

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E
CONSERVAÇÃO DE RECURSOS NATURAIS

Efeitos da herbivoria e condições ambientais sobre a instabilidade no desenvolvimento e resposta vegetativa em *Tithonia diversifolia* (Asteraceae)

Henrique Venâncio Silva

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E
CONSERVAÇÃO DE RECURSOS NATURAIS

Efeitos da herbivoria e condições ambientais sobre a instabilidade no desenvolvimento e resposta vegetativa em *Tithonia diversifolia* (Asteraceae)

Henrique Venâncio Silva

Orientador: Jean Carlos Santos
Co-orientadora: Tatiana Garabini Cornelissen

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) como requisito para a obtenção do título de mestre em Ecologia e Conservação dos Recursos Naturais.

Uberlândia, MG
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S586e Silva, Henrique Venâncio, 1991
2017 Efeitos da herbivoria e condições ambientais sobre a instabilidade no desenvolvimento e resposta vegetativa em *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) / Henrique Venâncio Silva. - 2017.
102 f. : il.

Orientador: Jean Carlos Santos.

Coorientadora: Tatiana Garabini Cornelissen.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais.

Inclui bibliografia.

1. Ecologia - Teses. 2. Variação (Biologia) - Teses. 3. Plantas - Fertilização - Teses. 4. - Teses. I. Santos, Jean Carlos. II. Cornelissen, Tatiana Garabini. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais. IV. Título.

CDU: 574

Henrique Venâncio Silva

EFEITOS DA HERBIVORIA E CONDIÇÕES AMBIENTAIS SOBRE A
INSTABILIDADE NO DESENVOLVIMENTO E RESPOSTA
VEGETATIVA EM *Tithonia Diversifolia* (ASTERACEAE)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Federal de Uberlândia (UFU) como
requisito para a obtenção do título de mestre em
Ecologia e Conservação dos Recursos Naturais.

em 22 de fevereiro de 2017

Prof. Dr Marco Antônio Alves Carneiro – UFOP

Prof^a Dr^a Vanessa Stefani Sul Moreira – UFU

Prof. Dr Jean Carlos Santos (Orientador) – UFU

Uberlândia
Fevereiro - 2017

“Passo a passo se atravessa uma estrada de mil quilômetros.”

Miyamoto Musashi

Agradecimentos

À minha família por todo o apoio que foi necessário durante estes anos da minha formação acadêmica;

à minha segunda família, o pessoal do LEEBIO (em geral) que também me ajudaram em diversos assuntos dentro e fora do meio acadêmico;

aos meus amigos do curso de Ciências Biológicas da UFU;

ao meu orientador Jean Carlos Santos, que desde 2011 vem me ajudando a aprimorar mais no meio acadêmico e na vida;

à Tatiana Garabini Cornelissen que, além de ajudar nas etapas do manuscrito, também me possibilitou aprender bastante sobre Assimetria Flutuante em outros projetos.

ao Estevão Alves Silva, que também vêm me ajudando em conquistas no meio acadêmico desde os tempos de graduação;

ao Marco Antônio Alves Carneiro (Marcão), Vanessa Stefani Sul Moreira e Wanessa Rejane de Almeida por ajudarem a melhorar a qualidade dessa dissertação;

aos colegas e amigos da turma de Mestrado de Ecologia da UFU;

aos técnicos do INBIO, professores e colegas da Ecologia que ajudaram bastante durante esses anos de mestrado;

à CAPES, FAU-UFU e DURATEX pelo apoio financeiro durante todos esses anos;

enfim, à todos que me ajudaram dentro do mestrado em Ecologia.

Muito obrigado!

Sumário

Resumo.....	iii
Abstract	v
Introdução Geral.....	1
Referências bibliográficas.....	7
Capítulo 1.....	11
1. Introduction.....	15
2. Material and methods	17
3. Results	24
5. Conclusion	28
6. References	29
7. Tables	37
8. Figures	39
Capítulo 2.....	44
1. Introdução	47
2. Material e Métodos	53
3. Resultados.....	63
4. Discussão	67
5. Conclusão	74
6. Referências bibliográficas	75
7. Tabelas.....	87
8. Figuras	95
Conclusão Geral	101

Resumo

Venâncio, H. 2017. Efeitos da herbivoria e condições ambientais sobre a instabilidade no desenvolvimento e resposta vegetativa em *Tithonia diversifolia* (Asteraceae). Dissertação de Mestrado em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais. UFU. Uberlândia-MG. 102p.

Herbivoria, competição edáfica e sombreamento podem induzir variação fenotípica, diminuir o desempenho e aumentar os níveis de assimetria flutuante (AF, um medidor de estresse) em plantas invasoras. A associação desses pode incrementar mais a AF, além de prejudicar mais severamente ou atrapalhar as variações fenotípicas da planta. Em contrapartida, a fertilização pode aumentar a AF, performance e diminuir os impactos negativos da herbivoria e competição edáfica em invasoras. Entretanto, ainda restam dúvidas da relação da AF com alguns desses fatores. Dessa forma, utilizamos a invasora *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) em experimentos em casa de vegetação para verificar como herbivoria, sombreamento, competição edáfica e fertilização podem influenciar na aptidão e variação fenotípica desta espécie. No primeiro capítulo analisamos como a herbivoria poderia causar alterações no nitrogênio foliar (tipo de defesa induzida) e AF de folhas injuriadas. Para isso, utilizamos jovens desta espécie e os separamos em grupo tratamento, onde causamos dano de herbivoria simulada nas folhas; e o grupo controle, que não sofreu injúrias. A AF dessas folhas foi acompanhada da primeira até a quarta semana do estudo, momento esse que o nitrogênio também foi verificado. Nossos resultados mostraram que plantas do grupo tratamento apresentaram maior AF na quarta semana, assim quando comparadas ao grupo controle; porém o nitrogênio não diferiu entre os tratamentos. Dessa forma, a herbivoria é capaz de aumentar a AF. No segundo capítulo, associamos, durante quatro semanas, a herbivoria com a condição de sombra, assim como para competição edáfica e fertilização. Acreditamos que a herbivoria, sombreamento e competição prejudicam a performance e aumentam a AF. Ainda hipotetizamos que a fertilização aumenta a aptidão e os níveis de AF de *T. diversifolia*, além de diminuir os impactos negativos da herbivoria e competição. Para o experimento de herbivoria-sombra, o grupo tratamento sofreu dois danos de herbivoria simulada em folhas, com indivíduos distribuídos entre sol e sombra. As plantas foram acompanhadas por quatro semanas. Também verificamos as folhas que surgiram pós-tratamentos. Para o experimento de herbivoria, competição edáfica e fertilização, retiramos 50% de área das folhas das plantas na primeira e terceira semana de estudo, juntamente com ausência e presença de fertilização e competição. Os resultados destes experimentos revelaram que sombreamento causa impactos negativos em *T. diversifolia*, e também aumenta a AF das folhas. Essa condição também causou variação fenotípica em estruturas caulinares. Herbivoria e competição edáfica não influenciaram em variações fenotípicas e AF, porém, os dois fatores no segundo experimento, impactaram negativamente esta espécie. A fertilização aumentou a performance e AF das plantas, além de amenizar os efeitos negativos da herbivoria e competição. A herbivoria associada com sombreamento e competição edáfica não intensificaram os prejuízos e nem influenciaram nas respostas de variação fenotípica. No geral, este estudo revelou que herbivoria, quando causada diretamente nas folhas, podem aumentar a AF, assim como a fertilização e sombreamento. Ainda vimos que sombreamento, competição edáfica e herbivoria podem impactar negativamente juvenis de *T. diversifolia*, no entanto a fertilização aumenta o desempenho dessa espécie, além de diminuir os impactos negativos gerados por esses fatores.

Palavras-chave: assimetria flutuante; estresse induzido pela herbivoria; planta invasora; variação fenotípica

Abstract

Venâncio, H. 2017. Effects of herbivory and environmental conditions on developmental instability and vegetative responses of *Tithonia diversifolia* (Asteraceae). MSc. Thesis. UFU. Uberlândia-MG. 102p.

Herbivory, edaphic competition and shading can induce phenotypic variation, decrease performance and increase levels of fluctuating asymmetry (FA, a stress measurer) in invasive plants. The association of these can further increase the FA, also harming severely or disrupting phenotypic variations of plants. On the other hand, fertilization can increase FA, performance and decrease the negative impacts of herbivory and edaphic competition on weeds. However, there are doubts about the relationship of FA with some of these factors. Thus, we used the invasive *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) in greenhouse experiments to verify how herbivory, shading, edaphic competition and fertilization can influence fitness and phenotypic variation of this species. In the first chapter, we analyzed how herbivory can cause changes in foliar nitrogen (type of induced defense) and FA of injured leaves. For this, we used seedlings of this species and separated them in group treatment, where we caused simulated herbivory damage on leaves; and the control group, which did not suffer injuries. The FA of these leaves was followed from the first to the fourth week of study, when the nitrogen was also verified. Our results showed that plants of the treatment group had higher FA on the fourth week when compared to control group; but nitrogen did not differ between treatments. In this way, herbivory can increase FA. In the second chapter, we associate for four weeks, herbivory with shade condition, as well as for edaphic competition and fertilization. We believe that herbivory, shading and competition decrease performance and increase FA. We further hypothesized that fertilization increases fitness and levels of FA of *T. diversifolia*, and reduces negative impacts of herbivory and competition. For the herbivory-shade experiment, the treatment group suffered two simulated herbivory damage on leaves, with individuals distributed between sun and shade. The plants were followed for four weeks. We also checked the leaves that came up after treatments. For herbivory, edaphic competition and fertilization, we removed 50% area from the leaves of the plants in the first and third week of study, along with and without fertilization and competition. The results of these experiments revealed that shading causes negative impacts on *T. diversifolia*, and increases leaf FA. This condition also caused phenotypic variation in shoot structures. Herbivory and edaphic competition did not influence phenotypic variations and FA, but the two factors in the second experiment negatively impacted this species. Fertilization increased plant fitness and FA, and decreased the negative effects of herbivory and competition. Herbivory associated with shading and edaphic competition did not intensify negative fitness nor influenced phenotypic variation responses. Overall, this study revealed that herbivory, when caused directly on leaves, can increase FA, as well as fertilization and shading. However, we observed that shading, edaphic competition and herbivory may adversely affect seedlings of *T. diversifolia*, however, fertilization increases the performance of this species, as well as reduced the negative impacts generated by these factors.

Keywords: fluctuating asymmetry; herbivory-induced stress; weed; phenotypic variation

Introdução Geral

Algumas espécies vegetais possuem a capacidade de sobreviver perante condições ambientais severamente estressantes, como é o caso de plantas invasoras (Richards et al. 2006; Richardson e Rejmánek 2011). Um dos motivos para conseguirem persistir em habitats estressantes é o fato de várias espécies desse grupo possuírem a característica de tolerar e responder de forma rápida e eficiente à essas condições, o que as possibilitam de desenvolverem rapidamente no ambiente tomando todo espaço disponível (Sutherland 2004; Sakai et al. 2001). Devido a isso, a capacidade de invasão dessas plantas e de excluir competitivamente outras espécies vegetais é uma das principais ameaças à biodiversidade e agricultura mundial (Gurevitch e Padilla 2004; Richards et al. 2006). Porém, a capacidade de tolerância pode não ser suficiente para algumas espécies sobreviverem ao nível de estresse (Pyšek e Richardson 2010). Por exemplo, herbivoria, baixa intensidade de luz solar e competição por recursos do solo podem prejudicar o desempenho de invasoras pioneiras (Sutherland 2004; Raghu e Dhileepan 2005; Ramula e Buckley 2010). Por outro lado, a condição de abundância na quantidade de recursos (p.ex., por fertilização) pode aumentar e acelerar o desempenho de plantas invasoras (Blackshaw e Brandt 2008).

Baixas quantidades de luz solar podem gerar menor aptidão em plantas invasoras intolerantes à esta condição, podendo até causar morte de indivíduos em estágios ontogenéticos iniciais (Sutherland 2004; Valladares et al. 2007). Para evitar isso, várias invasoras possuem a capacidade de induzir rapidamente variações no fenótipo ao ponto de compensar a essa condição de sombreamento (Claridge 2002; Richards et al. 2006). Dentro dessas, temos a alongação do comprimento do caule para que as novas folhas que surgirem no topo do caule possam absorver maior quantidade de luz solar ou até mesmo ultrapassar a

copa de outras plantas competidoras deste recurso (Valladares et al. 2007). Também surgem modificações nas folhas, onde há uma maior concentração de estruturas fotossintéticas no limbo foliar, e consequentemente aumento de nitrogênio. Ainda para as folhas, há um aumento na área foliar além de essas demorarem mais tempo para senescerem, pois a constante perda de folhas é de alto custo energético para a planta nesta condição limitante (Hikosaka 2005; Munier-Jolain et al. 2014).

Outra forma de competição que diminui a performance de espécies vegetais é a competição edáfica. Isso ocorre porque à medida que os indivíduos vão se desenvolvendo, os recursos edáficos vão se tornando mais limitados ao longo do tempo (Schenk 2006), e no caso de invasoras que possuem alta taxa de crescimento radicular, essa limitação pode ser alcançada em pouco tempo (Casper e Jackson 1997; Schenk 2006). No entanto, algumas invasoras são capazes de suportar populações extremamente densas sem que haja grande perdas na aptidão dos indivíduos (Richards et al. 2006; Moughalu 2008).

Assim como a competição, a ação de remover partes de tecidos vegetais também pode impactar negativamente algumas espécies de plantas. A herbivoria pode gerar respostas induzidas na quantidade de nitrogênio disponível nas folhas, onde pode haver o decréscimo desse, não alteração ou até mesmo aumento. A diminuição desse nutriente pode estar relacionada com o aumento na quantidade de compostos químicos contra herbivoria, como taninos, que declina a aptidão de herbívoros (Stamp 2003; Chen 2008). Outra forma de defesa induzida capaz de diminuir o ataque de herbívoros é por meio do aumento da dureza das folhas (esclerofilia), que também afetam negativamente a aptidão de fitófagos (Chen 2008). Apesar disso, algumas espécies possuem a capacidade de tolerar a herbivoria ao ponto de não apresentarem nenhum tipo de defesa induzida ou até mesmo alocarem energia para outras regiões vegetativas como forma de compensação (Zou et al. 2008; Tito et al. 2016).

Outro fator que influencia no desempenho de invasoras é a qualidade nutricional do solo. Solos com grande quantidade e qualidade de recursos edáficos afetam positivamente a performance de invasoras (Schlaepfer et al. 2010). Essa relação também é encontrada quando solos são fertilizados. Por apresentarem alta quantidade de macronutrientes, como nitrogênio, fertilizantes permitem que o desenvolvimento destas plantas acelere e assim ocupem mais rapidamente o ambiente (Blackshaw e Brandt 2008).

Além dos efeitos negativos causados por alguns destes fatores ambientais, a associação de dois ou mais destas condições podem diminuir ainda mais a performance de plantas ou até mesmo anular respostas induzidas, pois um fator pode influenciar na resposta da planta para a outra condição (Valladares et al. 2007; Rogers e Siemann 2005). Esse é o caso da herbivoria em associação com a competição edáfica ou sombreamento. Por outro lado, a presença de um fator benéfico, como fertilização, pode ajudar a planta a compensar os efeitos negativos da herbivoria (Sun et al. 2010).

Fatores que causem drásticas alterações no desenvolvimento ótimo de plantas, como herbivoria (Cornelissen e Stiling 2005), sombreamento (Silva et al. 2016), competição (Rettig et al. 1997) e fertilização (Møller 1995) podem causar desvios na simetria perfeita de estruturas bilaterais (como por exemplo, folhas) (Palmer 1994). Essa condição pode ser analisada pelo índice de assimetria flutuante (AF), que é representado por pequenos e aleatórios desvios entre os lados das folhas (Møller e Shykoff 1999). No entanto, ainda existem poucos estudos sobre estas condições, e em alguns desses temas ainda existem bastantes resultados controversos, como é o caso de herbivoria em folhas.

A relação entre herbivoria e AF possui duas hipóteses principais na literatura: que o aumento dos níveis de AF é causado pela ação da herbivoria, onde essa também é conhecida como “Hipótese do estresse induzido pela herbivoria” (Alves-Silva e Del-Claro 2016); e

outra que afirma que folhas mais assimétricas são buscadas por herbívoros por apresentarem melhor qualidade nutricional (Cornelissen e Stiling 2005). A primeira hipótese ainda é pouco explorada na literatura, apresentando tanto corroborações quanto refutações (Berteaux et al. 2007; Alves-Silva e Del-Claro 2016).

Tithonia diversifolia (Hemsl.) Gray (Asteraceae) é um bom modelo para o estudo porque essa apresenta folhas com um rápido e curto desenvolvimento, também por apresentar um acelerado desenvolvimento vegetativo (Moughalu 2008; Venâncio et al. 2016). Além disso, ela pode ser encontrada em ambientes com diferentes condições de luz solar, em grandes populações e em locais com a presença de solo fertilizado, como plantações, além de ser atacada por herbívoros (Ayeni et al. 1997; Moughalu 2008; Simelane et al. 2011).

Dessa forma, o objetivo geral desta dissertação foi verificar como a herbivoria, baixas intensidade de luz solar, competição edáfica intraespecífica, e fertilização podem influenciar no desempenho vegetativo e AF da espécie invasora *T. diversifolia*. Para isso, separamos esse objetivo em dois capítulos seguidos das seguintes hipóteses:

Capítulo 1

Objetivo: Verificar como danos de herbivoria simulada nas folhas podem influenciar nos níveis de nitrogênio foliar e AF.

Hipóteses: (i) Folhas com danos de herbivoria simulada aumentarão os níveis de AF;

(ii) Folhas com danos de herbivoria simulada sofrerão alterações nos níveis de nitrogênio.

Capítulo 2

Objetivo: Analisar os efeitos da herbivoria simulada, sombreamento, fertilização, competição intraespecífica no solo e associação destes fatores na performance vegetativa, variação fenotípica e AF.

Hipóteses: (i) indivíduos presentes nos tratamentos de herbivoria simulada, competição edáfica e sombreamento apresentarão menor performance vegetativa em relação ao grupo controle destas condições;

(ii) a fertilização aumentará o desempenho vegetativo dos juvenis de *T. diversifolia*;

(iii) *T. diversifolia* apresentará, como variação fenotípica, menores níveis de clorofila e maior esclerofilia em suas folhas nos tratamentos de herbivoria simulada;

(iv) a condição de sombreamento induzirá os jovens a investirem em maior quantidade de folhas, maior comprimento e, conseqüentemente, maior peso caulinar, além de maior área foliar e quantidade de clorofila comparado à condição de sol;

(v) os tratamentos de sombreamento, herbivoria simulada, competição edáfica e fertilização aumentarão os níveis de AF;

(vi) a associação da herbivoria simulada juntamente com o sombreamento impactará mais negativamente na performance vegetativa de plantas de *T. diversifolia* do que os indivíduos presentes em somente uma destas condições;

(vii) a herbivoria simulada diminuirá a capacidade de variação fenotípica para a condição de sombreamento;

(viii) plantas presentes nos tratamentos de competição no solo em associação com herbivoria simulada apresentarão menor desempenho vegetativo em relação aos indivíduos em somente uma dessas condições;

(ix) plantas sob os tratamentos de herbivoria e competição apresentarão maior resposta de variação fenotípica contra a herbivoria em comparação com os outros tratamentos destas condições;

(x) a fertilização juntamente com os tratamentos de herbivoria e competição diminuirá os impactos negativos destas duas condições;

(xi) a fertilização aumentará a tolerância das plantas à herbivoria, ao ponto de diminuir a variação fenotípica contra esse fator;

(xii) os níveis de AF das plantas aumentará à medida que há a associação dos tratamentos (i.e., herbivoria e sombreamento; herbivoria, competição e fertilização).

Referências bibliográficas

- Alves-Silva E, Del-Claro K. (2016) Herbivory-induced stress: Leaf developmental instability is caused by herbivore damage in early stages of leaf development. *Ecological Indicators* 61: 359-365.
- Ayeni AO, Lordbanjou DT, Majek BA (1997) *Tithonia diversifolia* (Mexican sunflower) in south-western Nigeria: occurrence and growth habit. *Weed research* 37(6): 443-449.
- Berteaux D, Diner B, Dreyfus C, Eble M, Lessard I, Klvana I (2007) Heavy browsing by a mammalian herbivore does not affect fluctuating asymmetry of its food plants. *EcoScience* 14: 188–194.
- Blackshaw RE, Brandt RN (2008) Nitrogen fertilizer rate effects on weed competitiveness is species dependent. *Weed Science*, 56(5): 743-747.
- Casper B, Jackson RB (1997) Plant competition underground. *Annual review of ecology and systematics* 28(1): 545-570.
- Chen MS (2008) Inducible direct plant defense against insect herbivores: a review. *Insect science*, 15(2): 101-114.
- Claridge K, Franklin SB (2002) Compensation and plasticity in an invasive plant species. *Biological Invasions* 4(4): 339-347.
- Cornelissen T, Stiling P (2005) Perfect is best: low leaf fluctuating asymmetry reduces herbivory by leaf miners. *Oecologia* 142: 46 - 56.
- Gurevitch, J, Padilla DK (2004) Are invasive species a major cause of extinctions?. *Trends in Ecology & Evolution* 19(9): 470-474.

- Møller AP (1995) Leaf-mining insects and fluctuating asymmetry in elm *Ulmus glabra* leaves. *Journal of Animal Ecology* 64 (6): 697-707.
- Møller AP, Shykoff JA (1999) Morphological developmental stability in plants: patterns and causes. *International Journal of Plant Sciences* 160(S6): S135-S146.
- Munier-Jolain NM, Collard A, Busset H, Guyot SH, Colbach N (2014) Investigating and modelling the morphological plasticity of weeds. *Field Crops Research* 155: 90-98.
- Muoghalu J I (2008) Growth, reproduction and resource allocation of *Tithonia diversifolia* and *Tithonia rotundifolia*. *Weed Research* 48 (2): 157-162.
- Palmer, AR (1994) Fluctuating asymmetry analyses: a primer. In: Markow (ed) *Developmental instability: its origins and evolutionary implications*, Springer Netherlands, pp 335-364.
- Pyšek P, Richardson DM (2010) Invasive species, environmental change and management, and health. *Annual Review of Environment and Resources* 35: 25-55.
- Raghu S, Dhileepan K (2005) The value of simulating herbivory in selecting effective weed biological control agents. *Biological Control* 34(3): 265-273.
- Ramula S, Buckley YM (2010) Management recommendations for short-lived weeds depend on model structure and explicit characterization of density dependence. *Methods in Ecology and Evolution* 1(2): 158-167.
- Rettig JE, Fuller RC, Corbett AL, Getty T (1997) Fluctuating asymmetry indicates levels of competition in an even-aged poplar clone. *Oikos* 80 (1): 123-127.

