

PRISCILA GOMES CORRÊA

**DEFESAS FOLIARES EM RESPOSTA À HERBIVORIA EM ESPÉCIES
LENHOSAS DE RESTINGA, IPOJUCA-PE**

**RECIFE – PE
2007**

PRISCILA GOMES CORRÊA

**DEFESAS FOLIARES EM RESPOSTA À HERBIVORIA EM ESPÉCIES
LENHOSAS DE RESTINGA, IPOJUCA-PE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica (PPGB) como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Botânica.

Orientadora: Profa. Dra. Rejane Magalhães de Mendonça Pimentel
Conselheiros: Profa. Dra. Jarcilene Silva de Almeida-Cortez
Prof. Dr. Haroudo Sátiro Xavier

**RECIFE – PE
2007**

PRISCILA GOMES CORRÊA

**DEFESAS FOLIARES EM RESPOSTA À HERBIVORIA EM ESPÉCIES
LENHOSAS DE RESTINGA, IPOJUCA-PE**

Dissertação defendida e aprovada com nota _____ pela banca examinadora:

Orientadora: _____

Dra. Rejane Magalhães de Mendonça Pimentel – UFRPE

Examinadora: _____

Dra. Carmen Sílvia Zickel – UFRPE

Examinadora: _____

Dra. Karina Perrelli Randau – UFPE

Examinador: _____

Dr. Gilberto Dias Alves – UPE

Suplente: _____

Dra. Suzene Izídio da Silva – UFRPE

Recife – PE

2007

A minha família e a Profª Rejane
Magalhães de Mendonça
Pimentel

“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de qualquer coisa, querer”.

Autor desconhecido

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e força de estar concluindo um sonho, pela possibilidade de crescer a cada dia.

À Professora Rejane Pimentel, pela orientação, amizade e compreensão do meu modo de ser.

Aos conselheiros: Dra. Jarcilene Silva de Almeida-Cortez e Dr. Haroudo Sátiro Xavier, pelas contribuições no desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Botânica da UFRPE, na pessoa da Prof. Dra. Carmen Sílvia Zickel e à CAPES, pela bolsa concedida.

Aos meus avós, Alcides e Lourdes, pessoas tão importantes e presentes em toda minha educação.

À minha mãe, Suely, pela vida de esforço e dedicação à família.

À minha irmã, Lyzandre, por sempre dizer “você vai conseguir”.

Aos meus tios, Célia, Zélia e Benoni, e primas, Mabel e Rebeka, por sempre estarem presentes em minha vida, dando apoio e incentivo.

Aos meus amigos e colegas de jornada, Karina e Luiza, pela amizade sincera e companheirismo sempre.

Aos companheiros do LAFF, Graça, pela grande ajuda nas análises estatísticas. À Milena, companheira de confecção de lâminas, pessoa especial que nos enche de alegria. À Aurinete, Isis, Danilo, Clébio e João, pela ótima convivência e boa vontade em ajudar sempre que preciso.

A André, grande amigo de aventuras, travessuras, planos e longas conversas, sem esquecer de Moisés, o mais novo componente desta turma.

À amiga Gláucia, que sempre torceu e acreditou na realização deste sonho. Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Porcentagem de herbivoria, relativa a folhas jovens e adultas em espécies de uma vegetação de restinga, Pernambuco, Brasil.....	45
Figura 2. Vista frontal da epiderme, faces adaxial (a) e abaxial (b), de espécies lenhosas de uma vegetação de restinga, Pernambuco, Brasil.....	46
Figura 3. Vista transversal das folhas de espécies lenhosas de uma vegetação de restinga, Pernambuco, Brasil.....	47

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Comparação entre idades foliares, relativas à porcentagem de herbivoria; espessura foliar (μm); espessura da epiderme nas faces adaxial e abaxial (μm); espessura da cutícula nas faces adaxial e abaxial (μm); densidade de tricomas e cristais ($\text{N}^{\circ}.\text{cm}^{-2}$), em espécies de uma vegetação de restinga, Pernambuco, Brasil.....	48
Tabela 2. Correlação entre a espessura foliar (μm); espessura da epiderme nas faces adaxial e abaxial (μm); espessura da cutícula nas faces adaxial e abaxial (μm); densidade de tricomas e cristais ($\text{N}^{\circ}.\text{cm}^{-2}$) e a herbivoria (%) ($p < 0.05$).....	49
Tabela 3. Metabólitos secundários encontrados em folhas de espécies lenhosas de uma vegetação de restinga, Pernambuco, Brasil.....	50

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	x
1. Introdução.....	11
2. Revisão de Literatura.....	12
2.1. Fragmentação.....	12
2.2. Interação planta-animal.....	13
2.3. Mecanismos de defesa.....	14
2.3.1. Defesas físicas ou morfológicas.....	15
2.3.1.1. Cutícula e epiderme.....	15
2.3.1.2. Apêndices epidérmicos.....	16
2.3.1.3. Estrutura anatômica.....	16
2.3.2. Defesa química.....	17
3. Referências Bibliográficas.....	19
MANUSCRITO: Defesas foliares em espécies tropicais de restinga, Ipojuca-PE, Brasil.....	26
Resumo.....	27
Abstract.....	28
Introdução.....	29
Material e Métodos.....	30
Área de estudo.....	30
Coleta das amostras.....	30
Análise morfológica.....	31
Análise fitoquímica.....	31
Análise estatística.....	32
Resultados e Discussão.....	33
Análise morfológica.....	33
Textura foliar.....	33
Espessura da cutícula x Herbivoria.....	33
Espessura da epiderme x Herbivoria.....	34
Tricomas x Herbivoria.....	35
Espessura foliar e esclerênquima x Herbivoria.....	35

Cristais x Herbivoria.....	36
Análise fitoquímica.....	37
Agradecimentos.....	39
Referências Bibliográficas.....	39
Anexo.....	51

RESUMO

A restinga apresenta uma flora marcada por fatores como elevadas temperaturas, luminosidade, solo arenoso e deposição de substâncias salinas. A desordenada exploração dos recursos naturais vem alterando processos biológicos como as interações entre planta e herbívoro, promovendo um maior investimento em defesa. As defesas relativas à supressão de tecido fotossintético são classificadas como constitutivas ou induzidas, diferindo na forma como a planta expressa a resistência, podendo ser, ainda, classificadas como químicas e físicas. Defesas físicas abrangem características estruturais da planta, enquanto que as defesas químicas são representadas por compostos secundários tóxicos ou repelentes. Esta pesquisa objetivou avaliar características anatômicas e fitoquímicas de defesa em folhas, jovens e adultas, de indivíduos de espécies ocorrentes numa vegetação de restinga sob a ação de insetos mastigadores. Foram coletadas dez folhas jovens e dez folhas adultas de cinco indivíduos das seguintes espécies: *Andira fraxinifolia* Benth. (Fabaceae), *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae), *Casearia javitensis* Kunth (Flacourtiaceae), *Guettarda platypoda* DC. (Rubiaceae), *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae), *Marlierea* cf. *regeliana* (Myrtaceae), *Myrcia bergiana* O. Berg. (Myrtaceae), *Ouratea fieldingiana* (Gardner) Engl. (Ochnaceae), *Sacoglottis mattogrossensis* Malme (Humiriaceae) e *Tetracera breyniana* Schlecht (Dilleniaceae). O material botânico foi digitalizado em *scanner* de mesa e fixado em FAA 50. Os testes fitoquímicos e a confecção de lâminas histológicas seguiram metodologia apropriada. A análise das seções histológicas foi realizada sob microscopia óptica e programa de análise de imagens. A porcentagem de herbivoria variou entre 0-21%. *O. fieldingiana* exibiu os maiores valores referentes à espessura da cutícula superior (12,77µm) e inferior (6,55µm), assim como da epiderme nas faces adaxial (76,01µm) e abaxial (25,57µm). *Andira fraxinifolia*, *Annona crassiflora* e *C. javitensis* apresentaram tricomas simples restritos a face abaxial. *G. platypoda*, *Myrcia bergiana* e *T. breyniana* apresentaram tricomas simples em ambas as faces. As análises para polifenóis e terpenóides nas espécies estudadas mostraram resultados positivos, enquanto que o teste para alcalóides exibiu resultado positivo apenas em *A. crassiflora*. As análises mostraram uma grande variedade de estratégias defensivas, entretanto os parâmetros anatômicos e porcentagem de herbivoria não apresentaram resultados significantes.

1. INTRODUÇÃO

A vegetação litorânea apresenta uma diversidade fisionômica, expressando uma composição que, em geral, mescla espécies próprias do litoral com outras provenientes de Floresta Atlântica, caatinga e cerrado (Freire 1990).

As comunidades vegetais das restingas da costa brasileira são conhecidas quanto à sua composição florística e às formações vegetais nelas encontradas (Henriques et al. 1986; Araújo e Oliveira 1988). Estas comunidades apresentam características peculiares proporcionadas por uma combinação de fatores físicos e químicos, tais como elevadas temperaturas, grande deposição de substâncias salinas e elevada exposição à luz (Henriques et al. 1986).

A crescente exploração dos recursos naturais, associada com o aumento da população humana, são os grandes responsáveis por alterações nos processos biológicos dos ecossistemas. Dessa forma, nas florestas tropicais, a grande maioria das espécies é muito susceptível à extinção, visto que ocorrem em densidades populacionais muito baixas e participam de interações ecológicas, às vezes muito estreitas e complexas, com outras espécies, como as plantas floríferas e seus polinizadores, os predadores e suas presas (Thomazini e Thomazin, 2000).

Os insetos são os principais consumidores da produção primária terrestre, constituindo cerca de 80% da vida animal e, aproximadamente, um terço de todas as espécies conhecidas. Apresentam hábito herbívoro, ao menos em uma fase do seu ciclo de vida (Bastos et al. 2003), desempenhando um importante papel ecológico, atuando como predadores, parasitas, polinizadores, fitófagos, entre outros (Ehrlich et al. 1980). Por ser um grupo bastante numeroso, apresentando uma elevada densidade e grande diversidade em termos de ambientes e habilidades para a dispersão. Os insetos são tidos como indicadores de impacto ambiental e de efeitos de fragmentação, uma vez que respondem rapidamente às alterações da qualidade e quantidade dos recursos disponíveis (Thomazini e Thomazini 2000).

Segundo estes mesmos autores, ambientes florestais fragmentados são mais vulneráveis à pragas florestais, uma vez que os insetos são muito afetados por mudanças súbitas na qualidade e quantidade dos recursos disponíveis, além de ter alteradas as relações naturais entre seus inimigos naturais. Há grandes evidências de que plantas sob estresse são mais susceptíveis ao ataque de herbívoros (Edwards e Wratten 1981).

As plantas não são passivas às agressões provocadas por vírus, bactérias, insetos e demais organismos ou agentes não-biológicos como a radiação,

temperaturas extremas e poluição. Para sobreviver, durante a evolução, as plantas desenvolveram mecanismos de resposta a estes danos (Pinheiro et al. 1999). Estas defesas são tradicionalmente classificadas em dois grupos principais, as defesas químicas, que incluem uma variedade de substâncias tóxicas, repelentes ou que dificultam a digestibilidade do tecido vegetal pelo animal. A segunda categoria refere-se às barreiras físicas ligadas aos tricomas, à superfície foliar e à cutícula (Becerra 1994).

De acordo com Peeters (2002), características estruturais foliares influenciam fortemente a distribuição e o ataque de insetos herbívoros. O conhecimento destas características estruturais tem permitido entender as relações interespecíficas, além de definir possíveis padrões anatômicos determinantes dos níveis de herbivoria na planta, assim como entender a preferência de insetos herbívoros por determinadas espécies vegetais.

Com base nestas informações, este estudo visa identificar as características anatômicas e fitoquímicas de defesa, em folhas jovens e adultas de espécies ocorrentes numa vegetação de restinga que representem estratégias capazes de minimizar a susceptibilidade à predação por herbívoros mastigadores. Foram observadas e descritas variações nos padrões de herbivoria, em folhas jovens e adultas, nas espécies estudadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fragmentação

A fragmentação da vegetação provoca várias alterações físicas e biológicas nos ambientes naturais como resultado da diminuição de ambientes e do aumento da incidência luminosa. O aparecimento abrupto de bordas florestais causa modificações microclimáticas, ocasionando mudanças na composição das espécies e na estrutura do ambiente (Tabanez et al. 1997), aumentando a mortalidade e promovendo o estabelecimento de espécies provenientes de outros ecossistemas (Laurence et al. 1998). Estes fatos provocaram uma necessidade de readaptação nestes organismos, dentre eles estão os insetos fitófagos, os quais passaram a ter suas populações aumentadas desordenadamente (Lara 1991). Desta forma, variações do meio, quanto à luminosidade e à sazonalidade, associadas às características das plantas como idade e altura da inserção da folha na copa da planta, juntamente com características específicas, como a presença de tricomas, a

espessura da cutícula, a presença de tecido esclerenquimático e a presença de compostos secundários, influenciam as taxas de herbivoria foliar (Lowman 1985).

2.2. Interação planta-animal

As relações estabelecidas entre os seres vivos, como predador-presa, herbívoro-planta e parasita-hospedeiro são exemplos de interações consumidor-presa, fundamentais na distribuição e na abundância de cada espécie, através do tempo e do espaço. Estas interações levaram ao desenvolvimento de adaptações que constituem a grande diversidade do mundo vivo (Ricklefs 2003). 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 a importância das interações, particularmente nos trópicos, onde uma forte seleção, em plantas e herbívoros, tem promovido maiores níveis de herbivoria e de investimento para a defesa, comparando com espécies de ambientes temperados. Pais (2003) afirma que estas interações influenciam, de modo significativo, a sucessão ecológica, uma vez que espécies muito atacadas podem ter suas populações diminuídas, em detrimento de outras não tão atrativas para os herbívoros.

