



DANESSA SCHARDONG BOLIGON

VARIAÇÃO NOS TRICOMAS DE *Solanum sisymbriifolium*  
(SOLANACEAE) E HERBIVORIA POR LARVAS DE *Gratiana spadicea*  
(COLEOPTERA, CHRYSOMELIDAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Área de Concentração: Biologia e Comportamento Animal  
Orientador: Prof. Dr. Gilson Rudinei Pires Moreira  
Co-orientador(es): Profa. Dra. Lenice Medeiros (UNIJUÍ) e Profa. Dra. Rosy Mary dos Santos Isaias (UFMG)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Porto Alegre

2007

Variação nos tricomas de *Solanum sisymbriifolium* (Solanaceae) e herbivoria  
por larvas de *Gratiana spadicea* (Coleoptera, Chrysomelidae)

DANESSA SCHARDONG BOLIGON

Aprovada em \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Flávia Nogueira de Sá

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Geraldo Luiz Gonçalves Soares

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Milton Mendonça Jr.

Dedico este trabalho aos meus pais, Pedro José e Geni, e à minha irmã Caroline em  
agradecimento ao incentivo e compreensão demonstrados em toda a minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Professor Gilson R.P. Moreira pela dedicação em todas as etapas do mestrado, profissionalismo, paciência, entusiasmo, apoio e pelos valiosos ensinamentos a cada dia de trabalho.

À Lenice Medeiros pelos primeiros e fundamentais ensinamentos na área da pesquisa, pelo incentivo, confiança, e amizade desde a graduação até hoje.

À Rosy Isaias pela acolhida em Belo Horizonte, pela paciência com os cortes de histologia vegetal, pelos e-mails animadores, dúvidas esclarecidas e todos os ensinamentos de botânica, imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Morfologia e Comportamento de Insetos, Ábner Campos, Ana Aymone, Ana Kristina, Denis dos Santos, Elisete Barp, Érica Giani, Evelyn Gonçalves, Josielma Hofman, Kim Barão, Lucas Kaminski, Leonardo Jorge e Queli Cardozo, pela convivência amigável, discussões, momentos de descontração e companheirismo demonstrados a cada dia.

Aos colegas do Laboratório de Bioecologia de Insetos e Entomologia Sistemática que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Adriano Cavalleri pelo auxílio com as fotos, dicas de trabalho, incentivo e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Carcinologia pela ótima companhia e amizade.

Aos amigos, Adriane Bartman, Andria Callegaro, Fátima Lopes, Tanise Sausen, Tatiane de Lima e Vinicius Oliveira pelo convívio e momentos de alegria durante estes dois anos.

À Daniela Rodrigues, Elisete Barp e Solange Kerpel pelas valiosas sugestões ao longo desta etapa.

Às amigas que representam a minha família em Porto Alegre, Daiana Castiglioni, Daniela Barcelos, Helena Hoffman e Viviana Matesco, verdadeiros presentes que ganhei durante o mestrado e que contribuíram para dias mais felizes.

Ao Marcelo, pelos momentos de distração nos últimos meses e por tudo o que representa para mim.

Agradeço aos meus amados pais, Pedro José e Geni, e à minha irmã Caroline, pelo incentivo nas minhas escolhas, pelo amor, carinho e compreensão em todos os momentos e a cada dia da minha vida. Muito obrigada!

Aos membros do Laboratório de Anatomia Vegetal da UFMG pela acolhida e pelos ensinamentos.

Aos técnicos em histologia, Sidnei (UNIJUÍ) e Circe (UFRGS), pelo auxílio na confecção das lâminas.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica (UFRGS) pela utilização dos equipamentos.

Aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal (UFRGS).

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado.

## RESUMO

A grande diversidade de plantas e de insetos herbívoros reflete na diversidade de interações entre os mesmos. Dentre estas interações, destacamos o papel dos tricomas na defesa mecânica e química das plantas contra o ataque de insetos herbívoros. As folhas de *Solanum sisymbriifolium* (Solanaceae) apresentam uma variedade de tricomas que atuam como barreira, mesmo para insetos especialistas como *Gratiana spadicea* (Coleoptera, Chrysomelidae). Tais estruturas dificultam o acesso ao alimento das larvas, principalmente nos ínstares iniciais, ocasião em que as larvas sofrem alta mortalidade quando alimentadas de folhas de alta densidade de tricomas. Não se sabe se as causas destes índices estão relacionadas com as barreiras físicas ou químicas impostas pela presença de tricomas. Neste trabalho, verificamos se a dificuldade em acessar o alimento, causada pela presença de tricomas, reflete ou não alterações na utilização da planta e no comportamento das larvas de *G. spadicea*. Para tanto, cultivamos plantas de *S. sisymbriifolium* no sol e na sombra para induzir variações na densidade de tricomas foliares. As folhas correspondentes foram caracterizadas quanto ao tipo de tricomas existentes, densidade dos mesmos e histoquímica dos glandulares. Foi qualificado o comportamento alimentar das larvas, bem como a taxa de remoção e ingestão de tricomas frente a tal variação. As folhas de *S. sisymbriifolium* apresentaram quatro tipos de tricomas: tector unicelular, tector estrelado com quatro ou mais raios laterais, glandular longo-pedicelado pluricelular com cabeça clavada unicelular e glandular curto-pedicelado com cabeça globosa pluricelular, os quais variaram significativamente entre as folhas de sol e de sombra. Os tricomas tector estrelado e glandular longo-pedicelado foram mais numerosos nas plantas mantidas no sol, enquanto o tector unicelular, nas plantas de sombra. O número de tricomas glandular curto-pedicelado

não diferiu significativamente entre os dois tipos de planta. Os testes histoquímicos foram positivos para fenóis, alcalóides e lipídios nos dois tipos de tricomas glandulares. As larvas removeram os tricomas das folhas para atingir o alimento (mesofilo foliar) e a alta densidade de tricomas, principalmente dos estrelados, interferiu no tempo dedicado à alimentação, já que o maior tempo dedicado à remoção destas estruturas diminuiu o tempo empregado na ingestão de alimento. O tempo dedicado as demais atividades (repouso, prova do alimento e deslocamento) não apresentou diferenças significativas entre as folhas de alta e baixa densidade de tricomas. Os ritmos de alimentação das larvas de *G. spadicea* foram de curta duração, sendo o tempo de assimilação do alimento ingerido menor que uma hora, principalmente em larvas de quinto ínstar. A ingestão de fragmentos de tricomas de *S. sisymbriifolium* ocorreu em todos os ínstars larvais, mas, a retenção destes fragmentos no intestino anterior das larvas deu-se, principalmente nos iniciais, quando as larvas são menores e o diâmetro do tubo digestivo também, o que dificulta a passagem de fragmentos. Para a liberação dos fragmentos retidos sugerimos duas possibilidades: podem ser regurgitados de uma estrutura anterior ao papo que teria a função de armazená-los até o momento de regurgitar, ou ainda, de liberá-los com a exúvia na ocasião da muda. A ingestão de tricomas e a passagem de alguns fragmentos através do canal alimentar podem estar relacionados com a alta mortalidade observada para estas larvas, principalmente nos ínstars iniciais.

## SUMÁRIO

	páginas
1. Introdução	01
1.1 Limitações à herbivoria	01
1.2 Comportamento alimentar	03
1.3 Canal alimentar, alimentação e digestão em insetos	06
1.4 O sistema <i>Gratiana spadicea</i> e <i>Solanum sisymbriifolium</i>	08
2. Material e Métodos	12
2.1 Cultivo das plantas	12
2.2 Criação dos insetos	13
2.3 Caracterização das folhas	13
2.4 Observações do uso temporal pelas larvas	14
2.5 Remoção de tricomas	16
2.6 Análise do tubo digestivo	16
2.7 Ingestão de tricomas	17
3. Resultados	17
3.1 Caracterização das folhas	17
3.2 Uso temporal pelas larvas	19
3.3 Remoção dos tricomas	31
3.4 Caracterização do canal alimentar	35
3.5 Ingestão de tricomas	38
4. Discussão	41
4.1 Tricomas de <i>Solanum sisymbriifolium</i>	41



4.2	Uso temporal de <i>Solanum sisymbriifolium</i> pelas larvas de <i>Gratiana spadicea</i>	43
4.3	Ingestão de tricomas	48
5.	Conclusões	51
6.	Referências Bibliográficas	53

## LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 1. A) Adulto e B) larva de <i>Gratiana spadicea</i> em quinto instar; C) hábito de planta adulta de <i>Solanum sisymbriifolium</i> e D) detalhe da superfície foliar em microscopia de luz.	10
Figura 2. Tricomas de <i>Solanum sisymbriifolium</i> em Microscopia Eletrônica de Varredura.	18
Figura 3. Caracterização histoquímica dos tricomas glandulares curto-pedicelados de <i>Solanum sisymbriifolium</i> .	20
Figura 4. Caracterização histoquímica dos tricomas glandulares longo-pedicelados de <i>Solanum sisymbriifolium</i> .	21
Figura 5. Variação na densidade de tricomas nas folhas de <i>Solanum sisymbriifolium</i> .	22
Figura 6. Variação no tempo destinado a diferentes atividades das larvas de <i>Gratiana spadicea</i> durante todo o estágio larval, sobre folhas de <i>Solanum sisymbriifolium</i> de alta e baixa densidade de tricomas.	23
Figura 7. Tempo destinado a diferentes atividades, exceto repouso, do primeiro ao quinto instar de <i>Gratiana spadicea</i> sobre folhas de <i>Solanum sisymbriifolium</i> de alta e baixa densidade de tricomas.	27
Figura 8. Características dos tricomas removidos por larvas de <i>Gratiana spadicea</i> , durante 24 horas de alimentação em discos foliares de <i>Solanum sisymbriifolium</i> .	33
Figura 9. Canal alimentar de larva de primeiro instar de <i>Gratiana spadicea</i> .	36
Figura 10. Cortes histológicos longitudinais do canal alimentar de larvas de quinto instar de <i>Gratiana spadicea</i> .	37
Figura 11. Variação nos tricomas encontrados no intestino anterior, médio e posterior de larvas de <i>Gratiana spadicea</i> .	39

## LISTA DE TABELAS

	página
Tabela I. Resumo da análise de variância sobre a influência da planta, ontogênese e comportamento no tempo destinado às atividades das larvas de <i>Gratiana spadicea</i> .	24
Tabela II. Variação no tempo ( $\bar{X} \pm$ erro padrão; em minutos) dedicado ao repouso e a outras atividades dos diferentes instares larvais (n = 20/instar) de <i>Gratiana spadicea</i> sobre folhas de <i>Solanum sisymbriifolium</i> de alta e baixa densidade de tricomas.	26
Tabela III. Resumo da análise de variância, a respeito da influência dos fatores planta e instar nos parâmetros número, duração e intervalo entre cada refeição das larvas de <i>Gratiana spadicea</i> .	29
Tabela IV. Tempo de alimentação das larvas de <i>Gratiana spadicea</i> em seis horas de observação sobre folhas de <i>Solanum sisymbriifolium</i> de alta e baixa densidade de tricomas.	30
Tabela V. Equações de regressão correspondentes ao tempo destinado a cada atividade ao longo do estágio larval de <i>Gratiana spadicea</i> em folhas de <i>Solanum sisymbriifolium</i> .	32

## 1. Introdução

### 1.1 Limitações à herbivoria

A performance de um determinado inseto herbívoro pode ser limitada e/ou influenciada por atributos da sua planta hospedeira (HOCHULI 1996). Dentre os fatores que influenciam esta interação, destaca-se as barreiras mecânicas e químicas impostas pela superfície foliar.

Segundo FERNANDES (1994), todas as partes de uma planta oferecem algum tipo de resistência contra herbívoros, e estas barreiras incluem a presença de tricomas. As folhas, por exemplo, podem apresentar variações de tipos e densidades de tricomas que constituem barreiras à herbivoria (JEFREE 1986). Os tricomas são apêndices derivados de células epidérmicas (ALBERTS *et al.* 1997), compostos principalmente de paredes celulósicas ou lignificadas e ocorrem em uma variedade de formas (LEVIN 1973). Podem ser glandulares ou tectores (não glandulares), retos, espiralados, em forma de gancho, simples ou estrelados (LEVIN 1973), podendo ainda variar quanto à densidade e quanto ao tipo, de acordo com a espécie de planta e do estágio de desenvolvimento (JOHNSON 1975, FERNANDES 1994, ZVEREVA *et al.* 1998). Ainda, a pubescência foliar pode ser alterada em função de variações sazonais no ambiente, como a radiação e a disponibilidade de água (JOHNSON 1975).

Os tricomas, aparentemente sem valor nutritivo, podem dificultar a digestão e até mesmo o acesso ao alimento por alguns insetos herbívoros. SCHILLINGER & GALLUN (1968) comprovaram que eles causam desequilíbrios na dieta das larvas do coleóptero *Oulema melanopus* (Linnaeus) levando-as à morte, principalmente nos instares iniciais. GILBERT (1971) demonstrou que os tricomas de *Passiflora adenopoda* (Juss.)

(Passifloraceae) podem matar larvas de heliconíneos (Lepidoptera) por inanição e perda de hemolinfa causada por puncturas no tegumento larval.

Há outros casos em que os insetos apresentaram algum provável comportamento adaptativo às superfícies densamente pilosas, como no estudo realizado por HILL *et al.* (1997), com duas espécies de Cassidinae: uma oligófaga, *Conchyloctenia tigrina* Oliver e outra monófaga, *Gratiana spadicea* (Klug), objeto deste estudo, que se alimenta somente de *Solanum sisymbriifolium* Lamarck (Solanaceae). As duas espécies de coleópteros removem os tricomas em uma determinada área antes de se alimentar. Entretanto, sobre folhas de *S. sisymbriifolium*, a qual apresenta tricomas glandulares, *C. tigrina* não consegue se movimentar e suas demais atividades são comprometidas. A dificuldade de movimento é atribuída à estrutura de seu tarso que facilita a adesão dos exudatos dos tricomas da planta. Já *G. spadicea* não apresenta dificuldade de se movimentar. Acredita-se que a estrutura do seu tarso represente uma estrutura característica de uma “linhagem” adaptada a explorar hospedeiras com tricomas (HILL *et al.* 1997). Outros aspectos adaptativos desta interação são discutidos no item 1.4.

Os tricomas podem atuar dificultando a alimentação. Por exemplo, a presença de fragmentos de tricomas simples (glandulares e tectores) de *Artemisia ludoviciana* Nutt. aparentemente intactos no intestino médio e fezes do gafanhoto *Hypochlora alba* (Dodge) (SMITH & KREITNER 1983), indicam a ingestão e não digestão destas estruturas. Outro caso foi estudado por WELLSO (1973), que verificou a ingestão de tricomas por larvas de *O. melanopus*, alimentadas com uma variedade pilosa de trigo. Nas fezes das larvas de primeiro instar, havia alta proporção de fragmentos dos tricomas, enquanto nas de quarto instar a maior parte era constituída por tricomas inteiros, indicando uma adaptação à presença destas estruturas. KERPEL (2004) demonstrou que não há mudanças estruturais significativas quanto à parede celular e a epiderme (incluindo

tricomas) dos fragmentos de *Passiflora misera* Kunth e *Passiflora suberosa* Lamarck, durante a passagem destes no tubo digestivo de *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera, Nymphalidae).

Além de atuarem como barreira física, os tricomas podem conter metabólitos ativos por toda a vida ou por somente um curto período de tempo, sendo capazes de apresentar altas concentrações de metabólitos secundários tóxicos para seus predadores, como fenóis e alcalóides (JOHNSON 1975). As propriedades químicas dos tricomas podem interferir negativamente no crescimento e desenvolvimento dos insetos em decorrência da ingestão, contato ou inalação de toxinas e por restrições físicas ao movimento (DUFFEY 1986, SOUTHWOOD 1986, MEDEIROS & MOREIRA 2002, MEDEIROS *et al.* 2004).

## 1.2 Comportamento alimentar

Para maior sucesso durante a alimentação, os insetos herbívoros desenvolveram estratégias comportamentais, e suas conseqüências são centrais para o entendimento de que podem, ou não, ser limitados ou influenciados por atributos das plantas (HOCHULI 2001). A evolução de uma característica morfológica ou comportamental de uma determinada espécie animal, em resposta a uma característica de outra espécie (vegetal), pode levar à especialização em determinado tecido ou taxa (FUTUYMA & MORENO 1988). Todos os insetos fitófagos exibem algum grau de seletividade ao alimento que ingerem, e têm a necessidade de selecionar uma planta hospedeira apropriada em algum estágio da sua história de vida (BERNAYS & CHAPMAN 1994).

