

PROJETO TEMÁTICO FAPESP/NSF (National Science Foundation)

Dimensões US-Biota São Paulo: Diversidades de interações multitróficas quimicamente mediadas em gradientes nos trópicos

Período: 2015 a 2017

Coordenadores: Massuo Jorge Kato e André Victor Lucci Freitas

Licença Sisbio : 15780-6

1. Equipe

A) Universidade de São Paulo-Instituto de Química

Coordenador – Massuo Jorge Kato

Pós-doutorandos – Lydia Fumiko Yamaguchi

Mariana Alves Stanton

Dimitre Alexandrov Ivanov

Doutorando – Andrés Camilo Guerrero Perilla

B) Universidade Estadual de Campinas – Departamento de Zoologia

Coordenador – André Victor Lucci de Freitas

Pós-doutorandos – Simeão de Souza Moraes

André Rangel do Nascimento

Técnica – Patrícia Avelino Machado

2. Introdução

As bases da compreensão da biodiversidade no planeta podem ser explicadas através das interações entre diferentes níveis tróficos nos trópicos (Dyer et al., 2004; Thompson 1997; Janzen 1974). Diferentes interações afetam desde de fatores basais à dinâmica de populações dentro de um ecossistema (Ollerton et al., 2004). Dessa forma, modelos de ecossistemas que ilustrem a plethora de interações entre diferentes organismos seria de extremo interesse para o esclarecimento do processo de diversificação. A relação de especificidade entre espécies é um tema bastante controverso, principalmente, devido à grande dificuldade em determinar os mecanismos nos quais os herbívoros conseguem lidar com os inúmeros metabólitos secundários potencialmente tóxicos presentes nas plantas (Wouters et al., 2016). Em geral, durante o processo de digestão, estes compostos podem ser convertidos em derivados mais polares. Reações de glicosilação de compostos fenólicos são bem conhecidas (Ahn et al., 2011). Em outros casos, a hidroxilação de posições específicas, O-desmetilação de um éter aromático, oxidações e quebras de ligações carbono-carbono são também muito conhecidos, porém, o significado fisiológico destas modificações ainda não foi esclarecido (Ramos e Kato, 2013; Ramos et al., 2008).

Os gêneros *Piper* e *Peperomia* são da família Piperaceae com o maior número de espécies com ocorrência pantropical e vem sendo estudado pelo grupo como um modelo para estudos de ecologia tropical e evolução (Dyer et al., 2004; Jeffrey et al., 2014). A fitoquímica da família Piperaceae é rica, apresenta inúmeras classes de metabólitos, como lignanas, neolignanas, cromenos, amidas, fenilpropanoides, flavonoides, dentre outros. Um dos modelos entre plantas e herbívoros para o estudo da intrincada rede de interações entre estes organismos é a relação entre plantas do gênero *Piper*, e seus herbívoros especialistas *Eois* spp. (Lepidoptera, Geometridae) (Dyer et al., 2004; Strutzenberger et al., 2010).

Lepidopteras do gênero *Eois* Hübner (Geometridae: Larentiinae) compreende 245 espécies válidas, das quais 217 são descritas para a região Neotropical, sendo 31 delas com localidade tipo no Brasil. Pelo fato de ser um

gênero rico em espécies que nunca foi revisado, além de contar com potenciais espécies novas e crípticas, este gênero está inserido em um cenário taxonômico problemático. Além disso, a relação de interação, no que tange o sequestro de metabólitos secundários, compostos voláteis de atração, e possíveis relações de coevolução, com a sua planta hospedeira (Piperaceae), é totalmente desconhecida.

Dessa forma, o objetivo geral do projeto seria o estudo da interação tritrófica entre plantas da família Piperacea, seus herbívoros e parasitoides destes.

Assim, como objetivos mais específicos temos:

- levantamento de espécies de Piperaceas em diversos biomas utilizando-se ferramentas morfológicas e moleculares, além do estudo da composição de metabólitos secundários das mesmas.

- levantamento de espécies dos herbívoros especialistas e generalistas nas mesmas localidades por observação.

- coleta de imaturos do gênero *Eois* (especialista) para acompanhamento do desenvolvimento e também de adultos para o estudo taxonômico.