Segundo Coley e Barone (1996), Medeiros e Morretes (1995), herbívoros provocam numerosos efeitos negativos na capacidade reprodutiva e crescimento das plantas, reduzindo sua habilidade competitiva. Dessa forma, as plantas desenvolvem características morfológicas e químicas capazes de inibir o ataque dos insetos herbívoros ou, até mesmo selecionando herbívoros favoráveis, como aqueles que vão atuar na defesa da planta. Neste caso, a planta disponibiliza alimento para os inimigos naturais destes herbívoros (Young et al. 1997).

Em geral, alterações que proporcionam uma maior dureza à folha, através de um maior desenvolvimento da espessura foliar, da epiderme e do parênquima paliçádico, atuam como defesa contra a ação de herbívoros (Milanez 1951, Wylie 1951; Lucas et al. 2000).

Segundo Edwards e Wratten (1981), a queda na produção de biomassa numa planta é conseqüência da perda progressiva do tecido fotossintético causado pelo herbívoro, ou da redução da área total da folha, visto que isto reduz a capacidade fotossintética da planta. A perda de tecidos vegetais, resultante da ação de herbívoros, implica na diminuição do desempenho da planta (Sargers e Coley 1995). Além disso, a herbivoria reduz a longevidade da folha (Risley e Crossley 1988),

como foi observado por Fadini et al. (2004), trabalhando com *Tetranychus urticae*, uma espécie de ácaro que ataca as culturas do morango. As injúrias causadas pelo ácaro provocaram perfurações na epiderme abaxial das folhas, reduzindo a taxa fotossintética em consequência dos danos causados às células do mesofilo e ao fechamento dos estômatos, acarretando, conseqüentemente, uma redução no número e peso dos frutos.

No Brasil, trabalhos que abordem a herbivoria em ambientes naturais ainda são escassos. Estudos realizados no ecossistema de cerrado mostram que, além da ação humana, a desfolha provocada pelos herbívoros determina a densidade das espécies vegetais (Fernandes et al. 2004, Souza e Coimbra 2005). Talora e Morellato (2000), realizando um estudo fenológico em uma Planície Litorânea no município de Ubatuba-SP, observaram que fatores endógenos, como herbívoros, predadores e dispersores, atuam como pressão seletiva, influenciando a periodicidade das fenofases das espécies. Menezes e Mehlig (2005), avaliando a herbivoria em *Avicennia germinans* (L.) Stearn, constataram que a desfolha provocada pela herbivoria causa a redução no crescimento da planta e no volume do tronco.

2.3. Mecanismos de defesa

Os herbívoros normalmente selecionam as plantas de acordo com o seu conteúdo nutricional. Folhas e flores jovens são freqüentemente preferidas em vez de folhas adultas, devido ao elevado conteúdo de celulose (Ricklefs 2003).

As plantas exibem uma variedade de mecanismos defensivos e modificações impressionantes a fim de reduzir a perda de tecido fotossintético pelos herbívoros (Cates 1975). De acordo com Price et al. (2001), Melo e Silva-Filho (2002), Karban e Myers (1989), as defesas podem ser constitutivas ou induzidas. Na defesa constitutiva, a planta expressa resistência de forma contínua e não depende da presença ou da ação de herbívoros, enquanto que na defesa induzida, a resistência se expressa somente após a injúria, podendo atuar diretamente sobre os herbívoros ou seus inimigos naturais. Em alguns casos, essas respostas podem levar alguns minutos ou horas, em outros, elas precisam de uma nova estação de crescimento para exibirem resistência. Ambas podem ocorrer em conjunto numa mesma planta.

Harborne (1988) dividiu as defesas em químicas e físicas. Esta última referente-se às defesas morfológicas (Lara 1991). Entre os mecanismos de defesa física ou morfológica estão os depósitos cuticulares, uma maior espessura da

epiderme, a abundância de cristais, tricomas, fibras e à dimensão e disposição destas estruturas e tecidos na folha. As defesas químicas, também importantes, são representadas pela presença de compostos secundários com propriedades tóxicas ou repelentes. Tais mecanismos reduzem a probabilidade de dano aos tecidos da planta, por alterar a palatabilidade para os animais.

Muitos estudos mostraram que as respostas das plantas à herbivoria podem reduzir, substancialmente, uma herbivoria subsequente. Esta indução sugere que alguns desses compostos químicos são de custo elevado para serem mantidos sob uma fraca pressão de pastagem. Além disso, quando os solos têm baixos níveis de nutrientes, indispensáveis para a produção de defensivos químicos, os custos da defesa são relativamente mais altos (Ricklefs 2003).

2.3.1. Defesas físicas ou morfológicas

As defesas físicas ou morfológicas abrangem todas as características estruturais da planta que atuem de forma negativa sobre o inseto, de modo a preservá-la de danos mais sérios (Lara 1991).

2.3.1.1. Cutícula e epiderme

A superfície externa da maioria dos vegetais constitui a principal defesa física contra estresses ambientais bióticos e abióticos. Folhas com uma superfície lisa dificultam a fixação e penetração dos insetos nos tecidos vitais, como o parênquima clorofiliano (Edwards e Wratten 1981), enquanto que uma cutícula espessa impede sua penetração (Lara 1991).

A área superficial de todas as plantas é coberta com uma cutícula protetora composta por substâncias lipídicas (Edwards e Wratten 1981). A cutícula representa um mecanismo de fundamental proteção, formando uma barreira mecânica contra a penetração de fungos e a ação de insetos herbívoros, protegendo, assim, os tecidos da planta (Kerstiens 1996, Eigenbrode e Espelie 1995).

Segundo Turner et al. (1995), a dureza da folha é conferida por propriedades da epiderme e de algumas células com parede espessada, imediatamente abaixo dela, como, por exemplo, a hipoderme ou feixes de fibras, lignificadas ou não. Epidermes com textura rígida pela deposição de sílica e lignina também constituem uma barreira mecânica, causando menor oviposição de algumas espécies de insetos (Lara 1991). Além disso, a cutícula e a epiderme representam fundamental proteção

para o mesófilo contra o déficit hídrico e os efeitos nocivos dos raios UV (Karabourniotis et al. 1999).

2.3.1.2. Apêndices epidérmicos

Muitas espécies vegetais não possuem superfícies lisas, mas revestidas por apêndices epidérmicos chamados tricomas. Os tricomas apresentam formas bastante variadas, podendo ser unicelulares ou multicelulares, glandulares ou não-glandulares, retos, em forma de espiral ou de gancho, tortuosos, simples, peltados ou estrelados, variando em forma e densidade de um órgão para outro. Alguns desenvolvem grossas paredes secundárias, algumas vezes impregnadas com sílica e carbonato de cálcio, formando fortes ganchos ou pontas. Outros são denominados glandulares e possuem uma estrutura vesicular que podem acumular substâncias como terpenos, gomas e/ou taninos. O contato com estas substâncias pode desencadear várias reações nos insetos, algumas apenas repelem, outras provocam a imobilidade dos membros, e há ainda aquelas que provocam toxidez e, até a morte (Levin 1973).

Os tricomas são estruturas adaptativas vantajosas para espécies vegetais de ambientes secos ou com incidência luminosa intensa, ou ainda em ambientes onde os indivíduos estão expostos ao efeito direto dos ventos, já que uma densa camada de tricomas controla a perda de água pela transpiração (Karabourniotis et al. 1999, Medeiros e Morretes 1995).

Além desta proteção contra a perda de água, em alguns casos, os tricomas se destacam por sua atuação sobre o comportamento dos insetos, promovendo suscetibilidade ou resistência. Eles funcionam como um obstáculo, através de suas características como densidade; forma e tamanho, àqueles que tentam se alimentar dos tecidos da planta, afetando a oviposição, locomoção ou seu comportamento em relação ao abrigo. Em algumas espécies vegetais ocorre uma correlação negativa entre a densidade de tricomas e as respostas alimentares, representando uma barreira física (Wei et al. 2000), além de possuírem substâncias como terpenos, fenóis, alcalóides ou outras substâncias repelentes, seja pelo odor ou sabor (Pais 2003, Wei et al. 2000).

2.3.1.3. Estrutura anatômica

Alterações na anatomia foliar também podem atuar diretamente sobre os insetos herbívoros (Peeters 2002). Características estruturais como a espessura das

epidermes, número de camadas dos tecidos que compõem o mesofilo, ou seja, atributos que contribuam para uma maior espessura foliar ou dureza dos tecidos, determinada pelo desenvolvimento de tecido esclerenquimático, além da presença de hipoderme, podem constituir um obstáculo para o ataque dos insetos herbívoros (Wei et al. 2000, Edwards e Wratten 1981, Peeters 2002).

Cristais de oxalato de cálcio são encontrados em mais de 215 famílias (Franceschi e Horner 1980, Ward et al. 1997, citados por Molano-Flores 2001), podendo ocorrer em várias partes da planta, como nas flores, folhas (Sunell e Healey 1985, Doaigey 1991), caule (Doaigey 1991), raízes e sementes (Sunell e Healey 1985). Nas plantas, a presença de cristais de oxalato de cálcio pode desempenhar um importante papel contra herbivoria, devido à sua propriedade irritante (Sunell e Healey 1979). Segundo Molano-Flores (2001), as folhas de espécies expostas à herbivoria apresentam uma maior densidade de cristais quando comparadas com aquelas não atacadas. Os cristais do tipo ráfides são geralmente interpretados como uma estrutura que desempenha importante função ecológica como mecanismo de defesa contra herbivoria.

Souza e Marquete (2000) observaram cristais, do tipo drusas, em tecidos subepidérmicos foliares, como estratégia de adaptação estrutural relacionada ao ambiente em duas espécies de Melastomataceae. Estas estruturas aumentam o aproveitamento da luz, ampliando-a, uma vez que estas plantas ocorrem em locais sombreados (Franceschi e Horner Jr. 1980, citados por Nakata 2003). Entretanto, mesmo não estando diretamente relacionadas aos processos metabólicos da fotossíntese, respiração e crescimento, proporcionam às plantas um sucesso adaptativo e uma defesa, face às pressões ambientais ou ataque por animais.

2.3.2. Defesa química

As plantas são ricas em substâncias que, aparentemente, não estão diretamente relacionadas com os processos metabólicos normais da fotossíntese, respiração e crescimento (Edwards e Wratten 1981). A estas substâncias dá-se o nome de compostos secundários, cujos produtos, embora não necessariamente essenciais para o organismo, garantem vantagens para sua sobrevivência e perpetuação da espécie no planeta (Santos 2004). Os compostos vegetais secundários podem ser divididos em três grandes classes, com base em sua estrutura química: os compostos nitrogenados, os terpenóides e os fenólicos. Entre os compostos nitrogenados estão os alcalóides, aminoácidos não-protéicos e

glicosídeos cianogênicos. Os terpenóides incluem óleos essenciais, triterpenos, saponinas, glicosídeos cardioativos. Entre os compostos fenólicos estão as ligninas, flavonóides e os taninos (Ricklefs 2003, Carvalho et al. 2004).

Durante muito tempo, os metabólitos secundários foram considerados como produtos de excreção do vegetal, sem função definida. Atualmente está confirmado que muitas destas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem o ajuste das plantas ao meio ambiente (Santos 2004). Segundo Rhodes (1994), a co-evolução das plantas, insetos, microrganismos e mamíferos conduz à síntese de metabólitos secundários com função de defesa ou atração, determinada pelas necessidades ecológicas e possibilidades biossintéticas.

Estima-se que, atualmente, o número desses compostos químicos ultrapasse 400 mil, com a maioria deles enquadrados nas classes dos compostos nitrogenados, terpenóides e fenólicos. Eles podem ser encontrados em uma ou mais partes da planta e, normalmente, suas concentrações variam com a idade (Lara 1991). Segundo Edwards e Wratten (1981), acredita-se que esta riqueza deve estar relacionada, pelo menos parcialmente, com a imobilidade das plantas, uma vez que elas não podem escapar das pressões ambientais pelo movimento; suas únicas defesas são estruturais e a composição química de substâncias produzidas e/ou acumuladas por elas. De acordo com Simas et al. (2004), alcalóides, terpenóides e glicosídeos são substâncias que desencadeiam processos comportamentais distintos, facilitando ou dificultando a preferência alimentar em formigas.

Segundo Melo e Silva-Filho (2002), as plantas produzem substâncias de defesa sob duas formas, como substâncias constitutivas que repelem os herbívoros provocando toxicidade direta ou reduzindo a digestibilidade do tecido vegetal, e como substâncias induzidas, sintetizadas em resposta ao dano causado ao tecido pelos herbívoros. Tais estratégias são capazes de prevenir um aumento do número de herbívoros, embora exista um número reduzido de insetos capazes de se adaptarem a uma determinada espécie vegetal; estas substâncias conferem à planta uma melhor capacidade reprodutiva, uma vez que os tecidos responsáveis pela fotossíntese são conservados.

