso pelos herbívoros.