- Richards CL, Bossdorf O, Muth NZ, Gurevitch J, Pigliucci M (2006) Jack of all trades, master of some? On the role of phenotypic plasticity in plant invasions. *Ecology letters* 9(8): 981-993.
- Richardson DM, Rejmánek M (2011) Trees and shrubs as invasive alien species—a global review. *Diversity and Distributions* 17(5): 788-809.
- Rogers WE, Siemann E (2005) Herbivory tolerance and compensatory differences in native and invasive ecotypes of Chinese tallow tree (*Sapium sebiferum*). *Plant Ecology* 181(1): 57-68
- Sakai AK, Allendorf FW, Holt JS, Lodge DM, Molofsky J, With KA, Baughman S, Cabin RJ, Cohen JE, Ellstrand NC, McCauley DE (2001). The population biology of invasive species. *Annual review of ecology and systematics* 32 (1): 305-332.
- Schenk HJ (2006) Root competition: beyond resource depletion. *Journal of Ecology* 94(4): 725-739.
- Schlaepfer DR, Glättli M, Fischer M, van Kleunen M (2010) A multi-species experiment in their native range indicates pre-adaptation of invasive alien plant species. *New Phytologist*, 185(4): 1087-1099.
- Silva HV, Alves-Silva E, Santos JC (2016) On the relationship between fluctuating asymmetry, sunlight exposure, leaf damage and flower set in *Miconia fallax* (Melastomataceae). *Tropical Ecology* 57(3): 419-427.
- Simelane DO, Mawela KV, Fourie A (2011) Prospective agents for the biological control of *Tithonia rotundifolia* (Mill.) SF Blake and *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae) in South Africa. *African Entomology* 19(2): 443-450.

- Stamp N (2003) Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *The Quarterly Review of Biology* 78(1): 23-55.
- Sun Y, Ding J, Frye MJ (2010) Effects of resource availability on tolerance of herbivory in the invasive *Alternanthera philoxeroides* and the native *Alternanthera sessilis*. *Weed Research* 50(6): 527-536.
- Sutherland S (2004) What makes a weed a weed: life history traits of native and exotic plants in the USA. *Oecologia* 141(1): 24-39.
- Tito R, Castellani TT, Fáveri SB, Lopes BC, Vasconcelos HL (2016) From over to undercompensation: Variable responses to herbivory during ontogeny of a Neotropical monocarpic plant. *Biotropica* 48(5): 608-617.
- Valladares F, Gianoli E, Gómez JM (2007) Ecological limits to plant phenotypic plasticity. *New Phytologist* 176(4): 749-763.
- Venâncio H, Silva EA, Santos JC (2016) Is a leaf life span enough to display changes on developmental instability and nitrogen after simulated herbivory?. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 222: 121-127.
- Zou J, Rogers WE, Siemann E (2008) Increased competitive ability and herbivory tolerance in the invasive plant *Sapium sebiferum*. *Biological Invasions* 10(3): 291-302.

Capítulo 1

Is a leaf life span enough to display changes on developmental instability and nitrogen after herbivory?

Artigo publicado na revista Flora

Venâncio H, Silva E A, Santos J C (2016). Is a leaf life span enough to display changes on developmental instability and nitrogen after simulated herbivory?. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 222:121-127.

Is a leaf life span enough to display changes on developmental instability and nitrogen after herbivory?

Henrique Venâncio ^{a*}, Estevão Alves Silva ^a, Jean Carlos Santos ^a

^a Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Rua Ceará s/n, 38400-902, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

ABSTRACT

Herbivory is a main source of plant damage and injured plants might present decrements in nutrients, delayed growth and low reproductive outputs. Therefore, herbivory can be considered a stressful agent to plants. In this study, we investigated short-term changes in the stress and nutrients levels of the invasive plant species *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) after simulated herbivory. Parameters such as leaf fluctuating asymmetry (FA, a measure of plant stress, also known as developmental instability) and nitrogen levels were compared between control and treated plants reared in a greenhouse. We expected high levels of FA and low nitrogen in injured leaves. FA was assessed by measuring the right and left sides of leaves, from the leaf edge to the midrib, at the middle point of the leaves; and nitrogen was evaluated through the Kjeldahl method. Results showed that FA was related to herbivory, in that injured leaves were 22% more asymmetric than control leaves. In addition, before-after analysis revealed that FA significantly increased 33% in leaves from the treated group after leaf damage. Nitrogen presented only minor and non-significant changes after simulated herbivory. Leaves from the control group did not show significant increments in neither FA nor in nitrogen. FA was concluded to be a good and rapid estimator of plant stress following leaf damage, as during its short lifespan (approximately 45 days), leaves displayed increased developmental instability. We consider that leaf damage is a predictor of plant developmental instability and that FA can be used to detect and compare stress levels in plants after herbivory damage.

Keywords: Asteraceae; fluctuating asymmetry; herbivory-induced stress; simulated herbivory; *Tithonia diversifolia*

RESUMO

A herbivoria é o principal fator de danos em plantas, e plantas danificadas podem apresentar decréscimos em nutrientes, crescimento prejudicado e baixo investimento em reprodução. Dessa forma, a herbivoria pode ser considerada um agente estressante para plantas. Neste estudo, nós investigamos rápidas mudanças nos níveis de estresse e nutrientes da espécie invasora *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) após herbivoria simulada. Parâmetros como assimetria flutuante (AF, um medidor de estresse em plantas, também conhecido como instabilidade no desenvolvimento) e níveis de nitrogênio foram comparados entre plantas controle e tratamento criadas em estufa. Nós esperamos altos níveis de AF e baixo nitrogênio em folhas danificadas. A AF foi avaliada por medições do lado esquerdo e direito das folhas, da borda da folha até a nervura central, no centro das folhas; e o nitrogênio foi avaliado através do método de Kjeldhal. Os resultados mostraram que AF relacionou com a herbivoria, onde folhas danificadas foram 22% mais assimétricas do que as folhas do controle. Em adição, as análises antes e depois revelaram que a AF significativamente aumentou 33% em folhas do grupo tratamento depois do dano foliar. O nitrogênio apresentou mudanças pequenas e não significativas depois da herbivoria simulada. As folhas do grupo controle não mostraram incrementos nem em AF e nitrogênio. A AF foi concluída em ser um bom e rápido estimador de estresse em planta após dano foliar, durante a sua rápida expansão (aproximadamente 45 dias), as folhas apresentaram instabilidade no desenvolvimento aumentada. Nós consideramos que o dano foliar é um preditor de instabilidade no desenvolvimento de plantas e que AF pode ser usada para detectar e comparar níveis de estresse em plantas depois de danos de herbivoria.

Palavras-Chave: Asteraceae; assimetria flutuante; estresse induzido pela herbivoria; *Tithonia diversifolia*

1. Introduction

Herbivory is the main source of biotic plant damage in nature and its consequences, regardless of the plant structure that animals feed on, are well documented; plants may present delayed growth, early leaf senescence and less investment in reproduction (i.e., the production of flowers and fruits) (Maron, 1998; Stephens and Westoby, 2015). Shortly after herbivore attack, the nutritional quality of tissues may undergo several changes. Nitrogen levels, for instance, can either decrease or increase following herbivory (Casotti and Bradley, 1991; Gange and Nice, 1997; Hartley, 1998). As demonstrated by Cornelissen and Fernandes (2001a), leaf damage significantly reduced nitrogen levels in a legume tree (see also Cooke et al., 1984) and the authors attributed this factor to induced plant defenses, since low nitrogen is related to increased concentration of tannins and low susceptibility to further insect herbivores (Cornelissen and Fernandes, 2001b; Cornelissen and Stiling, 2005).

With such large detrimental effects of herbivores on plant development, one may assume that injured plants are under stress (i.e. detriments in a biological system—Hoffmann and Parsons, 1991) compared to non-injured individuals (Díaz et al., 2004). One way to assess stress in plants is through the analysis of developmental instability (DI), which is based on morphological changes in the morphometry of bilateral characters (e.g., leaves) following perturbations (Leamy and Klingenberg, 2005). DI is the inability of organisms to buffer adverse ontogenetic processes and achieve a predetermined phenotypic condition (Olofsson and Strengbom, 2000). The DI of plants subjected to different types of perturbation, including herbivory, can be statistically evaluated by an index known as fluctuating asymmetry (FA), which measures the imperfect growth of leaves (Martel et al., 1999; Telhado et al., 2010). Under normal and optimal conditions, both sides of leaves (right and left sides) should

develop correspondingly, but a diverse array of biotic and abiotic stressful conditions (e.g., temperature, soil, shade, pollution, competition, parasitism, and herbivory) affects the bilateral development of leaves and gives rise to minor deviations from the perfect symmetry (reviewed in Møller and Shykoff, 1999). Since FA is a health index of populations (i.e., elevated FA levels are indicative of high stress), it can be used to compare plants with different levels of stress within a population (Alves-Silva and Del-Claro, 2013; Cornelissen and Stiling, 2011).

Several studies report positive relationships between FA and herbivory, that is, stressed plants may attract more herbivores (Lempa et al., 2000). It occurs because stress due to abiotic factors is related to low defensive compounds and increased nitrogen concentrations, in comparison to non-stressed plants, thus benefiting herbivores (White, 1984; Cornelissen and Stiling, 2005). The competing hypothesis, i.e., that herbivores do not select stressed plants, but rather are a direct cause of FA (herbivory-induced stress hypothesis—Alves-Silva and Del-Claro, 2016), has scarcely been examined, with different results (Berteaux et al., 2007; Zvereva et al., 1997a). Recently, it was demonstrated that even low herbivory levels in young leaves are capable of causing significant increases in FA, an evidence for the herbivory-induced stress hypothesis (Alves-Silva and Del-Claro, 2016). In an ecological conservation context, FA can be used to anticipate changes, sometimes detrimental, in plant fitness (Siikamäki et al., 2002; Venâncio et al., 2016) and initiatives can be performed to mitigate the effect of the stressing factors. Therefore, the faster the stress is assessed, the quicker can researchers predict whether plants are under stress or not.

In this study, we experimentally assessed the impact of simulated herbivory on leaf developmental instability (FA) and nutritional quality. These tasks were evaluated in seedlings of a rapid-growing invasive species, *Tithonia diversifolia* (Hemsl) Gray

(Asteraceae). The leaf life span of *T. diversifolia* lasts approximately 45 days, which might give us a rapid estimation of whether herbivory incurred in plant stress. Specifically, we compared the levels of FA and nitrogen in plants before and after leaf damage. Comparisons between control and treated groups were also performed. We expected a significant increase in FA after leaf damage, as suggested by the herbivory-induced stress hypothesis. Nitrogen levels were also expected to change after herbivory, as leaf damage can result in both increase or decrease in nitrogen (Gange and Nice, 1997; Hartley, 1998; Cornelissen and Fernandes, 2001a). By choosing a rapid-growth plant species we should be able to evaluate short-term effects of herbivory on parameters that are indicative of plant health and nutrition.

2. Material and methods

2.1. Plant species and status

T. diversifolia (also known as Mexican sunflower) is a semi-herbaceous shrub (1.5–2.5 m tall) with many branches and ramifications. Mature leaves reach up to 40 mm in width and 55 mm in length, are greenish, lobed and have small trichomes distributed evenly throughout the leaf blade. The margin is undulate, the base is acuminate, and the apex varies from acute to acuminate. Leaf lifespan lasts approximately 45 days, and senescent leaves are shed and rapidly replaced by new ones (personal observation). *T. diversifolia* presents rapid growth and is known because of its invasive capability, inhibiting the establishment of economically important crops and ornamental plants. It can reproduce both sexually and asexually, and produces over 100,000 small-sized seeds dispersed by wind, which contributes to its dispersal

by colonizing every available sunny space (Muoghalu, 2008). Individuals can tolerate a wide range of environmental and edaphic conditions. Adult plants may cover large areas and restrain the movement of animals and humans (see more in Muoghalu and Chuba, 2005). *T. diversifolia* is native to North and Central America and has been successfully introduced in China and some countries of Africa, and South America (Chengdong et al., 2006; Muoghalu and Chuba, 2005; Olivares, 2003), and is a potential invader of Pacific Islands (Meyer, 2000).

2.2. Plant sampling and seed germination

Seeds of *T. diversifolia* were randomly collected in June 2012 from a population of more than a hundred individuals growing in a degraded area within a Brazilian tropical savanna (Campus Glória, 48°12' W - 18°57' S) near Uberlândia city, Brazil. In January 2014, seeds were germinated in Petri dishes under controlled conditions (12h:12d, 25°C ± 1°C) in a germination chamber. Then, seedlings were individualized and transferred to pots (1.1 l; 12 cm × 10 cm) filled with a homogenized mixture of commercially available topsoil (Bioplant©), containing organic humus and nutrients. Seedlings were kept growing in a greenhouse at the Federal University of Uberlândia (18°53'S, 48°15'W), Brazil, from February to September 2014, when research on artificial herbivory commenced. At this time, all seedlings were approximately 40 cm tall and possessed fully expanded mature leaves, but our experimental procedure was conducted on the young/expanding leaves (see below). Plants at the greenhouse were evenly spaced to avoid shading and mechanically tap-watered four times a day in six-hour intervals during the entire study period. The greenhouse remained closed to avoid the entry of insect herbivores and uncontrolled herbivory, which might have interfered with the research.

2.3. Study design

For the experimental design, a total of 48 *T. diversifolia* seedlings were used. These individuals were randomly assigned to either treatment ($n = 24$) or control ($n = 24$), according to the experimental manipulation. The “treated” group contained plants that were used for the simulated herbivory tests, while the “control” group did not receive any type of damage simulation. The three most apical leaves from each plant were used for measurements ($n = 72$ leaves from each group). These leaves were 47 mm long (± 0.69 mm, mean \pm SE; range = 31.12–55.01), in contrast to fully expanded mature leaves (range = 60–69 mm in length; 63.99 ± 0.42 mm). As leaf lifespan does not last more than 45 days, we were able to observe the whole growth period of each tagged leaf. This was important because we hypothesized that simulated herbivory would affect leaf FA. This can be detected if leaves still grow following the treatment.

During the study period, some leaves became senescent and were naturally abscised from plants; the final sample size for each plant group was 65 and 68 leaves in the control and herbivory groups, respectively (2.71 ± 0.11 and 2.83 ± 0.08 leaves per plant respectively, mean \pm SE). For statistical procedures we used the average values per plant, as this is a widely used procedure in FA studies (following Alves-Silva and Del-Claro, 2016; Cornelissen and Stiling, 2011; Santos et al., 2013).

Before herbivory simulation experiments, several plant parameters were measured, namely: plant size (cm), number of leaves, leaf length (mm), leaf width (mm) and fluctuating asymmetry (mm); for plant size assessment, we used a metric tape, while for the other parameters, we used a digital caliper with 0.01 mm accuracy. All of these measurements were

made in order to ensure that differences between plants of the “treated” and “control” group did not differ in these parameters before experimentation. This procedure was conducted twice in a seven-day interval, and in both occasions, no difference in any plant parameter was noticed between plant groups (see Section 3 for detailed information and statistical tests), thus discarding a possible bias in our study.

In mid-September, leaves from the “treated” group were subjected to artificial herbivory. To simulate leaf herbivory, a round portion of 28.26 mm² (6 mm diameter) was removed from tagged leaves, with the aid of standard size hole-punch equipment (Schooler et al., 2006). Each leaf had the same area removed (6 mm diameter), but the percentage of damage was different, since leaves differed in sizes (length range 34.79–59.24 mm, (47.28 ± 0.72 mm; mean ± SE); width range 21.8–51.77 mm, (35.21 ± 0.76). This permitted us to evaluate whether different magnitudes of leaf damage affected FA and/or nitrogen levels. The interval between the simulated herbivory procedure and the final estimation of leaf parameters (FA and nitrogen) was two weeks, after which the leaves were not yet fully expanded. During this period, plants were left undisturbed in the greenhouse and both groups were subjected to the same environmental conditions and watering, as described above. In addition, during this period the holes in each leaf grew/expanded as the leaves became mature, hence the final average hole area in leaves was 33.76 mm² (±0.21; range: 28.92–36.6 mm²), what corresponded on average to 3.5% of leaf area (±0.14%; range 1.73–7.42%). The hole-punch equipment was rubbed on leaves of “control” plants to control for the effect of the equipment, but no damaged was made and/or noticed on these leaves.

2.4. Plant stress – fluctuating asymmetry

Fluctuating asymmetry was examined in both plant groups from the beginning until the end of the study. Leaves were always measured by the same researcher (following Kozlov and Zvereva, 2015) on both the right and left sides (Rs and Ls), with a digital caliper to the nearest 0.01 mm. Measurements were made from the middle part of the leaf (using the midrib as a reference) to the leaf edge, as this is the relevant methodology in this type of study (Cornelissen and Stiling, 2005; Santos et al., 2013) (Fig. 1). A subsample of 34 leaves was re-measured in the same way described above in order to conduct error analyses, which might indicate whether the measurements were performed with enough accuracy to rule out possible errors (Yezerinac et al., 1992). The index of repeatability of Falconer (IR) is commonly used to estimate the measurement error in FA studies and indicates whether leaf sides were measured with reasonable precision (Santos et al., 2013). Tests on the relation between original and re-measured values are also used to compare how good the measures were performed (Hódar, 2002). The IR was markedly high ($IR = 0.99$, $P < 0.0001$), revealing that the measurement error of leaves was insignificant. The range of the absolute values of $|Rs \text{ minus } Ls|$ was 0.04–1.85 (0.76 ± 0.09 ; mean \pm SE), while the re-measured leaves presented absolute FA values ranging between 0–2.29 mm (0.64 ± 0.09). Following Hódar (2002), a correlation test between original and re-measured values of Rs and Ls was conducted, yielding values of $r > 0.95$ in both cases. Therefore, we considered our measurements reliable to perform subsequent analyses.

Bilateral structures can display three different types of asymmetry such as FA, directional asymmetry and antisymmetry, all of which can be distinguished and labeled by exploratory analyses using the values of Rs minus Ls (or Ls minus Rs, the order does not matter here) (Graham et al., 2010; Palmer and Strobeck, 1986). Fluctuating asymmetry refers to random and minor deviations from the perfect symmetry, thus the Rs minus Ls values should not

significantly depart from a mean equal to zero. In directional asymmetry, one side of the bilateral character is significantly longer than the other, so the difference between sides (R_s minus L_s) is significantly different from zero. Antisymmetry occurs when the population contains individuals with both R_s greater than L_s and vice-versa, and data are characterized by a bimodal distribution. The main ecological difference between these asymmetries is that both directional asymmetry and antisymmetry may be affected both by genetic and environmental factors (see Graham et al., 1993; Pratt and McLain, 2002; Rowe et al., 1997), and their use as a measure of developmental instability is still under consideration (Leamy, 1999; Rowe et al., 1997; Silva et al., 2015). FA, on the other hand, is caused and/or boosted by external factors (Alves-Silva and Del-Claro, 2013; Cornelissen and Stiling, 2011); thus, FA permits comparisons of the effect of a given condition (e.g., herbivory—Alves-Silva and Del-Claro, 2016; Zvereva et al., 1997a) on leaf bilateral development.

The existence of both directional asymmetry and antisymmetry was discarded, as the average R_s minus L_s was not significantly different from zero (Student's $t_{132} = 0.3896$, $P = 0.6975$) and data did not depart from the normal curve (normality test $P = 0.4833$). Thus, our data entirely fitted the postulation of FA. The absolute values of R_s minus L_s were neither related to leaf length nor leaf width ($R^2 < 0.01$ and $P > 0.60$ in both cases), indicating that FA is independent of leaf size and thus can be assessed unambiguously in subsequent tests. In this study FA (in mm) per individual plant is shown as the mean absolute difference between the right and left sides of leaves [i.e., $FA = [|R_s \text{ minus } L_s|/n]$, where n represents the number of leaves measured (see FA index 1 in Cornelissen and Stiling, 2005).

2.5. Nitrogen

The analyses of leaf nitrogen content were performed at the end of the study in all leaves from control and treated groups (65 and 68 leaves, respectively; also used in FA analyses). Nitrogen was estimated through the Kjeldahl method, following Sáez-Plaza et al. (2013a, b). In this technique, leaf extracts undergo several phases in which different compounds are added to the sample, such as sulphuric acid, potassium sulphate, sodium hydroxide and boric acid. The organic matter on the sample is transformed in ammonium sulphate and then in ammonia. The concentration of nitrogen is then determined by back titration. The whole process is automated and was conducted by the Laboratory of Soil Analyses in our University (Laboratório de Análises de Solos, Universidade Federal de Uberlândia).

2.6. Statistical analyses

Quantitative data are displayed as mean \pm standard error. Whenever data did not fit the standards of normal distribution and variance homoscedasticity, log transformations were performed, and are indicated accordingly. To test whether before experimentation both plant groups (control and herbivory) were statistically similar in all aspects (plant size, number of leaves, leaf length, leaf width and fluctuating asymmetry) we conducted two-sample Student's *t* tests with each variable. In these tests, we used the mean values of leaf length, leaf width and FA per plant. A non-significant result from *t* tests with data before simulated herbivory would show plant groups were statistically similar in all parameters examined. Then we might focus on investigating whether simulated herbivory alone was a source of stress to plants, reflected in increased FA.

In order to investigate whether changes in the FA were related to time of sampling and treatment, we performed a repeated-measures ANOVA, where FA was employed as the

dependent variable. The interaction effects (time of sampling \times treatment) were also examined as factors affecting FA. In our concluding analyses we were solely interested in whether the simulated herbivory provoked changes in leaf FA and nitrogen. Thus, our final analyses cover the last week of study only, i.e., when the effects of simulated herbivory in plant parameters should be noticed. The comparison of nitrogen between control and treated plants was made with Student's t tests. A linear regression was performed in order to examine whether FA was related to leaf area loss (mm^2). Changes in nitrogen levels after simulated herbivory were examined with a general linear model test, where FA and simulated herbivory were employed as slopes. Statistical tests were performed in R statistical software version 3.2.3.

3. Results

3.1. Before simulated herbivory

Before the experimentation of simulated herbivory, the two groups of *T. diversifolia* did not differ in any aspect analyzed ($P > 0.05$ in all cases according to Student's t tests), thus discarding a study bias (Table 1, Fig. 2).

3.2. After simulated herbivory

According to the ANOVA test, no significant differences between plant groups and time classes were found, and there also was a non-significant interaction effect (treatment \times time)

on the levels of FA (Table 2). Nevertheless, FA in treated plants increased by 33% after leaves were mechanically injured, while FA from control plants remained essentially the same (Fig. 3). The difference in FA (average) between plant groups at the end of study (4th week) was of 22%.