A escolha de uma hospedeira envolve, freqüentemente, aleloquímicos agindo como atrativos, estimulantes, repelentes e deterrentes (BERNAYS & GRAHAM 1988, SLANSKY 1993). Segundo BERNAYS & CHAPMAN (1994), a seleção de plantas

hospedeiras pelos herbívoros ocorre em três fases: 1) atração à possível fonte de alimento, 2) permanência na fonte de alimento e 3) aceitação ou não da fonte de alimento. Insetos considerados especialistas, além de distinguir hospedeiras de não hospedeiras, são capazes de discriminar a sua qualidade (SCRIBER 1982).

O comportamento alimentar dos insetos pode mudar de acordo com o seu estágio de desenvolvimento. Larvas e adultos de muitos holometábolos diferem substancialmente quanto às dietas e comportamentos alimentares, mas mesmo assim pequenas mudanças podem ocorrer durante os ínstars larvais e/ou durante diferentes etapas da vida adulta (BROWNE 1995). Há mudanças na taxa total de alimento ingerido (quantidade de alimento ingerido sobre alguma unidade de tempo) de acordo com o estágio de desenvolvimento e, além disso, insetos em diferentes estágios de desenvolvimento podem consumir diferentes quantidades de dois ou mais alimentos enquanto estes diferirem no seu conteúdo nutricional e de água. Por exemplo, em hemimetábolos, ninfas de primeiro instar de duas espécies de Coreidae alimentam-se mais da região apical dos ramos de *P. suberosa*, quando comparado com as demais partes das plantas. No segundo instar, ambas as espécies mudam para os frutos verdes, sugerindo que, ao longo da ontogênese, as ninfas usam diferentes tecidos e diferentes plantas hospedeiras (RODRIGUES *et al.* 2007).

A alimentação larval provê também a energia necessária para suportar processos metabólicos nos períodos em que o inseto se alimenta e quando não há alimentação (antes e depois da muda), bem como durante o estágio pupal e para o restante da vida em espécies que não se alimentam quando adultas. A quantidade absoluta de alimento ingerido e a taxa de crescimento aumentam de instar para instar, e mudanças nas taxas são mais ou menos similares durante cada instar e, de modo geral, o consumo de alimento é maior nas larvas dos ínstars finais (BROWNE 1995).

Nas observações realizadas acerca das atividades das larvas de *Heliothis zea* (Boddie) (Lepidoptera, Noctuidae), a maior parte do tempo correspondeu ao repouso (41,5%), seguida de ecdise (23,4%), alimentação (23,3%), deslocamento (0,4%), dentre outras (11,4%). Esse estudo também indica que variações temporais em comportamentos dentro de cada instar são altamente significantes. Por exemplo, o tempo médio gasto para alimentação nas larvas de primeiro e segundo instar foi metade do tempo gasto pelas larvas dos três últimos ínstars. Os primeiros ínstars são mais móveis e larvas repousaram menos e se alimentaram mais no período entre mudas (ADLER & ADLER 1988).

Os insetos generalistas via de regra se alimentam de vários tipos de plantas, em especialistas limitam-se a apenas uma família, um gênero ou uma espécie de hospedeira (HSIAO 1986, BERNAYS 1998). Entre generalistas e especialistas pode haver diferenças comportamentais, como foi observado em experimento realizado por BERNAYS *et al.* (2004 a, b) com quatro espécies de larvas de Arctiidae (Lepidoptera), duas generalistas e duas especialistas, de tamanho e habitat similares. Essas foram observadas em campo durante seis horas, quando foi medido o tempo utilizado em várias atividades. Generalistas gastaram mais tempo caminhando, provando e rejeitando fontes potenciais de alimento e em períodos curtos de alimentação quando comparados aos especialistas. Uma das lagartas especialistas observadas, *Hypocrisias minima* (Neumoegen) passou cerca de 70% do tempo em repouso, enquanto 20% se alimentando e 3% caminhando. Outro especialista observado, *Pygarctia roseicapitis* (Neumoegen & Dyar), apresentou um comportamento diferenciado, cortando as nervuras da folha e provocando a “sangria” do látex, destinando cerca de 10% de seu do tempo a esta atividade. Comparações entre ínstars não foram realizadas nestes trabalhos. Este tipo de estudo anteriormente relatado é importante para verificar os efeitos que a qualidade e



disponibilidade do alimento, presença de barreiras físicas e químicas, temperatura e outras variáveis ambientais têm na utilização do tempo e nas atividades desempenhadas por um inseto, tanto na sua fase imatura quanto adulta. Para cassidíneos, nada se sabe a respeito do tempo destinado a cada atividade nem se ocorrem variações ao longo da ontogênese.

### 1.3 Canal alimentar, alimentação e digestão em insetos

O canal alimentar está relacionado, primeiramente, com a digestão e absorção de alimentos, e diferentes partes do intestino são envolvidas com diferentes aspectos destas funções (BERRIDGE 1970, CHAPMAN 1982). A eficiência com que os insetos utilizam o alimento é muito variada, mas a maioria dos insetos fitófagos digere e absorve somente uma pequena proporção do alimento consumido, e o restante passa inalterado para as fezes (CHAPMAN 1982, KERPEL 2004).

Em insetos mastigadores, o alimento é cortado em fragmentos que possam ser ingeridos, seguido da passagem destes pelo intestino anterior (CHAPMAN 1995). Estes insetos têm mandíbulas separadas, maxilas e lábio. As mandíbulas são importantes no corte do alimento, enquanto que os outros apêndices estão envolvidos com a manipulação e movimento para a boca e para o interior do intestino (CHAPMAN 1995). Em larvas de Lepidoptera, a mordida é a única ação mecânica aparentemente aplicada no fragmento alimentar (KERPEL 2004). O que se sabe até hoje a respeito, foi inferido com base na morfologia do aparelho bucal e intestino anterior, não havendo ainda análises mais rigorosas acerca dos processos mecânicos envolvidos.

Da boca, o alimento passa para o papo (dilatação do intestino anterior), com o auxílio dos movimentos peristálticos da faringe e esôfago. Não há evidências de uma trituração do alimento após a sua ingestão, pois não é verificada a redução no tamanho

das partículas encontradas no intestino médio quando comparadas às do intestino anterior. Entre os insetos fitófagos os fragmentos encontrados nas fezes são de tamanho similar aos encontrados no intestino anterior (CHAPMAN 1995, KERPEL 2004).

As refeições ou os momentos de ingestão de alimento são separados por períodos durante os quais a alimentação contínua não ocorre. Três parâmetros podem definir uma refeição: a quantidade de alimento ingerido (tamanho), o tempo de duração da alimentação e a conseqüente taxa de ingestão (SIMPSON 1995). Estudos comparativos de padrões de alimentação servem de base para interpretações acerca dos mecanismos de alimentação, tanto os fisiológicos, morfológicos, ecológicos quanto os comportamentais.

O intestino anterior envolve a armazenagem de alimento, mesmo que por pouco tempo. A região onde ocorre a maior parte da digestão é no intestino médio. O epitélio do intestino médio é simples e composto principalmente de células colunares, células regenerativas e células diferenciadas, que acredita-se ter uma função endócrina. A digestão inicial ocorre no interior do espaço interperitrófico, onde a ação de polímeros e outros constituintes diminuem o peso das moléculas de alimento, as quais, então, se difundem para fora da membrana peritrófica (SNODGRASS 1935, BERRIDGE 1970, TERRA 1990).

A membrana peritrófica envolve o bolo alimentar, situando-se entre o alimento e o epitélio do intestino médio. Sua principal função é proteger o epitélio de danos mecânicos causados por partículas sólidas de alimento e injúrias de patógenos, toxinas e outros danos químicos (BARBEHENN & MARTIN 1995, LEHANE 1997). Atua também regulando a passagem de moléculas entre os diferentes compartimentos do intestino médio. É constituída de microfibrilas de quitina embebidas em uma matriz proteoglicana. Embora a taxa de produção da membrana peritrófica possa variar entre os

insetos, é geralmente mais lenta que a taxa de passagem do alimento através do intestino, sendo continuamente produzida, dependendo das condições de armazenagem do alimento (LEHANE 1997). EISNER & EISNER (2000) verificaram a presença de uma membrana envolvendo as fezes de *Hemisphaerota cyanea* (Say) (Coleoptera, Chrysomelidae), que pode ser a membrana peritrófica.

Sobre o sistema digestivo de Coleoptera, YAHIRO (1990) descreveu a morfologia genérica do canal alimentar em adultos de Carabidae, delimitando as seguintes estruturas: o intestino anterior, que consiste em um tubo aberto pela boca, seguido do esôfago, papo e um curto proventrículo, o qual possui a função de armazenar e esmagar o alimento. No intestino médio, ocorre a digestão e absorção do alimento, sendo descrito como um tubo que vai da válvula esofágica até o piloro (válvula pilórica), geralmente reto.

Segundo CROWSON (1981), o papel do papo na digestão de besouros está em função do seu tamanho em relação ao intestino médio. Encontra-se geralmente ausente ou ligeiramente desenvolvido nas larvas, indicativo de um intestino que não armazena alimento, ou seja, geralmente relacionado a uma alimentação mais ou menos contínua e muitas vezes com a rápida passagem do alimento pelo canal alimentar (*e.g.* Chrysomelidae). A presença do papo é usual em besouros Adepthaga, nos quais o alimento é temporariamente armazenado, e em alguns casos sofre ação de enzimas regurgitadas do intestino médio.

#### 1.4 *Gratiana spadicea* (Coleoptera, Chrysomelidae, Cassidinae) e *Solanum sisymbriifolium* (Solanaceae)

Cassidinae (*sensu* Borowiec 1999) é uma das subfamílias de Chrysomelidae mais especializadas (JOLIVET 1988). A maioria das espécies se alimenta de um ou

poucos gêneros vegetais. Neste contexto destaca-se a estreita interação entre o gênero *Gratiana*, considerado especialista de *Solanum* Lamarck (HSIAO 1986, MEDEIROS *et al.* 1996). Alguns atributos físicos das solanáceas (espinhos, tricomas glandulares e não glandulares) são importantes na resistência contra muitos besouros crisomelídeos, devido ao pequeno tamanho destes insetos (HSIAO 1986).

O sistema *G. spadicea* e *S. sisymbriifolium* (Fig. 1) é utilizado como modelo de estudos, principalmente por se tratar de uma interação estreita de um inseto monófago, que passa todo o seu desenvolvimento em uma única planta. *S. sisymbriifolium* é pioneira das regiões temperadas e tropicais da América do Sul e invasora de locais abertos como pastagens, poteiros e culturas de trigo, milho, arroz, batata e soja (GROTH 1989, MENTZ & OLIVEIRA 2004).

ALBUQUERQUE & BECKER (1986) realizaram estudos relativos à fecundidade e a longevidade de *G. spadicea* em condições de laboratório. BECKER & ROMANOWSKI (1986) descreveram a morfologia e histologia dos órgãos reprodutivos internos das fêmeas de *G. spadicea*. BECKER & FRIEIRO-COSTA (1987) analisaram os parasitóides e predadores das ootecas de *G. spadicea* relacionando a maior causa de mortalidade nesse estágio à presença do eulofídeo *Emersonella ooecia* De Santis e ao mirídeo sugador *Tupiocoris cincticornis* (Stal). Após este estudo, a natalidade e mortalidade no estágio de ovo também foram avaliadas, sendo os mesmos parasitóides e predadores relacionados (BECKER & FRIEIRO COSTA 1988).

Características biológicas favoráveis de *G. spadicea*, como a alta taxa de crescimento, longevidade, mobilidade dos adultos, várias gerações por ano e alta taxa de alimentação, indicam que ela apresenta um grande potencial como agente de controle biológico de *S. sisymbriifolium* (HILL & HULLEY 1995, HILL *et al.* 1997, OLCKERS 2002). De fato, KVASINA & PONCE DE LEON (1985) realizaram um estudo sobre



Figura 1. A) Adulto e B) larva de *Gratiana spadicea* em quinto instar; C) hábito de planta adulta de *Solanum sisymbriifolium* e D) detalhe da superfície foliar em microscopia de luz. Barras = 2 mm, 300  $\mu$ m, 12 cm e 120  $\mu$ m, respectivamente.

*G. spadicea* descrevendo alguns aspectos da sua biologia, morfologia e da relação com *S. sisymbriifolium*, evidenciando sua possível utilização no controle biológico desta planta, uma vez que a mesma é invasora de culturas e pastagens.

Estudo realizado por BECKER & FREIRE (1996) sobre a ecologia populacional de *G. spadicea* determinou que três gerações ocorrem por ano (de primavera, verão e outono). Na última geração, os adultos remanescentes e sexualmente imaturos abandonam o local de alimentação para passar o inverno em outro lugar (diapausa). Nesse trabalho também são discutidas flutuações na abundância de *G. spadicea* e *S. sisymbriifolium*, bem como a fenologia ao longo do ano, mortalidade por inimigos naturais, localização e especificidade da hospedeira.

Mais recentemente, MEDEIROS & MOREIRA (2002, 2003, 2005) estudaram vários aspectos da interação entre *G. spadicea* e *S. sisymbriifolium*. As larvas deste besouro possuem, na porção distal das pernas, estruturas esclerotinizadas denominadas tarsúngulos, que atuam no deslocamento, ancorando-se nos raios dos tricomas das folhas de sua hospedeira. Os tricomas do tipo estrelado são os mais utilizados para o deslocamento, principalmente nos primeiros ínstaes, enquanto que no quarto e quinto ínstaes o comprimento das pernas das larvas permite a inserção da ponta do tarsúngulo diretamente na epiderme foliar. Ainda há uma correspondência entre o diâmetro dos tricomas e o tamanho da abertura dos tarsúngulos nas larvas de *G. spadicea*.

MEDEIROS & MOREIRA (2003) indicaram que a atividade de alimentação, em larvas e adultos de *G. spadicea*, ocorre em períodos de escotofase e fotofase. A oviposição é restrita aos períodos de fotofase e o maior consumo de alimento é durante o quinto instar larval, padrão geralmente encontrado em insetos holometábolos. Ainda, MEDEIROS & MOREIRA (2005) observaram que os tricomas estrelados de *S. sisymbriifolium* foram inteiramente ou parcialmente removidos pelas larvas de

*G. spadicea* antes da alimentação. No primeiro e segundo ínstaes, as larvas maceram os raios laterais dos tricomas para abrir uma “clareira” e atingir o mesofilo da folha e, nos ínstaes restantes, removem os tricomas inteiros cortando-os na região de inserção. Nesse trabalho, também foram oferecidos discos foliares com alta e baixa densidade de tricomas estrelados, e houve preferência por aqueles de menor densidade. E, além disso, as larvas alimentadas com discos foliares com os tricomas estrelados removidos apresentaram uma taxa de sobrevivência significativamente maior que as larvas sujeitas a outros tratamentos (exudatos dos tricomas glandulares removidos, intactos e controle).

A alta mortalidade registrada para larvas de *G. spadicea* no primeiro e segundo ínstaes, associada à presença de tricomas estrelados pode ocorrer por inanição, esgotamento energético e/ou perda da hemolinfa causada pela ação física destes (MEDEIROS & MOREIRA 2005). Nenhum trabalho, no entanto, tratou de investigar as possíveis causas desta alta mortalidade. Neste sentido, caracterizamos o tipo de tricomas existentes nas folhas de *S. sisymbriifolium*, densidade dos mesmos e histoquímica dos glandulares. Verificamos se a dificuldade em acessar o alimento, causada pela presença destas estruturas, reflete ou não alterações na utilização da planta e no comportamento das larvas de *G. spadicea*, bem como na taxa de remoção e ingestão de tricomas pelas larvas frente a tal variação.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Cultivo das plantas**

Mudas de *S. sisymbriifolium* foram coletadas em populações espontâneas do município de Canguçu, Rio Grande do Sul, transplantadas para vasos plásticos e cultivadas em um telado localizado no Campus do Vale da Universidade Federal do Rio

Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil. Posteriormente, as plantas foram divididas em dois grupos: 1) sol, sob luz natural e 2) sombra, sob tela de sombrite 50%. Tal procedimento teve como objetivo induzir dois padrões de densidade de tricomas, respectivamente: ADT (alta densidade de tricomas) e BDT (baixa densidade de tricomas).

## 2.2 Criação dos insetos

Larvas e adultos de *G. spadicea* foram coletados nas imediações do Campus do Vale / UFRGS e colocados em duas gaiolas teladas com 31 cm de largura, 31 cm de profundidade e 92 cm de altura. Cada gaiola tinha, aproximadamente, cinco casais de besouros, os quais foram mantidos no Laboratório de Morfologia e Comportamento de Insetos do Instituto de Biociências da UFRGS em câmara climatizada com condições abióticas controladas (14 horas luz/dia;  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Os ovos foram colocados em placas de Petri sobre papel filtro umedecido, e após a eclosão, as larvas foram transferidas para potes plásticos e alimentadas com folhas de *S. sisymbriifolium* procedentes dos cultivos.