- estudo da interação entre hospedeiro e herbívoro, coletando-se compostos voláteis da planta hospedeira "*in situ*" na presença ou ausência de herbívoros e análise destes por metodologias analíticas adequadas.

3 - Materias e Métodos

3.1. Locais de coleta

As coletas até este ponto do projeto foram realizadas nas seguintes áreas.

Localidade	Município - Estado
Parque Estadual de Intervales	Ribeirão Grande - SP
Parque Municipal da Serra do Japi	Jundiaí - SP
Parque Municipal de Mogi Guaçú	Mogi Guaçú - SP

3.2. Coleta de material vegetal

Aproximadamente, 20 a 100 g de diferentes órgãos de plantas da família Piperaceae foram coletadas para o estudo do perfil químico. Essas amostras foram secas em estufa e extraídas com MeOH, o extrato bruto resultante foram analisadas por métodos espectroscópico e espectrométricos. Amostras de 3 folhas jovens também foram coletadas para o estudo filogenético e exsiccatas de cada planta também foram confeccionadas e depositadas no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro e Herbário da Universidade de São Paulo. As identificações morfológicas foram realizadas pela Profa. Elsie Franklin Guimarães (IHJBRJ) e Prof. Eric Tepe (Herbário de Cincinnati, EUA).

3.3. Observação de herbivoria

Plantas do gênero *Piper* foram observadas e seus herbívoros (lepidópteras, coleópteras e orthopteras) foram contabilizados, além da área foliar atacada.

*3.4. Coleta de herbívoros especialistas, *Eois spp**

Os adultos foram coletados com armadilha luminosa. As lagartas foram coletadas manualmente até 10 indivíduos por planta e mantidas em suas plantas hospedeiras até o seu desenvolvimento no estágio adulto. Os adultos foram identificados morfológicamente pelo Dr. Simeão de Souza Moraes e o estudo filogenético foi realizado com a extração de três patas logo após a coleta. O seu DNA genômico total foi extraído com a utilização de kits comerciais. A amplificação do gene mitocondrial do citocromo oxidase subunidade I foi realizada utilizando-se iniciadores adequados.

4. Resultados

No Parque Nacional de Itatiaia foram coletadas 24 espécies de plantas do gênero *Piper* e uma do gênero *Manekia*. Dentre essas, 17 foram identificadas (Tabela 1). O perfil químico e a filogenia molecular de todas as espécies coletadas em diferentes localidades (cerca de 200 espécies) estão sendo compiladas em um artigo intitulado “ Phylogenetic studies of *Piper* and *Peperomia*: distribution of secondary metabolites”.

As lagartas foram coletadas de diferentes espécies de *Piper* e os imaturos foram mantidas até a eclosão dos adultos (2 semanas). Os adultos coletados em armadilhas de luz e a partir de imaturos foram montados para serem depositados no Museu de Zoologia da Unicamp. Dentre as coletas feitas em diferentes localidades 09 espécies foram identificadas no Parque Nacional de Itatiaia (Anexo 1, Figuras 1 a 32). Todas os indivíduos coletados estão sendo analisados também em relação à sua filogenia molecular.

A presença de parasitoides nas lagartas de *Eois* representaram 6 % de todas as coletas realizadas, porém, um montante grande das lagartas acabou morrendo, principalmente no estágio de pupa (Figura 1). Esse problema foi contornado, observando-se que o estágio de pupa se completa no solo, assim, foi adicionado terra ao pote de criação no último instar da lagarta e ao empupar na terra tivemos mais de 70 % de eclosão dos adultos.

Tabela 1: Coleta de Piperaceae realizada no Parque Nacional de Itatiaia.