3.4. Relationship between herbivory, FA and nitrogen

The analysis between leaf area loss (mm²) and FA at the end of the study revealed a positive relationship between these two variables ($F_{1,22} = 4.364$, $R^2 = 0.1655$, $P = 0.0465$), showing that FA was significantly influenced by simulated leaf herbivory (Fig. 4). Nitrogen content did not differ between control (14.62 ± 0.26 mg kg⁻¹) and treated (14.52 ± 0.36 mg kg⁻¹) plants ($t_{42} = 0.3424$, $P = 0.7336$). This nutrient was also neither related to FA and simulated herbivory (mm²), nor the interaction effect between the independent variables ($F_{3,20} = 0.4750$, $R^2 = 0.0665$, $P = 0.7031$) (Table 3).

4. Discussion

Simulated herbivory can be used to explore a diverse array of plant responses after leaf injury (Rogers and Siemann, 2002) and to anticipate changes in plant development (Raghu et al., 2006). In our study, the use of seedlings of a rapidly grown weed species permitted a quick evaluation of the effect of herbivory on leaf performance, which is more visible in young seedlings (Karban and Strauss, 1993). The temporal comparison of FA between plant groups showed that FA was not statistically influenced by plant grouping and/or time, despite

substantial increases in FA. We believe that an increased number of replicates might have revealed significant effects.

A leaf life span was sufficient to show tentative increases in the FA of leaves of *T. diversifolia* after simulated herbivory. FA values increased after leaf damage (33%) and in addition, leaves from the treated group were on average 22% more asymmetric than control plants. In a study relating FA and herbivory, differences ranging from 15% to 27% in FA between control and treated shrubs of *Banisteriopsis malifolia* (Nees and Martius) B. Gates and *Heteropterys escallonifolia* A. Juss. (both Malpighiaceae) were enough to display significant differences, that is, attacked leaves were significantly more asymmetrical than uninjured leaves (Alves-Silva and Del- Claro, 2016).

When treated plants were analyzed alone, FA was positively related to leaf area loss (mm^2), what corroborates our expectations that leaf injury would increase FA levels. FA of control plants showed a small tendency to decrease over time (initial FA levels = 0.58; final FA = 0.56 mm). The slight decrements in leaf FA of control plants from the beginning to the end of the study can be attributed to the constant feedback of leaves to maintain the perfect bilateral symmetry. As discussed by Freeman et al. (2003), leaves tend to regulate the growth and improve symmetry over time.

Two instances can be listed to support the hypothesis that leaf damage was a stressing factor to *T. diversifolia*. First, FA from control leaves had a tendency to decrease, while the FA from treated leaves had a tendency to increase after leaf injury. Second, a positive relationship between FA and leaf area loss was found, what indicates that leaf injury boosted leaf stress. Our results, however, are not evidence of a systemic stress response of the whole plant, but rather an organ-restricted response of damaged leaves, since only FA of damaged leaves was considered.

Our data show that small spheroid holes punctured in the apex of leaves triggered an induced response that boosted FA levels. Different types of (natural or artificial) herbivory (punctures, cuts, defoliation) together with varying positions damage (base, apex, middle portion) might as well reveal new outcomes, as plants are expected to show induced responses to herbivory accordingly (Alves-Silva and Del-Claro, 2016; Berteaux et al., 2007; Olofsson and Strengbom, 2000; Puerta-Piñero et al., 2008; Zvereva et al., 1997b).

Nitrogen levels presented only minor (non-statistically) differences between the two plant groups, rejecting our hypotheses that simulated herbivory would substantially change this nutrient (see Cooke et al., 1984). This result may indicate either that leaf nitrogen concentration does not present rapid changes after herbivory, or that *T. diversifolia* may compensate for/tolerate herbivory damage (Strauss and Agrawal, 1999). Rogers and Siemann (2002) demonstrated that the invasive plant species *Sapium sebiferum* (L.) Roxb. (Euphorbiaceae) was poorly affected by herbivory, which contributed to its invasive capability. Whether or not *T. diversifolia* has such a mechanism of compensation and tolerance to herbivory remains to be further investigated. We believe that nitrogen is not appropriate as a stress indicator (due to herbivory) in *T. diversifolia*, presumably because we examined the life stage when plants grow rapidly and as consequence need a lot of nitrogen, which might then become limited. Changes in nitrogen might indicate stress (i.e. plant stress hypothesis – White, 1984; Cornelissen and Stiling, 2005), but the relation between FA and nitrogen, or other nutrients (Lempa et al., 2000), is not fully understood (Bañuelos et al., 2004). At least in oaks, stressed leaves show higher levels of nitrogen (Cornelissen and Stiling, 2005).

5. Conclusion

In the present study, we showed that FA (mm) was positively related to simulated herbivory (mm²), indicating that FA analysis can be used as an environmental biomarker of plant stress following herbivore damage, as proposed by the herbivory-induced stress hypothesis. So far, despite the vast literature on the subject (e.g., Alves-Silva, 2012; Berteaux et al., 2007; Cuevas-Reyes et al., 2011; Puerta-Piñero et al., 2008), only a few studies show that herbivory can indeed increase/boost plant FA, but evidence is growing (Alves-Silva and Del-Claro, 2016; Santos et al., 2013; Zvereva et al., 1997a). We are confident that forthcoming studies assessing the effect of herbivores on the developmental instability of their host plants will provide significant advances in the application of FA/developmental instability analysis in ecological studies.

Acknowledgements

We would like to thank Laboratório de Análises de Solos (Universidade Federal de Uberlândia) for leaf nutrient analyses and to Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais-UFU and T. Lobato for logistical support. We are also thankful to four reviewers and the several rounds of peer review for enhancing the quality of the manuscript. This study had financial support from Capes (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel), CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development), Duratex and Fapemig (Foundation of Support Research of the State of Minas Gerais).

6. References

- Alves-Silva, E., Del-Claro, K., 2013. Effect of post-fire resprouting on leaf fluctuating asymmetry, extrafloral nectar quality, and ant-plant-herbivore interactions. *Naturwissenschaften* 100, 525–532.
- Alves-Silva, E., Del-Claro, K., 2016. Herbivory-induced stress: leaf developmental instability is caused by herbivore damage in early stages of leaf development. *Ecol. Indic.* 61, 359–365.
- Alves-Silva, E., 2012. The influence of *Ditylenchus* (Nematoda) galls and shade on the fluctuating asymmetry of *Miconia fallax* (Melastomataceae). *Ecol. Austral* 22, 53–61.
- Bañuelos, M.J., Sierra, M., Obeso, J.R., 2004. Sex, secondary compounds and asymmetry. Effects on plant–herbivore interaction in a dioecious shrub. *Acta Oecol.* 25, 151–157.
- Berteaux, D., Diner, B., Dreyfus, C., Eble, M., Lessard, I., Klvana, I., 2007. Heavy browsing by a mammalian herbivore does not affect fluctuating asymmetry of its food plants. *EcoScience* 14, 188–194.
- Casotti, G., Bradley, J.S., 1991. Leaf nitrogen and its effects on the rate of herbivory on selected eucalypts in the Jarrah forest. *For. Ecol. Manage.* 41, 167–177.
- Chengdong, X., Xiaodong, D., Shugang, L., 2006. Invasive plants in Honghe River Basin of Yunnan Province, China. *Chinese J. Ecol.* 25, 194–200.

- Cooke, F.P., Brown, J.P., Mole, S., 1984. Herbivory, foliar enzyme inhibitors, nitrogen and leaf structure of young and mature leaves in a tropical forest. *Biotropica* 16, 257–263.
- Cornelissen, T.G., Fernandes, G.W., 2001a. Defence, growth and nutrient allocation in the tropical shrub *Bauhinia brevipes* (Leguminosae). *Austral Ecol.* 26, 246–253.
- Cornelissen, T.G., Fernandes, G.W., 2001b. Patterns of attack by herbivores on the tropical shrub *Bauhinia brevipes* (Leguminosae): vigour or chance? *Eur. J. Entomol.* 98, 37–40.
- Cornelissen, T., Stiling, P., 2005. Perfect is best: low leaf fluctuating asymmetry reduces herbivory by leaf miners. *Oecologia* 142, 46–56.
- Cornelissen, T., Stiling, P., 2011. Similar responses of insect herbivores to leaf fluctuating asymmetry. *Arthropod Plant Inte.* 5, 59–69.
- Cuevas-Reyes, P., Oyama, K., González-Rodríguez, A., Fernandes, G.W., Mendoza-Cuenca, L., 2011. Contrasting herbivory patterns and leaf fluctuating asymmetry in *Heliocarpus pallidus* between different habitat types within a Mexican tropical dry forest. *J. Trop. Ecol.* 27, 383–391.
- Díaz, M., Pulido, F.J., Møller, A.P., 2004. Herbivore effects on developmental instability and fecundity of holm oaks. *Oecologia* 139, 224–234.
- Freeman, D.C., Brown, M.L., Dobson, M., Jordan, Y., Kizy, A., Micallef, C., Hancock, L.C., Graham, J.H., Emlen, J.M., 2003. Developmental instability: measures of

- resistance and resilience using pumpkin (*Cucurbita pepo* L.). Biol. J. Linn. Soc. 78, 27–41.
- Gange, A.C., Nice, H.E., 1997. Performance of the thistle gall fly, *Urophora cardui*, in relation to host plant nitrogen and mycorrhizal colonization. New Phytol. 137, 335–343.
- Graham, J.H., Freeman, D.C., Emlen, J.M., 1993. Antisymmetry, directional asymmetry, and dynamic morphogenesis. Genetica 89, 121–137.
- Graham, J.H., Raz, S., Hel-Or, H., Nevo, E., 2010. Fluctuating asymmetry: methods, theory, and applications. Symmetry 2, 466–540.
- Hódar, J.A., 2002. Leaf fluctuating asymmetry of Holm oak in response to drought under contrasting climatic conditions. J. Arid Environ. 52, 233–243.
- Hartley, S.E., 1998. The chemical composition of plant galls: are levels of nutrients and secondary compounds controlled by the gall-former? Oecologia 113, 492–501.
- Hoffmann, A.A., Parsons, P.A., 1991. Evolutionary Genetics and Environmental Stress. Oxford University Press, New York.
- Karban, R., Strauss, S.Y., 1993. Effects of herbivores on growth and reproduction of their perennial host, *Erigeron glaucus*. Ecology 74, 39–46.
- Kozlov, M. V, Zvereva, E.L., 2015. Confirmation bias in studies of fluctuating asymmetry. Ecol. Indic. 57, 293–297.

- Leamy, L., 1999. Heritability of directional and fluctuating asymmetry for mandibular characters in random-bred mice. *J. Evol. Biol.* 12, 149–155.
- Leamy, L.J., Klingenberg, C.P., 2005. The genetics and evolution of fluctuating asymmetry. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36, 1–21.
- Lempa, K., Martel, J., Koricheva, J., Haukioja, E., Ossipov, V., Ossipova, S., Pihlaja, K., 2000. Covariation of fluctuating asymmetry, herbivory and chemistry during birch leaf expansion. *Oecologia* 122, 354–360.
- Møller, A.P., Shykoff, J.A., 1999. Morphological developmental stability in plants: patterns and causes. *Int. J. Plant Sci.* 160, 135–146.
- Maron, J.L., 1998. Insect herbivory above- and belowground: individual and joint effects on plant fitness. *Ecology* 79, 1281–1293.
- Martel, J., Lempa, K., Haukioja, E., 1999. Effects of stress and rapid growth on fluctuating asymmetry and insect damage in birch leaves. *Oikos* 86, 208–216.
- Meyer, J.Y., 2000. Preliminary review of the invasive plants in the Pacific islands (SPREP Member Countries), in: Sherley, G. (Ed.), *Invasive Species in the Pacific: A Technical Review and Draft Regional Strategy*. South Pacific Regional Environment Programme (SPREP), Apia, Samoa, pp. 85–114.
- Muoghalu, J.I., Chuba, D.K., 2005. Seed germination and reproductive strategies of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray and *Tithonia rotundifolia* (P.M) Blake. *Appl. Ecol. Environ. Res.* 3, 39–46.

- Muoghalu, J.I., 2008. Growth, reproduction and resource allocation of *Tithonia diversifolia* and *Tithonia rotundifolia*. *Weed Res.* 48, 157–162.
- Olivares, E., 2003. The effect of lead on the phytochemistry of *Tithonia diversifolia* exposed to roadside automotive pollution or grown in pots of Pb-supplemented soil. *Brazilian J. Plant Physiol.* 15, 149–158.
- Olofsson, J., Strengbom, J., 2000. Response of galling invertebrates on *Salix lanata* to reindeer herbivory. *Oikos* 91, 493–498.
- Palmer, A.R., Strobeck, C., 1986. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 17, 391–421.
- Pratt, A.E., McLain, D.K., 2002. Antisymmetry in male fiddler crabs and the decision to feed or breed. *Funct. Ecol.* 16, 89–98.
- Puerta-Piñero, C., Gómez, J.M., Hódar, J.A., 2008. Shade and herbivory induce fluctuating asymmetry in a mediterranean oak. *Int. J. Plant Sci.* 169, 631–635.
- Raghu, S., Wilson, J.R., Dhileepan, K., 2006. Refining the process of agent selection through understanding plant demography and plant response to herbivory. *Aust. J. Entomol.* 45, 308–316.
- Rogers, W.E., Siemann, E., 2002. Effects of simulated herbivory and resource availability on native and invasive exotic tree seedlings. *Basic Appl. Ecol.* 3, 297–307.

- Rowe, L., Repasky, R.R., Palmer, A.R., 1997. Size-dependent asymmetry: fluctuating asymmetry versus antisymmetry and its relevance to condition-dependent signaling. *Evolution* 51, 1401–1408.
- Sáez-Plaza, P., Michałowski, T., Navas, M.J., Asuero, A.G., Wybraniec, S., 2013a. An overview of the Kjeldahl method of nitrogen determination. Part I. Early history, chemistry of the procedure, and titrimetric finish. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 43, 178–223.
- Sáez-Plaza, P., Navas, M.J., Wybraniec, S., Michałowski, T., Asuero, A.G., 2013b. An overview of the Kjeldahl method of nitrogen determination. Part II. Sample preparation, working scale, instrumental finish, and quality control. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 43, 224–272.
- Santos, J.C., Alves-Silva, E., Cornelissen, T.G., Fernandes, G.W., 2013. The effect of fluctuating asymmetry and leaf nutrients on gall abundance and survivorship. *Basic Appl. Ecol.* 14, 489–495.
- Schooler, S., Baron, Z., Julien, M., 2006. Effect of simulated and actual herbivory on alligator weed, *Alternanthera philoxeroides*, growth and reproduction. *Biol. Control* 36, 74–79.
- Siikamäki, P., Lammi, A., Mustajärvi, K., 2002. No relationship between fluctuating asymmetry and fitness in *Lychnis viscaria*. *Evol. Ecol.* 16, 567–577.
- Stephens, A.E.A., Westoby, M., 2015. Effects of insect attack to stems on plant survival, growth, reproduction and photosynthesis. *Oikos* 124, 266–273.

- Strauss, S.Y., Agrawal, A.A., 1999. The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends Ecol. Evol.* 14, 179–185.
- Telhado, C., Esteves, D., Cornelissen, T., Fernandes, G.W., Carneiro, M.A.A., 2010. Insect herbivores of *Coccoloba cereifera* do not select asymmetric plants. *Environ. Entomol.* 39, 849–855.
- Venâncio, H.S., Alves-Silva, E., Santos, J.C., 2016. Environmental and biotic factors affecting the fluctuating asymmetry and flower set in *Miconia fallax* (Melastomataceae). *Trop. Ecol.* 57, 419–427.
- White, T.C.R., 1984. The abundance of invertebrate herbivores in relation to the availability of nitrogen in stressed food plants. *Oecologia* 63, 90–105.
- Yezerinac, S.M., Loughheed, S.C., Handford, P., 1992. Measurement error and morphometric studies: statistical power and observer experience. *Syst. Biol.* 41, 471–482.
- Zvereva, E.L., Kozlov, M. V, Niemelä, P., Haukioja, E., 1997a. Delayed induced resistance and increase in leaf fluctuating asymmetry as responses of *Salix borealis* to insect herbivory. *Oecologia* 109, 368–373.
- Zvereva, E.L., Kozlov, M. V, Haukioja, E., 1997b. Stress responses of *Salix borealis* to pollution and defoliation. *J. Appl. Ecol.* 34, 1387–1396.
- Silva, M.H. de M., Almeida-Cortez, J.S., Alves-Silva, E., Santos, J.C., 2015. Relationship between gall-midge parasitism, plant vigor, and developmental instability in *Ouratea*

polygyna Engl. (Ochnaceae) in a patch of a Brazilian Atlantic Forest. Acta Bot.
Brasilica 29, 274–277.

7. Tables

Table 1 Parameters measured in two groups of *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) before experimental manipulation (simulated herbivory in treated group). Note that all variables in both groups remained statistically similar prior to experimentation, thus discarding study bias. The values are displayed as mean \pm standard error. Superscript ‘n.s.’ = non-significant. Sample size = 24 plants in each group.

Before simulated herbivory—between group comparisons					
1st week			2nd week		
Plant size (cm)					
Control	39.39 \pm 1.67	$t=0.6818^{\text{n.s.}}$	Control	39.88 \pm 1.31	$t=0.5318^{\text{n.s.}}$
Treated	41.05 \pm 1.78		Treated	40.83 \pm 1.73	
Number of leaves					
Control	6.75 \pm 0.22	$t=1.6136^{\text{n.s.}}$	Control	8.17 \pm 0.20	$t=0.1523^{\text{n.s.}}$
Treated	7.05 \pm 0.22		Treated	8.21 \pm 0.19	
Leaf length (mm)					
Control	47.29 \pm 1.05	$t=0.0593^{\text{n.s.}}$	Control	47.11 \pm 1.04	$t=0.0081^{\text{n.s.}}$
Treated	47.56 \pm 0.93		Treated	47.12 \pm 0.91	
Leaf width (mm)					
Control	36.11 \pm 0.92	$t=1.5552^{\text{n.s.}}$	Control	35.86 \pm 1.05	$t=0.5340^{\text{n.s.}}$
Treated	34.12 \pm 1.06		Treated	35.07 \pm 1.05	
Fluctuating asymmetry (mm)					
Control	0.58 \pm 0.05	$t=0.3404^{\text{n.s.}}$	Control	0.56 \pm 0.06	$t=0.4528^{\text{n.s.}}$
Treated	0.55 \pm 0.06		Treated	0.54 \pm 0.05	

Table 2 Coefficients and analysis of variance of the influence of treatment (simulated herbivory) and time (weeks of study) on the fluctuating asymmetry of *Tithonia diversifolia*.

MS—mean squares. Superscript ‘n.s.’ = non-significant.

Variables	d.f.	MS	F-Ratio
Treatment	2	0.096	1.853 ^{n.s.}
Time	1	0.047	0.904 ^{n.s.}
Treatment \times time	2	0.037	0.711 ^{n.s.}
Error	138	0.052	

Table 3 Coefficients of the relationship among nitrogen (intercept), leaf area loss (mm²) and fluctuating asymmetry (FA) in *Titonia diversifolia*. S.E.—standard error. Log + 1 data were used. ‘n.s.’ = non-significant.

Regression Coefficients			
Variables	Coefficient	S.E.	<i>t</i> -value
Intercept (nitrogen)	6.1756	6.0709	1.0172 ^{n.s.}
Partial regression (herbivory)	−0.9759	1.7104	0.5705 ^{n.s.}
Partial regression (FA)	−8.8828	11.3141	0.7851 ^{n.s.}
Interaction effects	2.5120	3.1765	0.7908 ^{n.s.}

8. Figures

Fig. 1. Assessment of fluctuating asymmetry levels in *Tithonia diversifolia*. (a) Potted seedling of *T. diversifolia*. (b) Leaf of *T. diversifolia* showing how the measurements (Right side (*Rs*) and Left side (*Ls*)) and artificial herbivory procedures (arrow) were performed. Leaf length = 55 mm.

Fig. 2. Comparisons of several parameters of *Tithonia diversifolia* (mean and standard error of plant size, number of leaves, leaf length, leaf width and fluctuating asymmetry) assessed before simulated herbivory procedure. Both control and treated groups were statistically similar in every aspect examined, thus discarding study bias. 'n.s.' indicates 'non-significant' according to Student's *t* tests. Data are presented in $\log+1$ values to fit single figures.

Fig. 3. Comparison of the fluctuating asymmetry (FA) levels (mean and standard error, mm) in control and treated individuals of *Tithonia diversifolia*. In the first two weeks, plants showed similar FA, but after leaves from the treated group were injured, FA increased by 33%.

Fig. 4. Relationship between fluctuating asymmetry (mm) and leaf area loss (mm²) in *Tithonia diversifolia*.

