



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

INFLUÊNCIA DO TAMANHO DA SEMENTE E DA ONTOGENIA NA RESISTÊNCIA  
À HERBIVORIA EM PLANTAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA*  
(ARAUCARIACEAE)

Fernanda Alabarce

Orientadora: Lúcia Rebello Dillenburg

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da UFRGS, como um requisito para obtenção do título de Mestre em Botânica.

Porto Alegre, março de 2012



*"Emancipate yourselves from mental slavery  
None but ourselves can free our mind"*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Lúcia Dillenborg, pela confiança e oportunidade.

À minha família, por todo apoio sempre. Em especial ao meu pai, Vitor Hugo (*in memoriam*), por inúmeros motivos e à minha mãe pela paciência nos momentos de tensão! Aos meus irmãos Diego e Rodrigo.

Aos colegas do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal, especialmente à Tatiana Lowe, Francine Cassana, Carla Korndorfer e Carolina Schlindwein, pela amizade e suporte nos trabalhos.

Ao Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia da Faculdade de Agronomia da UFRGS, por ceder um espaço na casa de vegetação, onde metade deste trabalho foi conduzido.

Ao pessoal do Laboratório de Fisiologia Vegetal, Prof. Arthur Fett-Neto, Hélio Nitta e Carolina Rueddel pelo suporte nas análises químicas.

Aos eternos amigos da bio que me deram apoio moral durante esse tempo, como sempre (especialmente à Juliana Gonçalves, Luciane Coletti e Claudete Pacheco).

Aos amigos que fiz ao longo do curso e aos que me acompanham desde a graduação até aqui, por partilharem dessa experiência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo bom convívio, envolvendo os profissionais, alunos e logística, que propiciou um ambiente favorável para a formulação do trabalho.

Aos professores João Ito Bergonci, Leandro da Silva Duarte e Luis Mauro Gonçalves Rosa por aceitarem fazer parte da banca examinadora.

Ao CNPq pela bolsa.

## SUMÁRIO

Resumo.....	4
Introdução geral.....	5
Bibliografia.....	9
<b>Artigo 1</b> – Influência do tamanho da semente na tolerância à herbivoria em plântulas de <i>Araucaria angustifolia</i> .....	11
Resumo.....	12
Abstract.....	14
Introdução.....	15
Materiais e métodos.....	18
Resultados.....	21
Discussão.....	26
Referências.....	30
<b>Artigo 2</b> – Influência da ontogenia na resistência à herbivoria em plantas de <i>A.</i> <i>angustifolia</i> .....	34
Resumo.....	35
Abstract.....	37
Introdução.....	38
Materiais e métodos.....	41
Resultados.....	44
Discussão.....	50
Literatura citada.....	54
Considerações finais.....	58
Bibliografia.....	60

## RESUMO

A dissertação versa sobre a compreensão das estratégias de resistência à herbivoria apresentadas pela conífera *Araucaria angustifolia* bem como a relação entre essas estratégias e a fisiologia da espécie. O trabalho está dividido em duas abordagens: a primeira trata da influência do tamanho da semente sobre a tolerância da espécie a um ataque de herbivoria. Na segunda abordagem, a ontogenia das plantas é avaliada em relação às diferentes estratégias de resistência. O estudo foi realizado em dois locais diferentes (em casa de vegetação na Faculdade de Agronomia e em jardins experimentais no Instituto de Biociências, ambos na UFRGS), porém com pinhões de mesma procedência (FLONA de São Francisco de Paula, RS, Brasil). Quarenta e oito plantas foram utilizadas para cada experimento. No primeiro, foram aplicados os tratamentos GC (planta de semente grande, controle), GD (planta de semente grande, danificada), PC (planta de semente pequena, controle) e PD (planta de semente pequena, danificada). No segundo, foram aplicados os tratamentos PC (plântula controle), PD (plântula danificada), JC (juvenil controle) e JD (juvenil danificada). Para os dois experimentos foram medidos e quantificados, após a aplicação do dano, parâmetros relacionados à resistência da planta. As análises de variância detectaram diferenças significativas entre os diferentes tamanhos de sementes e os diferentes estágios da planta. Plântulas oriundas de diferentes tamanhos de sementes possuem capacidade de compensar completamente um tecido perdido. No entanto, plântulas de sementes maiores são mais tolerantes do que as de sementes pequenas. Enquanto a estratégia de resistência de plântulas se dá pela tolerância à herbivoria, as plantas juvenis apresentam uma estratégia de resistência através da produção de compostos do metabolismo secundário, os flavonóides. Assim, observa-se que existe um *trade-off* entre tolerância e defesa ao longo do desenvolvimento desta espécie. Conclui-se que a resistência de *A. angustifolia* à herbivoria depende da disponibilidade de recursos e que esta varia de acordo com o tamanho da semente e com a prioridade da planta ao longo de seu ciclo de vida.

## INTRODUÇÃO GERAL

A herbivoria tem sido caracterizada como uma interação biótica que normalmente gera impactos negativos na aptidão das plantas (Crawley, 1997). Sementes e plântulas são particularmente vulneráveis ao ataque herbívoro e estas geralmente morrem, especialmente quando atacadas por herbívoros mamíferos (Dirzo *et al.*, 2007). Esses impactos negativos representam uma força seletiva importante, que favorece a evolução de mecanismos de resistência, que permitem às plantas lidar com seus consumidores. A resistência tem sido classificada principalmente em: (1) mecanismos de defesa química, que evitam o ataque pelo herbívoro (ex.: produção de metabólitos secundários deterrentes); (2) mecanismos de tolerância, que reduzem o impacto do dano pelo herbívoro quando ele ocorre (ex.: compensação do tecido perdido); e (3) estratégias de escape, que reduzem a probabilidade da planta ser atacada (ex.: tamanho da planta, espessura da folha, valor nutritivo da folha) (Dirzo, 1984; Crawley, 1997). No entanto, a expressão desta resistência implica em custos que são impostos a outros processos fisiológicos e bioquímicos (Strauss *et al.*, 2002). A construção de defesa química, por exemplo, pode exigir a alocação de reservas nutritivas valiosas, de modo que as plantas mais resistentes crescem mais lentamente, produzem menos descendentes e são competidores fracos contra plantas vizinhas (Herms e Mattson, 1992; Agrawal *et al.*, 1999). Assim, os mecanismos de resistência variam de acordo com a disponibilidade de recursos, que, por sua vez, podem variar de acordo com fatores como a ontogenia e o tamanho da semente da planta. Quando esta disponibilidade de recursos é apenas satisfatória, o carbono é alocado à divisão rápida de meristemas às custas do metabolismo secundário e vice-versa.

*Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze (pinheiro brasileiro) é uma gimnosperma nativa do Brasil. Ela forma agrupamentos densos que abrangem os estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, ocorrendo ainda como ilhas esparsas no sul do Estado de São

Paulo e na Serra da Mantiqueira, internando-se até o sul de Minas Gerais e Rio de Janeiro (Reitz e Klein, 1996). Ocorre também em pequenas manchas na Argentina e no Paraguai (Carvalho, 1994). Trata-se de uma espécie longeva e de grande porte, podendo atingir de 10 a 35 m de altura e 0,5 a 1,2 m de diâmetro à altura do peito (DAP). O fuste apresenta-se ereto, cônico e quase cilíndrico em formações campestres, com ramificações pseudo-verticilares com aspecto de candelabro nos indivíduos mais velhos (Carvalho, 1994). A espécie é uma conífera dióica, apresentando um estróbilo masculino, de formato cilíndrico, ou um estróbilo feminino (pinha), de formato esférico. A pinha carrega o pinhão (semente do pinheiro brasileiro) e este possui 5,1% de conteúdo protéico e 54,7% de amido (Solórzano-Filho, 2001). A dispersão dos pinhões é predominantemente autocórica (Carvalho, 1994), resultando em pinhões caídos ao redor da planta mãe, sujeitando-os a fatores ligados à densidade (predação e competição). Porém, também ocorre a dispersão zoocórica dos pinhões, através da gralha-azul (*Cyanocorax caeruleus*) e da cutia (*Dasyprocta azarae*). Esta fauna estoca o alimento para posterior consumo ou apenas transportam-nos para o consumo em locais mais seguros. Entre as espécies somente predadoras, que consomem todo o megagametófito, inviabilizando a germinação, estão os cervídeos do gênero *Mazama* (*Mazama gouazoupira* e *Mazama americana*) e o bugio (*Alouatta fusca*). Com relação ao papagaio charão (*Amazona petrei*), este tem o pinhão como principal recurso alimentar no inverno (Kindel, 1996). O pico de produção de pinhões ocorre entre os meses de maio e agosto no Rio Grande do Sul, época esta em que existem poucas angiospermas frutificando, o que torna a *A. angustifolia* importante fonte de recursos para pequenos animais.

O pinheiro brasileiro domina a formação conhecida como Floresta Ombrófila Mista (FOM), principal formação florestal do Planalto Sul-brasileiro. A exploração devido aos diversos tipos de utilização da madeira de *A. angustifolia* e a expansão agrícola levaram esse ecossistema ao estado de conservação de nível crítico (Biodiversity Support Program, 1995) e fez com que o pinheiro brasileiro constasse na “Red List” da IUCN (International Union of Conservation of

Nature) na categoria criticamente ameaçada. A redução da área original da FOM gerou populações isoladas, com baixa variabilidade genética e extremamente vulneráveis sob a ótica da conservação (Steffenon *et al.*, 2004). Desse modo, o desenvolvimento de técnicas e práticas apropriadas para a conservação de um ecossistema requer informações sobre a ecologia e fisiologia das espécies florestais no sentido de auxiliar e promover a regeneração natural das mesmas. Assim, a *A. angustifolia*, espécie chave da FOM, deve ser priorizada nessas iniciativas.

A FOM está circunscrita a uma região de campos naturais (Castella e Britez, 2004), onde foram observados indivíduos adultos portando mais de um caule principal (Mattos, 1994). Esta capacidade de rebrote nas coníferas está relacionada à presença dos meristemas presentes nas axilas foliares em diversas espécies, como no gênero *Araucaria*, incluindo *A. angustifolia* (Burrows, 1987). Embora se saiba que existem ataques de pequenos mamíferos roedores no interior da floresta, estes se restringem aos pinhões das araucárias, e não há relatos de ataques destes herbívoros à parte aérea do pinheiro brasileiro. Já em áreas de campo, Zandavalli (2006) observou plântulas apresentando numerosos rebrotes, derivados dos intensos ataques de formigas das espécies *Acromyrmex crassispinus* e *Atta* sp. As formigas cortadeiras do gênero *Atta* são uns dos herbívoros mais dominantes da região neotropical, tanto numericamente quanto em consumo de biomassa total (Wirth *et al.*, 2003). Existem alguns estudos sobre a resistência de plantas contra formigas cortadeiras (Howard, 1988; Hubbel *et al.*, 1984) e observações de rebrote de plantas após desfolhação. No entanto, a maioria dos trabalhos utiliza uma metodologia que envolve a simulação de herbivoria, o que poderia gerar resultados diferentes de uma herbivoria real. A desfolhação artificial, no entanto, pode representar a única alternativa viável para impor níveis controlados de dano e estudar respostas compensatórias em plantas lenhosas (Boege, 2005).

Sabe-se que as interações entre as plantas e seus predadores têm profundas implicações, tanto para a ecologia quanto para os processos evolutivos dos mesmos (Basset, 1994). Este autor



considera as interações planta-herbívoro bastante interessantes, particularmente nos trópicos, onde uma forte seleção, em plantas e herbívoros, tem promovido maiores níveis de herbivoria e de investimento para a resistência, comparado a ambientes temperados. Considerando-se que a colonização de *A. angustifolia* ocorre em ambientes onde as plantas são mais suscetíveis a danos por herbivoria, um importante aspecto a ser considerado é quais os fatores afetam a resistência da mesma a estes danos.

Este trabalho é uma investigação sobre os aspectos fisiológicos que afetam os mecanismos de resistência à herbivoria apresentados por plantas de *A. angustifolia*. Especificamente, buscou-se observar se o tamanho das sementes influencia na capacidade de tolerância das plântulas que delas se originam e se a ontogenia da planta influencia a resistência da mesma a um dano severo na parte aérea. Assim, este estudo está dividido em dois artigos: os artigos 1 e 2 tratam da influência do tamanho da semente e da ontogenia na resistência à herbivoria, respectivamente. Especificamente foram testadas as hipóteses de que plantas oriundas de sementes maiores devem apresentar maior tolerância ao dano do que plantas oriundas de sementes menores e que deve haver um *trade-off* entre tolerância e defesa ao longo da ontogenia da planta. Assim, as plântulas devem ser mais tolerantes e as juvenis mais aptas a se defender através de compostos do metabolismo secundário.