código	data	mês	ano	família	gênero	espécie	autor 1				posição geográfica									
K 1939	24	III	2014	Piperaceae	Manekia	obtusa	(Miq.) T.Arias, Callejas & Bornst.				22	26	21	S	44	36	40	W	950	m
K 1941	24	III	2014	Piperaceae	Piper	amplum	Kunth				22	26	56	S	44	36	31	W	900	m
K 1942	24	III	2014	Piperaceae	Piper	mollicomum	Kunth				22	26	21	S	44	36	34	W	1000	m
K 1943	24	III	2014	Piperaceae	Piper	solmsianum	C.DC.				22	26	22	S	44	36	40	W	1000	m
K 1944	24	III	2014	Piperaceae	Piper	lagoaense	C.DC.				22	26	21	S	44	36	34	W	1000	m
K 1945	24	III	2014	Piperaceae	Piper	sp					22	26	21	S	44	36	34	W	1000	m
K 1946	24	III	2014	Piperaceae	Piper	schcnckii	C.DC.				22	26	20	S	44	36	35	W	1000	m
K 1947	24	III	2014	Piperaceae	Piper	tectoniifolium	Kunth				22	27	02	S	44	36	42	W	850	m
K 1948	24	III	2014	Piperaceae	Piper	sp.					22	26	20	S	44	36	35	W	1000	m
K 1949	24	III	2014	Piperaceae	Piper	gaudichaudianum	Kunth				22	27	04	S	44	36	49	W	800	m
K 1950	24	III	2014	Piperaceae	Piper	truncatum	Vell.				22	27	02	S	44	36	38	W	800	m
K 1951	24	III	2014	Piperaceae	Piper	cubataonum	C.DC.				22	27	02	S	44	36	42	W	800	m
K 1952	24	III	2014	Piperaceae	Piper	cernuum	Vell.				22	27	01	S	44	36	40	W	800	m
K 1953	24	III	2014	Piperaceae	Piper	arboreum	Aubl.				22	27	01	S	44	36	42	W	800	m
K 1954	24	III	2014	Piperaceae	Piper	crassinervium	Kunth				22	26	59	S	44	36	30	W	800	m
K 1955	24	III	2014	Piperaceae	Piper	translucens	Yunck.				22	26	21	S	44	36	34	W	1000	m
K 1956	24	III	2014	Piperaceae	Piper	sp					22	26	22	S	44	36	40	W	1000	m
K 1957	24	III	2014	Piperaceae	Piper	sp					22	26	53	S	44	36	30	W	850	m
K 1958	25	III	2014	Piperaceae	Piper	sp					22	27	40	S	44	36	15	W	650	m
K 1960	25	III	2014	Piperaceae	Piper	chimonanthifolium	Kunth				22	27	38	S	44	36	16	W	775	m
K 1961	25	III	2014	Piperaceae	Piper	richardiifolium	Kunth				22	27	41	S	44	36	22	W	650	m
K 1962	25	III	2014	Piperaceae	Piper	amplum	Kunth				22	27	41	S	44	36	22	W	650	m
K 1966	25	III	2014	Piperaceae	Piper	sp					22	27	33	S	44	36	19	W	650	m
K 1970	26	III	2014	Piperaceae	Piper	sp					22	25	36	S	44	37	05	W	1200	m
K 1971	26	III	2014	Piperaceae	Piper	pseudopothifolium	C.DC.				22	27	41	S	44	36	22	W	1200	m
K 1972	26	III	2014	Piperaceae	Piper	arboreum	Aubl.	var.	hirtellum	Yunck.	22	27	41	S	44	36	22	W	700	m

Observou-se também um predomínio da espécie *Eois tegularia* (16 % de ocorrência) dentre as espécies que se alimentam das espécies de *Piper* (Figura 1).

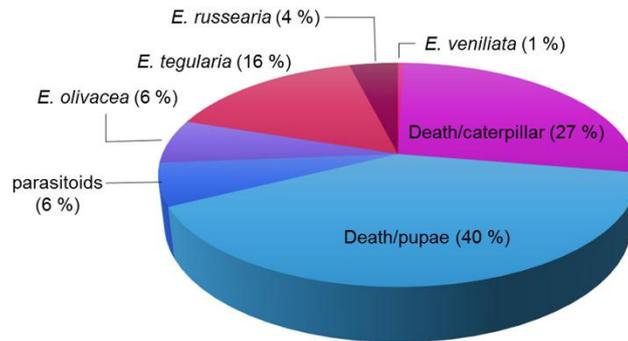


Figura 1. Distribuição das espécies de *Eois* coletados alimentando-se de espécies de *Piper* e presença de parasitoides nas lagartas.

Considerando-se o total das coletas foram observadas maiores incidências de lagartas do gênero *Eois* foram nas espécies de *Piper gaudichaudianum* e *P. malacophyllum* (Figura 2).

