

Universidade Federal do Amazonas – UFAM
Faculdade de Ciências Agrárias – FCA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e
Ambientais – PPGCIFA

Herbivoria e características foliares de espécies
florestais sob condições contrastantes de irradiância

Debora Coelho da Silva

Manaus, Amazonas

Junho/2019

Universidade Federal do Amazonas – UFAM
Faculdade de Ciências Agrárias – FCA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e
Ambientais – PPGCIFA

Herbivoria e características foliares de espécies
florestais sob condições contrastantes de irradiância

Debora Coelho da Silva

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Florestais e Ambientais da
Universidade Federal do Amazonas
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Ciências Florestais em Ambientais.

Orientador: Dr. Marciel José Ferreira

Manaus, Amazonas

Junho/2019

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586h Silva, Debora Coelho da
Herbivoria e características foliares de espécies florestais sob condições contrastantes de irradiância / Debora Coelho da Silva. 2019
73 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Marciel José Ferreira
Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais e Ambientais) - Universidade Federal do Amazonas.

1. estresse biótico. 2. irradiância. 3. ecofisiologia. 4. compostos fenólicos. 5. plantios florestais. I. Ferreira, Marciel José II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

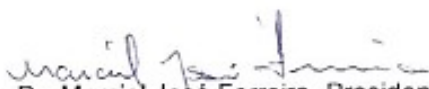
DEBORA COELHO DA SILVA

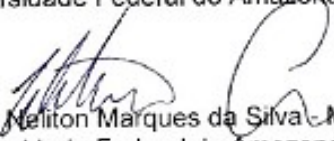
HERBIVORIA E CARACTERÍSTICAS FOLIARES DE
ESPÉCIES FLORESTAIS SOB CONDIÇÕES
CONTRASTANTES DE IRRADIÂNCIA

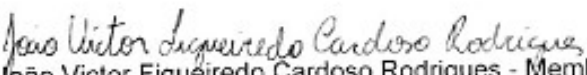
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Florestais e Ambientais, área de concentração em Ciências Florestais e Ambientais.

Aprovada em 26 de Junho de 2019

BANCA EXAMINADORA


Dr. Marciel José Ferreira- Presidente
Universidade Federal do Amazonas - UFAM


Dr. Meliton Marques da Silva- Membro
Universidade Federal do Amazonas - UFAM


Dr. João Victor Figueiredo Cardoso Rodrigues - Membro
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Dedicatória

Aos meus pais, Eliane e Venildo, pelo apoio e paciência.

Aos meus irmãos, Ercília, Venício e Ester, pelo afeto.

Ao meu filho, Enzo, por dizer que me ama todos os dias.

Agradecimentos

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais (PPGCIFA) pela possibilidade de realização do mestrado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo financiamento do projeto “*Crescimento e herbivoria de espécies florestais em plantio de enriquecimento de floresta secundária*”, edital FAPEAM/MCT/CNPq/CT-INFRA n.º 004/2017, que forneceu recursos ao desenvolvimento da pesquisa reportada na presente dissertação;

A todos os professores do PPGCIFA e do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pelas contribuições à minha formação;

Ao meu orientador, Dr. Marciel José Ferreira, por toda paciência, incentivo, confiança e palavras de conforto. Meu desejo de continuar na carreira científica nasceu assistindo às suas aulas;

À equipe do Laboratório de Silvicultura, Alex, Alaíde, André, Thalita, Kamila, Guilherme e Victor, por todo apoio nas coletas de dados, análises de laboratório, conversas aleatórias e troca de memes;

Aos colegas, que se tornaram meus grandes amigos ao longo desses dois anos, Thayane Matos e José Carlos Soares. As conversas que vão de análises estatísticas até qual melhor sabor de brigadeiro sem dúvida foram o que me ajudaram a passar esse período de maneira mais leve. Obrigada pela ajuda no campo, no laboratório e no departamento pessoal;

À equipe da Fazenda Experimental da UFAM, em especial ao Senhor Cosmo, Jacó e todos os ajudantes de campo que se revezavam na chuva e no sol para me acompanhar nas coletas;

Às estagiárias do IFAM, Rosa, Maria, Rayssa e Sabrina que foram fundamentais na minha coleta principal;

À equipe do Laboratório de Fisiologia Ecológica de Plantas (LAFIECO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo (USP) e ao Professor Dr. Marcos Buckeridge, pela possibilidade de colaboração. À Eglee, por estar sempre disposta a dar suas contribuições. Em especial à Laura, que me ajudou pipetar e a lavar mil tubos de ensaio;

À equipe do Laboratório de Fitoquímica do Instituto de Ciências Biológicas da USP e ao professor Dr. Antônio Salatino, pela oportunidade de colaboração;

À Dra. Adriana Grandis, que foi de uma contribuição inestimável, tanto científica como pessoal. Obrigada pela acolhida, conversas, conselhos e por me tratar como se eu fosse da sua família;

À Dra. Carmén Palácios, que apresentou o meu tão sonhado “mundo dos compostos secundários”. Foi uma das melhores experiências científicas que eu já participei;

Aos meus colegas de turma, em especial à Brisa Flor, que me convenceu a fazer o mestrado e à minha amiga onça, Fabrícia Reges, que assim como eu, não desistiu de estudar aquilo que o coração pede;

Ao meu time de rugby, em especial à Deborah, Patrícia, Mikaelle, Mayra, Kamila, Viviane e aos treinadores Roberto, Bené e Willfredo. Vocês foram meu porto seguro todos os sábados que eu não estava fazendo coleta ou análise;

À minha mãe, pelo apoio incondicional para eu concluir o mestrado. Obrigada pelo carinho, palavras fortes, conselhos e comidas quentinhas. Ao meu pai, por me dar força. Ao meu filho, por ser o motivo pelo qual tudo faz sentido;

À minha família, irmãos, tios, tias e primos, que me ajudaram de forma que apenas uma família com muito amor consegue fazer;

Enfim, a todos que contribuíram para essa dissertação e para meu crescimento pessoal e profissional, muito obrigada.

Resumo

A herbivoria é um dos fatores de estresse biótico que afetam o estabelecimento inicial das plantas. Os principais fatores que direcionam a herbivoria em espécies arbóreas tropicais ainda não são bem compreendidos. No presente estudo, nós investigamos se condições contrastantes de irradiância influenciam a herbivoria e se características funcionais foliares estão relacionadas à variação interespecífica na herbivoria em diferentes condições de irradiância. Nós medimos a herbivoria (redução de área foliar por insetos desfolhadores) em cinco espécies florestais sob plantio de enriquecimento de florestas secundárias a partir de dois indicadores, a herbivoria acumulada (pontual) e a taxa de herbivoria (medida ao longo do tempo). As medições foram feitas em três condições de irradiância (baixa irradiância, PPFD = 2,6 mol m² dia⁻¹; moderada irradiância, PPFD = 19,2 mol m² dia⁻¹ e alta irradiância, PPFD = 33,1 mol m² dia⁻¹). Além disso, analisamos sete características morfofisiológicas foliares: área foliar específica, teor relativo de água, esclerofila, conteúdo de compostos fenólicos, tanino total, tanino condensado e concentração de carboidratos não estruturais (amido, sacarose, glicose, frutose e rafinose). O efeito da condição de irradiância sobre a herbivoria diferiu entre os indicadores utilizados. Isto, pois a medição pontual (herbivoria acumulada) não captura o efeito da dinâmica foliar das espécies. A espécie com dinâmica foliar mais intensa (*Tabebuia rosea*) teve maiores taxas de herbivoria. Dentre as características morfofisiológicas foliares, características de defesa química (teores totais de fenol e tanino) foram mais relacionadas à variação interespecífica nas taxas de herbivoria nas condições de irradiância mais contrastantes (baixa e alta irradiância). A variação interespecífica nas taxas de herbivoria sugere que a pressão seletiva de herbívoros é principalmente determinada pelo grau de digestibilidade das folhas.

Palavras chave: estresse biótico, irradiância, ecofisiologia, compostos fenólicos, plantios florestais.

Abstract

The herbivory is one of the biotic stress factors that affect the initial establishment of plants. The main factors that direct herbivory in tree species are still not well understood. In the present study, we investigated whether contrasting conditions of irradiance influence the herbivore and whether functional traits are related to interspecific variation in herbivory under different irradiance conditions. We measured the herbivory (leaf area loss by insect attack) in five forest species in an experiment of enrichment plantation on secondary forest from two indicators, accumulated herbivory (punctual) and herbivory rate (measured over the time). The measurements were made in three irradiance conditions (low irradiance, PPFD = $2.6 \text{ mol m}^2 \text{ dia}^{-1}$; moderate irradiance, PPFD = $19.2 \text{ mol m}^2 \text{ dia}^{-1}$ and high irradiance, $33.1 \text{ mol m}^2 \text{ dia}^{-1}$). In addition, we analyzed seven morphophysiological leaf traits: specific leaf area, leaf water content, sclerophyll, phenolic compounds, tannin, condensed tannin and non-structural carbohydrate concentration (starch, sucrose, glucose, fructose and raffinose). The effect of the irradiance condition on herbivory differed between the indicators used. This, because the punctual measurement (accumulated herbivory) does not capture the effect of the leaf dynamics of the species. The species with more intense leaf dynamics (*Tabebuia rosea*) had the highest rates of herbivory. Among the leaf morphophysiological traits, chemical defense characteristics (phenolic compounds and tannin) were more related to the interspecific variation in herbivory rates in the most contrasting irradiance conditions (low and high irradiance). The interspecific variation in herbivory rates suggests that the selective pressure of herbivores is mainly determined by the degree of leaf digestibility.

Key words: biotic stress, irradiance, ecophysiology, phenolic compounds, forest plantations.

Lista de Figuras

- Figura 1 – Delineamento do projeto principal instalado e conduzido na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas (FAEXP – UFAM). No detalhamento, as parcelas principais receberam redução de área basal nos níveis 0, 20, 40, 60, 80 e 100%. As sub-parcelas foram tratadas com remoção de sub-bosque (quadrado vazio) e sem remoção de sub-bosque (quadrado preenchido). 22
- Figura 2 – Ambientes analisados. A) remoção de 0% de área basal: tratamento baixa irradiância; B) remoção de 60% da área basal: tratamento moderada irradiância; C) remoção de 100% de área basal: tratamento alta irradiância. ... 24
- Figura 3 – Croqui do delineamento experimental. Distribuição dos cinco blocos nos 16,5 hectares de floresta secundária (superior esquerdo). Bloco com as três parcelas utilizadas em destaque: baixa irradiância; moderada irradiância; alta irradiância (Superior direito). Distribuição das cinco mudas de cada uma das seis espécies florestais no espaçamento de 3 m x 3 m dentro da parcela (Inferior esquerdo). 25
- Figura 4 – Relação da quantidade de folhas amostradas e o percentual de redução de área foliar para cada espécie. A) *Bertholletia excelsa*; B) *Carapa guianensis*; C) *Cedrella fissilis*; D) *Hymenaea courbaril*; E) *Swietenia macrophylla*; F) *Tabebuia rosea*. Observar que os eixos x e y possuem valores diferenciados. 26
- Figura 5 – Formas de folivoria. A) Ataque em *B. excelsa*. C) Ataque em *T. rosea*. C) Ataque em *S. macrophylla*. 28
- Figura 6 – Dinâmica foliar de *Cedrella fissilis*. A) Indivíduos completamente desfolhados em uma parcela de ambiente de alta irradiância; B) Indivíduo com lançamento de folhas mais adiantando, em parcela de ambiente moderada irradiância; C) Indivíduo com lançamento de folhas em uma parcela de ambiente moderada irradiância; A diferença entre os indivíduos no momento do lançamento foliar tornou inviável a coleta e registro de herbivoria para esta espécie. 30

Figura 7 – Regressão linear simples ajustada entre os métodos de medição de redução de área foliar. A) BioLeaf x Medidor de área foliar; B) BioLeaf x ImageJ.	31
Figura 8 - Etapas do processamento de amostras. A) Coleta das folhas em campo. Para manter a homogeneidade na coleta, cada bloco foi coletado em um dia; B) Tomada de área foliar fresca com scanner de mesa após a chegada ao laboratório; C) Folhas em liofilizador de amostras. Cada bloco levou em média dois dias para secagem completa. D) Após moagem, as amostras foram acondicionadas em microtubos de 2 ml.	32
Figura 9 – Processo de extração para determinação de carboidratos não estruturais. A) Processo de pesagem da amostra pulverizada; B) Amostras após cozimento em banho-maria; C) O processo de centrifugação, que permite separar o sobrenadante do precipitado; D) O sobrenadante é utilizado para determinação de açúcares solúveis. Foram secos em evaporador de amostras; E) O precipitado é utilizado para determinação de amido. Foram secos em estufa a 50°C.....	34
Figura 10 – Determinação de açúcares solúveis: glicose, frutose, sacarose e rafinose. A) Amostras ressuspendidas. O clorofórmio foi utilizado para separar os pigmentos cloroplastídeos e lipídeos da fração açúcar; B) Pode-se observar a separação em duas fases. A fase superior foi cuidadosamente retirada com auxílio de pipeta pasteur e acondicionada em microtubos para centrifugação, evitando contato com a solução de pigmentos.....	35
Figura 11 – Fases da determinação de amido. A) Ressuspensão das amostras; B) Amostras após a segunda encubação em banho-maria, adicionados à α -amilase (<i>Bacillus licheniformis</i>); C) Amostras após a segunda encubação em banho-maria adicionadas à amiloglicosidade (<i>Aspergillus niger</i>) D) Adição de ácido perclórico para estancar a reação enzimática; E) Centrifugação rápida para separar o sobrenadante; F) Amostras em placa tipo Elisa, prontas para leitura em espectrofotômetro.....	36
Figura 12 – Detecção de compostos fenólicos totais. A) Extratos em triplicata após a adição dos reagentes; B) Amostras após 40 minutos de descanso em bancada. É possível observar visualmente a diferença na concentração dos compostos. C) Espectro da curva padrão de Ácido Gálico.	37

Figura 13 – Concentração de taninos totais contrastantes. A) <i>Tabebuia rosea</i> ; B) <i>Hymenaea courbaril</i> ; C) <i>Bertholletia excelsa</i>	38
Figura 14 – Determinação de taninos condensados (proantocianidinas). A) Extratos após adição de Butanol. B) Amostras em banho seco. C) Amostras prontas para leitura em espectrofotômetro; D) Espectro da curva padrão de Tanino Quebracho.....	39
Figura 15 – Herbivoria acumulada em cinco espécies florestais em função da variação na disponibilidade de irradiância. Os valores são as médias \pm erros padrão (n = 5). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Fisher LSD (*P < 0,05; **P < 0,01).....	41
Figura 16 – Taxa de herbivoria em cinco espécies florestais em função da variação na disponibilidade de irradiância. Os valores são as médias \pm erros padrão (n = 5). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Fisher LSD (ns = não significativo; **P < 0,01).....	42
Figura 17 – Efeito do ambiente de luz sobre a herbivoria ao longo do tempo para cinco espécies florestais. Os valores são as médias \pm erros padrão (n = 5). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Fisher LSD (**P < 0,001). Cada tempo refere-se a um intervalo de 60 dias entre as coletas, com início em março de 2018 (tempo 1) e final em fevereiro de 2019 (tempo 5). ...	43
Figura 18 – Percentual qualitativo de herbivoria avaliado por meio da contagem do número total de folhas de cada indivíduo. A avaliação foi realizada dentro de cada ambiente de luz (A) e entre as espécies florestais (B). A área escura é a percentagem de folhas com remoção de área foliar e a área branca é o percentual de folhas saudias (não herbivoradas).....	43
Figura 19 – Variação das taxas de herbivoria ao longo do tempo em cinco espécies florestais Os valores são as médias \pm erros padrão (n = 5). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Fisher LSD (**P < 0,001). Cada tempo se refere a um intervalo de 60 dias entre as coletas, com início em março de 2018 (tempo 1) e final em fevereiro de 2019 (tempo 5).). T1 = março/maio; T2 = maio/julho; T3 = julho/setembro; T4 = setembro/novembro; T5 = novembro/fevereiro.	44
Figura 20 – Área foliar específica de cinco espécies florestais em função da variação na disponibilidade de irradiância. Os valores são as médias \pm erros	

padrão (n = 5). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Fisher LSD (*P < 0,05; ***P < 0,001).....	46
Figura 21 – Esclerofilia em cinco espécies florestais em função da variação na disponibilidade de irradiância. Os valores são as médias ± erros padrão (n = 5). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Fisher LSD (ns = não significativo; **P < 0,01).	47
Figura 22 – Teor relativo de água em cinco espécies florestais. Os valores são as médias ± erros padrão (n = 5). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Fisher LSD (**P < 0,01; ***P < 0,001).	48
Figura 23 – Concentração de compostos fenólicos em cinco espécies florestais (A) e em três ambientes de luz (B). (n = 5). Nos Box-plots, a linha contínua representa a mediana. O limite superior da caixa refere-se ao quartil de 75% e o limite inferior, ao de 25%. As linhas verticais tracejadas são os percentis de 10 e 90%. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Mann-Whitney (U). (P < 0.05).	49
Figura 24 – Tanino total (curva: Ácido Tânico) (A e B) e tanino condensado, (curva: Tanino Quebracho) (C e D) em cinco espécies florestais em função da variação no ambiente de luz. Os valores são as médias ± erros padrão (n = 5). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Fisher LSD (ns = não significativo; ***P < 0,001).	50
Figura 25 – Concentração de sacarose em cinco espécies florestais (A) e nos diferentes ambientes de luz (B). Os valores são as médias ± erros padrão (n = 5). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Fisher LSD (ns = não significativo; ***P < 0,001).	50
Figura 26 – Concentração de glicose em cinco espécies florestais (A) e nos diferentes ambientes de luz. Os valores são as médias ± erros padrão (n = 5). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Fisher LSD (ns = não significativo; **P < 0,01; ***P < 0,001).	51
Figura 27 – Concentração de frutose em cinco espécies florestais (A) e entre ambientes de luz. Os valores são as médias ± erros padrão (n = 5). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Fisher LSD (ns = não significativo; **P < 0,01; ***P < 0,001).	51
Figura 28 – Concentração de amido em cinco espécies florestais em função da variação na disponibilidade de irradiância. Os valores são as médias ± erros	

padrão (n = 5). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Fisher LSD (**P < 0,01; ***P < 0,001).	52
Figura 29 – Concentração de rafinose em cinco espécies florestais em função da variação na disponibilidade de irradiância. Os valores são as médias ± erros padrão (n = 5). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Fisher LSD (**P < 0,01; ***P < 0,001).	53

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Química e fertilidade do solo da área de estudo.	20
Tabela 2 – Espécies implantadas em sistema de enriquecimento na Fazenda Experimental da UFAM.	23
Tabela 3 – Total de folhas utilizadas. O tamanho do esforço amostral foi definido de acordo com a estabilização dos valores da variância (σ) e intervalo de confiança ao nível de 95%.	27
Tabela 4 - Total de folhas analisadas ao longo do experimento. Os valores abaixo representam 384 indivíduos.....	29
Tabela 5 – Índice de herbivoria. Análise qualitativa (presença/ausência) de herbivoria nas espécies florestais em cada ambiente de luz. Foi considerada herbivoria a remoção de tecido foliar, avaliada visualmente.	45

Sumário

1.	Introdução	16
2.	Objetivos	19
2.1	Objetivo Geral:.....	19
2.2	Objetivos específicos:	19
3.	Material e Métodos	19
3.1.	Localização e caracterização da área de estudo	19
3.2.	Implementação e delineamento experimental.....	21
3.3.	Ensaio piloto de amostragem para análise de herbivoria.....	24
3.4.	Análises de herbivoria.....	27
3.5.	Características funcionais	31
3.6.	Características funcionais fisiológicas	33
3.6.	Características funcionais químicas	36
4.	Análises estatísticas	39
5.	Resultados.....	40
6.	Discussão	55
	<i>Varição interespecífica na herbivoria em condições contrastantes de irradiância: a importância da dinâmica foliar.....</i>	<i>55</i>
	<i>Efeito da disponibilidade de irradiância sobre as características morfofisiológicas foliares.....</i>	<i>57</i>
	<i>A variação interespecífica na herbivoria em condições mais contrastantes de irradiância está relacionada às características de defesa química</i>	<i>62</i>
7.	Conclusões.....	63
8.	Referências	65

1. Introdução

Os efeitos da variação na disponibilidade de luz sobre a sobrevivência e o crescimento das espécies florestais têm sido bastante estudados (Poorter, 1999; Bloor *et al.*, 2003; Baraza *et al.*, 2004; Poorter; Arets *et al.*, 2004; Liang; Stehlik, 2009; Salgado-Luarte; Gianoli, 2017; Vries *et al.*, 2019). No entanto, apesar da herbivoria ser um fator biótico crítico para a sobrevivência e o crescimento das mudas, os efeitos do ambiente de luz sobre as taxas de herbivoria de espécies tropicais são menos conhecidos (Goodale *et al.*, 2014).