## BIBLIOGRAFIA

- Agrawal, A.A., Karban, R. (1999) Why induced defenses may be favored over constitutive strategies in plants. In: *The Ecology and Evolution of Inducible Defenses*, eds. R. Tollrian, C.D. Harvell, pp. 45–61. Princeton: Princeton University Press.
- Basset, Y. (1994) Palatability of tree foliage to chewing insects: a comparison between a temperate and tropical site. *Acta Oecologica* **15**:181-191.
- Boege, K. (2005) Influence of plant ontogeny on compensation to leaf damage. *American Journal of Botany* **92**: 1632-1640.
- Burrowz, G.E. (1987) Leaf axil anatomy in the Araucariaceae. *Australian Journal of Botany* **35**: 631-640.
- Carvalho, P.E.R. (1994) Espécies Florestais Brasileiras : recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo: Embrapa. 640 p.
- Castella, P.R., Britez, R.M. (2004) A floresta com araucária no Paraná: conservação e diagnóstico dos remanescentes florestais. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 233 p.
- Crawley, M.J. (1997) Plant-herbivore dynamics. In: Crawley M.J. (ed.), *Plant Ecology*. Blackwell, pp. 401–474.
- Dirzo, R., (1984) Herbivory: a phytocentric overview. In: Dirzo, R., Sarukhan, J. (Eds.), *Perspectives on Plant Population Ecology*. Sinauer, Sunderland, MA, pp. 141–165.
- Dirzo, R., Mendonza, E., Ortis, P. (2007) Size-Related Differential Seed Predation in a Heavily Defaunated Neotropical Rain Forest. *Biotropica* **39**: 355- 362.
- Howard, J.J. (1988) Leafcutting ant diet selection—relative influence of leaf chemistry and physical features. *Ecology* **69**:250–260
- Harms, D.A., Mattson, W.J. (1992) The dilemma of plants: to grow or defend. *Quarterly Review of Biology* **67**: 283-335.

- Hubbell, S.P., Howard, J.J., Wiemer, D.F. (1984) Chemical leaf repellency to an Attine ant—seasonal distribution among potential host plant-species. *Ecology* **65**:1067–1076
- Kindel, E.A.I. (1996) Padrões de dispersão e disposição espacial de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze e suas relações com aves e mamíferos na estação ecológica de Aracuri, Esmeralda, RS. Programa de Pós graduação em Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Dissertação de Mestrado, 66p.
- Mattos, J.R. (1994) O pinheiro brasileiro. 2a. ed. Lages: Artes Gráficas Princesa. 225 p.
- Reitz, P.R., Klein, R.M. (1996) Araucariáceas. *Flora Ilustrada Catarinense*, 62p.
- Solórzano Filho, J.A. (2001) Demografia, fenologia e ecologia da dispersão de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) Ktze. (Araucariaceae), numa população relictual em Campos do Jordão, SP. São Paulo. 154 f. Dissertação, Universidade de São Paulo.
- Stefenon, V.M; Nodari, R.O., Guerra, M.P. (2004) Genética e conservação de *Araucaria angustifolia*: III. Protocolo de extração de DNA e capacidade informativa de marcadores RAPD para análise da diversidade genética em populações naturais. *Biotemas* **17**: 47–63.
- Strauss, S.Y., Rudgers, J.A., Lau, J.A., Irwin, R.E. (2002) Direct and ecological costs of resistance to herbivory. *Trends in Ecology and Evolution* **17**:278–285.
- Wirth, R., Herz, H., Ryel, R.J., Beyschlag, W., Holldobler, B. (2003) Herbivory of leaf-cutting ants: a case study on *Atta colombica* I the Tropical Rainforest of Panama. Springer, Berlin.
- Zandavalli, R.B. (2006) Importância da competição durante o estabelecimento e crescimento inicial da *Araucaria angustifolia*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Tese de doutorado. 167p.

ARTIGO 1:

Influência do tamanho da semente na tolerância à herbivoria em plântulas de *Araucaria angustifolia*

Este trabalho será submetido ao periódico: **Trees – Structure and Function**

**Influência do tamanho da semente na tolerância à herbivoria em plântulas de *Araucaria angustifolia***

**Fernanda Alabarce\***  
**Lúcia Rebello Dillenburg\***

RESUMO

O principal objetivo deste estudo foi investigar a tolerância à herbivoria de plântulas de *Araucaria angustifolia* oriundas de sementes grandes e pequenas. Cinquenta dias após a germinação, as plântulas foram separadas em quatro grupos, referentes às quatro combinações possíveis entre plântulas oriundas de sementes pequenas (P) e grandes (G) e plântulas controle (C) e danificadas (D). Sessenta dias após o dano, os seguintes parâmetros indicativos de tolerância foram analisados nas plântulas GD e PD: compensação, incremento em comprimento e em massa de parte aérea e massa total da plântula. O conteúdo de amido na semente e em diferentes órgãos das plântulas foi também mensurado nesta ocasião nos quatro grupos de plantas. Quando danificadas, plântulas de sementes grandes apresentaram maior compensação, incremento em comprimento e em massa de parte aérea e massa total da plântula do que as plântulas de sementes pequenas. O dano gerou maior mobilização do amido contido nas sementes e resultou em quantidades muito maiores de amido nas raízes e no hipocótilo subterrâneo. Plântulas oriundas de sementes grandes se mostraram mais tolerantes ao dano por herbivoria, mostrando melhor aptidão para se restabelecer após uma perturbação pela substituição do tecido perdido do que plântulas oriundas de sementes menores. É possível que a alocação de recursos para órgãos subterrâneos seja uma estratégia fundamental de sobrevivência desta espécie em seu estabelecimento inicial.

Palavras-chave: Tolerância, tamanho de semente, herbivoria, alocação de recursos, Pinheiro brasileiro.

\* PPG – Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500,  
CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: fernanda\_alabarce@yahoo.com.br;  
[lucia.dillenburg@ufrgs.br](mailto:lucia.dillenburg@ufrgs.br)

## Abstract

### **The role of seed size on tolerance to herbivory in seedlings of *Araucaria angustifolia***

The major objective of this study was to investigate the vulnerability and tolerance to herbivory of *Araucaria angustifolia* seedlings grown from large and small seeds. Fifty days after germination seedlings were separated into 4 groups, comprising the four possible combinations between seedlings from large (L) and small (S) seeds and control (C) and damaged (D) seedlings. Sixty days later, the following tolerance parameters were measured in the LD and SD plants: compensation, shoot length and shoot mass increment and total mass. Starch content in the seeds and in different plant organs was also measured in this occasion in the four plant groups. When damaged, seedlings from large seeds had greater compensation ability, shoot length and shoot mass increment, and total seedling mass than seedlings from small seeds. Damage caused a greater mobilization of the seed starch, and also led to a much greater amount of starch in the roots and underground hypocotyl. Seedlings from larger seeds were more tolerant to herbivory damage showing a greater ability to get reestablished after a disturbance by replacing lost tissue than seedling from smaller seeds. Resource allocation to the underground parts is likely to be a key survival strategy in this species in its very initial growth.

**Key words:** Tolerance · seed size · herbivory · resource allocation · Brazilian pine.

## **Introdução**

Pequenas quantidades de herbivoria foliar podem gerar grandes efeitos prejudiciais no crescimento da planta, na sua sobrevivência e nas interações competitivas (Hendrix 1988; Marquis 1992). Plântulas são particularmente suscetíveis à herbivoria, da mesma forma que folhas em expansão em indivíduos maduros, porque órgãos em fase de expansão tendem a ter menor resistência mecânica e maior valor nutritivo (Coley e Kursar 1996). Assim, o sucesso no estabelecimento de plântulas em condições de alta incidência de herbivoria depende da capacidade das mesmas em possuir mecanismos de defesa e em tolerar os danos causados pela ação dos herbívoros (Hanley 1998; Weltzin et al. 1998). A capacidade que as plantas possuem em resistir à herbivoria sem reduzir a aptidão da mesma tem implicações importantes para a ecologia e evolução das interações planta-herbívoro.

A tolerância à herbivoria pode ser definida como a capacidade que as plantas possuem em manter sua aptidão de crescimento e reprodução após sofrerem um dano por herbivoria, ou seja, é representada pela diferença entre crescimento e/ou reprodução de plantas danificadas e plantas não danificadas (Strauss e Agrawal 1999). Tolerância também está associada com compensação, sendo esta a reposição da biomassa perdida por herbivoria (McNaughton 1983). Para tanto, ocorre um aumento na mobilização dos recursos estocados de órgãos de armazenamento para outros órgãos (por exemplo, de raízes para folhas novas). A desfolhação é bem conhecida por resultar na mobilização de amido para o abastecimento de um novo crescimento da planta (Kosola et al. 2001), e a presença de reservas estocadas é um fator importante para a determinação da sobrevivência pós-desfolhação.

O dano causado pela herbivoria em plântulas pode variar desde a remoção de uma pequena porção do tecido fotossintético da plântula até a completa remoção da parte aérea, resultando em incapacidade fotossintética e, neste último caso, plântulas que se recuperam construindo novos



ramos (rebrote) têm vantagem sobre as demais (Green e Juniper 2004). As respostas ao dano por herbivoria em plântulas são influenciadas por fatores extrínsecos, como disponibilidade de nutrientes (Chapin e McNaughton 1989) e de luz (Anten e Ackerly 2001), mas também por atributos intrínsecos, como a quantidade de reservas das sementes. A sobrevivência e crescimento inicial das plântulas são fortemente influenciados pela disponibilidade de reservas das sementes (Westoby et al. 2002; Poorter e Rose 2005). Alguns estudos têm documentado que plântulas de sementes grandes podem rebrotar e tolerar a desfolhação melhor que plântulas de sementes pequenas. Leishman e Murray (2001) explicam que plântulas de sementes maiores têm melhor desempenho porque elas têm mais reservas disponíveis durante um tempo de déficit de carbono para um sustento temporário das mesmas, enquanto substituem o tecido fotossintético perdido pela herbivoria. Desta forma a quantidade de reservas estocadas na semente e no próprio corpo da plântula pode ser determinante na tolerância ao dano causado pela herbivoria, principalmente em situações onde a perda de tecido fotossintético é elevada. Assim, uma alteração no padrão de alocação de reservas estocadas é esperada em resposta à herbivoria de plântulas.

*Araucaria agustifolia* (Bertol.) O. Kuntze (Araucariaceae), conhecida popularmente como pinheiro brasileiro ou simplesmente araucária, é uma gimnosperma de sementes grandes, com cerca de 5 a 8g de peso fresco (Tompset 1984). As duas áreas de reserva de alimento em sementes desta espécie são o embrião e o gametófito feminino (Panza et al. 2002), sendo que este último representa ~70% da massa fresca da semente (Mantovani et al. 2004), com o amido representando a reserva mais conspícua. No embrião estão presentes corpos lipídicos, grãos de amido e cristais globóides, constituídos principalmente de P, K e Mg, além de S, Ca e Fe (Panza et al. 2002). Trata-se de espécie chave da Floresta Ombrófila Mista (Pastore et al. 1986; Pereira e Ganade 2008), um tipo de floresta atlântica formada por mosaicos de floresta e campo. O período de produção de sementes varia de 3 a 6 meses (Mantovani et al. 2004), e o recrutamento

de novos indivíduos pode ocorrer no sub-bosque florestal, em bordas de mata e em formações campestres (Garbin et al. 2006).

Além da intensa predação dos pinhões (Iob e Vieira 2008), observa-se, em condições de campo, danos à parte aérea causadas por herbivoria e pela ação de patógenos. A tolerância do pinheiro brasileiro à herbivoria pode ser observada tanto em indivíduos maduros quanto em plântulas. Mattos (1994) observou, em áreas de campo, a presença de indivíduos adultos da espécie portando mais de um caule principal. No caso de plântulas, quando estas têm seu meristema apical removido por ação de herbivoria, mais de um broto emerge da base do caule (dados não publicados), e tal fato possivelmente resulta em plantas adultas multicaulinares. Segundo Burrows (1987), em contraste com a maioria das coníferas, meristemas persistentes estão presentes nas axilas foliares de diversas espécies do gênero *Araucaria*, incluindo *A. angustifolia*. Esses meristemas são capazes de se desenvolver em gemas, dando às coníferas capacidade de rebrotar após sofrer um dano (Burrows 1987; 1989; 2003). As grandes sementes desta espécie provavelmente desempenham importante papel na tolerância a condições adversas durante o seu estabelecimento, incluindo possíveis remoções de tecidos por herbivoria. Além disto, a transferência inicial das reservas da semente para o hipocótilo subterrâneo da espécie (Dillenburg et al. 2010) aumenta as chances de que estas reservas da semente possam vir a ser mobilizadas em períodos de danos ou de baixa disponibilidade de recursos.

