



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL



**Variação temporal dos mecanismos de defesa contra herbivoria em
Ipomoea carnea subsp. *fistulosa* (Convolvulaceae)**

MILTON OMAR CÓRDOVA NEYRA

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Trigo

Campo Grande, MS

Abril/2014



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL



**Variação temporal dos mecanismos de defesa contra herbivoria em
Ipomoea carnea subsp. *fistulosa* (Convolvulaceae)**

MILTON OMAR CÓRDOVA NEYRA

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal junto ao colegiado de curso do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Trigo

Campo Grande, MS

Abril/2014

BANCA EXAMINADORA

Dr. José Roberto Trigo (Orientador)

(Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS)

Dr. Josué Raizer (Titular)

(Universidade Federal de Grande Dourados - UFGD)

Dr. Rafael Arruda (Titular)

(Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT)

Dr. Danilo Bandini Ribeiro (Suplente)

(Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS)

Cordova-Neyra, Milton Omar

Variação temporal dos mecanismos de defesa contra herbivoria em *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* (Convolvulaceae)

Milton Omar Córdova Neyra - UFMS, Campo Grande-MS, 2014. 72f.

Orientador: Dr. José Roberto Trigo

Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Palavras-chave: custo/benefício ecológico, demandas conflitantes, fenologia, inundação, interação inseto-planta

... .A cobrança deve ser proporcional às responsabilidades

*Dedico esta dissertação a minha família, pelo apoio e carinho apesar da distância,
e a meus amigos de Campo Grande que com sua amizade fizeram mais fácil o
trabalho durante o mestrado.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por cada dia de vida, e por me permitir viver tantas experiências inesquecíveis com pessoas maravilhosas durante estes dois anos.

A minha família (Norma, Eduardo, Javier, Rosy e Nelson) em especial meu irmão Norbil e minha cunhada Patricia pelo apoio incondicional durante este mestrado.

A meu orientador José Roberto Trigo por me encaminhar na área de Ecologia Química e pela constante orientação e apoio científico e logístico no desenvolvimento do projeto.

A Kamila Massuda pela inestimável ajuda principalmente no inicio do projeto, orientando a amostragem e facilitando todo seu conhecimento sobre *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa*.

Ao Rodrigo Cyrino pela grande ajuda no trabalho de campo nos meses de cheia, e o Evaldo Benedito pelas excelentes fotografias de campo.

Ao Diomar Verçosa e o Carlos Henrique Martins pela colaboração diária e constante durante o trabalho no Laboratório de Ecologia Química.

Aos Profs. Paulo Robson e Douglas Araujo pela identificação das formigas e aranhas respectivamente.

Aos meus colegas Vivian, Ivanda, Rodrigo e Evaldo pelas sugestões e dicas de português na redação do manuscrito.

À secretaria do PPGBV Ariana Françoso e o Antonio Lopes (coordenadoria de Estudos do Pantanal) pela ajuda nas questões burocráticas e por sua disponibilidade sempre.

Ao PPG Biologia Vegetal – UFMS, e aos professores por todo o que me ensinaram especialmente ao casal Pott (Arnildo e Vali) pela amizade, os presentes e por todos os ensinamentos.

A FAPESP pelo financiamento do projeto, e a CAPES pelos 12 meses de bolsa.

Aos meus conterrâneos em Campinas (Marina, Enrique, David, Claudia, Julio e Daphne) pela camaradagem e alojamento durante minhas viagens a essa cidade.

Aos meus amigos de Campo Grande, que fizeram esquecer por muitos momentos a distancia da minha cidade e da minha família, por todos os momentos vividos, foram dois anos que ficaram na minha memória por sempre.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	6
RESUMO	8
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO	10
MATERIAIS E MÉTODOS	12
1. Área de estudo.....	12
2. Organismos estudados.....	13
3. Dados fenológicos de <i>Ipomoea carnea</i> subsp. <i>fistulosa</i>	15
4. Variação temporal da herbivoria foliar	15
4.1. Percentagem de remoção de área foliar.....	15
4.2. Ocorrência de herbívoros foliares	15
5. Variação temporal dos mecanismos de defesa intrínsecos.....	16
5.1. Exsudação de látex	16
5.2. Defesas químicas.....	16
6. Variação temporal dos mecanismos de defesa extrínsecos	17
6.1. Ocorrência de inimigos naturais e outros visitantes em nectários extraflorais.....	17
6.2. Eficiência dos inimigos naturais.....	17
7. Padrões de variação temporal das diferentes defesas e a herbivoria	18
RESULTADOS	19
1. Dados fenológicos de <i>Ipomoea carnea</i> subsp. <i>fistulosa</i>	19
2. Variação temporal da herbivoria foliar	20
2.1. Percentagem de área foliar removida	20
2.2. Ocorrência de herbívoros foliares	22
2.3. Variação temporal dos mecanismos de defesa intrínsecos	23
3.1. Exsudação de látex	23
3.2. Defesas químicas	24
4. Variação temporal dos mecanismos de defesa extrínsecos	26
4.1. Ocorrência de inimigos naturais e outros visitantes em nectários extraflorais	26
4.2. Eficiência dos inimigos naturais.....	29
5. Padrões de variação temporal entre mecanismos de defesa e a herbivoria	29
DISCUSSÃO.....	32
REFERÊNCIAS	39

RESUMO

As plantas podem utilizar múltiplas defesas para minimizar os efeitos do ataque de herbívoros, variando em eficácia e intensidade, em diferentes escalas espaço - temporiais. *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* (Convolvulaceae) possui mecanismos de defesa intrínsecos (látex e defesas químicas) e extrínsecos (inimigos naturais), mas se desconhece como estes variam temporalmente. Estudamos uma população natural de *I. carnea* no Pantanal, MS, Brasil; mensurando mensalmente características fenológicas, ocorrência de herbívoros foliares e inimigos naturais, exsudação de látex, percentagem de herbivoria e quantidade de defesas químicas, e a inundação como fator abiótico, durante novembro/2012 a outubro/2013. Nossos resultados mostraram que os mecanismos de defesa intrínsecos se correlacionaram negativamente com os extrínsecos, os primeiros foram mais intensos em relação às estruturas vegetativas e os segundos às reprodutivas. A variação temporal dos mecanismos se relacionou a fatores abióticos, principalmente a inundação (diminuição dos intrínsecos e aumento dos extrínsecos), e não da herbivoria como se esperava. Os mecanismos extrínsecos se correlacionaram positivamente com os herbívoros e herbivoria, e especialmente as formigas representaram uma defesa constante e eficiente. Os custos foram baixos em relação aos benefícios ecológicos, devido a uma estratégia de defesa múltipla, combinando a estratégias fenológicas com mecanismos de defesa extrínsecos e intrínsecos, resultando em uma baixa e constante percentagem de herbivoria. Concluímos que *I. carnea* desenvolve variados mecanismos de defesa a custos ecológicos baixos em vez de mudar de defesa no âmbito dos quadros rígidos de demandas conflitantes, garantindo uma proteção constante contra herbivoria apesar das pressões ambientais e características fenológicas que determinam sua variação temporal.

Palavras-chave: custo/benefício ecológico, demandas conflitantes, fenologia, inundação, interação inseto-planta

ABSTRACT

Temporal variation of defense mechanisms against herbivory in *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* (Convolvulaceae)

Plants may use multiple defenses to minimize the effects of herbivore damage, varying in intensity and effectiveness in different spatial and temporal scales. *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* (Convolvulaceae), has defense intrinsic defense mechanisms (latex and chemical defenses) and extrinsic (natural enemies), but it is unknown how they vary temporally. We studied a natural population of *I. carnea* in the Pantanal Wetland, Brazil; each month we measured phenological characteristics, occurrence of leaf herbivores and natural enemies, latex exudation, percentage of herbivory and chemical defenses, and flood as abiotic factor, from November 2012 to October 2013. Our results showed that the intrinsic defense mechanisms were negatively correlated with extrinsic, the former were more intense compared to vegetative and the second to reproductive structures. The temporal variation of mechanisms depended on abiotic factors, especially the flood (decrease of intrinsic and increase of extrinsic) and not on herbivory as expected. Costs were low in relation to the ecological benefits, due to a strategy of multiple defense, combining phenological strategies and extrinsic and intrinsic defense mechanisms, resulting in a low and constant percentage of herbivory, ensuring successes in vegetative and sexual reproduction, without displaying possible trade-offs with the defenses. We conclude that *I. carnea* develops various defense mechanisms with low ecological costs instead of changing defense under the rigid frames of trade-offs, ensuring constant protection against herbivory in spite of environmental pressures and phenological characteristics that determine their temporal variation.

Palavras-chave: ecological cost-benefit, flood, phenology, plant-insect interactions, trade-off

INTRODUÇÃO

As plantas alteram suas características ao longo do seu ciclo de vida, em relação aos fatores ambientais, tanto abióticos (e.g. clima, solo, etc.) quanto bióticos (e.g. herbivoria, competição, etc.), que encontram no seu habitat. Especialmente, uma variação nas características de crescimento e reprodução produz complexas interações entre plantas e herbívoros. Ao longo do tempo evolutivo, a forte pressão exercida por herbívoros levou as plantas desenvolverem diferentes mecanismos de defesa para reduzir os danos por herbivoria (Marquis 1984; Coley & Kursar 1996).

Defesa é uma característica que confere um aumento na aptidão da planta na presença de herbívoros (Karban & Baldwin 1997; Strauss & Agrawal 1999; Mauricio 2000). O aumento de defesas pode ser induzido pelos ataques de herbívoros, mas como essas são custosas para a planta, seriam produzidas somente em grande quantidade quando nessas circunstâncias (Karban & Baldwin 1997; Núñez-Farfán et al. 2007). Respostas induzidas podem aumentar a aptidão da planta por meio de vários mecanismos: redução da preferência do herbívoros, mediante a indução de defesas, e redução da qualidade e quantidade do recurso (Agrawal 2006; Craig 2010). No entanto, o custo que impõe a herbivoria reduz a quantidade de recursos para reprodução e crescimento, gerando demandas conflitantes (Stowe & Marquis 2011; Lind et al. 2013), que podem afetar o equilíbrio dos indivíduos em uma população vegetal (Koricheva et al. 2004; Andrieu et al. 2011).

Embora, fatores bióticos sejam certamente importantes, maior atenção deve ser dada a fatores abióticos como determinantes das interações herbívoros planta (Heil et al. 2000; Stinchcombe 2002; Rico-Gray et al. 2012) já que influenciam a aptidão das plantas, principalmente na fenologia (Carroll & Quiring 2003; Freeman 2003) e no desenvolvimento e estabelecimento das populações de insetos herbívoros (Anu et al. 2009). Além disso, esses fatores são importantes para obter uma relação mais completa dos padrões de variação dos mecanismos de defesa em relação à variação do ambiente dentro de uma população ou comunidade (Stinchcombe 2002; Newton et al. 2010; Rico-Gray et al. 2012; Castillo et al. 2013; Falcão et al. 2013).

A produção de mecanismos de defesas tem custos e benefícios ecológicos para as plantas, diretamente relacionados com sua eficiência e limitações (Coley & Kursar 1996; Heil 2002; Strauss et al. 2002). O uso de estratégias múltiplas e graduais de defesa fornece um benefício ecológico constante, sem representar demandas conflitantes consideráveis (Koricheva

et al. 2004; Quintero & Brower 2013) que possam interferir com as demais funções da planta, como crescimento e reprodução (Vannette & Hunter 2011; Cipollini & Heil 2010; Matyssek et al. 2012). Por outro lado, a existência dessas estratégias em plantas torna necessária a reexploração das interações entre plantas e herbívoros (Sowell & Wolfe 2010; Vergés et al. 2007). O uso de múltiplos mecanismos de defesa contra herbivoria podem variar em eficácia e intensidade, e em diferentes escalas temporais e espaciais para diferentes herbívoros (Mauricio et al. 1997). Nesse contexto, estudos que incorporem abordagens múltiplas observando várias defesas sob diferentes escalas (Schneider 2001) serão os mais prováveis de definirem a natureza, as demanda conflitantes, as limitações e os custos/benefícios ecológicos dos mecanismos de defesa em plantas (Sagers & Coley 1995; Heil 2002; Strauss et al. 2002; Siemens 2003; Stowe & Marquis 2011).

Assim, as interações inseto-planta mensuradas em escalas temporais geram melhores panoramas sobre as interações entre plantas e herbívoros em relação a seu habitat, exibindo seus custos e benefícios ecológicos que podem representam para as populações vegetais, determinando assim aspectos da comunidade e de outras populações sob as mesmas condições ambientais (Heil & McKey 2003; Nuñez-Farfán et al. 2007). A forma como os organismos e as populações respondem à variação em seu ambiente (fotoperíodo e a progressão sazonal da temperatura e precipitação) depende da frequência com que ela ocorre, quanto mais extrema for a condição, menos frequente ela é. Os padrões de variação temporal podem ser intrínsecos a um sistema ecológico (Scheneider 2001; Ricklefs 2010). Assim, variações temporais são determinantes para conhecer o funcionamento da planta ao longo do seu ciclo de vida permitindo descrever demandas conflitantes entre crescimento, reprodução e defesa que foram decisivos no processo de coevolução inseto-planta (Simms & Fritz 1990; Rausher 2001; Agrawal 2006; Agrawal et al. 2006).

Assim, *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* (daqui a diante *I. carnea*) se apresenta como um ótimo modelo para explicar as interações herbívoroplanta em uma escala temporal, por apresentar uma variedade de defesas anti-herbívoros e por tolerar períodos de seca e cheia no Pantanal (macrófita anfíbia) (Pott et al. 2011). Nesse sentido, nossa hipótese foi que os fatores bióticos se correlacionariam com variação dos mecanismos de defesa em relação a suas características fenológicas em uma escala temporal. Por isso, nosso objetivo foi determinar padrões de variação temporal dos mecanismos de defesa contra herbivoria em *I. carnea*, correlacionando a história natural (dados fenológicos e herbivoria) com os mecanismos de defesa e com fatores abióticos, e assim descrever possíveis demanda conflitantes que possam representam tais características para essa espécie.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Área de estudo

O Pantanal Sul-Mato-Grossense é uma grande área úmida formada pela coalescência do rio Paraguai e seus afluentes. Apresenta clima tropical subsumido do tipo Aw (Köppen, 1931). A vegetação da planície sedimentar é um mosaico de aquáticas, campos inundáveis, florestas ripárias, savanas (cerrados), cerradão, floresta decidual, e uma grande parte de savanas e florestas pioneiras monodominantes como o algodoal (*Ipomoea* - algodão bravo) (Pott et al. 2011).

Com dados de precipitação acumulada e temperatura média mensal dos meses amostrados, obtidos no site do CEMTEC-MS (Centro de Monitoramento de Tempo, do Clima e dos Recursos Hídricos de Mato Grosso do Sul) para o Município de Corumbá, construímos um Diagrama Climático de Walter & Lieth (1967) para caracterizar climaticamente a área durante os meses de estudo. A região apresentou uma época seca e fria (julho-setembro), uma época úmida e quente (novembro-fevereiro) e uma época úmida com menores temperaturas (março a julho) (Fig. 1).

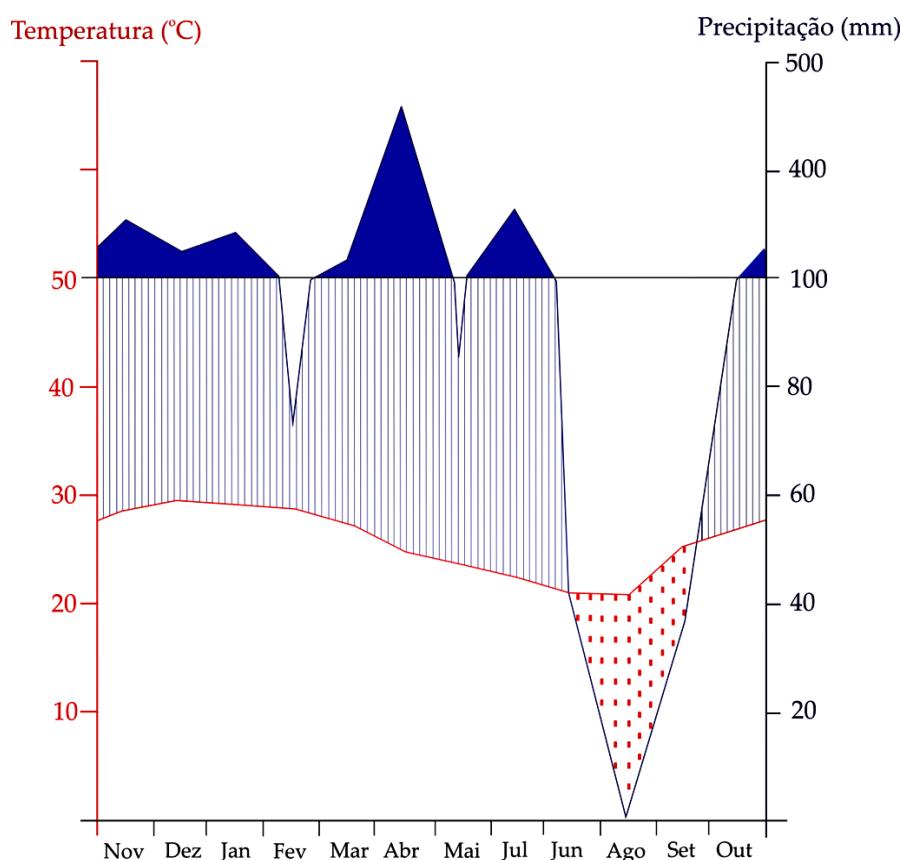


Figura 1. Diagrama climático de Walter & Lieth para o Município de Corumbá - MS (novembro 2012 – dezembro 2013). Destacam-se as épocas, úmida (área azul) e seca (área pontuada vermelha) de acordo à precipitação (linha azul) e à temperatura (linha vermelha).