## 2.3 Caracterização das folhas

Os tricomas de *S. sisymbriifolium* foram caracterizados em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para a realização deste objetivo porções com cerca de  $1\text{ cm}^2$  de *S. sisymbriifolium* foram fixadas em solução de FAA (formalina, álcool e ácido acético, 1:1:18, v/v) (JOHANSEN 1940). Posteriormente, foram desidratadas em série de acetona, seguida de ponto crítico em aparelho Baltec® - CPD 030, no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS. O material foi montado sobre fita dupla face em “stubs” metálicos, metalizado com ouro em aparelho Baltec® - SCD 050 e



observação/geração de imagens em um microscópio eletrônico de varredura JEOL® JSM-6060.

Para determinar a densidade de tricomas, foram cortados fragmentos de cerca de 1cm<sup>2</sup> das folhas ADT e BDT (n = 20 de cada) para o destacamento das epidermes segundo o método descrito por JOHANSEN (1940). Em seguida, os fragmentos epidérmicos foram lavados abundantemente em água corrente e submetidos à coloração em fucsina 0,5% (JOHANSEN 1940) e montados entre lâmina e lamínula em glicerina 50%. As lâminas foram lutadas com esmalte. Sob microscópio, foi contado o número de tricomas de cada tipo presentes em 1 mm<sup>2</sup> de fragmentos foliares, da região distal da folha.

A presença de metabólitos secundários nos tricomas glandulares de *S. sisymbriifolium* em folhas ADT e BDT foi testada em cortes transversais de material fresco. Para detectar lipídios, foi realizado o teste com Sudan Red B (JENSEN 1962) e Sudan black (PEARSE 1968). Os terpenóides foram testados com o Reagente de Lieberman-Buccharad (WAGNER *et al.* 1984), flavonóides com DMACA ( $\rho$ -dimetilaminocinamaldeído) (FEUCHT *et al.* 1986), derivados fenólicos com cloreto férrico 4% em etanol 95% (GAHAN 1984) e alcalóides com Reagente de Dragendorff (JOHANSEN 1940) e Reagente de Wagner (FURR & MAHLBERG 1981). Os cortes foram montados em glicerina 50%, entre lâmina e lamínula. Estruturas representativas dos casos correspondentes em que a presença de alguma destas substâncias foi positiva foram fotografadas.

#### 2.4 Observações do uso temporal das larvas

Para testar a hipótese de que o tempo dedicado pelas larvas em diferentes atividades varia dependendo da densidade de tricomas das plantas, foram realizadas

observações focais a respeito do seu comportamento ( $n = 20/\text{instar}/\text{densidade de tricoma}$ ). Em cada experimento, foram observadas dez larvas continuamente por seis horas, sobre folhas de alta e baixa densidade de tricomas. As mesmas larvas foram observadas no dia seguinte, invertendo a densidade de tricomas. Estas foram colocadas individualmente sobre a margem da folha de *S. sisymbriifolium*, na porção distal da face abaxial, cerca de duas horas antes do início do período de observação. As observações foram realizadas das 12h às 18h, por ser o período de maior atividade alimentar destes insetos (MEDEIROS & MOREIRA 2002). As observações foram realizadas a cada dois minutos, tempo estipulado com base em um projeto piloto, no qual observamos que as larvas não demoram menos do que este intervalo em qualquer uma das atividades avaliadas. Para as observações, utilizou-se uma lupa de mão (10 X), sendo registrada a atividade de acordo com as seguintes definições e comparações correspondentes (modificadas de BERNAYS *et al.* 2004b):

Deslocamento – locomovendo-se ativamente;

Prova do alimento – cabeça abaixada, movendo-se sobre a superfície da planta, entrando em contato momentaneamente com o alimento, mas sem mordida aparente;

Remoção – removendo os tricomas com auxílio das mandíbulas, armazenando os tricomas removidos na cavidade pré-oral e imediatamente “cuspindo” os mesmos para fora desta cavidade;

Alimentação – ingerindo alimento – vistas usualmente com a cabeça movendo-se ritmicamente e próximas à superfície da folha; observa-se a marca de alimentação no limbo foliar;

Repouso/Descanso – não se alimentando ou locomovendo; outros movimentos podem ocorrer durante o repouso, incluindo contorção, contração, defecação.

## 2.5 Remoção de tricomas

Para testar a hipótese de que as larvas de *G. spadicea* alimentadas com folhas de *S. sisymbriifolium* provenientes de plantas mantidas no sol removem e ingerem uma maior quantidade de tricomas do que aquelas alimentadas com plantas mantidas na sombra, estas foram alimentadas com discos de folhas provenientes do sol e de sombra separadamente. Cada indivíduo (n = 15/instar/planta) foi colocado em uma placa de Petri, forrada com papel filtro umedecido, contendo discos foliares suficientes para o período de alimentação (um para larvas de primeiro e segundo instar, dois para as de terceiro, três para as de quarto e quatro para as de quinto) (MEDEIROS & MOREIRA 2005) e mantidos em câmara climatizada por 24 horas. Após, as larvas foram congeladas para posterior dissecação, e os tricomas que se encontravam sobre os discos foliares e/ou sobre o papel filtro foram quantificados como: estrelado, solto e inteiro; estrelado, fixo e sem raio(s) lateral(is); estrelado, fixo e sem raio central; raio de estrelado solto; parte de estrelado solta e glandular longo-pedicelado solto.

## 2.6 Análise do tubo digestivo

Larvas de *G. spadicea* provenientes do cultivo descrito no item 2.2, foram congeladas para posteriormente serem dissecadas sob estereomicroscópio, para a obtenção do tubo digestivo que foi imediatamente fixado em FAA. Para a inclusão em parafina, o material foi desidratado em concentrações crescentes de álcool e diafanizado em xilol. Após, foi incluído em blocos de parafina, os quais foram cortados em micrótomo ajustado para 6µm. Os cortes obtidos foram submetidos a coloração por hematoxilina-eosina (H-E). A análise morfológica foi realizada em microscópio óptico.

## 2.7 Ingestão de tricomas

Para verificar a ocorrência da ingestão de tricomas por *G. spadicea*, as larvas (n = 15/instar/planta) provenientes do experimento descrito no item 2.5 foram dissecadas sob estereomicroscópio. O tubo digestivo foi destacado, imerso em glicerina 50 % e montado sobre lâmina/lamínula, para a observação em microscopia de luz. As lâminas foram observadas em microscópio e os tricomas, ou fragmentos destes, presentes em cada porção do intestino (anterior, médio e posterior) foram quantificados como: fragmentos de raio de tricoma estrelado ou fragmento de tector unicelular; tector unicelular inteiro; raio inteiro de estrelado; parte de estrelado com três ou mais raios; parte de glandular longo e parte de glandular curto.

Amostras de fezes de larvas de quinto instar de *G. spadicea* alimentadas com folhas de ADT foram fixadas em solução de FAA e posteriormente submetidas ao mesmo método de desidratação, preparação de amostras e geração de imagens em microscopia eletrônica de varredura descrito no item 2.3.

## 3. Resultados

### 3.1 Caracterização das folhas

Foram encontrados quatro tipos de tricomas em *S. sisymbriifolium*: 1) tector unicelular; 2) tector estrelado com quatro ou mais raios laterais; 3) glandular longo-pedicelado pluricelular com cabeça clavada unicelular e 4) glandular curto-pedicelado com cabeça globosa pluricelular (Fig. 2).

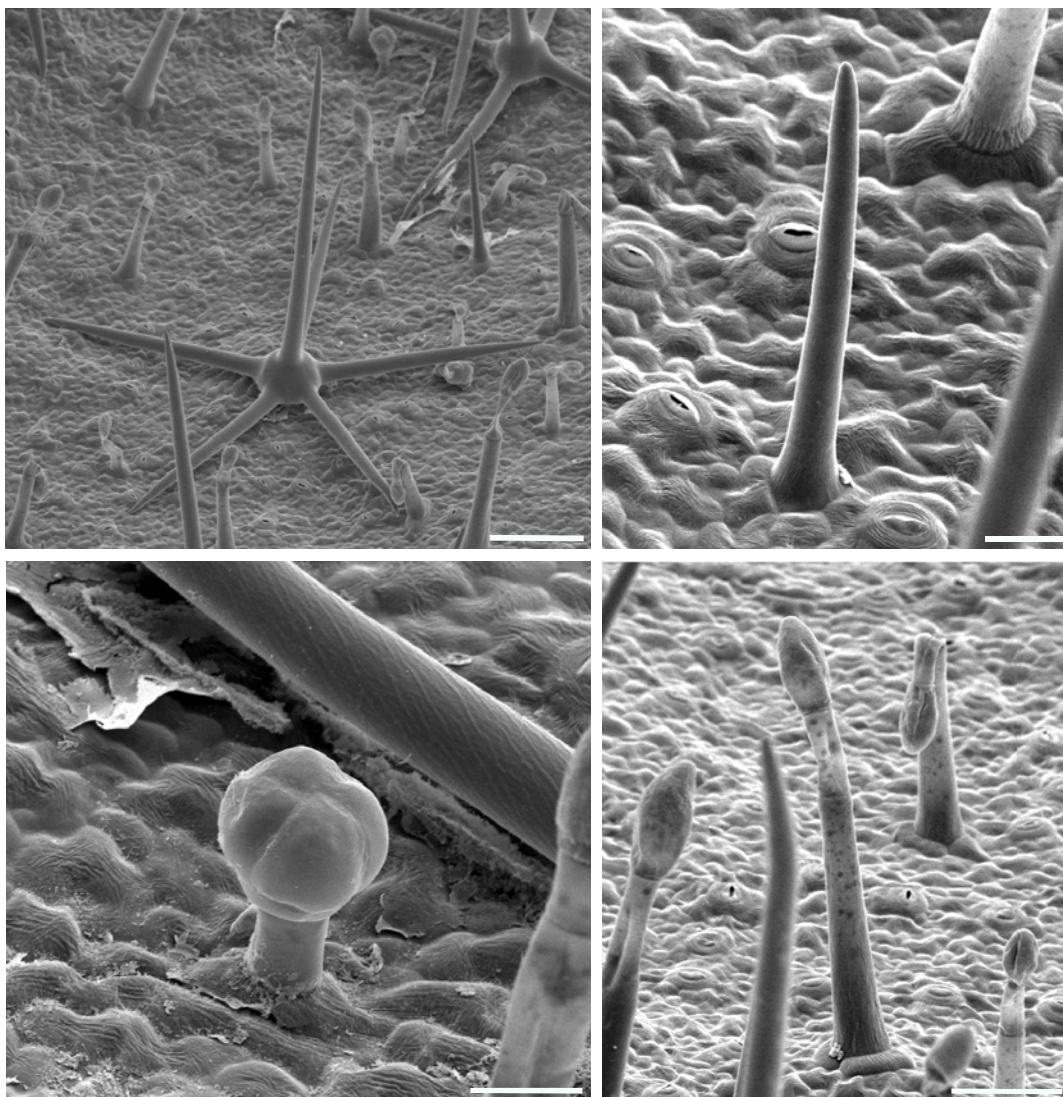


Figura 2. Tricomas de *Solanum sisymbriifolium* em Microscopia Eletrônica de Varredura. A) Tector estrelado com quatro ou mais raios laterais; B) tector unicelular; C) glandular curto-pedicelado com cabeça globosa pluricelular; D) glandular longo-pedicelado pluricelular com cabeça clavada unicelular. Barras = 100, 20, 20 e 50  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

Os testes histoquímicos foram positivos para lipídios, fenóis e alcalóides em ambos os tricomas glandulares, tanto nas folhas mantidas no sol quanto na sombra, exceto lipídios no tricoma glandular curto-pedicelado das folhas mantidas na sombra (Fig. 3, 4).

O número total de tricomas presentes nas plantas mantidas no sol (ADT) e na sombra (BDT) não diferiu ( $p = 0,9646$ ). No entanto, a distribuição dos diferentes tipos de tricomas foi diferente. As folhas ADT apresentaram maior número de tricomas tectores estrelados e tricomas glandulares longo-pedicelados pluricelular com cabeça clavada unicelular. Em contrapartida, as folhas BDT apresentaram maior número de tricomas tectores unicelulares. A quantidade de tricomas glandulares curto-pedicelados unicelulares com cabeça globosa pluricelular não diferiu significativamente entre as folhas ADT e BDT (Fig. 5).

### 3.2 Uso temporal pelas larvas

Considerando todo o estágio larval, não houve diferença no tempo dedicado às atividades de repouso, prova do alimento e deslocamento nas folhas ADT e BDT. Porém, o tempo destinado à remoção de tricomas e à alimentação diferiu significativamente em folhas de ADT e BDT (Fig. 6).

Houve efeito significativo da densidade dos diferentes tipos de tricomas no comportamento das larvas de *G. spadicea* e utilização das folhas de *S. sisymbriifolium*. Houve também interação entre o comportamento e as diferentes densidades de tricomas e entre este e a ontogênese. Assim, consideramos apenas as variações comportamentais dentro de cada instar e entre as plantas em um dado instar (Tab. I).

Primeiramente, verificamos a diferença entre o tempo dedicado ao repouso e às demais atividades (prova do alimento, remoção de tricomas, alimentação e deslocamento).

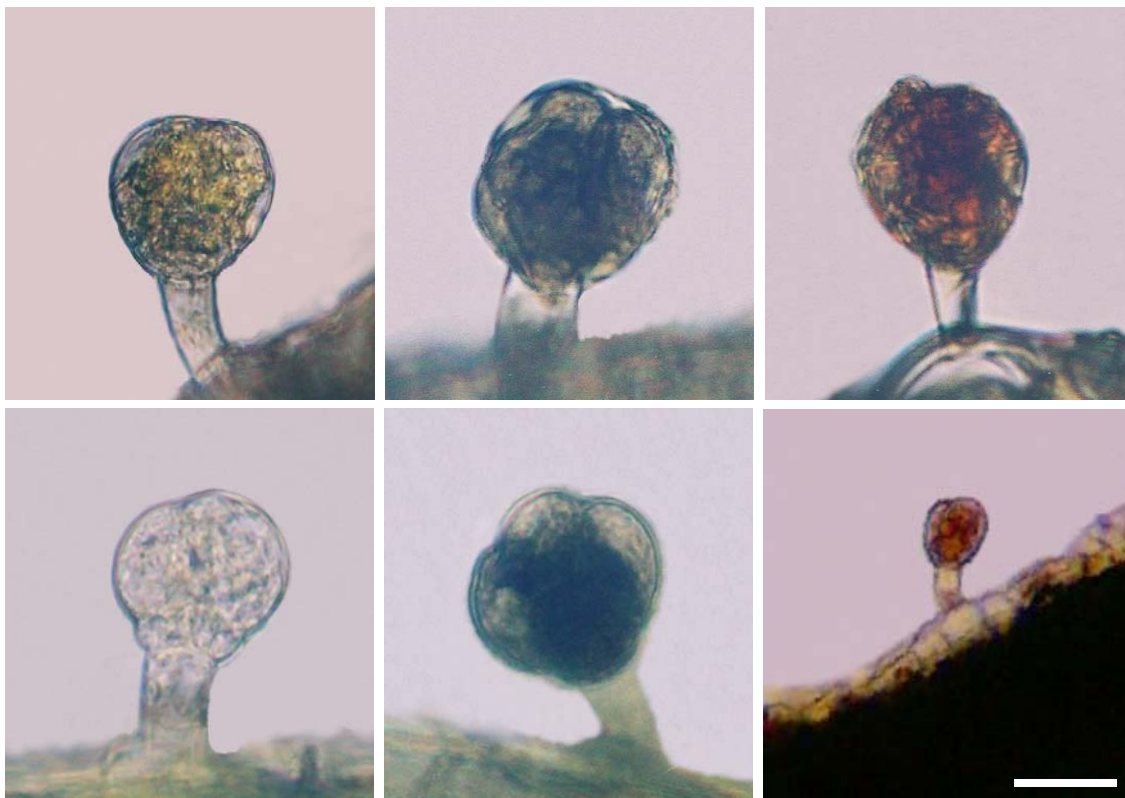


Figura 3. Caracterização histoquímica dos tricomas glandulares curto-pedicelados de *Solanum sisymbriifolium*. A-C, folhas com alta densidade de tricomas; D-E, folhas com baixa densidade de tricomas. A e D, reação ao Sudan black; B e E, cloreto férrico; C e F, reagente de Wagner. Barra = 20  $\mu$ m.