A herbivoria realizada por insetos pode causar perda entre 10 e 56,6% de biomassa foliar em ecossistemas naturais (Coley *et al.*, 1985; Strauss; Agrawal, 1999; Koslov *et al.*, 2015), com cerca de 0,003 a 30% de área foliar removida anualmente (Lamarre *et al.*, 2012; Kozlov; Zvereva, 2017). A remoção de área foliar apenas em espécies lenhosas é de 7,55 % (Koslov *et al.*, 2015). A herbivoria varia em função da disponibilidade de luz no ambiente, mas em geral, não há consenso na literatura sobre quais condições de luz mais a favorecem. Maiores intensidades de herbivoria em ambientes sombreados (baixa irradiância) foram relatadas para espécies de diferentes guildas sucessionais em florestas temperada e tropical (Liang; Stehlik, 2009; Salgado-Luarte; Gianoli, 2017). Da mesma forma, altas taxas de herbivoria foram observadas em condições de maior disponibilidade de luz (alta irradiância) (Chacón; Armesto, 2006; Richards; Coley, 2007). Por outro lado, ainda sob condições contrastantes de luz (baixa e alta irradiância), mudanças significativas nas taxas de herbivoria podem não ser observadas (Vasconcelos, 1999; Baraza, *et al.*, 2004; Plath *et al.*, 2011). As metodologias de coleta destes índices são ainda, alguns dos fatores que podem contribuir para as diferenças de herbivoria observadas nos diversos estudos (Andrew *et al.*, 2012)

Em geral, as diferenças no espectro de economia foliar, características genéticas e funcionais promovem diferentes estratégias de defesa (Coley; Barone, 1996; Tobias; Agrawal, 2017; Chauvin *et al.*, 2018; Endara *et al.*, 2018). As respostas das plantas a essas diferentes condições podem ser de ordem morfológica ou bioquímica e estão relacionadas à preferência dos

herbívoros (Coley *et al.*, 1988; Howe; Schaller, 2008; Barton Kasey; Koricheva, 2010; Ali; Agrawal, 2012; Brezzi *et al.*, 2017).

As plantas possuem diversos mecanismos de defesa para evitar ou reduzir os danos causados pelos herbívoros (Janzen, 1979; Strauss; Agrawal, 1999; López-Carretero *et al.*, 2016; Tauchen *et al.*, 2016). Tais mecanismos são representados geralmente pela variação das características funcionais foliares (Chauvin *et al.*, 2018). Característica funcional é qualquer característica que influencia indiretamente o desempenho do indivíduo por afetar a sobrevivência, o crescimento e a reprodução (Violle *et al.*, 2007). Em florestas tropicais, informações sobre quais e como as características funcionais se relacionam com a herbivoria ainda não são muito evidentes.

Correlações negativas já foram verificadas entre herbivoria e esclerofilia, área foliar específica e compostos secundários (Coley, 1988; Poorter *et al.*, 2004; Pontes Ribeiro *et al.*, 2007; Schuman; Baldwin, 2016). Há ainda, correlações positivas entre herbivoria e o conteúdo de água na folha, compostos secundários e área foliar específica (Tiffin, 2000; Poorter *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2015; Salgado-Luarte; Gianoli, 2017). Por outro lado, ausência de relação entre as taxas de herbivoria, teores foliares de água e área foliar específica também foi observada (Vasconcelos, 1999; Ruhnke *et al.*, 2009; Paul *et al.*, 2012). Existem ainda, indícios de acumulação de carboidratos não-estruturais (CNE) em espécies tropicais de vida longa como a resposta à distúrbios abióticos e possivelmente, bióticos (Poorter *et al.*, 2010; Martínez-Vilalta *et al.*, 2016).

Diversos trabalhos relatam a interação inseto-planta como uma “corrida armamentista”, tendo em vista as diversas alterações de ordem química verificadas em plantas e insetos. (Swain, 1977; Haslam, 1988; Dudt; Shure, 1994; Massad *et al.*, 2011; Dussourd, 2017). No entanto, não é totalmente claro o que desencadeia estas respostas em plantas. Por um lado, alguns trabalhos correlacionam negativamente a quantidade de compostos secundários (principalmente tanino) e a herbivoria, atribuindo este comportamento ao estágio sucessional (Poorter *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2015). Outros estudos sugerem que esta associação negativa é devido ao ambiente

de luz ao qual as espécies crescem (Baraza *et al.*, 2004; Chacón; Armesto, 2006; Glassmire *et al.*, 2019). Em outra linha, o motivo desta associação é relacionado ao tempo de vida das folhas das espécies (Coley, 1988; Yoneyama; Ichie, 2019).

Em nível de espécie, as respostas bioquímicas parecem associadas a um *trade-off* que envolve preferências de alocação do carbono entre crescimento e defesa, que, por sua vez, depende da variação luminosa (Tiffin, 2000; Richards; Coley, 2007; Martinez-Vilalta *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2017; Tobias; Agrawal, 2017).

Portanto, considerando que a herbivoria é um fator biótico determinante da sobrevivência e crescimento das espécies, é fundamental entender os padrões de herbivoria das espécies florestais de interesse econômico utilizadas em plantios de enriquecimento de florestas secundárias. No presente estudo, nós buscamos especificamente compreender as seguintes questões: *i*) o efeito da variação na disponibilidade de irradiância sobre a herbivoria difere entre as espécies florestais? *ii*) como as condições de irradiância influenciam a variação interespecífica nas características funcionais? *iii*) características morfofisiológicas relacionam-se com a variação interespecífica na herbivoria?

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral:

Investigar se condições contrastantes de irradiância influenciam a herbivoria e características funcionais foliares de espécies florestais de importância econômica em plantio de enriquecimento de floresta secundária.

2.2. Objetivos específicos:

- i) Investigar se condições contrastantes de irradiância influenciam a herbivoria de espécies florestais;
- ii) Analisar se a disponibilidade de irradiância influencia a variação interespecífica nas características funcionais foliares;
- iii) Identificar se características funcionais foliares (morfológicas e fisiológicas) relacionam-se com a variação interespecífica na herbivoria.

3. Material e Métodos

3.1. Localização e caracterização da área de estudo

O presente estudo está inserido no âmbito de um projeto mais amplo, cujo objetivo principal é compreender o estabelecimento inicial de espécies florestais de interesse econômico em resposta a tratamentos silviculturais em floresta secundária. O experimento foi instalado na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas (FAEXP-UFAM), localizada a 38 km da cidade de Manaus e acessada pela rodovia BR-174 (2° 38' S, 60° 03' W). O clima na região é classificado como Amw, de acordo com o sistema de classificação de Köppen, com médias mensais de temperatura do ar variando entre 24 e 27°C. O total de precipitação anual é 2730 mm, com período seco

(<100 mm mês⁻¹) entre os meses de agosto e setembro (Araújo *et al.*, 2002). A umidade relativa do ar atinge valor mínimo de 75% no mês de agosto e máximo de 92% no mês de abril durante o período chuvoso (Araújo *et al.*, 2002). O relevo é levemente ondulado com a altitude variando entre 60 e 120 m, aproximadamente, entre as regiões de platô e baixio. Os solos são pobres em nutrientes e nas regiões de platô possuem elevados teores de argila, sendo classificados como Latossolos argilosos álicos (Chauvel, 1892). Por outro lado, nas regiões de baixio ocorrem os Espodosolos caracterizados por textura arenosa (Luizão *et al.*, 2004). A caracterização química e da fertilidade do solo na área de estudo antes do plantio está descrita na Tabela 1.

Tabela 1 – Química e fertilidade do solo da área de estudo.

pH		P	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	T	SB	C/N	m
H ₂ O	KCL	mg kg ⁻¹			c molc kg ⁻¹					%
4,19 ±	3,85 ±	1,43 ±	0,043 ±	0,084 ±	1,43 ±	0,035 ±	1,6 ±	0,16 ±	12,32 ±	89,85 ±
0,05	0,02	0,76	0,01	0,01	0,08	0,03	0,11	0,05	0,79	2,24

Valores são médias ± desvio padrão de cinco amostras compostas. *P* concentração de fósforo total; *K⁺* Potássio trocável; *Ca²⁺* Cálcio trocável; *Mg²⁺* Magnésio trocável; *Al³⁺* Alumínio trocável; *t* capacidade de troca catiônica efetiva; *SB* soma de bases; *C/N* razão carbono nitrogênio; *m* saturação por alumínio.

Histórico de uso da área e produção de mudas

A floresta secundária possui aproximadamente 22 anos de idade e foi caracterizada a partir de uma série histórica de imagens de satélite e depoimentos de funcionários da fazenda. O histórico da área compreende duas remoções da vegetação, a primeira em 1986, sob administração da Fundação Centro de Apoio ao Distrito Agropecuário (FUCADA), que realizou corte e queima da floresta primária e posteriormente abandonou a área. A vegetação secundária se estabeleceu até o ano de 1997, quando nova intervenção de corte e queima foi realizada para a implementação de um plantio de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) que não foi conduzido e, novamente, a vegetação secundária se estabeleceu. Em inventário fitossociológico realizado na floresta secundária previamente à aplicação dos tratamentos silviculturais, encontrou-se alta abundância de espécies arbóreas de quatro gêneros:

Bellucia, *Goupia*, *Vismia* e *Cecropia*. A densidade de indivíduos adultos foi de 1200 ± 180 árvores ha^{-1} (DAP > 5 cm), com área basal de $12 \pm 3,6$ $\text{m}^2 \text{ha}^{-1}$.

A produção das mudas foi realizada no viveiro florestal da Universidade Federal do Amazonas (3° 6'S, 59° 58'W). Inicialmente, as sementes foram germinadas em substrato de areia, em seguida foram repicadas para recipientes (saco plástico de 1 dm^3) contendo substrato argiloso (20 cm da camada superficial do solo de floresta) acrescido de calcário dolomítico, fósforo (P_2O_5 : Superfosfato triplo), potássio (KCl: Cloreto de Potássio), nitrogênio (N: Sulfato de Amônio) e micronutrientes (B; Cu; Fe; Mn; Mo: FTE BR 12) nas dosagens de 500; 700; 150; 200 e 200 g m^{-3} , respectivamente. As mudas foram cultivadas durante seis meses no viveiro, e nesse período foram realizadas duas adubações de cobertura (40 ml muda⁻¹ de solução contendo 10 g P_2O_5 ; 2,5 g N; 3g KCl). Antes do plantio em campo, as mudas foram aclimatadas em pleno sol (irradiância fotossinteticamente ativa integrada ao longo do dia de 25 $\text{mol m}^{-2} \text{dia}^{-1}$) durante dois meses.

3.2. Implementação e delineamento experimental

O sistema silvicultural de enriquecimento foi implementado com aplicação de diferentes níveis de abertura do dossel a partir do desbaste de indivíduos arbóreos da vegetação secundária (0, 20, 40, 60, 80 e 100% de redução da área basal). O plantio ocorreu entre 24 de fevereiro e 8 de março de 2017. As mudas foram plantadas no espaçamento de 3 m x 3 m e covas de 30 x 30 x 30 cm. As plantas receberam correção da acidez do solo (65 g de calcário dolomítico cova⁻¹), a qual foi incorporada ao solo de cada cova no mês que antecedeu o plantio. Também foi aplicada adubação de plantio com 46 g de P_2O_5 cova⁻¹ (100 g de Superfosfato triplo); 11,6 g N cova⁻¹ (25 g de Ureia); 12 g K_2O cova⁻¹ (20 g de Cloreto de potássio) e 10 g FTE-BR12 (1,8% B; 0,8% Cu; 3,0% Fe; 2,0% Mn; 0,1% Mo). A aplicação do adubo fosfatado foi concentrada em duas micro covas laterais à muda, sendo os demais adubos aplicados em cobertura na forma de semicírculos. Após o plantio foram realizadas duas adubações de cobertura, aos 30 e 60 dias. A aplicação foi de 11,6 g N cova⁻¹ (25 g de Ureia); 12 g K_2O cova⁻¹ (20 g de Cloreto de potássio). Os cálculos das

doses e formas de aplicação dos nutrientes foram baseados em análise do solo e recomendações que atestam a quantidade suficiente de nutrientes para espécies arbóreas tropicais (Furtini Neto, 2000; Resende *et al.*, 2005; Campoe *et al.*, 2014, Alvarado, 2015). As adubações foram realizadas com o objetivo de assegurar que a variação no crescimento das mudas fosse predominantemente influenciada pelo gradiente de abertura do dossel e não pela variação na disponibilidade de nutrientes no solo.

O delineamento experimental é o de blocos casualizados (DBC), com aplicação do tratamento de remoção de área basal em parcelas principais de 2.318m², nos níveis de 0, 20, 40, 60, 80 e 100% com cinco repetições (Figura 1). As parcelas principais foram divididas em duas sub-parcelas de 270 m², que foram submetidas a um segundo tratamento silvicultural: a remoção e a não remoção do sub-bosque. Em todas as parcelas, a remoção do sub-bosque (vegetação herbácea, arbustiva e arvoretas com DAP < 5 cm) foi conduzida a cada três meses, com auxílio de foice e terçado.

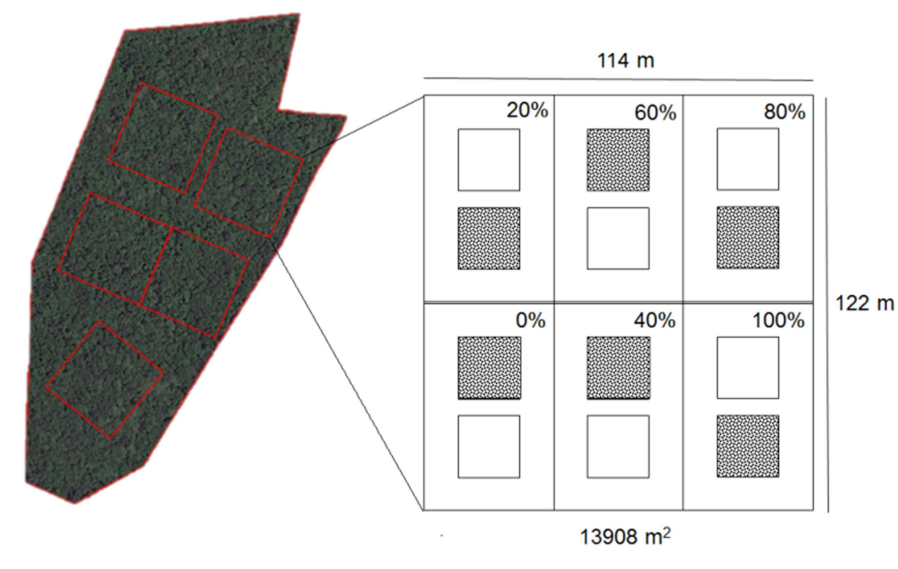


Figura 1 – Delineamento do projeto principal instalado e conduzido na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas (FAEXP – UFAM). No detalhamento, as parcelas principais receberam redução de área basal nos níveis 0, 20, 40, 60, 80 e 100%. As sub-parcelas foram tratadas com remoção de sub-bosque (quadrado vazio) e sem remoção de sub-bosque (quadrado preenchido).

A redução da área basal foi realizada com a técnica de corte direto, com motosserra, em indivíduos com diâmetro à altura do peito (1,30 m) maior ou igual a cinco centímetros. Seis espécies florestais foram selecionadas, seguindo os critérios de disponibilidade de sementes (mínimo de cinco matrizes), potencial econômico e importância ecológica e social na região (Tabela 2).

Tabela 2 – Espécies implantadas em sistema de enriquecimento na Fazenda Experimental da UFAM.

Espécie	Nome vulgar	Grupo ecológico ¹
<i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl.	Castanheira da Amazônia	Não-Pioneira (PTS)
<i>Carapa guianensis</i> Aubl.	Andiroba	Não-Pioneira (PTS)
<i>Cedrella fissilis</i> Vell.	Cedro	Pioneira (PVL)
<i>Hymenaea courbaril</i> L.	Jatobá	Não-Pioneira (PTS)
<i>Tabebuia rosea</i> (Bertol.) Bertero ex A.DC.	Ipê rosa	Pioneira (PVL)
<i>Swietenia macrophylla</i> King.	Mogno	Pioneira (PVL)

PTS – Parcialmente tolerante à sombra; PVL – Pioneira de vida longa (>30 anos).

¹Grupo ecológico conforme definições de: Swaine e Whitmore, 1988; Finegan, 1992, Poorte; Bongers., 2006; Chazdon, 2014.

No presente estudo, dos seis níveis de redução de área basal aplicados no projeto principal, somente os três níveis mais contrastantes de redução da área basal foram analisados. Eles foram definidos de acordo com a caracterização da irradiância fotossinteticamente ativa integrada ao longo do dia (PPFD): baixa irradiância (0% \approx PPFD = 2,59 mol.m².dia⁻¹), moderada irradiância (60% \approx PPFD = 19,23 mol.m².dia⁻¹) e alta irradiância (100% \approx PPFD = 33,05 mol.m².dia⁻¹) (Figura 2). Em relação ao segundo tratamento silvicultural, foram avaliadas apenas as mudas plantadas na condição de remoção do sub-bosque. Portanto, o experimento consistiu em um total de 15 parcelas (três ambientes x cinco repetições) e uma área útil de 3.780 m² (Figura 3).

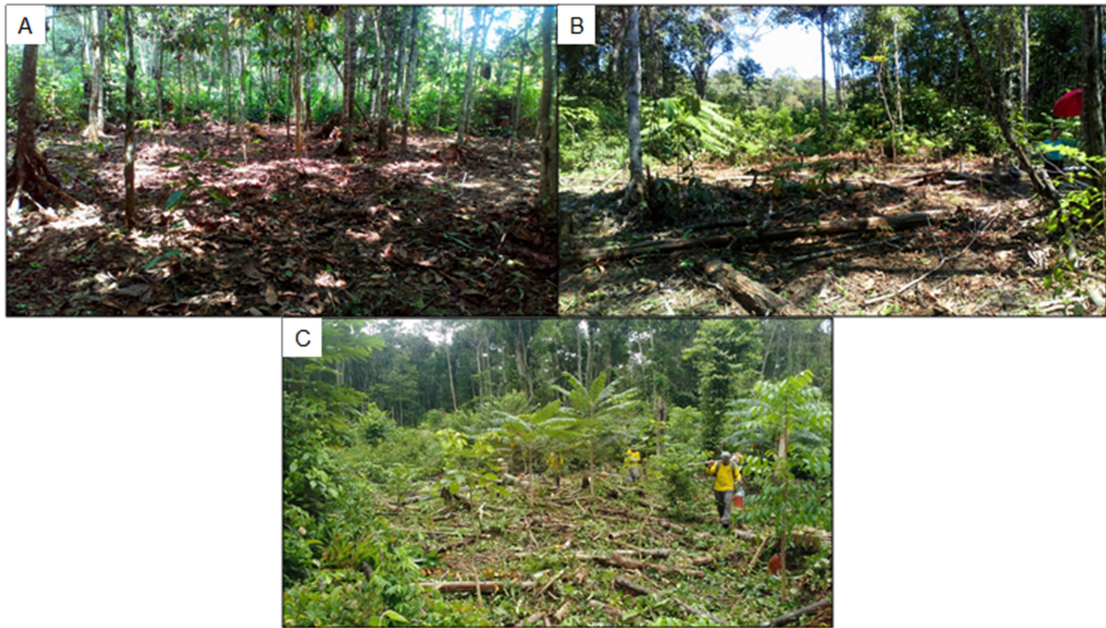


Figura 2 – Ambientes analisados. A) remoção de 0% de área basal: tratamento baixa irradiância; B) remoção de 60% da área basal: tratamento moderada irradiância; C) remoção de 100% de área basal: tratamento alta irradiância.

3.3. Ensaio piloto de amostragem para análise de herbivoria

A determinação do esforço amostral para as análises de herbivoria em cada espécie foi realizada a partir de uma amostragem piloto, conforme recomendação de Johnson *et al.*, (2016). No ensaio utilizamos todas as folhas de 36 plantas, seis de cada espécie, para determinar qual o tamanho adequado da amostra considerando a remoção de área foliar realizada por insetos desfolhadores na área de estudo. As folhas foram fotografadas individualmente contra uma prancheta milimetrada (1 cm²) de fundo azul, com uma máquina fotográfica e um aparelho celular. As imagens foram analisadas por meio do software ImageJ 1.50i (Rasband National Institutes of Health, USA). Um total de 3.789 folhas foi analisado (Tabela 3; Figura 4). Diferentes níveis de esforço amostral foram testados para identificar em qual deles ocorreria os menores valores de variância e intervalo de confiança ao nível de 95% de probabilidade. O objetivo foi atender a normalidade nos valores de esforço amostral para cada espécie (Johnson *et al.*, 2016; Kozlov; Zvereva, 2017).

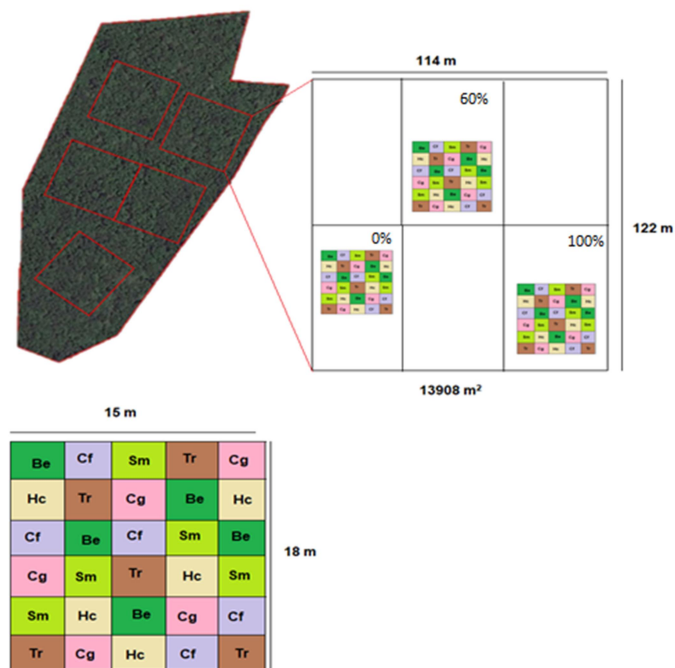


Figura 3 – Croqui do delineamento experimental. Distribuição dos cinco blocos nos 16,5 hectares de floresta secundária (superior esquerdo). Bloco com as três parcelas utilizadas em destaque: baixa irradiância; moderada irradiância; alta irradiância (Superior direito). Distribuição das cinco mudas de cada uma das seis espécies florestais no espaçamento de 3 m x 3 m dentro da parcela (Inferior esquerdo).