Muitas plantas usam compostos químicos para reduzir a disponibilidade de suas proteínas para os herbívoros. Os carvalhos e outras plantas capturam tanino nos vacúolos de suas folhas. Esses compostos se ligam às proteínas e inibem a digestão, retardando, consideravelmente, o crescimento de lagartas e outros herbívoros. Os insetos que se alimentam de plantas ricas em tanino podem reduzir

os efeitos inibitórios do tanino, pela produção de surfactantes semelhantes a detergentes, em seus fluidos intestinais, tendendo a dispersar o complexo tanino-proteínas. Assim como os taninos, muitos dos compostos secundários interferem nas vias metabólicas específicas ou nos processos fisiológicos dos herbívoros (Ricklefs 2003).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araújo D, Oliveira R (1988) Reserva Biológica Estadual da praia do Sul (Ilha Grande, Estado do Rio de Janeiro): lista preliminar da flora. *Acta Botanica Brasilica* 1:83-94

Basset Y (1994) Palatability of tree foliage to chewing insects: a comparison between a temperate and tropical site. *Acta Oecologica* 15:181-191

Bastos CS, Galvão JCC, Picanço MC, Cecon PR, Pereira PRG (2003) Incidência de insetos fitófagos e de predadores no milho e no feijão cultivados em sistema exclusivo e consorciado. *Ciência Rural*. Santa Maria 33:391-397

Becerra JX (1994) Squirt-gun defense in *Bursera* and the chrysomelid counterploy. *Ecology* 75:1991-1996

Carvalho JCT, Gosmann G, Schenkel EP (2004) Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP de, Mentz LA, Petrovick PR *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Editora da UFRGS/UFSC, Porto Alegre, Florianópolis, pp 519-535

Cates RG (1975) The interface between slugs and wild ginger: some evolutionary aspects. *Ecology* 56:391-400

Coley PD, Barone JA (1996) Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27:305-335

Doaigey A (1991) Occurrence, type, and location of calcium oxalate crystals in leaves and stems of 16 species of poisonous plants. *American Journal of Botany* 78:1608-1616

Edwards PJ, Wratten SD (1981) Ecologia das interações entre insetos e plantas. [tradução Vera Lúcia Imperatriz Fonseca]. EPU, São Paulo

Ehrlich PR, Murphy DD, Singer MC, Sherwood CB, White RR, Brown IL (1980) Extinction, reduction, stability and increase: the response of checkerspot butterflies to the California drought. *Oecologia* 46:101-105

Eigenbrode SD, Espelie KE (1995) Effects of plant epicuticular lipids on insect herbivores. *Annu. Rev. Entomol* 40:171-194

Fadini MAM, Lemos WP, Pallini A, Venzon M, Mourão SA (2004) Herbivoria de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) induz defesa direta em morangueiro? *Neotropical Entomology* 33:293-297

Fernandes GW (1994) Plant mechanical defenses against insect herbivory. *Revta Bras. Ent.* 38:421-433

Freire MS (1990) Levantamento florístico do Parque Estadual das Dunas de Natal. *Acta Botânica Brasílica* 4:301-315

Harbone JB (1988) Introduction to ecological biochemistry. 4 ed. Academic Press, London

Henriques RPB, Araújo DSD, Hay JD (1986) Descrição e classificação dos tipos de vegetação da restinga de Carapebus, Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Botânica* 9:173-189

Johansen DA (1940) Plant Microtechnique. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York

Karabourniotis G, Bornman JF, Liakoura V (1999) Different leaf surface characteristics of threes grate cultivars affect leaf optical properties as measured white fibre optics: possible implication in stress tolerance. *Australian Journal of Plant Physiology* 26:47-53

Karban R, Meyer J (1989) Induced plant responses to herbivory. *Annual Review of Ecology and Systematics* 20:331-348

Kerstiens G (1996) Signaling across the divide: a wider perspective of cuticular structure-function relationships. *Trends in plant science* 1:124-128

Lara FM (1991) *Princípios de resistência de plantas a insetos*. 2 ed. Ícone, São Paulo

Laurence WF, Ferreira LV, Merona JMR de, Laurance SG (1998) Rain forest fragmentation and the dynamics of Amazonian tree communities. *Ecology* 79:2032-2042

Levin DA (1973) The role of trichomes in plants defense. *The Quarterly Review of Biology* 48:3-15

Lowman MD (1985) Temporal and spatial variability in insect grazing of the canopies of five Australian rainforest tree species. *Australian Journal of Ecology* 10:7-24

Lucas PW, Turner IM, Dominy NJ, Yamashita N (2000) Mechanical defences to herbivory. *Annals of Botany* 86:913-920

Markham KR (1982) *Techniques of flavonoid identification*. Academic Press, London
Medeiros J de D, Morretes BL de (1995) Dimensões da folha e herbivoria em *Miconia cabucu* Hoehne (Melastomataceae). *Biotemas* 8:97-112

Melo MO, Silva-Filho MC (2002) Plant-insect interaction: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 14:71-81

Menezes MPM, Mehlig U (2005) Desfolha maciça de árvores de *Avicennia germinans* (L.) Stearn 1958 (Avicenniaceae) por *Hyblaea puera* (Lepidoptera: Hyblaeidae), nos manguezais da Península de Bragança, Pará, Brasil. *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi* 1:221-226

Milanez FR (1951) Nota sobre a anatomia da folha de *Coccoloba cereifera* Schwake. *Rodriguésia* 14:26-39

Molano-Flores B (2001) Herbivory and concentrations affect calcium oxalate crystal formation in leaves of *Sida* (Malvaceae). *Annals of Botany* 88:387-391

Nakata PA (2003) Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Science* 164:901-909

Pais MP (2003) Artrópodos e suas relações de herbivoria como bioindicadores nos primeiros estágios de uma recomposição florestal estacional semidecidual em Ribeirão Preto, SP. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, São Paulo

Peeters PJ (2002) Correlations between leaf structural traits and the densities of herbivorous insects guilds. *Biological Journal of the Linnean Society* 77:43-65

Pinheiro MM, Sandroni M, Lummerzheim M, Oliveira de (1999) A defesa das plantas contra as doenças. *Ciência Hoje* 147:1-11

Price WS, Tsuchiya F, Arata Y (2001) Time dependence of aggregation in crystallizing lysozyme solutions probed using NMR self-diffusion measurements. *Biophysical Journal* 80:1585-1590

Ricklefs RE (2003) A economia da natureza. 5 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro

Risley LS, Crossley Jr. DA (1988) Herbivore-caused greenfall in the Southern Appalachians. *Ecology* 69:1118-1127

Rhodes MJC (1994) Physiological roles for secondary metabolites in plants: some process, many outstanding problems. *Plant. Mol. Biol.* 24:1-20

Santos RI dos (2004) Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP de, Mentz LA, Petrovick PR (2004) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Editora da UFSC/UFSC, Porto Alegre, Florianópolis, pp 403-434

Sargers CL, Coley PD (1995) Benefits and costs of plant defense in a neotropical shrub. *Ecology* 76:1835-1843

Simas VR, Costa EC, Simas CA (2004) Principais espécies vegetais herbáceas em locais forrageados e não forrageados por *Atta vollenweideri* Forel, 1983 (Hymenoptera: Formicidae). *Rev. Fac. Zôo. Vet. Agro. Uruguaiana* 10:202-213

Souza JP, Coimbra FG (2005) Estrutura populacional e distribuição espacial de *Qualea parviflora* Mart. Em um cerrado sensu strictu. *Biosci.* 21(2):65-70

Souza RCOS, Marquete O (2000) *Miconia tristis* Spring e *Miconia dorianae* Cogn. (Melastomataceae): Anatomia do eixo vegetativo e folha. *Rodriguésia* 51:133-142

Sunell LA, Healey PL (1985) Distribution of calcium oxalate crystal idioblasto in leaves of taro (*Colocasia esculenta*). *Amer. J. Bot.* 72(12):1854-1860

Sunell LA, Healey PL (1985) Distribution of calcium oxalate crystal idioblasts in corms of taro (*Colocasia esculenta*). *American Journal of Botany* 66:1029-1032

Tabanez AJ, Viana VM, Dias AS (1997) Conservação da fragmentação e do efeito de borda sobre a estrutura, diversidade e sustentabilidade de um fragmento de floresta de Planalto de Piracicaba, SP. *Revista Brasileira de Biologia* 57:47-60

Talora DC, Morellato PC (2000) Fenologia de espécies arbóreas em floresta de planície litorânea do sudeste do Brasil. *Revta Bras. Bot.* 23:13-26

Thomazini MJ, Thomazini APBW (2000) A fragmentação florestal e a diversidade de insetos nas florestas tropicais úmidas. Embrapa Acre, (Embrapa Acre. Documentos, 57), Rio Branco

Turner IM, Ong BL, Tan HYW (1995) Vegetation analysis, leaf structure and nutrient status of a Malasian heath community. *Biotropica* 27:1-12

Wei J, Zou L, Rongping K, Liping H (2000) Influence of leaf tissue structure on host feeding selection by Pea leafminer *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). Zoological Studies 39:295-300

Wylie RB (1951) Principles of foliar organization shown by sun-shade leaves, from ten species of deciduous dicotyledonous trees. American Journal of Botany 38:355-361

Young TP, Stubblefield CH, Isbell LA (1997) Ants on swollen-thorn acacias: species coexistence in a simple system. Oecologia 109:98-107

Manuscrito a ser enviado ao periódico Oecologia

Defesas foliares em espécies tropicais de restinga, Ipojuca-PE, Brasil¹

Priscila Gomes Corrêa²; Rejane Magalhães de Mendonça Pimentel³; Jarcilene Silva de Almeida-Cortez⁴; Haroudo Sátiro Xavier⁵

¹Trabalho financiado pelo CNPq/PPGB-UFRPE.

²Parte da Dissertação de Mestrado da primeira Autora. Bolsista da CAPES pelo Programa de Pós-Graduação em Botânica (PPGB) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). E-mail: correa_pq@hotmail.com

³Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, S/N. Dois Irmãos. CEP: 52171-900. Recife, Pernambuco, Brasil. E-mail: pimentel@db.ufrpe.br

⁴Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Arthur de Sá, s/n. Cidade Universitária. CEP: 50740-521. Recife, Pernambuco, Brasil. E-mail: jacortez@ufpe.br

⁵Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 125. Cidade Universitária. CEP: 50670-901. Recife, Pernambuco, Brasil. E-mail: haroudo@yahoo.com.br

Resumo - A folha, principal órgão fotossintético, tem a importante função de ajustar as plantas aos diferentes ambientes, através de modificações morfológicas, químicas e fisiológicas, como resposta aos fatores ambientais. Os insetos mastigadores, principais consumidores de tecido foliar, prejudicam o desempenho das plantas através do consumo de tecido fotossintético. Algumas plantas sobrevivem desenvolvendo estratégias químicas e estruturais de defesa. Neste estudo foram avaliadas as características anatômicas e químicas de defesa da planta, responsáveis pela aceitabilidade ou resistência da ação de insetos herbívoros mastigadores em folhas, jovens e adultas, de indivíduos de espécies ocorrentes numa vegetação de restinga. As espécies estudadas foram: *Andira fraxinifolia* Benth. (Fabaceae), *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae), *Casearia javitensis* Kunth (Flacourtiaceae), *Guettarda platypoda* DC. (Rubiaceae), *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae), *Marlierea* cf. *regeliana* (Myrtaceae), *Myrcia bergiana* O. Berg. (Myrtaceae), *Ouratea fieldingiana* (Gardner) Engl. (Ochnaceae), *Sacoglottis matogrossensis* Malme (Humiriaceae), *Tetracera breyniana* Schlecht (Dilleniaceae). Foram coletadas dez folhas jovens e dez folhas adultas de cinco indivíduos de cada espécie. Todo o material botânico foi digitalizado em *scanner* de mesa e fixado em FAA 50. Os testes fitoquímicos e a confecção de lâminas histológicas seguiram metodologia apropriada. A análise anatômica foi realizada sob microscopia óptica e programa de análise de imagens. *Ouratea fieldingiana* apresentou maiores valores para espessura da cutícula e epiderme, comparando com outras espécies estudadas. No entanto *Annona crassiflora* exibiu maior espessura foliar sendo a terceira espécie menos atacada por herbívoros. As espécies *H. speciosa* e *S. matogrossensis* apresentaram menores áreas de lâmina foliar subtraídas por herbívoros, provavelmente como uma resposta à presença de látex e rutina, indicando uma defesa química. Os caracteres anatômicos e a porcentagem de herbivoria apresentaram correlação negativa sem significância. Contudo, as análises fitoquímicas e anatômicas exibiram uma grande variedade de estratégias defensivas, como o resultado positivo para as principais classes de metabólitos secundários (alcalóides, compostos fenólicos, saponosídeos) e caracteres anatômicos (espessura de cutícula e epiderme, presença de tricomas e cristais e tecidos esclerenquimático).

Palavras-chave: herbivoria, folha, defesas anatômicas, defesas químicas.