Com as medidas da altura linemétrica do rio Miranda na BEP obtivemos dados dos meses de cheia e seca. Também, quando a área de estudo começou a alagar, mensuramos a altura d'água em pontos correspondentes a cada indivíduo amostrado para ser correlacionada com o restante das variáveis medidas. Segundo os dados da altura linemétrica, o nível do rio Miranda aumentou gradualmente até atingir a cheia no mês de maio permanecendo assim durante junho, julho e agosto, diminuindo bruscamente no mês de setembro e outubro. O período de cheia na área de estudo começou no mês de abril com alagamentos parciais e se intensificou no mês de maio por aumento do nível do rio Miranda, permanecendo alagada até o mês de julho, em agosto a área foi seca até o final da coleta no mês de outubro onde estava totalmente seca (Fig. 2).

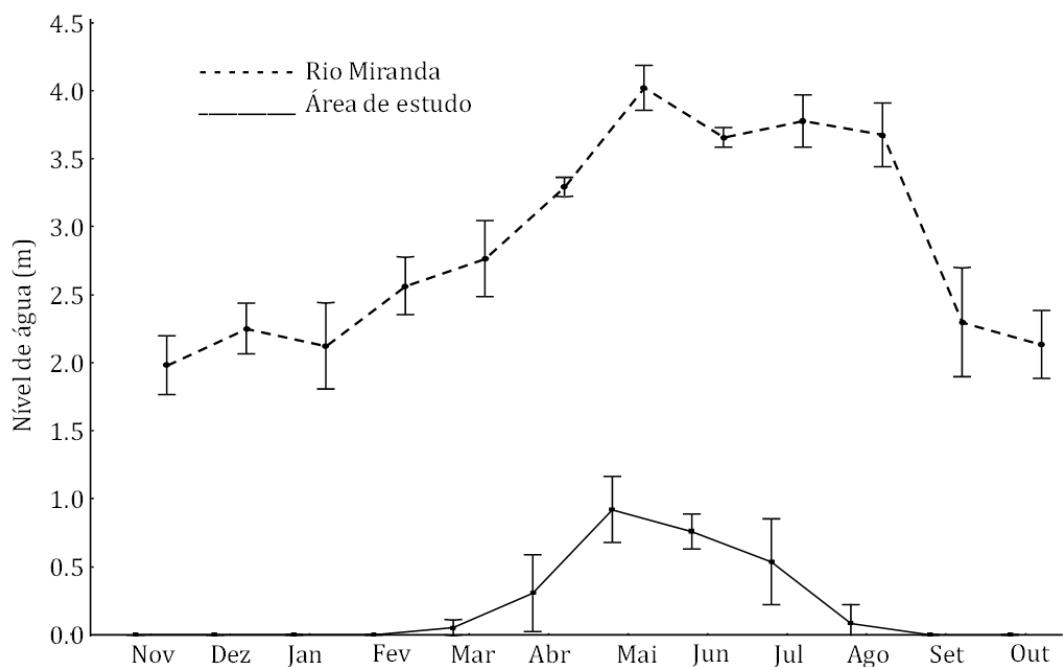


Figura 2: Inundação da área de estudo (média \pm desvio padrão), em relação à altura linemétrica do rio Miranda na Base de Estudos do Pantanal, UFMS, e à altura d'água nos indivíduos de *Ipomoea carnea*.

2. Organismos estudados

Ipomoea carnea subsp. *fistulosa* (Mart. ex Choisy) D.F. Austin (Convolvulaceae) (Austin 1977) é um arbusto neotropical perene distribuído na América Central e do Sul, inclusive no Caribe (Austin & Huáman 1996) sendo considerada uma espécie tóxica e infestante para pastagens (Tokarmia et al. 2002). No Pantanal esse arbusto alcança até 3 m de altura, ocorrendo em áreas não sombreadas que sofrem cheias sazonais (Haase 1999; Pott V. et al. 2011) (Fig. 3). Essa espécie apresenta variados mecanismos de defesa, que segundo Price et al. (1980) podem ser classificados em: (1) Intrínsecos: de ação direta distribuídas em todos os seus tecido, como

compostos químicos, como polihidroxialcaloides (Haragushi et al. 2003), látex e tricomas (Schwarz et al. 2003, 2004); e (2) Extrínsecos: de ação indireta, como os nectários extraflorais de folhas e flores (Keller 1977, 1978) que atraem inimigos naturais dos herbívoros (Steward & Keeler 1988). Em áreas úmidas, *I. carnea* acelera seu crescimento vegetativo no inicio da época chuvosa (novembro e dezembro) para uma posterior floração, frutificação e liberação de sementes no inicio da época seca (Haase 1999) (Fig. 04).



Figura 3: *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* (Mart. ex Choisy) D.F. Austin (Convolvulaceae). A. Habito B. Fruto tipo cápsula. C. Flor campanulada.

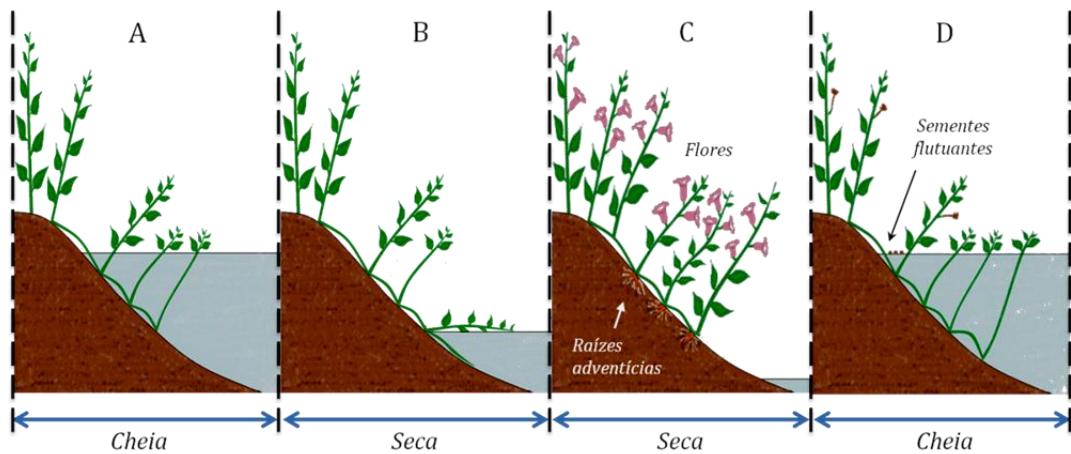


Figura 4: Ciclo fenológico de *Ipomoea carnea*. As folhas colapsam depois de frutificação e os ramos ficam submersos durante a cheia (A). Depois começam a se cobrir de raízes adventícias ao longo de toda a parte inundada (B). Durante a próxima seca, novos ramos aparecem ao longo das partes enraizadas que apresentam inflorescências (C). Os frutos amadurecem durante a seca e as sementes são dispersas por hidrocória (D) (Redesenhado de Patrick Blanck, observado em uma área úmida sazonal venezuelana / Convolvulaceae Unlimited).

3. Dados fenológicos de *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa*

Escolhemos uma população natural de *I. carnea* localizada na Estrada Parque, Ponte 14 (19°34'37''S, 57°00'42''W) nos arredores da Base de Estudos do Pantanal, da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Corumbá, MS. De novembro de 2012 até outubro de 2013, realizamos 12 amostragens nessa população. Trinta indivíduos foram escolhidos aleatoriamente percorrendo a área toda para cada amostragem mensal a uma altura mínima de 1,5 m do solo e separados por uma distância mínima de 5m.

Cada mês registramos o número de folhas, botões florais, flores, frutos verdes e maduros de três ramos. Baseados nesses dados descrevemos a variação temporal das estruturas vegetativas e reprodutivas ao longo de um ano.

4. Variação temporal da herbivoria foliar

4.1. Percentagem de remoção de área foliar

Para estimar a herbivoria foliar por mastigadores, coletamos todas as folhas de um quarto ramo semelhante aos usados na fenologia. Além disso, coletamos a primeira (1^a) e quinta (5^a) folhas totalmente expandidas dos ramos usados no registro da fenologia para estimar a herbivoria de folhas jovens e maduras respectivamente. Prensamos as folhas amostradas e as secamos à 50°C por 72 horas. Digitalizamos essas folhas em preto-e-branco, com resolução de 300 dpi. Completamos as imagens das folhas danificadas usando o programa Adobe Photoshop CS2 (Adobe Systems). As imagens foram medidas (em pontos) no programa Area Measure (MYKA Lab) e os pontos foram convertidos em cm² mediante a equação:

$$\text{Área em cm}^2 = (\text{número de pontos})/14093$$

A percentagem de área foliar removida foi calculada pela equação:

$$\text{Área removida}(\%) = \left(\frac{\text{Área da folha danificada}}{\text{Área estimada da folha antes da herbivoria}} \right) \times 100$$

As áreas calculadas de todas as folhas (ramo) foram usadas também para estimar a superfície foliar média (cm²/folha) de cada indivíduo por mês que foi considerada como um dado fenológico. A percentagem de herbivoria foi transformada em arco seno da raiz de *p* para satisfazer os critérios de normalidade. Essas características foram comparadas ao longo dos meses usando ANOVA de medidas repetidas.

4.2. Ocorrência de herbívoros foliares

Registraramos o número de insetos herbívoros se alimentando de folhas nos três ramos usados para os dados fenológicos. Os insetos foram na sua maioria classificados até o nível de

família, alguns deles até gênero e os herbívoros especialistas até espécie (*Charydotella rubicunda* e *Chelymorpha cribraria*, ambos os besouros crisomelídeos pertencentes à subfamília Cassidinae) usando literatura especializada (Costa Lima 1962; Resh & Cardé 2003; Gibb & Osseto 2006; Rafael et al 2012). Esses registros foram realizados em três horários: Manhã (08-10 h), Tarde (14-16 h), e Noite (19-21 h). Os herbívoros foram classificados de acordo à morfologia bucal em mastigadores e sugadores. Por outro lado foram identificados os herbívoros especialistas (*Charydotella rubicunda* e *Chelymorpha cribraria*) e generalistas (o restante de herbívoros foliares). As amostras dos três períodos foram somadas e analisadas entre os meses usando uma ANOVA de medidas repetidas.

5. Variação temporal dos mecanismos de defesa intrínsecos

5.1. Exsudação de látex

Medimos o volume de látex exsudado em pecíolos da primeira (1^a) e quinta (5^a) folhas totalmente expandidas nos mesmos ramos onde fizemos o registro de herbívoros. O pecíolo foi cortado na base da lâmina foliar e imediatamente o látex foi deixado fluir para dentro de um capilar graduado com 10 µL de volume. Medimos o pecíolo na região do corte usando um paquímetro (Kingtools). A quantidade de látex foi expressa pelo volume de látex (µL) por área de corte do pecíolo (mm²). Transferimos o látex coletado a um tubo Eppendorf de 1,5 ml contendo 1,0 mL de água destilada.

O volume de látex exsudado foi analisado ao longo dos meses usando uma ANOVA de medidas repetidas de dois fatores, o tempo e a posição da folha no ramo.

5.2. Defesas químicas

Quantificamos o alcaloide polihidroxilado swainsonina, tanto em folhas quanto no látex. As folhas foram agrupadas em intactas e atacadas por herbívoros para cada ramo. Segundo Gardner & Cook (2011), usamos 100 mg amostras de folhas secas que foram colocadas em tubos Falcon de plástico de 15 ml com tampa de rosca (Corming Life Sciences). Adicionamos 5 mL de uma solução aquosa de ácido acético 2% e colocamos em Ultrassom por 30 minutos. Depois centrifugamos as amostras durante 10 min a 10000 rpm (10416xg) à 18° C (Centrífuga Bekcman Coulter, Allegra X-30R). Transferimos o sobrenadante aquoso para outro tubo com as mesmas dimensões, adicionamos 4,5 mL de uma mistura acetato de etila:hexano (7:3), misturamos a solução durante 1 min e centrifugamos as amostras durante 10 min à 3000 rpm (1096xg) à 25° C. Esse procedimento extraí os compostos mais apolares na fase superior contendo a mistura acetato de etila:hexano, a qual foi descartada. A fase inferior contendo a solução aquosa de ácido acético 2%, a qual deve reter o alcaloide, foi armazenada à -20°C até a análise quantitativa.

A swainsonina foi quantificada por cromatografia líquida de alto desempenho acoplada a um detector de massas de ionização por “eletronspray” e quadrupolo simples (1260 LC-6130 MS, Agilent Technologies). O cromatógrafo líquido foi equipado com uma coluna Zorbax SB-18, 4,6 x 150 mm com partículas de 5 um (Agilent Technologies), a qual foi aquecida à 30°C. Usamos como fase móvel isocrática 95% de acetato de amônia 20 mM e 5% de metanol filtrado (0-5 min), 100% metanol (6-10 min). Antes da próxima análise, estabilizamos a coluna por 5 min com a mistura de solventes inicial. Usamos um fluxo de 1mL/min e injetamos 10 μ L.

A curva de calibração externa da swainsonina foi construída usando 0.01, 0.03, 0.06 e 0.09 μ g de swainsonina sintética (Sigma-Aldrich), originadas de soluções de 1, 3, 6 e 9 μ g/mL (área do pico = $569084 * (\mu\text{g de swainsonina})$, $r^2 = 0,998$). Tanto a swainsonina foliar como a do látex, foram analisadas ao longo dos meses usando uma ANOVA de medidas repetidas de dois fatores.

6. Variação temporal dos mecanismos de defesa extrínsecos

6.1. Ocorrência de inimigos naturais e outros visitantes em nectários extraflorais

Registraramos o número de inimigos naturais (formigas, vespas, aranhas e outros artrópodes) visitando nectários extraflorais nos 30 indivíduos de *I. carnea* nos mesmos ramos e horários usados para o registro de herbívoros. Os exemplares foram classificados até família e/ou gênero e alguns casos até espécie usando literatura especializada (Antweb v5.5, Fernández 2003, Baccaro 2006). Os dados foram analisados na mesma forma que para os herbívoros foliares.

6.2. Eficiência dos inimigos naturais

Realizamos bioensaios de remoção de um modelo de presa para acessar a eficiência dos inimigos naturais ao longo dos meses. Usamos cupins como modelo de presa (operários de *Nasutitermis* sp.). Selecioneamos 15 indivíduos de *I. carnea* diferentes dos 30 indivíduos usados anteriormente, e em cada um marcamos quatro ramos com folhas com NEFs ativos (não cicatrizados). Em cada ramo colamos um cupim na face abaxial da segunda folha totalmente expandida e aplicamos um tratamento por ramo, contabilizando quatro por indivíduo:

1. Sem formigas e sem predadores voadores
2. Com formigas e sem predadores voadores
3. Sem formigas e com predadores voadores
4. Com formigas e com predadores voadores

Para excluir as formigas, aplicávamos graxa de automóvel na base do ramo. Para excluir predadores voadores, envolvíamos o ramo com um saco de tule (malha de nylon tipo urdidura: 35 x 60 cm). Com a exclusão dos predadores voadores, excluímos formigas que não conseguem

passar pela malha do tule. Então, para excluir os predadores voadores e não excluir as formigas colocamos um tubo de plástico (0,8 cm de diâmetro interno e 7,0 cm de comprimento) ligando o exterior com o interior do saco de tule. Após 24 horas verificamos se os cupins tinham sido removidos ou não. A frequências de remoção ou não dos cupins entre os tratamentos e ao longo dos meses foram analisadas por um modelo loglinear (Marascuilo & Busk 1987).

7. Padrões de variação temporal das diferentes defesas e a herbivoria

Usamos uma Analise de Componentes principais baseado nas correlações de todas as variáveis mensuradas (Herbivoria, fenologia, mecanismos de defesa e dados fenológicos) de todos os indivíduos , para determinar o sentidos das variáveis e como os meses se orientavam de acordo a esses sentidos das variáveis.

RESULTADOS

1. Dados fenológicos de *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa*

A população natural de *I. carnea* observada nos meses de coleta apresentou fenofases claramente distintas. Durante o período de cheia, as plantas ficam submersas e somente os ramos mais longos permanecem fora da água. Ao longo do ano de coleta foi possível observar que floração de *I. carnea* começa ainda no período seco (janeiro) e se prolonga até o auge da cheia (maio) na qual se intensifica a frutificação e posterior dispersão de sementes (Fig. 5).