Fig. 1

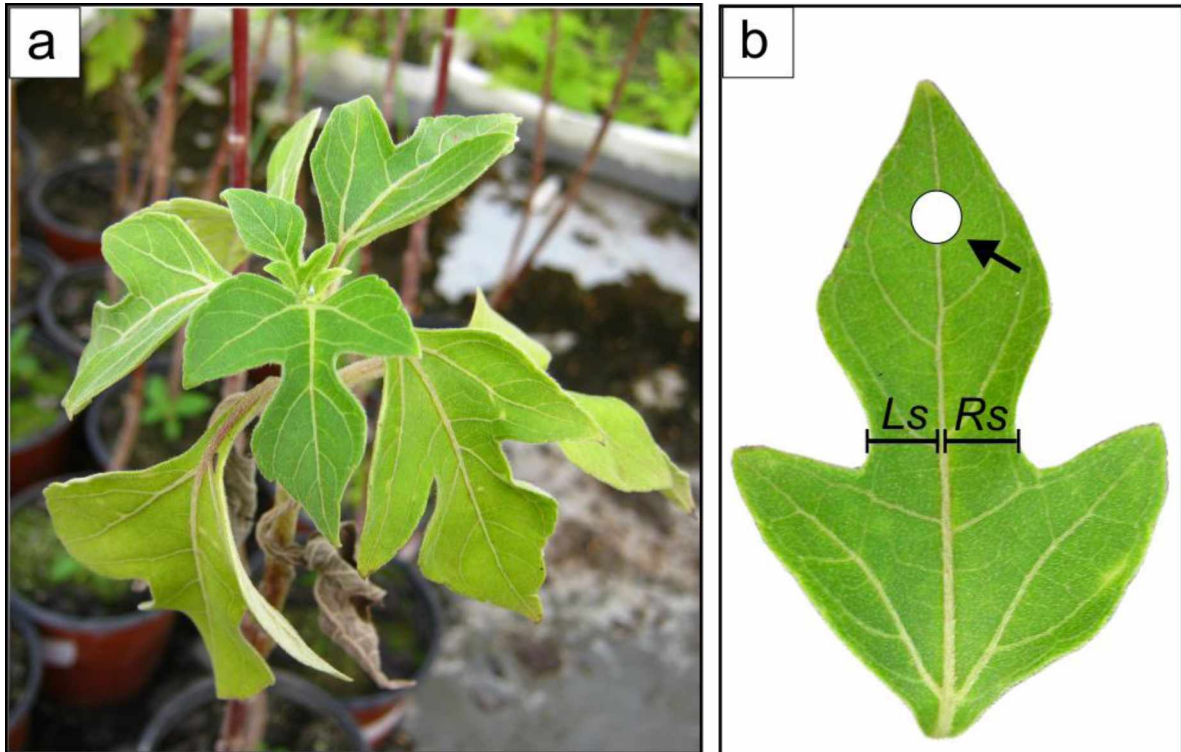


Fig. 2

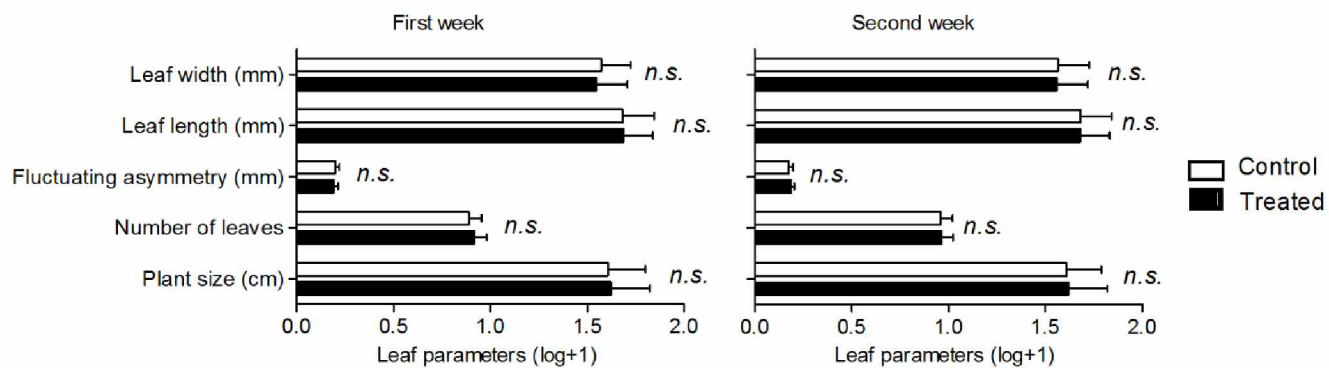


Fig. 3

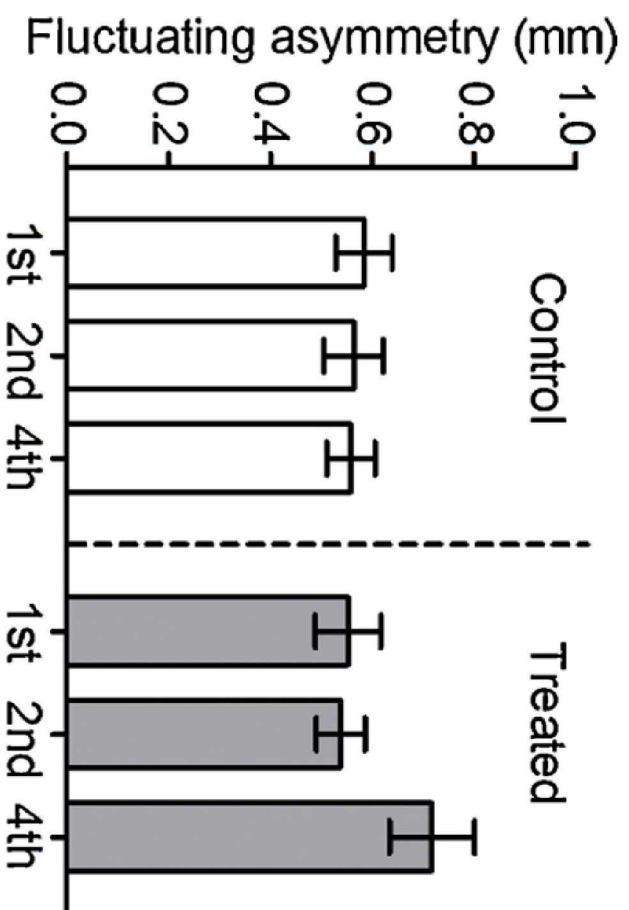
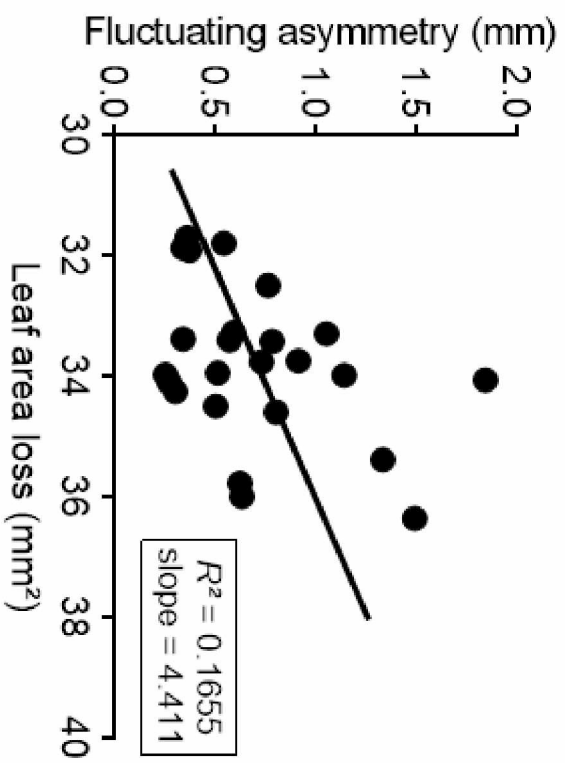


Fig. 4



Capítulo 2

Respostas vegetativas e assimetria flutuante da espécie invasora *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) sob diferentes condições ambientais

Henrique Venâncio ^{a*}, Tatiana Garabini Cornelissen ^b, Jean Carlos Santos ^a

^a Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

^b Universidade Federal de São João Del-Rei, São João Del-Rei, Minas Gerais, Brasil.

* Capítulo escrito seguindo as normas do periódico *Plant Ecology*

Resumo: Condições ambientais podem gerar estresse e influenciar na variação fenotípica e performance de plantas invasoras. Além disso, a associação de dois ou mais fatores podem aumentar ou diminuir estas respostas em plantas. Neste estudo, nós realizamos dois experimentos em casa de vegetação para verificar como a combinação de herbivoria simulada, competição edáfica intraespecífica, fertilização e sombreamento influenciam no estresse - medido através da assimetria flutuante (AF) - e resposta vegetativa (verificados pela clorofila foliar, esclerofilia, biomassa caulinar da raiz e comprimento do caule) de jovens da espécie pioneira e invasora *Tithonia diversifolia* (Asteraceae). O primeiro experimento simulou danos de herbivoria em folhas dessa espécie juntamente com dois níveis de luz solar, 100% e 20%. Já o segundo experimento envolveu a combinação de herbivoria simulada em altos níveis, competição edáfica e fertilização. Nossos resultados revelaram que a quantidade de injúrias de herbivoria simulada desse experimento não influenciaram nas respostas vegetativas na ausência ou na presença de sombreamento em *T. diversifolia*, porém na condição de sombra, essa espécie apresentou baixa biomassa acompanhada de um investimento na variação fenotípica de estruturas caulinares, na clorofila e esclerofilia em folhas, além de maior biomassa caulinar e aumento de AF nas folhas que surgiram após os tratamentos. No segundo experimento, a herbivoria diminuiu a biomassa, enquanto a competição intraespecífica gerou baixos níveis de clorofila nessa espécie, porém nenhuma das condições gerou aumentos de AF e tampouco intensificaram os efeitos quando as duas condições foram simultaneamente manipuladas. No entanto, a presença de fertilização foi capaz de aumentar a clorofila, biomassa e AF de *T. diversifolia*, além de diminuir os impactos negativos da herbivoria e competição. Nossos resultados indicam que alguns fatores influenciam na resposta vegetativa de plantas invasoras e que a AF pode ser usada como ferramenta de biomonitoramento desse grupo.

Palavras-chave: variação fenotípica; competição; fertilização; herbivoria simulada; aptidão.

Abstract: Environmental conditions can generate stress and induce phenotypic variations and performance of invasive plants. In addition, the association of two or more of these factors may increase or decrease these responses on plants. In this study, we performed two greenhouse experiments to verify how the combination of simulated herbivory, intraspecific edaphic competition, fertilization and shading can influence on stress- measured through fluctuating asymmetry (FA) - and vegetative responses (measured by leaf chlorophyll, Stem and root biomass and stem length) of pioneer seedlings of *Tithonia diversifolia*. The first experiment occurred by simulated herbivory damages on leaves of this species associated with two levels of sunlight, 100% and 20%. The second experiment involved the combination of high level of simulated herbivory, edaphic competition and fertilization. Our results revealed that low levels of herbivory on *T. diversifolia* do not influence on vegetative responses in the absence or presence of shading, but at shade condition, this species presented low biomass followed by an investment in phenotypic variations of stem structures, in chlorophyll and leaf sclerophilly, investments on steam biomass and improvement of FA on leaves that came after treatments. On the second experiment, herbivory decreased biomass, while intraspecific competition generated low levels of chlorophyll on this species, but none of the conditions increased FA, nor intensified the effects when both conditions were present. However, the presence of fertilization increased chlorophyll, biomass and FA of *T. diversifolia*, and decreases the negative impacts of herbivory and competition. Our results indicate that some factors influence the vegetative response of invasive plants and that AF can biomonitor tool of this group.

Keywords: phenotypic variation; competition; fertilization; simulated herbivory; fitness.

1. Introdução

O ambiente pode apresentar ampla heterogeneidade e variação das condições bióticas e abióticas ao longo de sua extensão que, muitas vezes, afetam negativamente a aptidão dos organismos (Ghalambor et al. 2007). No caso das plantas, que são organismos sésseis, as pressões ambientais podem agir desde o recrutamento do indivíduo, diminuindo a performance dos indivíduos logo nos estágios ontogenéticos iniciais (Valladares et al. 2007). No entanto, esses impactos podem não ocorrer em algumas plantas invasoras, visto que esse grupo apresenta grande amplitude de tolerância e resistência, acompanhada por uma rápida resposta de variação fenotípica desde o estágio de recrutamento, contribuindo assim para sua invasibilidade em ambientes naturais e plantações (Richards et al. 2006; Van Kleunen et al. 2010). Porém, as respostas vegetativas - termo esse que utilizamos para representar tanto desempenho quanto variações fenotípicas - que este grupo apresenta podem ser alteradas quando dois ou mais fatores afetam as plantas, pois um destes agentes pode influenciar nas respostas fisiológicas e/ou hormonais da planta para a outra condição (Cipollini 2004; Roger e Siemann 2005; Agrawal 2007).

Um fator ambiental que comumente influencia em respostas vegetativas das plantas é a herbivoria. O consumo de partes de tecidos vegetais por herbívoros é capaz de gerar impactos negativos na aptidão da planta, como, por exemplo, no decréscimo de energia disponível para partes vegetativas ou reprodutivas (Katz 2016). Devido a isso, vários autores relatam os impactos negativos da herbivoria tanto em plantas nativas (e.g., Eschtruth e Battles 2008; Shiels et al 2014) quanto em plantas invasoras (e.g., Lesica e Hann 2004; Raghu e Dhileepan 2005; Simelane et al. 2011). Entretanto, reporta-se que várias espécies invasoras

podem apresentar tolerância ou mesmo resistência à herbivoria (Zangerl e Berenbaum 2005; Richards et al. 2006). Um dos principais mecanismos de resistência à herbivoria envolve a indução de defesas químicas e mecânicas, como por exemplo, a síntese de compostos secundários carbonados ou nitrogenados e o aumento da esclerofilia (Chen 2008). A baixa concentração de nitrogênio foliar, por exemplo, pode estar relacionada ao aumento nos níveis de taninos, compostos defensivos que afetam negativamente a aptidão de herbívoros (Karban & Myers 1989; Stamp 2003; Fornoni 2011). Já a esclerofilia, também conhecida como massa foliar por área, é o aumento da rigidez das paredes celulares ao longo da área das folhas após a herbivoria, tornando a mastigação e digestão de insetos mais difíceis de serem realizadas, diminuindo a preferência de ataque de herbívoros em folhas mais esclerófilas (Chen 2008). Em contrapartida à indução, a tolerância à herbivoria é a capacidade da planta de sofrer danos sem que esses afetem negativamente a aptidão da mesma (Fornoni 2011). A tolerância pode ser alcançada mais facilmente em espécies invasoras quando essas estão presentes em condições edáficas ótimas, como por exemplo, em solos fertilizados. A fertilização do solo incentiva o crescimento das partes vegetativas de invasoras em pouco tempo, o que possibilita a recuperação dos efeitos negativos da herbivoria (Rogers & Siemann 2005; Sun et al. 2010). Um exemplo dessa situação foi relatado por Sun et al. (2010) que mostraram que a adição de fertilizante no solo permitiu que a erva daninha *Alternanthera philoxeroides* apresentasse alto desempenho mesmo em tratamentos de herbivoria simulada.

A competição intraespecífica abaixo do solo é outro fator que pode afetar negativamente os indivíduos, pois ao competirem por recursos edáficos, há um decréscimo do espaço subterrâneo e de nutrientes disponíveis, causando menor aptidão em plantas em cenário de competição (Schenk 2006). No entanto, algumas plantas invasoras possuem uma alta habilidade competitiva, podendo suportar grandes populações sem que haja impactos

negativos nessas (Baker 1974; Williams et al. 1977; Sakai et al. 2001). No entanto, a competição pode apresentar respostas divergentes quando associadas à outras condições. Por exemplo, a herbivoria associada com a competição edáfica pode influenciar negativamente a performance em invasoras devido a limitação de recursos que os dois podem causar na planta, podendo aumentar a indução de defesas secundárias em resposta à essa limitação (Karban e Myers 1989; Huang et al. 2012). Em contrapartida, a adição de recursos pode amenizar os efeitos negativos da competição. Isso é exemplificado quando a qualidade do solo é aumentada por fertilização, pois essa ação aumenta a quantidade de macronutrientes do solo, permitindo que os impactos negativos da competição possam ser compensados ao ponto de causar tolerância à herbivoria em plantas possibilitando a diminuição de defesas antiherbivoria (Karban e Myers 1989; Caper e Jackson 1997; Dukes e Mooney 1999; Herr-Turoff e Zedler 2007).

Outro exemplo de condição não favorável para plantas é a competição por luz solar para espécies pioneiras. Essa condição exige que plantas expressem variações fenotípicas em partes vegetativas para maximizar a captura da pouca quantidade de luz solar disponível (Valladares et al. 2007). Para isso, há um maior investimento na elongação do caule e nas folhas, maior investimento em estruturas que aumentem a capacidade fotossintética por área (Callaway et al. 2003; Hikosaka 2005; Shao et al. 2014). No caso de espécies invasoras pioneiras, o sombreamento pode gerar impactos negativos caso as respostas de fenótipo não sejam suficientemente rápidas nos estágios iniciais (Holt 1995; Magda et al. 2006). Devido a isso, alguns juvenis desse grupo possuem alta capacidade de variação fenotípica a ponto de tolerar essa condição (Richards et al. 2006; Valladares e Niinemets 2008). No entanto, quando a herbivoria age juntamente com o sombreamento, a resposta de variação fenotípica à pouca luz solar pode se tornar limitada, pois muitos precursores fisiológicos à essa condição

são prejudicados com a indução de defesas antiherbivoria (Valladares et al. 2007). Essa afirmação, apesar de ser bem estudada na literatura, ainda apresenta bastante contradição, onde existem estudos sobre a ausência de variação fenotípica ao sombreamento quando folhas foram danificadas por herbívoros (Salgado-Luarte et al. 2001; Valladares et al. 2007), também estudos opostos à esta condição (Wise e Abrahamson 2007; Pardo et al 2016). Por exemplo, a planta invasora *Sapium sebiferum* não sofreu decréscimo na capacidade de investir recursos em estruturas do caule e área foliar à condição de sombreamento associada com a herbivoria (Rogers e Siemann 2003).

Qualquer condição que cause grande prejuízo ou intensa aceleração no desenvolvimento ótimo de um organismo é suficientemente capaz de gerar alterações na simetria perfeita entre estruturas bilaterais (Palmer e Strobeck 1986). Isso ocorre porque tais condições geram alterações celulares (*i.e.*, na divisão e crescimento dessas) ao longo do desenvolvimento dessas estruturas, sendo refletidas na variação da morfometria desses órgãos (Klingenberg 2003). Um índice bastante comum na literatura capaz de medir instabilidades no desenvolvimento é a Assimetria Flutuante (AF) (Graham et al. 2010). Uma das vantagens do uso da AF é que ela é altamente relacionada à aptidão dos organismos, o que pode indicar respostas antecipadas do desempenho da população antes mesmo do período reprodutivo desses (Beasley et al. 2013). Dessa forma, essa ferramenta pode ser utilizada como forma de verificar se o habitat ou as interações estão favoráveis para a população.

A AF já foi utilizada em estudos para avaliar como condições não favoráveis podem induzir estresse em populações vegetais por diversos fatores (revisado por Møller e Shykoff 1999; Alves-Silva 2012). Estudos relatam aumentos nos níveis de AF sob condições de sombreamento (Silva et al. 2016), competição (Rettig et al. 1997), herbivoria (Alves-Silva e Del-Claro 2016) e fertilização (Møller 1995), porém alguns desses fatores ainda continuam

pouco explorados (Martel et al. 1999; Silva et al. 2016) e com respostas controversas (Alados et al. 1998; Telhado et al. 2010). Por exemplo, para a herbivoria, pequenos danos causados diretamente nas folhas podem ser capazes de induzir estresse a nível foliar e consequentemente gerar aumentos de AF (Alves-Silva e Del-Claro 2016; Venâncio et al. 2016, ver Capítulo 1). Dessa maneira, é esperado que condições tais como herbivoria, competição e sombreamento causem aumentos nos níveis de AF em espécies intolerantes à essas condições; o mesmo deve ocorrer para a condição de fertilização, já que a adição de recursos no solo pode causar rápido desenvolvimento na planta e instabilidade no desenvolvimento. Qualquer estudo adicional que indique o uso de AF como ferramenta para monitorar espécies invasoras é de grande importância, já que o uso dessa para verificar respostas dessas espécies às condições ambientais ainda é bastante escasso.

Nós utilizamos a espécie invasora *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray (Asteraceae) como modelo de estudo pelo fato de apresentar um rápido desenvolvimento vegetativo e tolerância à uma grande variedade de condições ambientais (Moughalu 2008). Essa espécie é comumente encontrada em populações com alta densidade de indivíduos em locais abertos que apresentam luz solar abundante e solos perturbados (Moughalu e Chuba 2005). É também encontrada em altas densidades em solos ricos em nutrientes, como plantações, condição essa que tem causado grandes prejuízos em plantações de alguns países (Moughalu 2008). Esta espécie também pode ser encontrada em locais com baixa quantidade de luz solar, mas em populações mais densas em locais com abundância de luz (Ayeni et al. 1997; Chukwuka et al. 2007). Além disso, há estudos mostrando que a herbivoria é capaz de causar grandes impactos negativos em *T. diversifolia* (Ambrósio et al. 2008; Simelane et al. 2011), incluindo aumento de AF em folhas com danos de herbivoria simulada (Venâncio et al. 2016, ver Capítulo 1). Neste sentido, para verificar como a herbivoria, a competição

intraespecífica por recursos edáficos, a fertilização e o sombreamento podem afetar no desempenho e agir como fatores estressantes em espécies invasoras, nós realizamos dois experimentos em casa de vegetação com indivíduos jovens de *T. diversifolia*. No primeiro experimento, nós analisamos as respostas da planta em desempenho (medido pela biomassa do caule e raiz e comprimento caulinar), variação fenotípica (verificados pela relação da biomassa entre caule e raiz, área foliar, clorofila e esclerofilia) e AF sob a combinação de herbivoria simulada associada à condição de sombreamento. No segundo experimento, nós analisamos a influência de herbivoria simulada, fertilização e competição edáfica no desempenho (medidos pela biomassa do caule e raiz, comprimento caulinar, quantidade de folhas e área foliar), variação fenotípica (verificados aqui pela clorofila e esclerofilia) e AF.

Assim, nós hipotetizamos que (i) indivíduos presentes nos tratamentos de herbivoria simulada, de competição edáfica e sombreamento apresentarão menor performance vegetativa em relação ao grupo controle destas condições; (ii) a fertilização aumentará o desempenho vegetativa dos juvenis de *T. diversifolia*; (iii) *T. diversifolia* apresentará, como variação fenotípica, menores níveis de clorofila e maior esclerofilia em suas folhas nos tratamentos de herbivoria simulada; (iv) a condição de sombreamento induzirá os jovens a investirem em maior quantidade de folhas, maior comprimento e peso caulinar, além de maior área foliar e quantidade de clorofila comparado à condição de sol; (v) os tratamentos de sombreamento, herbivoria simulada, competição edáfica e fertilização aumentarão os níveis de AF; (vi) a associação da herbivoria juntamente com o sombreamento impactará mais negativamente na performance vegetativa de plantas de *T. diversifolia* comparados com indivíduos presentes em somente uma destas condições; (vii) a herbivoria simulada diminuirá a capacidade de variação fenotípica para a condição de sombreamento; (viii) plantas presentes nos tratamentos de competição no solo em associação com herbivoria simulada

apresentarão menor desempenho vegetativo em relação aos indivíduos presentes em somente uma dessas condições; (ix) plantas sob os tratamentos de herbivoria e competição apresentarão maior resposta de variação fenotípica contra a herbivoria em comparação com os outros tratamentos destas condições; (x) a fertilização juntamente com os tratamentos de herbivoria e competição diminuirá os impactos negativos destas duas condições; (xi) a fertilização aumentará a tolerância das plantas à herbivoria, ao ponto de diminuir a variação fenotípica contra esse fator; (xii) os níveis de AF das plantas aumentará à medida que há a associação dos tratamentos (i.e., herbivoria e sombreamento; herbivoria, competição e fertilização).

2. Material e Métodos

2.1. Espécie do estudo

Tithonia diversifolia (Hemsl.) Gray (Asteraceae) é um semi-arbusto pioneiro nativo na América do Norte e Central que pode alcançar até 5m de altura (Simelane et al. 2011). Suas folhas verdes são simples com bordas serrilhadas que podem apresentar até cinco lóbulos, e que podem exceder 15 cm em comprimento e largura, senescendo 45 dias após seu surgimento (Ayeni et al. 1997; Venâncio et al. 2016, ver Capítulo 1). Dependendo da umidade do solo, essa espécie pode se reproduzir sexualmente em locais úmidos e por brotamento em solos áridos, produzindo mais de 100 sementes por capítulo (Ayeni et al. 1997; Muoghalu 2008). Essa espécie é uma invasora agressiva em várias localidades da África, América do Sul e China, onde grandes populações podem ser encontradas principalmente em locais perturbados e ensolarados, como bordas de estradas e plantações,

mas também em ambientes naturais e às vezes em florestas (Ayeni et al. 1997; Muoghalu e Chuba 2005; Yang et al. 2012).