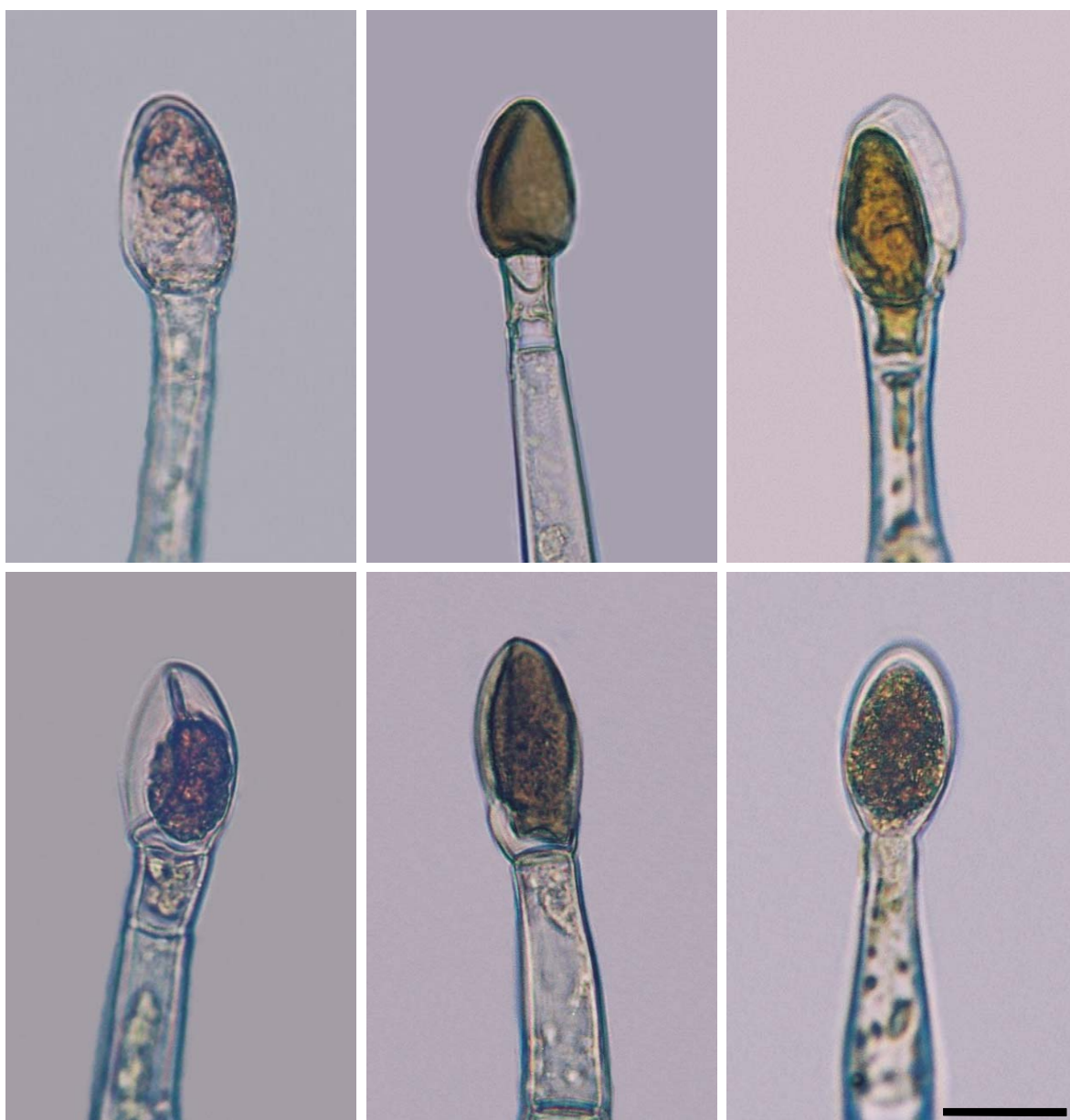


Figura 4. Caracterização histoquímica dos tricomas glandulares longo-pedicelados de *Solanum sisymbriifolium*. A-C, folhas com alta densidade de tricomas; D-E, folhas com baixa densidade de tricomas. A e D, reação ao Sudan black; B e E, cloreto férrico e C e F, reagente de Wagner. Barra = 30  $\mu$ m.



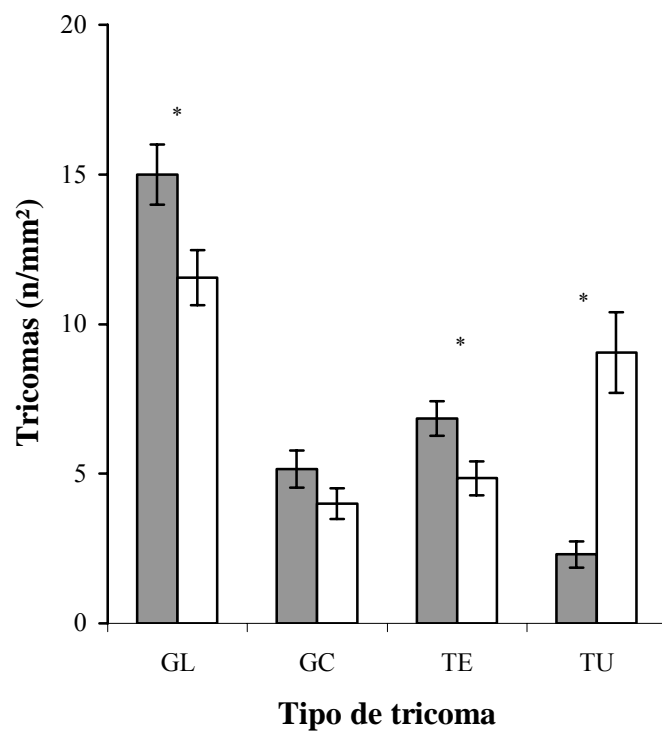


Figura 5. Variação na densidade de tricomas ( $\bar{X} \pm$  erro padrão) nas folhas de *Solanum sisymbriifolium* cultivadas no sol (barras cheias) e na sombra (barras vazias) densidade de tricomas. GL, glandular longo-pedicelado; GC, glandular curto-pedicelado; TE, tector estrelado e TU, tector unicelular. Asteriscos indicam diferença estatística significativa entre os dois tipos de folhas para o tipo de tricoma considerado (testes  $t$ ,  $p < 0,05$ ).

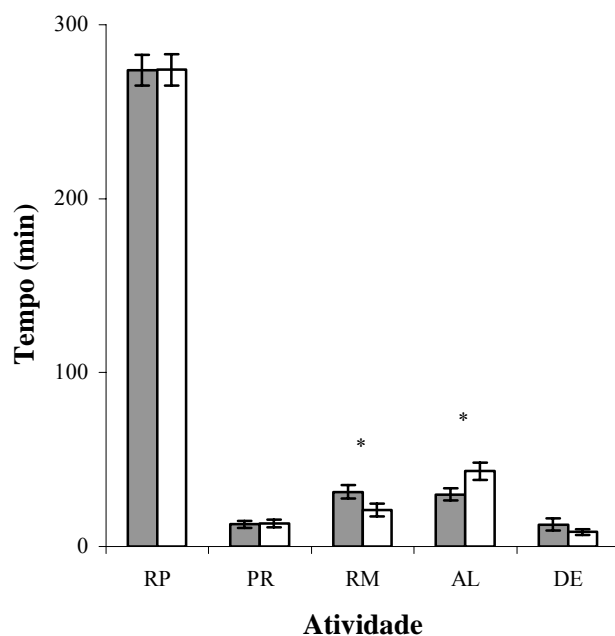


Figura 6. Variação no tempo destinado a diferentes atividades das larvas ( $\bar{X} \pm$  erro padrão;  $n = 100$ /planta) de *G. spadicea* durante todo o estágio larval, sobre folhas de *Solanum sisymbriifolium* de alta (barras cheias) e baixa (barras vazias) densidade de tricomas. RP, repouso; PR, prova do alimento; RM, remoção de tricomas; AL, alimentação; DE, deslocamento. Asteriscos indicam diferença estatística significativa entre os dois tipos de plantas para o tipo de atividade considerada (testes *t* pareado,  $\rho < 0,0001$ ). Em DE, o teste utilizado foi o de Wilcoxon ( $\rho = 0,1454$ ).

Tabela I. Resumo da análise de variância (ANOVA três fatores) sobre a influência da planta, ontogênese e comportamento no tempo destinado às atividades das larvas de *Gratiana spadicea*. Asteriscos indicam influências significativas (alfa = 0,05).

Fator	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	F	$\rho$
Planta	1	0,002	0,00	0,9684
Instar	4	0,029	0,01	0,9999
Atividade	4	10288,28	2578,99	<0,0001*
Interação:				
Planta X instar	4	0,029	0,01	0,9999
Planta X atividade	4	61,28	15,36	<0,0001*
Instar X atividade	16	149,49	9,37	<0,0001*
Erro	16	22,13	1,39	0,1402

Em todos os ínstaes, nesse caso, as larvas passaram significativamente mais tempo repousando comparado ao tempo em outras atividades, tanto em folhas ADT quanto em BDT. Os dados sugerem que larvas de quinto instar dedicaram menor tempo ao repouso e, conseqüentemente, maior tempo às outras atividades (Tab. II).

Desconsiderando o tempo dedicado ao repouso, comparamos, em cada instar, o tempo dedicado às demais atividades em plantas ADT e BDT. Larvas de primeiro e segundo ínstaes dedicaram mais tempo à remoção de tricomas e menos tempo à alimentação nas folhas ADT. Nas folhas BDT, destinaram menos tempo à remoção de tricomas e mais tempo à alimentação. No terceiro e quarto ínstaes, a mesma tendência foi observada, no entanto as diferenças não foram significativas. As larvas de quinto instar gastaram cerca do dobro do tempo em alimentação nas folhas BDT, quando comparado às folhas ADT, e o tempo empregado na remoção destes não diferiu estatisticamente. Em todos os ínstaes, o tempo dedicado à prova do alimento e deslocamento não diferiu estatisticamente entre folhas ADT e BDT (Fig. 7).

Ao longo da ontogênese, em folhas ADT, não houve diferença quanto ao número de refeições (Tab. III), mas em BDT, as larvas de quinto instar realizaram mais refeições do que as de terceiro e quarto. E ainda, no quinto instar, as larvas em folhas BDT tiveram maior número de refeições do que em ADT. O tempo de cada refeição não diferiu entre os ínstaes e variou entre as plantas somente no quinto, onde o tempo de alimentação foi maior em BDT. Em folhas ADT, os intervalos entre as refeições não variaram entre os ínstaes. Em folhas BDT, o intervalo foi menor no quinto instar em relação ao terceiro. Ainda, no primeiro e no quinto ínstaes os intervalos entre refeições foram menores em folhas BDT quando comparados com ADT (Tab. IV).

As análises de regressão acerca do tempo destinado a cada atividade avaliada ao longo da ontogênese não foram significativas quanto ao tempo de alimentação, em folhas

Tabela II. Variação no tempo ( $\bar{X} \pm$  erro padrão; em minutos) dedicado ao repouso e a outras atividades dos diferentes instares larvais (n = 20/instar) de *Gratiana spadicea* sobre folhas de *Solanum sisymbriifolium* de alta (ADT) e baixa densidade de tricomas (BDT), durante seis horas de observação. Letras diferentes indicam diferença significativa para o tipo de folha e instar considerados (ANOVA seguida de testes múltiplos de Tukey;  $\rho < 0,05$ ).

Instar	ADT		BDT	
	Repouso	Atividade	Repouso	Atividade
I	292±5,94 <sup>a</sup>	68±5,94 <sup>b</sup>	290,3±7,35 <sup>a</sup>	69,7±7,35 <sup>b</sup>
II	282,5±8,4 <sup>a</sup>	77,5±8,4 <sup>b</sup>	287,9±7,24 <sup>a</sup>	72,1±7,24 <sup>b</sup>
III	271,1±5,95 <sup>a</sup>	88,9±5,95 <sup>b</sup>	276±6,73 <sup>a</sup>	84±6,73 <sup>b</sup>
IV	272,9±11,04 <sup>a</sup>	87,1±11,04 <sup>b</sup>	283,7±6,24 <sup>a</sup>	76,3±6,24 <sup>b</sup>
V	248,2±9,25 <sup>a</sup>	111,8±9,25 <sup>b</sup>	232,7±10,3 <sup>a</sup>	127,3±10,3 <sup>b</sup>

Figura 7. Tempo ( $\bar{X} \pm$  erro padrão;  $n = 20$ ) destinado a diferentes atividades, exceto repouso, do primeiro ao quinto instar (de A a E, respectivamente) de *Gratiana spadicea* sobre folhas de *Solanum sisymbriifolium* de alta (barras cheias) e baixa (barras vazias) densidade de tricomas. PR, prova do alimento; RM, remoção de tricomas; AL, alimentação; DE, deslocamento. Asteriscos indicam diferença significativa entre os dois tipos de folhas para tipo de atividade considerada (testes  $t$  pareados,  $\rho < 0,05$ ).

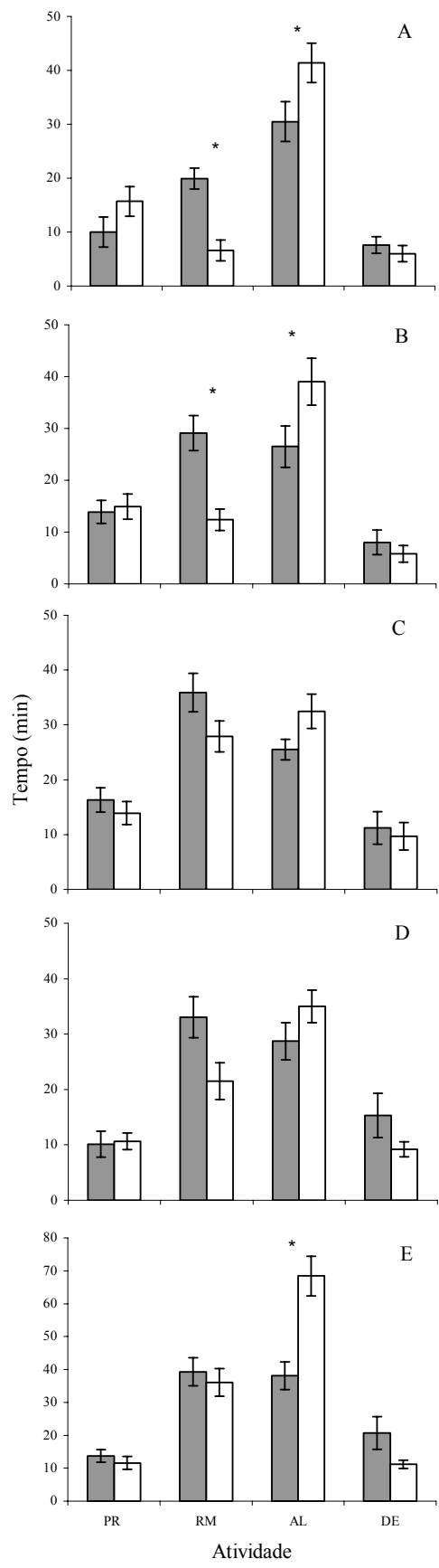


Tabela III. Resumo da análise de variância (ANOVA dois fatores), a respeito da influência dos fatores planta e instar nos parâmetros número, duração e intervalo entre cada refeição das larvas de *Gratiana spadicea*. Asteriscos indicam diferença estatística (alfa = 0,05).

Parâmetro	Fator	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	F	$\rho$
Número de refeições	Planta	1	1,892	6,673	0,0105*
	Instar	4	1,428	5,039	0,0259*
	Interação	1	0,007	0,023	0,8795
Tempo de cada refeição	Planta	1	248,3	12,249	0,0005*
	Instar	4	16,5	0,815	0,3678
	Interação	1	34,1	1,6804	0,1963
Intervalo das refeições	Planta	1	10974	9,4451	0,0022*
	Instar	4	14194	12,2173	0,0005*
	Interação	1	969	0,8338	0,3616



Tabela IV. Tempo de alimentação das larvas de *Gratiana spadicea* em seis horas de observação sobre folhas de *Solanum sisymbriifolium* de alta (ADT) e baixa (BDT) densidade de tricomas. Número de asteriscos diferente representa diferença significativa no comportamento entre ADT e BDT dentro de um dado instar e letras diferentes representam diferença estatística do comportamento entre instares para um dado tipo de folha (ANOVA, seguida de testes múltiplos de Tukey;  $p < 0,01$ ; dados logaritmizados).