O objetivo deste estudo foi investigar e comparar a tolerância de plântulas de *A. angustifolia* oriundas de diferentes tamanhos de sementes em resposta a um dano severo na parte aérea. Especificamente, foi analisada a tolerância da plântula ao dano a ela imposto (ou seja, compensação de tecido perdido) e a mobilização de amido na semente e nos diferentes órgãos das plantas. Neste sentido, foram formuladas as seguintes hipóteses: (1) plântulas originadas de sementes grandes apresentam maior tolerância do que plântulas originadas de sementes

pequenas; e (2) plântulas danificadas mobilizam o amido presente na semente e em órgãos subterrâneos de estocagem.

## **Materiais e métodos**

### Preparo das sementes e plantio

Os pinhões foram coletados na Floresta Nacional (FLONA) de São Francisco de Paula e classificados em dois grupos, com base na massa fresca, sendo estes: sementes pequenas (P) - pinhões de 5,0-6,5 g; e sementes grandes (G) – pinhões de 9,0-10,5 g. Depois de realizada a classificação dos pinhões, estes foram desinfetados com hipoclorito de sódio a 2% por 20 minutos. Para reduzir possíveis perdas de unidades amostrais, foram plantados nos recipientes de cultivo pinhões já pré-germinados. Como suporte e substrato para a germinação, foram utilizadas bandejas com vermiculita úmida.

Após a etapa de germinação, foi feito, em 28 de agosto de 2010, o transplante dos pinhões pré-germinados e a transferência destes para o Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia da Faculdade de Agronomia da UFRGS, localizada no município de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil (30°01'59" S e 51°13'48" W). Os pinhões germinados foram plantados em garrafas plásticas do tipo *PET*. O substrato utilizado foi areia de granulometria média sendo feita irrigação semanal de água. Após o transplante dos pinhões germinados, os vasos foram imediatamente dispostos em gaiolas com sombrite, onde a intensidade de radiação fotossinteticamente ativa teve uma média de  $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , com valores mínimos e máximos de 150 e 350, respectivamente.

### Delineamento experimental

Para avaliar os efeitos da remoção da parte aérea no crescimento subsequente de plântulas oriundas de diferentes tamanhos de sementes, plântulas de sementes grandes e de sementes pequenas de *A. angustifolia* foram decapitadas no dia 24 de setembro de 2010 (50 dias após a semeadura). A decapitação correspondeu à remoção de aproximadamente 80% da parte aérea e foi realizada com auxílio de uma tesoura (Figura 1). Estas plantas então foram comparadas com plântulas controle que não sofreram dano. O experimento incluiu 48 plantas, distribuídas em quatro tratamentos: plântulas controle oriundas de sementes grandes (GC); plântulas danificadas oriundas de sementes grandes (GD); plântulas controle oriundas de sementes pequenas (PC); e plântulas danificadas oriundas de sementes pequenas (PD). Cada tratamento foi representado por 12 plantas (unidades experimentais). Foram coletadas seis plantas de cada tratamento, no dia 0 (para mensurar a quantidade de tecido perdido) e 60 dias após o dano (para as análises de tolerância e mobilização de amido após o dano).

#### Avaliação da tolerância à herbivoria

A tolerância, que corresponde à compensação do tecido removido, foi medida no final do experimento, no dia 3 de dezembro de 2010. Para tanto foram medidas e coletadas as partes aéreas, raízes e hipocótilo das plantas dos tratamentos GC, GD, PC e PD ( $n = 6$  por tratamento). Essas partes foram secas em estufa a 60 °C durante uma semana e pesadas em balança analítica (Eletronic Balance FA2104N, Bioprecisa). A compensação foi calculada pela razão entre a massa de parte aérea de plantas danificadas e massa de parte aérea de plantas controle, sendo a compensação total equivalente a 1 (Strauss e Agrawal 1999). Também foram considerados dados relevantes para a tolerância e avaliados neste experimento o incremento em comprimento (a soma do comprimento de todos os rebrotes de cada plântula), o incremento em massa de parte aérea (soma da massa de todos os rebrotes emitidos por cada plântula) e a massa total da plântula

(soma das massas de raízes, hipocótilo e parte aérea). Todos estes parâmetros foram medidos 60 dias após o dano.

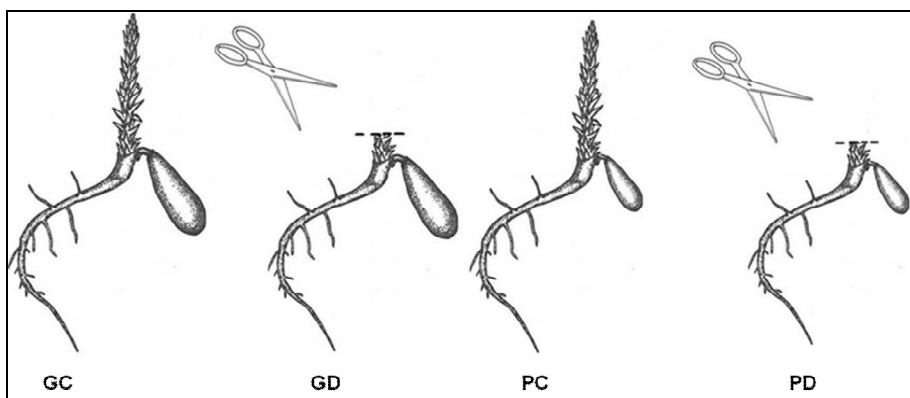
#### Mobilização de amido após o dano

Para testar se o dano infligido à parte aérea e o tamanho da semente influenciaram na mobilização de amido na planta, o conteúdo de amido foi calculado em indivíduos de cada tratamento (GC, GD, PC e PD). Para tanto, sessenta dias após a aplicação do dano, seis amostras de cada parte da planta (semente, hipocótilo e raiz principal) ( $n = 6$  por órgão por planta) foram coletadas e secas em estufa a 60 °C até atingir massa constante. Do material seco, foi feita a extração do amido, que se deu em ácido perclórico 52%, e as quantificações seguiram o método por reação com antrona (McCreedy et al. 1950). A mobilização de amido foi considerada como sendo a quebra do amido em açúcares simples (Boege 2005). Para verificar a porcentagem de mobilização de amido nas sementes, foi comparado seu conteúdo entre plantas controle e danificadas, segundo a equação:

$$[(\text{conteúdo de amido controle} - \text{conteúdo de amido dano})/\text{conteúdo de amido controle}] \times 100$$

#### Análises Estatísticas

A influência do tamanho da semente na tolerância ao dano foi verificada usando-se análise de variância (ANOVA) unifatorial. A influência do tamanho da semente e do dano na mobilização de amido foi analisada através de ANOVA bifatorial e, em caso de significância ( $\alpha = 0.05$ ), aplicou-se o Teste Tukey de separação de médias. Para todas as análises utilizou-se o pacote estatístico Statistix versão 8.0 (Analytical Software).



**Fig. 1.** O dano imposto à parte aérea em plântulas oriundas de sementes grandes e pequenas foi realizado como no esquema acima. Adaptado de Dillenburg et al. (2010).

## Resultados

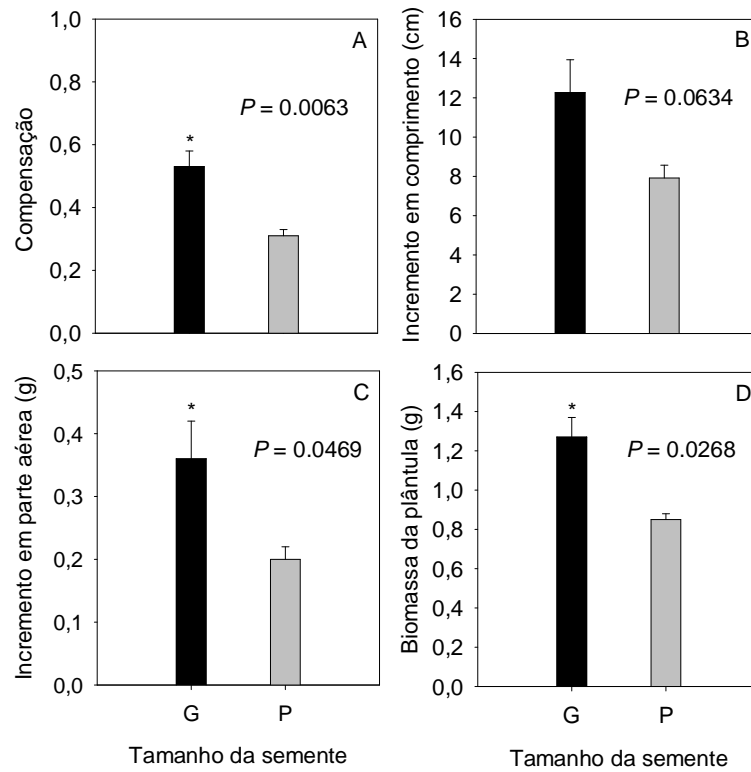
### Tolerância

Todas as plântulas danificadas emitiram rebrotes, porém o número de rebrotes por plântula não diferiu estatisticamente entre os diferentes tamanhos de sementes. As plantas de sementes grandes apresentaram em média 2.83 rebrotes enquanto que as plantas de sementes pequenas emitiram em média 2.33 rebrotes, sendo que 90% de todas as plantas rebrotadas apresentaram dominância de altura de um dos rebrotes. Sessenta dias após o dano, as plântulas ainda não tinham apresentado compensação total da remoção do tecido fotossintético. O tamanho da semente teve um efeito significativo na compensação e no incremento em massa de parte aérea e marginalmente significativo no incremento em comprimento da parte aérea. Plântulas oriundas de sementes grandes compensaram cerca de 50% do tecido perdido, enquanto que plântulas oriundas de sementes pequenas compensaram cerca de 30% deste tecido (Fig. 2A-B). Tais diferenças também se refletiram na massa total da plântula após o dano (Fig. 2C-D, Tabela

1), onde a produção de biomassa das plantas de sementes grandes foi significativamente maior do que das plantas de sementes pequenas.

**Tabela 1.** Análise de variância para os efeitos do tamanho da semente na tolerância ao dano (ANOVA unifatorial) e para os efeitos do tamanho da semente, do dano e da interação entre ambos na mobilização de amido (ANOVA bifatorial: amido em raiz, hipocótilo e semente).

Variável	df	<i>F</i>	<i>P</i>
Parâmetros de tolerância			
Compensação	1	27.4	0.0063
Incremento em comprimento	1	4.86	0.0634
Incremento em massa de parte aérea	1	8.06	0.0469
Massa total da plântula	1	11.17	0.0268
Nº de rebrotes	1	0.74	0.4105
Mobilização de amido			
Amido da raiz principal			
Dano	1	58.10	0.0003
Tamanho da semente	1	10.22	0.0187
Dano x Tamanho da semente	1	5.18	0.0631
Amido do hipocótilo			
Dano	1	129.08	0.0000
Tamanho da semente	1	0.43	0.5383
Dano x Tamanho da semente	1	0.01	0.9209
Amido da semente			
Dano	1	70.35	0.0002
Tamanho da semente	1	78.59	0.0001
Dano x Tamanho da semente	1	11.08	0.0158

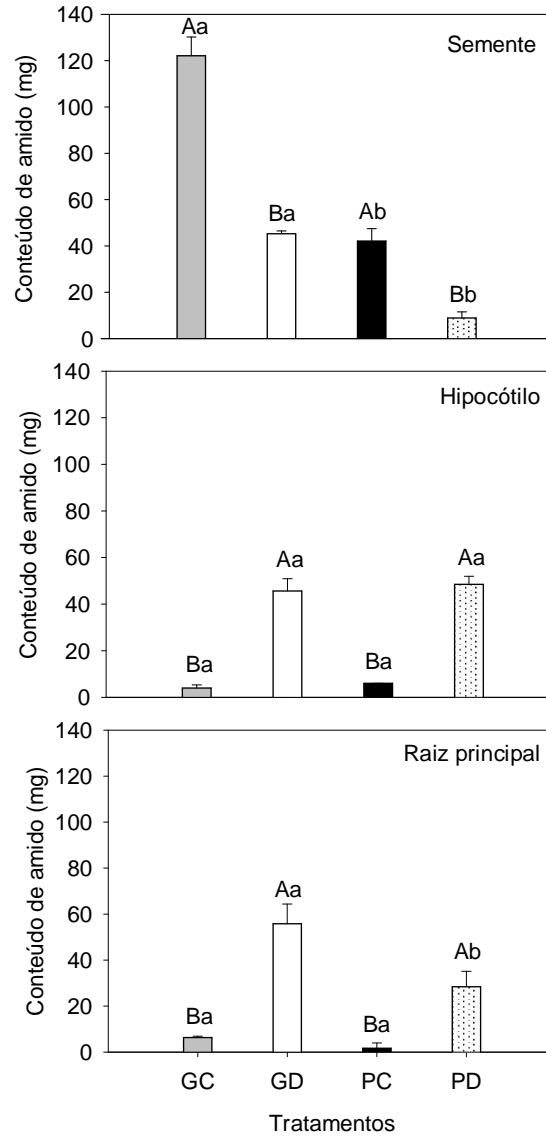


**Fig. 2.** Tolerância de plântulas danificadas de *Araucaria angustifolia* em termos de (A) compensação; (B) incremento em comprimento; (C) incremento em massa de parte aérea; e (D) biomassa total da plântula, em plantas oriundas de sementes grandes (G) e de sementes pequenas (P) 60 dias após um dano severo. As barras verticais representam o erro padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os grupos ( $n = 6$ ;  $P \leq 0.05$ ).