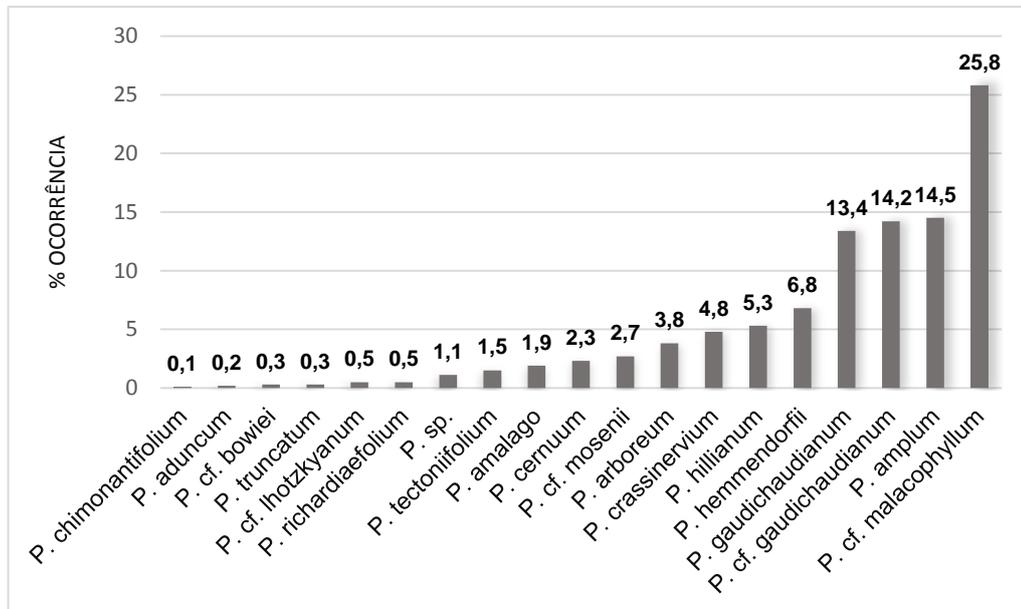


Figura 2. Distribuição de *Eois* por espécie de *Piper*.

5. Próximas etapas

As próximas etapas englobam o aprofundamento do estudo de interação entre as lagartas de *Eois* e as plantas de *Piper*, no qual, os compostos voláteis serão coletados "in situ" de plantas sem herbivoria e na presença de herbívoros com o intuito de avaliar variações nos padrões de voláteis e traçar uma possível resposta da planta em relação à herbivoria. Para tal, objetiva-se no campo, escolher espécies de *Piper* com herbivoria por *Eois*, englobar com um saco plástico a folha atacada na presença de um tubo de silicone (5 mm) recoberta com polímero PDMS que possibilita a captura de compostos voláteis de forma estática (Kallenbach et al, 2014). Os tubos serão mantidos por 48 horas, recolhidos e levados ao laboratório para análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Folhas controle sem ataque de herbívoros também serão coletados e replicadas por espécie de planta também serão realizados.