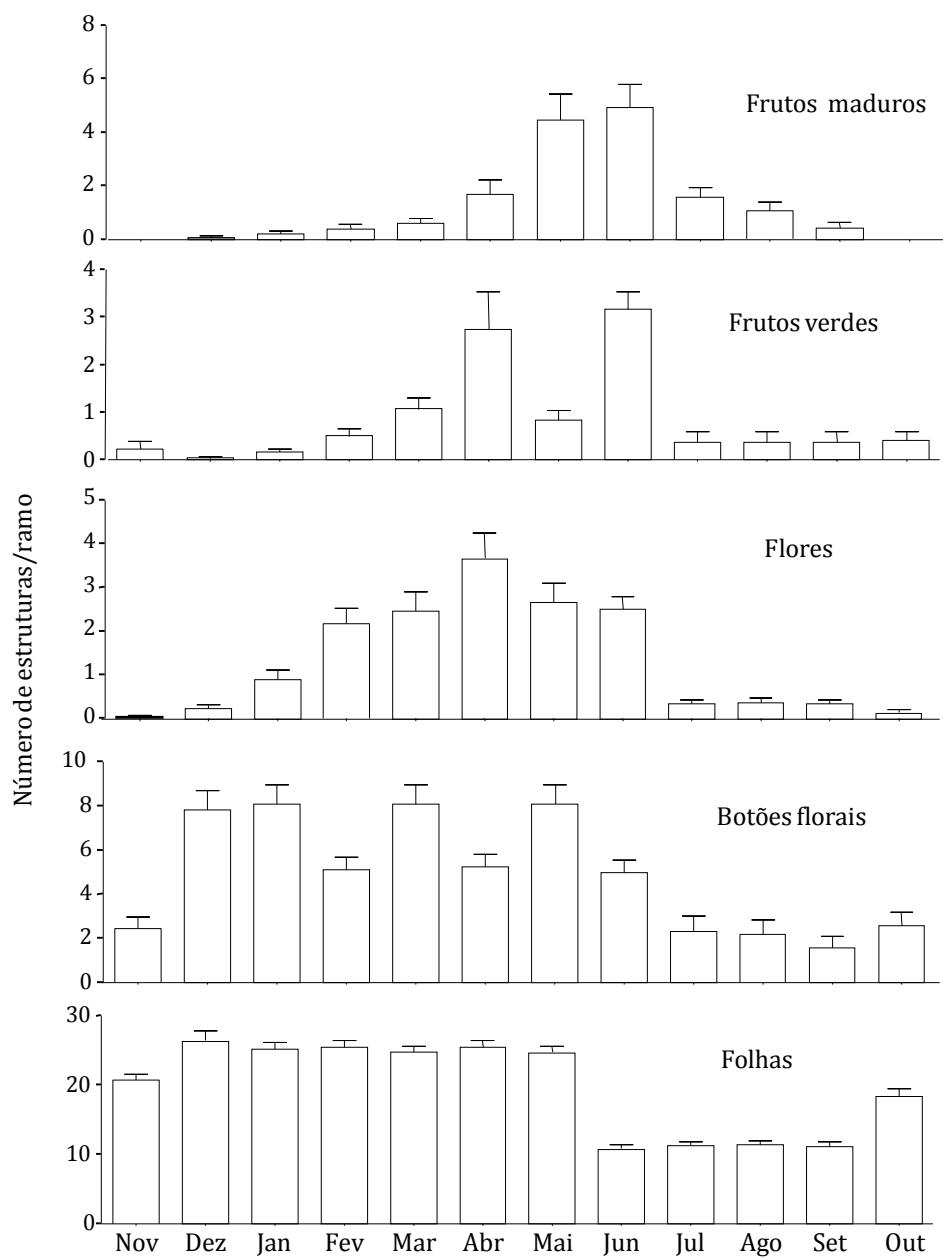


Figura 5: Dados fenológicos de *Ipomoea carnea*, considerando o número de folhas, botões florais, flores, frutos verdes e maduros. Nota-se o aumento de flores e frutos e a diminuição de folhas a partir de maio (auge da cheia).

As sementes de *I. carnea* são extremamente pilosas, adaptadas à hidrocória, e sua testa extremamente resistente. Isso confere a elas um período de dormência até a temporada seca, onde se podem encontrar algumas plântulas na área. A reprodução vegetativa também foi observada após a cheia onde ramos que tinham perdido grande parte da suas folhas durante os meses de frutificação e dispersão de sementes começaram a rebrotar aumentando notoriamente o número de folhas e superfície foliar nos meses de setembro e outubro. A superfície foliar média variou ao longo dos meses amostrados (ANOVA de medidas repetidas; $F_{(11,348)}=3,223$; $P<0,001$), sendo o mês de julho apresentou uma baixa superfície foliar com respeito aos meses de novembro, dezembro, fevereiro e outubro (Teste de Tukey; $P<0,05$) (Fig. 6).

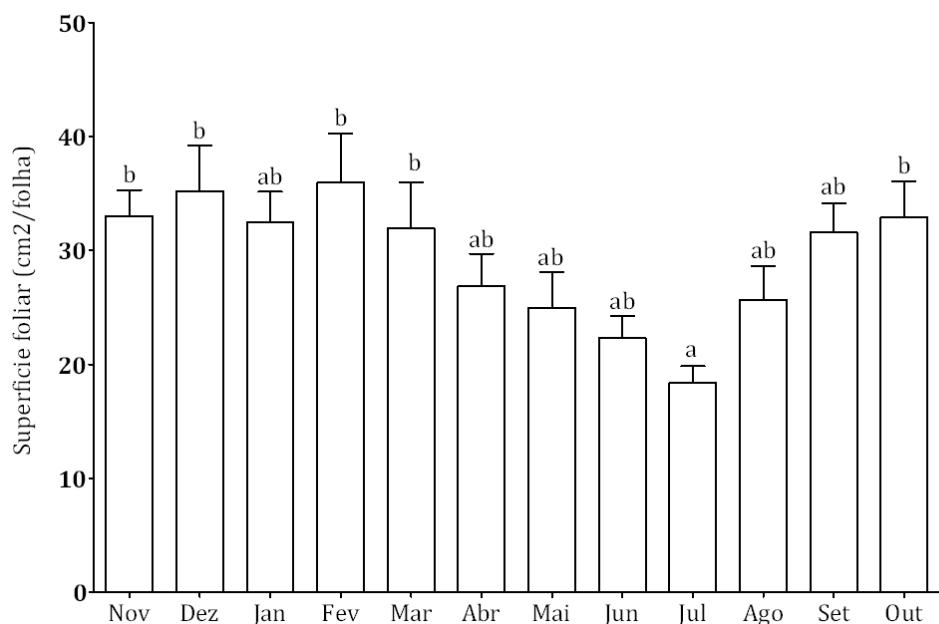


Figura 6. Superfície foliar média de *Ipomoea carnea* ao longo dos meses amostrados

2. Variação temporal da herbivoria foliar

2.1. Percentagem de área foliar removida

Os meses amostrados apresentaram diferença significativa na percentagem de dano por herbivoria (ANOVA de medidas repetidas; $F_{(11,348)}=3,223$; $P<0,001$). Ainda assim, o mês de setembro exibiu a menor percentagem de remoção de área foliar ($1,98 \pm 0,57$ %; média ± erro padrão), quando comparado com os meses de fevereiro, março, maio e junho (Teste de Tukey, $P<0,05$) (Fig. 7).

Em relação à de folhas jovens e maduras, 1^a e 5^a folhas totalmente expandidas, variaram ao longo dos meses (ANOVA de medidas repetidas; $F_{(3,102)}=3,223$; $P<0,001$), onde setembro teve a menor percentagem de área removida ($0,19 \pm 0,02$ %) independentemente da posição da

folha, quando comparados com os demais meses (Teste de Tukey; $P<0,01$). A exceção foram os meses de novembro e outubro (Fig. 8). Além disso, a herbivoria da 5^a folha foi maior ($2,59 \pm 0,25$ %) comparada com a 1^a folha ($0,88 \pm 0,16$ %) (ANOVA de medidas repetidas; $F_{(1,696)}=12,073$; $P<0,001$).

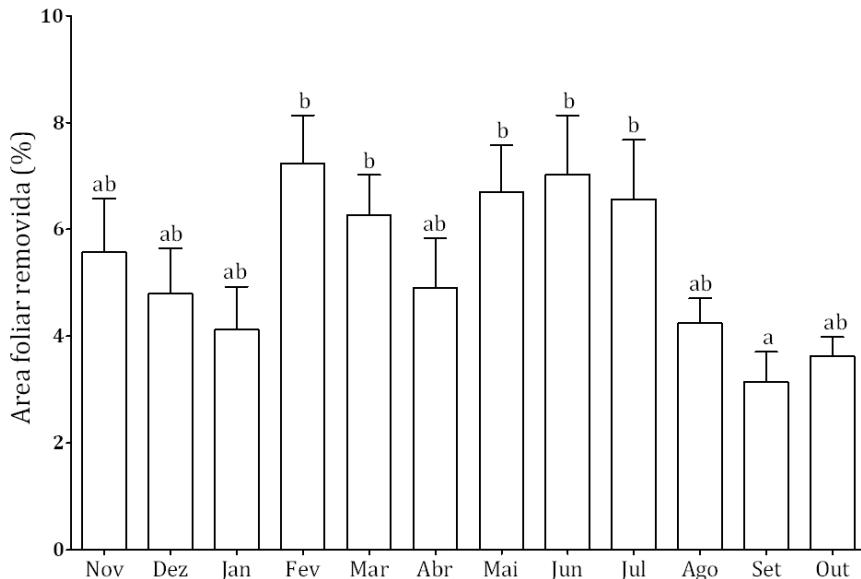


Figura 7. Percentagem de área foliar removida por mastigadores de *Ipomoea carnea* ao longo dos meses amostrados.

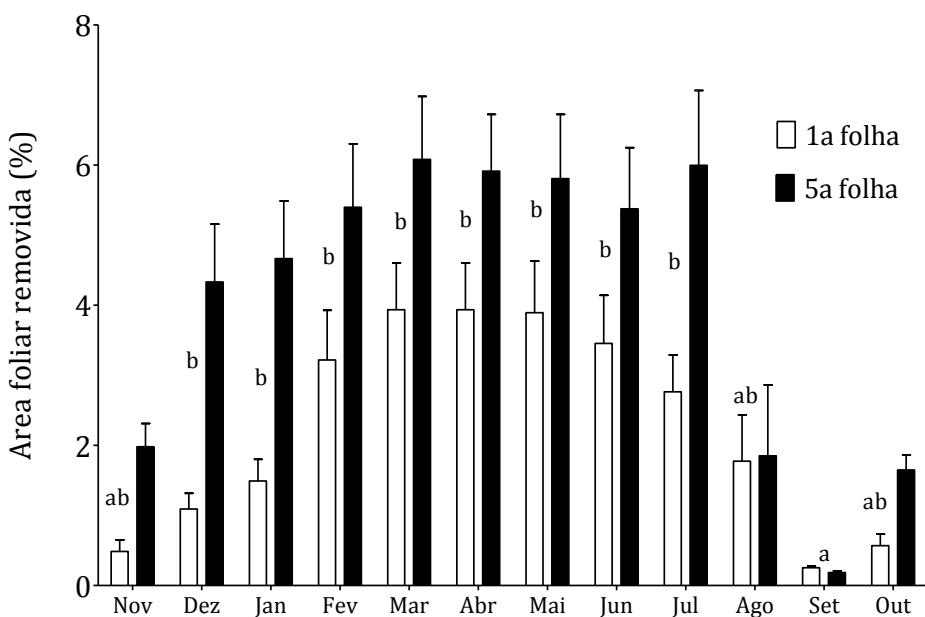


Figura 8: Percentagem de área foliar removida por mastigadores da 1^a e 5^a folhas totalmente expandidas de *Ipomoea carnea* ao longo dos meses amostrados

2.2. Ocorrência de herbívoros foliares

Registrados um total de 1996 insetos herbívoros foliares, sendo coletados 568. Esses insetos pertencem a cinco ordens e 25 famílias. Na percentagem de registros para cada ordem, Orthoptera foi o mais abundante (37,22%) seguido de Hemiptera (33,42%) e Coleoptera (23,35%). Os menos abundantes foram Lepidoptera e Blatodea com 3,91 e 2,10% respectivamente. As famílias com maior percentagem de registros foram Acriididae (26,35%), Chrysomellidae (16,63%) e Curculionidae (7,96%).

A ocorrência de herbívoros variou significativamente ao longo dos meses (ANOVA de medidas repetidas de dois fatores; $F_{(11,348)}=9,339$; $P<0,001$), sendo maio quem apresentou o maior número de herbívoros por ramo ($3,6 \pm 1,7$) comparado com o restante de meses (Teste de Tukey; $P<0,05$), com exceção do mês de abril. Em relação aos horários houve diferença significativa (ANOVA de medidas repetidas de dois fatores; $F_{(2,104)}=10,995$; $P<0,001$), onde o horário noturno teve a menor ocorrência ($0,5 \pm 0,1$ herbívoros/ramo) comparada com o período de manhã ($1,0 \pm 0,3$ herbívoros/ramo) (Teste de Tukey, $P<0,001$), independentemente do mês (Fig. 9). Em geral, a ocorrência dos herbívoros foliares mostrou um aumento no início da cheia (abril, maio), diminuindo gradualmente durante o período de seca.

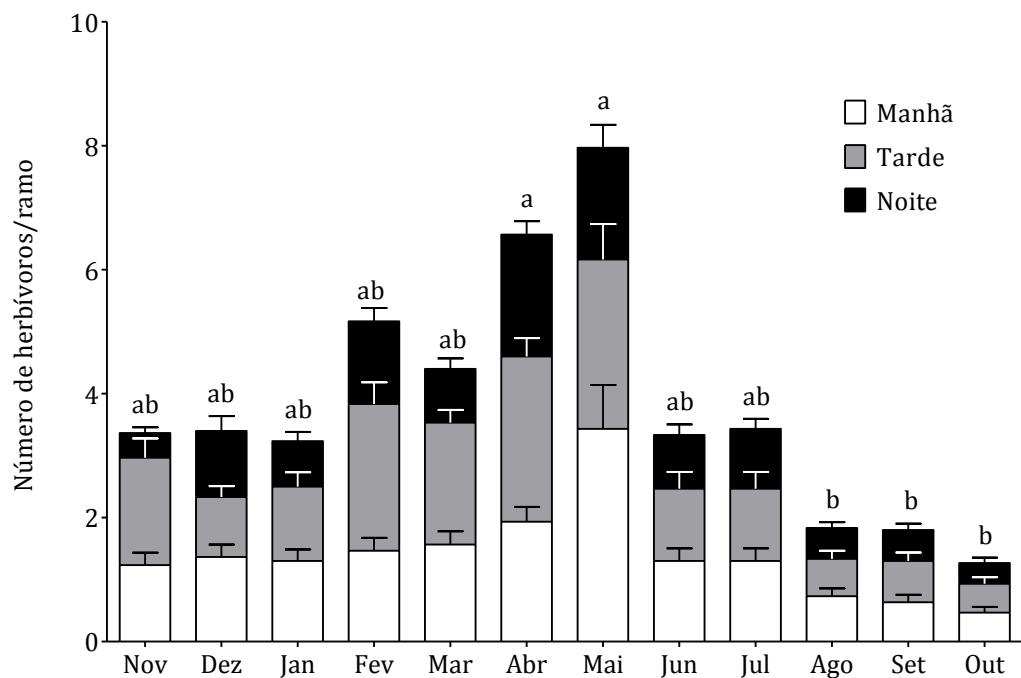


Figura 9: Número de herbívoros foliares se alimentado de *Ipomoea carnea* em diferentes horários do dia ao longo dos meses amostrados

Com respeito aos besouros especialistas, *Charydotella rubicunda* e *Chelymorpha cibraria* (Chrysomelidae: Cassidinae) ocorreram de forma diferenciada durante os meses amostrados. A primeira espécie teve maior ocorrência na seca, entanto a segunda foi mais ocorrente na cheia. Tanto os herbívoros especialistas como generalistas variaram com o tempo (ANOVA de medidas repetidas; $F_{(3,102)}=8,588$; $P<0,001$) onde os segundos sempre foram mais ocorrentes que os primeiros em todos os meses (Teste de Tukey, $P<0,001$). Em relação à forma de forrageamento, os herbívoros mastigadores foram significativamente mais ocorrentes que os sugadores (ANOVA de medidas repetidas de dois fatores; $F_{(3,102)}=4,704$; $P<0,001$) nos meses de fevereiro, junho, julho, agosto, setembro (Teste de Tukey, $P<0,001$) (Fig. 10).