## Mobilização de amido após o dano

Tanto a decapitação quanto o tamanho da semente tiveram efeito significativo na mobilização de amido nas sementes de plântulas. O conteúdo de amido nas sementes de plântulas danificadas foi menor em relação ao conteúdo de amido das sementes das plântulas controle e a mobilização de amido nessas sementes foi significativamente mais acentuada em plântulas oriundas de sementes pequenas, cerca de 78,9 %, enquanto que a mobilização de amido em sementes de plantas oriundas de sementes grandes foi de 63,1 %. A decapitação e o tamanho da semente não afetaram a mobilização de amido nos órgãos de estocagem. As plântulas danificadas, tanto as oriundas de sementes grandes quanto as oriundas de sementes pequenas, apresentaram maior conteúdo de amido na raiz principal e hipocótilo quando comparadas com as plântulas controle (Fig. 3, Tabela 1).



**Fig. 3.** Conteúdo de amido em semente, hipocótilo e raiz principal de plântulas de *A. angustifolia* de todos os tratamentos 60 dias após o dano. As barras verticais representam o erro padrão. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos controle e dano, e letras minúsculas indicam diferenças entre os tamanhos de sementes ( $n = 6$ ;  $P \leq 0.05$ ).

## Discussão

No presente estudo, a capacidade de sobreviver à herbivoria não dependeu do tamanho da semente, uma vez que todas as plantas rebrotaram após o dano. Em estudo de comparação interespecífica, foi verificado que 13 espécies lenhosas neotropicais de sementes pequenas tiveram falhas no processo de rebrotamento após o dano, levando à mortalidade de muitas plântulas (Harms e Dalling 1997). Como a *A. angustifolia* é uma espécie de sementes grandes, as variações no tamanho das mesmas não afetaram a sobrevivência das plântulas que sofreram dano.

Embora todas as plantas danificadas tenham sobrevivido e rebrotado, o aumento no tamanho da semente aumentou a intensidade com que a plântula compensou a perda do tecido fotossintético sessenta dias após o dano. Além disto, plântulas oriundas de sementes grandes apresentaram maior incremento no comprimento e na massa da parte aérea, além de atingirem uma maior massa total. Estes fatos nos levam a aceitar nossa primeira hipótese: a de que plantas oriundas de sementes grandes apresentam maior tolerância à herbivoria do que plantas oriundas de sementes pequenas. Bonfil (1998) relatou resultados semelhantes aos aqui obtidos para duas espécies de carvalho, onde, para cada espécie, plantas oriundas de sementes grandes acumularam mais massa após herbivoria de 50 e 100% do comprimento da parte aérea do que plantas originadas a partir de sementes menores. A presença do efeito do tamanho da semente na compensação de massa perdida após um dano na parte aérea é consistente também com os resultados observados por Armstrong e Westoby (1993), que compararam a sobrevivência e crescimento de 40 espécies de angiospermas australianas com diferentes tamanhos de semente após remoção de 95% do tecido fotossintético. Embora a comparação destes autores tenha sido inter-específica, como a maioria dos trabalhos que tratam das repercussões do tamanho de semente, os resultados também demonstraram um maior crescimento pós-dano em espécies de sementes grandes do que em espécies de sementes pequenas.

Uma das vantagens das plantas de sementes grandes está em sua maior capacidade em lidar com um déficit temporário de carbono no início de seu desenvolvimento (Denslow 1980) e uma das causas deste déficit é a perda de tecido fotossintético por herbivoria. Plantas de sementes grandes contêm grande quantidade de reservas, fornecendo energia e material para a reposição dos tecidos e Foster (1986) afirma que a habilidade de uma planta em se restaurar após sofrer um dano por herbivoria está ligada à quantidade e utilização das reservas de sua semente. Assim, o tamanho avantajado das sementes de *A. angustifolia* permitiu a retomada do crescimento de todas as plantas danificadas, mas este crescimento foi maior quando as reservas supridas pelos pinhões eram mais abundantes.

As plântulas danificadas, oriundas tanto de sementes grandes quanto de pequenas, mobilizaram o amido presente nas sementes, e esta mobilização foi maior quando as sementes eram pequenas do que quando eram grandes, visto que o decréscimo no conteúdo de amido em resposta ao dano foi bem maior naquelas do que nestas. Estes resultados nos levam a aceitar a segunda hipótese deste estudo, que predizia que as plântulas danificadas mobilizariam as reservas da semente em maior grau do que as controle após o dano.

Com base nas variações de massa da semente, Löwe (2011) constatou maior mobilização de reservas em sementes grandes do que em sementes pequenas de *A. angustifolia* durante o crescimento inicial de plântulas que não submetidas a dano. Nossos resultados não apenas mostram que esta mobilização aumenta com a ocorrência de um dano na parte aérea como também que esta mobilização ocorre em maior grau nas sementes pequenas do que nas grandes.

A maior parte dos trabalhos que analisaram a realocação de carboidratos na planta após um dano foi feita em plantas que já não dependiam mais da semente, mas sim de órgãos de estocagem, especialmente raízes (Boege 2005; Kabeya e Sakai 2005; Rodgers et al. 1995). No entanto, com base em variações de massa, Barberis e Dalling (2008) analisaram a realocação de reservas cotiledonares de *Gustavia superba* durante a emergência de plântulas e verificaram que

nem o tamanho da semente e nem a existência de dano afetaram a mobilização destas reservas, as quais se deslocaram lentamente em direção às raízes das plântulas. Estes órgãos serviriam de fonte de recursos para reposição de tecidos perdidos por herbivoria. Estes resultados contrastam com os aqui apresentados, que demonstraram que o dano à parte aérea afeta o consumo de reservas do pinhão.

Plantas danificadas apresentaram maior conteúdo de amido em órgãos subterrâneos do que plantas controle, indicando a priorização da estocagem de carboidratos em plantas que foram colocadas em situação de risco. A estocagem de reservas em órgãos subterrâneos após o estabelecimento das plântulas favorece plantas que são propensas à herbivoria, pois, esgotadas as reservas da semente, a reposição de tecidos fotossintéticos perdidos dependerá fortemente da realocação de reservas a partir de órgãos de estocagem, como raízes e hipocótilo (Bonfil 1998; Barberis e Dalling 2008; Alabarce 2010). Em *A. angustifolia*, a dependência dos recursos do pinhão dura cerca de 100 dias após a germinação (Dillenburg et al. 2010; Löwe e Dillenburg 2011), e o hipocótilo subterrâneo é um importante dreno inicial das reservas da semente. Além de um dreno inicial, este hipocótilo, assim como a raiz pivotante da espécie, atua como importantes locais de estocagem de carbono, que serão acionados em momentos de perturbações do balanço de carbono da planta em desenvolvimento.

A razão pela qual esta espécie mantém recursos estocados em órgãos subterrâneos pode estar relacionada com uma estratégia de sobrevivência, na qual a grande ocorrência de predação dos pinhões por roedores durante o desenvolvimento da plântula (Iob e Vieira 2008) constitui uma ameaça ao sucesso de estabelecimento da mesma. Dillenburg et al. (2010) mostraram que os recursos da semente de *A. angustifolia* são alocados e estocados como reservas no hipocótilo em um período inicial do desenvolvimento da plântula e este mesmo padrão foi encontrado em *A. bidwillii* por Burrows (1992). A alocação dessas reservas para o hipocótilo no período inicial de

desenvolvimento pode reduzir o risco das plântulas perderem toda sua reserva através de um evento de dano na parte aérea (Kabeya e Sakai 2003).

### **Conclusões**

Löwe e Dillenburg (2011) recentemente sugeriram que o tamanho avantajado das sementes de *A. angustifolia* representa um importante mecanismo de tolerância ao sombreamento intenso. Os resultados do presente trabalho acusaram a importância das reservas da semente da espécie para a tolerância da mesma à herbivoria. Como os resultados aqui apresentados referem-se a plantas cultivadas sob sombreamento moderado, lança-se a seguinte pergunta: será que os efeitos do tamanho da semente sobre a tolerância à herbivoria também se expressam quando as plântulas estão submetidas a uma forte limitação fotossintética devido a um intenso sombreamento?

### **Agradecimentos**

As autoras agradecem à Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela disponibilidade de espaço em casa de vegetação e ao Laboratório de Fisiologia Vegetal da mesma universidade pelo apoio nas análises químicas. As autoras também agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas concessões de bolsas de mestrado à primeira autora e de pesquisa à segunda e ao Programa de Pós-Graduação em Botânica pelo apoio institucional.

## Referências

- Alabarce F (2010) Capacidade e intensidade de rebrote de plântulas de *Araucaria angustifolia* (Pinheiro Brasileiro). Trabalho de conclusão.UFRGS, Porto Alegre, 37p.
- Anten NPR, Ackerly DD (2001) Canopy-level photosynthetic compensation after defoliation in a tropical understorey palm. *Functional Ecology* 15:252–262
- Armstrong DP, Westoby M (1993) Seedlings from large seeds tolerate defoliation better: a test using phylogenetically independent contrasts. *Ecology* 74:1092–1100
- Barberis IM, Dalling JW (2008) The effect of light, seed size and biomass removal on cotyledon reserve use and root mass allocation in *Gustavia superba* seedlings. *Journal of tropical ecology* 24:607-617
- Boege K (2005) Influence of plant ontogeny on compensation to leaf damage. *American Journal of Botany* 92:1632-1640
- Bonfil C (1998) The effects of seed size, cotyledon reserves, and herbivory on seedling survival and growth in *Quercus rugosa* and *Q. laurina* (Fagaceae). *American Journal of Botany* 85:79-87
- Burrows GE (1987) Leaf axil anatomy in the Araucariaceae. *Australian Journal of Botany* 35:631-640
- Burrows GE (1989) Developmental anatomy of axillary meristems of *Araucaria cunninghamii* released from apical dominance following shoot apex decapitation *in vitro* and *in vivo*. *Botanical Gazette* 150:369-377
- Burrows GE, Boag TS, Stockey RA (1992) A morphological investigation of the unusual cryptogeal germination strategy of bunya pine (*Araucaria bidwillii*) – 21 an Australian rain forest conifer. *International Journal of Plant Sciences* 153:503-512
- Burrows GE, Offord CA, Meagher PF, Ashton K (2003) Axillary meristems and the development of epicormic buds in Wollemi pine (*Wollemia nobilis*). *Annals of Botany* 92:835-844

- Chapin FSI, McNaughton SJ (1989) Lack of compensatory growth under phosphorus deficiency in grazing-adapted grasses from the Serengeti plains. *Oecologia* 79:551–557
- Coley PD, Kursar TA (1996) Antiherbivory defenses of young tropical leaves: Physiological constraints and ecological tradeoffs, pp. 305-336. Em: *Tropical Forest Plant Ecophysiology* (Smith, A.A.; S.S. Mulkey & R.L. Chaz, eds.). University of Utah, Salt Lake City.
- Denslow JS (1980) Gap partitioning among tropical rainforest trees. *Biotropica* 12:47-55
- Dillenburg LB, Rosa LM, Mósena M (2010) Hypocotyl of seedlings of the large-seeded species *Araucaria angustifolia*: an important underground sink of the seed reserves. *Trees* 24:705-711
- Foster SA (1986) On the adaptive value of large seeds for tropical moist forest trees: a review and synthesis. *Botanical review* 52:260-299
- Garbin ML, Zandavalli RB, Dillenburg LR (2006) Soil patches of inorganic nitrogen in subtropical Brazilian plant communities with *Araucaria angustifolia*. *Plant and Soil* 286:323-337
- Green PT, Juniper PA (2004) Seed–seedling allometry in tropical rainforest trees: seed mass-related patterns of resource allocation and the, ‘reserve effect’. *Journal of Ecology* 92:397-408
- Harms KE, Dalling JW (1997) Damage and herbivory tolerance through resprouting as an advantage of large seed size in tropical trees and lianas. *Journal of Tropical Ecology* 13:617-621
- Hendrix SD (1988) Herbivory and its impact on plant reproduction. *Plant Reproductive Ecology: Patterns and Strategies* (eds J. Lovett Doust & L. Lovett Doust), pp. 246 - 266. Oxford University Press, New York.
- Job G, Vieira EM (2008) Seed predation of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) in the Brazilian Araucaria Forest: influence of deposition site and comparative role of small and ‘large’ mammals. *Plant Ecology* 198:185-196
- Kabeya D, Sakai S (2003) The role of roots and cotyledons as storage organs in early stages of establishment in *Quercus crispula*: a quantitative analysis of the nonstructural carbohydrate in cotyledons and roots. *Annals of Botany* 92:537-545