2.2. Coleta e germinação das sementes

Nós coletamos as sementes de uma população ($n > 1.000$ indivíduos) de *T. diversifolia* localizada em uma área degradada urbana próxima ao Aeroporto de Uberlândia ($18^{\circ}53'S$ e $48^{\circ}13'O$). As coletas aconteceram em dezembro de 2015, período em que a maioria dos indivíduos da população possuíam os capítulos com sementes maduras. Para a obtenção das sementes, nós retiramos um capítulo de cada 100 indivíduos que estavam distantes entre si por pelo menos 10 metros. Esse método foi realizado para diminuir a coleta de sementes de rametas, já que esta espécie pode se reproduzir por brotamento (Muoghalu 2008). Os capítulos das plantas foram retirados, identificados e levados para o laboratório, onde as sementes maduras ($n \sim 3.000$) foram selecionadas e armazenadas para germinação.

Para a germinação das sementes, nós plantamos as mesmas aleatoriamente em bandejas para germinação (300 células) contendo substrato orgânico comercial (Bioflora[®]). Este mesmo substrato foi utilizado em todos os experimentos. Após duas semanas, período em que as plântulas já possuíam pelo menos um par de folhas, as mesmas foram transplantadas para dar início aos tratamentos. Esse método foi realizado da mesma forma em março e outubro de 2016, ao início de cada experimento. Tanto as etapas de germinação quanto os experimentos foram realizadas em casa de vegetação, localizada na Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais ($18^{\circ}53'S$ e $48^{\circ}15'O$). Este local não possui sombreamento do ambiente externo. A irrigação, com duração de 10 minutos cada, ocorre em quatro períodos, durante um intervalo de seis horas entre essas.

2.3. Delineamento experimental

Nós separamos os efeitos bióticos e abióticos sobre *T. diversifolia* em dois experimentos em casa de vegetação: um avaliando os efeitos estressantes de sombreamento e herbivoria (Experimento 1) e outro avaliando condições de competição edáfica, herbivoria e fertilização (Experimento 2).

Experimento 1 – Efeitos de herbivoria simulada e sombreamento

Em fevereiro de 2016, nós transplantamos 64 plântulas das bandejas para potes plásticos (12 x 10 cm; 500 mL) e as mantivemos nestes potes durante seis semanas, período em que a taxa de crescimento vegetativo desta espécie começa a ficar mais intenso (Smith e Anisu 1997). Após isso, nós transferimos as mesmas para potes maiores (21 x 12 cm; 1,7L), pois as raízes das plantas já haviam tomado todo o volume dos vasos pequenos, o que poderia atrapalhar nas análises da biomassa radicular nas condições de sombra-sol. Finalmente, em março de 2016, nós separamos 16 réplicas em dois níveis para os tratamentos de herbivoria simulada (um grupo com danos e outro sem danos) e dois níveis para a condição de luz solar (um que recebia luz solar totalmente e outro sob sombreamento), em forma de blocos aleatorizados (quantidade de plantas por tratamento: sol - sem danos = 16, sol - com danos = 16, sombra - sem danos = 16, sombra - com danos = 16).

Para mensurar a AF e clorofila durante o todo o experimento, nós selecionamos e marcamos as três folhas mais apicais que ainda estavam em desenvolvimento nos indivíduos (n = 48 folhas por grupo) e as acompanhamos uma vez por semana, por um tempo total de quatro semanas. A constatação de que estas folhas ainda estavam em expansão se deu por meio da comparação das mesmas no início e final do experimento, onde o comprimento das

mesmas na primeira semana do experimento ($83,27 \pm 1,50$ cm; $\bar{X} \pm EP$) foi menor do que no final ($102,72 \pm 2,26$) (Venâncio et al. 2016, ver Capítulo 1).

Para realizar os danos de herbivoria simulada, nós causamos duas injúrias circulares na região apical de cada folha selecionada dos indivíduos pertencentes ao grupo com herbivoria (Fig. 1). Essas injurias foram provocadas por meio de um perfurador de papel de 6 mm (área retirada por folha: $57,2 \text{ mm}^2$). Este método de herbivoria foi adaptado de Venâncio et al. (2016, ver Capítulo 1), porém dobramos a quantidade de danos de herbivoria causados por estes autores pois a média das folhas de *T. diversifolia* analisadas durante a primeira semana apresentaram comprimento maior (cerca de 100 %) comparada com as folhas verificadas pelos mesmos. Dessa forma, a causamos a proporção de injúrias de herbivoria mínima para induzir estresse nessa espécie.

Para simular a condição de sombreamento, nós utilizamos um tecido (sombrite) disposto acima das plantas, que permitiu a passagem de aproximadamente 20% da radiação solar do ambiente, enquanto que no grupo sem estresse de luz solar, as plantas recebiam 100% de iluminação do ambiente. Esse tipo de método é eficiente e comumente utilizado para experimentos de sombra-sol em plantas (e.g., Valladares et al. 2005; Friedman e Barrett 2011; Pardo et al. 2016).

Por fim, algumas folhas marcadas foram excluídas das análises, pois ao longo do experimento, essas apresentaram alto grau de senescência, o que impossibilitou as medições de AF e clorofila. No entanto, a quantidade de folhas das plantas entre os tratamentos não diferiu estatisticamente (quantidade de folhas por tratamento: sol - sem danos = 47, sol - com danos = 43, sombra - sem danos = 43, sombra - com danos = 47; ANOVA fatorial, $p > 0,90$).

Experimento 2 – Efeitos de herbivoria simulada, competição edáfica e fertilização

Nós transplantamos 160 plântulas das bandejas para os potes (12 x 10 cm; 500 mL) e esperamos até que as mesmas apresentassem dois pares de folhas expandidos para darmos início ao segundo experimento, que teve início em outubro de 2016. Para testar como as condições de herbivoria, fertilização e competição intraespecífica afetam *T. diversifolia*, todos os indivíduos foram distribuídos em blocos aleatorizados dentre oito grupos gerados da combinação das condições ($n = 20$ indivíduos por grupo), onde cada condição apresenta dois níveis (um controle e outro tratamento). Da mesma forma que o experimento de herbivoria simulada e sombreamento, esse teve duração de quatro semanas, porém as medições das respostas das plantas só foram realizadas ao início e ao final do experimento.

Nós selecionamos 80 indivíduos e distribuimos esses aos pares em 40 potes para compor tratamentos de competição intraespecífica (10 potes por tratamento). Para isso, nós seguimos o método realizado por Milla et al. (2009), onde plantamos os indivíduos de *T. diversifolia* com as raízes a uma distância de 2 cm uma da outra. Desta forma, a competição por recursos do solo entre as plantas teve início desde a primeira semana e se intensificou temporalmente até o final do estudo, já que esta espécie possui um rápido crescimento radicular (Muoghalu 2008).

Nós realizamos os danos de retirada de massa foliar em todas as plantas dos tratamentos de herbivoria ao início do experimento e no meio do mesmo, pois a intenção foi de verificar os impactos da herbivoria em altas proporções. Dessa maneira, nós causamos a primeira sequência de danos de herbivoria em todas folhas expandidas ($n = 4$) presentes em cada indivíduo por meio da retirada de 50% da área na região central das mesmas através de uma tesoura. O segundo momento de herbivoria aconteceu duas semanas após o primeiro tratamento de dano, onde nós retiramos metade do limbo foliar da mesma forma que

anteriormente, porém em 50% das folhas expandidas que estavam mais próximas ao ápice do caule de cada indivíduo. Nós diminuimos pela metade a quantidade de folhas danificadas no segundo momento porque o alto nível de herbivoria pode impossibilitar o surgimento de novas folhas para as análises em indivíduos de alguns tratamentos (*observação pessoal*). Após esta última sequência de danos, nós marcamos o caule de cada planta, próximo ao último par de folhas, de todos os tratamentos para que não coletássemos as folhas que surgiram antes do último tratamento de herbivoria. Estas marcações foram feitas usando uma caneta de marcação permanente, comumente usada em outros experimentos e que não causa nenhum dano na planta (Venâncio et al. 2016, Capítulo 1). Dessa forma, as quatro folhas que surgiram após os tratamentos foram coletadas para verificar as respostas vegetativas e AF das plantas.

Para a preparação do solo fertilizado do tratamento de fertilização, misturamos 12 g de fertilizante Osmocote® ForthCote Plus (proporção 15N: 9P: 12K) com 500 ml de substrato em cada pote dos tratamentos. Os minerais desse fertilizante vêm em forma de cápsulas que são liberadas em pequenas quantidades ao longo do tempo, o que evita a queima de folhas da planta e permite que o solo continue fertilizado durante todo o experimento (Cabrera 1997). Nós plantamos os indivíduos dos grupos fertilizados assim que terminamos a preparação do solo com fertilizante. Ao final do experimento, algumas folhas não foram incluídas nas análises por não estarem completamente expandidas ou por apresentarem alto grau de senescência, já que estas poderiam influenciar nas medidas de AF e clorofila; porém não houve diferença entre os tratamentos (número de folhas analisadas por tratamento: sem dano – sem fertilizante – sem competição = 77; com dano – sem fertilizante – sem competição = 78; sem dano – com fertilizante – sem competição = 73; com dano – com fertilizante – sem competição = 78; sem dano – sem fertilizante – com competição = 75; com dano – sem

fertilizante – com competição = 78; sem dano – com fertilizante – com competição = 73; com dano – com fertilizante – com competição = 74; ANOVA fatorial; $p > 0,100$, para todos os fatores e interações).

2.4. Medidas de respostas vegetativas

Para investigar como os fatores ambientais influenciam na aptidão e defesa das folhas de *T. diversifolia*, nós realizamos as medidas do comprimento do caule (cm), quantidade de folhas e clorofila foliar (unidades de SPAD). No primeiro experimento, nós avaliamos essas variáveis uma vez por semana durante um mês, e encerrando o experimento antes que grande parte das folhas marcadas pudessem senescer (Venâncio *et al.* 2016, Capítulo 1). Nós também verificamos, durante a última semana, a clorofila das três primeiras folhas expandidas que surgiram após o início da aplicação desse experimento (a partir de agora nós as definiremos como “folhas pós-tratamento”), já que a condição de defesa pode aparecer em folhas que surgem após a herbivoria (Karban & Myers 1989; Chen 2008). Nós coletamos essas mesmas variáveis para as quatro folhas que surgiram após o último tratamento de herbivoria no segundo experimento. Nós decidimos seguir este método para o experimento de herbivoria simulada, competição edáfica e fertilização pois as folhas das plantas que estavam nos tratamentos de fertilização apresentaram um tempo de vida menor comparada aos outros tratamentos, geralmente senescendo mais rapidamente do as folhas dos outros tratamentos. Além disso, por termos retirado uma grande porção de área foliar para os danos de herbivoria, grande parte das folhas necrosaram o tecido próximo ao dano, o que poderia influenciar na leitura do medidor de clorofila e medidas de AF. Nós comparamos todas essas variáveis juntamente com o comprimento e largura foliar ao início dos experimentos para verificar se não existiam diferenças entre os tratamentos.

Nós utilizamos o medidor de clorofila SPAD 502 Plus (Konica Minolta, Japão) para as medidas de clorofila em ambos experimentos. Este aparelho proporciona uma leitura rápida, não destrutiva e confiável dos valores de clorofila das folhas sem que haja retirada das mesmas da planta (Bullock e Anderson 1998; Britto et al. 2011). Além disso, os níveis de clorofila apresentados nesse aparelho são altamente correlacionados com a quantidade de nitrogênio presente em folhas, o que permite avaliar o nitrogênio indiretamente pela clorofila (Muñoz-Huerta et al. 2013). Como este aparelho faz a estimativa da clorofila a partir da quantidade de luz absorvida pelo tecido foliar amostrado (Netto et al. 2005), nós padronizamos um mesmo horário do dia e região das folhas (centro do limbo foliar) para realizar as medidas pelo SPAD.

Ao final dos experimentos, nós separamos o caule, a raiz e as folhas analisadas para secagem a fim de verificar os efeitos dos tratamentos na variação fenotípica sobre a parte aérea, subterrânea, área foliar e esclerofilia de cada indivíduo. Para isso, nós secamos essas partes em uma estufa a 60°C durante 48 horas e pesamos as mesmas para determinar a massa seca (sigla MS, unidade g). Nós geramos a razão da MS do caule e raiz (sigla C:R) e soma desses (C+R) para verificar se há alteração na alocação de recurso entre essas. Para a coleta da área foliar e esclerofilia, nós fotografamos as folhas sobre um vidro transparente e determinamos as medidas de área das folhas (sigla A, unidade mm²) pelo *software Image J*[®]. A esclerofilia foi gerada pela razão entre MS por A (MS/A, g mm⁻²) (Alves-Silva e Del-Claro 2014; Sanches et al. 2016).

2.5. Assimetria Flutuante

No primeiro experimento, nós acompanhamos a AF das folhas temporalmente com o auxílio de um par de vidros transparentes, de modo que os mesmos eram dispostos na região

abaxial e adaxial do limbo, prensados e em seguida fotografados sem que houvesse danificação ou retirada das folhas das plantas. As folhas analisadas ao início do experimento de herbivoria, competição e fertilização foram fotografadas da mesma forma. Já as folhas analisadas ao final dos dois experimentos (pós-tratamento e as últimas folhas expandidas no experimento 2), foram escaneadas (600 dpi) ainda frescas (Kozlov et al. 2017).

Nós tomamos as medições de AF na região central de cada folha, onde iniciamos as mensurações da nervura central até a borda dos lados esquerdo e direito (mm) de cada folha (Venâncio et al. 2016, ver Capítulo 1) com o auxílio do *software Image J*® (Fig. 1). Nós também remedimos uma sub-amostra de 50 folhas em cada experimento para verificar se houve erros de medidas (Palmer 1994). Para isso, nós comparamos as medidas iniciais e as remedidas do lado esquerdo (Le) e lado direito (Ld) das folhas por meio de uma correlação de Pearson (seguindo Hódar 2002). Em ambos experimentos, tanto Le quanto Ld apresentaram grande semelhança entre as medidas originais e as remedições, demonstrando alto grau de similaridade ($r > 0,96$), indicando a robustez dos valores de assimetria e descartando erros de medida.

Dentro dos estudos de instabilidade no desenvolvimento (ID), as populações podem apresentar três tipos de assimetria em suas estruturas bilaterais: antissimetria (AS), assimetria direcional (AD) e AF (Palmer e Strobeck 1986; Cornelissen e Stiling 2011). A AS é caracterizada quando a distribuição dos dados gerados por meio da subtração entre os lados das folhas (Ld-Le) se apresenta de modo platicúrtica ou bimodal, desviando assim de uma distribuição normal. A AD acontece quando as medidas do Ld e Le possuem uma média diferente de zero, sendo caracteriza com um dos lados mais frequentemente maiores que o outro. Por fim, a AF é presente quando há a exclusão dos outros tipos de assimetria, sendo, portanto, representado por pequenos e aleatórios desvios da simetria bilateral entre Le e Ld.

A partir disso, para determinar se existe a presença de AS, utilizamos uma análise gráfica (histograma) seguido de um teste de normalidade nos valores gerados pela subtração entre os lados das folhas (Ld-Le). Para a AD, nós utilizamos um teste-*t* unilateral para determinar se a diferença entre os lados da folha (Ld-Le) é diferente de zero. Caso as premissas dos testes anteriores sejam rejeitadas, a população apresenta a assimetria do tipo AF. A última análise dentro dos métodos de AF foi verificar se há a relação entre o tamanho da folha com a AF gerada em cada uma dessas, pois caso haja, torna-se necessário utilizar uma correção para a relação entre AF e tamanho ou área foliar (veja Palmer 1994). Nós verificamos essa relação por meio de regressões lineares entre as medidas de comprimento e largura foliar com o módulo da diferença entre os lados das folhas ($|Ld-Le|$) nos dois experimentos.

Nossos dados não apresentaram ausência de normalidade (curva mesocúrtica, $p > 0,1$ em ambos experimentos) e nenhum dos lados significativamente diferente do outro, *i.e.*, $Ld-Le = 0$, no primeiro experimento ($t_{179} = 0,758$; $p > 0,4$) e no segundo ($t_{608} = -1,63$; $p > 0,1$), excluindo AS e AD e demonstrando a ocorrência de padrões verdadeiros de AF. As análises de regressão acusaram uma dependência de $|Ld-Le|$ pelas medidas das folhas (comprimento e largura foliar), nos dois experimentos (experimento 1: $p < 0,01$, $r^2 < 0,15$; experimento 2: $p < 0,001$, $r^2 = 0,15$; para ambas medidas foliares). Dessa forma, nós analisamos a AF (mm) através de um índice que é capaz de corrigir essa dependência por meio da divisão do $|Ld-Le|$ pela média da soma dos lados da folha ($(Ld + Le)/2$) (Palmer 1994; Cornelissen e Stiling 2005), de acordo com a fórmula:

$$AF = \frac{\sum \left[\frac{|Ld - Le|}{(Ld + Le)/2} \right]}{n}$$

2.6. Análises estatísticas

Todos os valores estão expressos na forma de $\bar{X} \pm EP$. As análises de AF, clorofila, área foliar e esclerofilia foram testadas por médias geradas das folhas coletadas em cada indivíduo. Nós utilizamos uma ANOVA fatorial para verificar diferenças entre os grupos na primeira semana em ambos experimentos. Nós analisamos as medidas de AF e respostas vegetativa temporalmente no primeiro experimento por meio de uma ANOVA de medidas repetidas, seguindo por comparações *a posteriori* pelo teste de Tukey HSD. Para verificar as diferenças entre os grupos folhas pós-tratamento na área foliar, esclerofilia, C+R, C:R e AF do experimento de herbivoria simulada e sombreamento e de todas as variáveis de resposta vegetativa e AF no experimento de herbivoria simulada, competição edáfica e fertilização, nós utilizamos uma ANOVA fatorial seguido por pós-teste de Tukey. Tanto a quantidade de folhas nos dois experimentos, área foliar no segundo experimento e a soma e razão da biomassa do caule e raiz (C+R e C:R) foram transformadas em logaritmo (Log) para satisfazer as premissas dos testes. Todas as análises foram realizadas nos *softwares* Statistica 7 e Systat 13.

3. Resultados

3.1. Antes dos tratamentos

As medidas das variáveis coletadas (AF, comprimento do caule, quantidade de folhas e medidas de clorofila) antes dos tratamentos não apresentaram nenhuma diferença significativa entre os indivíduos dos grupos nos dois experimentos ($p > 0,05$; ANOVA fatorial), o que permitiu a continuidade das análises (Tabela 1 e 2).

3.2. Após os tratamentos

3.2.1. Experimento 1- Herbivoria simulada e sombreamento

Resposta vegetativa

As 32 plantas que receberam o tratamento de herbivoria simulada possuíram $1,83 \pm 0,14$ % (herbivoria e sol: $1,92 \pm 0,26$ %; herbivoria e sombra: $1,76 \pm 0,14$ %) da área foliar removida ao final do experimento. Essa quantidade representou, em área, danos médios de $55,34 \pm 2,61$ mm² (herbivoria e sol: $54,207 \pm 4,423$ mm²; herbivoria e sombra: $56,471 \pm 2,915$ mm²) no limbo foliar. Essa proporção de danos não foi suficiente para causar diferenças estatísticas nos grupos, temporalmente e nem interagiu com as condições de sombreamento nas medidas de resposta vegetativa ($p > 0,4$, em todos os casos) acompanhadas ao longo do estudo (Tabela 3; Fig. 2). Apesar disso, as plantas sob sombreamento apresentaram maiores valores em taxa de crescimento do comprimento caulinar comparado com o grupo de sol, mantendo esse incremento o longo do tempo (Tukey: $p < 0,05$) (Fig 2a.2). A quantidade de folhas presentes na condição de sol diminuiu bruscamente até o final do experimento, enquanto nas plantas sob o tratamento de sombreamento, o número de folhas ficou praticamente inalterado da segunda até a quarta semana ($p = 0,05$) (Fig. 2b.2). Já a condição de sombreamento não foi suficiente para causar diferenças entre os grupos e interação desses com a clorofila, porém ao longo do tempo, essa foi mantida quase inalterada da primeira até a quarta semana na sombra, enquanto que no grupo de sol, houve um decréscimo próximo a 30 % em relação à primeira semana (Fig. 2c.2).

Ao final do experimento, a esclerofilia não apresentou diferenças entre sol-sombra ($F_{1,60} = 1,24$; $p > 0,27$), tratamentos de herbivoria ($F_{1,60} = 0,014$; $p > 0,9$) e nem interação

entre os mesmos ($F_{1,60} = 0,001$; $p > 0,96$); o mesmo ocorreu para a área foliar ($p > 0,05$, para todos os casos) (Tabela 4). As plantas sob luz solar apresentaram maior biomassa seca de C+R ($F_{1,60} = 164,47$; $p < 0,001$), não apresentando diferença nos tratamentos de herbivoria e nem interação entre esses para ambas variáveis ($p > 0,483$) (Tabela 4). Somado com isso, a razão da biomassa seca entre caule e raiz (C:R) indicou maior investimento em estruturas aéreas do que em raiz na condição de sombra ($F_{1,60} = 73,605$; $p < 0,001$), não havendo diferença desse sob herbivoria ou interação com a condição entre os dois fatores ($p > 0,7$) (Tabela 4).

Por fim, as folhas pós-tratamento presentes na condição de sombreamento apresentaram menor esclerofilia ($F_{1,60} = 53,40$; $p < 0,001$) (Fig. 3a) e mais clorofila ($F_{1,60} = 10,712$; $p < 0,001$) (Fig. 3b) comparado com as que recebiam luz solar diretamente, não demonstrando diferenças entre os tratamentos de herbivoria e nem interação entre os dois tratamentos ($p > 0,1$ em todos os casos) (Fig. 3). Já a área foliar não diferiu em nenhum dos tratamentos ($p > 0,3$, para todos os fatores) (Fig. 3c).

Assimetria Flutuante

As folhas acompanhadas durante o experimento não apresentaram nenhuma alteração significativa entre os tratamentos ao longo do tempo ($p > 0,4$ em todos os casos) (Tabela 3; Fig 2d). Já as folhas pós-tratamento apresentaram maiores níveis de AF sob condição de sombreamento ($F_{1,60} = 4,93$; $p = 0,03$) (Fig 3d), indicando um aumento de estresse comparado ao grupo controle.