Instar	ADT			BDT		
	Nº refeições (n)	Tempo refeição (min)	Intervalo refeições (min)	Nº refeições (n)	Tempo refeição (min)	Intervalo refeições (min)
I	2,65±0,29 <sup>a*</sup>	12±1,02 <sup>a*</sup>	53,34±5,93 <sup>a*</sup>	3,55±0,38 <sup>ab*</sup>	12,78±1,05 <sup>a*</sup>	34,76±4,05 <sup>ab**</sup>
II	2,85±0,29 <sup>a*</sup>	9,3±0,81 <sup>a*</sup>	46,64±6,45 <sup>a*</sup>	3,7±0,41 <sup>a,b*</sup>	11,53±1,01 <sup>a*</sup>	36,91±4,65 <sup>ab*</sup>
III	2,4±0,19 <sup>a*</sup>	11,23±0,77 <sup>a*</sup>	54,60±7,73 <sup>a*</sup>	2,65±0,31 <sup>a*</sup>	13,86±1,24 <sup>a*</sup>	50,45±6,83 <sup>a*</sup>
IV	2,8±0,32 <sup>a*</sup>	11,34±1,15 <sup>a*</sup>	38,91±5,74 <sup>a*</sup>	3±0,31 <sup>a*</sup>	12,69±0,86 <sup>a*</sup>	34,35±5,27 <sup>ab*</sup>
V	3,7±0,37 <sup>a*</sup>	10,54±0,81 <sup>a*</sup>	33,20±4,43 <sup>a*</sup>	4,9±0,46 <sup>b**</sup>	14,67±1,15 <sup>a**</sup>	23,87±3,28 <sup>b**</sup>

ADT e BDT, quanto ao tempo destinado a prova do alimento em folhas ADT e quanto ao tempo em repouso em folhas BDT. Houve um aumento nas demais atividades, exceto para o tempo em repouso nas folhas ADT e aquele dedicado à prova do alimento em BDT, que diminuíram ao longo do estágio larval (Tab. V).

Comparando-se as regressões em folhas ADT e BDT, foram observadas diferenças na atividade de prova do alimento e repouso. Em ADT, as larvas repousaram menos ao longo dos ínstaes e não apresentaram diferença na prova do alimento. O oposto aconteceu em BDT, onde as larvas provaram menos ao longo do estágio larval e o tempo em repouso não variou (Tab. V).

### 3.3 Remoção dos tricomas

As larvas de ínstaes iniciais maceraram os raios laterais dos tricomas estrelados para atingir o mesofilo da folha. No primeiro instar, foi encontrado um número significativamente maior de raios de tricomas removidos e tricomas estrelados fixos na planta sem um ou dois raios laterais, nas folhas ADT. Uma pequena quantidade de tricomas estrelados inteiros removidos foi encontrada para este instar. No segundo, observou-se a mesma tendência. No entanto, ocorreu aumento no número de tricomas estrelados removidos por inteiro. Neste instar, as diferenças entre ADT e BDT não foram significativas (Fig. 8).

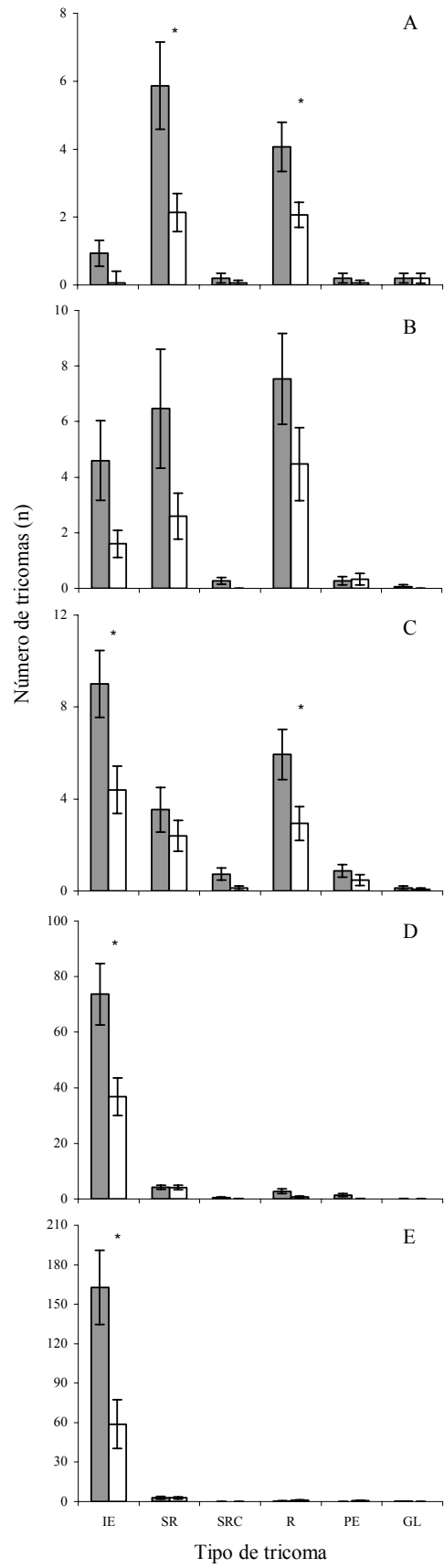
A partir do terceiro instar, o número de tricomas estrelados removidos por inteiro foi maior e o número de tricomas estrelados fixos na planta sem um ou dois raios laterais diminuiu, bem como o de raios soltos. Nas folhas ADT, o número de tricomas estrelados removidos por inteiro e o número de raios foram maiores (Fig. 8).

No quarto e quinto instar as larvas removeram, preferencialmente, os tricomas por inteiro e significativamente mais em folhas ADT (Fig. 8).

Tabela V. Equações de regressão correspondentes ao tempo destinado a cada atividade ao longo do estágio larval de *Gratiana spadicea* (n = 20/instar) em folhas de *Solanum sisymbriifolium* de alta (ADT) e baixa (BDT) densidade de tricomas. Asteriscos indicam variação significativa ao longo da ontogênese ( $\alpha = 0,05$ ).

Atividade	ADT				BDT			
	Equação	r	F	$\rho$	Equação	r	F	$\rho$
Repouso	$y = -10,13x + 304,14$	0,944	25,02	0,015*	$y = -11,94x + 309,94$	0,793	5,11	0,108
Prova alimento	$y = 0,36x + 11,72$	0,210	0,138	0,734	$y = -1,25x + 17,09$	0,910	14,53	0,031*
Remoção tricomas	$y = 4,27x + 18,63$	0,904	13,53	0,034*	$y = 6,81x + 0,47$	0,912	14,9	0,030*
Alimentação	$y = 1,74x + 24,64$	0,550	1,304	0,336	$y = 5x + 28,26$	0,546	1,276	0,340
Deslocamento	$y = 3,35x + 2,51$	0,963	38,32	0,008*	$y = 1,38x + 4,24$	0,916	15,68	0,028*

Figura 8. Características dos tricomas removidos ( $\bar{X} \pm$  erro padrão) por larvas de *Gratiana spadicea* (n = 15/instar/planta), durante 24 horas de alimentação em discos foliares de *Solanum sisymbriifolium* de alta (barras cheiras) e baixa (barras vazias) densidade de tricomas, ao longo da ontogênese (A a E, de primeiro a quinto instar, respectivamente). IE, estrelado, solto e inteiro; SR, estrelado, fixo e sem raio(s) lateral(is); SRC, estrelado, fixo e sem raio central; R, raio solto; PE, parte de estrelado solta; GL, glandular longo-pedicelado solto. Asteriscos indicam diferença significativa entre os tipos de planta, para o instar considerado (testes não paramétricos de Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ).



### 3.4. Caracterização do canal alimentar

O canal alimentar das larvas de *G. spadicea* consiste em três porções: o intestino anterior ou estomodeu, o intestino médio ou mesêntero e o intestino posterior ou proctodeu. O intestino anterior é composto pela boca, seguida da faringe e uma estrutura em forma de taça, que se projeta no esôfago. Este tem aspecto piriforme, dilatado em relação às demais seções. Não apresenta divertículo nem proventrículo, encerrando-se como um estreitamento do tubo (cárdia). O intestino médio apresenta-se alongado e finaliza-se com a válvula pilórica, junto à inserção dos túbulos de Malpighi (dois pares), que delimitam o início do intestino posterior. Este é formado por um tubo, freqüentemente dividido em duas partes, o íleo e cólon, seguido do reto e ânus (Fig. 9).

O epitélio que envolve a porção anterior do canal alimentar das larvas de *G. spadicea* apresenta uma fina camada muscular. No intestino anterior, o epitélio é simples e revestido por fina cutícula, refletindo a sua origem ectodérmica (Fig. 10).

A parede do intestino médio, de origem endodérmica, desprovida de cutícula, é formada pela membrana basal e um epitélio colunar simples secretor revestindo o lúmen. Opostas a membrana basal ocorrem as microvilosidades, que aumentam a área de absorção celular. O conteúdo alimentar, dentro do intestino médio, é envolvido por uma membrana peritrófica, que delimita o espaço inter e intra-peritrófico e têm a aparência de uma fina película que acompanha o bolo alimentar e, aparentemente, torna-se mais espessa no intestino posterior e nas fezes (Fig. 10).

No intestino posterior, o epitélio é formado por células colunares e revestido por uma camada de cutícula, dada sua origem também ectodérmica. Não foram observadas camadas musculares nesta estrutura (Fig. 10).

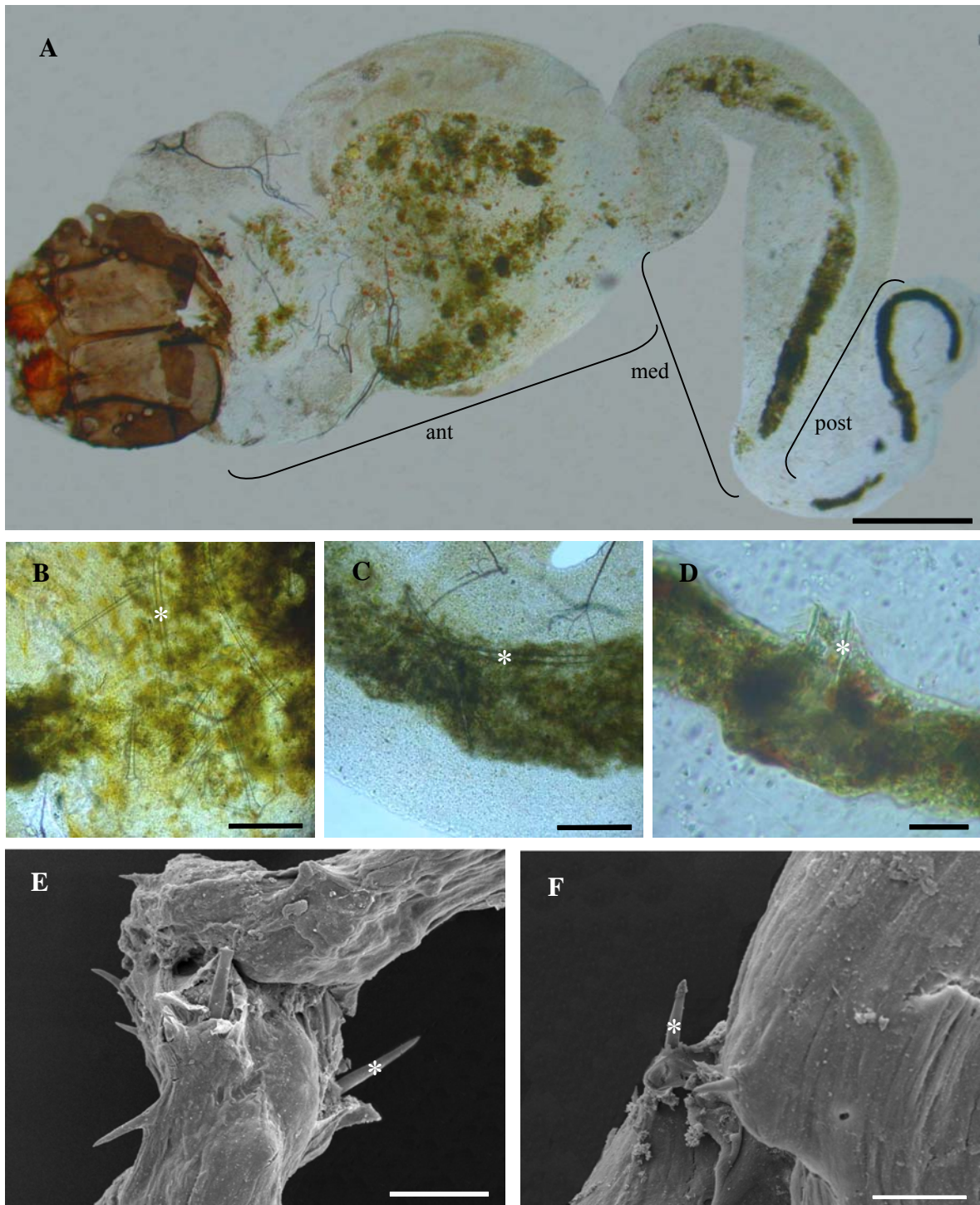


Figura 9. Canal alimentar de larva de primeiro instar de *Gratiana spadicea* (A). Detalhe de fragmentos de tricomas de *Solanum sisymbriifolium* (asteriscos) no intestino anterior (B), médio (C) e posterior (D) em microscopia de luz e fezes (E e F) em microscopia eletrônica de varredura. **ant**, intestino anterior; **med**, intestino médio; **post**, intestino posterior. Barras = 200, 300, 300, 50, 100 e 50  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

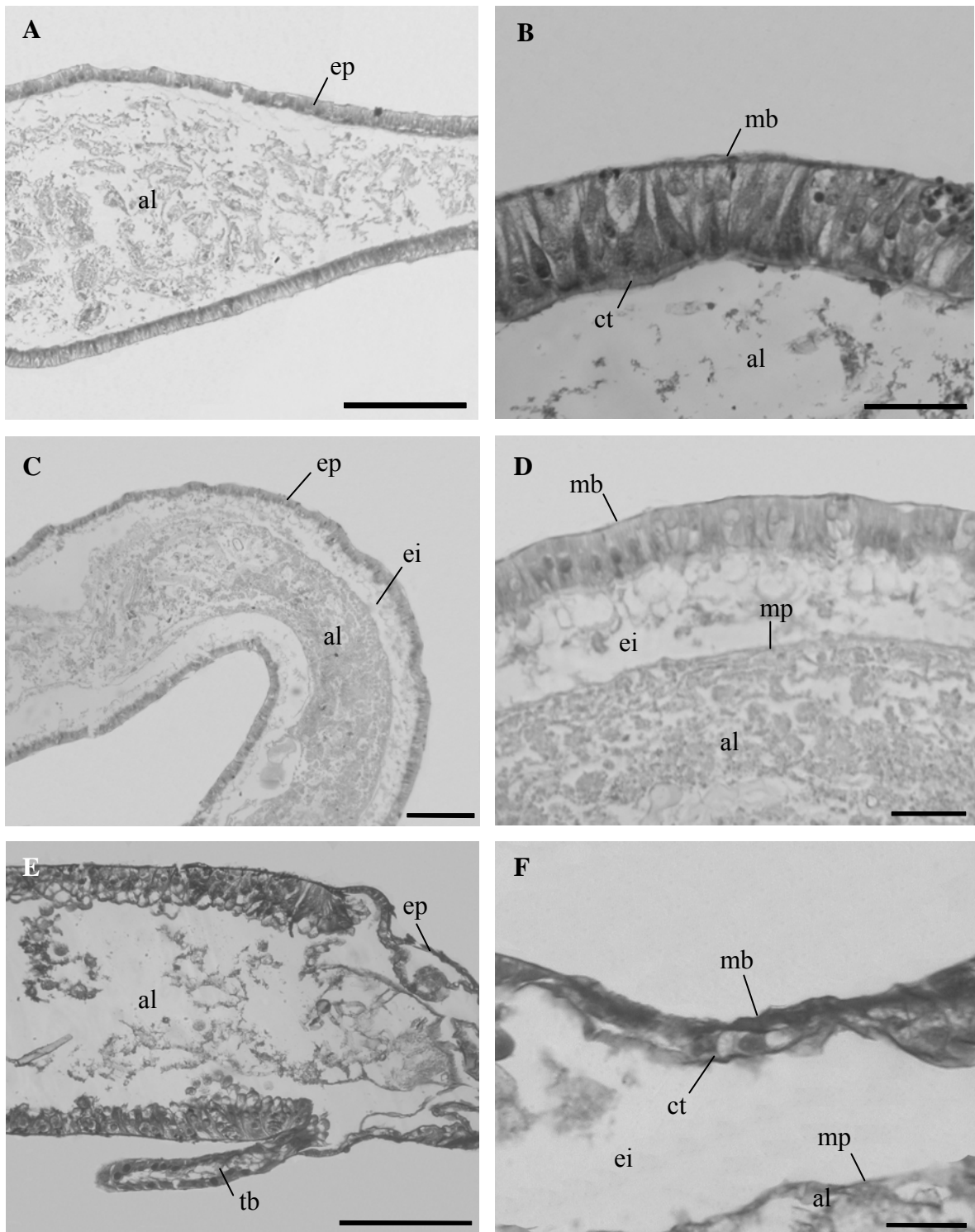


Figura 10. Cortes histológicos longitudinais do canal alimentar de larvas de quinto instar de *Gratiana spadicea*. A) Intestino anterior, B) detalhe do epitélio do intestino anterior, C) porção anterior do intestino médio, D) detalhe do epitélio do intestino médio, E) porção final do intestino médio / início do posterior e F) detalhe do epitélio do intestino posterior. **al**, alimento; **ct**, cutícula; **ei**, espaço inter-peritrófico; **ep**, epitélio, **mb**, membrana basal; **mp**, membrana peritrófica; **tb**, túbulos de Malpighi. Barras = 400, 30, 200, 60, 200 e 40  $\mu\text{m}$ , respectivamente.