- Kabeysa D, Sakai S (2005) The relative importance of carbohydrate and nitrogen for the resprouting ability of *Quercus crispula* seedlings. *Annals of Botany* 96:479-488
- Kosola KR, Dickmann DI, Paul EA, Parry D (2001) Repeated insect defoliation effects on growth, nitrogen acquisition, carbohydrates, and root demography of poplars. *Oecologia* 129:65-74
- Leishman MR, Murray BR (2001) The relationship between seed size and abundance in plant communities: Model predictions and observed patterns. *Oikos* 94:151-61
- Lowe T. Aspectos ecofisiológicos da alocação das reservas das sementes para as plântulas de *Araucaria angustifolia*. 2011. Tese de doutorado, UFRGS, Porto Alegre, 112p.
- Lowe TR, Dillenburg LR (2011) Changes in light and nutrient availabilities do not alter the duration of use of seed reserves in *Araucaria angustifolia* seedlings. *Australian journal of botany* 59:32-37
- Mantovani A, Morellato LPC, Reis MS (2004) Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. *Revista Brasileira de Botânica* 27:787-796
- Marquis RJ (1992) Selective impact of herbivores. *Plant Resistance to Herbivores and Pathogens: Ecology, Evolution and Genetics* (eds R.S. Fritz & E.L. Simms), pp. 301±325. University of Chicago Press, Chicago, USA.
- Mattos JR (1994) *O pinheiro brasileiro*. 2. ed. Lages: Artes Gráficas Princesa. 225 p.
- McNaughton SJ. 1983. Compensatory plant growth as a response to herbivory. *Oikos* 40:329
- Mccready RM, Guggolz A, Silveira V, Owens HS (1950) Determination of starch and amylase in vegetables: application to peas. *Analytical Chemistry* 22:1156-1158
- Panza V, Láinez V, Maroder H, Prego I, Maldonado S (2002) Storage reserves and cellular water in mature seeds of *Araucaria angustifolia*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 140:273-281
- Pastore U, Rangel ALR, Teixeira MB (1986) Levantamento de recursos naturais. *Vegetação*, IBGE, Rio de Janeiro, 33: 541-619.

- Pereira F, Ganade G (2008) Spread of a Brazilian keystone-species in a landscape mosaic. *Forest Ecology and Management* 255:1674-1683
- Poorter L, Rose SA (2005) Light-dependent changes in the relationship between seed mass and seedling traits: a meta-analysis for rain forest tree species. *Oecologia* 142:378-387
- Rodgers HL, Brakke MP, Ewel JJ (1995) Shoot damage effects on starch reserves of *Cedrela odorata*. *Biotropica* 27:71-77
- Strauss SY, Agrawal AA (1999) The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends in Ecology & Evolution* 14:179-185
- Tompsett PB (1984) Desiccation studies in relation to the storage of *Araucaria* seed. *The Annals of Applied Biology* 105:581-586
- Weltzin JF, Archer SR, Heitschmidt RK (1998) Defoliation and woody plant (*Prosopis glandulosa*) seedling regeneration: potential versus realized herbivory tolerance. *Plant Ecology* 138:127-135
- Westoby M, Falster DS, Moles AT, Vesk PA, Wright IJ (2002) Plant ecological strategies: some leading dimensions of variation between species. *Annual Review of Ecological Systematics* 33:125-159

ARTIGO 2:

Influência da ontogenia na resistência à herbivoria em plantas de *Araucaria angustifolia*

Este trabalho será submetido ao periódico: **American Journal of Botany**

## **Influência da ontogenia na resistência à herbivoria em plantas de *Araucaria angustifolia***

**Fernanda Alabarce\***  
**Lúcia Rebello Dillenburg\***

### **RESUMO**

Mudanças ontogenéticas em reservas de carboidratos e alocação de recursos podem restringir a capacidade das plantas em resistir a um evento de herbivoria. Para avaliar as mudanças ontogenéticas nesta resistência, plântulas e plantas juvenis da conífera subtropical *Araucaria angustifolia* foram sujeitas à remoção de mais da metade de sua parte aérea e a tolerância e defesa química em resposta a este dano foram quantificadas. Além disso, foram avaliados os efeitos do dano nas reservas de amido. Plantas de ambos estágios foram capazes de resistir ao dano infligido rebrotando, mas enquanto as plântulas apresentaram uma maior habilidade em compensar o tecido perdido, as juvenis se apresentaram mais aptas a se defender de um possível novo dano. O conteúdo de amido diminuiu em sementes de plântulas danificadas e principalmente em raízes de plantas juvenis, o que demonstra que o uso do amido pós-dano é dependente do estágio ontogenético. A concentração de flavonóides nas folhas aumentou enquanto que a tolerância diminuiu com a ontogenia. Isto sugere um *trade-off* entre recursos alocados para tolerância e defesa. Os resultados deste estudo sugerem que a ontogenia deve ser considerada quando se avaliam as respostas da espécie ao dano por herbivoria e que o estágio de plântula da mesma, embora mais vulnerável, é mais tolerante a uma drástica remoção dos tecidos fotossintéticos do que o estágio juvenil.

Palavras-chave: Ontogenia, tolerância, defesa química, herbivoria, alocação de recursos, pinheiro brasileiro.

\* PPG – Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500,  
CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: fernanda\_alabarce@yahoo.com.br;  
[lucia.dillenborg@ufrgs.br](mailto:lucia.dillenborg@ufrgs.br)

## ABSTRACT

### **The influence of ontogeny in resistance to herbivory in plants of *Araucaria angustifolia***

Ontogenetic changes in carbohydrate reserves and resource allocation can constrain the ability of plants to withstand an herbivory event. To evaluate the ontogenetic changes in such resistance, seedlings and saplings of the subtropical conifer *Araucaria angustifolia* were submitted to a removal of more than half of their shoots, and the tolerance and chemical defense in response to this damage were quantified. Moreover, the damage effects on the starch reserves were evaluated. Plants of both stages were able to resist to the inflicted damage by sprouting, but while seedlings had a greater ability to compensate tissue loss, saplings were more able to defend themselves from a possible new damage. Starch content decreased in seeds of damaged seedlings and mostly in roots of damaged saplings, which demonstrates that the use of starch after damage is ontogenetic stage-dependent. The concentration of flavonoids in leaves increased while tolerance decreased with ontogeny. This suggests a trade-off between resources allocated for tolerance and defense. The results of this study suggest that ontogeny must be taken into account when evaluating the species responses to damage by herbivores, and that the seedling stage, although more vulnerable, is more tolerant to a drastic removal of the photosynthetic tissues than the sapling stage.

**Key words:** Ontogeny, tolerance, chemical defense, herbivory, resource allocation, Brazilian pine.

## INTRODUÇÃO

Plantas em populações naturais possuem variados níveis de resistência à herbivoria, com alguns indivíduos relativamente mais resistentes e outros mais suscetíveis (Donaldson e Lindroth, 2007). A maioria dos estudos voltados para a compreensão da evolução da resistência das plantas tem se centrado em características que evitam um evento de herbivoria (Berembaum *et al.*, 1986). Tais características de “defesa” deveriam ser benéficas às plantas, uma vez que inimigos naturais geralmente reduzem a aptidão das plantas das quais eles se alimentam (Marquis, 1984). No entanto, muitos estudos têm questionado o pressuposto de que o dano por herbivoria sempre reduz a aptidão das plantas em populações naturais (McNaughton, 1983; Paige e Whitham, 1987; Mauricio *et al.*, 1993). Estes estudos sugerem que algumas plantas reduzem os efeitos prejudiciais da herbivoria desenvolvendo uma estratégia alternativa: a tolerância ao dano por herbivoria. Tolerância, ou compensação, é a capacidade de uma planta em tolerar diversos ataques de herbívoros sem reduzir sua aptidão (McNaughton, 1983). Ao contrário da defesa, a tolerância não evita a herbivoria, mas permite à planta compensar o dano já infligido pelos inimigos naturais.

Durante sua ontogenia, ou seja, enquanto elas se desenvolvem de sementes para plântulas, juvenis e estágios maduros, as plantas podem ser expostas a diferentes níveis de herbivoria (Tiffin, 2002). Como resultado, o impacto seletivo de herbívoros na resistência das plantas irá variar com a ontogenia das mesmas, promovendo mudanças na quantidade e tipo de resistência durante o desenvolvimento da planta. Tais mudanças estão diretamente ligadas com prioridades demográficas (estabelecimento, crescimento, reprodução) e restrições de alocação de recursos no decorrer da vida da planta (Weiner, 2004). Em geral, as teorias de alocação de recursos supõem que as plantas têm um limitado *pool* de recursos e que recursos alocados para

uma função ou estrutura não podem ser usados para outra, promovendo *trade-offs* e determinam as restrições de alocação de recursos (Weiner, 2004).

Existem dois processos principais associados com a ontogenia das plantas que podem influenciar a alocação de recursos: o aumento do tamanho da planta e a mudança de prioridades funcionais ao longo do desenvolvimento da mesma. Por exemplo, o aumento no tamanho da planta produz maiores órgãos de aquisição de recursos (raízes e área foliar). Assim, plantas menores apresentam maiores restrições em relação à alocação de recursos para produção de defesa contra herbivoria. Já as prioridades funcionais de crescimento, defesa, estocagem e reprodução também mudam ao longo do desenvolvimento da planta, e essas mudanças também podem influenciar conflitos de alocação de recursos (Zhang e Jiang, 2002). Por exemplo, quando as plantas atingem a idade reprodutiva, flores e frutos podem necessitar de recursos anteriormente estocados para sua produção ou para sua defesa.

No entanto, esses padrões ontogenéticos de resistência variam com outros fatores. Por exemplo, a longevidade do estágio juvenil pode apresentar um importante papel em discriminar padrões ontogenéticos de resistência. Plantas lenhosas frequentemente sobrevivem por vários anos, até mesmo décadas, como juvenis, antes que fachos de luz permitam a elas crescer e amadurecer, tornando-as altamente atrativas aos herbívoros (Feeny, 1976). A defesa química durante o estágio juvenil é então muito importante na sobrevivência e é provável que conduza a níveis maiores em juvenis comparando com lenhosas maduras. Em contraste, os estágios de plântula e juvenil são tipicamente breves em ervas e gramíneas porque elas germinam em densas comunidades onde o crescimento rápido é essencial para o sucesso no estabelecimento (Berendse e Elberse, 1990). Limitados tecidos de raízes e parte aérea em herbáceas juvenis e plântulas limitam ainda mais a aquisição e alocação de recursos para a defesa. Portanto, em ervas e gramíneas, devemos esperar que a defesa aumente de plântula/juvenil para o estágio maduro. Além disso, o tipo de herbívoro (mamíferos, insetos, moluscos e pássaros) representa outro fator



que gera uma variabilidade nos padrões ontogenéticos de resistência, devido às diferenças de acesso do herbívoro à planta em cada estágio ontogenético. Por exemplo, vários mamíferos herbívoros não podem ter acesso às folhas de plantas maduras e como resultado podem estabelecer diferentes pressões de seleção em padrões ontogenéticos na defesa das plantas comparado com insetos que possuem acesso tanto a plantas juvenis quanto maduras (Barton e Koricheva, 2010).

No pinheiro brasileiro (*Araucaria angustifolia*) a capacidade de tolerar um dano à parte aérea pode ser observada em indivíduos maduros e em plântulas. Alabarce (2010) observou que plântulas de *A. angustifolia* alocam os recursos presentes na semente para a produção de nova parte aérea e que os recursos de suas grandes sementes desempenham um papel fundamental no sucesso do estabelecimento da plântula. Já a defesa desta espécie contra herbivoria é representada pela presença de flavonóides em suas acículas (Yamaguchi *et al.*, 2009), porém o papel ecológico da produção destes compostos ainda é pouco estudado. Como espécie lenhosa, a *A. angustifolia* possui um período longo no estágio juvenil apresentando um crescimento lento. Esta espécie domina a formação conhecida como Floresta Ombrófila Mista e dentro desta formação está situada a região dos campos naturais (Castella e Britez, 2004). Em meio à floresta, podem ocorrer ataques de mamíferos herbívoros de pequeno porte e ação por patógenos em plântulas. Já em campo aberto e bordas de mata, é possível encontrar indivíduos adultos portando mais de um caule principal, provavelmente devido aos intensos ataques de formigas nesses ambientes enquanto plântulas (Zandavalli, 2006).