As diferenças interespecíficas indicaram a necessidade de esforços amostrais diferenciados. Enquanto algumas espécies tem uma herbivoria constante a partir de determinada quantidade de folhas (*B. excelsa*) outras aparentemente não estabilizam (*S. macrophylla*). Na Figura 4 é possível observar as diferenças nos pontos de estabilização da área herbivorada em relação ao número de folhas analisadas para cada espécie. A amplitude no total de herbivoria foi de 0,62% de área removida (variância: 4,801; IC \pm 0,267), em *B. excelsa*, até 7,59% de área removida (variância: 69,664; IC \pm 0.768), em *T. rosea*. Isso está diretamente ligado à diferença de até 51% na quantidade de folhas amostradas entre as espécies (Tabela 3).

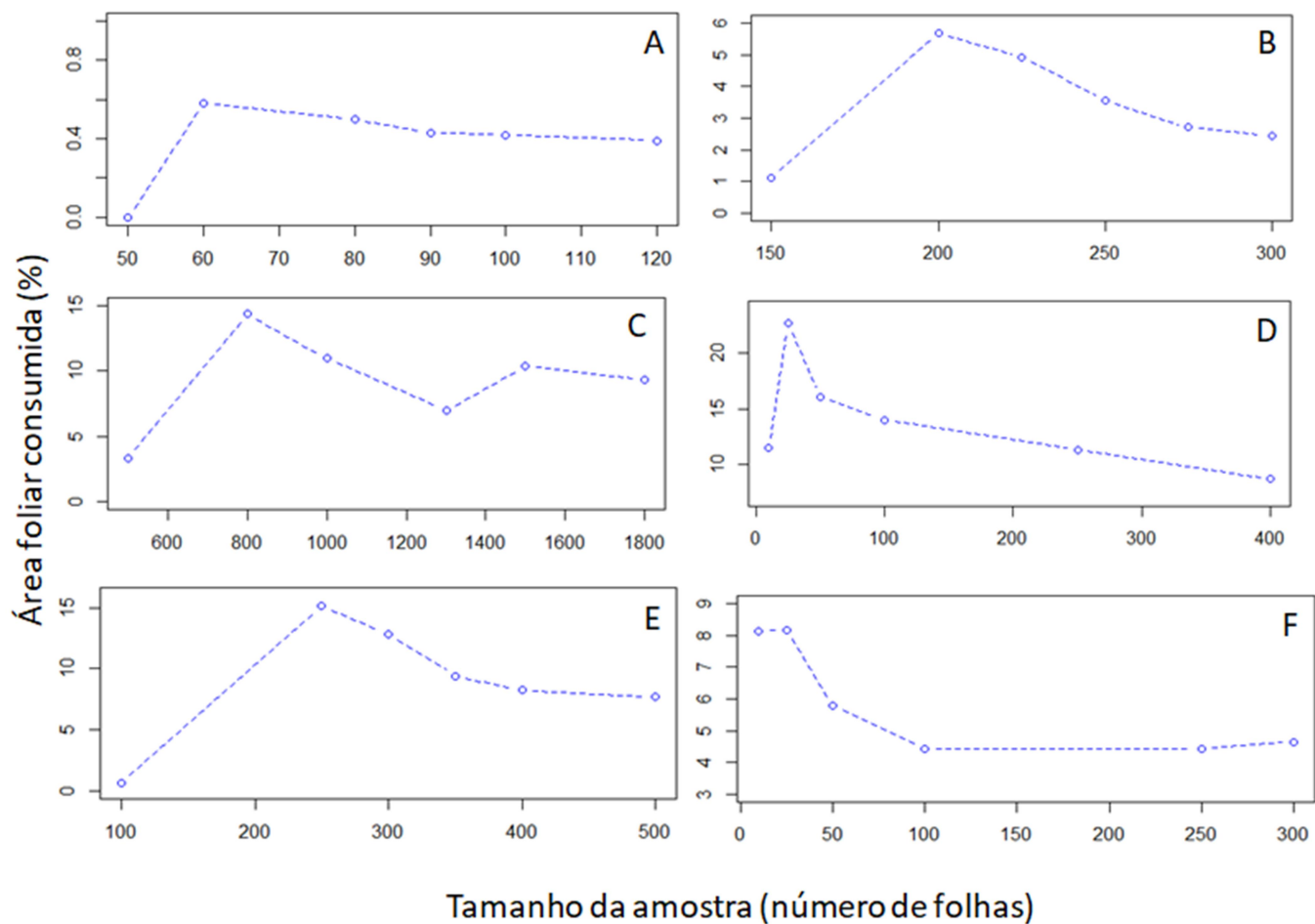


Figura 4 – Relação da quantidade de folhas amostradas e o percentual de redução de área foliar para cada espécie. A) *Bertholletia excelsa*; B) *Carapa guianensis*; C) *Cedrella fissilis*; D) *Hymenaea courbaril*; E) *Swietenia macrophylla*; F) *Tabebuia rosea*. Observar que os eixos x e y possuem valores diferenciados.

Tais diferenças reforçam a necessidade de adotar esforço amostral específico para cada espécie. Em cada ambiente de luz foi aplicado o mesmo esforço amostral definido por espécie, observando a quantidade máxima de folhas existentes por planta em cada ambiente e a dinâmica foliar das espécies.

Tabela 3 – Total de folhas utilizadas. O tamanho do esforço amostral foi definido de acordo com a estabilização dos valores da variância (σ) e intervalo de confiança ao nível de 95%.

Espécie	Total de folhas	Esforço Amostral	Média	Variância (σ)	\pm IC (5%)
<i>Bertholletia excelsa</i>	112	90	0.618	0.046	0.023
<i>Carapa guianensis</i>	321	275	1.754	5.757	0.284
<i>Cedrella fissilis</i>	1.814	800	3.983	13.254	0.252
<i>Hymenaea courbaril</i>	479	250	2.502	38.667	0.771
<i>Tabebuia rosea</i>	454	250	7.593	22.381	0.586
<i>Swietenia macrophylla</i>	609	350	3.372	29.789	0.572
Total	3.789	2.015			

3.4. Análises de herbivoria

A herbivoria foi estimada de duas formas, ambas de acordo com a metodologia adaptada de Poorter *et al.*, (2004). Primeiro, as folhas foram analisadas 16 meses após o plantio, com o objetivo de estimar o total de tecido foliar removido (herbivoria acumulada) em um momento no tempo. Em paralelo, folhas foram marcadas para acompanhamento da herbivoria por um período de tempo, com análises realizadas aos 0, 60, 120, 180, 240 e 300 dias (taxa de herbivoria). Foi considerado herbivoria o tecido foliar perdido ou removido por meio da folivoria, definida como o consumo de área foliar por insetos (Coley; Kusar, 1996), causada principalmente por insetos

desfolhadores (Figura 5). Em espécies com folhas compostas, os folíolos foram utilizados como unidades amostrais (Poorter *et al.*, 2004).

Adaptações à metodologia de Poorter *et al.*, (2004):

- Na herbivoria acumulada, o esforço amostral foi definido com base em indicadores estatísticos (variância e intervalo de confiança) derivados do ensaio piloto (Tabela 3);
- Na taxa de herbivoria, o esforço amostral utilizado variou devido à dinâmica foliar. Em espécies com troca foliar constante (ipê rosa, jatobá e mogno), mantemos o número de folhas definido no ensaio piloto (três/sete/sete, em cada indivíduo, respectivamente). A cada troca foliar, novas folhas eram marcadas. O objetivo foi registrar a herbivoria individual da planta ao longo do experimento.

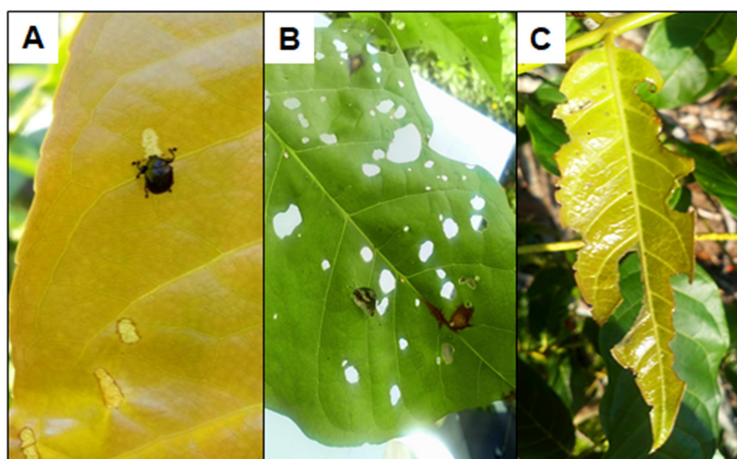


Figura 5 – Formas de folivoria. A) Ataque em *B. excelsa*. C) Ataque em *T. rosea*. C) Ataque em *S. macrophylla*.

Na herbivoria acumulada, a herbivoria por planta foi calculada como a porcentagem média de área foliar removida em relação ao total de folhas amostrado (Poorter *et al.*, 2004). As folhas foram selecionadas de forma aleatória, estratificada verticalmente, para garantir a representatividade de todo o indivíduo. Não houve distinção entre folhas jovens e velhas. A herbivoria média foi calculada por indivíduo, em seguida agrupada por espécie, em cada ambiente de luz.

Para verificar qualitativamente o impacto da herbivoria em cada indivíduo e avaliar o percentual de dano existente em cada ambiente de luz, o percentual

cumulativo de dano foliar foi calculado, correspondendo ao total de folhas danificadas, dividido pelo total de folhas na planta, multiplicado por 100 (Goodale et al, 2014).

Tabela 4 - Total de folhas analisadas ao longo do experimento. Os valores abaixo representam 384 indivíduos.

*Cada folíolo foi considerado como unidade amostral. **As folhas foram perdidas ao

Espécie	Herbivoria acumulada*	Taxa de Herbivoria*
<i>Bertholletia excelsa</i>	891	187
<i>Carapa guianensis</i>	891	439
<i>Cedrella Fissilis</i> **	228	1635
<i>Hymenaea courbaril</i>	905	562
<i>Tabebuia rosea</i>	703	633
<i>Swietenia macrophylla</i>	956	455
Total	4.583	3.991

longo da troca foliar da espécie.

Devido à sua deciduidade e intensa dinâmica foliar, *Cedrela fissilis* não possuía folhas suficientes no momento da coleta de herbivoria acumulada (Figura 6 – B; C). Em relação à taxa, o comportamento foi o mesmo. Mais de 50% dos indivíduos permaneceram completamente desfolhados por períodos superiores a dois meses e de forma irregular entre os ambientes de luz (Figura 6 – A), tornando a comparação estatística inviável. Por esses motivos, a espécie foi excluída das análises.

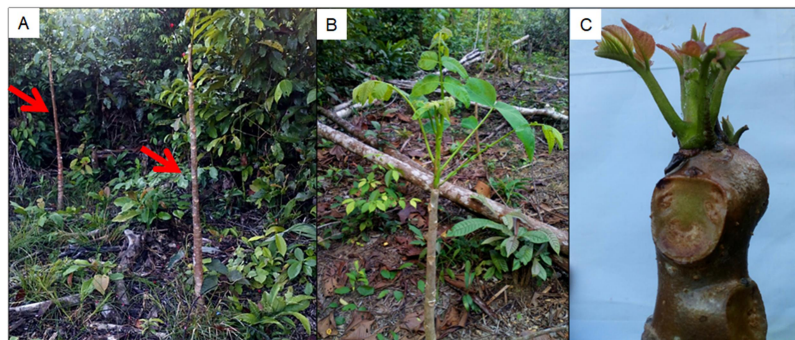


Figura 6 – Dinâmica foliar de *Cedrella fissilis*. A) Indivíduos completamente desfolhados em uma parcela de ambiente de alta irradiância; B) Indivíduo com lançamento de folhas mais adiantando, em parcela de ambiente moderada irradiância; C) Indivíduo com lançamento de folhas em uma parcela de ambiente moderada irradiância; A diferença entre os indivíduos no momento do lançamento foliar tornou inviável a coleta e registro de herbivoria para esta espécie.

A taxa de herbivoria, como definida por Poorter et al., (2004), corresponde ao aumento na porcentagem de folhas danificadas ao longo de um determinado período de tempo. Para o monitoramento das taxas de herbivoria, as folhas foram marcadas no pecíolo ou na ráquis com fita adesiva e tiveram a área foliar aferida a cada dois meses pelo período de 300 dias, com início em março de 2018, cobrindo as estações chuvosa e seca e as transições entre estas. A intensidade amostral adotada para monitoramento das espécies variou de 21% a 90% do esforço amostral utilizado para calcular a herbivoria acumulada (Tabela 4). O ajuste foi necessário tendo em vista que o tempo de vida das folhas variou entre as espécies. A taxa de herbivoria por planta foi calculada como a média de herbivoria nas folhas amostradas a cada 60 dias. Para a espécie *T. rosea*, que apresentou um padrão diferenciado (troca foliar completa a cada 60 dias), e *H. courbaril*, (troca foliar parcial a cada 100 dias) o acompanhamento foi realizado com as folhas disponíveis no momento da coleta. Para as demais espécies, apenas as folhas que permaneceram até o final do acompanhamento foram consideradas na análise estatística. A taxa de herbivoria por espécie corresponde à média dos indivíduos por ambiente de luz.

Metodologia de coleta

As medições de área foliar removida nos dois métodos (herbivoria acumulada e taxa de herbivoria) foram realizadas com o uso de aparelho celular, através do

software BioLeaf – Análise Foliar (Machado *et al.*, 2016). Este software possui a vantagem de reduzir o tempo de análise e permite o monitoramento da herbivoria de forma não destrutiva. Além disso, é disponível gratuitamente online e pode ser utilizado em qualquer aparelho andróide, dispensando uso de ferramentas de custos elevados e difícil acesso, como os scanners de mesa.

Com o objetivo de aferir as medições feitas a partir do aplicativo nas espécies estudadas, 14 folhas distribuídas em diversos níveis de dano (entre zero e 40% de remoção do tecido foliar) foram fotografadas e analisadas pelo BioLeaf. Os valores foram relacionados com valores calculados a partir do software ImageJ (Figura 7 – A) e com o medidor de área foliar CI 202 (Figura 7 – B). Análise de regressão simples foi aplicada para verificar a acurácia entre as metodologias, no software R versão 3.3.3.

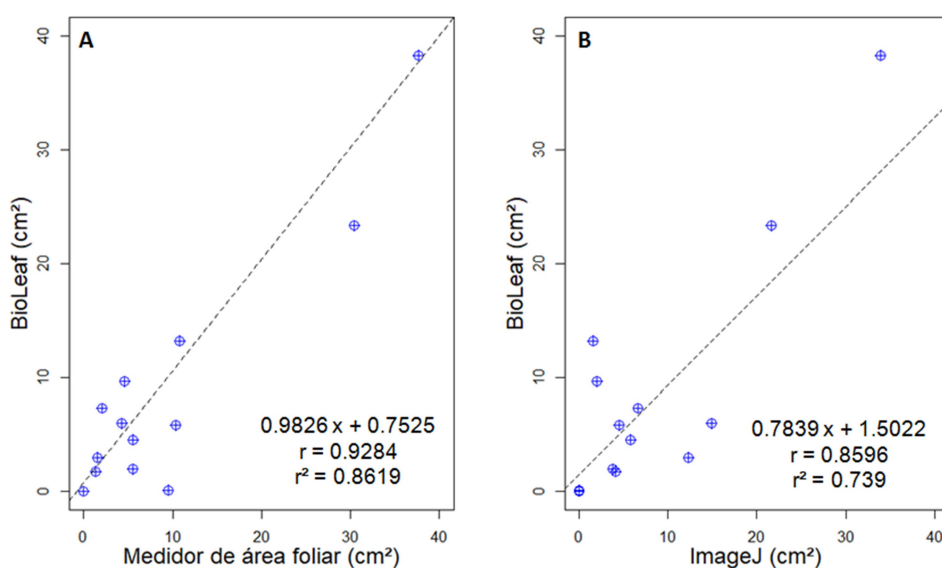


Figura 7 – Regressão linear simples ajustada entre os métodos de medição de redução de área foliar. A) BioLeaf x Medidor de área foliar; B) BioLeaf x ImageJ.

Observou-se correlações positivas entre os valores obtidos com o BioLeaf e ambas as metodologias de medição de área foliar (ImageJ, $r = 0,94$; MAF, $r = 0,93$). Tais resultados sustentaram a escolha do BioLeaf para as medições de redução de área foliar pela herbivoria.

3.5. Características funcionais

Aos 18 meses de plantio, as amostras foram obtidas de um total de 295 plantas (5 espécies x 3 condições de luz x 5 blocos). As folhas variaram de uma a cinco por indivíduo (dependendo da biomassa necessária para realização das metodologias). Foram coletadas folhas herbivoradas, com expansão completa, caracterizadas visualmente no período de transição entre folha nova e folha madura (quando possível), no período de 9h às 12h da manhã (Souza *et al.*, 2005). Cada folha foi embalada individualmente em saco de papel, para evitar a oxidação, e acondicionada em caixa de isopor com gelo para transporte ao laboratório (Figura 8 – A). Foram tomadas as medidas de área foliar total, com o medidor de área foliar CIC 202 (Figura 8 – B), e área foliar herbivorada com o aparelho celular.

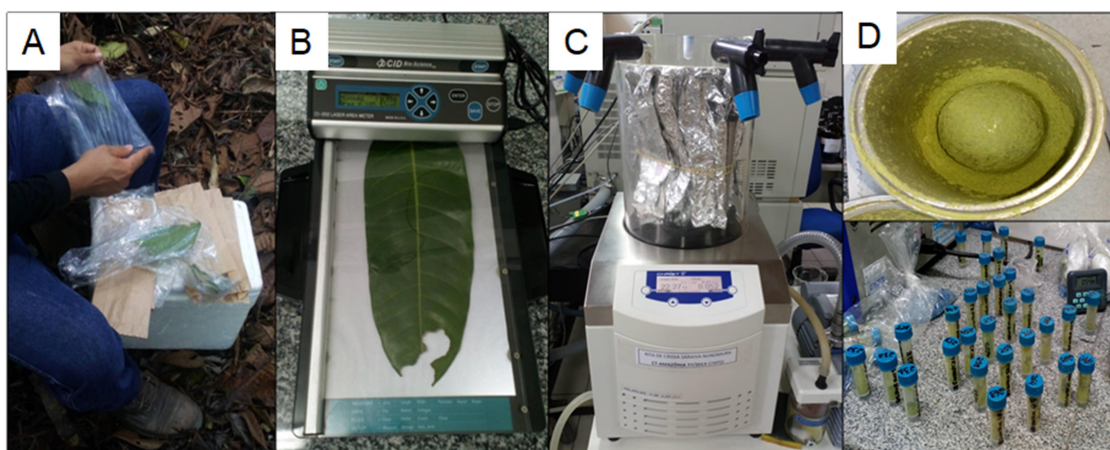


Figura 8 - Etapas do processamento de amostras. A) Coleta das folhas em campo. Para manter a homogeneidade na coleta, cada bloco foi coletado em um dia; B) Tomada de área foliar fresca com scanner de mesa após a chegada ao laboratório; C) Folhas em liofilizador de amostras. Cada bloco levou em média dois dias para secagem completa. D) Após moagem, as amostras foram acondicionadas em microtubos de 2 ml.

.Com o objetivo de preservar as atividades bioquímicas para análise de carboidratos, as folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas a -22°C até a secagem em liofilizador de amostras (Figura 8 – C). Para extração, as folhas foram pulverizadas em moinho de bolas (Figura 8 – D). Exceto para o teor relativo de água, todas as análises abaixo foram tomadas com base nessa coleta.

Área foliar específica

A área foliar específica (AFE) foi calculada pela razão entre a massa foliar seca pela área foliar fresca (Pérez-Harguindeguy *et al.*, 2016).

Esclerofilia

Após a liofilização, e antes da pulverização no moinho, as folhas foram pesadas individualmente em balança de precisão, para aferição do peso seco. A esclerofilia foi calculada através da fórmula: peso seco/[2 x (área foliar x 0,01)] (Rizzini, 1976).

3.6. Características funcionais fisiológicas

Teor relativo de água

As amostras foram obtidas de um total de 75 plantas (5 espécies x 3 condições de luz x 5 blocos), a partir de duas folhas por indivíduo. Os teores relativos de água (TRA) foram calculados a partir da retirada de oito discos foliares. A massa fresca (mf) foi determinada imediatamente após a coleta dos discos. Em seguida, os discos foram mantidos em recipientes com água destilada até a completa saturação. A massa dos discos túrgidos (mt) foi determinada após a completa submersão dos discos em água destilada. Os discos foram secos em estufa a 105°C até obtenção da massa seca (ms). O teor relativo de água foi calculado pela equação: $TRA = [(mf - ms)/(mt - ms)] * 100$ (Barrs; Weatherley, 1962).