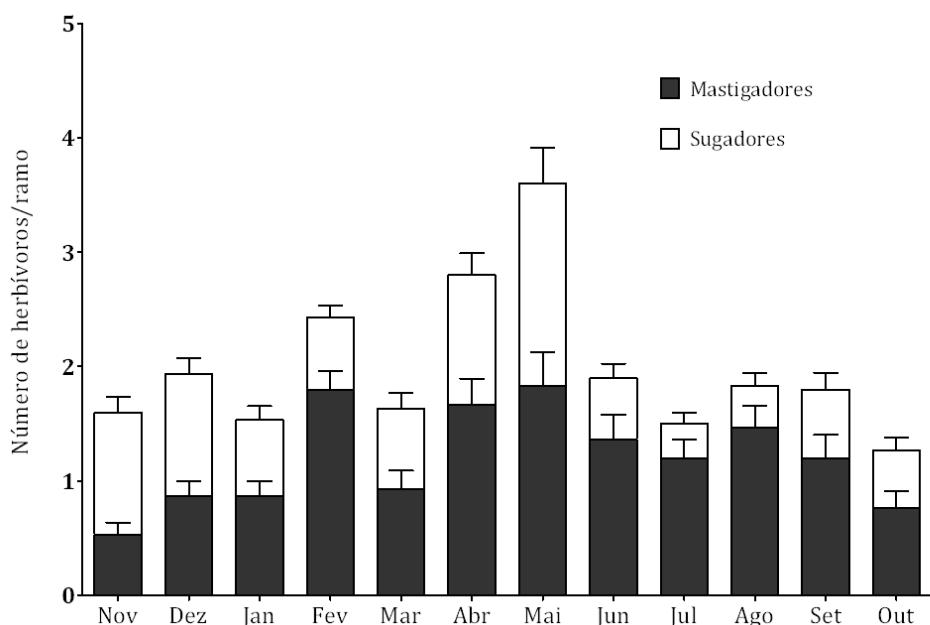


Figura 10: Número de herbívoros mastigadores e sugadores se alimentando de *Ipomoea carnea* ao longo dos meses amostrados

3. Variação temporal dos mecanismos de defesa intrínsecos

3.1. Exsudação de látex

O volume de látex exsudado de folhas jovens e maduras (1^a e 5^a) apresentou diferença significativa ao longo dos meses (ANOVA de medidas repetidas de dois fatores; $F_{(3,102)}=3,102$; $P<0,001$), onde o maior valor foi para janeiro ($0,44 \pm 0,03 \mu\text{L/mm}^2$ de pecíolo; média \pm erro padrão) em relação ao total de meses amostrados (Teste de Tukey, $P<0,01$) e o menor no mês de maio ($0,08 \pm 0,01 \mu\text{L/mm}^2$ de pecíolo) comparado com novembro, dezembro, janeiro, março, julho, setembro e outubro (Teste de Tukey; $P<0,01$) (Fig. 11). Em relação às folhas, o volume

exsudado pela 5^a folha ($0,22 \pm 0,01 \mu\text{L}/\text{mm}^2$ de pecíolo) foi significativamente maior que na 1^a folha (ANOVA de medidas repetidas de dois fatores; $F_{(1,696)}=12,073; P<0,001$).

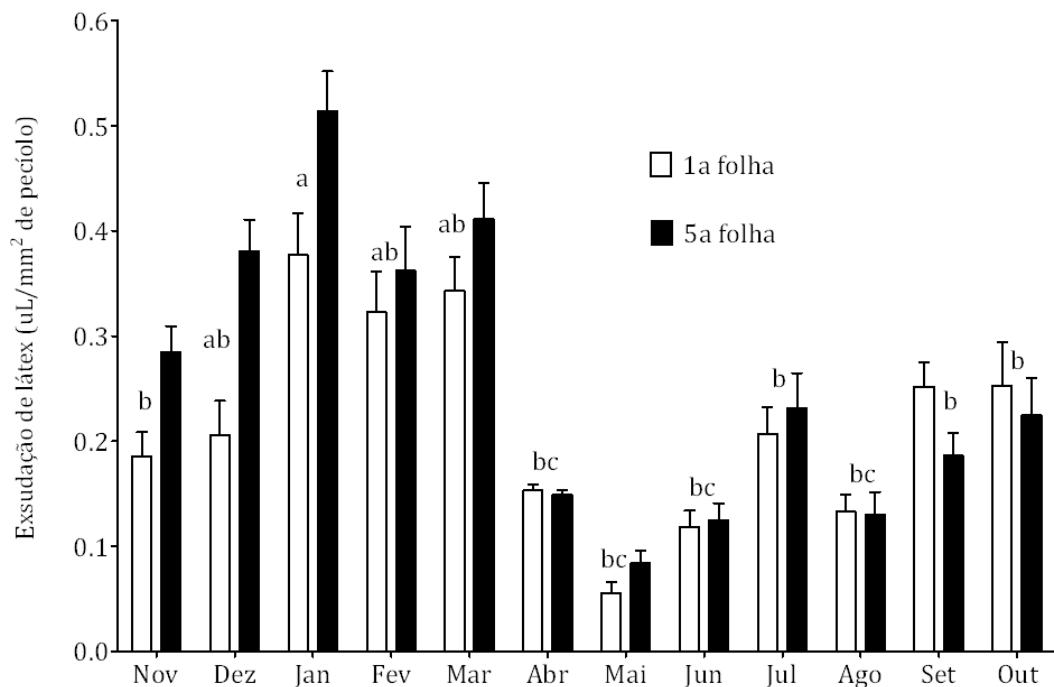


Figura 11: Volume de látex exsudado da 1^a e 5^a folhas totalmente expandidas de *Ipomoea carnea* ao longo dos meses amostrados

3.2. Defesas químicas

As defesas químicas variaram significativamente ao longo dos meses (ANOVA de medidas repetidas de dois fatores; $F_{(11,102)}=5,492; P<0,001$), sendo maio apresentou a menor quantidade de swainsonina por biomassa foliar ($0,097 \pm 0,004 \mu\text{g}/\text{mg}$) comparado com dezembro, janeiro, fevereiro, julho, agosto, setembro (Teste de Tukey; $P<0,05$) e dezembro a maior ($1,76 \pm 0,200 \mu\text{g}/\text{mg}$) comparado com novembro, março, abril, maio, junho, outubro (Teste de Tukey; $P<0,01$) (Fig. 12). Não houve diferença significativa entre folhas atacadas e intactas.

A swainsonina presente no látex de folhas jovens e maduras apresentou um panorama semelhante de variação temporal (ANOVA de medidas repetidas; $F_{(11,102)}=2,696; P<0,005$). Em novembro ocorreu a maior concentração do alcaloide ($24,40 \pm 1,19 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de látex) comparado com o restante de meses (Teste de Tukey; $P<0,01$) (Fig. 13). Por outro lado, a quantidade de swainsonina da 1^a folha foi maior ($14,39 \pm 1,19 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de látex) que na 5^a folha ($5,05 \pm 0,59 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de látex) (ANOVA de medidas repetidas de dois fatores; $F_{(1,696)}=56,941; P<0,001$). Além

disso, a quantidade de swainsonina no látex ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) tende a diminuir significativamente quando o volume de látex (μL) aumenta (Corr. Pearson; $r=-0,237$; $P<0,01$).

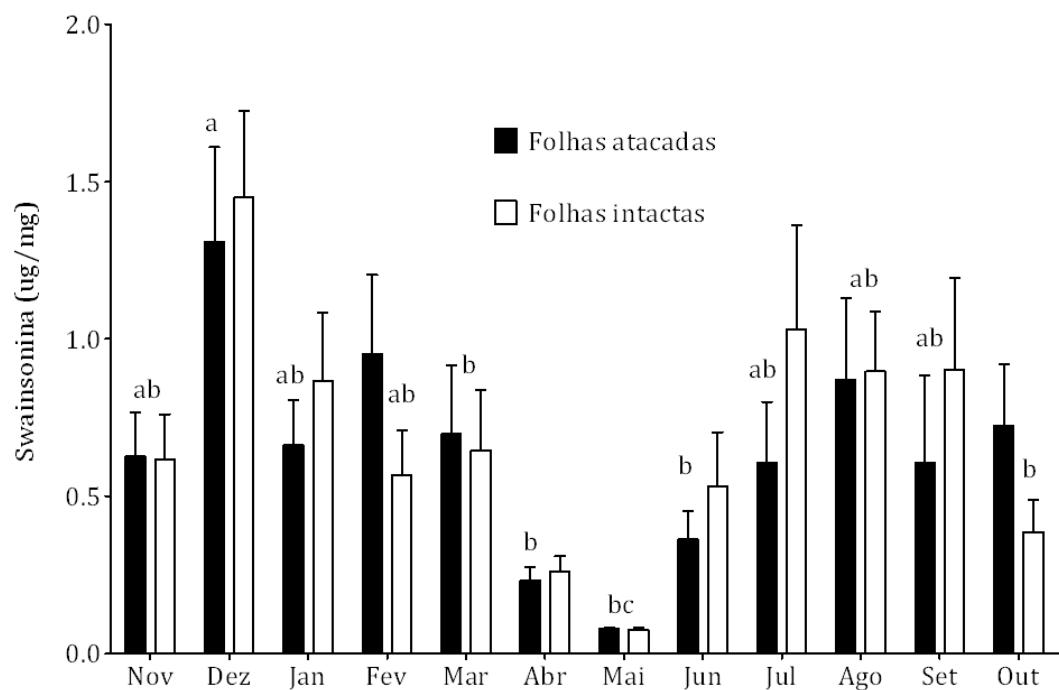


Figura 12: Concentração de swainsonina em folhas intactas e atacadas por herbívoros mastigadores em *Ipomoea carnea* ao longo dos meses amostrados

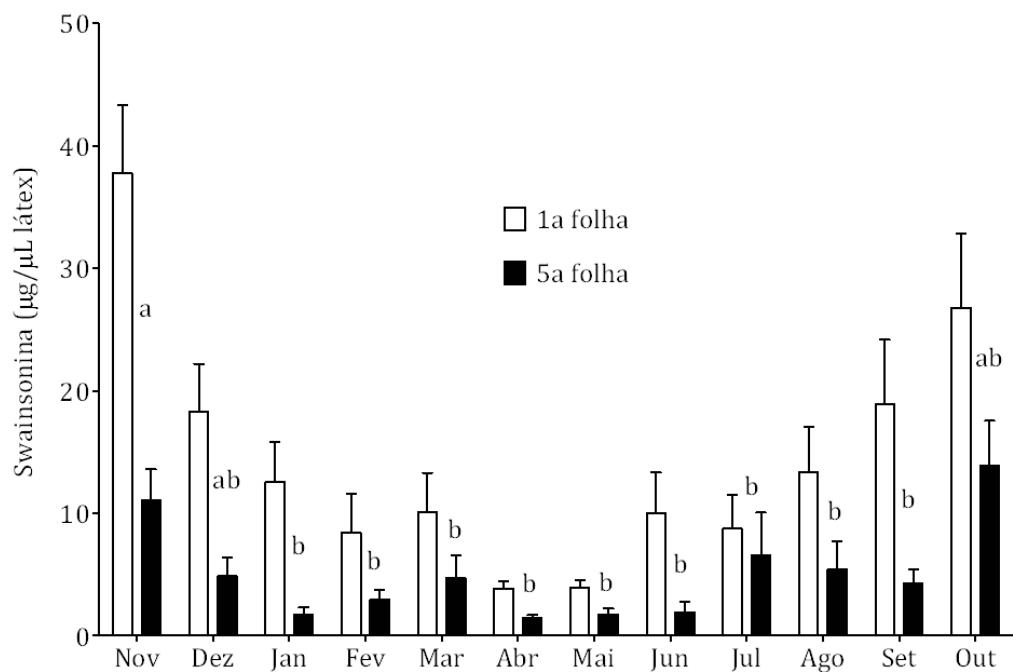


Figura 13 Concentração de swainsonina do látex exsudado pela 1^a e 5^a folhas totalmente expandidas de *Ipomoea carnea* ao longo dos meses amostrados

4. Variação temporal dos mecanismos de defesa extrínsecos

4.1. Ocorrência de inimigos naturais e outros visitantes em nectários extraflorais

Os quatro grupos de inimigos naturais ocorreram diferencialmente nos meses estudados (ANOVA de medidas repetidas de dois fatores; $F_{(33,139)}=18,865$; $P<0,001$). Formigas foi o grupo com maior ocorrência ($8,5 \pm 1,0$ indivíduos/ramo) nos três períodos do dia, comparado com vespas, aranhas e outros inimigos potenciais (Teste de Tukey; $P<0,001$).

4.1.1. Formigas

Foram registrados 17415 indivíduos visitando os NEFs de *I. carnea* e coletados 1062. Esses indivíduos pertenciam a cinco subfamílias e nove gêneros, destacando-se o *Solenopsis* ssp. (Myrmicinae), como o mais abundante com 48,78%, seguido de *Camponotus* spp. (Formicinae) com 27,24%.

A ocorrência nos diferentes horários variou ao longo dos meses (ANOVA de medidas repetidas de dois fatores; $F_{(22,104)}=9,534$; $P<0,001$), sendo significativamente maior no mês de maio ($60,1 \pm 9,5$ formigas/ramo) em relação aos outros meses (Teste de Tukey; $P<0,001$). Considerando os horários, a manhã mostrou maior número de formigas por ramo ($8,5 \pm 1,0$) em relação à tarde e à noite (Teste de Tukey; $P<0,01$). Neste último período, o número foi menor ($2,5 \pm 0,3$) que nos dois primeiros (Teste de Tukey; $P<0,01$) (Fig. 15).

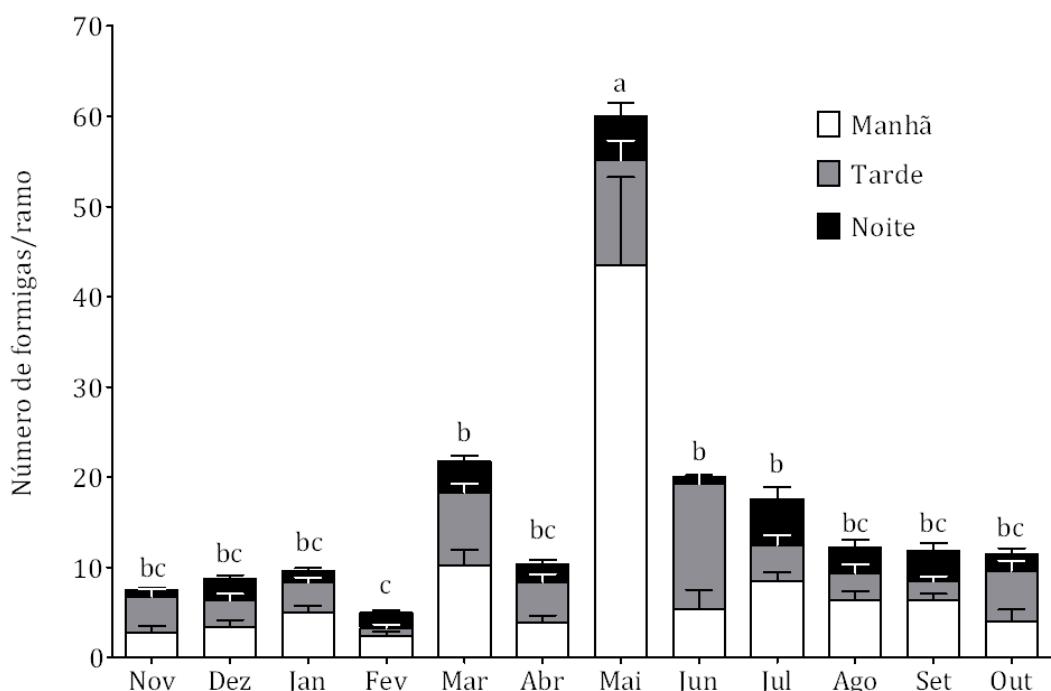


Figura 15: Número de formigas visitando nectários extraflorais de *Ipomoea carnea* em diferentes horários do dia ao longo dos meses amostrados

4.1.2. Vespas

Foram registradas 1268 vespas visitando os NEFs de *I. carnea* e coletadas 92. Esses indivíduos pertenciam a três subfamílias. Alguns exemplares não puderam ser classificados no nível de subfamília. Destaca-se *Polybia* sp. (Polibidae), como a espécie mais abundante, com 41,65%, seguido de *Polistes* sp. (Polistidae) com 18,45% (Tabela 11).

O número de vespas por ramo nos diferentes horários mostrou variação ao longo dos meses (ANOVA de medidas repetidas de dois fatores; $F_{(22,104)}=8,049$; $P<0,001$), aumentando significativamente no mês de junho ($5,5 \pm 0,64$ vespas/ramo) em relação aos outros meses (Teste de Tukey; $P<0,001$). Em relação aos horários, a manhã mostrou maior número de vespas por ramo ($1,13 \pm 0,33$) em relação à tarde e à noite (Teste de Tukey; $P<0,01$). Neste último horário, o número de vespas foi menor significativamente ($0,03 \pm 0,03$) que os dois primeiros (Teste de Tukey; $P<0,01$) (Fig. 16).