O objetivo geral deste estudo foi investigar como a resistência à herbivoria é influenciada pela ontogenia em *A. angustifolia*, comparando-se o estágio de plântula com o estágio juvenil inicial. Mais especificamente, pretendemos responder as seguintes questões: (1) Em qual estágio a planta é mais tolerante à herbivoria? (2) Em qual estágio a planta está mais apta a se defender quimicamente da herbivoria? (3) Existe um *trade-off* entre tolerância e defesa? (4) O padrão de

mobilização e amido após o dano varia com a ontogenia? A teoria da alocação de recursos pressupõe que a fase de plântula é mais tolerante e produz menos compostos de defesa e, sendo assim, existe um *trade-off* entre tolerância e defesa. As plântulas devem alocar recursos da semente para a reposição da parte aérea e as juvenis, por não possuírem mais sementes devem alocar preferencialmente o amido presente em seus órgãos de estocagem.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Sistema de estudo** – *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze é uma gimnosperma da família Araucariaceae, nativa do sul do Brasil. As razões pelas quais nós estudamos esta espécie são várias. Primeiro, o fato de ela ocorrer em uma área restrita ao sul da América do Sul e estar criticamente ameaçada de extinção segundo a IUCN (International Union of Conservation of Nature). Segundo, esta espécie é uma espécie-chave em seu ecossistema que também sofreu uma redução drástica ao longo dos anos, ocorrendo atualmente populações isoladas, com baixa variabilidade genética e extremamente vulnerável sob a ótica da conservação (Stefenon *et al.*, 2004). Terceiro, observações de estudos em campo documentaram a existência de intensos ataques de herbívoros nesta espécie, principalmente em plântulas estabelecidas em áreas de campo e borda de mata.

Apesar do grande interesse na ecologia de *A. angustifolia*, poucos estudos têm sido publicados acerca da resistência da mesma aos ataques de herbívoros. Esta espécie possui capacidade de tolerar um dano severo à parte aérea no estágio de plântula (Alabarce, 2010), porém, não existem estudos que confirmem se essa capacidade varia de acordo com a ontogenia da planta.

*Estudo da ontogenia* - Estudos em jardins experimentais foram conduzidos na primavera de 2010 (plântulas) e na primavera de 2011 (juvenis). As sementes foram coletadas na Floresta Nacional (FLONA de São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, Brasil), submetidos ao teste de imersão em água e desinfetados com hipoclorito de sódio a 2% por 20 minutos. Foram germinadas em recipientes de cultivo contendo vermiculita úmida e quando todas as sementes já estavam germinadas elas foram transplantadas para garrafas plásticas do tipo *PET* com capacidade para 2 litros. O substrato utilizado foi areia de granulometria média sendo quinzenalmente aplicada uma solução de Hoagland modificada (Taiz e Zeiger, 2004) a 10% de sua força. Após o transplante dos pinhões germinados, os vasos foram imediatamente dispostos em gaiolas com sombrite, onde a intensidade de radiação fotossinteticamente ativa teve uma média de  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . As plântulas foram separadas em dois grupos de estágios, para serem danificadas aos 2 e 11 meses após a germinação. Estes estágios foram selecionados porque eles incluem um estágio óbvio de plântula (2 meses) assim como o estágio juvenil, onde certamente as reservas da semente já estão esgotadas (11 meses). De acordo com Lowe (2011), o período em que esta espécie não depende mais das reservas das sementes se dá cerca de 100 dias após a semeadura. A aplicação do dano, feito nas plântulas aos 2 meses de idade e nas juvenis aos 11 meses de idade, foi realizado com um único corte na parte aérea utilizando-se uma tesoura. A aplicação do dano (simulando um ataque severo de herbivoria) correspondeu a ~ 80% da massa total da parte aérea. Plântulas e plantas juvenis foram separadas então em grupo controle e grupo de danificadas, totalizando 4 tratamentos: (1) Plântulas controle (PC); (2) Plântulas danificadas (PD); (3) Juvenis controle (JC); e (4) Juvenis danificadas (JD). Para a condução desse experimento, foram feitas duas coletas em cada tratamento, uma no dia da aplicação do dano e outra sessenta dias após o dano ( $N = 6$  por tratamento, totalizando 48 plantas). Em cada coleta, as plantas foram medidas e separadas em parte aérea, raiz lateral, raiz principal, hipocótilo e semente. As partes foram secas em estufa a  $60^{\circ}\text{C}$  por uma semana e pesadas em balança analítica

(Eletronic Balance FA2104N, Bioprecisa). A tolerância à herbivoria foi considerada como sendo a compensação da remoção do tecido fotossintético 60 dias após o dano, através da razão entre massa de parte aérea de plantas danificadas e massa de parte aérea de plantas controle, sendo a compensação total equivalente a 1 (Strauss e Agrawal, 1999). Outros parâmetros considerados relevantes na análise de tolerância são os incrementos em massa de parte aérea, de comprimento e de área foliar, tanto de plantas controle quanto de plantas danificadas. Nas plantas controle, o incremento seguiu o cálculo:  $P_f - P_i$  (sendo  $P_f$  = valor do parâmetro final, 60 dias após o dano; e  $P_i$  = valor do parâmetro inicial, no dia 0 da aplicação do dano). Nas plantas danificadas, o incremento em massa de parte aérea foi considerado a massa total dos rebrotes e o incremento em comprimento total como sendo a soma do comprimento de todos os rebrotes de cada planta danificada no final do experimento. O incremento em área foliar nas plantas danificadas seguiu a equação  $P_f - P_i$ . Para o incremento em área foliar, a área total de cinco acículas foi medida com medidor automático de área foliar (modelo LI-3100, Licor Inc.). Para caracterizar a defesa química das plantas, das partes aéreas coletadas 60 dias após o dano, foi analisado o teor de flavonóides: foram separadas acículas de seis plantas de cada um dos quatro tratamentos ( $N = 6$  por tratamento). Do material seco foi feita a extração em etanol 95% e a quantificação seguiu o método do complexo cloreto de alumínio descrito por Zhishen *et al.* (1999). A distribuição de biomassa em cada plântula (de todos os tratamentos) foi calculada no final do experimento. Para verificar a mobilização de amido após o dano (quebra de amido em açúcares solúveis, segundo Boege, 2005), foi quantificado o conteúdo de amido no eixo principal de indivíduos dos quatro tratamentos, e ainda em sementes de plântulas, sessenta dias após o dano. Para tanto, seis amostras de sementes, raízes e hipocótilo ( $N = 6$  por órgão por planta) foram separadas. Do material seco foi feita a extração do amido que se deu em ácido perclórico 52% e as quantificações seguiram o método por reação com antrona (McCready *et al.*, 1950).

*Análises estatísticas* - A influência da ontogenia e do impacto do dano na mobilização de amido, na produção de flavonóides e nos incrementos em massa de parte aérea, em comprimento e em área foliar, foram analisadas usando-se análise de variância (ANOVA) bifatorial e, em caso de significância ( $\alpha = 0.05$ ), aplicou-se o teste Tukey de separação de médias. Foi realizada ANOVA unifatorial ( $\alpha = 0.05$ ) considerando-se apenas a ontogenia como o único fator para a compensação e o dano como o único fator para análise de amido de sementes em plântulas, uma vez que as plantas juvenis já não exploravam mais o pinhão. No caso da distribuição de biomassa o fator considerado foi a parte da planta. Para todos os testes foi utilizado o pacote estatístico Statistix versão 8.0 (Analytical Software).

## RESULTADOS

*Parâmetros de tolerância* – O número de rebrotes emitidos por planta foi significativamente maior nas juvenis ( $4.25 \pm 0.25$ ) do que nas plântulas ( $2.5 \pm 0.28$ ) (Tabela 1) não havendo dominância em relação a um dos rebrotes para o estágio juvenil e com 85% de dominância de um rebrote sobre outro nas plântulas (Fig. 1). A ontogenia e o impacto do dano não afetaram o incremento em comprimento. No entanto, enquanto as plantas controle apresentaram aumento em área foliar em relação à área foliar do dia da aplicação do dano, as plantas danificadas apresentaram uma diminuição na área foliar em relação ao dia 0 sendo que esta diminuição foi significativamente maior nas juvenis. Já o incremento em massa de parte aérea foi afetado apenas pelo dano, onde o grupo das plantas danificadas apresentou incremento inferior ao das plantas controle (Tabelas 2 e 3). A ANOVA unifatorial detectou um efeito significativo do estágio na compensação da remoção de tecido fotossintético (Fig. 2a, Tabela 1).

TABELA 1. Análise de variância unifatorial para os seguintes parâmetros em plantas de *A. angustifolia*.

Fator/Variável	df	F	P
Estágio ontogenético			
Nº de rebrotes por planta	1	21.0	0.004
Compensação	1	81.5	0.0003
Parte da planta			
Contribuição relativa PC	2	13393	0.0000
Contribuição relativa PD	2	15016	0.0000
Contribuição relativa JC	2	15675	0.0000
Contribuição relativa JD	2	38413	0.0000
Dano			
Amido da semente	1	90.1	0.0002

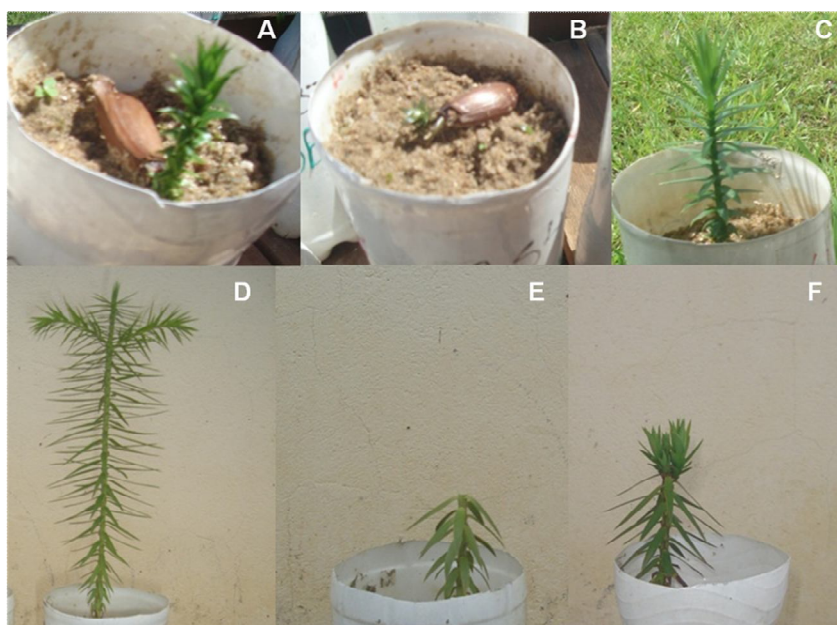


Fig. 1. Aspecto de plantas de *A. angustifolia* ao longo do experimento: plântulas antes (A), logo após (B) e 60 dias após o dano (C); e juvenis antes (D), logo após (E) e 60 dias após o dano (F).

TABELA 2. Médias (Erro padrão) de variáveis morfométricas e massa de parte aérea em plantas controle e danificadas de *Araucaria angustifolia* de diferentes estágios ontogenéticos ao longo do experimento. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes representam diferenças significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre estágios ontogenéticos e dano, respectivamente.

Tratamentos	Incremento em massa de parte aérea (g)	Incremento em comprimento (cm)	Incremento em área foliar (cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>
Plântula controle	1.33 (0.2)Aa	17.0 (0.76)ns	0.53 (0.2)Aa	12
Plântula danificada	0.42 (0.06)Ab	14.37 (1.47)ns	-0.51 (0.16)Ab	12
Juvenil controle	0.89 (0.12)Aa	14.0 (1.51)ns	0.22 (0.25)Aa	12
Juvenil danificada	0.33 (0.02)Ab	11.3 (0.3)ns	-2.08 (0.06)Bb	12

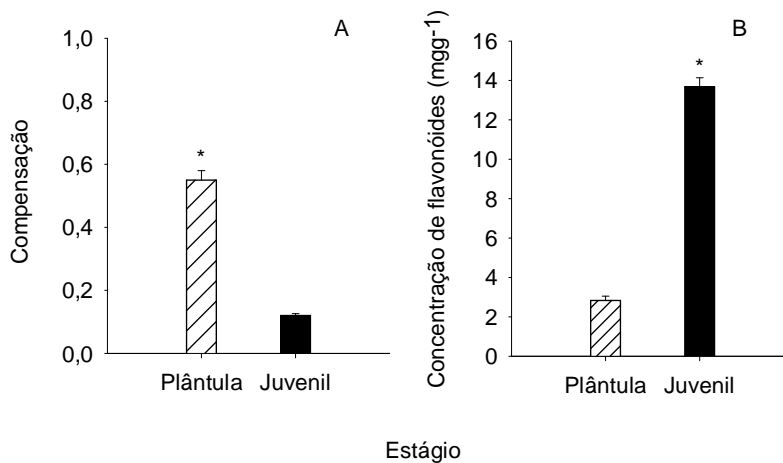


Fig. 2. Mudanças ontogenéticas em: (A) tolerância à herbivoria (compensação) e; (B) defesa contra herbivoria (concentração de flavonóides). As barras verticais representam o erro padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os estágios ontogenéticos ( $n = 6$ ;  $P \leq 0.05$ ).