3.2.2. Experimento 2- Herbivoria simulada, competição edáfica e fertilização

Resposta vegetativa

O tratamento de herbivoria simulada influenciou negativamente o comprimento caulinar ($F_{1,152} = 5,39$; $p = 0,022$), a quantidade de folhas ($F_{1,152} = 16,16$; $p < 0,001$), a área foliar ($F_{1,152} = 4,20$; $p = 0,042$), a biomassa de C+R ($F_{1,152} = 12,57$; $p = 0,001$) e a razão entre C:R ($F_{1,152} = 5,9$; $p = 0,016$), enquanto clorofila e esclerofilia não se diferiram com o tratamento controle ($p > 0,16$) (Fig. 4). Já a competição influenciou negativamente a quantidade de folhas produzidas ($F_{1,152} = 22,35$; $p < 0,001$), a área foliar ($F_{1,152} = 12,48$; $p < 0,001$), a clorofila ($F_{1,152} = 5,4$; $p = 0,021$) e a biomassa total (C+R) ($F_{1,152} = 35,54$; $p < 0,001$) (Fig. 4). A esclerofilia não apresentou diferença entre nenhum dos tratamentos de competição e nem interação entre esses ($p > 0,06$ em todos os casos) (Tabela 5; Fig. 4c). Em contradição aos outros tratamentos, a fertilização influenciou positivamente todas as variáveis vegetativas avaliadas de *T. diversifolia* ($p < 0,001$, em todos os casos), em exceção à esclerofilia foliar, que não variou entre os tratamentos ($F_{1,152} = 0,76$; $p > 0,3$) (Tabela 5; Fig. 4).

Quando avaliamos separadamente as interações entre fatores, houve diferença significativa da Fertilização x Herbivoria para os níveis de clorofila, o que diminuiu os impactos negativos dessa variável na presença de herbivoria simulada em fertilização (Tukey: $p < 0,01$) (Tabela 5; Fig. 5d). De maneira semelhante, a área foliar das plantas sob competição na presença de fertilizante (Competição x Fertilização) apresentaram maior área comparada com aquelas sem fertilização (Tabela 5, Fig. 5e). A biomassa de C+R apresentaram interação de Fertilização x Competição, onde a fertilização aumentou a biomassa nos dois níveis de competição, porém com incrementos maiores sem a presença de competição (Tukey: $p < 0,05$, para todos) (Tabela 5; Fig. 5f). Também encontramos interações entre os três tratamentos para a C+R, onde a presença de fertilizante aumentou a

massa total seca independente da presença dos dois fatores, porém em menor intensidade quando estes estavam presentes (Tukey: $p < 0,05$ para presença de fertilizante) (Fig. 5f).

Assimetria Flutuante

Somente o tratamento de fertilização influenciou estatisticamente nos níveis de AF, aumentando essa em quase 75 % em relação ao grupo controle, enquanto nos outros tratamentos não houve diferença (Tabela 5; Fig. 5h). A AF apresentou interação entre Fertilização x Herbivoria onde, na ausência de herbivoria simulada, as plantas com fertilização apresentaram elevada AF, já na presença da duas, houve um decréscimo dessa variável (Tukey: $p < 0,001$) (Fig. 5g). Isso também ocorreu na interação de Fertilização x Competição e em Fertilização x Competição x Herbivoria, porém os resultados não foram significativos ($p = 0,06$; $p = 0,07$, respectivamente) (Fig. 5h).

4. Discussão

Nossos resultados indicam que a espécie invasora *T. diversifolia* é fortemente influenciada pelas condições de herbivoria, competição edáfica intraespecífica, sombreamento e fertilização. A herbivoria, quando causada de forma mais intensa e a competição no solo geram baixo desempenho vegetativo na biomassa total, quantidade de folhas, área foliar e clorofila das folhas, porém esta última variável foi menor somente no tratamento de competição edáfica. Da mesma forma, sombreamento causou baixa biomassa total nas plantas, mas as mesmas apresentaram rápida capacidade de variação fenotípica nas folhas e caule nessa condição. Já a condição de fertilização causou grande aumento em todas as variáveis vegetativas verificadas nesse trabalho. Somado a isso, a associação da herbivoria

com sombreamento (experimento 1) e herbivoria e competição edáfica (experimento 2) não causaram alterações nas respostas vegetativas de *T. diversifolia*, em exceção à presença de fertilização, que diminuiu os impactos negativos da herbivoria e competição (experimento 2). Somente a fertilização e sombreamento causaram aumentos na AF.

Respostas vegetativas

Baixo nível de luz solar é um fator limitante para diversas espécies vegetais, incluindo invasoras pioneiras (Rogers e Siemann 2002; Richards et al. 2006; Martin et al. 2009). Indivíduos jovens de *Tithonia diversifolia* apresentaram menor acúmulo de biomassa aérea e radicular, o que demonstra intolerância à sombra neste estado ontogenético. Somado a isso, nossos resultados também mostraram grande capacidade de variação fenotípica nas estruturas caulinares (comprimento e quantidade de folhas) em um curto período de tempo (quatro semanas), o que é uma característica comum em espécies invasoras pioneiras (Richards *et al.* 2006). O aumento na taxa de crescimento e investimento na biomassa do caule (C:R) mostra que há uma grande alocação de recursos para aumentar a capacidade competitiva por luz e consequentemente maior absorção quando essa se apresenta limitada no ambiente (Valladares *et al.* 2007). Nas plantas expostas ao sol, os maiores valores de C:R mostram que essas investiram mais biomassa em órgãos radiculares para captação de água no solo (Callaway *et al.* 2003), possivelmente devido à adaptação dessa espécie para ambientes áridos (Ayeni 1997; Moughalu 2008).

As variações fenotípicas à baixa intensidade de luz solar também ocorrem em nível foliar. Nessas condições, há maior investimento na proporção de concentração de aparatos fotossintéticos nas folhas para captar maior quantidade de luz solar, menor alocação em massa foliar (esclerofilia) e aumento da área foliar (Valladares et al. 2007; Niinemets 2010),

enquanto no sol ocorre o contrário para o aumento da resistência foliar sob essa condição (Poorter et al. 2009). Isso explica altos níveis de clorofila e baixa esclerofilia nas folhas pós-tratamento das plantas sob sombra. Apesar das folhas que sofreram manipulação não terem se diferenciado em esclerofilia com o grupo de sol, a clorofila desse último grupo sofreu rápido declínio ao longo do tempo, indicando uma baixa longevidade foliar. Esse fato pode ser causado pela rápida translocação de nitrogênio de folhas maduras para as mais jovens que ocorre em plantas sob luz solar que apresentam rápido desenvolvimento, e consequentemente rápido ciclo de vida das folhas (Hikosaka 2005). A esclerofilia nestas mesmas folhas que foram acompanhadas ao longo dos tratamentos não diferiu entre os grupos. Como todas as plantas estavam inicialmente sob luz solar ambiente antes dos tratamentos, as variações de fenótipo da formação das estruturas anatômicas das folhas podem não ter acompanhado a rápida mudança da condição de sol para sombra (cerca de 4 semanas). Da mesma forma, a área foliar de todas as folhas analisadas não diferiu entre os grupos. Isso pode indicar que *T. diversifolia* investe em outros mecanismos de variação fenotípica foliar (p. ex., conservação de clorofila) e não em aumento de área foliar (James e Bell 2000; Hikosaka 2005).

Plantas invasoras possuem alta capacidade competitiva por recursos edáficos, podendo afetar negativamente até indivíduos da mesma população (Ramula e Buckley 2010). Isso foi demonstrado neste trabalho, onde *T. diversifolia* sob tratamento de competição por recursos do solo apresentou menor biomassa total, quantidade de folhas, área foliar, clorofila e comprimento caular. Uma das características mais marcantes do sucesso de invasão de plantas exóticas é o rápido desenvolvimento do sistema radicular, captando assim os recursos edáficos disponíveis no solo (Sakai et al. 2001; Richards et al. 2006). *T. diversifolia* também apresenta essa característica, pois em ambientes naturais e plantações, essa espécie é capaz de consumir rapidamente os recursos edáficos diminuindo o estabelecimento de outras

plantas (Ayeni 1997). Quando isso ocorre, essa invasora começa a investir mais em reprodução, apresentando ciclo anual ou gerando clones, sendo substituída rapidamente por uma nova geração (Moughalu e Chuba 2005; Moughalu 2008), assim como ocorre em outras espécies invasoras agressivas (Sakai et al. 2001).

A quantidade de danos causados nas folhas de *T. diversifolia* não gerou nenhuma diferença em relação aos valores de clorofila e esclerofilia com o grupo controle em ambos experimentos, porém altos níveis de herbivoria (experimento 2) causaram impactos negativos na biomassa (C+R; C:R), número de folhas, área foliar e comprimento do caule. No entanto, é importante ressaltar que os altos níveis de herbivoria artificiais realizados neste segundo experimento não são comumente encontrados em plantas em ambientes tropicais (~8%) (Kozlov et al. 2015). A ausência de defesa química gerada por alterações na clorofila pode indicar que outros mecanismos de defesa (por exemplo, tricomas) podem ser adotadas por essa espécie, assim como em outras Asteraceae que não possuem a via de síntese de defesas carbonadas que envolvem a síntese de nitrogênio, como taninos (Almeida-Cortez et al. 2004; Ambrósio et al. 2008; Rasman e Agrawal 2009; Ahern e Whitney 2014). Da mesma forma, alguns juvenis podem não apresentar a esclerofilia como característica de defesa física contra a herbivoria, pois a curta longevidade foliar pode não ser vantajosa para o investimento em enrijecimento e depósito compostos estruturais na folha como forma de defesa antiherbivoria (Coley 1983; Hanley et al. 2007).

A associação da herbivoria com baixa disponibilidade de recursos causados pela competição (sombreamento e competição no solo) não influenciaram em nenhuma das respostas de variação fenotípica e de performance de *T. diversifolia*. No experimento de herbivoria simulada e sombreamento, os danos de herbivoria demonstraram que esta espécie possui tolerância à essa em nível foliar, ao ponto da herbivoria não influenciar diretamente e

indiretamente nos mecanismos de variação fenotípica de folhas na condição de sombra (Wise & Abrahamson 2007). A ausência de alteração em defesas antiherbivoria na condição de competição edáfica juntamente com a herbivoria possivelmente ocorreu pelas variáveis analisadas aqui neste trabalho (clorofila e esclerofilia) não serem tipos de defesas antiherbivoria presente nessa espécie (Hanley et al. 2007; Ambrósio et al. 2008). Por fim, a ausência do aumento dos impactos negativos da associação da herbivoria com sombreamento e da herbivoria com competição edáfica em *T. diversifolia*, pode indicar que essa espécie possui tolerância a associação de mais de um fator negativo por esses não terem sido tão intensos ao ponto impactá-la severamente (Wise & Abrahamson 2007; Pardo et al 2016).

A fertilização é um fator que pode impulsionar o desempenho de várias plantas invasoras (Blackshaw e Brandt 2008; Sun et al. 2010). Nossos resultados indicam a importância da manipulação da quantidade de recursos para *T. diversifolia*, pois essa apresentou aumentos em todas as medidas de performance dessa espécie após a adição de fertilizante. A razão disso pode ser por jovens de espécies invasoras, que possuem ciclo rápido, serem capazes de absorver grandes quantidades de recursos do solo (principalmente nitrogênio), rapidamente investindo esses para crescimento vegetativo (Rejmánek et al. 2005; Pyšek et al. 2008). Essa explicação também pode ser o motivo do tratamento de fertilização suprimir os impactos negativos da herbivoria e competição para as variáveis de clorofila, área foliar e biomassa total. Essa característica é de grande importância para a capacidade de invasibilidade em algumas espécies invasoras, pois além de suprimir a aptidão de outras espécies, o ciclo reprodutivo pode ser alcançado de forma mais rápida e intensa (Claridge e Franklin 2002; Blackshaw e Brandt 2008).

Assimetria flutuante

Os grupos de alta e baixa intensidade de luz solar não foram capazes de causar alterações nos níveis de AF nas folhas acompanhadas durante o experimento de herbivoria e sombreamento. No entanto, as folhas pós-tratamento surgiram com AF maior sob a condição de sombreamento. Nossos resultados corroboram a hipótese proposta por outros autores, onde plantas pioneiras apresentam maiores níveis de AF sob sombreamento devido ao menor desempenho sob essa condição (Puerta-Piñheiro et al. 2008; Alves-Silva 2012; Silva et al. 2016). Essa condição só foi notada nas folhas pós-tratamento, o que pode indicar que a prévia absorção da luz solar nas folhas pode amenizar a instabilidade no desenvolvimento dessas. Mas esta é uma hipótese que deve ser testada futuramente, já que ainda não existem estudos experimentais que acompanharam essa relação.

A relação entre herbivoria e AF já foi extensivamente estudada na literatura (Cornelissen e Stiling 2005; Alves-Silva e Del-claro 2016; Fernandes et al. 2016), porém ainda existem muitos resultados inconclusivos sobre este tema (Berteaux et al. 2007; Telhado et al. 2010; Silva et al. 2016). Neste trabalho, a herbivoria também não foi capaz de induzir aumento de AF nos dois experimentos. Venâncio et al. (2016) (ver Capítulo 1) concluíram que pequenos danos de herbivoria foram capazes de gerar ID ao longo da expansão foliar em *T. diversifolia*. No entanto, os danos realizados no experimento de herbivoria simulada e sombreamento deste trabalho foram quase 100% (média de 1,8 %) menores do que causados por Venâncio et al. (2016) (média de 3,5 %, Capítulo 1). Isso pode indicar que a hipótese do estresse induzido pela herbivoria (Alves-Silva e Del-Claro 2016) causa aumentos na instabilidade de desenvolvimento (ID) de folhas atacadas ainda quando jovens, porém é necessária uma quantidade mínima dessa ação para que ocorra estresse nas plantas e assim haja aumentos na AF dessas folhas. Da mesma forma, esses danos não foram suficientes para induzir maior AF nas folhas pós-tratamento em ambos experimentos. Esses resultados podem

indicar que essa espécie conseguiu suportar os níveis de danos causados nestes experimentos de forma a não causar aumento de AF refletidas nas folhas, assim como apresentado para outras espécies (Berteaux et al. 2007; Costa et al. 2013; Silva et al. 2016).

Competição subterrânea entre plantas é uma das interações menos estudadas em relação a seus efeitos na assimetria flutuante, com resultados ainda mistos na literatura (Rettig et al. 1997; Alados et al. 1998). Nossos resultados não apresentaram evidências que competição aumente a AF em juvenis de *T. diversifolia*. Essa espécie pode não apresentar estresse sob competição de modo a causar instabilidade no desenvolvimento no período de tempo conduzido neste experimento. *T. diversifolia* quase sempre é encontrada em populações bastante densas e em competição inter- e intra-específica intensa que não geram impactos negativos na reprodução dessa espécie (Moughalu 2008).

A ID é gerada quando fatores do ambiente estressantes para o organismo geram pequenos erros em estruturas bilaterais ao longo do desenvolvimento do mesmo, aumentando esses erros à medida que há o acúmulo de mais que um fator ambiental estressante (Palmer 1994). Neste trabalho, a associação da herbivoria com sombreamento ou competição edáfica não causaram aumentos da AF. Isso foi devido à somente um desses fatores (sombreamento para as folhas pós-tratamento) terem sido suficientes para causar esses erros ao longo do desenvolvimento de *T. diversifolia*, portanto não intensificando a AF na influência de dois fatores.

A presença de fertilizante causou grande diferença de AF nas folhas de *T. diversifolia* em relação ao grupo controle. Condições ambientais que aceleram exageradamente o desenvolvimento de organismos são capazes de causar grandes desvios nas medidas de estruturas bilaterais (Martel et al 1999; Alves-Silva e Del-Claro 2013). Isso pode ser explicado pelo fato que fatores que induzem um rápido crescimento podem também gerar

maiores oportunidades para o desenvolvimento de erros ao longo do desenvolvimento (Møller 1995; Martel et al. 1999). Essa relação também pôde ser percebida na interação da fertilização quando na presença da herbivoria e competição. Esses dois fatores fizeram com que as plantas apresentassem prejuízos em sua aptidão e com isso, podem ter contrabalanceado o efeito de rápido desenvolvimento causado pela fertilização.

5. Conclusão

Neste trabalho, vimos que herbivoria simulada não foi capaz de induzir respostas antiherbivoria (esclerofilia e alterações na clorofila) em folhas de *Tithonia diversifolia*. Porém altos níveis herbivoria podem impactar negativamente a aptidão de juvenis dessa espécie invasora, mas não a ponto de aumentar a AF das mesmas. Da mesma forma, baixas intensidades de luz solar diminuem a aptidão e geram aumento de AF em jovens de *T. diversifolia*, porém esses apresentam respostas de variação fenotípica bastante rápida para os indivíduos sobreviverem nesse tipo de condição. Já a competição intraespecífica por recursos edáficos também impactou negativamente as plantas, no entanto, assim como a herbivoria, não gerou aumento de AF. Por fim, fertilização foi um importante impulsionador para o desempenho de jovens de *T. diversifolia*, aumentando todos os parâmetros vegetativos analisados neste estudo, incluindo a AF. Além disso, o tratamento de fertilização conseguiu diminuir os impactos negativos da herbivoria e competição edáfica entre os indivíduos. Dessa forma, este trabalho abre espaço para que outros estudos possam avaliar como fatores bióticos e abióticos impactam a performance de espécies invasoras, e com isso, haja melhor compreensão da previsibilidade de invasão no ambiente, além da utilização de meios para controle populacional.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Dr^a Vanessa Stefani, Dr Marco Carneiro e Dr^a Wanessa Almeida pelas correções e melhora deste trabalho. Também agradecemos à Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e Duratex pelo apoio financeiro.

6. Referências bibliográficas

Agrawal AA (2007) Macroevolution of plant defense strategies. Trends in Ecology & Evolution 22(2):103-109.

Ahern JR, Whitney KD (2014) Sesquiterpene lactone stereochemistry influences herbivore resistance and plant fitness in the field. Annals of botany: 113 (4): 731-740.

Alados, CL, Emlen, JM, Wachocki, B, Freeman, DC (1998) Instability of development and fractal architecture in dryland plants as an index of grazing pressure. Journal of Arid Environments 38(1): 63-76.

- Almeida-Cortez JS, Shipley B, Arnason JT (2004) Growth and chemical defense in relation to resource availability: tradeoffs or common responses to environmental stress?. *Brazilian Journal of Biology* 64(2): 187-194.
- Alves-Silva E (2012) The influence of Ditylenchus (Nematoda) galls and shade on the fluctuating asymmetry of *Miconia fallax* (Melastomataceae). *Ecología austral* 22: 53-61.
- Alves-Silva E, Del-Claro K. (2013) Effect of post-fire resprouting on leaf fluctuating asymmetry, extrafloral nectar quality, and ant-plant-herbivore interactions. *Naturwissenschaften* 100 (6): 525-532.
- Alves-Silva E, Del-Claro K. (2016) Herbivory-induced stress: Leaf developmental instability is caused by herbivore damage in early stages of leaf development. *Ecological Indicators*. 61:359-365.
- Ambrósio SR, Oki Y, Heleno VCG, Chaves JS, Nascimento PGBD, Lichston JE, Constantino MG, Varanda EM, Da Costa, FB (2008) Constituents of glandular trichomes of *Tithonia diversifolia*: relationships to herbivory and antifeedant activity. *Phytochemistry* 69(10): 2052-2060.
- Ayeni AO, Lordbanjou DT, Majek BA (1997) *Tithonia diversifolia* (Mexican sunflower) in south-western Nigeria: occurrence and growth habit. *Weed research* 37(6): 443-449.
- Baker HG (1974) The evolution of weeds. *Annual review of ecology and systematics* 5 (1): 1-24.

- Beasley EA, Bonisoli-Alquati A, Mousseau TA (2013) The use of fluctuating asymmetry as a measure of environmentally induced developmental instability: A meta-analysis. *Ecological Indicators* 30: 218-226.
- Berteaux D, Diner B, Dreyfus C, Eble M, Lessard I, Klvana I (2007) Heavy browsing by a mammalian herbivore does not affect fluctuating asymmetry of its food plants. *EcoScience* 14: 188–194.
- Blackshaw RE, Brandt RN (2008) Nitrogen fertilizer rate effects on weed competitiveness is species dependent. *Weed Science* 56(5): 743-747.
- Brito GG, Sofiatti V, Brandão ZN, Silva VB, Silva FM, Silva, DA (2011) Non-destructive analysis of photosynthetic pigments in cotton plants. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 33(4): 671-678.
- Bullock DG, Anderson DS (1998) Evaluation of the Minolta SPAD-502 chlorophyll meter for nitrogen management in corn. *Journal of Plant Nutrition* 21(4): 741-755.
- Cabrera RI (1997) Comparative evaluation of nitrogen release patterns from controlled-release fertilizers by nitrogen leaching analysis. *HortScience* 32(4): 669-673.
- Callaway RM, Pennings SC, Richards CL (2003) Phenotypic plasticity and interactions among plants. *Ecology* 84(5): 1115-1128.
- Casper B, Jackson RB (1997) Plant competition underground. *Annual review of ecology and systematics* 28(1): 545-570.
- Chen MS (2008) Inducible direct plant defense against insect herbivores: a review. *Insect science* 15(2): 101-114.

- Chukwuka KS, Ogunyemi S, Fawole I (2007) Ecological distribution of *Tithonia diversifolia* (Hemsl). A. Gray-a new exotic weed in Nigeria. Journal of Biological Sciences 7(5): 709-719.
- Cipollini D (2004) Stretching the limits of plasticity: can a plant defend against both competitors and herbivores? Ecology 85(1): 28-37.
- Claridge K, Franklin SB (2002) Compensation and plasticity in an invasive plant species. Biological Invasions 4(4): 339-347.
- Coley PD (1983) Herbivory and defensive characteristics of tree species in a lowland tropical forest. Ecological monographs 53(2): 209-234.
- Cornelissen T, Stiling P (2011) Similar responses of insect herbivores to leaf fluctuating asymmetry. Arthropod-plant interactions 5(1): 59-69.
- Cornelissen T, Stiling P (2005) Perfect is best: low leaf fluctuating asymmetry reduces herbivory by leaf miners. Oecologia 142: 46 - 56.
- Costa FVD, Pinheiro de Azevedo IF, Braga LDL, Perillo LN, Neves FDS, Leite LO, Silva BLR, Ribeiro LC, Fernandes GW, Cuevas-Reyes P (2013) Fluctuating asymmetry and herbivory in two ontogenetical stages of *Chamaecrista semaphora* in restored and natural environments. Journal of Plant Interactions 8(2): 179-186.
- Dukes JS, Mooney HA (1999) Does global change increase the success of biological invaders?. Trends in Ecology & Evolution 14(4): 135-139.
- Eschtruth AK, Battles JJ (2008) Deer herbivory alters forest response to canopy decline caused by an exotic insect pest. Ecological Applications 18(2): 360-376.