Abstract – The leaf, the major photosynthetic plant organ, has the important function to adjust the plants to different habitats through morphological, chemical and physiological changes as a defense against the environmental factors. The chewing insects, the major consumers of leaf tissues, prejudice the behavior of the plants through the consumption of the photosynthetic tissue. Some plants survive developing chemical and structural strategies of defense. This study evaluated the anatomical and chemical characteristics of defense in plants responsible to the acceptability or resistance to the herbivorous chewing insects in leaves, young and mature, in individuals of species occurring in restinga vegetation. The studied species were: *Andira fraxinifolia* Benth. (Fabaceae), *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae), *Casearia javitensis* Kunth (Flacourtiaceae), *Guettarda platypoda* DC. (Rubiaceae), *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae), *Marlierea cf. regeliana* (Myrtaceae), *Myrcia bergiana* O. Berg. (Myrtaceae), *Ouratea fieldingiana* (Gardner) Engl. (Ochnaceae), *Sacoglottis mattogrossensis* Malme (Humiriaceae) e *Tetracera breyniana* Schlecht (Dilleniaceae). Ten young and ten mature leaves from five individuals of each species were collected. All leaves were digitized in scanner and after fixed in FAA 50. The phytochemical tests and the histological slides were made following the respective methods. The anatomical analyses were made using an optical microscope and a program of image analysis. *Ouratea fieldingiana* showed higher values to thickness of cuticle and epiderm, comparing with other studied species. However, *Annona crassiflora* exhibit greater leaf thickness and it was the third specie less attacked by herbivores. The species *H. speciosa* and *S. matogrossensis* showed smaller leaf lamina taken off by herbivorous, probably as a response to the presence of latex and rutine, indicating a chemical defense. The anatomical characters and the herbivory percentage showed a negative correlation without significance. However, the phytochemical and anatomical analysis exhibited a great variety of defensive strategies, as a positive result to the major secondary compounds classes (alkaloids, phenolic metabolites, and saponosides) and anatomical characters (cuticle and epidermal thickness, presence of trichomes, crystals and schlerenchymatic tissues).

Key-Words: herbivory, leaf, anatomical defenses, chemical defenses.

INTRODUÇÃO

A restinga é uma vegetação litorânea caracterizada pela heterogeneidade florística e estrutural, marcada por fatores ambientais como elevadas temperaturas, luminosidade, salinidade e solos arenosos (Freire 1990, Henriques et al. 1990). A crescente ação antrópica neste ecossistema pode influenciar negativamente as interações inseto-planta, ocasionada, principalmente, pela retirada das espécies vegetais nativas.

A folha, principal órgão fotossintético, é responsável pela adaptação das plantas aos mais diversos ambientes, através de modificações morfológicas, químicas e fisiológicas (Monteiro et al. 2005). A luz é um fator determinante para o estabelecimento, crescimento e sobrevivência das espécies em ambientes tropicais, no entanto, a ação de insetos herbívoros (Walters e Reich 2000) interfere nestes processos através da perda de tecido fotossintético, prejudicando o desempenho da planta. Segundo Hochuli (2001), os insetos mastigadores são tidos como os principais consumidores de tecidos foliares.

Feeny (1970) atribuiu a sobrevivência das plantas às suas próprias estratégias de defesa, com as características estruturais da folha exercendo forte influência na escolha do inseto herbívoro. Tradicionalmente, as defesas das plantas são divididas em duas categorias, químicas e físicas (Harbone 1988). A primeira categoria inclui uma variedade de substâncias tóxicas, repelentes ou que dificultam a digestão dos tecidos vegetais pelos insetos herbívoros. Inicialmente, estas substâncias foram consideradas apenas como resíduos do metabolismo primário, sem nenhum valor para a sobrevivência dos vegetais (Harbone 1988). Entretanto, esta idéia logo foi descartada, uma vez que a produção destas substâncias é altamente dispendiosa para a planta e demanda um custo adicional na manutenção de mecanismos que evitem a autotoxidez (Edwards e Wratten 1981). Certos compostos secundários são produzidos durante períodos particulares de crescimento e reprodução ou durante períodos de estresse, como os terpenóides, que têm sua produção desencadeada após lesões de tecidos vegetais, desempenhando importante papel defensivo, muitos deles apresentando ação tóxica e/ou repelentes (Turlings et al. 1990).

A segunda categoria abrange as características estruturais que atuam como uma barreira mecânica, proporcionando dureza e rigidez, dificultando a locomoção e a alimentação pelo herbívoro. Nestas, estão inclusas estruturas como tricomas ou uma superfície muito dura, lisa ou pegajosa (Becerra et al. 2001). Os tricomas, além de evitarem a perda de água, atuam, também, ou até muito mais, na defesa da planta. A grande quantidade de depósitos cuticulares na superfície da planta não está relacionada, necessariamente, apenas a uma economia de água no interior da planta. Esses depósitos além de minimizarem a perda de nutrientes por lixiviação, fazem parte de um complexo defensivo contra patógenos e herbívoros (Salatino et

al. 1993), bem como a epiderme, hipoderme ou feixes de fibras que determinam maior rigidez às folhas. (Turner et al. 1995).

Embora o valor nutritivo da planta seja fator importante na escolha dos insetos, está claro que o sabor conferido por certos compostos secundários influencia no comportamento alimentar dos insetos herbívoros (Edwards e Wratten 1981).

Este estudo objetivou avaliar as características anatômicas e químicas, consideradas como defesa da planta e responder as seguintes questões: as características anatômicas foliares em espécies nativas de uma vegetação de restinga, sob a ação de insetos herbívoros mastigadores, (a) influenciam numa maior procura de folhas jovens e adultas pelos insetos? ou (b) estimulam uma maior resistência nestas folhas? (c) os metabólitos secundários têm alguma participação nestes aspectos?

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

As espécies vegetais selecionadas para este estudo foram provenientes de uma restinga, situada numa área preservada na Reserva Particular do Patrimônio Natural Nossa Senhora do Outeiro de Maracápe. A reserva está localizada entre as coordenadas 08°31'48" S e 35°01'05" W, no Distrito de Nossa Senhora do Ó, Município de Ipojuca, Litoral Sul de Pernambuco, Brasil, distante 80 km da Cidade do Recife.

O clima da região é tropical chuvoso do tipo As', segundo Köppen, com verão seco e precipitação pluviométrica anual de, aproximadamente, 2533 mm e menor que 60 mm no mês mais seco (Inmet 2005).

Coleta das amostras

Com base nos estudos florístico e fitossociológico realizados na área por Almeida Jr. (2006), selecionaram-se dez espécies lenhosas entre as mais abundantes. Foram elas: *Andira fraxinifolia* Benth. (Fabaceae), *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae), *Casearia javitensis* Kunth (Flacourtiaceae), *Guettarda platypoda* DC. (Rubiaceae), *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae), *Marlierea cf. regeliana* (Myrtaceae), *Myrcia bergiana* O. Berg. (Myrtaceae), *Ouratea fieldingiana* (Gardner) Engl. (Ochnaceae), *Sacoglottis mattogrossensis* Malme (Humiriaceae), *Tetracera breyniana* Schlechtd (Dilleniaceae), seguindo o sistema de classificação de Cronquist (1988).

De cada espécie selecionada foram coletadas, aleatoriamente (García-Robledo 2005), dez folhas adultas e dez folhas jovens. Folhas adultas foram consideradas àquelas com a lâmina foliar totalmente expandida quando comparada às demais presentes no indivíduo,

localizadas entre o quarto e o oitavo nó, a partir do ápice do ramo. Foram consideradas folhas jovens àquelas localizadas antes do quarto nó.

Análise morfológica

Todas as folhas coletadas foram digitalizadas em *scanner* de mesa. Nas imagens digitais foram determinadas a área da lâmina foliar (cm²) e a área removida (cm²) pelo herbívoro, utilizando programa de análise de imagens, *Image Tool 3.0*, obtendo as taxas de herbivoria, expressas pela porcentagem da área foliar perdida (Medeiros e Morretes 1995, García-Robledo 2005), estimada segundo a fórmula:

$$\% \text{ herbivoria} = \frac{\text{área perdida}}{\text{área total}} \times 100$$

Posteriormente, as amostras foram fixadas em FAA 50 por um período mínimo de 48 h (Johansen 1940), e após este período, foi iniciada a confecção das lâminas histológicas semipermanentes.

As determinações da estrutura anatômica foliar foram realizadas em cortes transversais e paradérmicos da região mediana da lâmina foliar (borda e nervura). Cortes transversais foram obtidos, à mão livre, clarificados após imersão em solução de hipoclorito de sódio 10 %, neutralizados em água acética a 1:500, lavados, corados com safranina e azul de astra e montados em glicerina aquosa 50 % (Krauter 1985). Cortes paradérmicos foram obtidos de fragmentos epidérmicos, obtidos após imersão de fragmentos de folha em solução de hipoclorito de sódio a 30 % até dissociação, e posterior neutralização em água acética a 1:500, lavagem em água destilada, coloração com safranina aquosa e montagem em glicerina aquosa a 50 % (Johansen 1940). As amostras mais resistentes foram dissociadas utilizando solução de ácido crômico e ácido nítrico, 1:1 (Johansen 1940).

Imagens de secções transversais e paradérmicas foram obtidas utilizando câmera digital (5.0 Megapixel), acoplada a um microscópio óptico Zeiss, para posterior análise utilizando o programa de análise de imagens, *Image Tool*. Os caracteres estudados foram: presença/ausência, densidade de tricomas e cristais (N⁰.cm⁻²), espessura (µm) da folha, da cutícula e da epiderme, faces adaxial e abaxial.

Análise fitoquímica

Foram realizados testes qualitativos para a detecção dos principais compostos secundários alcalóides, polifenóis (cumarinas, flavonóides, proantocianidinas e

leucoantocianidinas), terpenóides (triterpenóides, esteróides, iridóides e saponosídeos), seguindo a metodologia apropriada para cada um dos metabólitos. As substâncias investigadas são consideradas por vários autores como atuantes na defesa da planta (Lowman e Box 1983, Harborne 1988, Adler et al. 2001, Reis et al. 2001, Carvalho et al. 2004, Henriques et al. 2004, Zuannazzi e Montanha 2004, Santos e Mello 2004, Simões et al. 2004, Cantarelli 2005).

As determinações fitoquímicas foram realizadas em folhas jovens e adultas, separadas em sadias e herbivoradas, cada amostra contendo 50 g, de folhas provenientes dos mesmos indivíduos sob análise anatômica. Foi realizada extração metanólica em placa de aquecimento, sob agitação até a exaustão. Os extratos foram filtrados e submetidos: 1) a cromatografia em camada delgada, utilizando aplicações de 10 µl, tendo como fase móvel a mistura de acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e água nas proporções: (100:11:11:27 v/v) (100:2:2:2 v/v) e (100:3:3:3 v/v) (100:0,5:0,5;0,5 v/v) e Éter-tolueno (50:50:50 v/v) e 2) reveladores específicos para a identificação de cada classe de substâncias investigadas: Dragendorff (alcalóides) (Wagner 1996), NEU (difenilboriloxietilamina) (flavonóides) (Neu 1956), vanilina clorídrica (proantocianidinas, leucoantocianidinas e iridóides) (Roberts 1956), U.V. 365 nm (cumarinas) (Wagner 1996) e Lieberman/ Burchard seguido de aquecimento em estufa 100° (triterpenos e esteróides) (Harborne 1998).

Foi aplicado o teste de afrogenicidade para a identificação de saponosídeos. O teste consistiu no aquecimento, em placas de Petri, de 12 mL do extrato metanólico para a eliminação do solvente. Os extratos secos foram diluídos em água destilada, colocados em tubos de ensaio, submetidos à agitação manual por aproximadamente trinta segundos e em seguida mantidos em repouso por aproximadamente cinco minutos. Em seguida, foi observada a consistência e a persistência da espuma produzida. O critério usado para avaliar a presença de saponosídeos foi a formação de uma espuma abundante e persistente por mais de 15 minutos (Costa 2001).

Análise estatística

Medidas referentes à espessura foliar, espessuras da epiderme, nas faces adaxial e abaxial, espessura da cutícula, inferior e superior e a densidade de cristais e tricomas foram obtidas em cinco folhas de cinco indivíduos por espécie. Para cada parâmetro anatômico foram testadas as diferenças entre as médias, entre idades (jovem e adulta) ($p < 0,05$) das espécies, pela análise de variância (ANOVA). Teste de correlação foi realizado entre os parâmetros e a taxa de herbivoria expressa como a porcentagem da área foliar danificada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise morfológica

Todas as espécies apresentaram padrões semelhantes de herbivoria, com áreas suprimidas iniciando da borda em direção ao interior da lamina foliar.

As taxas de herbivoria variaram entre 0-21 % nas espécies estudadas. Menezes e Mehling (2005), estudando os efeitos da herbivoria em *Avicennia germinans*, importante espécie arbórea dos manguezais, observou uma perda da área foliar de 30-50 %. Faraco e Lana (2004), avaliando o consumo foliar, também em três espécies de manguezal, verificaram um consumo de 2,3-5,4 % do limbo foliar.

Com exceção de *Ouratea fieldingiana*, as demais espécies apresentaram maiores níveis de herbivoria em folhas adultas, porém, esta variação foi estatisticamente significativa apenas em *Myrcia bergiana* e *Tetracera breyniana* (Figura 1, Tabela 1). Geralmente, as folhas jovens são mais susceptíveis a danos causados por herbívoros, visto que a qualidade nutricional das folhas muda com a idade. Os teores de água e nitrogênio diminuem, aumentando as fibras e substâncias como taninos e compostos fenólicos aumentando a resistência físico-mecânica e a espessura foliar (Scriber e Slansky 1981). Porém, algumas espécies possuem maiores quantidades de taninos e toxinas nas folhas jovens, comprometendo o desenvolvimento e a sobrevivência dos herbívoros (Fernandes 1994). Isto foi observado por Tuner (1995) e Medinaceli et al. (2004) em espécies de bosques tropicais e por Lowman e Box (1983), ao avaliar variações na resistência foliar e composição de compostos fenólicos em cinco espécies de uma floresta estacional na Austrália. Lowman e Box (1983) constataram níveis mais elevados de metabólitos secundários em folhas jovens, comprovando a preferência dos herbívoros pelos tecidos mais maduros, em duas das cinco espécies estudadas.