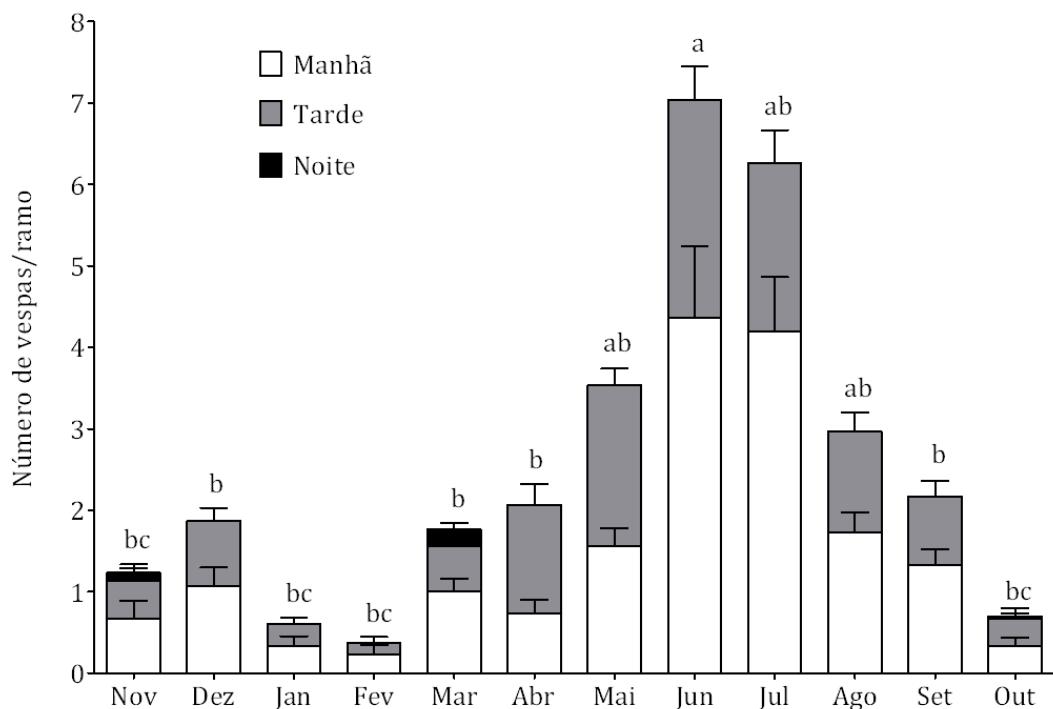


Figura 16: Número de vespas visitando nectários extraflorais de *Ipomoea carnea* em diferentes horários do dia ao longo dos meses amostrados

4.1.3. Aranhas

Foram registradas 2001 aranhas visitando os NEFs de *I. carnea* e coletadas 72. Esses indivíduos pertenciam a oito famílias, destacando-se Araneidae com 28,38% dos registros, como o grupo mais abundante, seguido de Salticidae com 25,03%. A ocorrência das aranhas apresentou uma variação temporal nos diferentes horários (ANOVA de medidas repetidas de dois fatores; $F_{(22,104)}=6,444$; $P<0,001$) aumentando significativamente no número de aranhas no mês de julho

$(4.6 \pm 0.4$ aranhas/ramo) em relação aos outros meses (Teste de Tukey; $P<0,001$). Considerando os horários, a noite mostrou maior número de aranhas por ramo ($0.8 \pm 0,2$) em relação à manhã e tarde (Teste de Tukey; $P<0,01$), este ultimo foi menor significativamente ($0.4 \pm 0,1$) que os dois primeiros horários (Teste de Tukey; $P<0,01$) (Fig. 17).

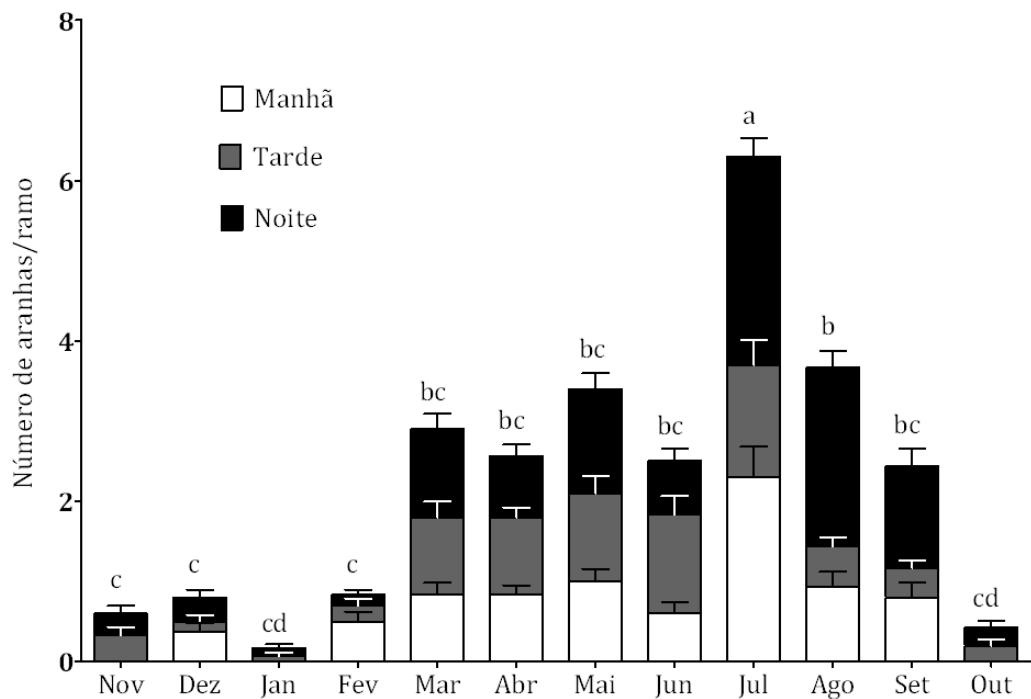


Figura 17: Número de aranhas visitando nectários extraflorais de *Ipomoea carnea* em diferentes horários do dia ao longo dos meses amostrados

4.1.4. Outros visitantes de nectários extraflorais.

Foram registrados 1174 indivíduos de outros insetos visitando NEFs de *I. carnea*. Foram coletados 65 indivíduos. A espécie mais abundante foi *Trigona* sp. (Hymenoptera: Apidae) com 78,02 %, seguido da família Lampyridae (Coleoptera) com 9,81%. Da mesma forma que os inimigos naturais, estes visitantes variaram temporalmente (ANOVA de medidas repetidas de dois fatores; $F_{(11,104)}=20,431$; $P<0,001$) sendo maio, junho e julho os meses com maior número de indivíduos por ramo ($3,4 \pm 0,2$; $3,9 \pm 0,9$; $3,7 \pm 0,7$ respectivamente) comparados com os meses restantes (Teste de Tukey; $P<0,001$). Os horários não mostraram diferença significativa (Fig. 18).

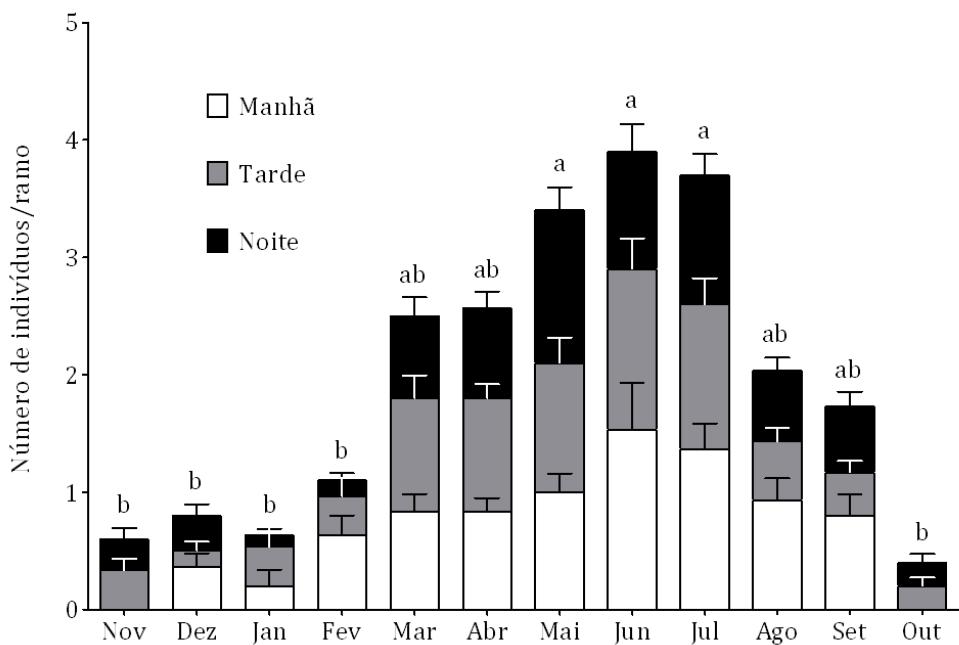


Figura 18: Número de outros visitantes dos nectários extraflorais de *Ipomoea carnea* em diferentes horários do dia ao longo dos meses amostrados

4.2. Eficiência dos inimigos naturais

A análise loglinear para os bioensaios de remoção de modelos de presa (cupins), para acessar eficiência do terceiro nível trófico ao longo dos meses, mostrou que o melhor modelo para explicar os resultados de remoção é a interação entre presença ou ausência de formigas e remoção ou não de cupins ($X^2=64,795$; $gl=1$; $P<0,001$). Plantas onde as formigas foram excluídas apresentavam uma menor frequência de remoção de cupins (5%) do que plantas onde as formigas transitavam livremente (50%).

5. Padrões de variação temporal entre mecanismos de defesa e a herbivoria

Na figura 19 (PCA), é interessante notar a disposição das variáveis ao longo de PC1, que modela 38,8% da variância da matriz de dados. A inundação, estruturas reprodutivas, mecanismos extrínsecos, herbivoria e herbívoros tem sinais contrários aos mecanismos de defesa intrínsecos, estruturas vegetativas. O PC2 que modela 21,9% mostrou que os herbívoros e herbivoria apresentam sinais coincidentes com as características vegetativas (folhas e superfície foliar). A orientação dos meses no gráfico segundo esses dois componentes principais (68,7%) por um lado os meses de cheia (abril, maio, junho e julho) se orientaram positivamente aos mecanismos extrínsecos de defesa, estruturas reprodutivas, herbivoria e herbívoros, e por outro lado os meses de seca se orientaram positivamente aos mecanismos de defesa intrínsecos e estruturas vegetativas.

Em primeiro lugar, dentro dos mecanismos de defesa intrínsecos, o volume de látex exsudado, tanto pela 1^a e 5^a folha, se correlacionou positivamente entre si e com a concentração de swainsonina, tanto de folhas atacadas como intactas, mostrando que ambos os mecanismos intrínsecos aumentaram proporcionalmente. Os inimigos naturais (formigas, vespas, aranhas) se correlacionaram positivamente entre si. A exsudação de látex foi inversamente proporcional ao número de inimigos naturais; e a concentração de swainsonina com o número de formigas. Além disso, a swainsonina do látex (1^a folha) variou negativamente em relação ao número de aranhas.

Em relação à herbivoria, os inimigos naturais se correlacionaram positivamente como os herbívoros foliares, e estes últimos negativamente com o de látex (tanto volume da 5^a folha como concentração de swainsonina da 1^a folha). Os herbívoros mastigadores e generalistas se correlacionaram negativamente com a swainsonina do látex e positivamente com as formigas e vespas. A percentagem de herbivoria se correlacionou positivamente com os mecanismos de defesa extrínsecos (inimigos naturais) e negativamente com os intrínsecos (volume e swainsonina do látex). Em geral os tipos de defesa se correlacionam diferentemente com a herbivoria, os intrínsecos positivamente e os extrínsecos negativamente.

Quanto aos dados fenológicos, o número de estruturas vegetativas e reprodutivas se correlacionaram negativamente entre si. Assim, estruturas reprodutivas (frutos verdes e maduros) se correlacionaram negativamente com o número de folhas (estruturas vegetativas) e positivamente com o número de flores. Além disso, o número de folhas se correlacionou negativamente com o número de vespas e aranhas. Os frutos verdes se correlacionaram positivamente com todos os tipos de inimigos naturais. Por outro lado, a superfície foliar média que se correlacionou negativamente com a ocorrência de aranhas e vespas.

Podemos observar que a diversidade de inimigos naturais aumentou com a produção de estruturas reprodutivas. Consequentemente, os mecanismos intrínsecos, tanto volume e quantidade de swainsonina do látex, se correlacionaram negativamente com o aumento de estruturas reprodutivas (flores e frutos). Mas o volume exsudado de látex se correlacionou positivamente com o número de folhas e a superfície foliar media que são características vegetativas.

A inundação foi um fator que se relacionou a todos os aspectos medidos neste estudo podendo influenciar na fenologia como na produção de mecanismo de defesa contra herbivoria em *I. carnea*. Esse fator abiótico se correlacionou negativamente com o volume e quantidade de swainsonina do látex e positivamente com o restante de defesas. A inundação (altura d'água) também se correlacionou positivamente com a herbivoria e os herbívoros foliares, mas negativamente com o número de folhas e a superfície foliar. O número de estruturas reprodutivas aumentou em proporção da altura d'água.

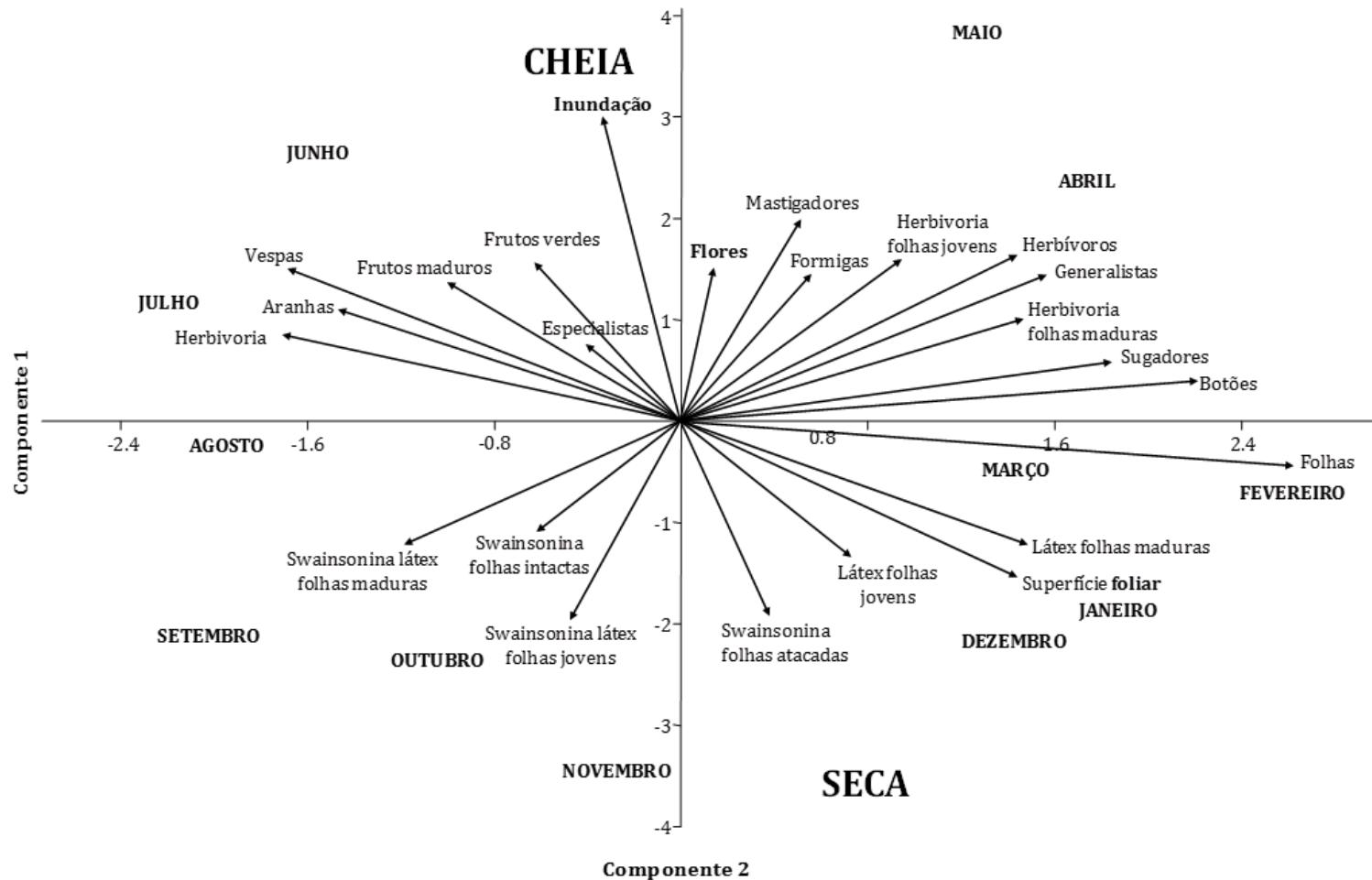


Figura 19: Analise de Componentes Principais (PCA) baseado em correlações das variáveis mensuradas nos meses amostrados. A inundação determina os períodos de seca e cheia. Destaca-se a orientação dos mecanismos extrínsecos e estruturas reprodutivas para meses de seca, e os intrínsecos e estruturas vegetativas para os meses a cheia.

DISCUSSÃO

Neste estudo, observações mensais de *I. carnea* durante um ano revelaram que seus mecanismos de defesa contra herbivoria mudam com o tempo. Nossos resultados mostram que essa variação temporal se relacionou às características fenológicas e ambientais. Em primeiro lugar, relacionando os dados fenológicos e a herbivoria, podemos perceber que *I. carnea* cresceu mais (maior produção de folhas) em períodos mais favoráveis aos insetos herbívoros (época úmida quente) (Hasse 1999) correndo o risco de suportar significativamente mais herbivoria (Aide 1992; Coley & Barone 1996); embora a abundância de herbívoros pode não aumentar significativamente nessas condições (Wolda 1988; Richards & Coley 2007; Anu et al. 2009).