Conteúdo de carboidratos não estruturais

A metodologia utilizada foi descrita por Amaral *et al.*, (2007). Para a extração, 10mg do pó obtido (Figura 9 – A) foram pesados em microtubos de eppendorf de 2 mL (Figura 9 – B), então adicionados a uma solução de 1,5 mL etanol 80% (v:v) e agitados. Em seguida, permaneceram em banho-maria por 20 minutos a 80°C. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos a temperatura de 5°C. (Figura 9 – C) O sobrenadante foi vertido em tubos de plástico. O processo foi

repetido três vezes, totalizando 6 ml de sobrenadante, que foram reunidos e armazenados a -22°C até a secagem (Figura 9 – D) em um evaporador de amostras por 24h. O precipitado foi colocado em estufa a 50°C para a completa evaporação do etanol (Figura 9 – E).

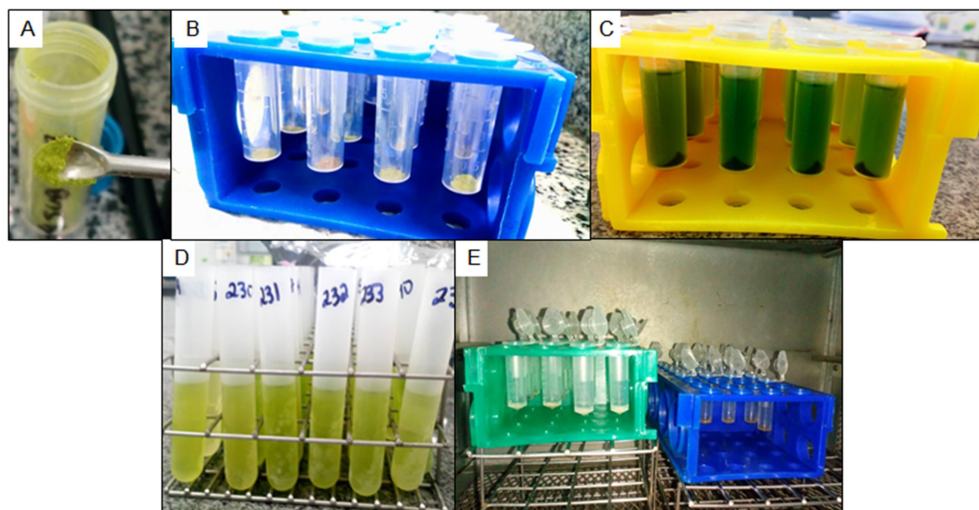


Figura 9 – Processo de extração para determinação de carboidratos não estruturais. A) Processo de pesagem da amostra pulverizada; B) Amostras após cozimento em banho-maria; C) O processo de centrifugação, que permite separar o sobrenadante do precipitado; D) O sobrenadante é utilizado para determinação de açúcares solúveis. Foram secos em evaporador de amostras; E) O precipitado é utilizado para determinação de amido. Foram secos em estufa a 50°C .

Açúcares solúveis

Após o processo de secagem, o material foi ressuspenso em 1 mL de água ultrapura adicionada a 1mL de clorofórmio 99%, para retirada de pigmentos fotossintéticos (Figura 10 – A). Após a decantação do material (Figura 10 – B), o sobrenadante foi retirado e centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos a 3°C (Figura 10 – C). Uma alíquota de 5 mL foi retirada e acondicionada em vial. Para a separação e quantificação de açúcares (glicose, frutose, sacarose e rafinose) foi utilizado cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em sistema Dionex-DX500. A coluna utilizada foi CARBOPAC PA1, eluída com NaOH 200mM e água. O tempo de corrida foi de 60 minutos, com fluxo de 1 mL/min, com proporção aplicada de 50% de cada eluente durante os primeiros 15 minutos (tempo médio para separação de todos os picos de interesse). Para limpeza da coluna foi

aplicado 100% de NaOH 200 mM por cinco minutos e finalizando com 100% de água para regeneração por 5 minutos. Para a curva padrão foram utilizados os açúcares glicose, frutose e sacarose (nas concentrações 50, 100 e 200 mM). A curva padrão foi inserida na sequência de corrida a cada 10 amostras afim de evitar erros de detecção devido às variações temporais do aparelho na determinação nos tempos de retenção, bem como para detectar possíveis variações nas concentrações dos açúcares devido a degradação dos mesmos.

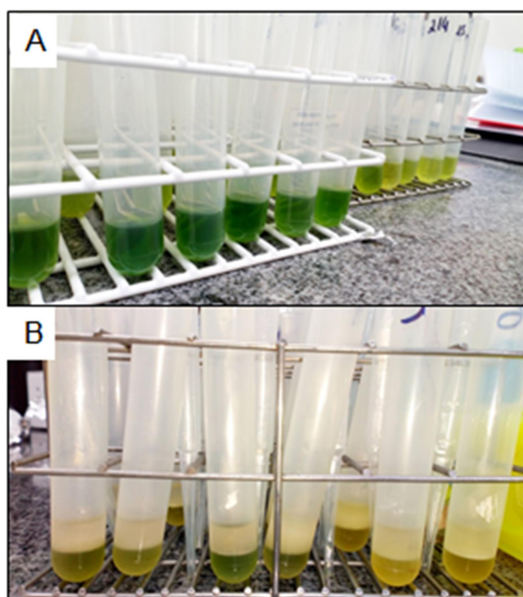


Figura 10 – Determinação de açúcares solúveis: glicose, frutose, sacarose e rafinose. A) Amostras ressuspendidas. O clorofórmio foi utilizado para separar os pigmentos cloroplastídeos e lipídeos da fração açúcar; B) Pode-se observar a separação em duas fases. A fase superior foi cuidadosamente retirada com auxílio de pipeta pasteur e acondicionada em microtubos para centrifugação, evitando contato com a solução de pigmentos.

Conteúdo de amido

Após a completa secagem do precipitado obtido na fase de extração descrita anteriormente, 0,5 mL (120 U mL) de α -amilase (EC 3.2.1.1) termoestável de *Bacillus licheniformis* (cód. E-ANAAM, MEGAZYME), diluída em tampão MOPS 10 mM pH 6,5 foram adicionadas (Figura 11 – A). As amostras foram encubadas a 75°C por 30 minutos. Esse procedimento foi repetido, totalizando 120 unidades de enzima (Figura 11 – B). As amostras foram resfriadas até 50°C e então foi adicionado 0,5 mL de uma solução contendo 30 U mL de amilogucosidade (EC 3.2.1.3) de

Aspergillus niger (cód.E-AMPGU, MEGAZYME) em tampão de acetato de sódio 100 mM pH 4,5. As amostras foram incubadas a 50°C por 30 minutos. O procedimento foi repetido (Figura 11 – C). Após as incubações descritas, foram acrescentados 100 mL de ácido perclórico 0,8M afim de estancar a reação enzimática e precipitar proteínas (Figura 11 – D). Após uma rápida centrifugação (5 minutos a 3°C, 1400 rpm) (Figura 11 – E).

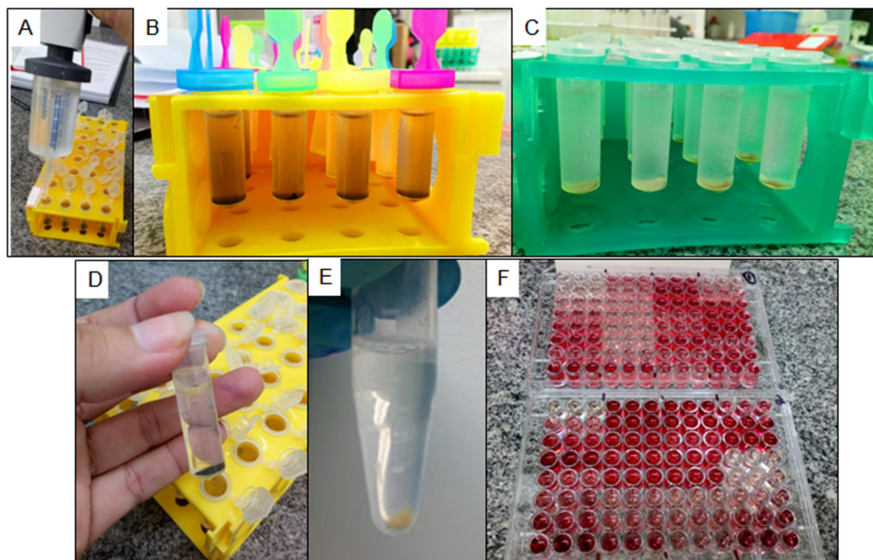


Figura 11 – Fases da determinação de amido. A) Ressuspensão das amostras; B) Amostras após a segunda incubação em banho-maria, adicionados à α -amilase (*Bacillus licheniformis*); C) Amostras após a segunda incubação em banho-maria adicionadas à amiloglicosidase (*Aspergillus niger*) D) Adição de ácido perclórico para estancar a reação enzimática; E) Centrifugação rápida para separar o sobrenadante; F) Amostras em placa tipo Elisa, prontas para leitura em espectrofotômetro.

Alíquotas de 5 μ L do extrato foram adicionadas a 300 μ L do reagente Glicose PAP Liquiform (LABTEST, Brasil), contendo as enzimas glicose-oxidase (~ 11000 U mL $^{-1}$) e peroxidase (~ 700 U mL $^{-1}$), 290 μ mol L $^{-1}$ 4-aminoantipirina e 50 mM de fenol pH 7,5 (Figura 11 – F). Após incubação por 15 minutos a 30°C em banho seco, o teor de glicose foi determinado em espectrofotômetro acoplado a leitor de ELISA em comprimento de onda de 490 nm. Para a confecção da curva padrão foi utilizada solução de glicose (SIGMA), nas concentrações de 0; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mg/mL.

3.6. Características funcionais químicas

Determinação de substâncias fenólicas

Para a extração, 50 mg do pó obtido foi pesado em microtubo de 2 mL e adicionado 1 mL de etanol 50% (v:v). As amostras foram conduzidas em banho seco a 40°C com agitação regular por 1 hora. Em seguida, foram centrifugadas por 15 minutos a 3°C. O procedimento foi repetido três vezes. Ao fim do processo, as amostras foram reunidas em tubos de plástico e armazenadas a -22°C até a secagem em evaporador de amostras (Speed-Vac). Cada amostra foi ressuspensa em 1 mL de etanol 50% (v:v).

Conteúdo de fenóis totais

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado de acordo com a metodologia de Folin Ciocalteu (Blainski *et al.*, 2013), modificada para microescala. Em microplaca tipo ELISA foram adicionados 25 μ L de extrato, 200 μ L H₂O Milli-Q, 25 μ L H₂O Folin-Ciocalteu e entre 1 – 8 min, 25 μ L Na₂CO₃. (Figura 12 – A). A leitura foi realizada após 40 min de descanso em bancada à temperatura ambiente (24°C), sob proteção de luz, por espectrofotometria a 760 nm (Figura 12 – B). As amostras e o controle fora feitos em triplicata. Para as amostras que ultrapassaram o limite de detecção do aparelho, realizou-se diluição das mesmas (1:30). Um conjunto de soluções para a construção da Reta Padrão foi preparado da mesma forma descrita acima, com Ácido Gálico variando de 0 a 0,16 μ g (Figura 12 – C). O conteúdo total de fenóis foi expresso em μ g de ácido fenólico/mg de extrato.

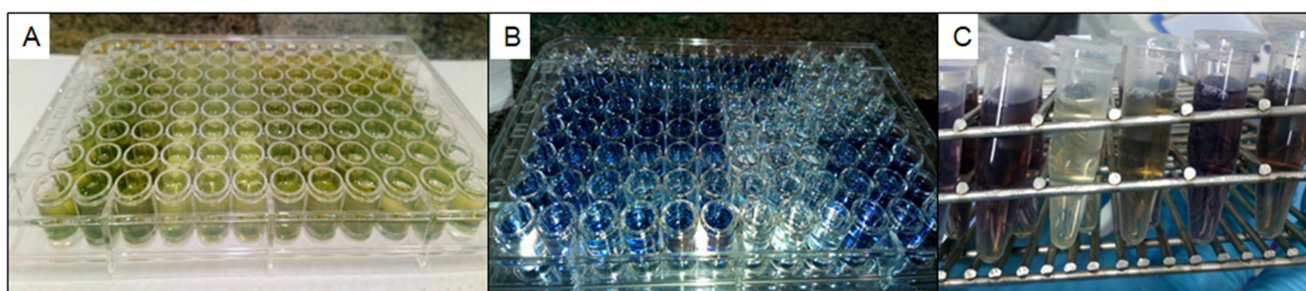


Figura 12 – Detecção de compostos fenólicos totais. A) Extratos em triplicata após a adição dos reagentes; B) Amostras após 40 minutos de descanso em bancada. É possível observar visualmente a diferença na concentração dos compostos. C) Espectro da curva padrão de Ácido Gálico.

Conteúdo de taninos totais

A determinação do conteúdo total de taninos foi realizada pelo método de precipitação das proteínas (Hagerman, 1987), adaptado para microescala. Inicialmente procedemos à preparação dos reagentes. 100 mL de solução BSA (albumina soro bovino) foi preparada a partir da dissolução de 1.4 mL de ácido acético (Tampão de ácido acético 0.2 M pH 5.0) adicionados a de 0.96 g de cloreto de sódio (0.17 M) e 100 mg de albumina, BSA (fração V 1 mg/mL). O pH foi corrigido com NaOH 1N e o volume foi completo com água destilada. Para 100 mL da solução SDS (dodecilsulfato de sódio), dissolveu-se 1 g de SDS (1%), 5 mL de trietanolamina (5%) e 20 mL de isopropanol (20%), e o volume foi completo com água destilada. Para preparação de 125 mL de solução de cloreto férrico, diluiu-se 201,25 mg de FeCl_3 (0,01 M) em 0.1 mL de HCl (0,01 M) cc e o volume foi completo com água destilada. O extrato principal foi diluído (100 μL extrato; 150 μL etanol 50% v.v). Para preparação das amostras, de 250 μL do extrato diluído foi adicionado de 500 μL de solução BSA, que foi homogeneizada e ficou em descanso de bancada de 15 minutos. As amostras foram então centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm e em seguida o sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 1000 μL de solução SDS. A solução foi então levada ao vórtex até a dissolução dos pellets precipitados. Após a homogeneização completa, 250 μL de cloreto férrico foram adicionados e então homogeneizados em vórtex. Após um descanso de bancada de 15 minutos a leitura das amostras foi realizada por meio de espectrofotometria a 510 nm (Figura 13). A concentração de tanino foi calculada por meio da curva padrão de Ácido Tânico que variou de 0 a 50 mg/mL.

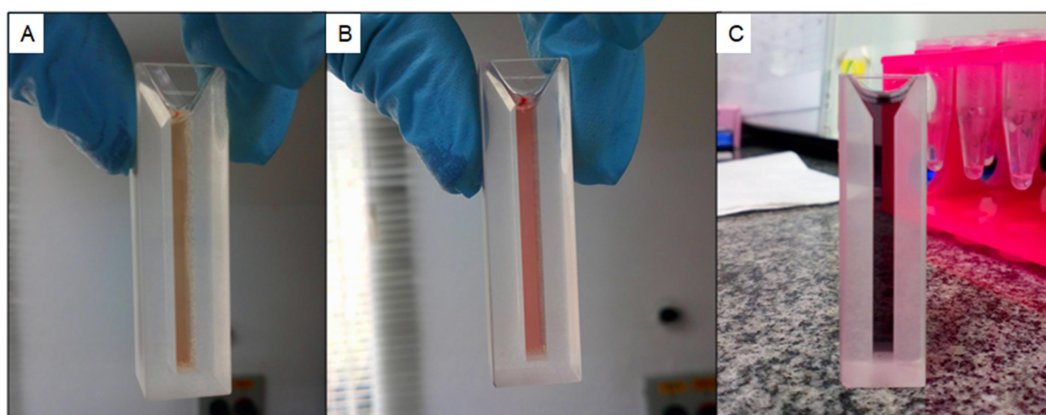


Figura 13 – Concentração de taninos totais contrastantes. A) *Tabebuia rosea*; B) *Hymenaea courbaril*; C) *Bertholletia excelsa*.

Conteúdo de Taninos Condensados

A determinação de taninos condensados (proantocianidinas) foi realizado seguindo metodologia de Waterman, 1994, com adaptações. 80 uL de extrato foi pipetado em tubos de vidro e adicionados a 1120 uL de Butanol – HCL, dentro da capela (Figura 14 – A). Cada tubo foi homogeneizado com auxílio de vórtex e aquecido a 95°C em banho seco, por 50 min com tubo fechado para evitar a evaporação da solução (Figura 14 – B). Após o resfriamento, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 550 nm (Figura 14 – C). A determinação de taninos condensados foi estimada por meio da curva padrão de Tanino Quebracho, que variou de 0 a 0,8 mg/mL (Figura 14 – D).

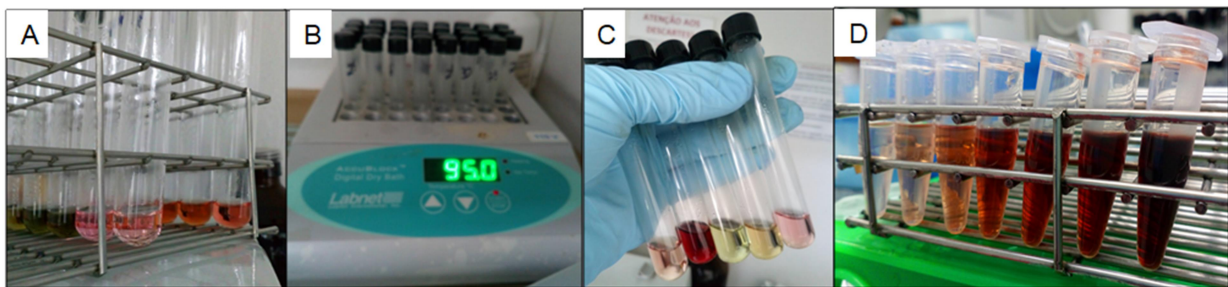


Figura 14 – Determinação de taninos condensados (proantocianidinas). A) Extratos após adição de Butanol. B) Amostras em banho seco. C) Amostras prontas para leitura em espectrofotômetro; D) Espectro da curva padrão de Tanino Quebracho.

4. Análises estatísticas

Os dados foram previamente submetidos às análises dos pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias pelos testes de Kolomorov-Smirnoff e Levene, respectivamente. Quando necessário, as variáveis foram transformadas (log(x), raiz quadrada, boxcox e arcseno) para atender os pressupostos. As análises descritas abaixo foram realizadas de acordo com o cada objetivo específico. Em caso de significância, o teste *post hoc* utilizado foi o de Fisher, LSD.

Para verificação do primeiro objetivo específico, foi realizada uma análise de variância em ensaio fatorial de dupla entrada (três condições contrastantes de luz;

baixa, moderada e alta irradiância x cinco espécies florestais = 15 tratamentos) para as variáveis respostas herbivoria acumulada e taxa de herbivoria. Para avaliar a variação da herbivoria entre os tempos de coleta, foi aplicado um Modelo Linear Generalizado Misto. Os valores de herbivoria em cada tempo correspondem à porcentagem de área foliar removida a cada 60 dias, ao longo de 300 dias (n = 5). O tempo foi a variável dependente enquanto o ambiente de luz (três ambientes de luz x cinco tempos de avaliação = 15 tratamentos) e espécies florestais (cinco espécies florestais x cinco tempos, 25 tratamentos) as variáveis independentes. Em caso de significância, o teste *post hoc* utilizado foi o de Fisher, LSD.

Para verificar o segundo objetivo, foi realizada para cada característica morfofisiológica, uma análise de variância em ensaio fatorial de dupla entrada (três condições contrastantes de luz (baixa, moderada e alta irradiância) x cinco espécies florestais). Em caso de significância, o teste *post hoc* utilizado foi o de Fisher, LSD. Para a variável que não atendeu os pressupostos (conteúdo totais de fenóis), foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. O teste *post hoc* utilizado foi o de Mann-Whitney U.

Para verificar o terceiro objetivo específico, foram aplicadas análises de correlação de Pearson, com a taxa de herbivoria como variável dependente e as diferentes características funcionais foliares como variáveis independentes. Além disso, as correlações foram analisadas em cada ambiente de luz, individualmente.

As análises foram realizadas nos programas Statistica (versão 10) e R (Versão 3.5.3) através da extensão Rstudio. Para confecção dos gráficos, o programa utilizado foi SigmaPlot (versão 12.0).

5. Resultados

Efeito da variação na disponibilidade de irradiância sobre a herbivoria acumulada e taxas de herbivoria em espécies florestais

A remoção de área foliar individual variou de 0,01 a 90%. Entretanto, valores acima de 20% de remoção foram observados em apenas 5% das folhas amostradas em todas as espécies (N= 4.355). A herbivoria acumulada diferiu tanto entre espécies quanto entre os ambientes de luz (Figura 15). Além disso, a significância da interação indicou que o efeito do ambiente de luz sobre a herbivoria foi dependente da espécie.