Textura foliar

Quanto à textura foliar, as espécies estudadas variaram entre membranácea (*Andira fraxinifolia*, *Casearia javitensis*, *Guettarda platypoda*, *Hancornia speciosa*, *Tetracera breyniana*), cartácea (*Myrcia bergiana*, *Marlierea regeliana*, *Sacoglottis matogrossensis*) e coriácea (*Annona crassiflora*, *Ouratea fieldingiana*), classificadas segundo Hickey (1973).

Espessura da cutícula x Herbivoria

Os valores referentes à espessura da cutícula superior variaram entre 4,34-12,77 µm e 2,21-6,55 µm na cutícula inferior (Tabela 1). *Ouratea fieldingiana* exibiu os maiores valores para este parâmetro, seguida por *Myrcia bergiana*, *Annona crassiflora* e *Andira fraxinifolia*.

Destas, apenas *Myrcia bergiana* e *Annona crassiflora* apresentaram variação significativa entre as idades foliares, sempre maior nas folhas adultas (Tabela 1).

O teste de correlação entre a espessura da cutícula e a porcentagem de herbivoria foi negativo, com exceção das espécies *Marlierea regeliana* e *Hancornia speciosa*, porém o resultado não foi estatisticamente significativo (Tabela 2).

A cutícula constitui a primeira barreira entre as ações do meio e a folha (Linchston e Godoy 2006). De acordo com Salatino et al. (1993), os depósitos cuticulares minimizam a perda de nutrientes, por lixiviação, nas folhas. Porém, a grande quantidade de cera na superfície da planta não está necessariamente relacionada apenas à economia hídrica, mas fazendo parte de um complexo defensivo contra patógenos e herbívoros. Várias pesquisas têm sido realizadas acerca do papel dos depósitos cuticulares na defesa, entretanto são abordados, apenas, os aspectos químicos (Sugayama e Salatino 1995, Salatino et al. 1998, Escalante-Erosa et al. 2004, Wang et al. 2006) e a ornamentação das ceras epicuticulares (Nabeshima et al. 2001, Eigenbrode e Jetter 2002, Lichston e Godoy 2006), ignorando a espessura dessa estrutura como uma barreira mecânica ao ataque dos insetos herbívoros.

Embora o teste de correlação entre este parâmetro e a porcentagem de herbivoria não tenha mostrado resultado significativo, a espessura da cutícula pode estar relacionada aos menores valores de herbivoria em *Andira fraxinifolia*, *Annona crassiflora* e *O. fieldingiana* (Figura 3a, b, h) uma vez que apresentam cutícula bastante espessada e baixos níveis de herbivoria. Entre as espécies com maior espessura da cutícula, apenas *Myrcia bergiana* apresentou níveis elevados de herbivoria (Figura 3g).

Espessura da epiderme x Herbivoria

A espessura da epiderme variou entre 10,11-76,07 μm na face adaxial, e 7,25-25,57 μm na face abaxial (Tabela 1). *Ouratea fieldingiana* apresentou os maiores valores para este parâmetro, seguida por *Annona crassiflora* e *Guettarda platypoda*. O menor valor correspondeu à espécie *Sacoglottis mattogrossensis*.

Segundo Hermoso et al. (1997), além da composição química, o caráter de resistência de uma planta está associado aos padrões anatômicos, como uma lâmina foliar mais espessa e uma epiderme composta por várias camadas. Neste estudo não foi observado epiderme multiestratificada em nenhuma das espécies estudadas, porém *Annona crassiflora* e *O. fieldingiana* exibiram uma epiderme bastante espessa e baixos níveis de herbivoria (Figura 3b, h).

Tricomas x Herbivoria

Quanto à presença de tricomas, apenas *Hancornia speciosa*, *Marlierea regeliana*, *Ouratea fieldingiana* e *Sacoglottis mattogrossensis*, não apresentaram indumentos (Figura 2. 5a-b, 6a-b, 8a-b, 9a-b), as demais espécies exibiram tricomas tectores simples variando em densidade, forma e tamanho. *Andira fraxinifolia*, *Annona crassiflora* e *Casearia javitensis* mostraram tricomas simples restritos a face abaxial, porém escassos nesta última espécie (Figura 2. 1a-b, 2a-b, 3a-b). *Guettarda platypoda*, *Myrcia bergiana* e *Tetracera breyniana* possuem tricomas em ambas as faces sempre mais abundantes na face abaxial (Figura 2. 4a-b, 7a-b, 10a-b). Os tricomas presentes em *G. platypoda* caracterizaram-se pela presença de cristais incrustados em suas paredes (Figura 2. 4a-b; Figura 3. d). Estes dados estão de acordo com as descrições realizadas por Metcalfe e Chalk (1950).

Com relação ao número de tricomas, dentre as espécies estudadas não houve variação significativa entre as idades foliares (Tabela 1). As espécies que apresentaram indumento tiveram correlação negativa entre o número de tricomas e a porcentagem de herbivoria, no entanto os resultados não foram significativos (Tabela 2). No caso da espécie *G. platypoda* não foi possível quantificar os tricomas presentes na face abaxial devido à abundância (Figura 3. 4a-b).

De acordo com Salatino et al. (1993), os tricomas atuam muito mais como defesa do que evitando a perda de água. No entanto a taxa de herbivoria foi bastante variável entre as espécies que possuem tricomas, já que *Guettarda platypoda* e *Myrcia bergiana* exibiram grande quantidade de tricomas e mesmo assim foram bastante herbivoradas, enquanto que *Hancornia speciosa*, *Sacoglottis mattogrossensis* e *Ouratea fieldingiana* não apresentaram tricomas e foram pouco herbivoradas, indicando que a presença de tricomas não foi fator de influência na herbivoria.

Espessura foliar e Esclerênquima x Herbivoria

A espessura foliar variou entre 171,01-434,25 µm. *Andira fraxinifolia* apresentou o menor valor para este parâmetro e *Annona crassiflora* o maior valor. Com exceção de *Sacoglottis mattogrossensis* e *Tetracera breyniana*, as demais espécies possuíram maiores valores relativos à espessura nas folhas adultas (Tabela 1). De acordo com Wei et al. (2000), a estruturação física foliar, tais como espessura, espessura das paredes da epiderme, densidade dos parênquimas paliçádico e esponjoso, pode exercer importante papel, influenciando a oviposição e a alimentação pelos insetos herbívoros.

Além de bastante espessas, *Annona crassiflora* possui folhas ricas em tecido esclerênquimático, com esclereídeos distribuídos por todo mesofilo (Figura 3b). Na nervura

principal observou-se calotas de fibras e células pétreas rodeando o feixe vascular. Segundo Turner et al. (1995), as fibras esclerênquimáticas são as principais responsáveis pela maior dureza das folhas. Desta forma, a espessura foliar associada à riqueza de tecido esclerênquimático proporciona textura coriácea às folhas desta espécie, dificultando a alimentação pelo herbívoro, esclarecendo os baixos níveis de herbivoria na espécie. García et al. (2001).

Assim como *Andira fraxinifolia*, *Annona crassiflora*, *Ouratea fieldingiana* e *S. mattogrossensis* exibiram calotas de fibras circundando os feixes vasculares (Figura 3a, b, h, i). *Hancornia speciosa* foi a segunda espécie com maior espessura foliar, no entanto suas folhas são mais membranáceas, e não mostraram abundância de tecido esclerenquimático, mesmo assim, apresentou maior resistência à herbivoria.

Cristais x Herbivoria

Quanto à presença de cristais de oxalato de cálcio, *Sacoglottis mattogrossensis* e *Casearia javitensis* apresentaram raros cristais monohídricos no tecido parênquimático observados apenas nas folhas adultas. A presença de cristais monohídricos também foi observada em *Myrcia bergiana*. Cristais do tipo drusas foram observados em *Guettarda platypoda*, *Ouratea fieldingiana* e *Marlierea cf. regeliana*, destas apenas *O. fieldingiana* teve variação significativa no número de cristais entre as idades, sempre maior nas folhas adultas (Tabela 1). De acordo com Volk et al. (2002), cristais de oxalato de cálcio são comuns nas células de vários órgãos e têm como principal função remover o excesso de cálcio do sistema. Outras funções, geralmente associadas à presença destes cristais, são a de defesa da planta contra herbivoria e ou a manutenção de nutrientes como reserva de cálcio ou oxalato.

De um modo geral as espécies analisadas neste estudo mostraram correlação negativa entres os parâmetros anatômicos avaliados e a porcentagem de dano foliar, porém não foram estatisticamente significativos (Tabela 2), contrariando os resultados obtidos por Wei et al. (2000) estudando quarenta e sete espécies de 19 famílias, entre ornamentais, ervas daninhas e espécies usadas na agricultura. Estes autores encontraram correlação negativa entre a espessura das paredes da epiderme nas faces superior e inferior, densidade dos parênquimas paliçádico e esponjoso. Já Lowman e Box (1983) não observaram este comportamento em cinco espécies arbóreas de uma floresta estacional na Austrália, onde não foi encontrada uma relação bem definida entre os níveis de herbivoria e a resistência foliar nas diferentes idades. Peeters (2002) afirma que a estrutura foliar não é o único fator de influência aos insetos herbívoros. Características como fisiologia, composição química e a influência microclimática atuam em conjunto na atividade destes animais.

Análise fitoquímica

Com exceção de *Annona crassiflora*, as demais espécies apresentaram resultado negativo para alcalóides (Tabela 3). Os alcalóides encontrados em *Annona crassiflora* apresentaram coloração pouco intensa. Foram observadas quatro moléculas apolares e Rf (fator de retenção) semelhantes. Henriques et al. (2004) citam que ao longo do tempo tem sido observado que muitas plantas que produzem alcalóides são evitadas pelos herbívoros em sua dieta, como foi observado em *Annona crassiflora*. Estes mesmos autores afirmam que este fato ocorre, certamente, devido à sua toxicidade ou pela maioria dos alcalóides possuir um gosto amargo.

A análise cromatográfica para polifenóis mostrou resultado positivo em todas as espécies (Tabela 3), confirmada pela presença de flavonóides de fluorescência azul, laranja e verde, reveladas com reagente NEU e observadas em U.V. 365 nm. *Guettarda platypoda* exibiu moléculas de fluorescência mais intensa nas amostras herbivoradas, indicando teores mais elevados destas substâncias. Todas as amostras foram cromatografadas com os padrões quercetina e kempferol, porém apenas *Tetracera breyniana*, *Ouratea fieldingiana* apresentaram resultado positivo para as duas substâncias (Tabela 3). *Andira fraxinifolia* apresentou apenas kempferol, não observado nas amostras provenientes das folhas jovens saudáveis. Em *Annona crassiflora* foi observado apenas o padrão quercetina, melhor visualizado na amostra proveniente das folhas jovens herbivoradas. *Myrcia bergiana* exibiu uma molécula com Rf semelhante ao da quercetina, porém de fluorescência pouco intensa. *Casearia javitensis* apresentou moléculas de coloração mais intensa nas folhas jovens e resultado positivo apenas para o padrão quercetina.

Hancornia speciosa exibiu uma molécula de coloração esverdeada e fluorescência mais intensa nas amostras adultas, indicando a presença de ácido clorogênico quando co-cromatografadas com padrão dessa substância (extrato metanólico de alcachofra = *Cynara scolymus* L.).

Sacoglottis mattogrossensis apresentou uma molécula de coloração alaranjada indicando resultado positivo para rutina (Tabela 3). Cantarelli et al. (2005), em seu estudo com formigas cortadeiras (*Acromyrmex lundii*), tratam da eficiência do uso de um inseticida obtido a partir do extrato de *Ateleia glazioviana* (Fabaceae), cujo principal flavonóide é a rutina. Estes autores citam, também, o uso popular das folhas de *Ateleia glazioviana* no combate aos insetos domésticos. Deste modo, a presença deste flavonóide pode estar relacionada aos baixos níveis de herbivoria na espécie.

Os testes para cumarinas apresentaram resultados negativos em todas as amostras (Tabela 3).

Segundo Carvalho et al. (2004), na ecologia química, os compostos fenólicos participam das inter-relações entre animais e vegetais atuando na defesa. Zuannazzi e Montanha (2004) afirmam que várias funções são atribuídas aos flavonóides, como a proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e proteção contra insetos, fungos e bactérias.

A análise para proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas revelou resultado positivo em *Myrcia bergiana*; *O. fieldingiana*; *S. mattogrossensis* e *H. speciosa* (Tabela 3), com uma única molécula de leucoantocianidina fracamente corada em *Marlierea regeliana* e *T. breyniana*. Nesta última observou-se a ausência de uma molécula de uma leucoantocianidinas na amostra adulta herbivorada. *C. javitensis* revelou apenas proantocianidinas condensadas. Esses compostos da classe dos polifenóis são taninos com papel biológico envolvido na defesa química das plantas contra o ataque de herbívoros vertebrados ou invertebrados e contra microorganismos patogênicos, inibindo a alimentação pela diminuição da palatabilidade pelo sabor adstringente, dificultando a digestão pela formação de complexos dos taninos com as enzimas digestivas, formando produtos tóxicos no trato digestivo (Santos e Mello 2004).

Os testes para saponosídeos revelaram resultados positivos exceto em *Myrcia begiana*, com espuma consistente e persistente nas demais espécies. Simões et al. (2004), afirma que as saponinas estão entre os triterpenos e esteróides de grande importância vegetal na defesa contra insetos e microrganismos.