### 3.5 Ingestão de tricomas

As larvas de *G. spadicea* ingerem partes dos tricomas de *S. sisymbriifolium*, principalmente fragmentos de raios dos tricomas estrelados (Fig. 9 e 10).

De um modo geral, o intestino anterior apresenta maior número de tricomas e fragmentos do que o intestino médio e posterior. Embora não tenham sido testados estatisticamente, o número de tricomas ingeridos por larvas de primeiro e segundo ínstaes alimentadas com folhas ADT foi maior que com folhas BDT. Nos demais ínstaes isto geralmente não ocorre, principalmente em relação aos fragmentos dos raios dos tricomas (Fig. 11).

A presença de maior número de fragmentos de tricomas no intestino anterior em relação ao médio e posterior é mais acentuada nos primeiros ínstaes. No quarto e quinto ínstaes, aparentemente, os fragmentos de tricomas não ficam retidos no intestino anterior, sendo encontrados com freqüência no intestino médio (Fig. 11).

Durante as observações das lâminas do tubo digestivo verificamos, além dos tricomas mencionados, a presença de células lignificadas, como elementos traqueais e algumas células epidérmicas. No caso das larvas de quarto e quinto instar, foram encontrados pedaços da epiderme com os tricomas aderidos, geralmente no intestino anterior.

A quantidade de tricomas glandulares no intestino anterior em relação ao médio e posterior também foi significativamente maior na maioria dos ínstaes e em plantas ADT e BDT. Aparentemente, quando foi observada a presença da parte secretora destes tricomas em alguma das porções do intestino, a mesma parecia intacta, raramente “murcha” ou vazia, sem a secreção (Fig. 11).

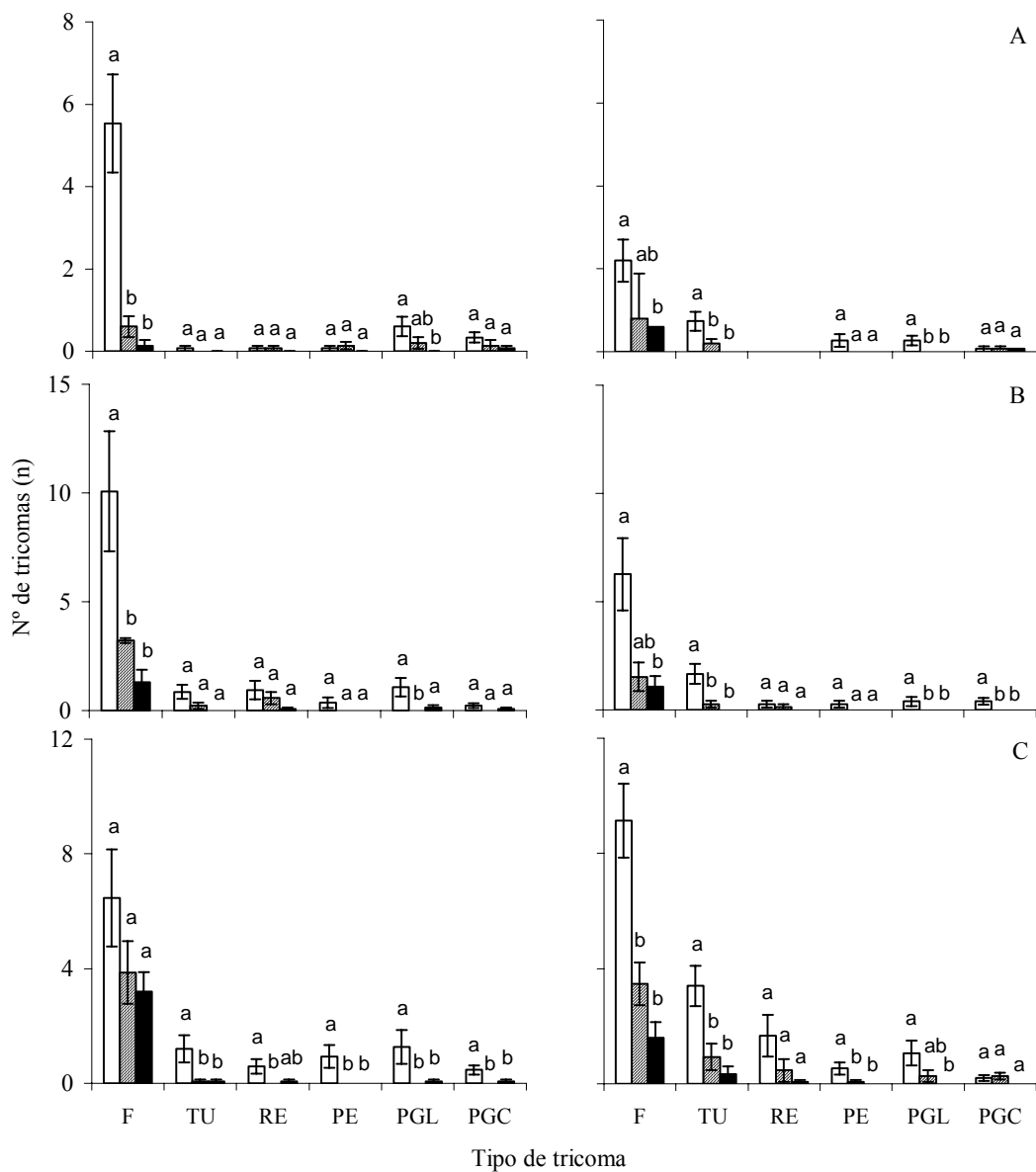
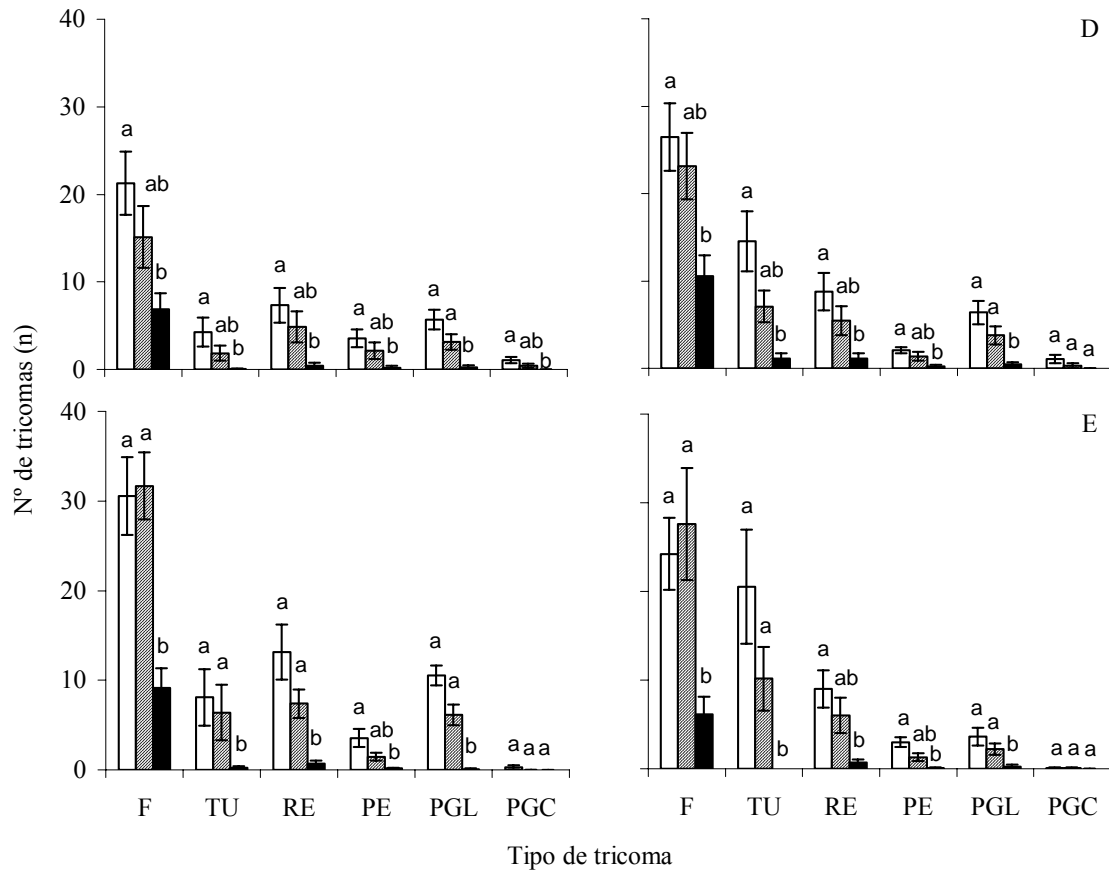


Figura 11. Variação nos tricomas ( $\bar{X} \pm$  erro padrão) encontrados no intestino anterior (barras vazias), médio (barras hachureadas) e posterior (barras cheias) de larvas de *Gratiana spadicea* do primeiro ao quinto instar (A ao D) (n = 15/planta), alimentadas com *Solanum sisymbriifolium* de alta (coluna da esquerda) e baixa (coluna da direita) densidade de tricomas. F, fragmentos de raio; TU, tector unicelular inteiro; RE, raio inteiro de estrelado; PE, parte de estrelado com três ou mais raios; PGL, parte de glandular longo, PGC, parte de glandular curto. Letras diferentes indicam diferença significativa dentro de cada tipo de tricoma entre as porções do canal alimentar, para o instar considerado e tipo de folha considerada (testes não paramétricos de Kruskal-Wallis, seguidos de testes de Dunn;  $p < 0,05$ ).

Figura 11. (continuação)



Raios inteiros e partes de tricomas estrelados (de três a cinco raios laterais) foram pouco freqüentes dentro do tubo digestivo das larvas, principalmente nos instares iniciais, tanto em ADT quanto em BDT. Larvas de quarto e quinto instares apresentaram maior quantidade destes tricomas no seu tubo digestivo, diferindo em número, do intestino anterior para o posterior (Fig. 11).

Perfurações associadas aos tricomas estrelados foram detectadas internamente, pelo menos na membrana peritrófica de larvas de todos os instares (Fig. 9 C, D). As fezes das larvas de quinto instar apresentaram-se envoltas por uma membrana aparentemente espessa, semelhante a um muco, a qual também aparece perfurada por raios de tricomas estrelados (Fig. 9 E, F).

#### **4. Discussão**

##### **4.1 Tricomas de *S. sisymbriifolium***

Dentre os tricomas relacionados por MENTZ *et al.* (2000) para as folhas de *S. sisymbriifolium*, há dois tipos não encontrados neste estudo: o simples bicelular e o misto estrelado glandular, os quais, aparentemente, são raros e podem ser facilmente confundidos com o tector unicelular e o estrelado, respectivamente. O tricoma glandular curto-pedicelado unicelular com cabeça globosa pluricelular não havia sido registrado anteriormente. HILL *et al.* (1997) e COSA *et al.* (2002) descrevem apenas três tipos de tricomas nesta planta: 1) tricoma estrelado, 2) tricoma simples e 3) tricoma glandular tipo B, equivalente ao glandular longo-pedicelado pluricelular com cabeça clavada unicelular aqui descrito. Atribuímos tais diferenças possivelmente aos diferentes métodos empregados; MENTZ *et al.* (2000) e COSA *et al.* (2002) utilizaram microscopia óptica, enquanto HILL *et al.* (1997) utilizaram microscopia óptica e eletrônica de

varredura. Acreditamos que, neste caso, apenas a microscopia eletrônica de varredura aliada à microscopia óptica e a histoquímica serão capazes de nos oferecer resultados satisfatórios.

Em estudo realizado por WOODMAN & FERNANDES (1991), a redução de pêlos resultou no aumento da taxa de evapotranspiração, embasando a hipótese de que os tricomas têm papel no controle da perda de água das plantas, formando uma “cobertura” que diminui a ação do vento, reflete a luz solar e diminui a temperatura da folha. Tal hipótese corrobora os resultados deste trabalho, nos quais as plantas mantidas no sol apresentaram maior densidade de tricomas estrelados, os quais, provavelmente, devido ao maior tamanho, oferecem maior proteção contra a perda de água. Ainda, os tricomas simples, mais numerosos nas folhas de sombra, podem representar uma barreira menos eficiente devido ao menor tamanho em relação aos estrelados. Em *P. suberosa*, a alta pubescência das folhas mantidas no sol está supostamente relacionada ao estresse hídrico associado à proteção foliar pelo aumento da reflexão da luz ou prevenção da evapotranspiração excessiva (BARP *et al.* 2006).

Os compostos secundários detectados histoquimicamente nos tricomas glandulares, tanto nas folhas ADT quanto BDT, indicam que não há diferenças qualitativas entre estas quanto a composição química do exudato dos tricomas. A presença de metabólitos secundários das plantas e exudatos de tricomas glandulares, como alcalóides e fenóis, podem atuar como repelentes gustatórios e, portanto, na defesa das plantas contra os insetos herbívoros (LEVIN 1973, SEIGLER & PRICE 1976). Os fenóis apresentam cerca de 10.000 metabólitos e uma variedade de funções, desde suporte mecânico, atração de polinizadores até defesa contra herbívoros (*e.g.* ligninas e taninos, abundantes nas plantas) (TAIZ & ZEIGER 2004). Os alcalóides, também presentes nos tricomas glandulares de *S. sisymbriifolium*, fazem parte dos metabólitos

secundários nitrogenados e exercem importante papel na defesa de plantas contra predadores, em especial de grandes vertebrados, devido à toxidez e deterrência (HARBORNE 1986, TAIZ & ZEIGER 2004). Porém, para as plantas, os lipídios são utilizados principalmente para armazenar carbono e produzir energia (TAIZ & ZEIGER 2004). Para os insetos, por outro lado, podem representar importante recurso energético. Tais tricomas são ingeridos pelas larvas de *G. spadicea*, cujo papel frente à mortalidade correspondente resta ser elucidado do ponto de vista químico.

Em *G. spadicea*, aparentemente, não há mudanças no comportamento diante do contato com substâncias oriundas dos tricomas glandulares. Entretanto, podem haver alterações no consumo de alimento e na performance das larvas e adultos, o que não foi avaliado neste trabalho, com relação específica aos tricomas glandulares. MEDEIROS & MOREIRA (2005) porém verificaram que não há diferença entre a performance de larvas alimentadas com discos foliares intactos e discos foliares com o exudato dos tricomas glandulares removido e ainda, que a presença de exudatos não interfere na velocidade de deslocamento das larvas de primeiro e quinto ínstar (MEDEIROS & MOREIRA 2002).

#### 4.2 Uso temporal pelas larvas

As larvas de *G. spadicea*, durante a ontogênese, empregam a maior parte do seu tempo em repouso, o que é tido como um padrão em insetos, principalmente para especialistas que estão situados na sua hospedeira desde o estágio de ovo (BERNAYS 2001). O comportamento de um inseto herbívoro pode ser regulado e influenciado por fatores como a qualidade do alimento, o qual contribuirá na alocação de tempo para as várias atividades desempenhadas pelo herbívoro (BERNAYS 1998). A quantidade de tempo empregado em cada atividade proporciona uma avaliação do efeito de inimigos naturais, qualidade do alimento, temperatura, e outras variáveis que vão influenciar o

comportamento (ADLER & ADLER 1988). Por isso, o tempo destinado à atividade de repouso deve estar relacionado com o fato das larvas permanecerem na sua única fonte de alimento. Em contrapartida, mesmo situadas na planta hospedeira, as larvas podem provar várias ou algumas partes da planta até encontrar a área mais indicada para alimentação, mais nutritiva, mais sombreada ou com menor densidade de tricomas.