A herbivoria foliar e a ocorrência de herbívoros foliares em *I. carnea* apresentaram uma variação esperada, correlacionando-se positivamente com o recurso (folhas). Nesse panorama, investir em mecanismos de defesa é necessário para garantir a proteção contra a herbivoria. Entretanto, esses são custosos para ser produzidos em grandes quantidades (Karban et al. 1997; Karban & Baldwin 1997; Agrawal 1999; Kim et al. 2011). Em vista disso, os mecanismos intrínsecos e extrínsecos de *I. carnea* se correlacionaram negativamente, variando em relação à fenologia (Freeman et al. 2003; Carroll & Quiring 2003) e principalmente aos fatores abióticos (Coley & Barone 1996; Heil et al. 2000; Stinchcombe 2002; Agrawal 2006), no nosso caso a inundação.

Em relação aos mecanismos de defesa intrínsecos, as defesas químicas (o alcaloide indolizídílico swainsonina) e a exsudação de látex de *I. carnea*, manifestaram-se como a principal defesa no crescimento vegetativo diminuindo com os aumento de estruturas reprodutivas. No período reprodutivo os principais mecanismos de defesas foram os extrínsecos. Principalmente no crescimento vegetativo, a produção de defesas contra uma variedade de herbívoros pode contribuir para o estabelecimento e persistência da espécie em uma variedade de habitat (Carson & Root 2000; Harvey et al. 2011; Lieurance & Cipollini 2013), controlando a mortalidade e crescimento dos indivíduos e garantindo o sucesso reprodutivo (Horvitz & Schemske 2002; Atala & Gianoli 2008; Barton & Hanley 2013).

A produção de defesas intrínsecas influencia diretamente no desempenho dos herbívoros (Newton et al. 2010; Harvey & Gols 2011; Nogueira et al. 2012) diminuindo a seletividade do herbívoro pela baixa qualidade do recurso (Mauricio 2000; Vergés et al. 2007). Entretanto, a aptidão de *I. carnea* também se relacionou com tal ocorrência, principalmente no fornecimento de recurso foliar (Lewinsohn et al. 2005; Craig 2010; Erickson et al. 2012), fato pelo qual se correlacionaram positivamente com o número de folhas, exibindo uma possível estratégia defensiva

fenológica. Nesse sentido, a quantidade de elementos nutritivos nas folhas que os herbívoros precisam tais como aminoácidos essenciais, nitrogênio e água (White 1993), varia ao longo do ciclo de vida da planta, diminuindo nas fases reprodutivas (Moran & Hamilton 1980; Bazzaz et al. 1987; Coley & Aide 1991; Horvitz e Schemske 2002).

O látex, como barreira física e como um sistema de transporte de substâncias, demonstrou ser um componente importante da resistência aos herbívoros (Agrawal e Konno 2009; Konno 2011) nos indivíduos de *I. carnea* com alta produção de folhas (Jones & Paine 2012; Yamawo et al. 2012), confirmada pela correlação negativa que teve com a ocorrência de herbívoros. Além disso, a exsudação de látex respondeu à herbivoria de folhas maduras (5^a folha) exsudando um maior volume de látex para essa folha, concordando com a idéia que essa defesa é semelhante a um sistema induzível, sendo mobilizado para o local danificado embora seja pré-formado na planta (Agrawal & Konno 2009).

Folhas jovens apresentaram menor volume de látex exsudado (menor barreira física), mas uma alta quantidade de swainsonina por microlitro de látex (maior barreira química), conseguindo assim reduzir a herbivoria nessas folhas e garantir o sucesso da expansão foliar (Coley & Kursar 1996; Tiffin & Rausher 1999; Tiffin 2002; Yamawo et al. 2012). Em relação a isso, considera-se que a herbivoria sobre folhas jovens compreende a maior parte dos danos sobre esses órgãos (Carson & Root 2000; Atala & Gianolli 2008; Lieurance & Cipollini 2013) por ser nutritivamente mais atrativas para os herbívoros (Coley & Barone 1996; Yamawo et al. 2012; Quintero & Brower 2013).

Consequentemente, a velocidade de expansão foliar se relaciona com o teor de defesas encontradas nas folhas (McKey 1979), onde o investimento em metabolismo secundário pode ser menor em plantas com expansão foliar rápida (Rhoades & Cates 1976; Marquis 1984; Yamawo et al. 2012) e maior em ramos que crescem mais lentamente (Jong & van der Meijden 2000; Horvitz e Schemske 2002), de maneira que a redução no período de expansão foliar pode ser uma alternativa para redução de danos (Lin & Galloway 2010; Andrieu et al. 2011).

Nesse panorama, é determinante produzir um mecanismo de defesa eficiente (compostos químicos e látex) nas fenofases vegetativas e assim garantir um sucesso reprodutivo (Barton & Hanley 2013). Assim, considerando que o consumo de tecido fotossinteticamente ativo também impõe um custo, reduzindo a quantidade de recursos para a produção de estruturas reprodutivas afetando o sistema de reprodução da planta (Marquis 1984; Agrawal 1999; Strauss et al. 2002; Núñez-Farfán 2007; Sowell & Wolfe 2010).

Além disso, a remoção de estruturas vegetais vai resultar em uma mudança drástica na seletividade do herbívoro (Schutlz 1998; Funk & Throop 2010; Castillo et al. 2013), devido à

qualidade do tecido afetado, nutritivamente fraco e tóxico devido à indução de defesas químicas (Mauricio 2000; Vergés et al. 2007), em especial a swainsonina que causa alterações enzimáticas e imunológicas (Tulsiani et al. 1984; Schwarz et al. 2003, 2004; Meira et al. 2012) o que faz de *I. carnea* um recurso pouco atrativo para os herbívoros nas fases vegetativas.

Não obstante, como seria esperado, existem custos metabólicos relacionados aos produtos do metabolismo secundário (Gershenzon 1994), como as defesas intrínsecas. Nesse sentido, os herbívoros podem agir como agentes de seleção (Mauricio et al. 1999; Mauricio 2000; Rausher 2001; Núñez-Farfán, 2007). Nesse sentido, uma alta produção de defesas químicas reduz a herbivoria foliar, mas é custosa, diminuindo o crescimento da planta (Karban 1993; Sagers & Coley 1995; Jong & van der Meijden 2000), favorecendo indivíduos com menores investimentos em defesa na ausência de herbívoros (Stamp 2003).

Porém, isso não correspondeu a *I. carnea*, onde o látex e defesas químicas apresentaram quantidades maiores durante o crescimento vegetativo no período de seca (época úmida quente). É por isso, em questões de interação planta - herbívoro, os tecidos vegetativos podem contribuir mais para a aptidão da planta do que as estruturas reprodutivas (Horvitz e Schemske 2002; Stamp 2003; Vergés et al. 2006).

Por outro lado, os mecanismos de defesa extrínsecos (inimigos naturais), aumentaram proporcionalmente em quantidade e variedade com as estruturas reprodutivas e diminuição das vegetativas. Principalmente as vespas que seriam mais atraídas pelos nectários extraflorais localizados nas flores (Keller, 1977, 1978; Falcão et al. 2013; Silva et al. 2013) além do néctar floral (Galleto & Bernardello 2004; Lima 2013), cumprindo a função defensiva dessas estruturas.

Além disso, as plantas podem modular a composição do néctar extrafloral para atrair um determinado tipo de inimigo natural (Wilder e Eubanks 2010; Heil 2011; Falcão et al. 2013). Desta forma, vespas podem localizar NEFs de curtas distâncias simplesmente pelo seu odor, e encontrá-lo muito mais rápido do que os açucares (Rose et al. 2006; Silva et al. 2013), que é mais afim para as formigas (De la Fuente & Marquis 1999; Bixeman et al. 2011; Shenoy et al. 2012) e para aranhas (Pollard et al. 1995; Taylor 2004; Jackson 2009; Pfannenstiel & Patt 2012).

As vespas foram o segundo grupo mais abundante dos inimigos naturais, embora, não responderam como protetores foliares eficientes tanto quanto as formigas, o que podemos supor que vespas protegem estruturas reprodutivas. Nesse sentido, as formigas se caracterizam por serem protetores constantes (Heil & McKey 2003; Rudgers et al. 2003), patrulhando a planta toda, e removendo qualquer organismo quimicamente estranho à planta simbionte (orientação química)(Rico Gray 1993; Agrawal & Rutter 1998; Trager et al. 2010).

Ademais, as formigas representaram o grupo mais abundante dos inimigos naturais registrados para *I. carnea*, principalmente no auge da cheia. Assim, se confirma que a heterogeneidade do ambiente é um fator determinante para a coexistência e diminuição de competição entre espécies de formigas (Price et al. 1980; Corrêa et al. 2006) e onde os efeitos da sua presença são mais pronunciados (Rosumek et al. 2009 Carmona-Galindo et al. 2014),

Além disso, as formigas respondem ao dano foliar induzindo seu recrutamento (Romero & Izzo 2004; Grangier et al. 2008; Bixenman 2011) razão pela qual se correlacionaram positivamente com a ocorrência de herbívoros foliares e a percentagem de herbivoria. Mas, como qualquer defesa, a produção de NEFs e secreções associadas são custosas para a planta (Mortensen et al. 2011; Shenoy et al. 2012; Mortensen et al. 2013).

No entanto, este custo é compensado pelos benefícios proporcionados, conduzindo a um aumento de aptidão da planta (Agrawal 1998; Gentry 2003; Heil & McKey 2003; Falcão et al. 2013). Basicamente de estruturas vegetativas (folhas), e estruturas reprodutivas imaturas (botões florais e frutos verdes) com as que se correlacionou positivamente sugerindo que NEFs podem apresentar um custo semelhante ao benefício ecológico que proporcionam (Heil et al. 2000; Rudgers et al. 2003; Nogueira et al. 2011; Trager et al. 2010; Marazzi et al. 2013).

De todos os inimigos naturais, as aranhas foram as mais variáveis temporalmente, aumentando sua ocorrência quando a produção de folhas foi baixa (após o auge da cheia) e as formigas diminuíram sua ocorrência (Heil 2002). As aranhas podem fornecer uma inesperada defesa adicional (Ruhren & Handel 1999; Meehan et al. 2005; Sorem & Chowdhury 2011; Pfannenstiel & Patt 2012) o que coincide com a correlação positiva que mostraram com a herbivoria. Não obstante, e apesar de que foram observadas desovas sobre as folhas, as aranhas são consideradas protetores errantes, contribuindo em defesa somente em condições ambientais particulares (Patt & Pfannenstiel 2008; Taylor & Pfannenstiel 2008; Jackson 2009) para o caso de *I. carnea* no período após o auge da cheia.

A variação dos inimigos naturais em relação aos horários do dia mostrou um padrão característico. Formigas ocorreram com maior frequência no horário da manhã, assim como os herbívoros foliares. Ao respeito disso, as plantas podem evitar secreção de néctar durante a noite (Radhika et al. 2010; Falcão et al. 2013) aumentando o risco de predação para os herbívoros durante o dia, que pode ser três vezes maior do que durante a noite (Novotny et al. 1999; Brown & Schmitt 2001).

No entanto, a abundância de herbívoros foi maior durante o dia (manhã e tarde). Mas, quando as formigas diminuíram, as vespas aumentaram sua ocorrência somente pela manhã e tarde. Nessas circunstâncias as aranhas foram abundantes durante a noite, garantindo a proteção diurna e

noturna na época seca fria. Esse aumento coincidiu com a aparição das primeiras plântulas e brotações após a cheia, onde a herbivoria noturna pode ser mais frequente (Strauss et al. 2009). Nesse sentido o controle da herbivoria evitaria efeitos negativos sobre o estabelecimento das plântulas e brotações (Strauss et al. 2009; Yamawo et al. 2012; Yamawo 2014).

De modo geral, os mecanismos de defesa se relacionaram diferentemente às características fenológicas e ambientais. Mas foram os fatores abióticos (inundação) que influenciaram sobre a fenologia e sobre os fatores bióticos (herbivoria) (Richards & Coley 2007; Heil et al. 2000; Anu et al. 2009; Rico-Gray et al. 2012). Particularmente, o desenvolvimento da artropofauna depende de condições ambientais, principalmente umidade, que é considerada como fator limitante da abundância de tais organismos (Richards & Coley 2007; Anu et al. 2009).

Assim, a maior diversidade de herbívoros e inimigos naturais foi registrada no início do período após o auge da cheia (junho), quando as águas ainda estavam altas, com maior disponibilidade de recursos, devido à abundância do banco de macrófitas (Elder 2006; Silva et al. 2009). O aumento de herbívoros e inimigos naturais no final da época úmida quente (fevereiro) e no auge da cheia (maio) coincidiu com o início e intensificação de floração de *I. carnea* respectivamente. Tal fato mostra que existe uma sincronicidade com o aumento da entomofauna, que também inclui os polinizadores que a planta precisa para completar seu ciclo reprodutivo (Galleto & Bernardello 2004; Lima et al. 2013).

Embora, o aumento proporcional da herbivoria e inimigos naturais com o nível de inundação se relacionaram com a diminuição de defesas intrínsecas (látex e swainsonina). Nessas circunstâncias a planta tinha que alocar recursos para essa completar a função reprodutiva e devido a pressão ambiental e a intensificação na produção de estruturas reprodutivas (Bazzaz et al. 1987; Schierenbeck et al. 1994; Freeman 2003; Verges et al. 2007), e suportar a inundação (Dat et al. 2004; Jackson e Colmer 2005). Na maioria dos casos, o impacto da herbivoria é mais forte em plantas que estão se recuperando de uma pressão ambiental, como a inundação (Spiller e Agrawal 2003; Elder 2006) podendo aumentar a susceptibilidade durante esse período (Grace & Ford 1996; Louda e Collinge 1992).

Assim, *I. carnea* investiu em mecanismos de defesa extrínsecos, considerando que a proteção por nectários é mais eficiente em ambientes inundados (Bentley 1976; Cogni et al. 2003). Além disso, foi ótima competidora pois cumpriu com sucesso sua função reprodutiva, sexual e vegetativa (Cipollini 2004; Li et al. 2005; Levine 2000; Stricker et al. 2008; Hakes & Cronin 2011). Dessa forma, a herbivoria atua como um fator de exclusão competitiva em uma comunidade vegetal monodominante sujeita a inundações periódicas (Gough e Grace 1998a,b; Stricker et al. 2008) como a nossa área de estudo, o algodoal no Pantanal.

Nesse sentido, a variação temporal dos diversos mecanismos de defesa se relaciona diretamente com a intensidade das pressões ambientais sem arriscar o sucesso do crescimento e reprodução (Matyssek et al. 2012; Lind et al. 2013). Muitas das características defensivas se correlacionam com suas limitações fisiológicas e compensações (demanda conflitantes) (Hanley et al. 2007) e representam uma restrição na aptidão da planta, resultando ser um fator importante na manutenção da biodiversidade de um local (Simms & Rausher 1987; Simms & Fristz 1990). A expressão de defesas vai depender do custo-benefício e da aquisição de recursos da planta (Cipollini et al. 2003; Venette & Hunter 2011; Matyssek et al. 2012). Custos ecológicos podem incluir um aumento da susceptibilidade a herbívoros, mas as consequências na aptidão da planta (custos fisiológicos) têm sido pouco estudadas (Strauss et al. 2002; Cipollini et al. 2003; Heil 2002). Mas, para *I. carnea* parece que os custos de tais variações e adaptações são proporcionais aos benefícios ecológicos devido ao uso de múltiplas defesas (Karban et al. 1997; Dyer et al. 2001; Moles et al. 2014; Yamawo et al. 2014).

Assim, segundo nossos resultados, não houve possíveis demandas conflitantes entre crescimento e defesa intrínsecas, fisiologicamente mais caras (Gershenson 1994), pois ambos tiveram uma intensidade proporcional. Mas quando se intensificou a produção de estruturas reprodutivas, as defesas intrínsecas diminuíram podendo representar um custo ecológico (Stewar & Keller 1988; Yamawo et al 2012). Em resposta, aumentaram as defesas extrínsecas pelo qual a relação defesa/reprodução não representou uma demanda conflitante (Agrawal et al. 2002; Koricheva et al. 2004) considerando que todos os inimigos se correlacionaram positivamente com a herbivoria. Além disso, a maior pressão ambiental foi a abiótica (inundação) e não a biótica (herbivoria) que comumente é a responsável da expressão das demandas conflitantes e dos custos e/ou benefícios das defesas em plantas (Coley & Kursar 1996; Stinchcombe 2002; Hanley et al. 2007; Matyssek et al. 2012).

Portanto, os custos foram baixos em relação aos benefícios ecológicos, pois *I. carnea* sempre manteve uma estratégia de defesa múltipla, combinando as características fenológicas com mecanismos de defesa extrínsecos e intrínsecos. Consequentemente manteve um nível baixo e constante de herbivoria em todas as fases do seu ciclo fenológico obtendo sucessos em reprodução vegetativa e sexual (Mutikainen et al. 2003; Hakes & Cronin 2011; Siemens et al. 2010). Assim, nosso estudo sugere que as interações planta - herbívoro que ocorrem em escala local podem ter um papel importante na variação temporal da herbivoria e dos mecanismos de defesa em arbustos neotropicais sujeitos a inundações periódicas.