Para a análise de iridóides todas as amostras foram cromatografadas com padrão ipolamiida, revelando resultado negativo para esta substância, porém *H. speciosa* exibiu duas moléculas de coloração pouco intensa, pertencente a esta classe de substância.

Hancornia speciosa, *S. mattogrossensis*, *G. platypoda*, *C. javitensis*, *A. fraxinifolia*, *M. bergiana*, *T. breyniana* e *M. regeliana*, exibiram moléculas de coloração avermelhada quando observadas em U.V. 365 nm, indicando a presença de triterpenos e esteróides.

Com base nas informações obtidas neste estudo, podemos inferir que a diferença nos níveis de herbivoria observada nas folhas das espécies analisadas pode ser devido à composição química e física das folhas. Embora as análises estatísticas não tenham mostrado influência significativa, as variedades estruturais e químicas apresentadas pelas espécies sugerem uma interação entre as estratégias de defesa física e química, exceto nas espécies *C. javitensis*, *H. speciosa* e *S. mattogrossensis*, uma vez que estas espécies não possuíram estratégias físicas de defesa. No entanto, correspondem às espécies com baixos níveis de herbivoria, indicando que a estratégia química de defesa prevalece.

H. speciosa, espécie que mostrou maior resistência, apresentou em suas folhas látex. Segundo Reis et al. (2001), o látex é composto de substâncias tóxicas, como triterpenos, muitas vezes letais a alguns animais e sua presença geralmente é relacionada à defesa da planta contra herbivoria.

De acordo com Sagers (1992) espécies que crescem em ambientes com alta incidência luminosa apresentam um maior grau de herbivoria do que aquelas que crescem em ambientes sombreados. Em se tratando de um ambiente de restinga, as espécies estão submetidas à moderada/alta luminosidade, um dos fatores que poderia contribuir para as elevadas taxas de herbivoria.

Agradecimentos – Ao CNPq, pelo financiamento do projeto “Aspectos Florísticos, Anatômicos e Ecológicos da vegetação da Restinga da RPPN Nossa senhora do Outeiro de Maracaípe, Ipojuca, Pernambuco” processo nº 473974/07-3, Coordenado pela Profa. Dra. Carmen Sílvia Zickel.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adler PB, Raff DA, Lauenroth WK (2001) The effect of grazing on the spatial heterogeneity of vegetation. *Oecologia* 128:465-479

Almeida Jr. EB (2006) Fisionomia e estrutura da restinga da RPPN Nossa Senhora do Outeiro de Maracaípe, Ipojuca, Pernambuco. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Botânica, UFRPE, Recife

Becerra JX, Venable DL, Evans PH, Bowers WS (2001) Interactions between chemical and mechanical defenses in the plant genus *Bursera* and their implications for herbivores. *Amer Zool* 4:865-876

Cantarelli EB, Costa EC, Oliveira L da S, Perrando ER (2005) Efeito de diferentes doses do formicida “citromax” no controle de *Acromyrmex lundii* (Hymenoptera: Formicidae). *Ciências Florestais* 15:249-253

Carvalho JCT, Gosmann G, Schenkel EP (2004) Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP de, Mentz LA, Petrovick PR (eds) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Editora da UFRGS/UFSC, Porto Alegre, Florianópolis, pp 519-535

Costa AF (2001) Farmacognosia. III volume/Farmacognosia Experimental. 3ª ed. Revista e atualizada pelo Prof. A. Proença da Cunha. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa

Cronquist A (1988) The evolution and classification of flowering plants. 2 ed. The New York Botanical Garden, Bronx, New York

Edwards PJ, Wratten SD (1981) Ecologia das interações entre insetos e plantas. [tradução Vera Lúcia Imperatriz Fonseca]. EPU, São Paulo

Eigenbrode SD, Jetter R (2002) Attachment to plant surface waxes by an insect predator. *Integr. Comp. Biol.* 42:1091-1099

Escalante-Erosa F, Ortégón-Campos I, Parra-Tabla V, Peña-Rodríguez LM (2004) Chemical composition of the epicuticular wax of *Cnidioscolus aconitifolius*. *Rev. Soc. Quím. Méx.* 48:24-25

Faraco LFD, Lana PC (2004) Leaf-consumption levels in subtropical mangroves of Paranaguá Bay (SE Brazil). *Wetlands Ecology and Management* 12:115-122

Feeny PP (1970) Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars. *Ecology* 51:565-581

Fernandes GW (1994) Plant mechanical defenses against insect herbivory. *Revta Bras. Ent.* 38:421-433

Freire MSB (1990) Levantamento florístico do parque estadual das dunas de Natal. *Acta Botanica Brasilica* 4:41-59.

García E de, Vidal M del C, Haddad O. (2001) Características genéticas relacionadas con la resistencia a la Sigatoga en *Musa* spp. Disponível em: www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/05/05pdf/05-023.pdf

García-Robledo C (2005) Comparación de dos métodos para medir herbivoría. ¿ Es la herbivoría en el Geotrópico mayor de lo que creemos? *Rev. Biol. Trop.* 53:111-114

- Harborne JB (1988) Introduction to ecological biochemistry. 4 ed. Academic Press, London
- Harborne JB (1998) Phytochemical Methods. 3 ed. Chapman & Hall, London
- Henriques AT, Limberge RP, Kerber VA, Moreno PRH (2004) Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP de, Mentz LA, Petrovick PR (eds) Farmacognosia: da planta ao medicamento. Editora da UFRGS/UFSC, Porto Alegre, Florianópolis pp 765-791
- Henriques RPB, Araújo DSD, Hay JD (1986) Descrição e classificação dos tipos de vegetação da restinga de Carapebus, Rio de Janeiro. Revista Brasileira de Botânica 9:173-189
- Hermoso L, Lindorf H, García E (1997) Anatomia foliar del variante somaclonal (CIEN BTA-03) *Musa sp.*, resistance a la Sigatoka Amarilla. Anales de Botânica Agrícola 4:63-66
- Hochuli DF (2001) Insect herbivory and ontogeny: How do growth and development influence feeding behavior, morphology and host use? Austral Ecology 26:563-570
- Hickey LJ (1973) Classification of the architecture of dicotyledonous leaves. Amer. J. Bot. 60(1):17-333
- INMET (2005) Disponível em www.inmet.gov.br. Acesso em 27/12/2006
- Isaias RM dos S, Soares GLG, Christiano J de CS, Gonçalves SJ de MR (2000) Análise comparativa entre as defesas mecânica e química de *Aspidosperma australe* Müll. Arg. e *Aspidosperma cylindrocarpon* Müll. Arg. (Apocynaceae) contra herbivoria. Floresta e Ambiente 7:14-30
- Johansen DA (1940) Plant Microtechnique. McGraw-Hill Book Co. Inc. New York
- Krauter D (1985) Erfahrungen mit Etzolds FSA-Färbung für pflanzenschnitte. Mikrokosmos 74:231-233
- Lichston JE, Godoy SAP (2006) Morfologia e teor de cera de folhas de café após aplicação de fungicida. Pesq. Agropec. Bras. 41:919-926

Lowman MD, Box JD (1983) Variation in leaf toughness and phenolic content among five species of Australian rain forest trees. *Australian Journal of Ecology* 8:17-25

Medinaceli A, Miranda-avilés F, Flores-saldaña NP, Gutierrez-Calucho (2004) Herbivoría en relación al tamaño de la planta y a las diferencias de exposición de *Pilea* sp. (Urticaceae) en la Estación Tunquini, Cotapata, La Paz-Bolivia. *Ecología en Bolivia* 39:4-8

Menezes MPM, Mehlig U (2005) Desfolha maciça de árvores de *Avicennia germinans* (L.) Stearn 1958 (Avicenniaceae) por *Hyblaea puera* (Lepidoptera: Hyblaeidae), nos manguezais da Península de Bragança, Pará, Brasil. *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi* 1:221-226

Metcalf CR, Chalk L (1950) *Anatomy of dicotyledons*. 2ª Ed. Clarendon Press, Oxford

Monteiro JEBA, Sentelhas PC, Chiavegato EJ, Guiselini C, Santiago AV, Prela A (2005) Estimación da área foliar do algodoeiro por meio de dimensões e massa das folhas. *Bragantia* 64:15-24

Medeiros JD, Morretes, BL (1995) Dimensões da folha e herbivoria em *Miconia cabucu* Hoehne. *Biotemas* 8: 97-112

Nabeshima E, Murakami M, Hiura T (2001) Effects of herbivory and light conditions on induced defense in *Quercus crispula*. *Journal of Plant Research* 114:403-409

Neu R (1956) A new Reagent for differentiating and Determining Flavones on Paper Chromatograms. *Naturwissenschaften*

Peeters PJ (2002) Correlations between leaf structural traits and the densities of herbivorous insects guilds. *Biological Journal of the Linnean Society* 77:43-65

Reis BL, Ferreira DC, Dias RR, Ribas CR (2001) Por que insetos podem alimentar-se de plantas tóxicas? *Acad. Insecta* 1:5-7

Roberts EAH, Cartwright RA, Wood DJ (1956) Flavonols of tea. *Journal of the Sciences of Food and Agriculture* 7:637-640

Sagers CL (1992) Plasticity of plant defenses in a neotropical shrub: effects of light and genotype. *Bulletin of the Ecological Society of America* 73:332

Salatino A, Kraus JE, Salatino LF (1993) Contents of tannins and their histological localization in young and adult parts of *Struthanthus vulgaris* Mart. (Loranthaceae). *Annals of Botany* 72:409- 414

Salatino A, Sugayama RL, Giuseppina N, Vilegas (1998) Effect of constituents of the foliar wax of *Didymopanax vinosum* on the foraging activity of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 86:261-266

Santos S da C, Mello JCP (2004) Taninos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP de, Mentz LA, Petrovick PR (2004) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Editora da UFRGS/UFSC, Porto Alegre, Florianópolis, pp 615-656

Scriber, JM, Slansky Jr (1981) The nutritional ecology of immature insect. *Annu. Rev. Entomol* 26:183-211

Sharma OP, Dawra RK (1991) Thin-layer chromatographic separations of lantandenes, the pentacyclic triterpenoids from (*Lantana camara*). *Plant J. Chromat* 587:351-354

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP de, Mentz LA, Petrovick PR (2004) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Editora da UFRGS/ UFSC, Porto Alegre, Florianópolis, pp519-535

Sugayama RL, Salatino A (1995) Influence of leaf epicuticular waxes from cerrado species substrate selection by *Atta sexdens rubropilosa*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 74: 261-266

Turlings TCJ, Tumlinson JH, Lewis XJ (1990) Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasp. *Science* 250: 1251-1253

Turner IM, Ong BL, Tan HYW (1995) Vegetation analysis, leaf structure and nutrient status of a Malasian heath community. *Biotropica* 27:2-12

Turner IM. (1995). Foliar defenses and habitat adversity of tree woody plant communities in Singapore. *Functional Ecology* 9: 279-84

Volk GM, Lynch-Holm VJ, Kostman TA, Goss LJ, Franceschi VR (2002) The role of druse and raphide calcium oxalate crystals in tissue calcium regulation in *Pistia stratiotes* leaves. *Plant Biol* 4:34-45

Wagner H, Bladt S (1996) *Plant drug analysis – a thin layer chromatography atlas*. SPRINGER. 2ª ed. MUNICH

Walters MB, Reich PB (2000) Seed size, nitrogen supply, and growth rate affect tree seedling survival in deep shade. *Ecology* 81:1887-1901

Wang F, Zhang P, Qiang S, Xu L (2006) Interaction of plant epicuticular waxes and extracellular esterase of *Covularia eragrostidis* during infection of *Digitaria sanguinalis* and *Festuca arundinacea* by the fungus. *Int. J. Mol. Sci.* 7:346-357

Wei J, Zou L, Kuang R, He, L (2000) Influence of leaf tissue structure on host feeding selection by pea leafminer *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). *Zoological Studies* 39:295-300

Wilcox D, Dove B, McDavid D, Greer D (2002) *Image Tool*. University of Texas Health Science Center. San Antonio. Texas.

Zuanazzi JAS, Montanha JA (2004) Flavonóides. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP de, Mentz LA, Petrovick PR (2004) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Editora da UFRGS/UFSC, Porto Alegre, Florianópolis, pp 577-614

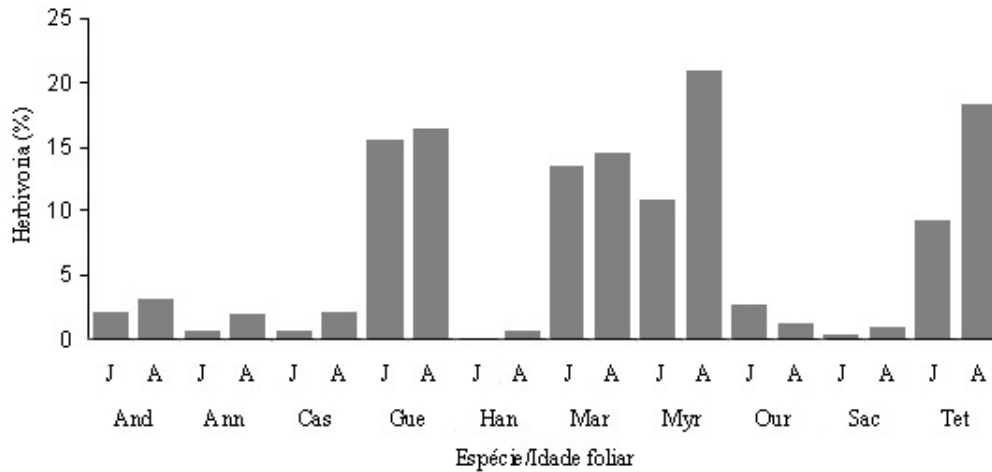


Figura 1. Porcentagem de herbivoria, relativa a folhas jovens e adultas em espécies de uma vegetação de restinga, Pernambuco, Brasil. **And** = *Andira fraxinifolia*, **Ann** = *Annona crassiflora*, **Cas** = *Casearia javitensis*, **Gue** = *Guettarda platypoda*, **Han** = *Hancornia speciosa*, **Mar** = *Marlierea cf. regeliana*, **Myr** = *Myrcia bergiana*, **Our** = *Oouratea fieldingiana*, **Sac** = *Sacoglottis mottogrossensis* e **Tet** = *Tetracera breyniana*. J = folha jovem; A = folha adulta.