- Fernandes GW, Oliveira SCS, Campos IR, Barbosa M, Soares LA, Cuevas-Reyes P (2016) Leaf Fluctuating Asymmetry and Herbivory of *Tibouchina heteromalla* in Restored and Natural Environments. *Neotropical Entomology* 45(1): 44-49.
- Fornoni J (2011) Ecological and evolutionary implications of plant tolerance to herbivory. *Functional Ecology* 25(2): 399-407.
- Friedman J, Barrett SC (2011) Genetic and environmental control of temporal and size-dependent sex allocation in a wind-pollinated plant. *Evolution* 65(7): 2061-2074.
- Ghalambor CK, McKay JK, Carroll SP, Reznick DN (2007) Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Functional ecology* 21(3): 394-407.
- Graham JH, Raz S, Hel-Or H, Nevo E (2010) Fluctuating asymmetry: methods, theory, and applications. *Symmetry* 2(2): 466-540.
- Hanley ME, Lamont BB, Fairbanks MM, Rafferty CM (2007) Plant structural traits and their role in anti-herbivore defense. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 8(4): 157-178.
- Herr-Turoff A, Zedler JB (2007) Does morphological plasticity of the *Phalaris arundinacea* canopy increase invasiveness?. *Plant Ecology* 193(2): 265-277.
- Hikosaka K (2005) Leaf canopy as a dynamic system: ecophysiology and optimality in leaf turnover. *Annals of Botany* 95(3): 521-533.
- Hódar JA (2002) Leaf fluctuating asymmetry of Holm oak in response to drought under contrasting climatic conditions. *Journal of arid environments* 52(2): 233-243.

- Holt JS (1995) Plant responses to light: a potential tool for weed management. *Weed Science* 43 (3): 474-482.
- Huang W, Carrillo J, Ding J, Siemann E (2012) Interactive effects of herbivory and competition intensity determine invasive plant performance. *Oecologia* 170(2): 373-382.
- James SA, Bell DT (2000) Influence of light availability on leaf structure and growth of two *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* provenances. *Tree Physiology* 20(15): 1007-1018.
- Karban R, Myers JH (1989) Induced plant responses to herbivory. *Annual Review of Ecology and Systematics* 20 (10):331-348.
- Katz DS 2016. The effects of invertebrate herbivores on plant population growth: a meta-regression analysis. *Oecologia* 182 (1): 1-11.
- Klingenberg CP (2003) A developmental perspective on developmental instability: theory, models and mechanisms. *Developmental instability: causes and consequences*, pp.14-34.
- Kozlov MV, Lanta V, Zverev, V, Zvereva EL (2015) Global patterns in background losses of woody plant foliage to insects. *Global Ecology and Biogeography* 24(10): 1126-1135.
- Kozlov MV, Cornelissen T, Gavrikov DE, Kunavin MA, Lama AD, Milligan JR, Zverev V, Zvereva EL (2017) Reproducibility of fluctuating asymmetry measurements in plants: Sources of variation and implications for study design. *Ecological Indicators* 73: 733-740.

- Lesica P, Hanna D (2004) Indirect effects of biological control on plant diversity vary across sites in Montana grasslands. *Conservation Biology* 18(2): 444-454.
- Magda D, Duru M, Huguenin J, Gleizes B. (2006) Impact of shading and cutting on the demography and composition of *Mimosa pudica* L., a ligneous weed species of tropical grasslands. *Grass and Forage Science* 61(1):89-96.
- Martel J, Lempa K, Haukioja E (1999) Effects of stress and rapid growth on fluctuating asymmetry and insect damage in birch leaves. *Oikos* 86 (2): 208-216.
- Martin, PH, Canham CD, Marks PL (2009) Why forests appear resistant to exotic plant invasions: intentional introductions, stand dynamics, and the role of shade tolerance. *Frontiers in Ecology and the Environment* 7(3): 142-149.
- Milla R, Forero DM, Escudero A, Iriondo JM (2009) Growing with siblings: a common ground for cooperation or for fiercer competition among plants?. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 276(1667): 2531-2540.
- Møller AP, Shykoff JA (1999) Morphological developmental stability in plants: patterns and causes. *International Journal of Plant Sciences* 160(S6): S135-S146.
- Møller AP (1995) Leaf-mining insects and fluctuating asymmetry in elm *Ulmus glabra* leaves. *Journal of Animal Ecology* 64 (6): 697-707.
- Muñoz-Huerta RF, Guevara-Gonzalez RG, Contreras-Medina LM, Torres-Pacheco I, Prado-Olivarez J, Ocampo-Velazquez RV (2013) A review of methods for sensing the nitrogen status in plants: advantages, disadvantages and recent advances. *Sensors* 13: 10823–10843

- Muoghalu J I (2008) Growth, reproduction and resource allocation of *Tithonia diversifolia* and *Tithonia rotundifolia*. *Weed Research* 48 (2): 157-162.
- Muoghalu J I, Chuba DK (2005) Seed germination and reproductive strategies of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray and *Tithonia rotundifolia* (PM) Blake. *Applied ecology and environmental research* 3 (1): 39-46.
- Netto AT, Campostrini E, Oliveira JG, Bressan-Smith RE (2005). Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. *Scientia Horticulturae* 104(2): 199-209.
- Niinemets Ü (2010) A review of light interception in plant stands from leaf to canopy in different plant functional types and in species with varying shade tolerance. *Ecological Research* 25(4): 693-714.
- Palmer AR, Strobeck C (1986) Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Annual review of Ecology and Systematics* 17 (1): 391-421.
- Palmer, AR (1994) Fluctuating asymmetry analyses: a primer. In: Markow (ed) *Developmental instability: its origins and evolutionary implications*, Springer Netherlands, pp 335-364.
- Pardo A, García FM, Valladares F, Pulido F (2016) Simulated herbivory does not constrain phenotypic plasticity to shade through ontogeny in a relict tree. *Plant Biology* 18(4): 618-626.
- Poorter H, Niinemets Ü, Poorter L, Wright IJ, Villar R (2009) Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): a meta-analysis. *New Phytologist* 182(3): 565-588.

- Puerta-Piñero C, Gómez JM, Hódar JA (2008) Shade and herbivory induce fluctuating asymmetry in a mediterranean oak. *International Journal of Plant Sciences* 169: 631-635.
- Pyšek P, Richardson DM (2008) Traits associated with invasiveness in alien plants: where do we stand?. In: Netwig W (ed) *Biological invasions* , Springer Berlin Heidelberg, pp 97-125.
- Raghu S, Dhileepan K (2005) The value of simulating herbivory in selecting effective weed biological control agents. *Biological Control* 34(3): 265-273.
- Ramula S, Buckley YM (2010) Management recommendations for short-lived weeds depend on model structure and explicit characterization of density dependence. *Methods in Ecology and Evolution* 1(2): 158-167.
- Rasman S, Agrawal AA (2009) Plant defense against herbivory: progress in identifying synergism, redundancy, and antagonism between resistance traits. *Current opinion in plant biology*, 12(4): 473-478.
- Rejmánek M, Richardson DM, Pyšek P (2009) Plant invasions and invasibility of plant communities. *Vegetation Ecology*, 332.
- Rettig JE, Fuller RC, Corbett AL, Getty T (1997) Fluctuating asymmetry indicates levels of competition in an even-aged poplar clone. *Oikos* 80 (1): 123-127.
- Richards CL, Bossdorf O, Muth NZ, Gurevitch J, Pigliucci M (2006) Jack of all trades, master of some? On the role of phenotypic plasticity in plant invasions. *Ecology letters* 9(8): 981-993.

- Rogers WE, Siemann E (2002) Effects of simulated herbivory and resource availability on native and invasive exotic tree seedlings. *Basic and Applied Ecology* 3(4): 297-307.
- Rogers WE, Siemann E (2003) Effects of simulated herbivory and resources on Chinese tallow tree (*Sapium sebiferum*, Euphorbiaceae) invasion of native coastal prairie. *American Journal of Botany* 90(2): 243-249.
- Rogers WE, Siemann E (2005) Herbivory tolerance and compensatory differences in native and invasive ecotypes of Chinese tallow tree (*Sapium sebiferum*). *Plant Ecology* 181(1): 57-68
- Sakai AK, Allendorf FW, Holt JS, Lodge DM, Molofsky J, With KA, Baughman S, Cabin RJ, Cohen JE, Ellstrand NC, McCauley DE (2001). The population biology of invasive species. *Annual review of ecology and systematics* 32 (1): 305-332.
- Salgado-Luarte C, Gianoli E (2011) Herbivory may modify functional responses to shade in seedlings of a light-demanding tree species. *Functional Ecology* 25(3): 492-499.
- Sanches MC, Marzinek J, Bragiola NG, Nascimento ART (2016) Morpho-physiological responses in *Cedrela fissilis* Vell. submitted to changes in natural light conditions: implications for biomass accumulation. *Trees* 1-13.
- Schenk HJ (2006) Root competition: beyond resource depletion. *Journal of Ecology* 94(4): 725-739.
- Shao Q, Wang H, Guo H, Zhou A, Huang Y, Sun Y, Li M (2014) Effects of shade treatments on photosynthetic characteristics, chloroplast ultrastructure, and physiology of *Anoectochilus roxburghii*. *PloS one* 9(2): e85996.

- Shiels AB, Ennis MK, Shiels L (2014) Trait-based plant mortality and preference for native versus non-native seedlings by invasive slug and snail herbivores in Hawaii. *Biological invasions*, 16(9), pp.1929-1940.
- Silva HV, Alves-Silva E, Santos JC (2016) On the relationship between fluctuating asymmetry, sunlight exposure, leaf damage and flower set in *Miconia fallax* (Melastomataceae). *Tropical Ecology* 57(3): 419-427.
- Simelane DO, Mawela KV, Fourie A (2011) Prospective agents for the biological control of *Tithonia rotundifolia* (Mill.) SF Blake and *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae) in South Africa. *African Entomology* 19(2): 443-450.
- Smith MAK, Anisu OO (1997) Some aspects of the Biology of Mexican sunflower *Tithonia diversifolia*. *Nigerian Journal of Weed Science* 10:1-5.
- Stamp N (2003) Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *The Quarterly Review of Biology* 78(1): 23-55.
- Sun Y, Ding J, Frye MJ (2010) Effects of resource availability on tolerance of herbivory in the invasive *Alternanthera philoxeroides* and the native *Alternanthera sessilis*. *Weed Research* 50(6): 527-536.
- Telhado C, Esteves D, Cornelissen T, Fernandes GW, Carneiro MAA (2010) Insect herbivores of *Coccoloba cereifera* do not select asymmetric plants. *Environmental entomology* 39(3): 849-855.
- Valladares F, Niinemets Ü (2008) Shade tolerance, a key plant feature of complex nature and consequences. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 39: 237-257.

- Valladares F, Dobarro I, Sánchez-Gómez D, Pearcy RW (2005) Photoinhibition and drought in Mediterranean woody saplings: scaling effects and interactions in sun and shade phenotypes. *Journal of Experimental Botany* 56(411): 483-494.
- Valladares F, Gianoli E, Gómez JM (2007) Ecological limits to plant phenotypic plasticity. *New Phytologist* 176(4): 749-763.
- Van Kleunen M, Weber E, Fischer M (2010). A meta-analysis of trait differences between invasive and non-invasive plant species. *Ecology letters* 13(2): 235-245.
- Venâncio H, Silva EA, Santos JC (2016) Is a leaf life span enough to display changes on developmental instability and nitrogen after simulated herbivory?. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 222: 121-127.
- Williams RD, Quimby Jr, PC, Frick KE (1977) Intraspecific competition of purple nutsedge (*Cyperus rotundus*) under greenhouse conditions. *Weed Science*, 25 (6): 477-481.
- Wise MJ, Abrahamson WG (2007). Effects of resource availability on tolerance of herbivory: a review and assessment of three opposing models. *The American Naturalist* 169(4): 443-454.
- Yang J, Tang L, Guan, YL, Sun WB (2012). Genetic diversity of an alien invasive plant Mexican sunflower (*Tithonia diversifolia*) in China. *Weed Science* 60(4): 552-557.
- Zangerl AR, Berenbaum MR (2005). Increase in toxicity of an invasive weed after reassociation with its coevolved herbivore. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(43):15529-15532.

7. Tabelas

Tabela 1 – Resultados indicando a ausência de diferença nos parâmetros medidos entre os indivíduos de *Tithonia diversifolia* antes da execução dos tratamentos de herbivoria simulada e sombreamento presentes no experimento 1 na primeira semana de estudo. A sigla “n. s.” indica não significativo.

Experimento 1 – Herbivoria simulada e sombreamento				
Variável	Fonte de variação	GL	QM	F
Comprimento do caule (cm)	Herbivoria	1	1,03	0,0243 ^{n.s.}
	Ambiente	1	19,69	0,0467 ^{n.s.}
	Herb X Amb	1	4,36	0,1034 ^{n.s.}
	Erro	60	42,16	
Quantidade de folhas	Herbivoria	1	0,06	0,001 ^{n.s.}
	Ambiente	1	0,06	0,027 ^{n.s.}
	Herb X Amb	1	0,06	0,007 ^{n.s.}
	Erro	60	2,15	
Comprimento foliar (mm)	Herbivoria	1	2,00	0,948 ^{n.s.}
	Ambiente	1	355,10	0,385 ^{n.s.}
	Herb X Amb	1	170,90	0,546 ^{n.s.}
	Erro	60	464,40	
Largura foliar (mm)	Herbivoria	1	118,80	0,491 ^{n.s.}
	Ambiente	1	15,60	0,802 ^{n.s.}
	Herb X Amb	1	81,30	0,568 ^{n.s.}
	Erro	60	247,40	
Clorofila (SPAD)	Herbivoria	1	0,01	0,047 ^{n.s.}
	Ambiente	1	11,04	0,052 ^{n.s.}
	Herb X Amb	1	2,94	0,052 ^{n.s.}
	Erro	60	40,83	
AF (mm)	Herbivoria	1	0,003	0,561 ^{n.s.}
	Ambiente	1	0,013	0,259 ^{n.s.}
	Herb X Amb	1	0,004	2,927 ^{n.s.}
	Erro	60		

Tabela 2 – Resultados indicando a semelhança estatística entre as variáveis vegetativas antes da execução dos tratamentos de herbivoria simulada, fertilização e competição edáfica na primeira semana de estudo. A sigla “n. s.” indica não significativo.

Experimento 2 – Herbivoria simulada, competição edáfica e fertilização				
Variável	Fonte de variação	GL	QM	F
Comprimento do caule (cm)	Herbivoria	1	0,651	1,90 ^{n.s.}
	Competição	1	0,002	0,01 ^{n.s.}
	Fertilizante	1	0,732	2,14 ^{n.s.}
	Herb X Comp	1	0,009	0,03 ^{n.s.}
	Herb X Fert	1	0,031	0,90 ^{n.s.}
	Comp X Fert	1	1,194	2,49 ^{n.s.}
	Herb X Comp X Fert	1	1,194	0,06 ^{n.s.}
	Erro	152	0,342	
Clorofila (SPAD)	Herbivoria	1	12,4	1,06 ^{n.s.}
	Competição	1	0	0,00 ^{n.s.}
	Fertilizante	1	4,2	0,36 ^{n.s.}
	Herb X Comp	1	10,8	0,92 ^{n.s.}
	Herb X Fert	1	9	0,77 ^{n.s.}
	Comp X Fert	1	1	0,09 ^{n.s.}
	Herb X Comp X Fert	1	23,5	2,00 ^{n.s.}
	Erro	152	11,7	
Comprimento foliar (mm)	Herbivoria	1	14,14	0,68 ^{n.s.}
	Competição	1	4,82	0,23 ^{n.s.}
	Fertilizante	1	0,24	0,01 ^{n.s.}
	Herb X Comp	1	7,98	0,38 ^{n.s.}
	Herb X Fert	1	46,49	2,23 ^{n.s.}
	Comp X Fert	1	1,10	0,05 ^{n.s.}
	Herb X Comp X Fert	1	6,38	0,31 ^{n.s.}
	Erro	152	20,88	
Largura foliar (mm)	Herbivoria	1	1,09	0,19 ^{n.s.}
	Competição	1	0,79	0,14 ^{n.s.}
	Fertilizante	1	0,21	0,04 ^{n.s.}
	Herb X Comp	1	11,06	1,90 ^{n.s.}
	Herb X Fert	1	12,90	2,23 ^{n.s.}
	Comp X Fert	1	0,08	0,01 ^{n.s.}
	Herb X Comp X Fert	1	0,05	0,01 ^{n.s.}
	Erro	152	5,79	

Tabela 2 - Continuação

Variável	Fonte de variação	GL	QM	F
AF (mm)	Herbivoria	1	0,001	1,000 ^{n.s.}
	Competição	1	0	0,040 ^{n.s.}
	Fertilizante	1	0	0,148 ^{n.s.}
	Herb X Comp	1	0,001	0,976 ^{n.s.}
	Herb X Fert	1	0	0,092 ^{n.s.}
	Comp X Fert	1	0	0,037 ^{n.s.}
	Herb X Comp X Fert	1	0	0,504 ^{n.s.}
	Erro	152	0,001	

Tabela 3- Coeficientes e análise de variância das variáveis vegetativas (comprimento do caule, quantidade de folhas e clorofila) e assimetria flutuante (AF) ao longo do tempo (quatro semanas) em *Tithonia diversifolia* para os tratamentos de luz solar (Ambiente) e danos de herbivoria simulada (Herbivoria). A quantidade de folhas foi transformada em logaritmo.

Variável	Fonte de variação	GL	QM	F	P
Comprimento do caule (cm)	Herbivoria	1	8,7	0,032	0,859
	Ambiente	1	2239,7	8,196	0,006
	Herb X Amb	1	6,9	0,025	0,874
	Erro	60	273,3		
	Tempo	3	2381,6	159,882	0,001
	Tempo X Herb	3	3,2	0,214	0,887
	Tempo X Amb	3	212,8	14,284	0,001
	Tempo X Herb X Amb	3	2,7	0,180	0,910
	Erro	180	14,9		
Quantidade de folhas	Herbivoria	1	0	0,163	0,687
	Ambiente	1	0,121	3,935	0,052
	Herb X Amb	1	0,038	1,235	0,271
	Erro	60	0,031		
	Tempo	3	0,381	85,021	0,001
	Tempo X Herb	3	0	0,298	0,827
	Tempo X Amb	3	0,021	4,692	0,004
	Tempo X Herb X Amb	3	1,194	2,560	0,057
	Erro	180	0,005		
Clorofila (SPAD)	Herbivoria	1	8,0	0,077	0,782
	Ambiente	1	253,5	2,449	0,123
	Herb X Amb	1	58,1	0,561	0,457
	Erro	60	103,5		
	Tempo	3	419,4	44,970	0,001
	Tempo X Herb	3	1,4	0,153	0,928
	Tempo X Amb	3	257,2	27,585	0,001
	Tempo X Herb X Amb	3	3,5	0,377	0,770
	Erro	180	9,3		

Tabela 3 - Continuação

Variável	Fonte de variação	GL	QM	F	P
AF (mm)	Herbivoria	1	0	0,087	0,769
	Ambiente	1	0	0,098	0,755
	Herb X Amb	1	0,048	2,999	0,089
	Erro	60	0,016		
	Tempo	3	0	1,049	0,372
	Tempo X Herb	3	0	1,276	0,284
	Tempo X Amb	3	0	1,118	0,343
	Tempo X Herb X Amb	3	0	0,062	0,980
	Erro	180	0		

Tabela 4- Resultados das variáveis vegetativas de *Tithonia diversifolia* coletados na última semana do experimento 1 para os tratamentos de herbivoria simulada (Herbivoria) e sombreamento (Ambiente) indicando menor biomassa total (C+R) para a condição de sombra e menor valor da razão entre biomassa do caule e raiz (C:R) para a condição de sol. A biomassa seca de C+R e C:R foram transformadas em logaritmo. Os valores de P em negrito indicam diferença estatística entre os tratamentos.

Variável	Fonte de variação	GL	QM	F	P
Área foliar (mm ²)	Herbivoria	1	54.882,1	0,023	0,880
	Ambiente	1	2.653.743,0	1,117	0,295
	Herb X Amb	1	587.586,6	0,247	0,621
	Erro	60	2.376.179,5		
Esclerofilia (g mm ²⁻¹)	Herbivoria	1	0	0,014	0,904
	Ambiente	1	0	1,239	0,270
	Herb X Amb	1	0	0,002	0,967
	Erro	60	0		
C+R (g)	Herbivoria	1	0	0,001	0,996
	Ambiente	1	1,007	164,470	0,001
	Herb X Amb	1	0,003	0,498	0,483
	Erro	60	0,006		
C:R	Herbivoria	1	0,007	0,165	0,686
	Ambiente	1	3,216	73,605	0,001
	Herb X Amb	1	0,006	0,145	0,705
	Erro	60	0,044		

Tabela 5- Efeitos dos tratamentos de herbivoria simulada, fertilização e competição edáfica sobre o comprimento do caule, quantidade de folhas, área foliar, clorofila, assimetria flutuante (AF, mm), esclerofilia, C+R e C:R de *Tithonia diversifolia*. A quantidade de folhas, a área foliar, C+R e C:R foram transformadas em logaritmo. Os valores de P em negrito destacam diferença estatística.