6. Referências

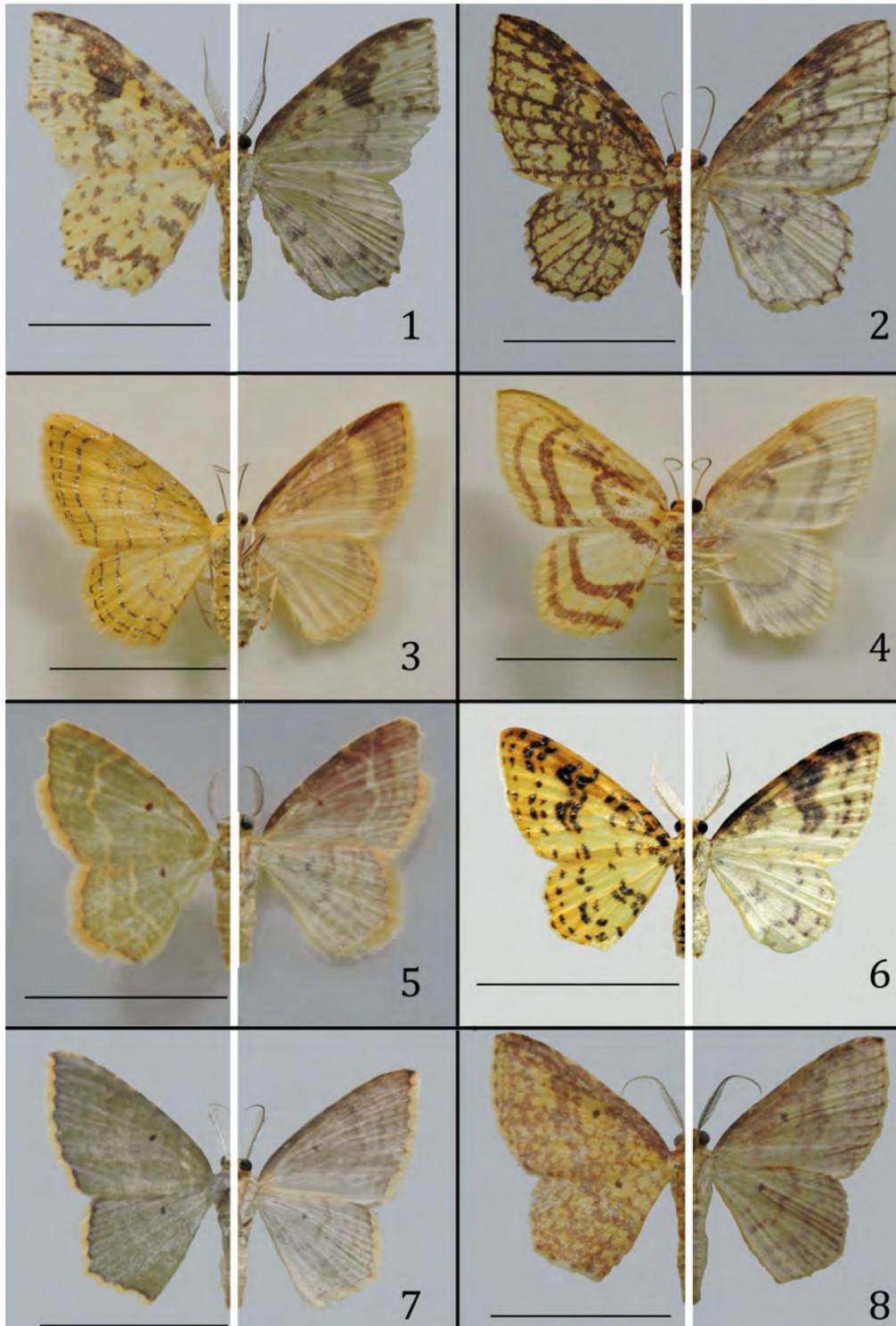
- Ahn S. J., Badenes-Perez F. R., Reichelt M., Svatos A., Schneider B., Gershenzon J., Heckel D. G. (2011) Metabolic detoxification of capsaicin by udp-glycosyltransferase in three *Helicoverpa* species. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 78,104-118.
- Dyer, L. A., Richard, J., Dodson, C. D., (2004) Isolation, synthesis, and evolutionary ecology of *Piper* amides. In: Dyer, L. A., Palmer, A. N. (Eds.), *Piper: A model genus for studies of evolution, chemical ecology, and trophic interactions*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 117-139.
- Janzen, D. H. (1974) The deflowering of Central America. *Nat. History*, 83, 49-53.
- Jeffrey, C. S., Leonard, M. D., Glassmire, A. E., Dodson, C. D., Richards, L. A., Kato, M. J., Dyer, L. A. (2014) Anti-herbivore prenylated benzoic acid derivatives from *Piper kelleyi*. *J. Nat. Prod.*, 77, 148-153.