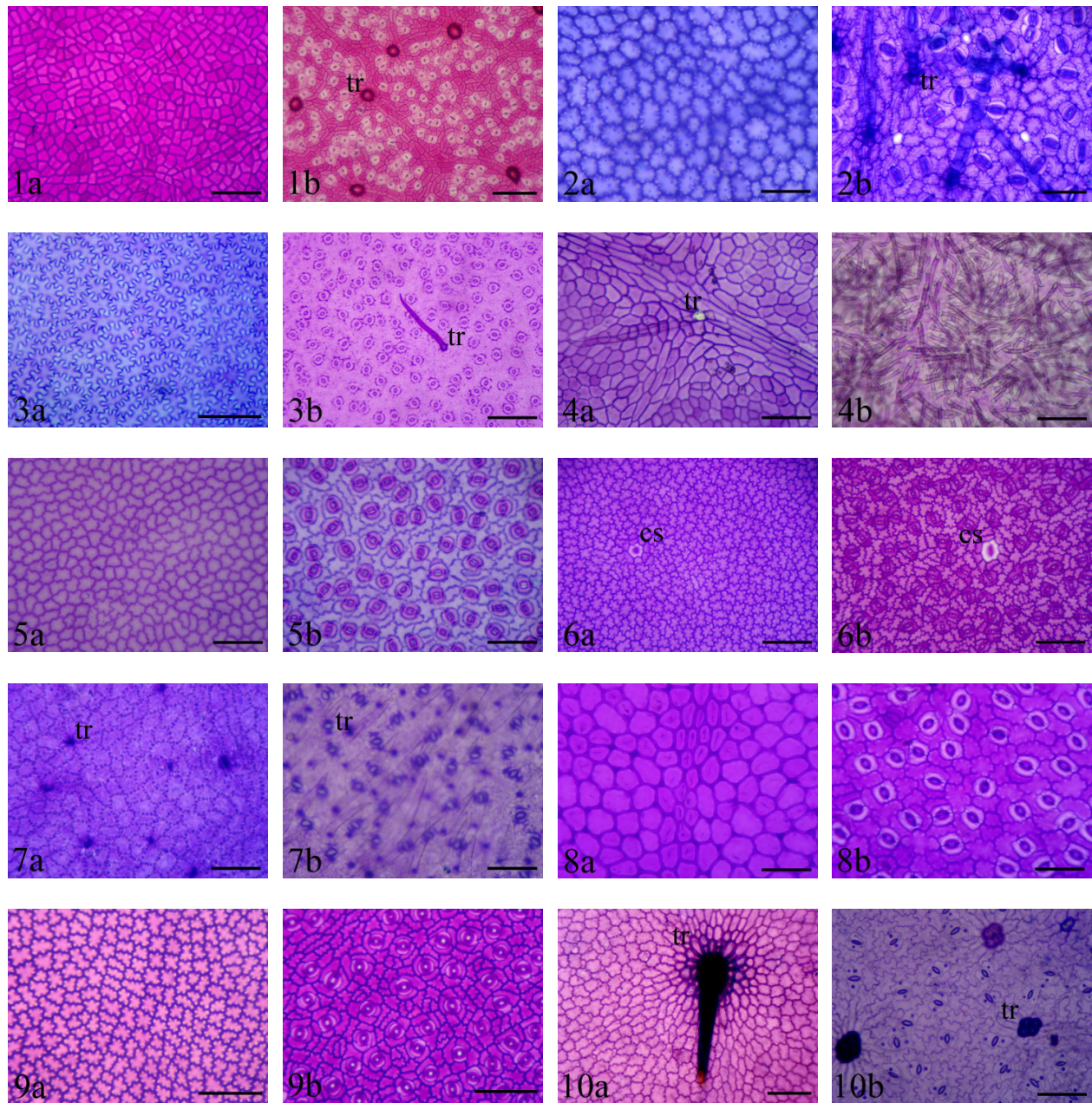


Figura 2. 1a-10b. Vista frontal da epiderme, faces adaxial (a) e abaxial (b), de espécies lenhosas de uma vegetação de restinga, Pernambuco, Brasil. 1. *Andira fraxinifolia*; 2. *Annona crassiflora*; 3. *Casearia javitensis*; 4. *Guettarda platypoda*; 5. *Hancornia speciosa*; 6. *Marlierea* cf. *regeliana*; 7. *Myrcia bergiana*; 8. *Ouratea fieldingiana*; 9. *Sacoglottis mattogrossensis*; 10. *Tetracera breyniana*. cs, canal secretor; tr, tricoma. Barras:100 μ m.

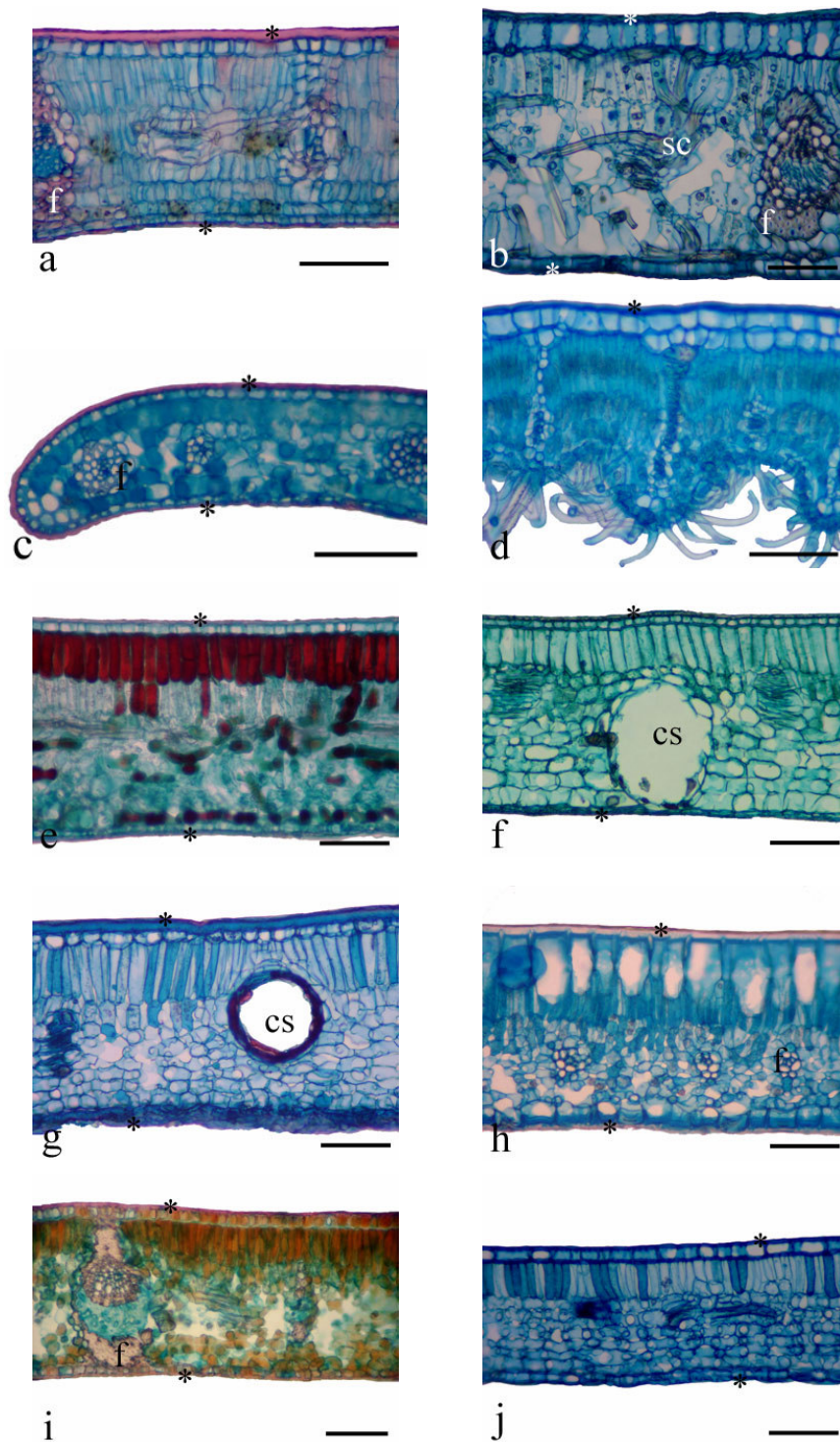


Figura 3. Vista transversal das folhas de espécies lenhosas de uma vegetação de restinga, Pernambuco, Brasil. a. *Andira fraxinifolia*; b. *Annona crassiflora*; c. *Casearia javitensis*; d. *Guettarda platypoda*; e. *Hancornia speciosa*; f. *Marlierea* cf. *regeliana*; g. *Myrcia bergiana*; h. *Ouratea fieldingiana*; i. *Sacoglottis mattogrossensis*; j. *Tetracera breyniana*. cs, canal secretor; f, fibras; sc, esclereídeo; *, cutícula. Barras: 100 μ m.

Tabela 1. Comparação entre idades foliares, relativas à porcentagem de herbivoria; espessura foliar (μm); espessura da epiderme nas faces adaxial e abaxial (μm); espessura da cutícula nas faces adaxial e abaxial (μm); densidade de tricomas e cristais ($\text{N}^\circ.\text{cm}^{-2}$), em espécies de uma vegetação de restinga, Pernambuco, Brasil.

Espécies	Idade	Herbivoria (%)	Espessura Foliar (μm)	Epiderme (μm)		Cutícula (μm)		Tricomas ($\text{N}^\circ.\text{cm}^{-2}$)		Cristais ($\text{N}^\circ.\text{cm}^{-2}$)
				AD	AB	AD	AB	AD	AB	
<i>Annona crassiflora</i>	J	0,72 ± 2,85 a	411,05 ± 52,97 a	43,68 ± 5,62 b	22,39 ± 4,43 a	6,99 ± 2,51 b	3,97 ± 1,89 b	-	0,025 ± 0,004 a	-
	A	1,79 ± 4,33 a	434,25 ± 48,32 a	48,07 ± 6,00 a	23,40 ± 5,24 a	8,75 ± 3,03 a	5,38 ± 2,13 a	-	0,027 ± 0,004 a	-
<i>Andira fraxinifolia</i>	J	1,97 ± 3,18 a	171,01 ± 23,09 b	11,95 ± 2,22 a	8,05 ± 1,46 a	7,53 ± 1,88 a	2,43 ± 0,84 a	-	0,027 ± 0,015 a	-
	A	3,04 ± 4,33 a	189,96 ± 34,79 a	13,10 ± 2,26 a	7,50 ± 1,15 a	7,73 ± 1,88 a	2,44 ± 0,77 a	-	0,030 ± 0,017 a	-
<i>Casearia javitensis</i>	J	0,51 ± 1,07 b	176,46 ± 38,81 b	8,74 ± 1,90 a	7,25 ± 1,52 a	4,53 ± 1,44 a	2,21 ± 0,62 a	-	0,002 ± 0,004 a	-
	A	2,14 ± 3,17a	206,16 ± 22,57 a	10,11 ± 3,26 a	8,23 ± 1,94 a	4,34 ± 1,08 a	2,35 ± 0,72 a	-	0,005 ± 0,003 a	0,005 ± 0,006
<i>Guettarda platypoda</i>	J	15,52 ± 16,40 a	184,64 ± 49,60 a	24,06 ± 6,85 a	9,33 ± 2,50 b	4,90 ± 1,43 a	2,51 ± 0,95 a	0,003 ± 0,001 a	*	0,049 ± 0,138 a
	A	16,44 ± 10,01 a	197,27 ± 31,20 a	22,88 ± 4,39 a	10,89 ± 2,04 a	5,30 ± 1,46 a	2,45 ± 0,70 a	0,002 ± 0,002 a	*	0,008 ± 0,006 a
<i>Hancornia speciosa</i>	J	0,00 ± 0,00 a	299,98 ± 40,61 b	13,16 ± 3,16 a	9,83 ± 2,43 a	4,79 ± 1,28 a	3,23 ± 1,15 b	-	-	-
	A	0,68 ± 0,34 a	321,76 ± 34,58 a	13,66 ± 2,11 a	9,97 ± 2,16 a	5,48 ± 1,31 a	3,89 ± 1,05 a	-	-	-
<i>Myrcia bergiana</i>	J	10,85 ± 14,72 b	265,61 ± 50,30 b	18,81 ± 3,22 a	11,04 ± 2,53 a	7,06 ± 2,42 b	4,13 ± 1,93 b	0,031 ± 0,008 a	0,174 ± 0,077 a	0,063 ± 0,008 a
	A	20,86 ± 11,04 a	301,58 ± 45,32a	17,33 ± 2,72 a	11,77 ± 2,90 a	8,90 ± 2,41 a	5,51 ± 2,47 a	0,029 ± 0,022 a	0,170 ± 0,096 a	0,026 ± 0,009 a
<i>Marlierea regeliana</i>	J	13,48 ± 10,85 a	283,04 ± 32,82 b	13,22 ± 3,86 a	9,47 ± 2,32 a	5,74 ± 1,44 a	3,89 ± 1,56 a	-	-	0,004 ± 0,007 a
	A	14,40 ± 8,85 a	303,48 ± 21,89 a	12,58 ± 1,56 a	9,56 ± 1,92 a	5,65 ± 1,43 a	3,38 ± 1,36 a	-	-	0,005 ± 0,009 a
<i>Ouratea fieldingiana</i>	J	2,59 ± 4,98 a	292,86 ± 28,26 a	74,81 ± 14,67 a	22,98 ± 6,50 a	12,77 ± 2,87 a	6,54 ± 1,73 a	-	-	0,048 ± 0,040 b
	A	1,15 ± 2,09 a	302,63 ± 23,25 a	76,01 ± 12,73 a	25,57 ± 4,18 a	12,43 ± 2,78 a	6,55 ± 1,70 a	-	-	0,083 ± 0,047 a
<i>Sacoglottis matto grossensis</i>	J	0,28 ± 0,59 a	273,39 ± 41,30 a	16,32 ± 2,95 a	11,02 ± 2,05 a	5,18 ± 1,31 b	3,16 ± 1,01 a	-	-	-
	A	0,86 ± 1,41 a	244,30 ± 29,84 b	17,06 ± 3,64 a	14,77 ± 18,14 a	5,96 ± 1,24 a	2,88 ± 0,92 a	-	-	0,010 ± 0,015
<i>Tetracera breyniana</i>	J	9,30 ± 9,17 b	193,01 ± 19,21 a	16,23 ± 3,35 a	10,76 ± 2,49 a	5,25 ± 1,40 a	3,24 ± 0,91 a	0,007 ± 0,005 a	0,031 ± 0,022 a	-
	A	18,23 ± 18,75 a	173,30 ± 38,22 b	15,16 ± 3,73 a	9,08 ± 1,70 b	4,94 ± 1,07 a	3,10 ± 1,15 a	0,006 ± 0,002 a	0,024 ± 0,012 a	-