Variável	Fonte de variação	GL	QM	F	P
Comprimento do caule (cm)	Herbivoria	1	406,0	5,390	0,022
	Competição	1	33,1	0,439	0,508
	Fertilizante	1	3.263,6	43,327	0,001
	Herb X Comp	1	2,2	0,029	0,865
	Herb X Fert	1	116,3	1,544	0,216
	Comp X Fert	1	69,1	0,918	0,340
	Herb X Comp X Fert	1	2,5	0,033	0,856
	Erro	152	75,3		
Quantidade de folhas	Herbivoria	1	0,134	16,16	0,001
	Competição	1	0,185	22,35	0,001
	Fertilizante	1	0,609	73,70	0,001
	Herb X Comp	1	0	0,11	0,745
	Herb X Fert	1	0,017	1,99	0,160
	Comp X Fert	1	0,003	0,37	0,542
	Herb X Comp X Fert	1	0,014	1,68	0,197
	Erro	152	0,008		
Área foliar (mm ²)	Herbivoria	1	0,131	4,20	0,042
	Competição	1	0,390	12,48	0,001
	Fertilizante	1	5,805	185,78	0,001
	Herb X Comp	1	0	0,03	0,866
	Herb X Fert	1	0,003	0,08	0,772
	Comp X Fert	1	0,167	5,36	0,219
	Herb X Comp X Fert	1	0,035	1,12	0,292
	Erro	152	0,031		
Clorofila (SPAD)	Herbivoria	1	25,4	1,91	0,168
	Competição	1	72,3	5,45	0,021
	Fertilizante	1	3.386,2	255,00	0,001
	Herb X Comp	1	36,8	2,77	0,098
	Herb X Fert	1	64,5	4,86	0,029
	Comp X Fert	1	20,2	1,52	0,219
	Herb X Comp X Fert	1	9,6	0,73	0,395
	Erro	152	13,3		

Tabela 5 - Continuação

Variável	Fonte de variação	GL	QM	F	P
AF (mm)	Herbivoria	1	0	0,02	0,903
	Competição	1	0	1,69	0,196
	Fertilizante	1	0,026	10,36	0,002
	Herb X Comp	1	0	0,08	0,780
	Herb X Fert	1	0,029	11,46	0,001
	Comp X Fert	1	0,008	3,44	0,066
	Herb X Comp X Fert	1	0,009	3,61	0,059
	Erro	152			
Esclerofilia (g mm ²⁻¹)	Herbivoria	1	0	0,019	0,890
	Competição	1	0	0,016	0,900
	Fertilizante	1	0	0,147	0,702
	Herb X Comp	1	0	0,725	0,396
	Herb X Fert	1	0	2,291	0,132
	Comp X Fert	1	0	0,145	0,704
	Herb X Comp X Fert	1	0	3,712	0,056
	Erro	152	0		
C+R (g)	Herbivoria	1	0,303	12,565	0,001
	Competição	1	0,867	35,940	0,001
	Fertilizante	1	4,509	186,969	0,001
	Herb X Comp	1	0,039	1,627	0,204
	Herb X Fert	1	0,007	0,292	0,589
	Comp X Fert	1	0,145	6,010	0,015
	Herb X Comp X Fert	1	0,111	4,613	0,033
	Erro	152	0,024		
C:R	Herbivoria	1	0,074	5,946	0,016
	Competição	1	0,001	0,036	0,849
	Fertilizante	1	1,504	120,378	0,001
	Herb X Comp	1	0	0,015	0,902
	Herb X Fert	1	0	0,382	0,537
	Comp X Fert	1	0	0,591	0,443
	Herb X Comp X Fert	1	0	0,149	0,700
	Erro	152	0,012		

8. Figuras

Legendas de figuras

Fig. 1- Folha de *Tithonia diversifolia* indicando a posição dos danos de herbivoria simulada causados no primeiro experimento e a forma que as medidas de assimetria flutuante foram realizadas no centro do limbo foliar nos dois experimentos. Legenda: Ld – Lado direito e Le – Lado esquerdo.

Fig. 2- Média e erro padrão da ANOVA de medidas repetidas (GLM) para os resultados de (A) comprimento do caule, (B) quantidade de folhas, (C) clorofila e (D) assimetria flutuante (AF) em *Tithonia diversifolia*. Os gráficos foram separados em tratamentos de herbivoria simulada (herbivoria e intacta) e de luz solar (sombra e sol). O tratamento de herbivoria é representado pela letra seguida pelo número “1” e de luz solar por “2”. As letras que se diferem no gráfico representam diferença estatística entre os grupos ao longo das semanas de estudo (Tukey: $p < 0,05$). A quantidade de folhas foi transformada em logaritmo.

Fig. 3- Relações de (a) esclerofilia, (b) clorofila, (c) área foliar e (d) assimetria flutuante (AF) pós-tratamento de *Tithonia diversifolia* sob ausência (Intacta) e presença (Herbivoria) de danos de herbivoria simulada, e condições de luz solar ambiente (Sol) e sombreamento (Sombra). Os valores estão representados como média e erro padrão.

Fig. 4- Variáveis vegetativas de AF (assimetria flutuante) de *Tithonia diversifolia* analisadas sob as condições de herbivoria simulada (intacta ou dano), competição edáfica (isolada ou competição) e fertilização (sem ou com). Área foliar, quantidade de folhas, C+R e C:R estão na forma de logaritmo. Os dados estão representados como média e erro padrão.

Fig. 1

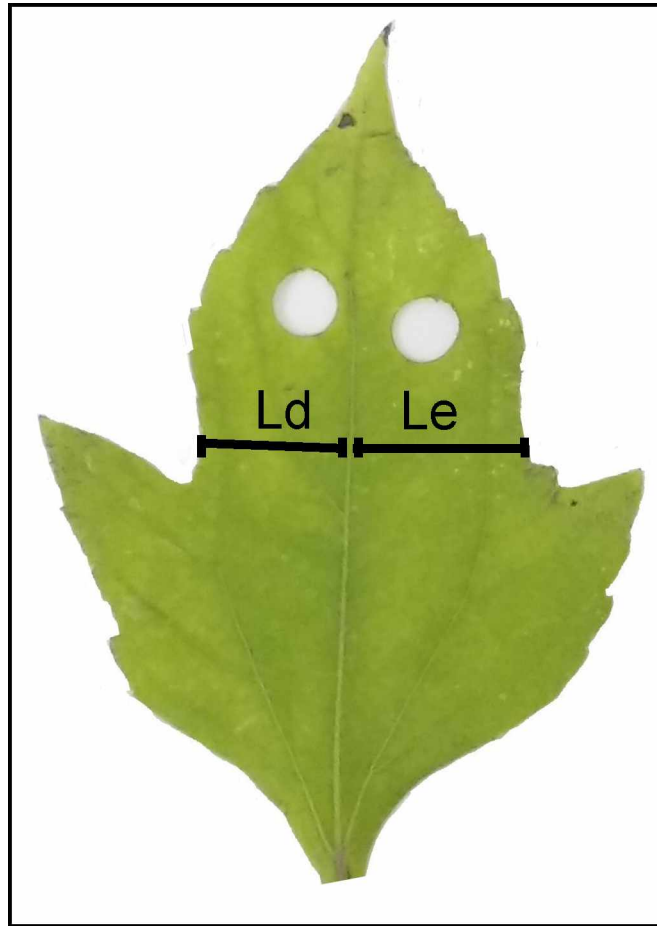
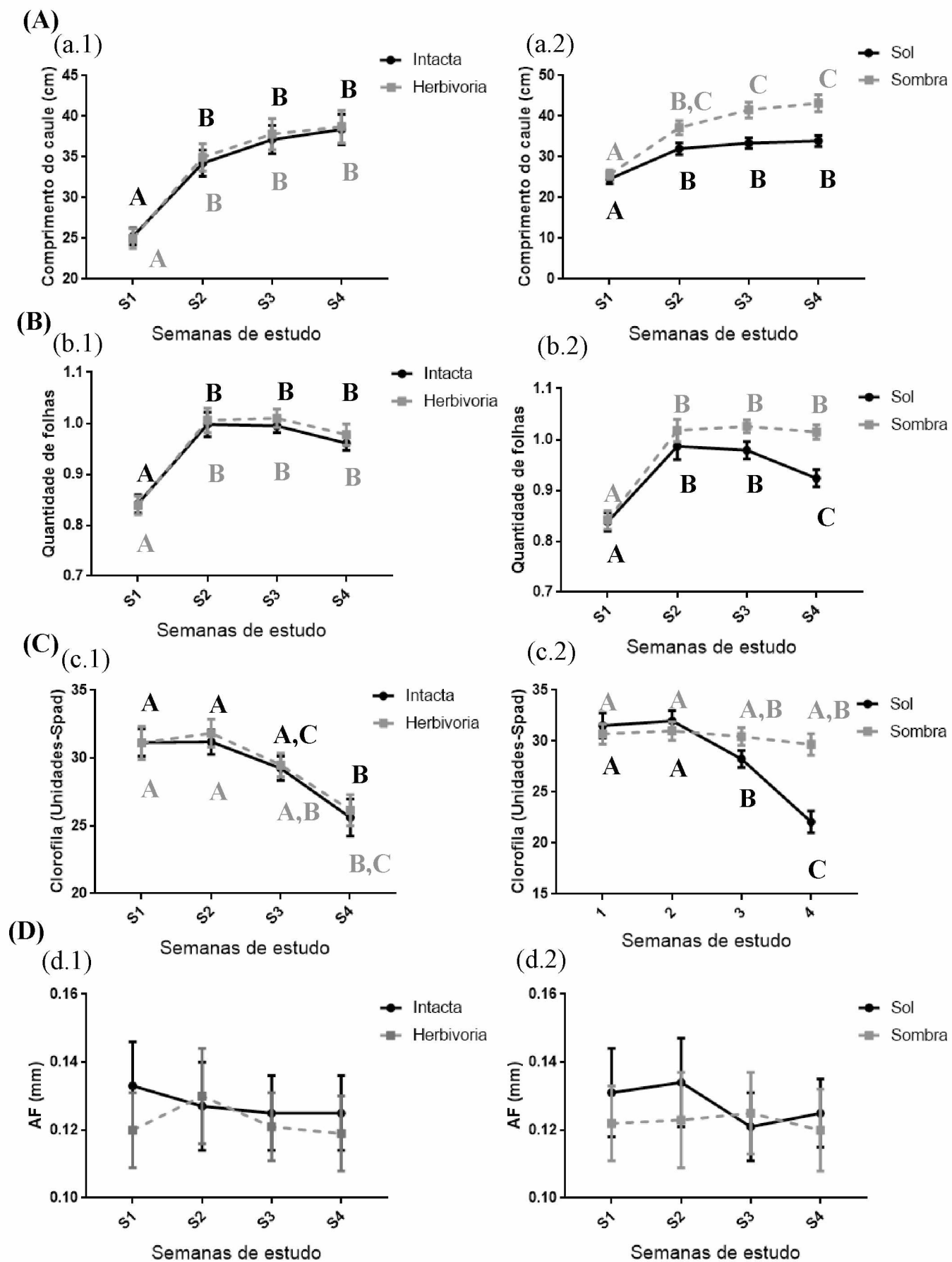


Fig. 2



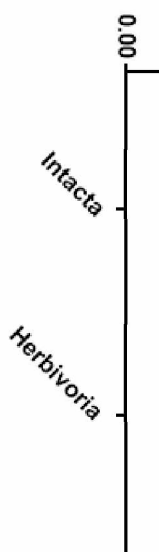
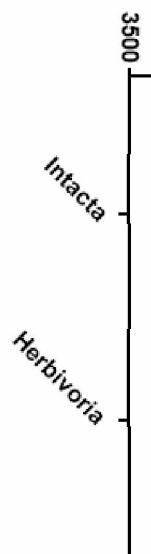


Fig. 3

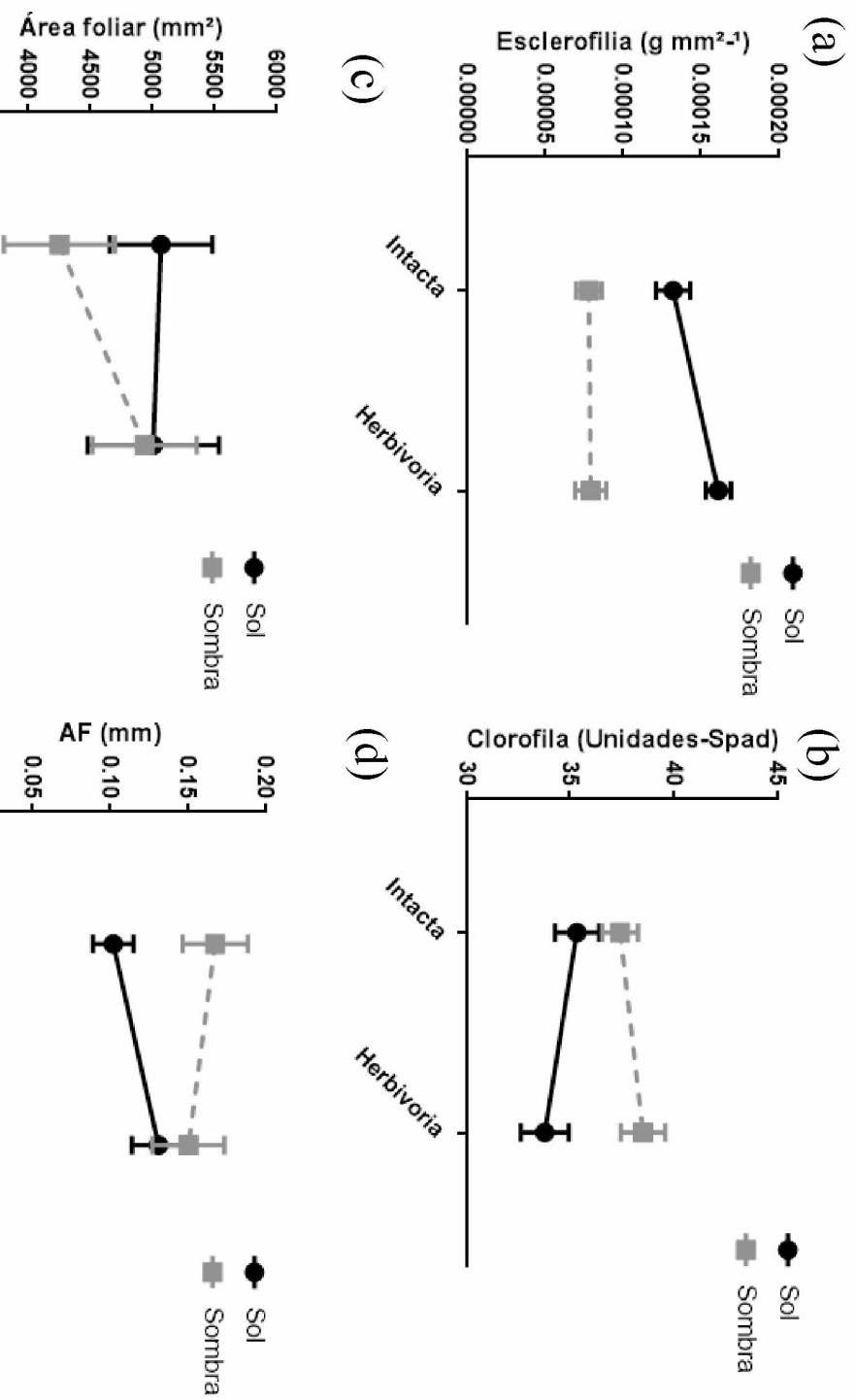
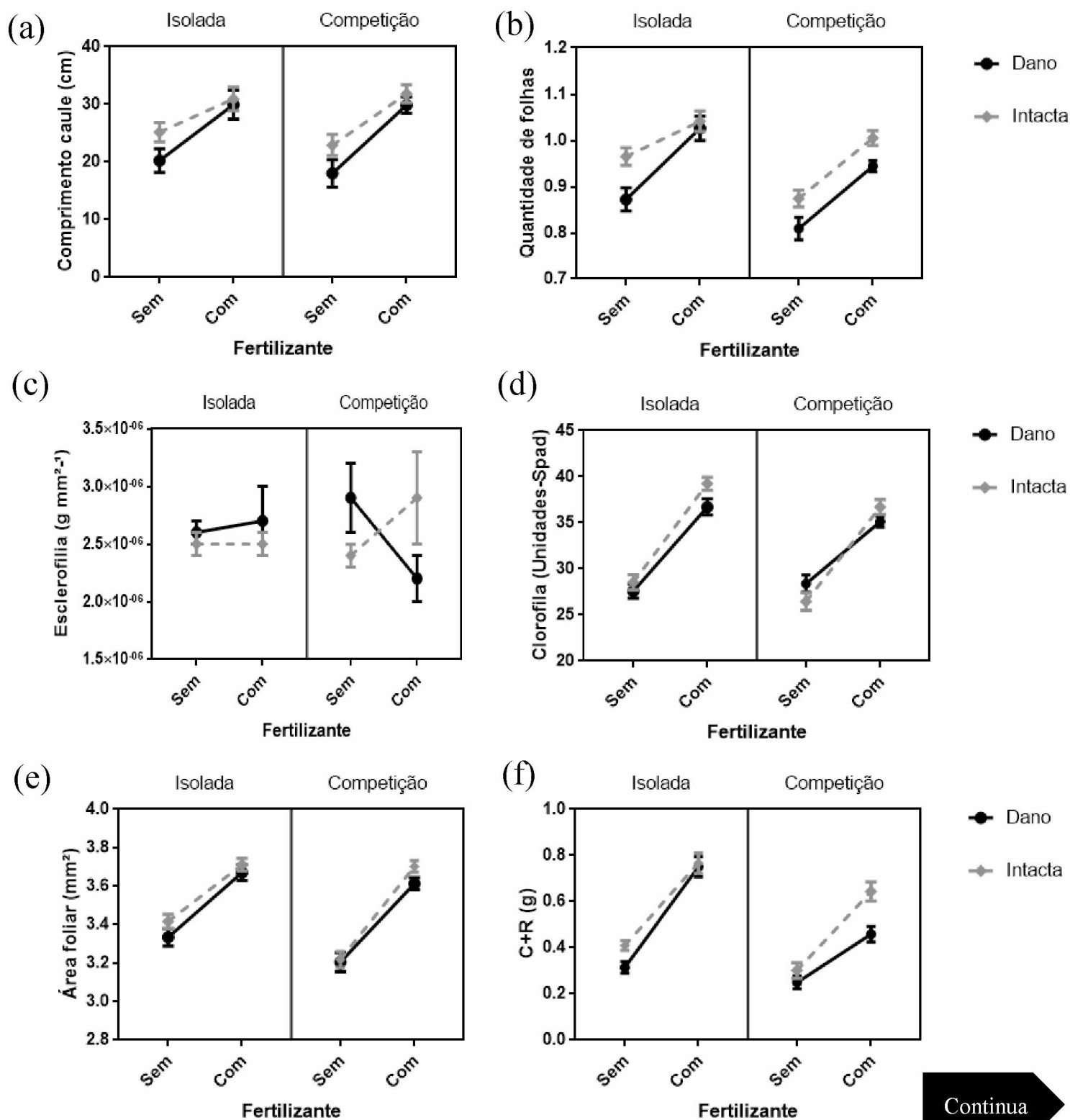
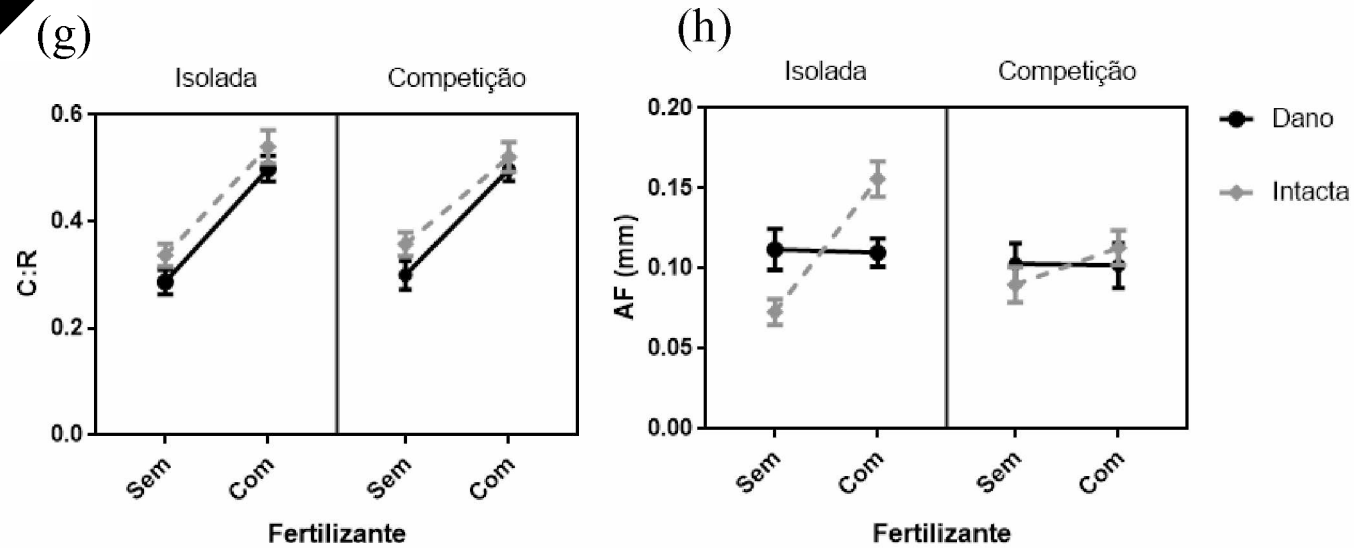


Fig. 4



Continua



Conclusão Geral

No primeiro capítulo, verificamos como a herbivoria pode influenciar nos níveis de AF e nitrogênio das folhas da planta invasora *T. diversifolia*. Os danos de herbivoria aumentaram a AF de folhas que sofreram o tratamento, porém a quantidade de nitrogênio não se diferiu entre o grupo controle e herbivoria. Esses resultados corroboram a hipótese do estresse induzido pela herbivoria, que prediz que danos de herbivoria simulada são capazes de aumentar a AF de folhas. Isso é um importante passo para os estudos de AF, já que poucos estudos avaliaram esta hipótese e a mesma continua muito controversa na literatura.

Para o segundo capítulo, nós demos um passo à frente do primeiro, onde associamos herbivoria simulada com sombreamento, em um experimento; e em outro, a associação de herbivoria simulada, competição edáfica e fertilização. Neste capítulo verificamos como esses fatores isolados e unidos podem influenciar na performance, variação fenotípica e AF de *T. diversifolia*. Nossos resultados indicaram que sombreamento, competição edáfica e elevadas injúrias de herbivoria simulada (danos realizados no segundo experimento) diminuem a performance vegetativa dessa espécie. Porém, esta invasora não apresentou variação fenotípica perante a herbivoria; a mesma ocorreu somente para a condição de sombreamento, onde houve investimento em estruturas caulinares e folhas para aumentar a captação de luz. Também refutamos nossa hipótese de que a herbivoria associada com a competição ou sombreamento diminuiria a performance e também influenciaria na capacidade de variação fenotípica de *T. diversifolia*. Ao contrário das outras condições verificadas, a fertilização aumentou a performance vegetativa dessa espécie, além de diminuir os impactos negativos da herbivoria e competição por recursos do solo. Por fim,

somente sombreamento e fertilização foram capazes de aumentar os níveis de AF, dessa forma refutando a nossa hipótese de que a herbivoria e competição edáfica e a associação de mais de dois fatores ambientais estressantes também aumentariam a instabilidade no desenvolvimento (indicado pela AF). Estes resultados indicam como *T. diversifolia*, pode ser prejudicada ou favorecida por fatores presentes no ambiente, influenciando, dessa forma, no modo que ela estabelecer em determinado habitat. Além disso, nossos resultados reforçam a hipótese que fertilização e sombreamento aumentam a AF de folhas, encorajando mais estudos dentro desses dois temas ainda pouco explorados na literatura de instabilidade no desenvolvimento. Também abrimos mais oportunidades para estudos que explorem mais o quanto é preciso em relação à herbivoria e competição edáfica para que haja aumentos nos níveis de AF em espécies que possuem grande tolerância à esses fatores, como por exemplo, plantas invasoras.

Em suma, este trabalho pode ajudar outros estudos que verifiquem como fatores ambientais e a interação desses podem influenciar na aptidão, e conseqüentemente na capacidade de invasão de *T. diversifolia* e outras plantas invasoras. Da mesma forma, este estudo reforça a ideia do uso da AF como biomonitor de organismos, mais especificamente de espécies invasoras, além de encorajar que outros estudos testem a relação deste indicador de estresse com condições do ambiente em espécies invasoras.