Variações na densidade dos diferentes tipos de tricomas em folhas de *S. sisymbriifolium* refletem mudanças na utilização destas por larvas de *G. spadicea*, principalmente com relação ao tempo utilizado na remoção dos tricomas e na alimentação. O tempo gasto em alimentação pode representar um custo para o inseto (BERNAYS *et al.* 2004b). No caso das larvas de *G. spadicea*, existe a barreira física dos tricomas, que deve ser transposta, já que estes impedem o acesso ao mesofilo foliar, o que vai interferir no tempo destinado às demais atividades. Assim, este comportamento de remoção dos tricomas pode ser uma adaptação primária para neutralizar o sistema de defesa das plantas (*e.g.*, CLARKE & ZALUCKI 2000).

As larvas de *G. spadicea* apresentaram padrão de remoção de tricomas anteriormente descrito por MEDEIROS & MOREIRA (2005). Entretanto, neste trabalho, foram feitas comparações entre plantas ADT e BDT, as quais apresentaram diferenças significativas na densidade de tricomas. O maior tempo destinado à remoção de tricomas em folhas mantidas no sol corrobora o fato destas folhas apresentarem maior densidade de tricomas estrelados e glandulares longo-pedicelados, que são os tricomas de maior tamanho em *S. sisymbriifolium* e impedem a alimentação, principalmente de larvas menores. Nas folhas mantidas na sombra, menos tempo foi dedicado à remoção, dada a baixa densidade dos tricomas estrelados e glandulares longo-pedicelados e ao estar o mesofilo, por consequência, mais acessível. Salienta-se que o maior número de tricomas tectores unicelulares nestas folhas, provavelmente, não oferece barreira

expressiva à alimentação, visto que, aparentemente, são de pequeno tamanho em relação aos demais.

As diferenças no tempo de remoção de tricomas, mais expressivas nos dois primeiros instares larvais, corroboram o fato de as larvas, nesta fase, macerarem os raios laterais dos tricomas estrelados para se alimentar. Isto representa mais tempo nessa atividade do que os demais instares, nos quais passam a remover os tricomas por inteiro, cortando-os apenas uma vez no pedúnculo (MEDEIROS & MOREIRA 2005). Comparando a remoção de tricomas nas plantas de alta e baixa densidade o padrão foi o mesmo, no entanto, o número de tricomas removidos foi maior para as larvas que se alimentaram em alta densidade. Dessa forma, confirma-se a dificuldade de acessar o alimento e maior gasto energético para se alimentarem nestas plantas, o que também pode estar relacionado à alta mortalidade observada nas larvas de *G. spadicea* nos instares iniciais (MEDEIROS & MOREIRA 2005).

Muitas espécies de insetos parecem gastar somente uma pequena porção do seu tempo consumindo alimento de fato. O aumento do tempo de alimentação ou a baixa qualidade nutricional da hospedeira pode envolver o consumo de grandes quantidades de tecido da planta para sustentar o crescimento. Porém, plantas de alta qualidade nutritiva são mais adequadas para o crescimento dos insetos e, nestas plantas, o tempo gasto em alimentação é menor (BERNAYS 2001, BERNAYS *et al.* 2004b). As larvas de *G. spadicea* empregam pouco tempo na alimentação, os intervalos entre as refeições são relativamente longos e envolvem atividades como a remoção dos tricomas, prova de alimento e deslocamento. Em insetos, os ritmos de alimentação de curta duração (*e.g.*, menos que uma hora se alimentando separada por cerca de 30 minutos a 2 horas de repouso) provavelmente refletem o tempo necessário para digerir e absorver uma porção supostamente ótima do alimento ingerido (SLANSKY 1993). As refeições de,



aproximadamente, 10 minutos realizadas pelas larvas de *G. spadicea* em todos os ínstaes indicam a ingestão de uma porção ótima de alimento que levaria menos de uma hora para ser absorvida (intervalo entre refeições), quando ocorre novamente a ingestão de alimento.

As diferenças quanto aos ritmos de alimentação em relação às folhas de alta e baixa densidade de tricomas ocorrem preferencialmente nas larvas de quinto instar, as quais são maiores e responsáveis pelo período de maior ingestão de alimento. O maior número de refeições, o maior tempo destinado às refeições e o menor intervalo entre refeições sobre plantas de BDT podem estar relacionados a dois fatores: 1) tempo disponível a alimentação, visto que não necessitam remover tricomas, ou ainda, 2) qualidade nutricional destas plantas, hipótese que deve ser considerada, pois plantas mantidas no sol e na sombra podem apresentar diferente qualidade e/ou quantidade de nutrientes (JOHNSON 1975). Larvas de primeiro instar sobre folhas de baixa densidade de tricomas necessitam de um menor intervalo de tempo para digerir/absorver uma quantidade ideal de alimento, mas isso não reflete significativamente no tempo de cada refeição nem mesmo no número de refeições.

O tempo dedicado à alimentação por larvas de *G. spadicea* não aumenta ao longo dos ínstaes; no entanto, sabe-se que as larvas maiores, com o aumento do tamanho corporal, necessitam de mais alimento e, para isso comem mais (MEDEIROS & MOREIRA 2003). O fato do tempo destinado à alimentação não aumentar pode ser justificado pela ingestão de maiores pedaços/fragmentos do alimento. Com a cabeça e as mandíbulas maiores, os últimos ínstaes larvais têm maior facilidade em ingerir grandes quantidades de material foliar. Como consequência desta mudança, pode ocorrer a redução da eficiência de assimilação nos últimos ínstaes, provavelmente como um resultado da ingestão de uma maior proporção de alimento, porém de menor

qualidade (SLANSKY 1993, HOCHULI 2001); ou de pedaços maiores, porém de difícil digestão. Conforme demonstrado por KERPEL (2004), as lagartas de *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera, Nymphalidae) aproveitam maior quantidade de nutrientes em fragmentos menores, com maior superfície exposta relativa, o que resulta em maior aproveitamento do conteúdo das células mais internas do fragmento.

O consumo de alimento pode mudar com a idade dentre e entre os ínstaes, provavelmente refletindo mudanças fisiológicas durante o desenvolvimento de *G. spadicea*. O pequeno tamanho das larvas, principalmente no primeiro e segundo ínstaes, dificulta o acesso ao alimento, principalmente sobre folhas de alta densidade de tricomas, nas quais a necessidade de remover tricomas é maior. Em ambas as plantas, quanto maior a larva, maior é o tempo utilizado para remoção de tricomas e para o deslocamento sobre a folha; mas, conforme já mencionado, o tempo de alimentação é o mesmo. A mudança deste padrão quanto ao tempo de repouso e de prova sugere que há um tipo de compensação no tempo empregado nestas duas atividades. Se, em baixa densidade de tricomas, ao longo dos ínstaes, o tempo de prova diminui, ou seja, provar não é mais tão necessário, o tempo em repouso se mantém. Mas, se a necessidade de provar é a mesma, diminui o tempo de repouso, como acontece em folhas de alta densidade de tricomas, então, é provável que nestas folhas, as larvas tenham a necessidade de encontrar melhores sítios de alimentação, ou aqueles que possuem menor número de tricomas, principalmente os estrelados, que oferecem maior barreira à ingestão de alimento. Por isso, destinam o mesmo tempo à prova do alimento durante todos os ínstaes e, assim, diminuem o seu tempo de repouso.

### 4.3 Ingestão de tricomas

O consumo de alimento provê energia e nutrientes necessários para realizar as demais atividades da vida de um inseto ou qualquer outro animal: crescimento e desenvolvimento, armazenagem de reservas metabólicas, movimento, defesa, e reprodução (SLANSKY 1993). Para se alimentar, as larvas de *G. spadicea* precisam remover os tricomas presentes nas folhas de *S. sisymbriifolium*. No entanto, acabam ingerindo-os em parte, geralmente, em fragmentos menores. Destacamos a presença de um número maior de fragmentos de tricomas na porção anterior do intestino, sugerindo a existência de um mecanismo/comportamento que atue na regulação da passagem destes fragmentos, evitando estas estruturas no intestino médio que apresenta o epitélio mais delicado e sujeito potencialmente a danos mecânicos causados por estas estruturas. Desenvolvemos duas hipóteses que podem embasar este fenômeno. A primeira delas é que haja um regurgito do intestino anterior para a cavidade pré-oral, embasada pela presença de uma estrutura em forma de taça, próxima a faringe, que se projeta no papo e possui um estreitamento antes desse. Assim, os tricomas acumulados nesta estrutura poderiam ser regurgitados após certo período de alimentação. A segunda hipótese é que os tricomas acumulados no intestino anterior sejam “liberados”, pelo menos em parte, juntamente com a exúvia, visto que esta porção do intestino é coberta por uma cutícula quitinosa, de origem ectodérmica, renovada em cada muda (CHAPMAN 1982, WEISS 2006). Salienta-se, entretanto, que mesmo frente à existência desta adaptação, a presença de perfurações pelo menos na membrana peritrófica (no interior do intestino e fezes) pode comprometer à sobrevivência, e precisa ser melhor avaliada.

A retenção de fragmentos de tricomas no intestino anterior parece estar ocorrendo somente nas larvas dos três primeiros ínstares, pois nas de quarto e quinto o número de fragmentos não difere entre o intestino anterior, médio e posterior. Com o

aumento do tamanho corporal das larvas nos últimos ínstars, a passagem dos fragmentos de tricomas pode ser facilitada e assim, não há necessidade destes serem retidos, diferentemente do que acontece nos primeiros ínstars, quando um ou mais fragmentos têm difícil passagem para o intestino médio. Conforme estudos preliminares, constatamos que em larvas de primeiro instar a largura do espaço intra-peritrófico mede cerca de 65  $\mu\text{m}$  e, em larvas de quinto instar, cerca de 261  $\mu\text{m}$ . Da mesma forma, o diâmetro médio dos raios laterais dos tricomas é de aproximadamente 33  $\mu\text{m}$  e o comprimento 184  $\mu\text{m}$  (MEDEIROS & MOREIRA 2002). Salienta-se também que para a passagem destes pelo tubo digestivo precisam satisfazer a orientação longitudinal, porque a altura dos raios dos tricomas é maior que a largura do espaço intra-peritrófico nos ínstars iniciais.

O método aqui utilizado para detectar a presença de tricomas no canal alimentar possui algumas limitações, sobretudo em relação às larvas de quarto e quinto instar, que têm grande quantidade de alimento no tubo digestivo, dificultando a visualização dos tricomas e fragmentos. Tal afirmativa é principalmente verdadeira para o intestino posterior, onde ocorre reabsorção de água (CHAPMAN 1982), e o conteúdo alimentar (fezes) torna-se mais compacto e escuro.

A quantidade de tricomas tectores unicelulares no tubo digestivo das larvas que se alimentaram de folhas de sombra (baixa densidade de tricomas) corrobora o alto número destes tricomas quantificado nestas folhas. A maior quantidade destes tricomas no intestino anterior do que no médio e posterior é mantido, tanto em alta quanto em baixa densidade de tricomas.

Em larvas de *Oulema melanopus* (Linnaeus) (Coleoptera, Chrysomelidae) que se alimentam de uma variedade pilosa de trigo, os tricomas passam através do canal alimentar não digeridos e aparentemente não tem valor nutritivo, exceto por algum

citoplasma presente na cavidade do tricoma (WELLSO 1973). De forma semelhante, em *G. spadicea* os tricomas parecem intactos em qualquer das porções do canal alimentar e nas fezes, sem sinal de digestão. Tricomas e nervuras podem conter mais sílica do que outras áreas da lâmina foliar, o que pode justificar a sua indigestibilidade (WELLSO 1973). Além disso, as paredes celulares celulósicas são naturalmente indigeríveis pelos insetos, porque raramente implica em vantagens, já que o gasto energético é muito grande sem a presença de simbioses (MARTIN 1991), os quais não foram observados em *G. spadicea* (SILVA 1999).

As larvas de *G. spadicea* apresentam o canal alimentar com estrutura típica esperada para insetos mastigadores (SNODGRASS 1935, CROWSON 1981, CHAPMAN 1982). A fim de evitar danos mecânicos causados por partículas sólidas de alimento, no intestino médio o conteúdo alimentar é envolvido pela membrana peritrófica. Entretanto, verificamos larvas com indícios de rompimento nesta membrana, causados pelos fragmentos de tricomas ingeridos, tanto no intestino médio, quanto no posterior e nas fezes, indicando que podem lacerar o canal alimentar e causar danos às larvas.

Diante dos resultados aqui apresentados e discutidos, podemos inferir que existe uma adaptação das larvas de *G. spadicea* à presença de tricomas na sua hospedeira, os quais são removidos ou macerados previamente à ingestão do mesofilo; atividade essa que envolve consumo de energia e representa um custo subletal.

Após a remoção, fragmentos dos tricomas removidos são ingeridos e atravessam o canal alimentar sem qualquer sinal de digestão e, provavelmente, causam danos físicos na passagem pelo tubo digestivo, o que precisa ser melhor estudado. Além disso, o maior índice de fragmentos no intestino anterior do que no médio e posterior indicam haver algum mecanismo que filtra e/ou retêm tais estruturas no intestino anterior, os quais podem ser regurgitados ou liberados juntamente com a exúvia.

## 5. Conclusões

Diferentes densidades de tricomas não interferem no tempo destinado ao repouso e às demais atividades das larvas de *G. spadicea*. O tempo em repouso é maior que o tempo em atividade, o qual varia entre os comportamentos observados: remoção de tricomas, alimentação, prova do alimento e deslocamento.

A alta densidade de tricomas, principalmente estrelados, afeta o tempo dedicado à alimentação das larvas, já que o maior tempo dedicado a remoção destas estruturas diminuiu o tempo empregado na ingestão de alimento.

O tamanho das larvas interfere principalmente no tempo destinado a remoção de tricomas, visto que, ao longo da ontogênese, este aumenta em folhas com alta e baixa densidade de tricomas, indicando que larvas maiores removem tricomas por mais tempo. Tal fato também pode estar relacionado com mudanças no comportamento de remoção, já que larvas nos instares iniciais maceram os raios dos tricomas e nos últimos instares cortam-os apenas na base, removendo a estrutura inteira.

Os ritmos de alimentação das larvas de *G. spadicea* são de curta duração e o tempo de assimilação do alimento ingerido é menor que uma hora, principalmente em larvas de quinto instar. As diferenças entre os ritmos de alimentação não se manifestam entre os demais instares, mas principalmente no quinto instar e entre as folhas de alta e baixa densidade de tricomas, sugerindo uma maior facilidade de ingestão nas folhas de baixa densidade e, possivelmente, um menor aproveitamento de nutrientes.

As larvas repousaram menos, ao longo do estágio larval, em folhas de alta densidade de tricomas, o que refletiu no tempo destinado a prova de alimento, que não variou. O contrário foi verificado para folhas de baixa densidade de tricomas, sugerindo que as larvas necessitaram buscar ou procurar sítios de alimentação com menos

tricomas nestas folhas e, assim, compensarem este gasto de tempo diminuindo o tempo em repouso.

As larvas de *G. spadicea* reduzem o efeito dos tricomas, removendo-os antes de iniciar a alimentação. Tal comportamento provavelmente é uma adaptação para neutralizar esta barreira física que atua no sistema de defesa da sua hospedeira. Como qualquer outro comportamento, remover tricomas requer tempo e consumo de energia e apesar do gasto energético envolvido na remoção, alguns dos fragmentos são ingeridos, provavelmente de forma acidental.

A ingestão de fragmentos de tricomas de *S. sisymbriifolium* ocorre em todos os instares larvais de *G. spadicea*, mas, a retenção destes fragmentos no intestino anterior das larvas dá-se, principalmente nos instares iniciais, quando as larvas são menores e o diâmetro do tubo digestivo também, o que dificulta a passagem de fragmentos maiores. Para a liberação dos fragmentos retidos há duas possibilidades: podem ser regurgitados de uma estrutura anterior ao papo que teria a função de armazená-los até o momento de regurgitar, ou ainda, serem liberadas com a exúvia na ocasião da muda.

A ocorrência de ingestão de tricomas e a passagem de alguns fragmentos através do canal alimentar podem estar relacionados com a alta mortalidade anteriormente observada para estas larvas, principalmente nos instares iniciais, visto que estas estruturas podem danificar o epitélio do tubo digestivo. Além disso, a presença de um mecanismo para regurgitar ou liberar com a exúvia os fragmentos ingeridos pode não ser totalmente eficiente, pois a retenção dos fragmentos é mais acentuada nos três primeiros instares onde ocorrem, porém, os índices mais altos de mortalidade.