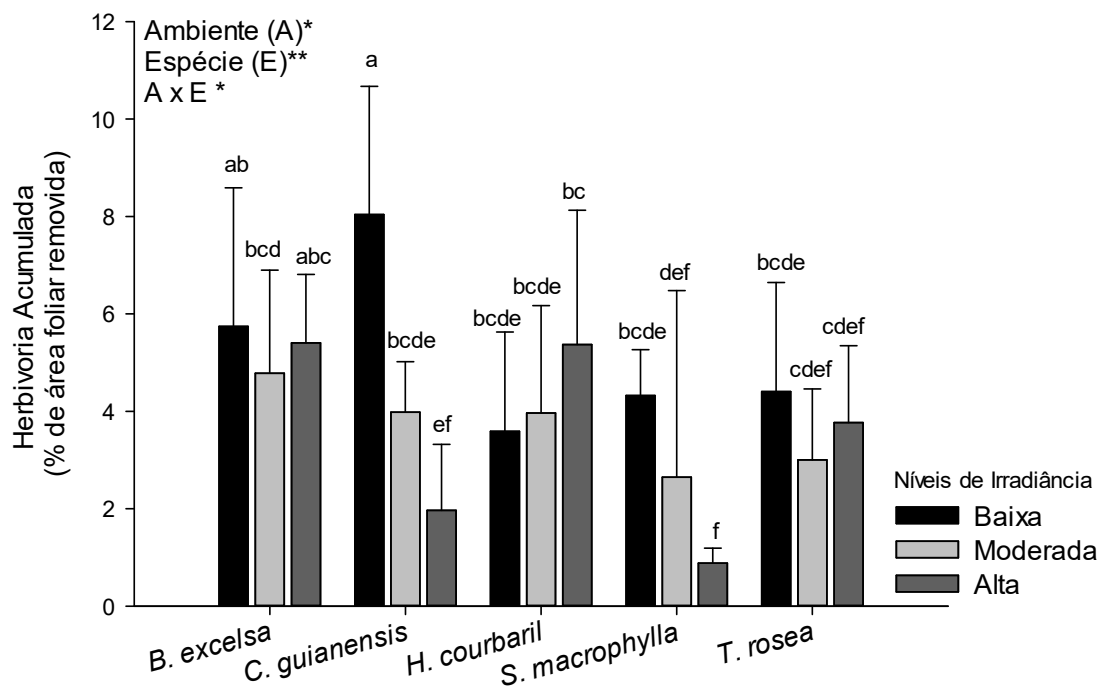


Figura 15 – Herbivoria acumulada em cinco espécies florestais em função da variação na disponibilidade de irradiância. Os valores são as médias \pm erros padrão (n = 5). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Fisher LSD (*P < 0,05; **P < 0,01).

A variação na herbivoria acumulada entre ambientes de luz foi mais evidente para as espécies *C. guianensis* e *S. macrophylla*. Para essas espécies, a herbivoria foi maior em baixa irradiância e menor em alta irradiância. Por outro lado, as espécies *B. excelsa*, *H. courbaril* e *T. rosea* não tiveram diferenças entre ambientes de luz. As diferenças interespecíficas foram maiores nos ambientes de baixa e alta irradiância, sendo que as espécies *C. guianensis* e *B. excelsa* (baixa irradiância) e *B. excelsa* e *H. courbaril* (alta irradiância) tiveram os maiores valores.

As taxas de herbivoria diferenciaram-se apenas em função das espécies (Figura 16). Os maiores valores médios foram observados para *T. rosea* e *H. courbaril*. *B. excelsa*, *C. guianensis*, e *S. macrophylla*, por sua vez, não tiveram diferenças significativas entre si.

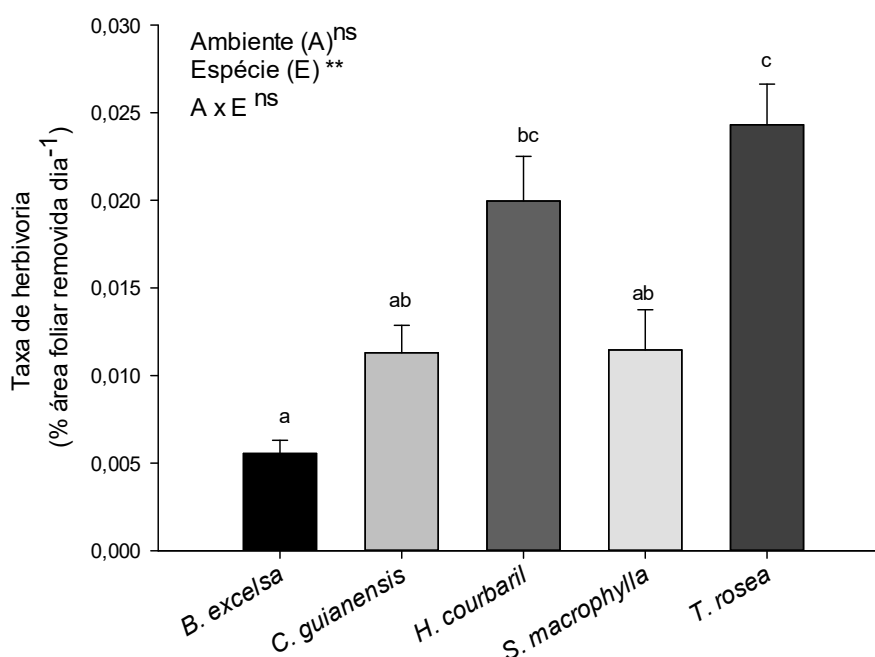


Figura 16 – Taxa de herbivoria em cinco espécies florestais em função da variação na disponibilidade de irradiância. Os valores são as médias \pm erros padrão ($n = 5$). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Fisher LSD (ns = não significativo; $**P < 0,01$).

Houve padrão diferenciado na variação de herbivoria ao longo do tempo entre os ambientes de luz (Figura 17). Enquanto nos extremos de luz (baixa e alta irradiância) o aumento foi superior a 200% ao mês, no ambiente de moderada irradiância, a variação não ultrapassou 70%.

No que se refere ao índice de herbivoria (Tabela 5; Figura 18), em baixa irradiância, as plantas tiveram média de 37 folhas por espécie ($N = 3.740$), das quais 72,5% apresentavam algum nível de área foliar removida.

Na condição de luz moderada, observou-se em média 166 folhas por espécie ($N = 16.428$), com 68,4% dessas folhas com herbivoria. O ambiente de alta irradiância teve média de 348 folhas por espécie ($N = 38.676$), e desse total, 53,6% possuíam algum grau de herbivoria.

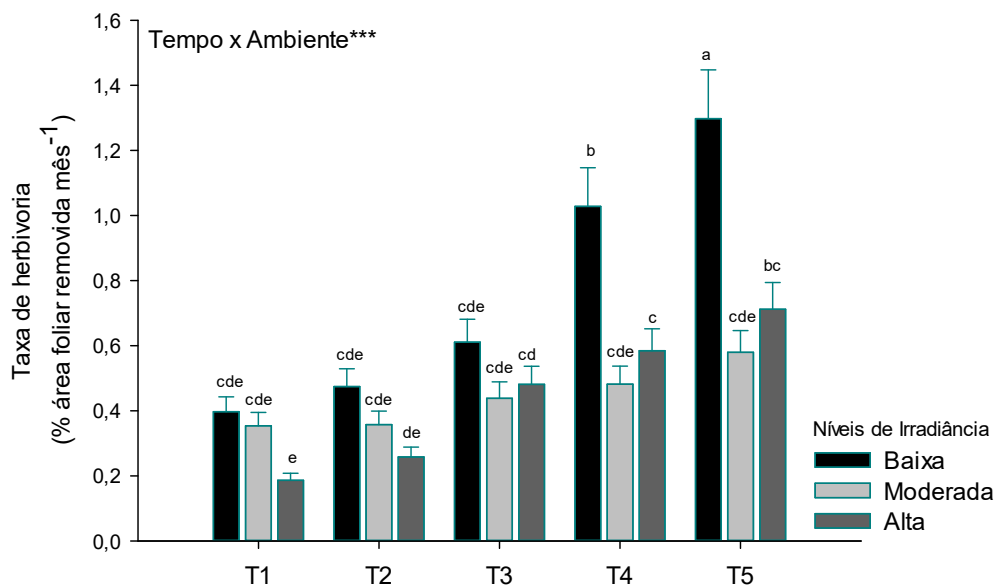


Figura 17 – Efeito do ambiente de luz sobre a herbivoria ao longo do tempo para cinco espécies florestais. Os valores são as médias \pm erros padrão (n = 5). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Fisher LSD (***) $P < 0,001$). Cada tempo refere-se a um intervalo de 60 dias entre as coletas, com início em março de 2018 (tempo 1) e final em fevereiro de 2019 (tempo 5).

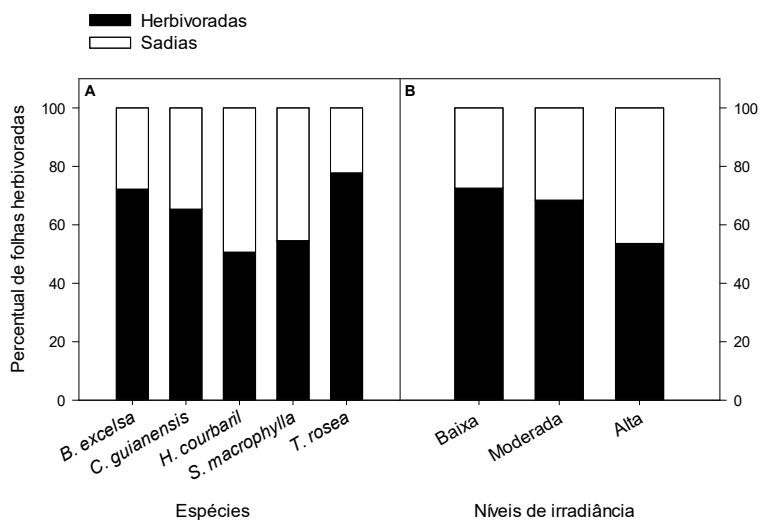


Figura 18 – Percentual qualitativo de herbivoria avaliado por meio da contagem do número total de folhas de cada indivíduo. A avaliação foi realizada dentro de cada ambiente de luz (A) e entre as espécies florestais (B). A área escura é a percentagem de folhas com remoção de área foliar e a área branca é o percentual de folhas sadias (não herbivoradas).

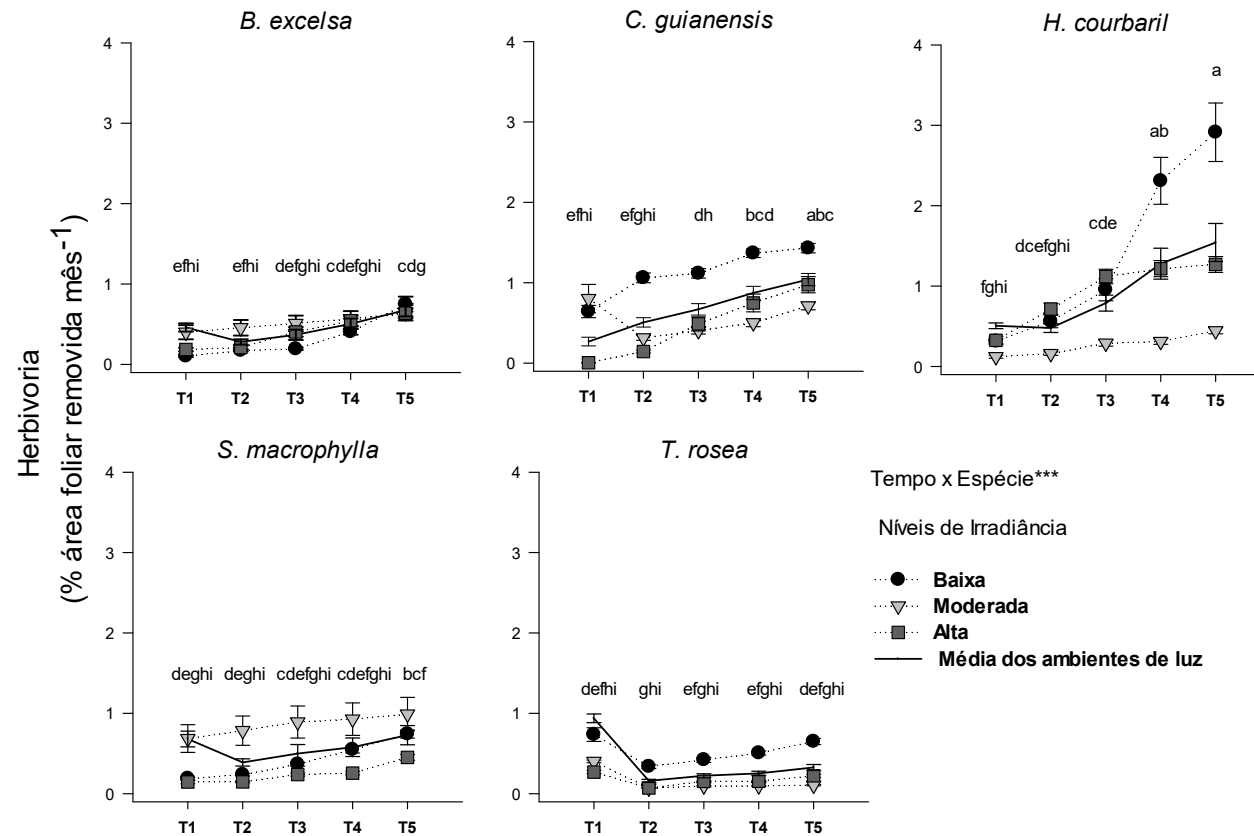


Figura 19 – Variação das taxas de herbivoria ao longo do tempo em cinco espécies florestais. Os valores são as médias ± erros padrão (n = 5). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Fisher LSD (***P < 0,001). Cada tempo se refere a um intervalo de 60 dias entre as coletas, com início em março de 2018 (tempo 1) e final em fevereiro de 2019 (tempo 5). T1 = março/maio; T2 = maio/julho; T3 = julho/setembro; T4 = setembro/novembro; T5 = novembro/fevereiro.

Tabela 5 – Índice de herbivoria. Análise qualitativa (presença/ausência) de herbivoria nas espécies florestais em cada ambiente de luz. Foi considerada herbivoria a remoção de tecido foliar, avaliada visualmente.

Níveis de irradiância/ Espécie	Total de folhas (média± desvio padrão)	% de folhas herbivoradas
Baixa	37 (± 22)	72,5
<i>B. excelsa</i>	15 (± 3)	78,6
<i>C. guianensis</i>	42 (± 7)	71,6
<i>H. courbaril</i>	36(± 14)	52,2
<i>S. macrophylla</i>	70 (± 25)	78,7
<i>T. rosea</i>	25 (± 5)	81,7
Moderada	166 (± 109)	68,4
<i>B. excelsa</i>	79 (± 35)	75,1
<i>C. guianensis</i>	141 (± 38)	67,9
<i>H. courbaril</i>	304 (± 120)	52,6
<i>S. macrophylla</i>	233 (± 114)	59,2
<i>T. rosea</i>	113 (± 37)	84,3
Alta	348 (± 358)	53,6
<i>B. excelsa</i>	158 (± 81)	62,7
<i>C. guianensis</i>	208 (± 90)	56,8
<i>H. courbaril</i>	1040 (± 363)	48,0
<i>S. macrophylla</i>	318 (± 64)	31,7
<i>T. rosea</i>	135 (± 22)	69,4

Efeito da variação na disponibilidade de irradiância sobre as características morfofisiológicas foliares de espécies florestais

Observaram-se efeitos significativos de ambos os fatores (espécies e ambientes de luz) para todas as características analisadas. Os efeitos da interação entre ambientes de luz e espécies foram significativos para área foliar específica (AFE), esclerofilia, amido e rafinose.

A variação na área foliar específica entre ambientes de luz foi mais evidente para as espécies *C. guianensis*, *H. courbaril*, *S. macrophylla* e *T. rosea* (Figura 20). Para essas espécies, a AFE foi maior em baixa irradiância e sem diferença entre moderada e alta irradiância. Por outro lado, a espécie *B. excelsa* não mostrou diferença entre ambientes de luz. A magnitude das diferenças interespecíficas foi maior no ambiente de baixa irradiância, com *T. rosea* tendo o maior valor e *B. excelsa* o menor.

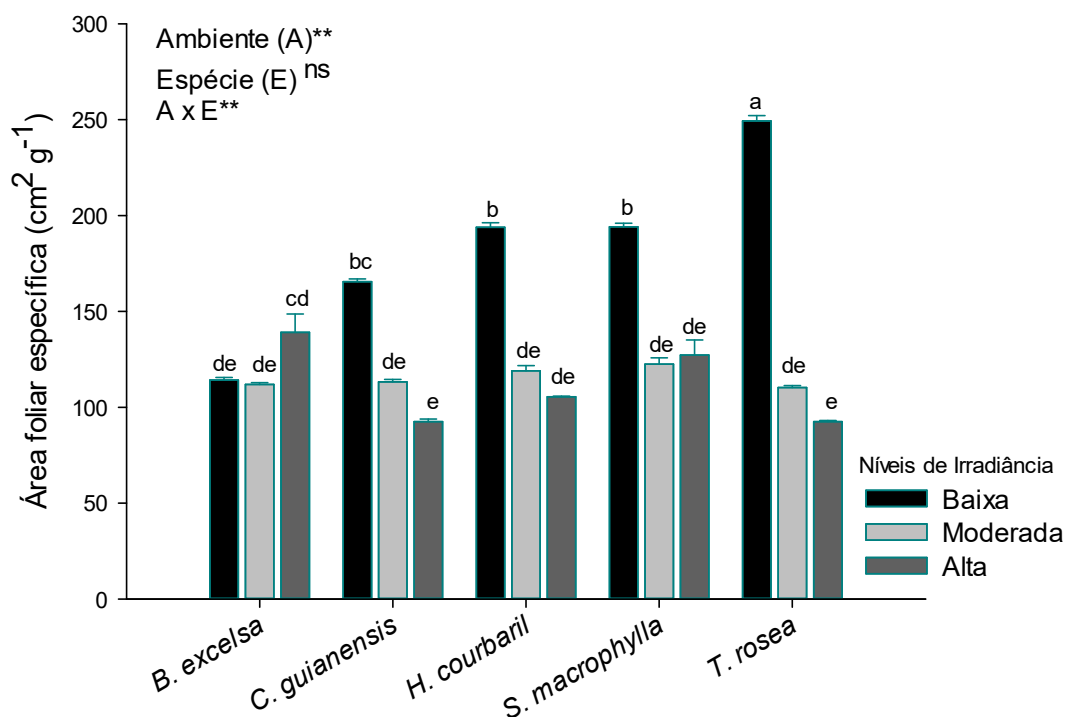


Figura 20 – Área foliar específica de cinco espécies florestais em função da variação na disponibilidade de irradiância. Os valores são as médias \pm erros padrão (n = 5). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Fisher LSD (*P < 0,05; ***P < 0,001).

A variação na esclerofilia entre ambientes de luz foi mais evidente para as espécies *C. guianensis*, *H. courbaril*, *S. macrophylla* e *T. rosea* (Figura 21). Para essas espécies, a esclerofilia foi menor em baixa irradiância e sem diferenças entre moderada e alta irradiância. Por outro lado, a espécie *B. excelsa* não mostrou diferenças entre ambientes de luz. A magnitude das diferenças interespecíficas foi maior em ambiente de baixa irradiância, com *B. excelsa* tendo o maior valor e *T. rosea* o menor.

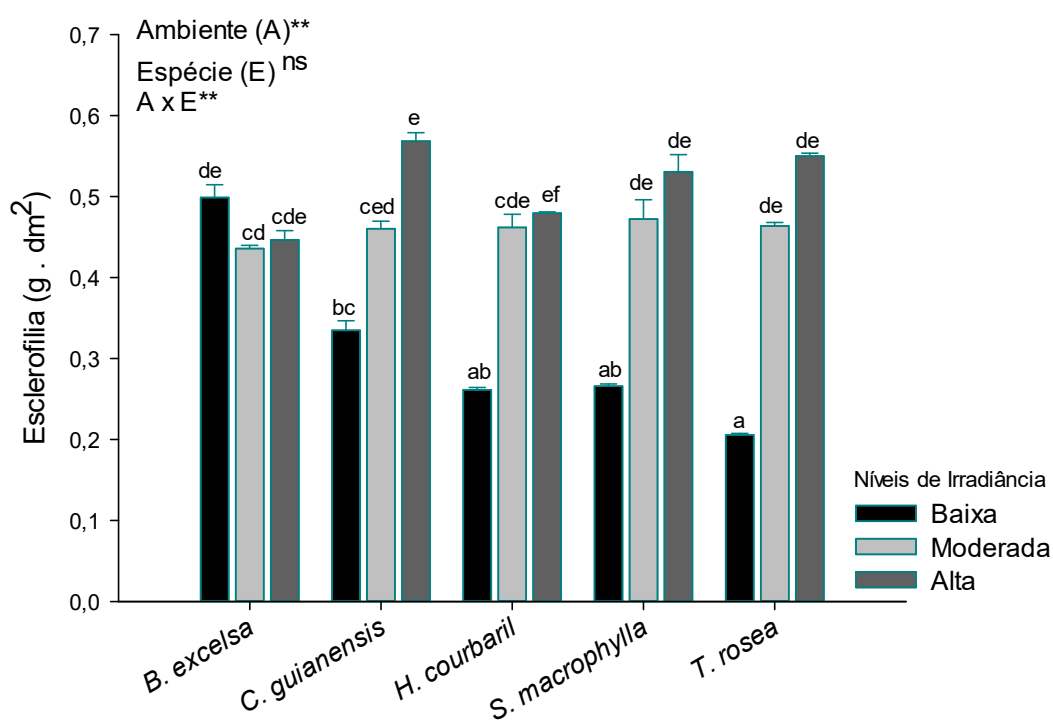


Figura 21 – Esclerofilia em cinco espécies florestais em função da variação na disponibilidade de irradiância. Os valores são as médias \pm erros padrão (n = 5). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Fisher LSD (ns = não significativo; **P < 0,01).