Assim, concluímos que *I. carnea* desenvolve variados mecanismos de defesa a custos ecológicos baixos em vez de mudar de defesa no âmbito dos quadros rígidos de demanda conflitantes, garantindo uma proteção constante contra herbivoria apesar das pressões ambientais e

características fenológicas que determinam sua variação temporal. Nesse sentido, a inundação como pressão ambiental se relaciona diferentemente com os mecanismos de defesa e com a herbivoria variando proporcionalmente com a ocorrência de herbívoros (e herbivoria) e mecanismos extrínsecos, e em paralelo com a diminuição gradual dos mecanismos intrínsecos. Por outro lado, as estruturas vegetativas e reprodutivas imaturas se relacionam com o aumento dos mecanismos intrínsecos, e as estruturas reprodutivas maduras ao dos extrínsecos. Dentro dos extrínsecos, as formigas são uma defesa constante e eficiente se relacionando mais com a herbivoria que com características fenológicas e abióticas.

REFERÊNCIAS

- Agrawal, A.A. (1998) Leaf damage and associated cues induce aggressive ant recruitment in a neotropical ant-plant. *Ecology*, 79, 2100-2112.
- Agrawal, A.A. (1999) Induced responses to herbivory in wild radish: effects on several herbivores and plant fitness. *Ecology*, 80, 1713-1723.
- Agrawal, A.A. (2006) Macroevolution of plant defense strategies. *Ecology and Evolution*, 22, 103-109.
- Agrawal, A.A. & Konno, K. (2009) Latex: A model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 40, 311-31.
- Agrawal, A.A. & Rutter, M. (1998) Dynamic anti-herbivore in ant-plant: the role of induced responses. *Oikos*, 83: 227-236.
- Agrawal, A.A., Janssen, A., Bruin, J., Posthumus, M.A. & Sabelis, M.W. (2002) An ecological cost of plant defence: attractiveness of bitter cucumber plants to natural enemies of herbivores. *Ecology Letters*, 5, 377-385.
- Agrawal, A.A., Lau, J.A., Hamback, P.A. (2006) Community heterogeneity and the evolution of interactions between plants and insect herbivores. *The Quarterly Review of Biology*, 81, 349-376.
- Aide, T.M. (1992) Dry season leaf production: an escape from herbivory. *Biotropica*, 24, 532-537.
- Andrieu, E., Debussche, M., Munoz, F. & Thompson, J.D. (2011) How does herbivory affect individuals and populations of the perennial herb *Paeonia officinalis*? *Flora*, 206, 544-549.
- AntWeb 2002-2014, Formigas registradas para Mato Grosso do Sul. The California Academy of Sciences. Disponivel em: <http://www.antweb.org/taxonomicPage.do?rank=genus&project=matogrosso dosulants&images=true>
- Anu, A., Sabu, T.K. & Vineesh, P.J. (2009) Seasonality of litter insects and relationship with rainfall in a wet evergreen forest in south western ghats. *Journal of Insect Science* 9, 46, disponivel em: <http://www.insectscience.org/9.46>.
- Atala, C., & Gianoli, E. (2008) Induced twining in Convolvulaceae climbing plants in response to leaf damage. *Canadian Journal of Botany*, 86, 595-602.

Austin, D.F. & Huáman, Z.A. (1996) Synopsis of *Ipomoea* (Convolvulaceae) in the Americas. *Taxon*, 45, 6-12.

Austin, D.F. (1977) *Ipomoea carnea* Jacq. vs. *Ipomoea fistulosa* Mart. ex-Choisy. *Taxon*, 26, 235-238.

Baccaro, F. (2006) Chave para as principais subfamílias e gêneros de formigas (Hymenoptera: Formicidae). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA Programa de Pesquisa em Biodiversidade - PPBIO.

Barton, K.E. & Hanley, M.E. (2013) Seedling - herbivore interactions: insights into plant defence and regeneration patterns. *Annals of Botany*, 112, 643 - 650.

Bazzaz, F.A., Chiariello, N.R., Coley, P.D., Pitelka, L.F. (1987) Allocating resources to reproduction and defense. *BioScience*, 37, 58-67.

Bencke, S.C. & Morellato, L.P.C. (2002) Comparação de dois métodos de avaliação da fenologia de plantas, sua interpretação e representação. *Revista Brasileira de Botânica*, 25, 269-275.

Bentley, B.L. (1976) Plants bearing extrafloral nectaries and the associated ant community: interhabitat differences in the reduction of herbivore damage. *Ecology*, 57, 815-820.

Bixenmann, R.J., Coley, P.D. & Kursar T.A (2011) Is extrafloral nectar production induced by herbivores or ants in a tropical facultative ant-plant mutualism? *Oecologia*, 165, 417-425.

Brown M.W. & Schmitt, J.J. (2001) Seasonal and diurnal dynamics of beneficial insect populations in apple orchards under different management intensity. *Environmental Entomology*, 30, 415-424.

Carmona-Galindo, V.D., Morales, K., Maser, R., Doyle, J., Gobrial, M. (2014) Characterization of sugar diversity in floral and extra-floral nectar from the coastal coral tree (*Erythrina caffra* Thunb.) in Southern California. *Open Journal of Ecology*, 4, 23-27.

Carroll, A.L. & Quiring, D.T. (2003) Herbivory modifies conifer phenology: induced amelioration by a specialist folivore. *Oecologia*, 136, 88-95.

Carson, W.P. & Root, R.B. (2000) Herbivory and plant species coexistence: Community regulation by an outbreaking phytophagous insect. *Ecological Monographs*, 70, 73-99.

Castillo, G., Cruz, L.L., Hernández-Cumplido J., Oyama, K., Flores-Ortiz, C. M., Fornoni, J., Valverde, P.L. & Núñez-Farfán, J. (2013) Geographic association and temporal variation

- of chemical and physical defense and leaf damage in *Datura stramonium*. Ecological Research, 28, 663-672.
- Cipollini, D. & Heil, M. (2010) Costs and benefits of induced resistance to herbivores and pathogens in plants. CAB Review: Perspective Agricultural Veterinarian Science, Nutrition and Natural Resources, 5, 1-25.
- Cipollini, D. (2004) Stretching the limits of plasticity: can a plant defend against both competitors and herbivores? Ecology, 85, 28-37.
- Cipollini, D., Purringtonb, C.B. & Bergelsonc, J. (2003) Costs of induced responses in plants. Basic and Applied Ecology, 4, 79-89.
- Coley, P.D. & Barone, J.A. (1996) Herbivory and plant defenses in tropical forests. Annual Review of Ecology and Systematics, 27, 305-35
- Coley, P.D. & Kursar, T.A. (1996) Antiherbivore defenses of young tropical leaves: Physiological constraints and ecological trade-offs. Tropical forest plant ecophysiology (eds S.S. Mulkey, R.L. Chazdon, & A.P. Smith), pp. 305-335. New York: Chapman & Hall Press. USA
- Corrêa, M., Fernandes, W. & Leal, I. (2006) Diversidade de formigas epigéicas (Hymenoptera: Formicidae) em capões do Pantanal Sul Matogrossense: Relações entre riqueza de espécies e complexidade estrutural da área. Neotropical Entomology, 35, 724-730.
- Costa Lima, J. (1962) Insetos do Brasil. Escola Nacional de Agronomia. Série Didáticas, 1938 – 1962.
- Craig, T.P. (2010) The resource regulation hypothesis and positive feedback loops in plant - herbivore interactions. Population Ecology, 52, 461-473.
- Dat J.F., Capelli, N., Folzer, H., Bourgeade, P., Badot, P.M. (2004) Sensing and signalling during plant flooding. Plant Physiology and Biochemistry, 42, 273–282.
- De La Fuente, M.A.S. & Marquis, R.J. (1999) The role of ant-tended extrafloral nectaries in the protection and benefit of a Neotropical rainforest tree. Oecologia, 118, 192-202.
- Dyer, E.A., Dodson, C.D., Beihoffer, J. & Letourneau, D.K. (2001) Trade-offs in antiherbivore defenses in *Piper cenocladum*: Ant mutualists versus plant secondary metabolites. Journal of Chemical Ecology, 27, 581-592.
- Elder, B.D. (2006) Disturbance-mediated trophic interactions and plant performance. Oecologia, 147, 261-271.

- Erickson, A.A., Bell, S.S. & Dawes, C.J. (2012) Associational resistance protects mangrove leaves from crab herbivory. *Acta Oecologica*, 41, 46-57.
- Falcão, J.C.F., Dátilo, W. & Izzo, T.J. (2013) Temporal variation in extrafloral nectar secretion in different ontogenetic stages of the fruits of *Alibertia verrucosa* S. Moore (Rubiaceae) in a neotropical savanna. *Journal of Plant Interactions*, 9, 137-142.
- Fernández, F. (2003) Introducción a las Hormigas de la Región Neotropical. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia. XXVI.
- Freeman, R.S., Brody, A.K. & Neefus, C.D. (2003) Flowering phenology and compensation for herbivory in *Ipomopsis aggregata*. *Oecologia*, 136, 394-401.
- Funk, J.L. & Throop, H.L. (2010) Enemy release and plant invasion: patterns of defensive traits and leaf damage in Hawaii. *Oecologia*, 162, 815-823.
- Galetto L. & Bernardello G. (2004) Floral nectaries, nectar production dynamics and chemical composition in six *Ipomoea* species (Convolvulaceae) in relation to pollinators. *Annals of Botany*, 94, 269-280.
- Gardner, D.R. & Cook, D. (2011) A comparison of alternative sample preparation procedures for the analysis of swainsonine using LC-MS/MS. *Phytochemical Analysis*, 22, 124-127.
- Gentry, G. (2003) Multiple parasitoid visitors to the extrafloral nectaries of *Solanum adherens*. Is *S. adherens* an insectary plant? *Basic and Applied Ecology*, 4, 405-411.
- Gershenzon, J. (1994). Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher-plants. *Journal of Chemical Ecology*, 20, 1281-1328.
- Gibb, T.J. & Oseto, C.Y. (2006) Arthropod Collection and Identification Field and Laboratory Techniques. Academic Press-Elsevier Science.USA.
- Gough, L. & Grace, J.B. (1998a) Effects of flooding, salinity and herbivory on coastal plant communities, Louisiana, United States. *Oecologia*, 117, 527-535.
- Gough, L. & Grace, J.B. (1998b) Herbivore effects on plant species density at varying productivity levels. *Ecology*, 79, 1586–1594.
- Grace, J.B. & Ford, M.A. (1996) The potential impact of herbivores on the susceptibility of *Sagittaria lancifolia* to saltwater intrusion in coastal wetlands. *Estuaries*, 19, 13-20.
- Grangier, J., Dejean, A., Malé, P.G. & Orivel, J. (2008) Indirect defense in a highly specific ant - plant mutualism. *Naturwissenschaften*, 95, 909-916.

- Haase, R. (1999) Seasonal growth of algodão-bravo (*Ipomoea carnea* spp. *fistulosa*). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34, 159-163.
- Hakes, A.S. & Cronin, J.T. (2011) Environmental heterogeneity and spatiotemporal variability in plant defense traits. *Oikos*, 120, 452–462
- Hanley, M.E., Lamont B.B., Fairbanks M.M. & Rafferty, C.M. (2007) Plant structural traits and their role in anti-herbivore defence. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 8, 157-178.
- Haraguchi, M., Mórniak, S.L., Ikeda, K., Minami, Y., Kato, A., Watson, A.A., Nash, R.J., Molyneux, R.J. & Asano, N. (2003) Alkaloidal components in the poisonous plant, *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4995-5000.
- Harvey, J.A. & Gols, R. (2011) Population-related variation in plant defense more strongly affects survival of an herbivore than its solitary parasitoid wasp. *Journal of Chemical Ecology*, 37, 1081-1090.
- Harvey, J.A., van Dam, N.M., Raaijmakers, C.E., Bullock, J.M. & Gols, R. (2011) Tri-trophic effects of inter- and intra-population variation in defence chemistry of wild cabbage (*Brassica oleracea*). *Oecologia*, 166, 421-431.
- Hei, M. (2011) Nectar - generation, regulation and ecological functions. *Trends in Plant Science*, 16, 191-200.
- Heil, M. & McKey, D. (2003) Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 34, 425-453.
- Heil, M. (2002) Ecological costs of induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, doi: 10.1016/S1369-5266(02)00267-4.
- Heil, M., Fiala, B., Baumann, B. & Linsenmair, K.E. (2000) Temporal, spatial and biotic variations in extrafloral nectar secretion by *Macaranga tanarius*. *Functional Ecology*, 14, 749-757.
- Horvitz, C.C. & Schemske, D.W. (2002) Effects of plant size, leaf herbivory, local competition and fruit production on survival, growth and future reproduction of a neotropical herb. *Journal of Ecology*, 90, 279-290.
- Jackson, D.E. (2009) Nutritional ecology: A first vegetarian spider. *Current Biology*, doi: 10.1016/j.cub.2009.08.043.

- Jackson, M.B., Colmer, T.D. (2005) Response and Adaptation by Plants to Flooding Stress. *Annals of Botany*, 96, 501–505.
- Jones, M.E. & Paine, T.M. (2012) Ants impact sawfly oviposition on bracken fern in southern California. *Arthropod-Plant Interactions*, 6, 283-287.
- Jong, T.J. & van der Meijden, E. (2000) On the correlation between allocation to defence and regrowth in plants. *Oikos*, 88, 503-508.
- Karban, R. & Baldwin I.T. (1997) Induced responses to herbivory. The University of Chicago Press, Chicago.
- Karban, R. (1993) Costs and benefits of induced resistance and plant density for a native shrub, *Gossypium thurberi*. *Ecology*, 74, 9-19.
- Karban, R., Agrawal, A.A. & Mangel, M. (1997) The benefits of induced defenses against herbivores. *Ecology*, 78, 1351-1355.
- Keeler, K.H. (1977) The extrafloral nectaries of *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae). *American Journal of Botany*, 64, 1182-1188.
- Keeler, K.H. (1978) Insects feeding at extrafloral nectaries of *Ipomoea carnea*. *Entomological News*, 89, 163-168.
- Kim, J., Quaghebeur, H. & Felton, G.W. (2011) Reiterative and interruptive signaling in induced plant resistance to chewing insects. *Phytochemistry*, 72, 1624-1634.
- Konno, K. (2011) Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein. *Phytochemistry*, 72, 1510-1530.
- Köppen, W. (1931) *Climatologia*. Buenos Aires, Fondo de Cultura Económica.
- Koricheva, J., Nykcanen H. & Gianoli, E. (2004) Meta-analysis of trade-offs among plant antiherbivore defenses: are plants Jacks-of-all-trades, masters of all? *The American Naturalist*, 163, 65-75.
- Levine, J.M. (2000) Complex interactions in a streamside plant community. *Ecology*, 81, 431-3444.
- Lewinsohn, T.M., Novotny, V. & Basset, Y. (2005) Insects on plants: Diversity of herbivore assemblages revisited. *Annual Review Ecology, Evolution and Systematics*, 36, 597-620.

- Li, S., Martin, L.T., Pezeshki, S.R F., Shields, D. (2005) Responses of black willow (*Salix nigra*) cuttings to simulated herbivory and flooding. *Acta Oecologica*, 28, 173-180.
- Lieurance, D. & Cipollini, D. (2013) Environmental influences on growth and defence responses of the invasive shrub, *Lonicera maackii*, to simulated and real herbivory in the juvenile stage. *Annals of Botany*, 112, 741-749.
- Lima J.R., Gimenes, M. & Pigozzo, C.M. (2013) Three diurnal patterns of anthesis in *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* (Convolvulaceae): Implications for temporal, behavioral and morphological characteristics of pollinators? *Flora*, 208, 138-146.
- Lin S.M. & Galloway L.F. (2010) Environmental context determines within- and potential between-generation consequences of herbivory. *Oecologia*, 163, 911-920.
- Lind, E.M., Borer, E., Seabloom, E., Adler, P., Bakker, J.D., Blumenthal, D.M., Crawley, M., Davies, K., Firn, J., Gruner, D.S., Harpole, W.S., Hautier, Y., Hillebrand, H., Knops, J., Melbourne, B., Mortensen, B., Risch, A.C., Schuetz, M.C., Stevens, P. & Wragg, P.D. (2013) Life-history constraints in grassland plant species: a growth-defence trade-off is the norm. *Ecology Letters*, 16, 513-521.
- Louda, S.M. & Collinge, S.K. (1992) Plant resistance to insect herbivores: A field test of the environmental stress hypothesis. *Ecology*, 73, 153-169.
- Marascuilo, L.A. & Busk, P.L. (1987) Loglinear models: a way to study main effects and interactions for multidimensional contingency tables with categorical data. *Journal of Counseling Psychology*, 34, 443-445.
- Marazzi, B., Bronstein, J.L. & Koptur, S. (2013) The diversity, ecology and evolution of extrafloral nectaries: current perspectives and future challenges. *Annals of Botany*, 111, 1243-1250.
- Marquis, R.J. (1984) Leaf herbivores decrease fitness of a tropical plant. *Science*, 226, 537-539.
- Matyssek, R., Schnyder, H., Obwald, W., Ernst, D., Munch, J.C. & Pretzsch, H. (2012) Growth and defence in plants: Resource allocation at multiple scales. *Ecological Studies*, 220, 474-492.
- Mauricio, R. (2000) Natural selection and the joint evolution of tolerance and resistance as plant defense. *Evolutionary Ecology*, 14, 491-507.
- Mauricio, R., Rausher, M.D. & Burdick, D.S. (1997) Variation in the defense strategies of plants: Are resistance and tolerance mutually exclusive? *Ecology*, 78, 1301-1311.