TABELA 3. Análise de variância bifatorial de parâmetros medidos em plântulas e plantas juvenis de *A. angustifolia* intactas e danificadas no final do experimento.

Variável	df	F	P
Incremento em massa de parte aérea			
Estágio	1	4.64	0.0683
Dano	1	31.22	0.0008
Estágio x Dano	1	2.11	0.1895
Incremento em comprimento			
Estágio	1	6.25	0.0670
Dano	1	4.80	0.0599
Estágio x Dano	1	0.00	0.9735
Incremento em area foliar			
Estágio	1	25.04	0.0010
Dano	1	77.51	0.0000
Estágio x Dano	1	9.54	0.0149
Amido do hipocótilo			
Estágio	1	110.46	0.0000
Dano	1	6.47	0.0345
Estágio x Dano	1	85.38	0.0000
Amido da raiz principal			
Estágio	1	130.18	0.0000
Dano	1	43.17	0.0002
Estágio x Dano	1	69.49	0.0000
Flavonóides			
Estágio	1	920.63	0.0000
Dano	1	0.00	0.9921
Estágio x Dano	1	228.89	0.0000

**Distribuição de biomassa na planta** – Houve uma diferença significativa na distribuição de massa nas plantas de todos os tratamentos: no estágio de plântula, as plantas controle investiram significativamente mais massa em parte aérea do que em raízes e no estágio juvenil as plantas controle investiram igualmente em raízes e parte aérea. Em concordância com os resultados de reposição de massa perdida, a contribuição em parte aérea nas plântulas danificadas foi maior do que em raízes em contraste com o modelo de partição em juvenis danificadas (Fig. 3, Tabela1).



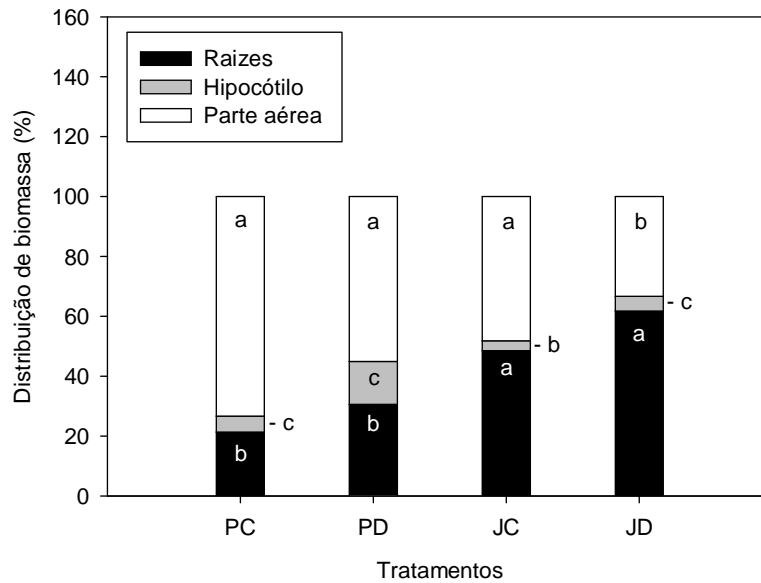


Fig. 3. Distribuição de biomassa nas diferentes partes (raízes, hipocótilo e parte aérea) das plantas de *A. angustifolia* no final do experimento nos tratamentos: (PC) plântula controle; (PD) plântula danificada; (JC) juvenil controle; e (JD) juvenil danificada. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as partes da planta ( $n = 6$ ;  $P \leq 0.05$ ).

**Defesa química** – O dano não apresentou efeito significativo na concentração de flavonóides, tanto em plântulas quanto em juvenis. Porém, a concentração deste composto aumentou com a ontogenia nas plantas danificadas (Fig. 2b, Tabela 3).

**Mobilização de amido após o dano** – As plantas juvenis responderam ao dano reduzindo o conteúdo de amido do hipocótilo e, principalmente, da raiz, enquanto que as plântulas responderam ao dano ao reduzir significativamente o conteúdo de amido da semente mantendo altas quantidades (talvez aumentando) em hipocótilo e raízes (Fig. 4, Tabela 3).

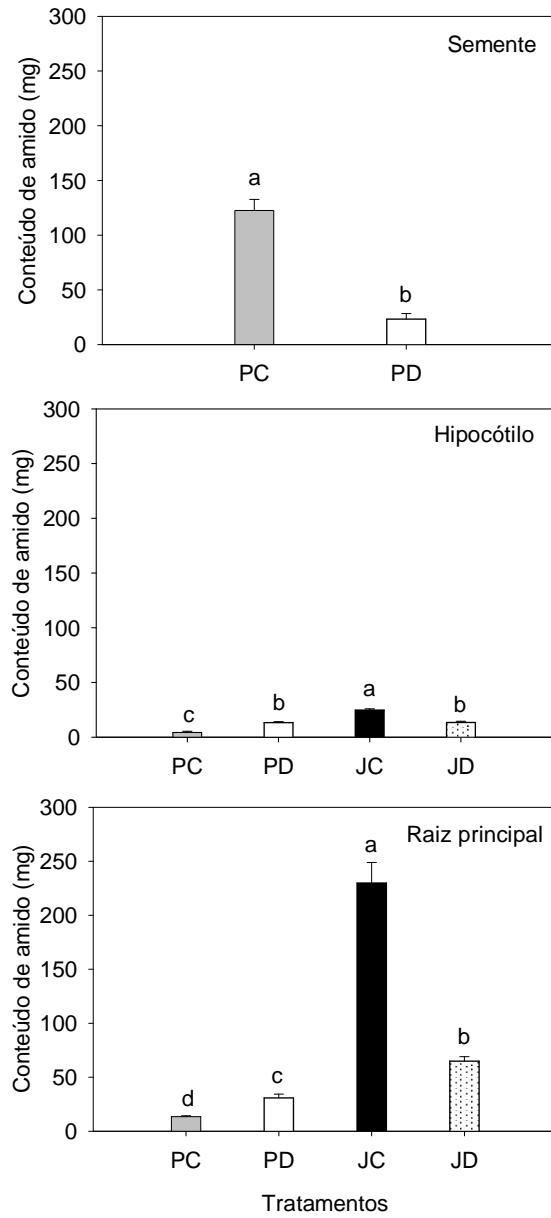


Fig. 4. Conteúdo de amido em semente, hipocótilo e raiz principal de plantas de *A. angustifolia* de todos os tratamentos 60 dias após o dano. As barras verticais representam o erro padrão. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $n = 6$ ;  $P \leq 0.05$ ).

## DISCUSSÃO

As plântulas apresentaram maior tolerância ao dano do que as plantas juvenis, ou seja, foram capazes de compensar rapidamente o tecido perdido. As plântulas apresentaram uma melhor resposta ao dano: elas repuseram cerca de 50% do tecido perdido em dois meses enquanto que as juvenis repuseram cerca de 10% em um mesmo período de tempo, o que responde a nossa primeira questão: plântulas são mais tolerantes do que plantas juvenis aos danos causados pela herbivoria. Este resultado concorda com o observado em *Prosopis glandulosa* por Weltzin *et al.* (1998), onde foi encontrado alto grau de tolerância após a remoção da parte aérea durante o período inicial de vida da espécie. Boege (2005), ao comparar a capacidade de tolerância em plantas juvenis e adultas danificadas de *Casearia nitida*, verificou que o impacto da desfolhação foi mais negativo nas adultas. Assim, a autora concluiu que a ontogenia diminuiu a capacidade de tolerância e que esse impacto negativo em plantas adultas se deve às restrições de alocação de biomassa, que deve ser direcionada para a produção de frutos e, portanto, a reposição de parte aérea é sacrificada. Os custos das diferenças ontogenéticas na resistência podem ser causados por mudanças de prioridade de funções nas plantas (defesa química, crescimento e estocagem para reprodução) (Weiner, 2004). Dessa forma, as plantas devem atender suas prioridades em face de um dano severo.

Espécies lenhosas, como *A. angustifolia*, apresentam um padrão de contínuo decréscimo na razão parte aérea:raiz ao longo do desenvolvimento (Wilson, 1988). Estas mudanças na razão parte aérea:raiz durante o ciclo de vida de uma planta estão relacionadas com a ontogenia, que é controlada por genes. Uma visão alternativa é que taxas de crescimento de raízes e parte aérea continuamente se ajustam em resposta à captura de recursos com biomassa alocada com “base nas necessidades” (Atwell *et al.*, 1999). No caso de *A. angustifolia*, o padrão de alocação de biomassa em seu desenvolvimento inicial envolve um crescimento pronunciado da parte aérea,

que se inicia cerca de 35 dias após a germinação e é sustentado tanto pelas reservas da semente quanto do hipocótilo (dreno inicial das reservas do pinhão). Assim, a priorização no crescimento da parte aérea em plântulas levou a uma reposição mais rápida do tecido perdido nestas do que em juvenis. Esta priorização no crescimento da parte aérea e a tolerância ao dano infligido à mesma durante o estágio de plântula estão diretamente ligadas às abundantes reservas do pinhão. Desprovida destas reservas iniciais e com severo dano aos seus tecidos fotossintéticos, a planta juvenil tem menor capacidade de reposição da massa removida.

No entanto, as plântulas do pinheiro brasileiro, ao investirem sua energia na rápida reposição do tecido perdido, produziram menores níveis de compostos de defesa do que as plantas juvenis, o que responde nossa segunda pergunta: as plantas juvenis estão mais aptas a se defenderem quimicamente da herbivoria do que as plântulas. Espécies lenhosas nos estágios de plântula, juvenil e madura podem diferir na defesa química contra herbívoros. Esse resultado é consistente com o observado em *Pinus ponderosa* por Wagner (1988), onde a defesa induzida está restrita a plantas juvenis. Sanches-Hidalgo *et al.* (1999) também concluíram que existe um aumento na produção de defesa química com a ontogenia na lenhosa tropical *Nectandra ambigens*. O custo energético da produção de defesa anti-herbívoro deve ser maior em períodos do ciclo de vida quando a competição por carbono entre defesa química e outras funções é intensa (Bryant e Julkunen-Tiitto, 1995). No estágio de plântula, a alocação de fotossintatos para substâncias como defesas químicas que não sustentam o crescimento seria seletivamente desvantajoso (Bryant *et al.*, 1992). Assim, nossos resultados de tolerância e defesa química sugerem a presença de um *'trade-off'* entre essas estratégias ao longo dos estágios de vida de *A. angustifolia*, o que responde nossa terceira questão. Assim, as plântulas mobilizaram suas reservas para a reconstrução do tecido fotossintético perdido às custas de baixos níveis de flavonóides, enquanto que as plantas juvenis apresentam maiores níveis de defesa química às custas de um ritmo mais lento de reposição da biomassa perdida. De acordo com Boege *et al.*

(2007), ‘trade-offs’ podem ocorrer quando as mudanças ontogenéticas na aquisição e disponibilidade de recursos determinam o custo-benefício de uma estratégia sobre a outra em um dado estágio ontogenético.

A resistência à herbivoria levou à mobilização de amido das sementes nas plântulas e, no caso das juvenis, à mobilização do amido principalmente das raízes, já que estas não possuíam mais as reservas da semente. Sendo assim, a mobilização de amido após o dano varia com a ontogenia, respondendo à nossa quarta pergunta. Barberis e Dalling (2008) relataram resultados muito semelhantes para *Gustavia superba*, onde o rebrotamento das plantas foi sustentado por reservas cotiledonares logo após a emergência da plântula e por reservas radiculares após o período de estabelecimento. Existem, porém, poucos estudos que avaliam o impacto do dano em plântulas. Como estas possuem ainda as reservas de suas sementes para sustentar o crescimento, nós sugerimos que haja um efeito “estabilizador” das reservas nutritivas do pinhão sobre o impacto da herbivoria em *A. angustifolia*. A maioria dos estudos com herbivoria em estágios iniciais de crescimento aponta para a importância de carboidratos não estruturais presentes nas raízes para um evento de desfolhação (Boege, 2005; Kabeya e Sakai, 2005). O primeiro observou uma tendência à diminuição de amido de raízes da lenhosa *Casearia nitida* com o aumento nos graus de dano. Já o último constatou que o estoque de carboidratos é mais importante do que a disponibilidade de nutrientes no sucesso de rebrote em *Quercus crispula*. Rodgers *et al.* (1995) simularam o ataque do herbívoro específico de *Cedrela odorata* aplicando danos moderados a severos em plantas de 14 meses de idade e observaram que, 30 dias após o dano, houve uma diminuição nas concentrações de amido nas raízes. A diminuição de amido em sementes de plântulas e em raízes das juvenis após o dano sugere a quebra de recursos estocados em açúcares simples para serem enviados para órgãos, como novas folhas, que foram intensamente produzidas pelas plantas danificadas.