- Kallenbach, M., Veit, D., Eilers, E.J. and Schuman, M.C. 2015. Application of Silicone Tubing for Robust, Simple, High-throughput, and Time-resolved Analysis of Plant Volatiles in Field Experiments. *Bio-protocol*, 5: 1–8.
- Ollerton, J., Cranmer, L. (2004) Latitudinal trends in plant pollinator interaction: are tropical plants more specialized? *Oikos*, 104, 629-629.
- Ramos, C. S., Kato, M. J. (2013) Metabolism of neolignans from *P. regnellii* (Piperaceae) in the beetle *Naupactus bipes* (Coleoptera: Curculionidae). *Chemoecology*, 23,143-148.
- Ramos, C. S., Vanin,, S. A., Kato, M. J. (2008) Metabolism of (-)-grandisin from *Piper solmsianum* in Coleoptera and Lepidoptera species. *Phytochemistry*, 69, 2157-2161.
- Strutzenberger, P., Brehm, G., Bodner, F., Fiedler, K. (2010) Molecular phylogeny of *Eois* (Lepidoptera, Geometridae): evolution of wing patterns and host plant use in a species-rich group of Neotropical moths. *Zool. Scr.*, 39, 603-620.
- Thompson, J. N. (1997) Conserving interaction biodiversity p. 285-293. In S.T.A. Pickett, R.S. Ostefeld, M. Shachak, G.E. Likens (Eds.). *The ecological basis of conservation: heterogeneity, ecosystems, and biodiversity*. Chapman & Hall, New York, USA.
- Wouters, F. C., Blanchette, B., Gershenzon, J., Vassao, D. G. (2016) Plant defense and herbivore counter-defense: benzoxazinoids and insect herbivores. *Phytochem. Reviews*, 15,1127-1151.