Médias (\pm desvio padrão) entre folhas jovens e adultas, por espécie, seguidas pela mesma letra, não diferiram significativamente entre si pelo teste Tukey a 0,05.

(*) Não foi possível quantificar.

(-) Ausência.

Tabela 2. Correlação entre a espessura foliar (μm); espessura da epiderme nas faces adaxial e abaxial (μm); espessura da cutícula nas faces adaxial e abaxial (μm); densidade de tricomas e cristais ($\text{N}^\circ.\text{cm}^{-2}$) e a herbivoria (%) ($p < 0.05$).

Espécies	Idade	Espessura Foliar (μm)	Epiderme (μm)		Cutícula (μm)		Tricomas ($\text{N}^\circ.\text{cm}^{-2}$)		Cristais ($\text{N}^\circ.\text{cm}^{-2}$)
			AD	AB	AD	AB	AD	AB	
<i>Annona crassiflora</i>	J	- 0,08	- 0,00	- 0,11	0,05	- 0,12	-	- 0,17	-
	A	- 0,14	0,26	- 0,13	- 0,10	- 0,23	-	0,08	-
<i>Andira fraxinifolia</i>	J	- 0,09	- 0,07	0,38	- 0,10	- 0,18	-	- 0,53	-
	A	0,18	- 0,13	- 0,05	0,19	- 0,12	-	0,34	-
<i>Casearia javitensis</i>	J	0,26	- 0,26	- 0,06	- 0,14	0,40	-	- 0,35	-
	A	0,05	- 0,10	- 0,01	- 0,12	0,15	-	- 0,22	- 0,21
<i>Guettarda platypoda</i>	J	0,02	- 0,07	- 0,13	0,47	- 0,15	- 0,41	*	0,16
	A	- 0,22	0,27	0,09	- 0,01	0,11	- 0,39	*	- 0,13
<i>Hancornia speciosa</i>	J	-	-	-	-	-	-	-	-
	A	0,04	0,13	0,08	0,19	0,06	-	-	-
<i>Myrcia bergiana</i>	J	- 0,24	- 0,39	0,02	- 0,01	- 0,17	- 0,14	- 0,70	- 0,07
	A	- 0,23	- 0,22	- 0,32	- 0,12	- 0,02	- 0,83	- 0,23	- 0,05
<i>Marlierea regeliana</i>	J	- 0,16	0,23	- 0,10	0,27	0,33	-	-	- 0,17
	A	- 0,19	0,21	0,36	0,19	0,07	-	-	0,02
<i>Ouratea fieldingiana</i>	J	- 0,03	- 0,05	- 0,10	- 0,14	- 0,26	-	-	0,09
	A	- 0,18	0,06	0,21	- 0,02	- 0,08	-	-	0,13
<i>Sacoglottis mattogrossensis</i>	J	- 0,16	- 0,05	0,31	- 0,02	0,01	-	-	-
	A	0,13	0,11	0,31	0,34	- 0,13	-	-	- 0,35
<i>Tetracera breyniana</i>	J	0,38	0,02	0,17	- 0,19	0,36	- 0,18	- 0,30	-
	A	0,18	0,06	0,08	- 0,30	- 0,44	- 0,49	- 0,63	-

(*) Não foi possível quantificar.

(-) Ausência.

Tabela 3. Metabólitos secundários encontrados em folhas de espécies lenhosas de uma vegetação de restinga, Pernambuco, Brasil.

Espécies	Metabólitos										
	Alcalóides	Quercetina	Kempferol	Ácido clorogênico	Rutina	Cumarina	Proantocianidinas	Leucoantocianidinas	Saponosídeos	Iridóides	Triterpenos/ Esteróides
<i>Annona crassiflora</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Andira fraxinifolia</i>	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
<i>Casearia javitensis</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+
<i>Guettarda platypoda</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
<i>Hancornia speciosa</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>Myrcia bergiana</i>	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Marlieria regeliana</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
<i>Ouratea fieldingiana</i>	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>Sacoglottis mattogrossensis</i>	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
<i>Tetracera breyniana</i>	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+

(+) Resultado Positivo.

(-) Resultado Negativo.

ANEXO

Oecologia

Instructions for Authors

Oecologia publishes peer-reviewed ecological research of international interest in a timely manner. We publish reviews, advances in methodology, rapid communications, and original contributions, emphasizing the following areas:

Physiological ecology;
Plant-animal interactions;
Population ecology;
Community ecology;
Ecosystem ecology;
Global change and conservation ecology;

Manuscripts should be written in **English**. They should present new scientific findings that have not been previously published. Purely theoretical and modeling studies, microbial ecology, behavioral ecology and/or descriptive and/or natural history papers with extensive faunal and/or floral lists usually will not be considered. Manuscripts should be concisely but informatively written and should not exceed 10 printed pages. Editors are instructed to return manuscripts that appear likely to exceed this page limit (includes text, figures, and tables). An **excess page charge** will be levied for manuscripts that exceed 10 pages (Euro 100 or US \$ 90 plus 16% VAT, for each page in excess of that limit). Illustrations must be kept to a minimum and plates should be grouped whenever possible. Authors are expected to cover the expenses associated with color pages.

Manuscripts should be **electronically as PDF files** to Manuscript Central with a recommendation that the manuscript be handled by the appropriate Editorial Office. The cover letter and manuscript text including text/figures should be submitted as two separate files (see manuscript entral instructions).

Manuscripts in electronic form. Authors are required to all versions of their manuscript in electronic form through Manuscript Central.

Before final acceptance we will need a "Copyright Transfer Statement". The author(s) transfer(s) the copyright to his/their article to Springer-Verlag effective if and when the article is accepted for publication. The copyright covers the exclusive and unlimited rights to reproduce and distribute the article in any form of reproduction (printing, electronic media or any other form); it also covers translation rights for all languages and countries. For U.S. authors the copyright is transferred to the extent transferable.

Authors are encouraged to suggest the name(s) of any *Oecologia* Editorial Board member(s) appropriate to oversee their manuscript during the review process.

Manuscripts should be submitted in final form. They should be prepared in accordance with the journal's accepted practice, form and content; manuscripts should be checked carefully to exclude the need for corrections in proof. A charge will be made for changes introduced after the manuscript has been typeset. Manuscripts should be typed **double-spaced throughout and with wide margins**. Authors are encouraged to use line numbers in their manuscript in order to facilitate reviewers comments. The author may mark in the margin **where figures and tables are to be inserted**.

The **title page** should include:

- name(s) of author(s)
- title of paper
- affiliation(s)
- any footnotes referring to the title
- address for correspondence
- e-mail and FAX number of the corresponding author

Each paper should be preceded by an **abstract** of the main points.

Immediately following the abstract, up to five **key words** should be supplied, indicating the scope of the paper.

Genus and species names should be underlined or in italics.

Footnotes other than those referring to the title should be numbered consecutively.

Reference to the literature in the text should be by author's surname with the year in parentheses; for more than 2 authors, e.g., Remane et al. (1932).

The **bibliography** at the end of the paper should list in alphabetical order under the first author's name only works referred to in the text. They should be cited as follows:

Journal papers- surnames and initials of all authors, year, full title, abbreviated journal title (according to *Chemical Abstracts*), volume number, first and last page numbers.

Books - author(s), year, full title, edition, publishers and place.

Examples:

Lundgren BO, Kiessling KH (1985) Seasonal variation in catabolic enzyme activities in breast muscle of some migratory birds. *Oecologia* 66:468-471

Bewley JD, Krochko JE (1982) Desiccation tolerance. In: Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H (eds) *Physiological plant ecology II* (Encyclopedia in plant physiology, NS, vol 12B). Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 325-378

Huey RB (1982) Temperature, physiology, and ecology of reptiles. In: Gans C, Pough FH (eds) *Biology of the reptilia*, vol 12. Academic Press, London, pp 25-91

If available, the Digital Object Identifier (DOI) of the cited literature should be added at the end of the reference in question

Example

Wyatt JL, Silman MR (2004) Distance-dependence in two Amazonian palms: effects of spatial and temporal variation in seed predator communities. *oecologia* DOI 10.1007/s00442-004-1554-y

Citation of Internet Publications (Based in part on ISO 690-2)

Online Document

author (year) title of subordinate document. In: The dictionary of substances and their effects. Royal Society of Chemistry. Available via DIALOG. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Cited 15 Jan 1999

Online Database

Healthwise Knowledgebase (1998) US Pharmacopeia, Rockville. <http://www.healthwise.org>. Cited 21 Sept 1998.

Supplementary material/ private homepage

author (year) title of supplementary material. <http://www.privatehomepage.com>. Cited 22 Feb 2000

University site

author (year) title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html>. Cited 25 Dec 1999

author (year) Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt>. Cited 12 Nov 1999

Organization site

ISSN International Centre (1999) Global ISSN database. <http://www.issn.org>. Cited 20 Feb 2000

Figures are costly and should be used with discretion. An illustration is only justified if it clarifies or reduces the text. The same data should not be presented in both graph and table form. Information given in captions should not be repeated in the text. For color illustrations the author will be expected to make a contribution (Euro485 or US \$ 435, plus 16% VAT per article) towards the extra costs.

Figures, graphs and tables should always be mentioned in the text and numbered with arabic numerals. A brief descriptive legend should be provided for each figure; legends are part of the text and should be appended on a separate page. Original figures in a form suitable for reproduction should be submitted separately from the text. The top of the figure, the author and the figure number should be written lightly in soft pencil on the back of each. Copies of the figures should be supplied with each copy of the manuscript.

Good-quality **prints** should be submitted for **line drawings**. Inscriptions should be legible, with initial capital letters and appropriately scaled to the size of the drawing. Submission of digital images line drawings and half-tones, black and white and colour on diskette or some other storage medium can mean more efficient production.

Computer drawings are acceptable provided they are of comparable quality to line drawings (minimum resolution of 600 dpi). Computer-drawn curves and lines must be smooth. Lettering must be of high quality. Helvetica is the preferred font. Lettering fonts must be consistent within and among all figures.

For **half-tone illustrations**, well-contrasted photographic prints (not photocopies) should be submitted; they should be trimmed at right angles and in the desired final size. Inscriptions should be about 2 mm.

In case reduction is absolutely necessary, please state the alternative scale desired. The publisher reserves the right to reduce or enlarge illustrations.

The figures, including legends, should not exceed the print area 176x236 mm. Several figures should be grouped into a plate on one page.

Illustrations prepared in digital form must be in accordance with the special instructions that are published in this journal.

Electronic supplementary material. Data such as black and white or colour illustrations, large tables, animations, video clips, or sound recordings, that are not essential for the understanding of a printed article but yet of interest can be put on Springer-Verlag's server and will be accessible free of charge on the contents site of this journal. Such material has to be submitted in electronic form (see the special instructions that are regularly published in this journal) and will also be reviewed. Reference to this material will be given with the printed article.

Offprints 25 offprints for each paper will be supplied free of charge. Additional offprints may be ordered at cost price at the time when the proofs are returned.