A variação no teor relativo de água foi apenas interespecífica. As espécies *B. Excelsa* e *T. rosea* apresentaram os maiores valores no conteúdo percentual de água (Figura 22). As demais espécies não apresentaram diferenças entre si.

Os maiores valores de compostos fenólicos foram observados para *B. excelsa*, *C. guianensis* e *S macrophylla*. As menores concentrações foram registradas em *T. rosea* (Figura 23). Os ambientes de luz não diferiram entre si.

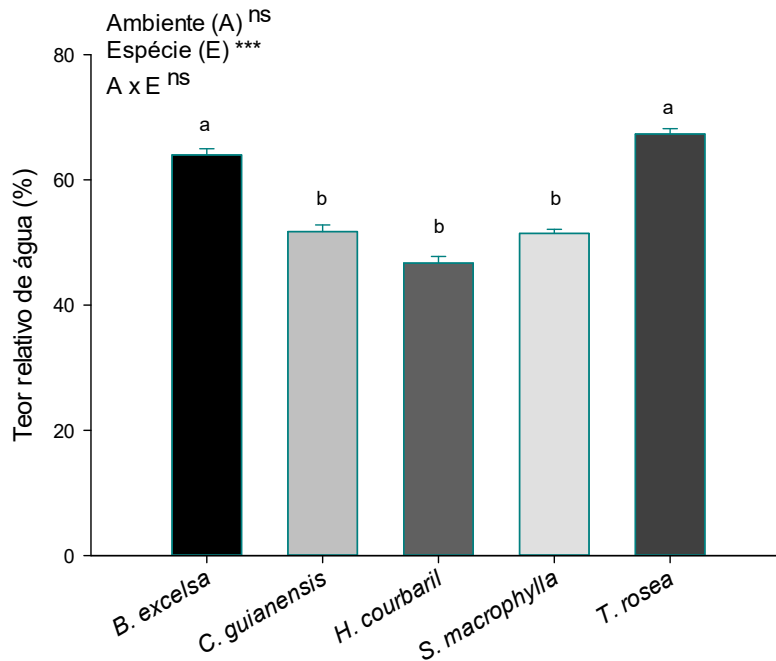


Figura 22 – Teor relativo de água em cinco espécies florestais. Os valores são as médias \pm erros padrão ($n = 5$). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Fisher LSD (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

Os maiores valores de tanino total foram observados para *B. excelsa*. As menores concentrações foram registradas em *T. rosea* (Figura 24 – A). O ambiente de baixa irradiância apresentou as menores concentrações de tanino total, enquanto os ambientes de moderada e alta irradiância não diferiram entre si (Figura 24 – B).

As concentrações de tanino condensado foram superiores para as espécies *C. guianensis* e *S. macrophylla*, enquanto as menores concentrações foram verificadas em *B. excelsa* (Figura 24 – C). O ambiente de baixa irradiância apresentou as menores concentrações de tanino condensado, enquanto os ambientes de moderada e alta irradiância não diferiram entre si (Figura 24 – D).

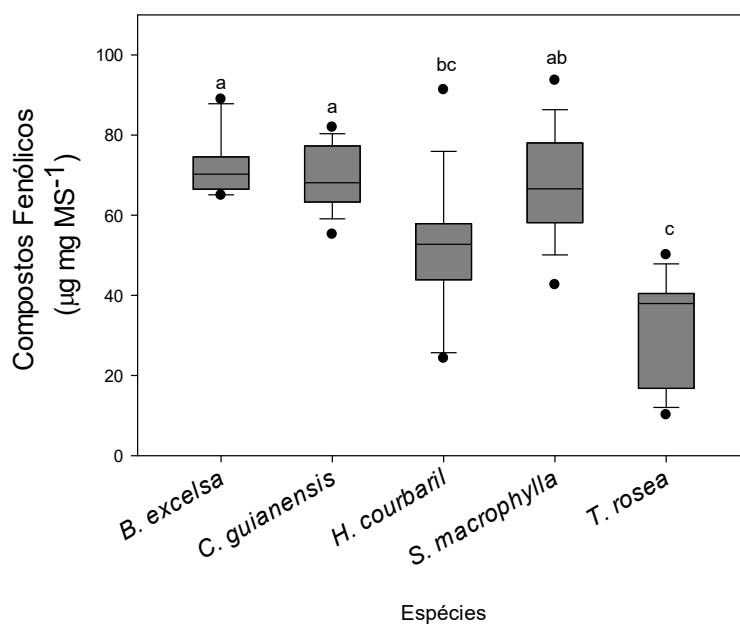


Figura 23 – Concentração de compostos fenólicos em cinco espécies florestais (A) e em três ambientes de luz (B). (n = 5). Nos Box-plots, a linha contínua representa a mediana. O limite superior da caixa refere-se ao quartil de 75% e o limite inferior, ao de 25%. As linhas verticais tracejadas são os percentis de 10 e 90%. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Mann-Whitney (U). (P < 0.05).

As maiores concentrações de sacarose foram observadas em *S. macrophylla* (Figura 25 – A). As menores concentrações foram registradas em *B. excelsa*, *H. courbaril* e *T. rosea*. O ambiente de baixa irradiância apresentou concentração 26% menor que os demais ambientes (Figura 25 – B).

A concentração de glicose foi notadamente maior para *T. rosea* (Figura 26 – A). Essa espécie apresentou concentração nove vezes superior em relação à média das demais espécies. Em contraste aos demais açúcares estudados, em baixa irradiância apresentou a maior concentração de glicose (Figura 26 – B).

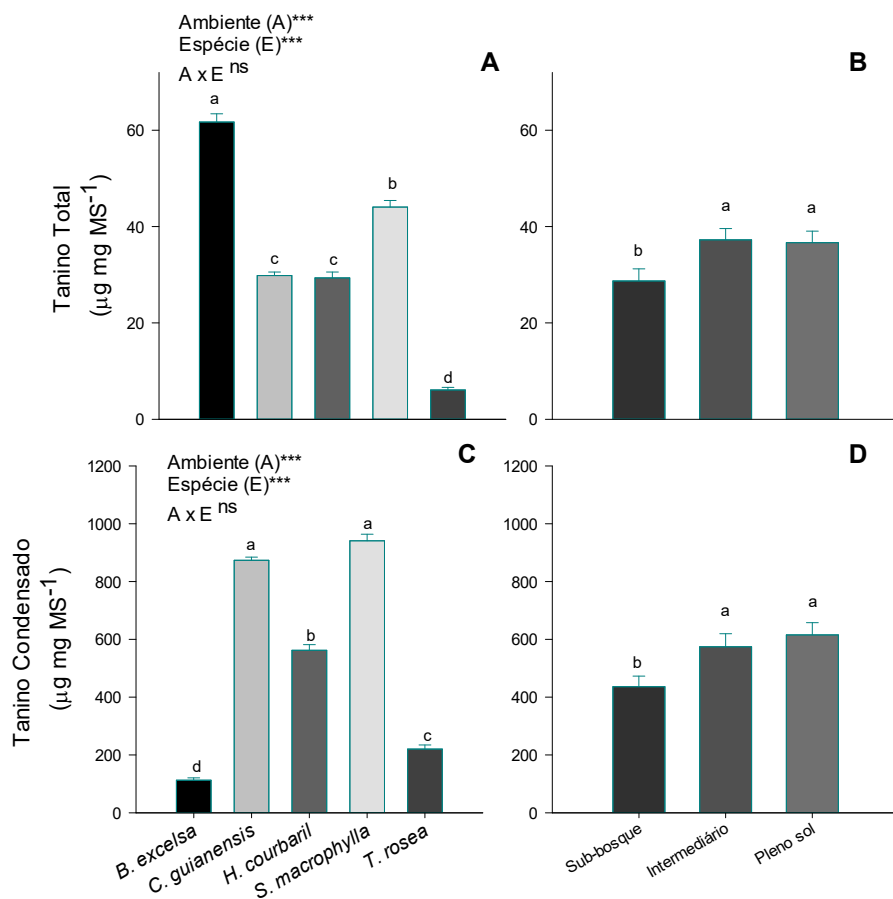


Figura 24 – Tanino total (curva: Ácido Tânico) (A e B) e tanino condensado, (curva: Tanino Quebracho) (C e D) em cinco espécies florestais em função da variação no ambiente de luz. Os valores são as médias \pm erros padrão (n = 5). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Fisher LSD (ns = não significativo; ***P < 0,001).

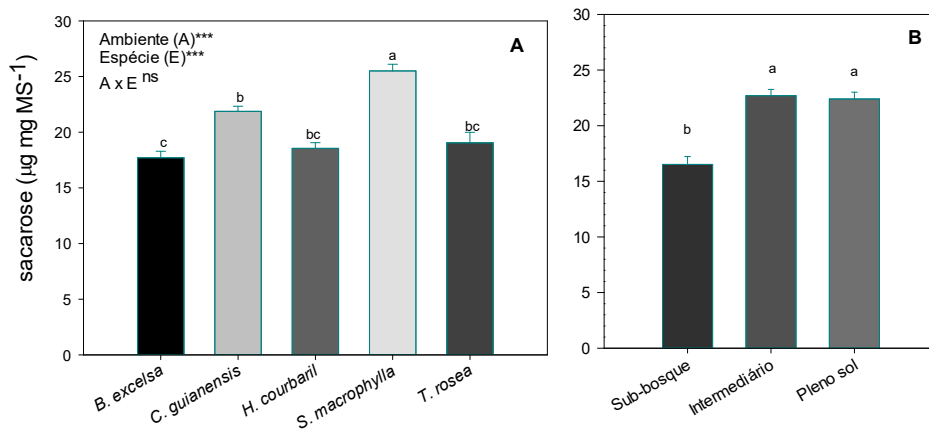


Figura 25 – Concentração de sacarose em cinco espécies florestais (A) e nos diferentes ambientes de luz (B). Os valores são as médias \pm erros padrão (n = 5). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Fisher LSD (ns = não significativo; ***P < 0,001).

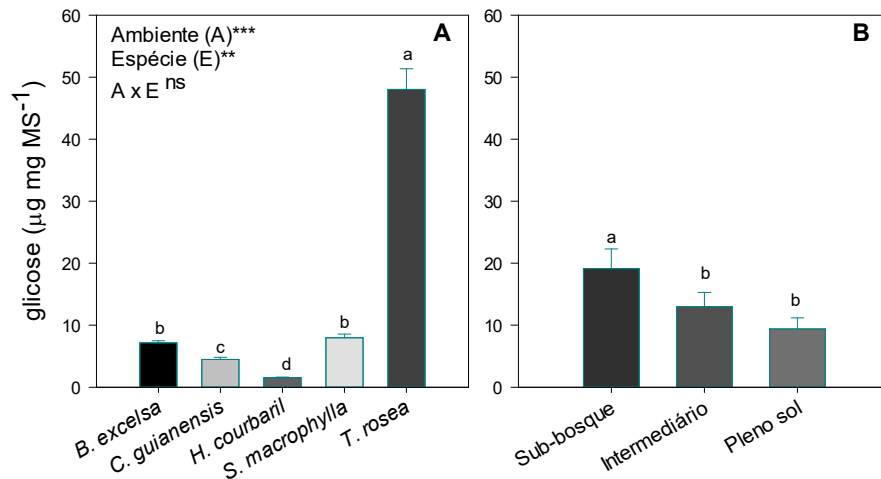


Figura 26 – Concentração de glicose em cinco espécies florestais (A) e nos diferentes ambientes de luz. Os valores são as médias \pm erros padrão (n = 5). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Fisher LSD (ns = não significativo; **P < 0,01; ***P < 0,001).

A maior concentração de frutose foi verificada na espécie *S. macrophylla* (Figura 27 – A). Os menores valores foram registrados em *H. courbaril*. Entre ambientes de luz, as maiores concentrações de frutose foram encontradas nos ambientes baixa e moderada irradiância (Figura 27 – B).

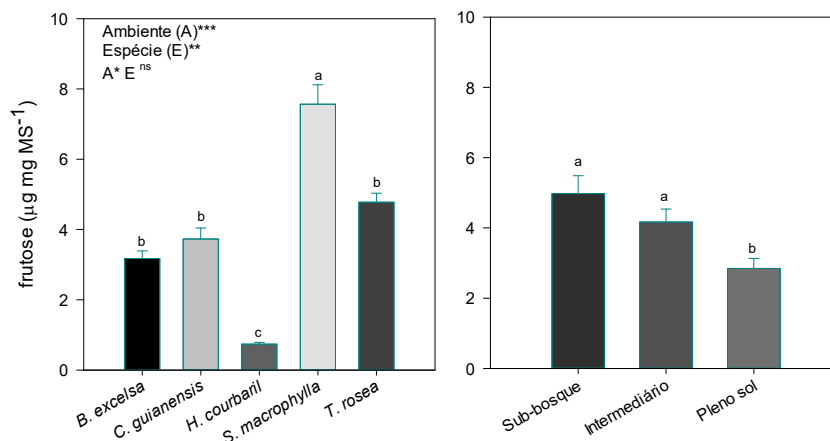


Figura 27 – Concentração de frutose em cinco espécies florestais (A) e entre ambientes de luz. Os valores são as médias \pm erros padrão (n = 5). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Fisher LSD (ns = não significativo; **P < 0,01; ***P < 0,001).

A variação nas concentrações foliares de amido entre ambientes de luz foi mais evidente para as espécies *S. macrophylla* e *C. guianensis* (Figura 28). Para estas espécies, o teor de amido foi menor em baixa irradiância e maior

em alta irradiância. As espécies *B. excelsa* e *H. courbaril* registraram suas menores concentrações em baixa irradiância, e sem diferença para os demais ambientes. *T. rosea* não teve diferenças entre ambientes de luz. As diferenças interespecíficas foram menores no ambiente de baixa irradiância.

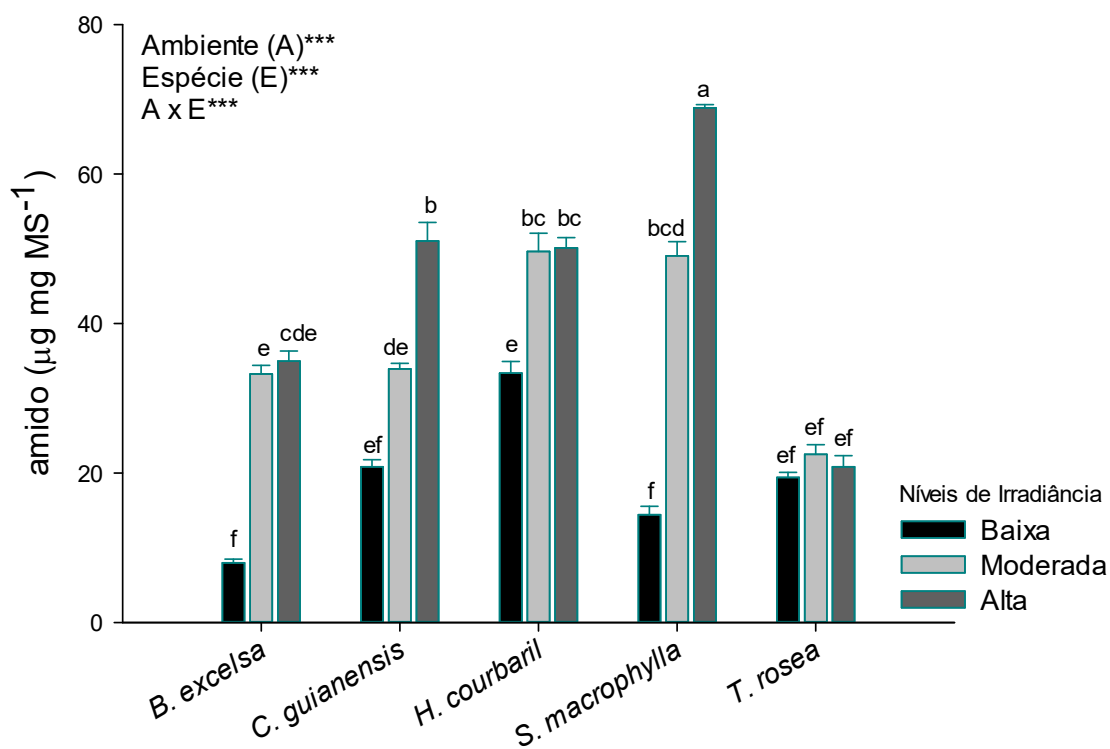


Figura 28 – Concentração de amido em cinco espécies florestais em função da variação na disponibilidade de irradiância. Os valores são as médias \pm erros padrão (n = 5). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Fisher LSD (***) ($P < 0,001$).

A variação nas concentrações de rafinose entre ambientes de luz foi notadamente superior para a espécie *T. rosea* (Figura 29). Esta espécie apresentou menores concentrações em alta irradiância e sem diferenças entre baixa e moderada irradiância. A espécie *C. guianensis* teve menor concentração em baixa irradiância. *T. rosea* apresentou as maiores concentrações de rafinose independente do ambiente de luz, cerca de 38 vezes superior à espécie com o menor valor deste açúcar, *H. courbaril*.

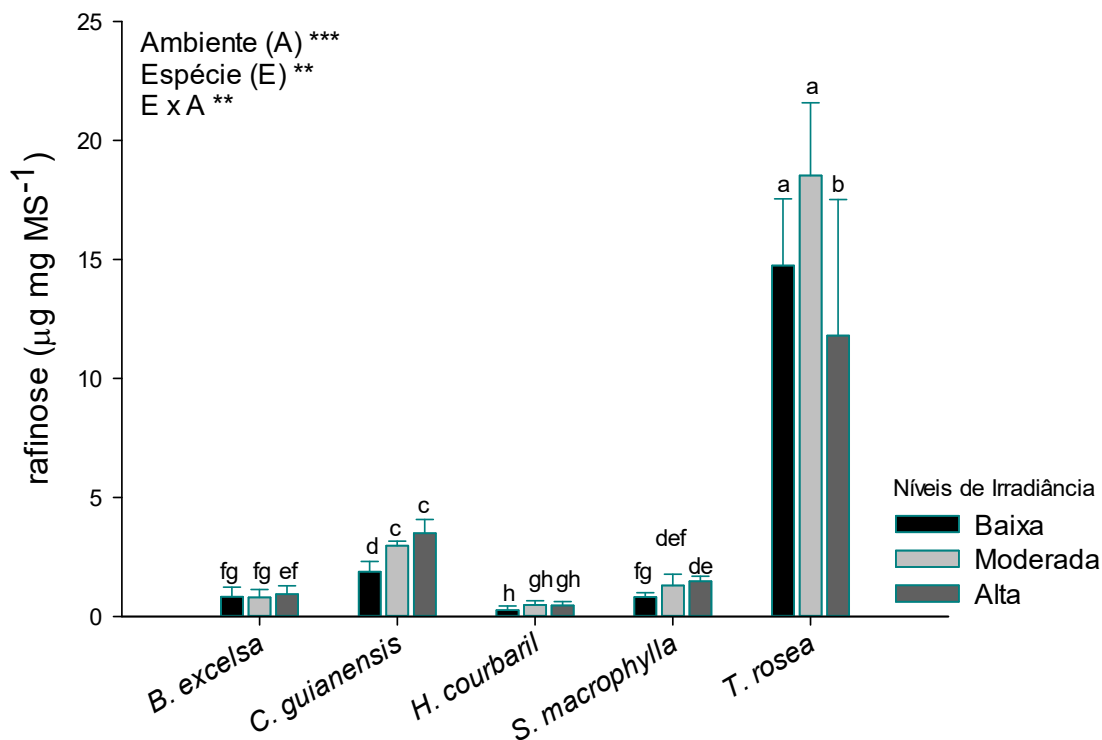


Figura 29 – Concentração de rafinose em cinco espécies florestais em função da variação na disponibilidade de irradiância. Os valores são as médias \pm erros padrão ($n = 5$). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Fisher LSD (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

Associações entre características funcionais foliares e herbivoria


Considerada a herbivoria diária o indicador mais apropriado para registrar o dano sofrido pelas espécies, buscamos relacionar este indicador e as características funcionais. Houve correlações significativas entre a herbivoria e traços funcionais associados às defesas químicas e à fisiologia (Tabela 6). Para as concentrações de fenóis e tanino total a relação foi moderadamente negativa ($r = -0,451$; $r = -0,441$). A rafinose apresentou uma relação positiva fraca ($r = 0,234$).

Quando os ambientes de luz são analisados separadamente, as características que melhor correlacionam com a herbivoria diferem (Tabela 6). Em baixa irradiância, área foliar específica, fenol e tanino total correlacionaram

moderadamente com a herbivoria, AFE de maneira positiva e fenol e tanino de forma negativa. No ambiente de alta irradiância, duas variáveis tiveram correlações significativas, moderada e forte: concentrações de fenóis e tanino total, respectivamente. No ambiente moderado de luz, não houve correlações significativas.