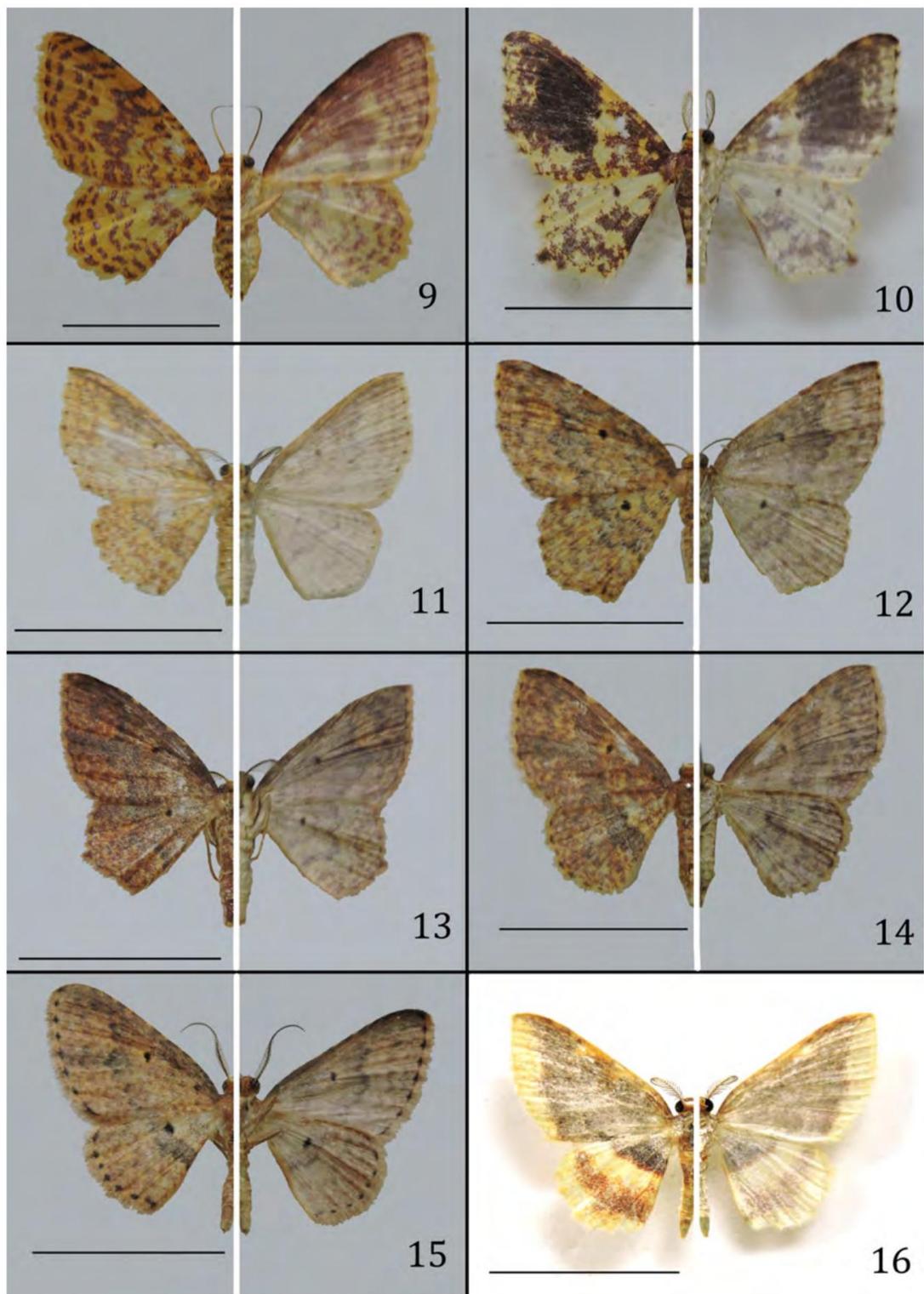
7. Outras atividades

O artigo “Similarity in volatile communities leads to increased herbivory and greater tropical forest diversity”, Massad, Tara; Martins de Moraes, Marcilio; Philbin, Casey; Oliveira Jr., Celso; Cebrian Torrejon, Gerardo; Fumiko Yamaguchi, Lydia; Jeffrey, Christopher; Dyer, Lee; Richards, Lora; Kato, Massuo, foi aceito para publicação no jornal *Ecology* (Anexo 2).

Anexo 1



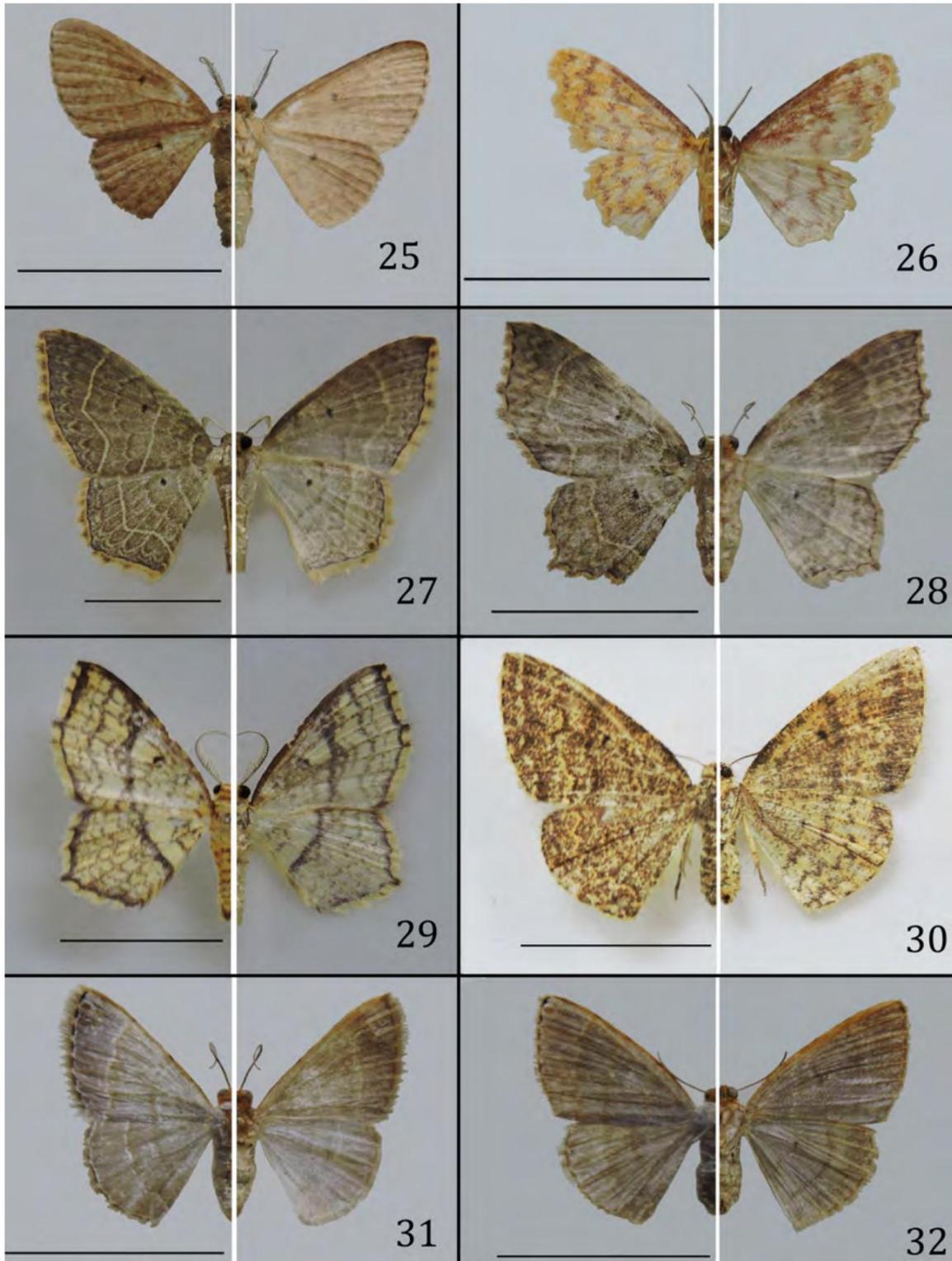
Figuras 1-8. Representantes do gênero *Eois* Hübner, lado esquerdo vista dorsal, lado direito vista ventral. 1. *E. veniliata* (Walker, 1861), Teresópolis-RJ. 2. *E. cancellata* Warren, 1906, Itatiaia-RJ. 3. *E. lucivittata brasiliensis* Prout 1933, Salesópolis-SP. 4. *E. isographata* (Walker, 1863), Salesópolis-SP. 5. *E. olivacea* (Felder & Rogenhoferr, 1875), Jundiá-SP. 6. *E. paulona* (Schaus, 1927), Itatiaia-SP. 7. *E. hyperythraia* (Genée, 1858), Itatiaia-SP. 8. *E. tegularia* (Genée, 1857), Teresópolis-RJ. Escala 1 cm.