De forma geral, os resultados aqui apresentados elucidam questões acerca das estratégias de resistência e estabelecimento de plantas de *A. angustifolia* em situações de risco, e de suas respostas fisiológicas a estes mecanismos.

#### AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem à Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela disponibilidade de espaço em casa de vegetação e ao Laboratório de Fisiologia Vegetal da mesma universidade pelo apoio nas análises químicas. As autoras também agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas concessões de bolsas de mestrado à primeira autora e de pesquisa à segunda e ao Programa de Pós-Graduação em Botânica pelo apoio institucional.

## LITERATURA CITADA

- ALABARCE, F. 2010. Capacidade e intensidade de rebrote de plântulas de *Araucaria angustifolia* (Pinheiro Brasileiro). Trabalho de conclusão.UFRGS, Porto Alegre, 37p.
- ATWELL, B. J., P. E. KRIEDEMANN, and C. G. N. TURNBULL. 1999. *Plants in Action: Adaptation in Nature, Performance in Cultivation*. South Yarra, Australia: Macmillan Education.
- BARBERIS, I. M., and J. W. DALLING. 2008. The effect of light, seed size and biomass removal on cotyledon reserve use and root mass allocation in *Gustavia superba* seedlings. *Journal of tropical ecology* 24: 607-617.
- BARTON, K. E., and J. KORSHEVA. 2010. The ontogeny of plant defense and herbivory: Characterizing general patterns using meta-analysis. *The American Naturalist* 175: 481-493.
- BERENBAUM, M. R., A. R. ZANGERL, and J. K. NITAO. 1986. Constraints on chemical coevolution: wild parsnips and the parsnip webworm. *Evolution* 40: 1215-28.
- BERENDSE, F., and W. T. ELBERSE. 1990. Competition and nutrient availability in heathland and grassland ecosystem. Pages 93–116 *In*: J. B. Grace and D. Tilman, [eds.] *Perspectives on plant competition*. Blackburn, Caldwell, NJ.
- BOEGE, K. 2005. Influence of plant ontogeny on compensation to leaf damage. *American Journal of Botany* 92: 1632-1640.
- BOEGE, K., R. DIRZO, D. Siemens, and P. Brown. 2007. Ontogenetic switches from plant resistance to tolerance: minimizing cost with age? *Ecology Letters* 10: 177-187.
- BRYANT, J. P., P. B. REICHARDT, T. P. CLAUSEN, F. D. PROVENZA, and P. J. KUROPAT. 1992. Woody plant-mammal interactions, pp. 344-371, *In*: G. A. Rosenthal and M. R. Berenbaum [eds.]. *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*, Vol. II, 2nd ed., *Ecological and Evolutionary Processes*. Academic Press, New York,

- BRYANT, J.P., and R. JULKUNEN-TIITO. (1995) Ontogenic development of chemical defense by seedling resin birch: energy cost of defense production. *Journal of Chemical Ecology*. 21: 883-896.
- CASTELLA, P. R., and R. M. BRITZ. 2004. A floresta com araucária no Paraná: conservação e diagnóstico dos remanescentes florestais. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 233 p.
- DILLENBURG, L. B., L. M., ROSA, and M. MÓSENA. 2010. Hypocotyl of seedlings of the large-seeded species *Araucaria angustifolia*: an important underground sink of the seed reserves. *Trees* 24: 705-711.
- DONALDSON, J. R., and R. L. LINDROTH. 2007. Genetics, environment, and their interaction determine efficacy of chemical defense in trembling aspen. *Ecology* 88: 729–739.
- FEENY, P. 1970. Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars. *Ecology* 51: 565–581.
- KABEYA, D., and S. SAKAI. 2005. The relative importance of carbohydrate and nitrogen for the resprouting ability of *Quercus crispula* seedlings. *Annals of Botany* 96: 479-488.
- LOWE, T. Aspectos ecofisiológicos da alocação das reservas das sementes para as plântulas de *Araucaria angustifolia*. 2011. Tese de doutorado, UFRGS, Porto Alegre, 112p.
- MARQUIS, R. J. 1984. Leaf herbivores decrease fitness of a tropical plant. *Science* 226: 537–539.
- MAURICIO, R., M. D. BOWERS, and F. A. BAZZAZ. 1993. Pattern of leaf damage affects fitness of the annual plant *Raphanus sativus* (Brassicaceae). *Ecology* 74: 2066-2071.
- MCCREADY, R. M, A. GUGGLOZ, V. SILVEIRA, and H. S. OWENS. 1950. Determination of starch and amylase in vegetables: application to peas. *Analytical Chemistry* 22: 1156-1158.
- MCNAUGHTON, S. J. 1983. Compensatory plant growth as a response to herbivory. *Oikos* 40: 329–336.



- PAIGE, K. N., and T. G. WHITMAN. 1987. Overcompensation in response to mammalian herbivory: the advantage of being eaten. *American Naturalist* 129: 407-416.
- RODGERS, H. L., M. P. BRAKKE, and J. J. EWEL. 1995. Shoot damage effects on starch reserves of *Cedrela odorata*. *Biotropica* 27: 71 - 77.
- SANCHEZ-HIDALGO, M. E., M. MARTINEZ-RAMO, and F. ESPINOZA-GARCIA. 1999. Chemical differentiation between leaves of seedlings and spatially close adult trees from the tropical rainforest species *Nectandra ambigens* (Lauraceae): an alternative test of the Janzen-Connell model. *Functional Ecology* 13: 725–732.
- STEFFENON, V. M., R. O. NODARI, and M. P. GUERRA. 2004. Genética e conservação de *Araucaria angustifolia*: III. Protocolo de extração de DNA e capacidade informativa de marcadores RAPD para análise da diversidade genética em populações naturais. *Biotemas* 17: 47–63.
- STRAUSS, S. Y., and A. A. AGRAWAL. 1999. The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends in Ecology & Evolution* 14: 179–185.
- TAIZ, L., and E. ZEGGER. 2004. Fisiologia Vegetal. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 719p.
- TIFFIN, P. 2002. Competition and time of damage affect the pattern of selection acting on plant defense against herbivores. *Ecology* 83: 1981–1990.
- WAGNER, M. R. 1988, Induced defenses in ponderosa pine against defoliating insects, pp. 141-156, *In*: W. J. Mattson, J. Levieux, and C. Bemard-Dagen [eds.]. Mechanisms of Woody Plant Defenses Against Insects; Search for a Pattern. Springer-Verlag, New York.
- WEINER, J. 2004. Allocation, plasticity and allometry in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 6: 207–215.
- WELTZIN, J. F., S. R. ARCHER, and R. K. HEITSCHMIDT. 1998. Defoliation and woody plant (*Prosopis glandulosa*) seedling regeneration: potential versus realized herbivory tolerance. *Plant Ecology* 138: 127–135.

- WILSON, J. B. 1988. A review of evidence on the control of shoot:root ratio, in relation to models. *Annals of Botany* 61: 433-449.
- YAMAGUSHY, L. F., M. J. KATO, and P. Di MASCIO. 2009. Biflavonoids from *Araucaria angustifolia* protect against DNA UV-induced damage. *Phytochemistry* 70: 615-620.
- ZANDAVALLI, R. B. Importância da competição durante o estabelecimento e crescimento inicial da *Araucaria angustifolia*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006 (Tese de doutorado). 167p.
- ZHANG, D. Y., and X. H. JIANG. 2002. Size-dependent resource allocation and sex allocation in herbaceous perennial plants. *Journal of Evolutionary Biology* 15: 74–83.
- ZHISHEN, J., T. MENGCHENG, and W. JIANMING. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64: 555–559.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A resistência das plantas a danos por herbivoria estão relacionados com a disponibilidade de recursos da planta, ou seja, a quantidade de recursos que a semente dispõe para o desenvolvimento inicial da planta e a disponibilidade desses recursos em uma dada fase da vida da mesma. O efeito reserva pode explicar um aumento na tolerância de plantas oriundas de sementes maiores. Essa hipótese prediz que, sementes maiores retêm uma proporção maior de suas reservas, as quais podem então ser mobilizadas para o crescimento, manutenção e reparação da plântula (Green e Jupiter, 2004). No caso de *A. angustifolia*, essa possui sementes grandes e dispõe de grande quantidade de amido em seu megagametófito (Panza *et al.*, 2002), porém, dentro desta espécie existe uma variação no tamanho da semente e sabe-se que plantas oriundas de sementes maiores têm maiores chances de lidar com injúrias (Westoby *et al.*, 1996). A variação no tamanho das sementes pode ser importante para o estabelecimento de plântulas sob diferentes condições ambientais. Espécies com consideráveis variações intraespecíficas no tamanho da semente devem, portanto, aumentar seu estabelecimento em ambientes heterogêneos (Quero *et al.*, 2007). Assim, as grandes sementes do pinheiro brasileiro são de extrema importância na aptidão da planta. Em concordância com nossos resultados, Lowe (2011) observou que plantas de *A. angustifolia* oriundas de sementes maiores apresentaram maior altura e massa total, o que corresponde a uma melhor aptidão, do que plantas de sementes menores.

Porém, as sementes de *A. angustifolia* são muito vulneráveis à predação por apresentarem importante fonte nutritiva para a fauna circundante. Uma possível estratégia adaptativa é a transferência de reservas para o hipocótilo subterrâneo no período inicial do desenvolvimento da planta (Alabarce, 2010). Estudos anteriores mostraram que esta transferência ocorre cerca de cinquenta dias após a semeadura (Alabarce, 2010; Dillenburg *et al.*, 2010; Lowe, 2011). Segundo Alabarce (2010), no caso de plântulas de *A. angustifolia* virem a sofrer predação de

seus pinhões e ainda desfolhação por ataque de herbívoros, estas podem se regenerar via rebrote devido às reservas contidas no hipocótilo, um órgão subterrâneo e protegido contra perturbações.

Esta é uma característica específica do período inicial da vida desta espécie, no entanto, várias características fenotípicas das plantas podem mudar dramaticamente ao longo do seu desenvolvimento (Evans, 1972). Por exemplo, enquanto em um período inicial existe um maior investimento em parte aérea do que em raízes, nos períodos mais tardios do desenvolvimento, a planta tende a apresentar um equilíbrio entre essas partes. Ou seja, quando a fonte de recursos da planta (a semente) se esgota, a mesma deve investir igualmente nos tecidos de captação de nutrientes e produção de recursos. Os resultados desse estudo mostraram que o pinheiro brasileiro tem capacidade de resistir a perturbações e que, enquanto plântulas, esta espécie depende das reservas de sua semente para tolerar tais injúrias. Já as juvenis dependem das reservas estocadas principalmente nas raízes. Entretanto, plantas crescidas em ambientes diferentes frequentemente apresentam plasticidade a esses ambientes (Gedoc *et al.*, 1996). Assim, a resistência das plantas à herbivoria pode depender não só dos fatores internos, como a disponibilidade de recursos da semente e a partição dos mesmos na planta ao longo do seu desenvolvimento, como também de fatores externos, que podem afetar diretamente os recursos citados.

## BIBLIOGRAFIA

- Alabarce, F. (2010) Capacidade e intensidade de rebrote de plântulas de *Araucaria angustifolia* (Pinheiro Brasileiro). Trabalho de conclusão.UFRGS, Porto Alegre, 37p.
- Dillenburg, L.B., Rosa, L.M., Mósen, M. (2010) Hypocotyl of seedlings of the large-seeded species *Araucaria angustifolia*: an important underground sink of the seed reserves. *Trees* 24: 705-711.
- Evans, G.C. (1972) *The Quantitative Analysis of Plant Growth*. Berkeley, CA: University of California Press. 734 p.
- Gerdock, J.J, McConnaughay, K.D.M., Coleman, J.S. (1996) Plasticity in root/shoot partitioning: optimal, ontogenetic, or both? *Functional Ecology* 10: 44-50.
- Green, P.T., Juniper, P.A. (2004) Seed–seedling allometry in tropical rainforest trees: seed mass-related patterns of resource allocation and the, ‘reserve effect’. *Journal of Ecology* 92: 397–408.
- Lowe, T. Aspectos ecofisiológicos da alocação das reservas das sementes para as plântulas de *Araucaria angustifolia*. 2011. Tese de doutorado, UFRGS, Porto Alegre, 112p.
- Panza, V., Láinez, V., Maroder, H., Prego, I., Maldonado, S. (2002) Storage reserves and cellular water in mature seeds of *Araucaria angustifolia*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 140: 273-281.
- Quero, J.L., Villar, R., Marañón, T., Zamora, R., Poorter, L. (2007) Seed mass effect in four Mediterranean *Quercus* species (Fagaceae ) growing in contrasting light environments. *American Journal of Botany* 94: 1795– 1803.
- Westoby, M., Falster, D.S., Moles, A.T., Vesk, P.A., Wright, I.J. (2002) Plant ecological strategies: some leading dimensions of variation between species. *Annual Review of Ecological Systematics* 33:125-159.