Tabela 6 – Mapa de Correlação de Pearson entre as características funcionais foliares em cada ambiente de luz e a herbivoria diária. Cores quentes representam correlação negativa enquanto cores frias representam correlações positivas. A intensidade das cores representa a força da relação. Ausência de cor corresponde à ausência de correlação. Os valores em negrito representam as relações significativas.

Mapa de Correlação



	Herbivoria Diária	Níveis de irradiância		
		Baixa	Moderada	Alta
Herbivoria	1,000	1,000	1,000	1,000
AFE	c0,203	0,415	0,028	-0,204
TRA	-0,029	-0,270	0,200	0,137
Esclerofilia	-0,212	-0,382	-0,052	0,151
Fenol	-0,451	-0,445	-0,363	-0,469
Tanino total	-0,441	-0,457	-0,298	-0,504
Tanino condensado	-0,04	0,043	-0,050	-0,006
Amido	-0,084	0,343	0,037	-0,363
Glucose	0,106	0,129	0,082	-0,001
Frutose	-0,129	-0,227	0,093	-0,364
Sacarose	-0,125	-0,204	0,079	0,114
Rafinose	0,234	0,262	0,223	0,314

6. Discussão

A herbivoria afeta o estabelecimento inicial das mudas. No presente estudo, nós identificamos duas principais informações acerca dos efeitos deste fator de estresse biótico em espécies florestais amazônicas de interesse comercial. Primeiro, nós ampliamos para um maior número de espécies a conclusão obtida por Poorter *et al.* (2014), que a redução de área foliar medida a partir de um indicador pontual (herbivoria acumulada) é menos precisa que a taxa de herbivoria (medida ao longo do tempo), uma vez que este último consegue capturar a variação interespecífica na dinâmica foliar. Segundo e mais importante, observamos que a variação interespecífica nas taxas de herbivoria em condições mais contrastantes de luz (baixa e alta irradiância) está mais relacionada às características foliares de defesa química (teores de fenol e tanino totais), que sugere maior pressão seletiva de herbívoros por folhas mais digeríveis.

Variação interespecífica na herbivoria em condições contrastantes de irradiância: a importância da dinâmica foliar

Os efeitos dos ambientes contrastantes de luz sobre a herbivoria são variáveis. Alguns estudos demonstram maiores valores de herbivoria em baixa irradiância (Goodale *et al.*, 2014; Mađerek *et al.*, 2017; Salgado-Luarte; Gianoli, 2017), outros indicam maior herbivoria em clareiras ou alta irradiância (Chacón; Armesto, 2006; Richards; Coley, 2007; Piper *et al.*, 2018) e ainda não haver diferenças entre os extremos de luz (Vasconcelos, 1999; Ruhnke *et al.*, 2009). Aqui, nós observamos para cinco espécies florestais plantadas em condições contrastantes de irradiância, que os efeitos do ambiente de luz sobre a herbivoria acumulada dependem da espécie. No entanto, quando considerada a taxa, não há efeito significativo da interação ambiente vs espécie. Enquanto para algumas espécies há evidências de maior herbivoria acumulada em baixa irradiância (*C. guianensis* e *S. macrophylla*), as demais exibem valores semelhantes nos três ambientes de luz (Figura 12).

As diferenças observadas quanto às respostas dos indicadores de herbivoria (acumulada ou taxa) podem estar associadas à variação interespecífica da dinâmica foliar. A medição a partir de uma única coleta (herbivoria acumulada), que se refere à redução de área foliar sofrida pela planta desde o viveiro até o momento da coleta (16 meses de idade), não captura os efeitos da dinâmica foliar ao longo do tempo. Desta forma, espécies com intensa dinâmica foliar podem ter seus valores de herbivoria subestimados, enquanto para espécies com reduzida dinâmica foliar, os danos são superestimados.

Em nosso estudo, a espécie *T. rosea* apresentou valores acumulados de herbivoria subestimados em comparação à taxa de herbivoria diária, que pode estar associado à sua intensa troca foliar frequentemente observada a cada três meses (dados não apresentados). O contrário foi observado para *B. excelsa*. Esta espécie tem herbivoria diária baixa, enquanto o período de tempo para troca foliar mais intensa é superior ao nosso tempo de monitoramento, o que deve explicar os maiores registros de dano acumulado em *B. excelsa*.

Diversos estudos têm associado o tempo de vida das folhas com o grupo ecológico e a taxa de herbivoria (Coley, 1988; Poorter *et al.*, 2004; Lusk *et al.*, 2008; Cardenas *et al.*, 2014). Em florestas tropicais chuvosas, mesmo espécies não-pioneiras pertencentes à mesma família, podem ter diferentes tempos de vida foliares (em inglês, *leaf life-span*) (Yoneyama; Ichie, 2019). Assim, devido à forte variação no tempo de vida das folhas entre as espécies, o indicador de herbivoria medido em um único momento no tempo (herbivoria acumulada) pode ser um fraco preditor dos reais danos experimentados pelas espécies (Poorter *et al.*, 2004; Andrew *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2017). Um exemplo claro é a espécie *T. rosea*. Em nossas observações de campo, folhas novas (amostradas logo após o momento da expansão completa) geralmente possuem menor registro de herbivoria em relação àquelas coletadas durante a senescência. Isto pode estar associado ao padrão de seleção dos herbívoros os quais seguem pistas olfativas que aumentam sua concentração com a idade da folha (Hanley *et al.*, 2013). Por outro lado, estudos apontam para uma maior concentração de metabólitos de defesa em folhas de vida longa (Coley; Kusar, 1996), fato que poderia adicionar evidências ao nosso resultado observado.

Outras evidências que indicam o fraco poder de predição da herbivoria acumulada são os resultados de herbivoria ao longo dos diferentes tempos de coleta (Figuras 14 e 15). É possível que, dependendo do período do ano em que a coleta foi realizada, os valores de herbivoria entre as espécies podem ser subestimados ou superestimados. Além disso, parâmetros não medidos neste estudo, como preferência alimentar dos insetos-praga, níveis de tolerância, resistência e abundância de predadores ou parasitóides podem também estar associados em maior ou menor grau às respostas de herbivoria (Núñez-Farfán *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2012; Ibanez *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2017; Endara *et al.*, 2018).

Efeito da disponibilidade de irradiância sobre as características morfofisiológicas foliares

Ambientes de irradiância contrastantes influenciam significativamente as respostas ecofisiológicas das plantas (Poorter, 1999; Poorter *et al.*, 2003; Mithöfer; Boland, 2012; Salgado-Luarte; Gianoli, 2017; Vries *et al.*, 2019; Poorter *et al.*, 2019). Nas três condições de irradiância analisadas, os traços funcionais morfológicos (AFE, Esclerofilia) foram dependentes da espécie. As características químicas (concentração de compostos fenólicos, tanino total e tanino condensado) variaram de forma independente para os fatores ambiente de luz e espécie. Entre as características fisiológicas, os açúcares solúveis, amido e rafinose apresentaram interação entre os fatores (ambiente vs espécie), enquanto a sacarose, glicose e frutose variaram de forma independente. Para o teor relativo de água, verificamos apenas relação interespecífica.

Características funcionais morfológicas

Nossos resultados mostraram que o ambiente de luz controla mais fortemente as respostas morfológicas, enquanto diferenças interespecíficas em cada nível de irradiância foram não significativas. *T. rosea*, *S. macrophylla*, *H. courbaril* e *C. guianensis* apresentaram maior AFE em baixa irradiância, no entanto, sem diferença significativa entre os demais ambientes de luz. Como

esperado, o índice de esclerofilia apresentou padrão oposto ao verificado para AFE. Esse parâmetro diz respeito ao nível de resistência das folhas e teve valores próximos aos resultados observados para espécies sempre verdes, abaixo de 0,6 (Rizini; Garay, 2003), variando significativamente entre os extremos de luz (baixa e alta irradiância).

Folhas em ambientes sombreado possuem um conjunto de estratégias bioquímicas e morfológicas para lidar com a baixa incidência de luz (Taiz *et al.*, 2017). Dentre elas, o investimento em área foliar é uma forma de aumentar a interceptação da luz (Osunkoya *et al.*, 1994; Poorter, *et al.*, 2003). Essa estratégia tende a deixar as lâminas foliares mais finas, portanto, suscetíveis à danos mecânicos (Poorter *et al.*, 1999). A variação de luz exerceu maior influência sobre as características morfológicas se comparada à variação interespecífica em cada nível de irradiância (não significativa), o que pode significar que a intensidade de irradiância seja mais importante que a qualidade com que esta chega às plantas (Poorter *et al.*, 2019)

Curiosamente, *B. excelsa* foi a única espécie em nossas análises que não demonstrou diferenças entre ambientes de luz. Essa resposta pode indicar uma menor plasticidade da espécie aos extremos de luz, no período de estabelecimento inicial. Em indivíduos adultos de *B. excelsa*, as folhas apresentam AFE significativamente diferentes entre folhas de sol e sombra (Ferreira, *et al.*, 2016). A plasticidade morfológica exige capacidade de aclimação aos diferentes ambientes de luz, ou seja, troca foliar (Poorter, 2010). Para esta espécie a dinâmica foliar é baixa, ou seja, sua capacidade de exibir plasticidade é limitada.

Características químicas foliares

Compostos fenólicos são um dos maiores grupos entre os metabólitos secundários, sendo os taninos os principais representantes (Sieniawska; Baj, 2017). Os efeitos das condições de irradiância sobre as concentrações foliares dos compostos fenólicos totais, taninos totais e taninos condensados diferiram entre as espécies (Figura 21).

A variação entre os níveis de irradiância teve um padrão semelhante para taninos totais e condensados: baixos valores em baixa irradiância com

aumento nos demais ambientes. O aumento desses compostos nos ambientes com maior disponibilidade de luz que favorece as próprias vias metabólicas das quais esses compostos obtêm intermediários biossintéticos (Kabera, *et al.*, 2014). Em ambientes com maior disponibilidade de irradiância, geralmente há aumento das taxas fotossintéticas e respiratórias (Guimarães *et al.*, 2018; Poorter *et al.*, 2019; He *et al.*, 2019), que são os processos funcionais mais comuns para a síntese dos precursores destas rotas metabólicas (Kabera, *et al.*, 2014). Altas concentrações desses fitoquímicos foram verificadas em *B. excelsa*, *C. guianensis*, *S. macrophylla* e *H. courbaril*. Por outro lado, *T. rosea* apresentou baixas quantidades de compostos fenólicos.

A ação antioxidante e presença de tanino condensado é reconhecida para os frutos da família Lecythidaceae (John; Shahidi, 2010; Demoliner *et al.*, 2018), mas em relação às folhas, a literatura ainda é escassa sobre quais tipos de compostos secundários são predominantes em *B. excelsa*. Uma das substâncias já identificadas foram os terpenos (De Siqueira *et al.*, 2003). Em nosso estudo, *B. excelsa* teve as maiores concentrações absolutas de compostos fenólicos e tanino total entre as espécies analisadas. No ensaio de proantocianidinas, por outro lado, foi a espécie com os menores valores de tanino condensado. Um dos motivos para este resultado pode estar ligado às metodologias utilizadas para determinação destes compostos (Schofield *et al.*, 2001). As substâncias utilizadas para a confecção da curva padrão diferem em seu espectro de absorção para o reagente utilizado para leitura (Blainski *et al.*, 2013). O ácido tânico utilizado (Dab 7, FU, Ph, Helv - Merk) é um extrato concentrado de tanino condensado. O tanino quebracho, dependendo da planta da qual é extraída, varia em suas quantidades de tanino condensado e pode superestimar ou subestimar as quantidades de taninos presentes nas amostras (Sieniawska; Baj, 2017). Adicionalmente, deve-se considerar a presença de outros tipos de taninos principais para esta espécie, como galotaninos, elagitaninos e/ou taninos complexos (Kraus *et al.*, 2003; Sieniawska; Baj, 2017).

Para *H. courbaril* há diversos registros de compostos fenólicos, além de terpenos e alcalóides em diversas estruturas da planta (Crankshaw; Langenheim, 1981; Imai *et al.*, 2008; Veggi *et al.*, 2014). Grande parte dos

fenóis totais neste gênero é representada pelo tanino condensado, que é notadamente envolvido na ação antibacteriana e anti-fúngica (Crankshaw; Langenheim, 1981; Oliveira, 2018). Aqui, nós observamos em *H. courbaril* haver maior variação na concentração de compostos fenólicos totais entre as espécies estudadas e valores intermediários de tanino total e condensado.

As espécies *C. guianensis* e *S. macrophylla* tiveram quantidades semelhantes de compostos fenólicos totais, porém diferiram significativamente nas quantidades de tanino total. Para estas espécies, a literatura descreve diversos compostos fenólicos, sendo os taninos os mais abundantes na folha (De Siqueira, *et al.*, 2003; Arumugasamy *et al.*, 2004; Durai *et al.*, 2016), fato confirmado em nosso estudo.

T. rosea teve valores muito baixos para as concentrações de compostos fenólicos totais e taninos. Isto pode estar associado ao fato das espécies pertencentes à família Bignoniaceae produzirem como composto secundário majoritário as naftoquinonas (Hook *et al.*, 2014). Estes metabólitos utilizam as mesmas rotas de biossíntese dos compostos fenólicos, como as rotas do acetato-malato e shiquimato (Epifano *et al.*, 2014). Desta forma, em *T. rosea*, a síntese de naftoquinonas ocorre em detrimento à síntese de compostos fenólicos, confirmando as baixas concentrações observadas neste estudo.

Traços funcionais fisiológicos

As espécies apresentaram apenas variação interespecífica em relação ao teor de água nas folhas. Uma das explicações para este comportamento pode estar associado ao grupo sucessional ao qual as espécies pertencem (Gerra *et al.*, 2010). Outro fator que pode contribuir para este resultado é a regular distribuição da precipitação na área de estudo, com apenas dois meses de seca (< 100 mm), que não limitaria as espécies quanto à disponibilidade de água. Os carboidratos não estruturais (CNE) possuem funções dinâmicas nos vegetais (Martínez-Vilalta *et al.*, 2001). Para o amido e a rafinose, verificamos que o padrão de variação entre os ambientes de luz é dependente da espécie. Em ambientes com maior disponibilidade de luz, a maior abundância do amido

transitório poderia ser explicada pela alta produção de fotoassimilados pelas espécies e a limitação na produção de sacarose, que induziria o maior acúmulo deste carboidrato nas folhas (Martínez-Vilalta *et al.*, 2016). Para as espécies, a maior variação entre ambientes foi registrada em *S. macrophylla*, o que indica que esta espécie pode atingir a máxima produção fotoassimilados em ambientes de luz moderados.

Para a rafinose, quando avaliamos a respostas das espécies em relação aos ambientes de luz, encontramos a interação destes fatores. Esse fato está relacionado ao seu papel fisiológico na resposta a estresses ambientais (Sengupta *et al.*, 2015; Kito *et al.*, 2017). Em *Arabidopsis thaliana*, este é o único oligossacarídeo da família das rafinoses que se acumula nas folhas, unicamente em condições de estresse abiótico (Loedolf *et al.*, 2015). O acúmulo deste açúcar foi observado em todas as espécies, com diferenças significativas entre ambientes de luz para *C. guianensis*, *S. macrophylla* e *T. rosea*. Para *B. excelsa*, *C. guianensis* e *S. macrophylla* este é o primeiro trabalhos que mostra acúmulo deste açúcar. Cabe destacar que as altas concentrações verificada em *T. rosea* podem estar associadas ao composto secundário predominante nesta família, as naftoquinonas (Jacomé, *et al.*, 2001; Hook *et al.*, 2014). Esses compostos são amplamente relacionados ao seu valor farmacológico e apresentam atividades citotóxicas, antibacterianas, antivirais e inseticidas (Jiménez-Golzaes *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2018). Além disso, o comportamento observado para a rafinose poderia dar os primeiros indícios de que os oligossacarídeos da família das rafinoses estão relacionados ao estresse biótico, e não apenas ao abiótico, como reportado na literatura (Loedolf *et al.*, 2015; Singputa *et al.*, 2015). A maior concentração deste açúcar é em baixa irradiância, adicionando evidências à sua relação com estresses bióticos.

Os demais CNE (glicose, frutose e sacarose) variaram significativamente tanto entre os ambientes de luz quanto entre espécies. Entre os ambientes de luz, glicose e frutose variaram de forma semelhante, com maiores concentrações em baixa irradiância. A sacarose apresentou padrão oposto. As concentrações de CNE observadas neste estudo estão dentro do esperado para espécies tropicais (Martinez-Vilalta *et al.*, 2016). Entre as espécies, cabe

destaque as altas concentrações de glicose em *T. rosea*, que adiciona evidências ao comportamento metabólico específico da família (Barbosa-Filho *et al.*, 2004; Da Silva *et al.*, 2012; Jiménez-Golzales *et al.*, 2013; Epifano *et al.*, 2014).

A variação interespecífica na herbivoria em condições mais contrastantes de irradiância está relacionada às características de defesa química

Compostos metabólicos secundários são amplamente relacionados ao status de defesa da planta (Coley, 1988; Nykanen; Koricheva, 2004; War *et al.*, 2018). Apesar de muitos traços morfológicos constituírem importantes mecanismos de defesa de espécies florestais (Poorter *et al.*, 2004; Bixemam *et al.*, 2016; War *et al.*, 2018), nossos resultados evidenciam que, sob condições mais contrastantes de luz (baixa e alta irradiância), as defesas químicas têm papel fundamental na proteção contra herbívoros. Surpreendentemente, não observamos relações significativas entre a variação nas taxas de herbivoria e as características morfofisiológicas foliares em condição de irradiância intermediária.

A relação negativa entre a variação interespecífica nas taxas de herbivoria e teores de fenóis totais foi impulsionada pelos comportamentos contrastantes das espécies *B. excelsa* e *T. rosea*. *B. excelsa* foi a espécie com a maior concentração absoluta de fenóis, representada em grande parte por tanino, enquanto *T. rosea* investe na síntese de naftoquinonas. Em *T. rosea*, a possível competição desses dois compostos pelas rotas metabólicas do malato-acetato e shiquimato adicionam evidências para a discrepância nas concentrações de fenol observadas entre as duas espécies.

Dentre as razões biológicas para folhas com altos teores de taninos terem menor herbivoria, pode-se destacar a baixa digestibilidade desse composto (Ilan de Vau; Schultz, 1992; Summers *et al.*, 1994). Os compostos fenólicos são altamente reativos em pH alcalino, como acontece no intestino de insetos não tolerantes, resultando em efeitos citotóxicos após a ingestão desses compostos

(Barbehenn *et al.*, 2004). Além disso, a capacidade inerente de taninos precipitarem proteínas contribui para uma deficiente atividade bacteriana no estômago de alguns insetos (Scholfield *et al.*, 2001).

Outro fator que poderia explicar a alta quantidade de fenóis e taninos em *B. excelsa* é a baixa dinâmica foliar da espécie. Em geral, espécies não-pioneiras produzem folhas com maior tempo de vida, as quais são melhor estruturadas física e/ou quimicamente (Coley 1988; Lusk *et al.*, 2008). Devido à intensa dinâmica foliar em *T. rosea*, as folhas possuíam menos de três meses de idade no momento da amostragem, enquanto para *B. excelsa*, a maioria das folhas possuíam idade superior a seis meses e em alguns casos (principalmente em baixa irradiância) mais de um ano.

É necessário considerar que um complexo conjunto de fatores de sinalização, os quais podem envolver os CNE, podem atuar para a rápida resposta de produção de tanino para maioria das espécies. Desta forma, ainda que a maior produção de fenóis e taninos tenha ocorrido em condições de maior disponibilidade de irradiância, a presença desses metabólitos em plantas em baixas irradiâncias evidencia que a resposta ao estresse biótico não é limitada pela baixa disponibilidade de luz. Por outro lado, as espécies crescendo sob maior disponibilidade de luz têm maior capacidade de produção desses metabólitos, diminuindo a pressão seletiva dos herbívoros.

7. Conclusões

As respostas de herbivoria em relação aos níveis de irradiância diferem de acordo com o indicador utilizado. A taxa de herbivoria é o melhor preditor dos reais danos experimentados pelas espécies florestais durante o estabelecimento em condições contrastantes de irradiância. As espécies *B. excelsa* (baixa herbivoria) e *T. rosea* (alta herbivoria) representam dois extremos quanto à variação interespecífica na redução de área foliar.

Os efeitos da disponibilidade de irradiância sobre as características morfofisiológicas (AFE, esclerofilia, teores de amido e rafinose) difere entre as

espécies, embora sejam semelhantes para as concentrações foliares de sacarose, glicose e frutose.

As características químicas (teores totais de fenol e tanino) constituem os principais mecanismos de defesa relacionados à variação interespecífica nas taxas de herbivoria.