McKey, D.D. (1979) The distribution of secondary compounds within plants. *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*, (eds. G.A. Rosenthal & D.H. Janzen). Academic Press, New Jersey, 55-133 pp.

Meehan, C.J., Olson, E.J., Reudink, M.W., Kyser, T.K., & Curry, R.L. (2005) Herbivory in a spider through exploitation of an ant-plant mutualism. *Current Biology*, doi: 10.1016/j.cub.2009.08.043.

Meira, M., Pereira, E., David, J.M. & David, J.P. (2012) Review of the genus *Ipomoea*: traditional uses, chemistry and biological activities. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22, 682-713.

Moles, A.T., Begoña, P., Wallis, I.R., Foley, W.J., Poore, A.G.B., Seabloom, E.W., Vesk, P.A., Bisigato A.J., Cella-Pizarro, L., Clark, C.J., Cohen, P.S., Cornwell, W.K., Edwards, W., Ejrnæs, R., Gonzales-Ojeda, T., Graae, B.J., Hay, G., Lumbwe, F.C., Rodriguez, B.M., Moore, B.D., Peri, P.L., Poulsen, J.R., Stegen J.C., Veldtman, R., Zeipel, H., Andrew, N.R., Boulter, S.L., Borer, E.T., Cornelissen, J.H.C., Farji-Brener, A.G., DeGabriel, J.L., Jurado, E., Kyhn, L.A., Low, B., Mulder, C.P.H., Reardon-Smith, K., Rodriguez, J., De Fortier, A., & Hui, F.K.C. (2013) Correlations between physical and chemical defences in plants: tradeoffs, syndromes, or just many different ways to skin a herbivorous cat? *New Phytologist*, 198, 252–263.

Moran, N. & Hamilton, D.W. (1980) Low nutritive quality as a defense against herbivores. *Journal of Theoretical Biology*, 86, 247-254.

Mortensen, B., Wagner, D. & Doak, P. (2011) Defensive effects of extrafloral nectaries in quaking aspen differ with scale. *Oecologia*, 165, 983-993.

Mortensen, B., Wagner, D. & Doak, P. (2013) Parental resource and offspring liability: the influence of extrafloral nectar on oviposition by a leaf-mining moth. *Oecologia*, 172, 767-777.

Mutikainen, P., Walls, M., Ovaska, J., Keinänen, M., Julkunen-Tiitto, R. & Vapaavuori, E. (2002) Costs of herbivore resistance in clonal saplings of *Betula pendula*. *Oecologia*, 133, 364-371

Newton, E., Bullock, J.M. & Hodgson, D. (2010) Temporal consistency in herbivore responses to glucosinolate polymorphism in populations of wild cabbage (*Brassica oleracea*). *Oecologia*, 164, 689-69.

- Nogueira, A., Guimarães, E., Rodrigues, S. & Lohmann, L.G. (2012) Do extrafloral nectaries present a defensive role against herbivores in two species of the family Bignoniaceae in a Neotropical savannas? *Plant Ecology*, 213, 289-301.
- Novotny, V., Basset, Y., Auga, J., Boen, W., Dal, C., Drozd, P., Kasbal, M., Isua, B., Kutil, R. & Manumbor, M. (1999) Predation risk for herbivorous insects on tropical vegetation: A search for enemy-free space and time. *Australian Journal of Ecology*, 24, 477-483.
- Núñez-Farfán, J., Fornoni, J. & Valverde, P.L. (2007) The evolution of resistance and tolerance to herbivores. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 38, 541-66.
- Patt, J.M. & Pfannenstiel R.S. (2008) Odor-based recognition of nectar in cursorial spiders. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 127, 64-71.
- Pfannenstiel, R.S. & Patt, J.M. (2012) Feeding on nectar and honeydew sugars improves survivorship of two nocturnal cursorial spiders. *Biological Control*, 63, 231-236.
- Pollard, S.D., Beck, M.W. & Dodson, G.N. (1995) Why do male crab spiders drink nectar? *Animal Behaviour*, 49, 1443-1448.
- Pott, A., Oliveira, A.K.M., Damasceno-Junior, G.A. & Silva, J.S.V. (2011) Plant diversity of the Pantanal wetland. *Brazilian Journal of Biology*, 71, 265-273.
- Pott, V.J., Pott, A., Lima, L.C.P., Moreira, S.N. & Oliveira, A.K.M. (2011) Aquatic macrophyte diversity of the Pantanal wetland and upper basin. *Brazilian Journal of Biology*, 71, 255-263,
- Price, P.W., Bouton, C.E., Gross, P., McPheron, B.A., Thompson, J.N. & Weis, A.E. (1980) Interactions among three trophic levels: Influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 11, 41-65.
- Quintero, C. & Bowers M.D. (2013) Effects of insect herbivory on induced chemical defences and compensation during early plant development in *Penstemon virgatus*. *Annals of Botany*, 112, 661-669.
- Radhika, V., Kost, C., Mithöfer, A., & Boland, W. (2010) Regulation of extrafloral nectar secretion by jasmonates in lima bean is light dependent. *PNAS Early Edition*, Disponível em: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1009007107
- Rafael, J.A., Melo, G.A.R., Carvalho, C.J.B., Casari, S.A. & Constantino, R. (2012) *Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia*. Ribeirão Preto. Editora Holos.

- Resh, V.H. & Cardé, R.T. (2003) Encyclopedia of Insects. Academic Press-Elsevier Science.USA.
- Rhoades D.F. & Cates, R.G. (1976) Toward a general theory of plant antiherbivore chemistry. Biochemical interactions between plants and insects (eds. J. Wallace, & R.L. Mansell), pp.168-213. Recent Advances in Phytochemistry.
- Richards, L.A. & Coley, P.D. (2007) Seasonal and habitat differences affect the impact of food and predation on herbivores: a comparison between gaps and understory of a tropical forest. *Oikos*, 116, 31-40.
- Ricklefs, R.E. (2010) A Economia da Natureza - 6^a Ed. Guanabara Koogan, USA.
- Rico-Gray, V. & Castro, G. (1996) Effect of an ant-aphid-plant interaction on the reproductive fitness of *Paullinia fuscescens* (Sapindaceae). *The Southwest Naturalist*, 41, 434-440.
- Rico-Gray, V. & Oliveira, P.S. (2007) The ecology and evolution of ant-plant interactions. *Myrmecological News*, 11, 78-83.
- Rico-Gray, V. (1993) Use of plant-derived food resources by ants in the dry tropical lowlands of coastal Veracruz, Mexico. *Biotropica*, 25, 301-315.
- Rico-Gray, V., Díaz, C., Ramírez, A., Guimarães, P.R. & Holland, J.N. (2012) Abiotic factors shape temporal variation in the structure of an ant-plant network. *Arthropod-Plant Interactions*, 6, 289-295.
- Rico-Gray, V., Garcia-Franco, J.G., Palacios-Rios, M., Díaz, C., Parra-Tabla, V. & Navarro, J.A. (1998) Geographical and seasonal variation in the richness of ant-plant interactions in Mexico. *Biotropica*, 30, 190-200.
- Romero, G.Q. & Izzo, T.J. (2004) Leaf damage induces ant recruitment in the Amazonian ant - plant *Hirtella myrmecophila*. *Journal of Tropical Ecology*, 20, 675-682.
- Röse, U.S.R., Lewis, J. & Tumlinson, J.H. (2006) Extrafloral nectar from cotton (*Gossypium hirsutum*) as a food source for parasitic wasps. *Functional Ecology*, 20, 67-74.
- Rosumek, F.B., Silveira, F.A.O., Neves F.S., Barbosa N.P., Diniz, U.L., Oki, Y., Pezzini, F.G., Fernandes, W. & Cornelissen, T. (2009) Ants on plants: A meta-analysis of the role of ants as plant biotic defenses. *Oecologia*, 160, 537-549.
- Rudgers, J.A., Hodgen, J.G. & White J.W. (2003) Behavioral mechanisms underlie an ant-plant mutualism. *Oecologia*, 135, 51 - 59.

Ruhren, S. & Handel, S.N. (1999) Jumping spiders (Salticidae) enhance the seed production of a plant with extrafloral nectaries. *Oecologia*, 119, 227-230.

Sagers C.L. & Coley P.D. (1995) Benefits and costs of defense in a neotropical shrub, *Ecology*, 76, 1835-1843.

Sant'Ana M.V., Rodrigues, R.B., Lopes, C.C., Faccenda, O. & Fernandes, D.W. (2008) Atividade de forrageamento de formigas (Hymenoptera: Formicidae) em áreas de mata e campo de gramíneas no Pantanal Sul-Mato-Grossense. *EntomoBrasilis*, 1, 29-32

Schierenbeck, K.A., Mack, R.N. & Sharitz, R.R. (1994) Effects of herbivory on growth and biomass allocation in native and introduced species of *Lonicera*. *Ecology*, 75, 1661-1672.

Schneider, D.C. (2001) The rise of the concept of scale in ecology. *BioScience*, 51, 545-553

Schultz, J.C. (1988) Plant responses induced by Herbivore. *Tree*, 3, 45-49.

Schwarz, A., Górnjak, S.L., Bernardi, M.M., Dagli, M.L.Z. & Spínosa, H.S. (2003) Effects of *Ipomoea carnea* aqueous fraction intake by dams during pregnancy on the physical and neurobehavioral development of rat offspring. *Neurotoxicology and Teratology*, 25, 615-626.

Schwarz, A., Zoriki, R., Schumaher, B., Hueza, I., Gardner, D., Haraguchi, M., Lima, S., Bernardi, M.M. & Souza, H. (2004) Identificação de princípios ativos presentes na *Ipomoea carnea* brasileira. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 40, 181-187.

Shenoy, M., Radhika, V., Satish, S. & Borges, R.M. (2012) Composition of extrafloral nectar influences interactions between the *Myrmecophyte humboldtia brunonis* and its ant associates. *Journal of Chemical Ecology*, 38, 88-99.

Siemens, D.H., Keck, A.G. & Ziegenbein, S. (2010) Optimal defense in plants: assessment of resource allocation costs. *Evolutionary Ecology*, 24, 1291-1305.

Silva, E., Barônio, G.J., Silingardi, H.M. & Del Claro, K. (2013) Foraging behavior of *Brachygastra lecheguana* (Hymenoptera: Vespidae) on *Banisteriopsis malifolia* (Malpighiaceae): Extrafloral nectar consumption and herbivore predation in a tending ant system. *Entomological Science*, 16, 162-169.

Silva, F.H. Favero, S., Sabino J. & Garnés J.S. (2009) Distribuição da entomofauna associada às macrófitas aquáticas na vazante do rio Correntoso, Pantanal do Negro, Estado do Mato Vazante do rio Correntoso, Pantanal do Negro, Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil Grosso do Sul, Brasil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 31, 127-134.

- Silva, L.B., Fernandes, M.A.U. & Nascimento, J.N. (2010) Diversidade de insetos capturados em armadilha McPhail no pantanal sul-mato-grossense. *Interbio*, 4, 22-30.
- Simms, E.L. & Fritz, R.S. (1990) The ecology and evolution of host-plant resistance to insect. *Tree*, 5, 356-359.
- Simms, E.L. & Rausher, M.D. (1987) Costs and benefits of plant resistance to herbivory. *The American Midland Naturalist*, 130, 570-581.
- Soren, R. & Chowdhury, S. (2011) Spider nectivory by *Phintella vittata* Koch (Araneae: Salticidae) from the extrafloral nectaries of *Urena lobata* L. from the Indian region. *Current Science*, 100, 1123-1124.
- Sowell, D.R. & Wolfe, L.M. (2010) Pattern and consequences of floral herbivory in four sympatric *Ipomoea* species. *The American Midland Naturalist*, 163, 173-185.
- Spiller, D. & Agrawal A.A. (2003) Intense disturbance enhances plant susceptibility to herbivory: Natural and experimental evidence. *Ecology*, 84, 890-897.
- Stamp, R. (2003) Theory of plant defensive level: example of process and pitfalls in development of ecological theory. *Oikos*, 102, 672-678.
- Steward, J.L. & Keeler, K.H. (1988) Are there trade-offs among antiherbivore defenses in *Ipomoea* (Convolvulaceae)? *Oikos*, 53, 79-86.
- Stinchcombe, J.R. (2002) Environmental dependency in the expression of costs of tolerance to deer herbivory. *Evolution*, 56, 1063-1067.
- Stowe, K.A. & Marquis, R.J. (2011) Costs of defense: correlated responses to divergent selection for foliar glucosinolate content in *Brassica rapa*. *Evolutionary Ecology*, 25, 763-775.
- Strauss, S.W. & Agrawal, A.A. (1999) The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends in Ecology and Evolution*, 14, 179-185.
- Strauss, S.Y., Rudgers, J.A., Lau, J.A. & Irwin, R.E. (2002) Direct and ecological costs of resistance to herbivory. *Trends in Ecology and Evolution*, 17, 278-285.
- Strauss, S.Y., Stanton, M.L., Emery, N.C., Bradley, C.A., Carleton, A., Dittrich-Reed, D.R., Ervin, O.A., Gray, L.N., Hamilton, A.M., Rogge, J.H., Harper, S.D., Law, K.C., Pham, V.Q., Putnam, M.E., Roth, T.M., Theil, J.H., Wells, L.M. & Yoshizuka, E.M. (2009) Cryptic seedling herbivory by nocturnal introduced generalists impacts survival, performance of native and exotic plants. *Ecology*, 90, 419-429.

- Striker, G.G., Insausti, P. & Grimoldi, A.A. (2008) Flooding effects on plants recovering from defoliation in *Paspalum dilatatum* and *Lotus tenuis*. *Annals of Botany*, 102, 247–254.
- Taylor, R.M. & Pfannenstie, R.S. (2008) Nectar feeding by wandering spiders on cotton plants. *Environmental Entomology*, 37, 996-1002.
- Taylor, R.M. (2004) Plant nectar contributes to the survival, activity, growth, and fecundity of the nectar-feeding wandering spider *Cheiracanthium inclusum* (Hentz) (Araneae: Miturgidae). *Dissertação da The Ohio State University*, 151p.
- Tiffin, P. & Rausher, M.D. (1999) Genetic constraints and selection acting on tolerance to herbivory in the common morning glory, *Ipomoea purpurea*. *American Naturalist*, 154, 700-716.
- Tiffin, P. (2002) Competition and time of damage affect the pattern of selection acting on plant defense against herbivores. *Ecology*, 83, 1981-1990.
- Tokarnia, C.H., Dobereiner, J. & Peixoto, P.V. (2002) Poisonous plants affecting livestock in Brazil. *Toxicon*, 40, 1635-1660.
- Trager, M.D., Bhotika, S., Hostetler, J.A., Andrade, V., Rodriguez-Cabal, M.A., Keon, C.S.M., Osenberg, C.W. & Bolker, B.M. (2010) Benefits for plants in ant-plant protective mutualisms: A meta-analysis. *PLoS ONE* 5, doi: 10.1371/journal.pone.001430.2010.
- Tulsiani D.R.P., Broquist, H.P., James L.F. & Touster, A. (1984) The similar effects of swainsonine and locoweed on tissue glycosidases and oligosaccharides of the pig indicate that the alkaloid is the principal toxin responsible for the induction of locoism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 232, 76-85.
- Vannette, R.L. & Hunter, M.D. (2011) Plant defence theory re-examined: nonlinear expectations based on the costs and benefits of resource mutualisms. *Journal of Ecology*, 99, 66-76.
- Vergés, A., Becerro, M.A., Alcoverro, T. & Romero, J. (2007) Variation in multiple traits of vegetative and reproductive seagrass tissues influences plant-herbivore interactions. *Oecologia*, 151, 675-686.
- White, T.C.R. (1993) The inadequate environment: Nitrogen and the abundance of animals. Springer-Verlag.
- Wilder, S.M. & Eubanks, M.D. (2010) Extrafloral nectar content alters foraging preferences of a predatory ant. *Biological Letters*, 6, 177-179.

Wolda H. (1988) Insect seasonality: Why? Annual Review of Ecology and Systematics, 19, 1-18.

Yamawo, A., Tagawa J., & Suzuki, N.(2012) Two *Mallotus* species of different life histories adopt different defense strategies in relation to leaf age. Plant Species Biology, doi: 10.1111/1442-1984.12001.

Yamawo, A., Tagawa, J., Hada, Y. & Suzuki, N. (2014) Different combinations of multiple defence traits in a extrafloral nectary-bearing plant growing under various habitat conditions. Journal of Ecology, 102, 238-247.