## 6. Referências bibliográficas

(de acordo com as normas da Revista Brasileira de Zoologia)

- ADLER, P.H. & C.R.L. ADLER. 1988. Behavioral time budget for larvae of *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae) on artificial diet. **Annals of Entomological Society of America**, College Park, **81** (4): 682-688.
- ALBERTS, B.; D. BRAY; J. LEWIS; M. RALF; K. ROBERTS & J.D. WATSON. 1997. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre, Artes Médicas, 1294p.
- ALBUQUERQUE, G.S. & M. BECKER. 1986. Fecundidade e longevidade de *Gratiana spadicea* (Klug, 1829) (Coleoptera, Chrysomelidae, Cassidinae), em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, **30** (1): 105-113.
- BARBEHENN, R. & M.M. MARTIN. 1995. Peritrophic envelope permeability in herbivorous insects. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, **41** (4): 303-311.
- BARP, E.A.; G.L.G. SOARES; G. GOSMANN; A.M. MACHADO; C. VECCHI & G.R.P. MOREIRA. 2006. Phenotypic plasticity in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae): induction and reversion of two morphs by variation in light intensity. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, **66** (3): 853-862.
- BECKER, M. & A.J.P. FREIRE. 1996. Population ecology of *Gratiana spadicea* (Klug), a monophagous Cassidinae on an early successional Solanaceae in southern Brazil, p. 271-287. In: P.H.A. JOLIVET & M.L. COX (Eds.). **Chrysomelidae biology, vol. 2: ecological studies**. Amsterdam, SPB Academic Publishing, 462p.
- BECKER, M. & F.A. FRIEIRO-COSTA. 1987. An analysis of the fate of eggs of *Gratiana spadicea* (Klug, 1829) (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae) in relation to the position in the ootheca. **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, **4** (3): 195-205.



- BECKER, M. & F.A. FRIEIRO-COSTA. 1988. Natalty and mortality in the egg stage in *Gratiana spadicea* (Klug, 1829) (Coleoptera, Chrysomelidae), a monophagous Cassidinae beetle of an early successional Solanaceae. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, **48** (3): 467-475.
- BECKER, M. & H.P. ROMANOWSKI. 1986. The female internal reproductive organs of *Gratiana spadicea* (Klug, 1829) (Col.: Chrysomelidae: Cassidinae): morphology and histology. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, **46** (1): 149-157.
- BERNAYS, E.A. 1998. Evolution of feeding behavior in insects herbivores. **BioScience**, Washington, **48** (1): 35-44.
- BERNAYS, E.A. 2001. Neural limitations in phytophagous insects: implications for diet breadth and evolution of host affiliation. **Annual Review of Entomology**, Stanford, **46**: 703-727.
- BERNAYS, E.A. & M. GRAHAM. 1988. On the evolution of host specificity in phytophagous arthropods. **Ecology**, Tempe, **69** (4): 886-892.
- BERNAYS, E.A. & R.F. CHAPMAN. 1994. **Host-plant selection by phytophagous insects**. New York, Chapman & Hall, 312p.
- BERNAYS, E.A.; M.S. SINGER & D. RODRIGUES. 2004a. Trenching behavior by caterpillars of the *Euphorbia* specialist, *Pygarctia roseicapitis*: a field study. **Journal of Insect Behavior**, New York, **17** (1): 41-52.
- BERNAYS, E.A.; M.S. SINGER & D. RODRIGUES. 2004b. Foraging in nature: foraging efficiency and attentiveness in caterpillars with different diet breadths. **Ecological Entomology**, London, **29** (4): 389-397.
- BERRIDGE, M.J. 1970. A structural analysis of intestinal absorption. *In*: **Symposium of Royal Entomology Society of London**, 5, London, p. 135-150

- BOROWIEC, L. 1999. **A world catalogue of the Cassidinae (Coleoptera: Chrysomelidae)**. Wrocław, Biologica Silesiae, 476p.
- BROWNE, L.B. 1995. Ontogenetic changes in feeding behavior, p. 307-342. *In*: R.F. CHAPMAN & G. DE BOER (Eds.). **Regulatory mechanisms in insect feeding**. New York, Chapman & Hall, 398p.
- CHAPMAN, R.F. 1982. **The insects: structure and function**. Cambridge, Harvard University Press, 919p.
- CHAPMAN R.F. 1995. Mechanics of food handling by chewing insects, p. 3-31. *In*: R.F. CHAPMAN & G. DE BOER (Eds.). **Regulatory mechanisms in insect feeding**. New York, Chapman & Hall, 398p.
- CLARKE, A.R. & M.P. ZALUCKI. 2000. Foraging and vein-cutting behavior of *Euploea core corinna* (W. S. Macleay) (Lepidoptera: Nymphalidae) caterpillars feeding on latex-bearing leaves. **Australian Journal of Entomology**, Victoria, **39**: 283-290.
- COSA, M.T; M. HADID; N. DOTTORI & G. BRUNO. 2002. Anatomía de órganos vegetativos en *Solanum palinacanthum*, *S. sisymbriifolium* y *S. euacanthum* (Solanaceae). **Anales Del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Série Botânica**, Mexico, **73** (1): 27-38.
- CROWSON, R.A. 1981. **The biology of Coleoptera**. London, Academic Press, 802p.
- DUFFEY, S.S. 1986. Plant glandular trichomes: their partial role in defense against insects, p. 151-172. *In*: B. JUNIPER & T.R.E. SOUTHWOOD (Eds.). **Insects and the plant surface**. London, Edward Arnold Publishers, 360p.
- EISNER, T. & M. EISNER. 2000. Defensive use of a fecal thatch by a beetle larva (*Hemisphaerota cyanea*). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, **97** (6): 2632-2636.

- FERNANDES, G.W. 1994. Plant mechanical defenses against insect herbivory. **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, **38**(2): 421-433.
- FEUCHT, W.; P.P.S. SCHMIDT & E. CHRIST. 1986. Distribution of flavanols in meristematic and mature tissues of *Prunus avium* shoots. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, **125**: 1-8.
- FURR, M. & P.G. MAHLBERG. 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. **Journal of Natural Products**, Columbus, **44** (2): 153-159.
- FUTUYMA, D. J. & G. MORENO. 1988. The evolution of ecological specialization. **Annual review of ecology and systematics**, Palo Alto, **19**: 207-233.
- GAHAN, P.B. 1984. **Plant histochemistry and citochemistry**. London, Academic Press, 301p.
- GILBERT, L. 1971. Butterfly-plant coevolution: has *Passiflora adenopoda* won the selectional race with Heliconiine butterflies? **Science**, Washington, **172** (1): 585-586.
- GROTH, D. 1989. Caracterização morfológica das sementes e plântulas de seis espécies invasoras do gênero *Solanum* L. **Acta Botânica Brasilica**, Porto Alegre, **3** (1): 25-41.
- HARBORNE, J. B. 1986. Systematic significance of variations in defense chemistry in the Solanaceae, p. 328-343. *In*: W.G. DÀRCY (Ed.). **Solanaceae: biology and systematics**. New York, Columbia University Press. 603p.
- HILL, M.P. & P.E. HULLEY. 1995. Biology and host range of *Gratiana spadicea* (Klug, 1829) (Coleoptera, Chrysomelidae, Cassidinae), a potential biological control agent for the weed *Solanum sisymbriifolium* Lamarck (Solanaceae) in South Africa. **Biological Control**, Orlando, **5** (3): 345-352.

- HILL, M.P.; P.E. HULLEY; J. ALLSOPP & G. van HARMELEN. 1997. Glandular trichomes on the exotic *Solanum sisymbriifolium* Lamarck (Solanaceae): effective deterrents against an indigenous South African herbivore. **African Entomology**, Pretoria, **5** (1): 41-50.
- HOCHULI, D. 1996. The ecology of plant/insect interactions: implications of digestive strategy for feeding by phytophagous insects. **Oikos**, Copenhagen, **75**(1): 133-141.
- HOCHULI, D. 2001. Insect herbivory and ontogeny: How do growth and development influence feeding behavior, morphology and host use? **Austral Ecology**, Carlton, **26**: 563-570.
- HSIAO, T.H. 1986. Specificity of certain chrysomelid beetles for Solanaceae, p. 346-363. *In*: W.G. DÀRCY (Ed.). **Solanaceae: biology and systematics**. New York, Columbia University Press. 603p.
- JEFREE, C.E. 1986. The cuticle, epicuticular waxes and trichomes of plants, with reference to their structure, functions and evolution, p. 23-64. *In*: B. JUNIPER & R. SOUTHWOOD (Eds.). **Insects and the plant surface**. London, Edward Arnold, 360p.
- JENSEN, W.A. 1962. **Botanical histochemistry**. San Francisco, Freeman, 408 p.
- JOHANSEN, D.A. 1940. **Plant microtechnique**. New York, London: MacGraw-Hill Book Co., 523p.
- JOHNSON, H.B. 1975. Plant pubescence: an ecological perspective. **The Botanical Review**, Riverside, **41** (3): 233-258.
- JOLIVET, P. 1988. Food habits and food selection of Chrysomelidae. Bionomic and evolutionary perspectives, p. 1-24. *In*: P. JOLIVET, E. PETITPIERRE & T.H. HSIAO (Eds.). **Biology of Chrysomelidae**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 615p.

- KERPEL, S. 2004. **Influência do conteúdo nutricional de *Passiflora suberosa* e *Passiflora misera* na performance, nutrição, digestão e comportamento de escolha de *Heliconius erato phyllis***. Porto Alegre, Tese de Doutorado, Ecologia, UFRGS, 158p.
- KVASINA, M.L. & R. PONCE-DE-LEÓN. 1985. Nuevos aportes a la biología de *Gratiana spadicea* (Klug, 1829) (Coleoptera, Chrysomelidae) y su relación com la planta huésped *Solanum sisymbriifolium* Lamarck, 1797 (Solanaceae). **Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay**, Montevideo, **3**: 9-15.
- LEHANE, M.J. 1997. Peritrophic Matriz Structure and Function. **Annual Review of Entomology**, Stanford, **42**: 525-550.
- LEVIN, D.A. 1973. The role of trichomes in plant defense. **The Quarterly Review of Biology**, New York, **48** (1): 3-15.
- MARTIN, M.M. 1991. The evolution of cellulose digestion in insects. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B**, London, **333**: 281-288.
- MEDEIROS, L.; D.S. BOLIGON & G.R.P. MOREIRA. 2004. Morphological and behavioral adaptations to movement on different leaf surfaces: Studies with Cassidinae larvae, p. 291-303. *In*: P. JOLIVET, J.A. SANTIAGO-BLAY & M. SCHMITT (Eds.). **New developments in the biology of Chrysomelidae**. Dordrecht, SPB Academic Publishing, 804p.
- MEDEIROS, L. & G.R.P. MOREIRA. 2002. Moving on hairy surfaces: modifications of *Gratiana spadicea* larval legs to attach on its host plant *Solanum sisymbriifolium*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, **102** (3): 295-305.
- MEDEIROS, L. & G.R.P. MOREIRA. 2003. Leaf selection and daily variation on feeding and oviposition of *Gratiana spadicea* (Klug) (Coleoptera, Chrysomelidae, Cassidinae). **Revista Brasileira de Zoociências**, Juiz de Fora, **5** (2): 153-160.

- MEDEIROS, L. & G.R.P. MOREIRA. 2005. Larval feeding behavior of *Gratiana spadicea* (Klug) (Coleoptera, Chrysomelidae, Cassidinae) on its host plant, *Solanum sisymbriifolium* Lamarck (Solanaceae): interaction with trichomes. **The Coleopterist's Bulletin**, Washington, **59** (2): 339-350.
- MEDEIROS, L.; D.N. FERRO & A. MAFRA-NETO. 1996. Association of chrysomelid beetles with solanaceous plants in the south of Brazil, p. 339-363. *In*. P.H.A. JOLIVET, & M.L. COX (Eds.). **Chrysomelidae biology, vol. 2: ecological studies**. Dordrecht, SPB Academic Publishing, 462p.
- MENTZ, L.A. & P.L. OLIVEIRA. 2004. ***Solanum* (Solanaceae) na região sul do Brasil**. Pesquisas / Instituto Anchietano de Pesquisas. São Leopoldo, Unisinos, 327p.
- MENTZ, L.A., P.L. OLIVEIRA & M.V. SILVA. 2000. Tipologia dos tricomas das espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae) na Região Sul do Brasil. **Iheringia**, Série Botânica, Porto Alegre, **54**: 75-106.
- OLCKERS, T., J.C. MEDAL & D.E. GANDOLFO. 2002. Insects herbivores associated with species of *Solanum* (Solanaceae) in Northeastern Argentina and Southeastern Paraguay, with reference to biological control of weeds in South Africa and the United States of America. **Florida Entomologist**, Gainesville, **85** (1): 254-260.
- PEARSE, A.G.E. 1968. **Histochemistry theoretical and applied**. London, J. & A. Churchill Ltd., 759p.
- RODRIGUES, D.; L.S. DUARTE & G.R.P. MOREIRA. (2007). Performance consequences of food mixing in two passion vine leaf-footed bugs, *Holymeria clavigera* and *Anisoscelis foliacea marginella* (Hemiptera: Coreidae). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, **61**: 631-637.

- SCHILLINGER, J.A. & R.L. GALLUN. 1968. Leaf pubescence of wheat as a deterrent to the cereal leaf beetle, *Oulema melanopus*. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, **61** (4): 900-903.
- SCRIBER, J.M. 1982. The behavior and nutritional physiology of southern armyworm larvae as a function of plant species consumed in earlier instars. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, **31**: 359-369.
- SEIGLER, D. & P.W. PRICE. 1976. Secondary compounds in plants: primary functions. **The American Naturalist**, Chicago, **110**: 101-105.
- SILVA, N.F. 1999. Estudos dos órgãos transmissores de simbioses associados aos órgãos de reprodução e dos órgãos que abrigam simbioses associados ao tubo digestivo em Cassidinae e Eumolpinae (Insecta: Coleoptera: Chrysomelidae). Porto Alegre, Dissertação de Mestrado, Biologia Animal, UFRGS, 67p.
- SIMPSON, S.J. 1995. Regulation of a meal: chewing insects, p. 137-156. *In*: R.F. CHAPMAN & G. DE BOER (Eds.). **Regulatory mechanisms in insect feeding**. New York, Chapman & Hall, 398p.
- SLANSKY, F.Jr. 1993. Nutritional ecology: the fundamental quest for nutrients. *In*: N.E. STAMP & T. CASEY (Eds.). **Caterpillars: ecological and evolutionary constraints on foraging**. New York, Chapman & Hall, 587p.
- SMITH, S.G.F. & G.L. KREITNER. 1983. Trichomes in *Artemisia ludoviciana* Nutt. (Asteraceae) and their ingestion by *Hypochlora alba* (Dodge) (Orthoptera: Acrididae). **The American Midland Naturalist**, Notre Dame, **110** (1): 118-123.
- SNODGRASS, R.E. 1935. **Principles of insect morphology**. New York, McGraw Hill, 667p.

- SOUTHWOOD, R. 1986. Plant surfaces and insects – an overview, p. 1-23. *In*: B. JUNIPER & R. SOUTHWOOD (Eds.). **Insects and the plant surface**. London, Edward Arnold, 360p.
- TAIZ, L. & E. ZEIGER. 2004. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre, Artmed, 719p.
- TERRA, W.R. 1990. Evolution of digestive systems of insects. **Annual Review of Entomology**, Stanford, **35**: 181-200.
- WAGNER H.; S. BLADT & E.M. ZGAINSKI. 1984. **Plant drug analysis**. Berlin, Springer-Verlag, 167p.
- WEISS, M.R. 2006. Defecation behavior and ecology of insects. **Annual Review of Entomology**, Stanford, **51**: 635-661.
- WELLSO, S.G. 1973. Cereal leaf beetle larval feeding, orientation, development and survival on four small-grain cultivars in the laboratory. **Annals of Entomological Society of America**, College Park, **66**: 1201-1208.
- WOODMAN, R.L. & G.W. FERNANDES. 1991. Differential mechanical defense: herbivory, evapotranspiration, and leaf-hairs. **Oikos**, Copenhagen, **60**: 11-19.
- YAHIRO, K. 1990. A comparative morphology of the alimentary canal in the adults of ground-beetles (Coleoptera) I. Classification into the types. **Esakia**, Fukuoka, **1**:35-44.
- ZVEREVA, E.L.; M. KOZLOV & V.E. NIEMELÄ PEKKA. 1998. Effects of leaf pubescence in *Salix borealis* on host-plant choice and feeding behavior of the leaf beetle, *Melasoma lapponica*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, **89** (3): 297-303.