8. Referências

- Ali, J. G; Agrawal, A. A. Specialist versus generalist insect herbivores and plant defense. **Trends in plant science**, v. 17, n. 5, 2012. p. 293-302.
- Alvarado, A; Pancel, L; Köhl, M. Plant Nutrition in Tropical Forestry. **Tropical Forestry Handbook**, Springer, 2015. p. 1114-1182.
- Amaral, L. I. V. do *et al.* Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, v. 34, n. 4, 2007. p. 425-431.
- Andrew, N. R. *et al.* Insect herbivory along environmental gradients. **Open Journal of Ecology**, v. 2, n. 04, 2012. p. 202-213.
- Araújo, A; *et al.* Comparative measurements of carbon dioxide fluxes from two nearby towers in a central Amazonian rainforest: The Manaus LBA site. **Journal of Geophysical Research**, v. 107, 2002. p. 80-90.
- Arumugasamy, K. *et al.* Studies on some pharmacognostic profiles of *Swietenia macrophylla*. King. **Ancient science of life**, v. 24, n. 2, 2004. p. 97.
- Baraza, E. *et al.* Herbivory has a greater impact in shade than in sun: response of *Quercus pyrenaica* seedlings to multifactorial environmental variation. **NCR Canadá**, v. 82, 2004. p.357-364.
- Barbehenn, R. *et al.* Phenolic compounds in red oak and sugar maple leaves have prooxidant activities in the midgut fluids of *Malacosoma disstria* and *Orgyia leucostigma* caterpillars. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 5, 2005. p. 969-988.
- Barbosa-Filho, J. M. *et al.* Botanical study, phytochemistry and antimicrobial activity of *Tabebuia aurea*: with 1 table & 1 figure. **Phyton Buenos Aires**, v. 73, 2004. p. 221-228.
- Barrs; H. D; Weatherley, P. E. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 15, 1962. p. 413-428.
- Barton K. E; Koricheva, J. The ontogeny of plant defense and herbivory: characterizing general patterns using meta-analysis. **The American Naturalist**, v. 175, 2010. p. 481-493.
- Bixenmann, R. J. *et al.* High herbivore pressure favors constitutive over induced defense. **Ecology and evolution**, v. 6, n. 17, 2016. p. 6037-6049.
- Brezzi, M; *et al.* Tree diversity increases levels of herbivore damage in a subtropical forest canopy : evidence for dietary mixing by arthropods ?. **Journal of Plant ecology**, v. 10, 2017. p. 13–27.
- Blainski, A.; Lopes, G.; De Mello, J. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. **Molecules**, v. 18, n. 6, 2013. p. 6852-6865.

Bloor, J. M. G; Grubb, P. J. Growth and mortality in high and low light: trends among 15 shade-tolerant tropical rain forest tree species. **Journal of ecology**, v. 91, 2003. p. 77-85.

Campoe, O. C, *et al.* R. Atlantic forest tree species responses to silvicultural practices in a degraded pasture restoration plantation: From leaf physiology to survival and initial growth. **Forest Ecology and Management**, v. 313, 2014. p. 233-242.

Cardenas, R. E. *et al.* Plant traits predict inter-and intraspecific variation in susceptibility to herbivory in a hyperdiverse Neotropical rain forest tree community. **Journal of Ecology**, v. 102, n. 4, 2014. p. 939-952.

Chacon, P; Armesto, J. J. Do carbon-based defences reduce foliar damage ?, Habitat-related effects on tree seedling performance in a temperate rainforest of Chiloe. **Oecologia**, v. 146, 2006. p. 555–565.

Chauvel, A. Os latossolos amarelos, álicos, argilosos dentro dos ecossistemas das bacias experimentais do INPA e da região vizinha. **Acta Amazônica**, v. 12, 1982. p. 47-60.

Chauvin, K. M. *et al.* Decoupled dimensions of leaf economic and anti-herbivore defense strategies in a tropical canopy tree community. **Oecologia**, v. 186, n. 3, 2018. p. 765-782.

Chazdon, R. L. Second growth: The promise of tropical forest regeneration in an age of deforestation. **University of Chicago Press**, 2014.

Chen, Y. *et al.* Growth, physiological responses and secondary metabolite production in *Pinellia ternata* under different light intensities. **Pak. J. Bot.**, v. 49, 2017. p. 1709-1716.

Coley, P. D; Bryant, J. P; Chapin, S. Resource Availability and Plant Anti-herbivore Defense. **Science**, v. 230, 1985. p. 895-900.

Coley, P. D. Effects of plant growth rate and leaf leaftime on the amount and type of anti-herbivore defense. **Oecologia**, 1988. p. 531–536.

Coley, P. D; Barone, J. A. Herbivory and plant defenses in tropical forests. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, v. 27, 1996. p. 305-335.

Coley, P. D; Kursor, T. A. Anti-herbivore defenses of young tropical leaves: physiological constraints and ecological trade-offs. In: **Tropical forest plant ecophysiology**. Springer, Boston, MA, 1996. p. 305-336.

Crankshaw, D. R.; Langenheim, J. H. Variation in terpenes and phenolics through leaf development in *Hymenaea* and its possible significance to herbivory. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 9, n. 2-3, 1981. p. 115-124.

Da Silva, A. M. P. *et al.* Atividade biológica de naftoquinonas de espécies de Bignoniaceae. **Revista Fitos**, v. 7, n. 04, 2013. p. 207-215.

De Siqueira, D. S. *et al.* Determinação de compostos de massa molecular alta em folhas de plantas da Amazônia. **Química Nova**, v. 26, n. 5, 2003. p. 633-640.

De Veau, E. J. I.; Schultz, J. C. Reassessment of interaction between gut detergents and tannins in Lepidoptera and significance for gypsy moth larvae. **Journal of chemical ecology**, v. 18, n. 8, 1992. p. 1437-1453.

De Vries, J. *et al.* Ecological interactions shape the adaptive value of plant defence: Herbivore attack versus competition for light. **Functional Ecology**, v. 33, n. 1, 2019. p. 129-138.

Demoliner, F. *et al.* Sapucaia nut (*Lecythis pisonis* Cambess) and its by-products: A promising and underutilized source of bioactive compounds. Part II: Phenolic compounds profile. **Food Research International**, v. 112, 2018. p. 434-442.

Dudt, J. F.; Shure, D. J. The Influence of Light and Nutrients on Foliar Phenolics and Insect Herbivory. **Wiley on behalf of the Ecological Society of America Stable**, v. 75, 1994. p. 86–98.

Durai, M. V. *et al.* Qualitative and quantitative analysis of phytochemicals in crude extract of big-Leaf mahogany (*Swietenia macrophylla* King). **International Journal of Herbal Medicine**, v. 4, n. 6, 2016. p. 88-91.

Dussourd, D. E. Behavioral Sabotage of Plant Defenses by Insect Folivores, **Ann. Rev. Entomol.** 62 1, 2017. p.15-34.

Endara, M. J. *et al.* Coevolutionary arms race versus host defense chase in a tropical herbivore–plant system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 36, 2017. p. E7499-E7505

Epifano, F. *et al.* Lapachol and its congeners as anticancer agents: a review. **Phytochemistry reviews**, v. 13, n. 1, 2014. p. 37-49.

Fantini, A. C.; Siminski, A. Manejo de florestas secundárias da Mata Atlântica para produção de madeira: possível e desejável. **Revista Brasileira de Pós-Graduação**, 13, 2017. p. 673 – 698.

Ferreira, M. J. *et al.* Clonal variation in photosynthesis, foliar nutrient concentrations, and photosynthetic nutrient use efficiency in a Brazil nut *Bertholletia excelsa* plantation. **Forest Science**, v. 62, n. 3, 2016. p. 323-332.

Ferreira, P. G. *et al.* The antifungal activity of naphthoquinones: An integrative review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 1, 2018. p. 1187-1214.

Finegan, B. The management potential of neotropical secondary lowland rain forest. **Forest Ecology and Management**, 47, 1992. p.295-321.

Furtini Neto, *et al.* Fertilização em reflorestamento com espécies nativas. **Nutrição e fertilização florestal**, 2000. p. 352-383.

Glassmire, A. E. *et al.* Proximity to canopy mediates changes in the defensive chemistry and herbivore loads of an understory tropical shrub, *Piper kelleyi*. **Ecology letters**, v. 22, n. 2, 2019. p. 332-341.

Goodale, U. M. *et al.* Differences in survival and growth among tropical rain forest pioneer tree seedlings in relation to canopy openness and herbivory. **Biotropica**, v. 462, 2014. p. 183–193.

Guerra, . C; Becerra, J.; Gianoli, E. Explaining differential herbivory in sun and shade: the case of *Aristolelia chilensis* saplings. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 4, n. 4, 2010. p. 229-235.

Guimarães, Z. T. M. *et al.* Leaf traits explaining the growth of tree species planted in a Central Amazonian disturbed area. **Forest Ecology and Management**, v. 430, 2018. p. 618-628.

Hagerman, A.E. Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. **J. Chem. Ecol.** 133, 1987. p. 437-449.

Haslam, E. Plant polyphenols syn. vegetable tannins and chemical defense - a reappraisal. **Journal of Chemical Ecology**, v. 14 n. 10, 1988. p. 1789-1805.

He, P. *et al.* Leaf mechanical strength and photosynthetic capacity vary independently across 57 subtropical forest species with contrasting light requirements. **New Phytologist**, 2019.

Hook, I.; Mills, C.; Sheridan, H. Bioactive naphthoquinones from higher plants. In: **Studies in natural products chemistry**. Elsevier, 2014. p. 119-160.

Howe, G. A., Schaller, A. Direct defenses in plants and their induction by wounding and insect herbivores. In: **Schaller A. eds Induced Plant Resistance to Herbivory**, Springer, Dordrecht, 2008. p 7-29.

Ibanez, Sébastien *et al.* Plant functional traits reveal the relative contribution of habitat and food preferences to the diet of grasshoppers. **Oecologia**, v. 173, n. 4, 2013. p. 1459-1470.

Imai, T. *et al.* Heartwood extractives from the Amazonian trees *Dipteryx odorata*, *Hymenaea courbaril*, and *Astronium lecointei* and their antioxidant activities. **Journal of wood science**, v. 54, n. 6, p. 470-475, 2008.

Jácome, R. L. R. P. *et al.* Estudo químico de *Zeyheria montana* M.bolsa-de-pastor. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 1, p. 5-12, 2001.

Janzen, D. H. New horizons in the biology of plant defenses. In: **Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites - Chapter 8**, Academic Press, Inc. 1979. p. 331-350.

Jiménez-González, F. J.; Veloza, L. A.; Sepúlveda-Arias, J. C. Anti-infectious activity in plants of the genus *Tabebuia*. **Universitas Scientiarum**, v. 18, n. 3, 2013. p. 257-267.

- John, J. A.; Shahidi, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut *Bertholletia excelsa*. **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 3, 2010. p. 196-209.
- Johnson, M. J.; Bertrande, J. A.; Turcotte, M. M. Precision and accuracy in quantifying herbivory. **Ecological Entomology**. February, v. 411, 2016. p. 112-121.
- Kabera, J. N. *et al.* Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. **J Pharm Pharmacol**, v. 2, 2014. p. 377-392.
- Kito, K. *et al.* Isolation, functional characterization and stress responses of raffinose synthase genes in sugar beet. **Journal of plant biochemistry and biotechnology**, v. 27, n. 1, 2018. p. 36-45.
- Kozlov, M. V. *et al.* Global patterns in background losses of woody plant foliage to insects. **Global Ecology and Biogeography**, v. 24, n. 10, 2015. p. 1126-1135,
- Kozlov, M. V.; Zvereva, E. L. Background Insect Herbivory: Impacts, Patterns and Methodology, In: **Progress in Botany**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2017. p 1-43.
- Kraus, T. E. C.; Dahlgren, R. A.; Zasoski, R. J. Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems-a review. **Plant and Soil**, v. 256, n. 1, 2003. p. 41-66.
- Lamarre, G. P. A; *et al.* Herbivory, growth rates, and habitat specialization in tropical tree lineages: implications for Amazonian beta-diversity. **Ecological Society of America**, 938, 2012. p. 195–210.
- Liang, Y; Stehlik, I. Relationship between shade and herbivory in *Asarum canadense* (Wild Ginger). **Journal of Undergraduate Life Science**, v. 3 n. 1, 2009. p. 30–32.
- López-Carretero, A. *et al.* Influence of plant resistance traits in selectiveness and species strength in a tropical plant-herbivore network. **American journal of botany**, v. 103, n. 8, 2016. p. 1436-1448.
- Luizão, R. C. *et al.* Variation of carbon and nitrogen cycling processes along a topographic gradient in a central Amazonian forest. **Global Change Biology**, v. 10, 2004. p. 592-600.
- Loedolff, B.. Functional roles of raffinose family oligosaccharides: Arabidopsis case studies in seed physiology, biotic stress and novel carbohydrate engineering. 2015. (**Tese de Doutorado**). Stellenbosch: Stellenbosch University.
- Lusk, C. H. *et al.* Ontogenetic variation in light requirements of juvenile rainforest evergreens. **Functional Ecology**, v. 22, n. 3, 2008. p. 454-459.
- Machado, B. B. *et al.* BioLeaf: A professional mobile application to measure foliar damage caused by insect herbivory. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 129, 2016. p. 44-55.

- Mađerek, E. *et al.* Light as a regulator of structural and chemical leaf defenses against insects in two *Prunus* species. **Acta oecologica**, v. 85, 2017. p. 18-24.
- Martínez-Vilalta, J. *et al.* Dynamics of non-structural carbohydrates in terrestrial plants: a global synthesis. **Ecological Monographs**, v. 86, n. 4, 2016. p. 495-516.
- Massad, T. J.; *et al.* Restoration of Pasture to Forest in Brazil's Mata Atlântica: The Roles of Herbivory, Seedling Defenses, and Plot Design in Reforestation. **Restoration Ecology**, v. 19 n. 201, 2011. p. 257–267.
- Mithöfer, .; Boland, W. Plant defense against herbivores: chemical aspects. **Annual review of plant biology**, v. 63, 2012 p. 431-450.
- Núñez-Farfán, J.; Fornoni, J.; Valverde, P. L. The evolution of resistance and tolerance to herbivores. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, v. 38, 2007. p. 541-566.
- Nykänen, H.; Koricheva, J.. Damage-induced changes in woody plants and their effects on insect herbivore performance: a meta-analysis. **Oikos**, v. 104, n. 2, 2004. p. 247-268.
- Oliveira, . G. da S. *et al.* Phytochemical screening, Sun Protection Factor (SPF) and sugar analysis of jatobá fruits (*Hymenaea martiana* Hayne: A native medicinal plant from the San Francisco Valley. **Food Science and Technology**, n. AHEAD, 2019.
- Osunkoya, O. O. *et al.* Influence of seed size and seedling ecological attributes on shade-tolerance of rain-forest tree species in northern Queensland. **Journal of Ecology**, 1994. p. 149-163.
- Paul, G. S. *et al.* Foliar herbivory and leaf traits of five native tree species in a young plantation of Central Panama. **New Forests**, v. 43, n. 1, 2012. p. 69-87,
- Pérez-Harguindeguy, N. *et al.* New handbook for stand-ardised measurement of plant functional traits worldwide. **Australian Journal of Botany**, v. 61, 2013. p. 167-234.
- Plath, M; *et al.* Establishment of native tropical timber trees in monoculture and mixed-species plantations: small-scale effects on tree performance and insect herbivory. **Forest Ecology and Management**, v. 261, n. 3, 2011. p. 741-750.
- Piper, F. I.; Altmann, S. H; Lusk, C. H. Global patterns of insect herbivory in gap and understorey environments, and their implications for woody plant carbon storage. **Oikos**, v. 127, n. 4, 2018. p. 483-496,
- Poorter, L. Growth responses of 15 rain-forest tree species to a light gradient: the relative importance of morphological and physiological traits. **Functional Ecology**. v. 13, 1999. p. 396-410.
- Poorter, L. *et al.* Leaf Traits and Herbivory Rates of Tropical Tree Species Differing in Successional Status Leaf Traits and Herbivory Rates of Tropical Tree Species Differing in Successional Status. **Plant Biology**, December. v. 6, n. 1, 2004. p. 746-754.

Poorter, L.; Arets, E. J. M. M. Light environment and tree strategies in a Bolivian tropical moist forest: an evaluation of the light partitioning hypothesis. **Plant Ecology**, v. 166, n. 2, 2003. p. 295-306.

Poorter, L.; Bongers, F. Leaf traits are good predictors of plant performance across 53 rain forest species. **Ecology**, v. 87, 2006. p. 1733-1743.

Poorter, L. *et al.* Resprouting as a persistence strategy of tropical forest trees: relations with carbohydrate storage and shade tolerance. **Ecology**, v. 91, n. 9, 2010. p. 2613-2627.

Poorter, H. *et al.* A meta-analysis of plant responses to light intensity for 70 traits ranging from molecules to whole plant performance. **New Phytologist**, 2019.

Pontes Ribeiro, S.; Basset, Y. Gall-forming and free-feeding herbivory along vertical gradients in a lowland tropical rainforest: the importance of leaf sclerophylly. **Ecography**, v. 30, n. 5, 2007. p. 663-672.

Resende, A. V.; Furtini Neto, A. E.; Curi, N. Mineral nutrition and fertilization of native tree species in Brazil: research progress and suggestions for management. **Journal of Sustainable Forestry**, v. 20, 2005. p. 45-81.

Rizzini, C. T. Tratado de fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos. **Editora de Humanismo, Ciência e Tecnologia**, 1976.

Richards, L. A; Coley, P. D. Seasonal and habitat differences affect the impact of food and predation on herbivores: A comparison between gaps and understory of a tropical forest, **Oikos**, v. 116, n. 1, 2007. p. 31-40.

Ruhnke, H; *et al.* Variability in leaf traits, insect herbivory and herbivore performance within and among individuals of four broad-leaved tree species. **Basic and Applied Ecology**, v. 10, n. 8, 2009. p. 726-736.

Salgado-Luarte, C. and Gianoli, E. Shade tolerance and herbivory are associated with RGR of tree species via different functional traits, **Plant Biology**, v. 19, n. 3, 2017. p. 413-419.

Schuman, M. C; Baldwin, I. T. The layers of plant responses to insect herbivores. **Annual review of entomology**, v. 61, 2016. p. 373-394.

Sengupta, S., *et al.* Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. **Frontiers in plant science**, v. 6, 2015.

Sieniawska, E; Baj, T. Tannins. In: **Pharmacognosy**. Academic Press, 2017. p. 199-232.

Silva, J. O.; Espírito-Santo, M. M.; Melo, G. A. Herbivory on *Handroanthus ochraceus* (Bignoniaceae) along a successional gradient in a tropical dry forest. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 6, n. 1, 2012. p. 45-57.

Silva, J. O; Espírito-Santo, Mário M.; Morais, H. C. Leaf traits and herbivory on deciduous and evergreen trees in a tropical dry forest. **Basic and applied ecology**, v. 16, n. 3, 2015. p. 210-219.

Silva, J. O. *et al.* Seasonal and diel variations in the activity of canopy insect herbivores differ between deciduous and evergreen plant species in a tropical dry forest. **Journal of insect conservation**, v. 21, n. 4, 2017. p. 667-676.

Souza, A. de *et al.* Diurnal variations of non-structural carbohydrates in vegetative tissues of *Melinis minutiflora*, *Echinolaena inflexa* and *Lolium multiflorum* (Poaceae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 28, n. 4, 2005. p. 755-763.

Strauss, S. Y, Agrawal, A. A. The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 145, 1999. p. 179–185.

Summers, C. B; Felton, G. W. Prooxidant effects of phenolic acids on the generalist herbivore *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: *Noctuidae*: potential mode of action for phenolic compounds in plant anti-herbivore chemistry. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 24, n. 9, 1994. p. 943-953.

Swaine, M. D.; Whitmore, T. C. On the definition of ecological species groups in tropical rain forests. **Vegetatio**, v. 75, 1988. p. 81-86.

Swain, T. Secondary compounds as protective agents, **Ann. Rev. Plant Physiol.** v. 28, 1977. p. 479-501.

Taiz, L. *et al.* Fisiologia e desenvolvimento vegetal. **Artmed Editora**, 2017.

Tauchen, J. *et al.* Phenolic composition, antioxidant and anti-proliferative activities of edible and medicinal plants from the Peruvian Amazon. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 6, 2016. p. 728-737.

Tiffin, P. Mechanisms of tolerance to herbivore damage: what do we know?. **Evolutionary Ecology**, v. 14, n. 4-6, 2000. p. 523-536.

Tobias, Z. and Agrawal, A. A. Trade-offs between plant growth and defense against insect herbivory: an emerging mechanistic synthesis, **Ann. Rev. Plant Biol.**, v. 68, 2017. p. 513-534.

Vasconcelos, H. L. Levels of leaf herbivory in Amazonian trees from different stages in forest regeneration. **Acta Amazônica**, v. 29, n. 4, 1999. p. 615-623.

Veggi, P. C. *et al.* Obtaining phenolic compounds from jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) bark by supercritical fluid extraction. **The Journal of supercritical fluids**, v. 89, 2014. p. 68-77.

Violle, C. *et al.* Let the concept of trait be functional!. **Oikos**, v. 116, 2007. p. 882-892.

Waterman, P. G; Mole, S. Analysis of phenolic plant metabolites. **Oxford: Blackwell Scientific**, 1994.

Yoneyama, A.; Ichie, T. Relationship between leaf flushing phenology and defensive traits of canopy trees of five dipterocarp species in a tropical rain forest. **Tropics**, v. 27, n. 4, 2019. p. 67-79.

War, A. R. *et al.* Plant defence against herbivory and insect adaptations. **AoB Plants**, v. 10, n. 4, 2018. p. ply037.

Zhang, S.; Zhang, Y.; MA, K. The association of leaf lifespan and background insect herbivory at the interspecific level. **Ecology**, v. 98, n. 2, 2017. p. 425-432.