Figuras 9-16. Representantes do gênero *Eois* Hübner, lado esquerdo vista dorsal, lado direito vista ventral. 9. *E. azafanata* (Dognin, 1893), Itatiaia-RJ. 10. *E. sp. nr. burla* (Dognin, 1899), Itatiaia-RJ. 11. *E. sp. nr. commixta* (Warren, 1904), Ribeirão Grande-SP. 12. *E. sp. nr. basaliata* (Warren, 1907), Itatiaia-RJ. 13. *E. sp. nr. basaliata* (Warren, 1907), Itatiaia-RJ. 14. *E. sp. nr. fucosa* (Dognin, 1912), Ribeirão Grande-SP. 15. *E. signaria* (Schaus, 1901), Itatiaia-RJ. 16. *E. sp. nr. amarillada* (Dognin, 1893), Teresópolis-RJ. Escala 1 cm.



Figuras 17-24. Representantes do gênero *Eois* Hübner, lado esquerdo vista dorsal, lado direito vista ventral. 17. *E. contracta* (Walker, 1861), Manaus-AM. 18. *E. russearia* Hübner, 1818, Mogi das Cruzes-SP. 19. *Eois sp. nov.1*, Salesópolis-SP. 20. *Eois sp. nov.2*, Salesópolis-SP. 21. *E. sp. nr. russearia*, Mogi das Cruzes-SP. 22. *E. sp. nr. lilacea* Prout, 1933, Ribeirão Grande-SP. 23. *E. sp. nr. lilacea* Prout, 1933, Ribeirão Grande-SP. 24. *E. sp. nr. flavotaeniata* (Warren, 1895), Itatiaia-RJ. Escala 1 cm.



Figuras 25-32. Representantes associados ao gênero *Eois* Hübner, lado esquerdo vista dorsal, lado direito vista ventral. 25. *E. sp. nr. inconspicua* (Warren, 1907), Ribeirão Grande-SP. 26. *Eois sp3*, Jundiá-SP. 27. *E. sp. nr. carnana aberrans* Prout, 1922, Itatiaia-RJ. 28. *E. sp. nr. carnana aberrans* Prout, 1922, Itatiaia-RJ. 29. *E. sp. nr. concatenata* (Prout, 1910), Itatiaia-RJ. 30. *Eois sp4*, Itatiaia,RJ. 31. *Eois sp5*, Ribeirão Grande-SP. 32. *Eois sp.6*, Ribeirão Grande-SP. Escala 1 cm.

