



LIVIA APARECIDA DE SOUZA

**O DILEMA DAS PLANTAS ENTRE CRESCER, DEFENDER-
SE, REPRODUZIR E GERAR DESCENDENTES MAIS
RESISTENTES A INSETOS**

LAVRAS-MG

2019

LIVIA APARECIDA DE SOUZA

**O DILEMA DAS PLANTAS ENTRE CRESCER, DEFENDER-SE, REPRODUZIR E
GERAR DESCENDENTES MAIS RESISTENTES A INSETOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, área de concentração em Entomologia, para a obtenção do título de Doutora.

Prof(a). Dr(a). Maria Fernanda Gomes Villalba Peñaflor
Orientadora

Prof(a). Dr(a). Brígida Souza
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Souza, Livia Aparecida de.

O dilema das plantas entre crescer, defender-se, reproduzir e gerar descendentes mais resistentes a insetos / Livia Aparecida de Souza. - 2019.

98 p. : il.

Orientador(a): Maria Fernanda Gomes Villalba Peñaflores.

Coorientador(a): Brígida Souza.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Interação inseto-planta. 2. Defesas induzidas de plantas. 3. Herbívoros. I. Peñaflores, Maria Fernanda Gomes Villalba. II. Souza, Brígida. III. Título.

LIVIA APARECIDA DE SOUZA

**O DILEMA DAS PLANTAS ENTRE CRESCER, DEFENDER-SE, REPRODUZIR E
GERAR DESCENDENTES MAIS RESISTENTES A INSETOS**

**THE PLANT'S DILEMMA BETWEEN GROWING, DEFENDING, REPRODUCING
AND GENERATING INSECT-RESISTANT DESCENDANTS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, área de concentração em Entomologia, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 06 de dezembro de 2019.

Dr (a). Maria Fernanda Gomes Villalba Peñaflor UFLA

Dr. Alcides Moino Junior UFLA

Dr. Marconi Souza Silva UFLA

Dr (a). Rosangela Cristina Marucci UFLA

Dr (a). Dani Lucas-Barbosa ETH ZURICH

Prof^a: Dr (a). Maria Fernanda Gomes Villalba Peñaflor
Orientadora

Dr (a). Brígida Souza
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2019**

Dedicatória

*Esta tese é dedicada à minha querida sobrinha e afilhada Liz por todo amor e por ser a
minha melhor companhia.*

AGRADECIMENTOS

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

Antes de tudo, o meu primeiro agradecimento é feito a Deus, por me dar muito mais do que eu preciso, por me abençoar e me ensinar a compreender os momentos difíceis. Obrigada Senhor por me guiar sempre para o melhor caminho e por jamais ter me deixado desistir.

Essa jornada certamente não seria concluída com sucesso se ao meu lado não estivessem as pessoas as quais quem merecem o meu sincero agradecimento. Agradeço à minha mãe Luzia, por sua simplicidade de cuidar tão bem da nossa família, por estar me esperando todos os dias com um delicioso almoço e por fazer de tudo para me ver feliz. João, meu pai, por ter arcado com todos os custos dos meus estudos desde a pré-escola, além disso, por jamais ter medido esforços para me ajudar em todas as horas que eu lhe chamei. Pai, você é meu exemplo de luta, forças e de fazer o melhor que podemos. Aos meus irmãos Régis e Aline pelas palavras de incentivo, por acreditarem no meu trabalho e acima de tudo, por me darem os melhores presentes que tenho hoje, meus afilhados Liz e Gael. Eu agradeço carinhosamente a minha pequena Liz, a quem essa tese é dedicada, por ter sido minha melhor companhia nesses quatro anos, com seu amor mais puro e singelo. O amor e apoio tão grande que sempre recebi da minha família foi fundamental para me manter forte a cada etapa da minha graduação e pós-graduação.

Agradeço a minha orientadora e a quem orgulhosamente hoje chamo de amiga, professora doutora Maria Fernanda Peñaflor, por me dar a chance de mostrar o meu trabalho e a minha dedicação. Obrigada por acreditar em mim e confiar no meu potencial como pesquisadora, por ter me ensinado muitas coisas além da Ecologia Química e por ter me abraçado e ter me ouvido em alguns momentos difíceis que passei. Tenho um orgulho imenso da orientadora que eu tive e vou levar seu nome comigo para onde eu for. Minha querida coorientadora, professora doutora Brígida Souza, por ter me acompanhado desde o mestrado, pelos conselhos, pelas palavras de fé e por ter feito de tudo para conseguir os materiais que eu precisei. Aos demais professores do departamento de Entomologia por compartilharem seus conhecimentos e contribuírem para minha formação. Agradeço de forma especial à técnica de laboratório Elaine pelas dicas e auxílio na criação dos insetos, e por sempre estar disposta a me ajudar. Agradeço às meninas auxiliares de limpeza por me receber todos os dias um sorriso no rosto e por cuidarem tão bem do nosso ambiente de trabalho. Aos amigos de laboratório, Ramom e Marina por me ajudarem nas criações dos insetos e nos experimentos de campo. Agradeço aos demais amigos do Laboratório de Ecologia Química, Lara, Patrícia, Fernanda,

Marvin, Bianca e Tatiane pela ajuda em alguns experimentos, pelos momentos de alegria e as horas alegres compartilhadas na sala de estudos. A amizade de vocês foi fundamental para a concretização dessa tese. Também agradeço aos colegas do departamento de Entomologia, em especial a amiga Marília pelo apoio e momentos felizes que compartilhamos juntas.

Agradecimento especial aos meus amigos Antonio e Evanise, meus amigos de muitos anos, meus companheiros, principalmente nas horas tristes, pelas palavras de conforto e por segurarem a minha mão quando eu mais precisei. Vocês me deram forças e me ampararam nos momentos difíceis e isso foi essencial para a concretização desse trabalho.

Sou muito grata a minha terapeuta Valéria Borges por ter me ajudado a enfrentar meus maiores medos e lutas internas. A sua ajuda foi essencial para que eu conseguisse terminar esse trabalho com grande valor e dedicação.

Eu acredito que ninguém vence sozinho, estar junto com quem nos ama é essencial para ter nossas vitórias. Então todas as pessoas mencionadas acima fizeram e fazem a diferença na minha vida. Obrigada de coração por tudo.

Por fim, não menos importante, faço um agradecimento especial a dois seres que são responsáveis pela minha felicidade e por também terem me acompanhado nessa jornada, minhas cachorrinhas Belinha e Xiquinha. Eu amo vocês.

“Faça o teu melhor, na condição que você tem, enquanto você não tem condições melhores, para fazer melhor ainda”

(Mario Sergio Cortella)

RESUMO GERAL

Insetos herbívoros consomem estruturas vegetativas e reprodutivas, comprometendo os recursos energéticos para o crescimento e reprodução das plantas, além de alterações no fenótipo que reduzem a atração de visitantes florais com impactos sobre o *fitness* da planta. Em geral, alterações no fenótipo induzidas pela herbivoria são mecanismos adaptativos de defesa da planta que são ativados somente na presença de herbívoros. Desse modo, essa plasticidade no balanço energético entre crescer, reproduzir e se defender pela planta é uma adaptação frente à variação da pressão da herbivoria no espaço e tempo. Algumas características do fenótipo induzido pela herbivoria podem ainda ser transmitidas para as gerações subsequentes, fenômeno conhecido como resistência transgeracional. Esse estudo investigou se a herbivoria pelo besouro *Diabrotica speciosa* em plantas de pimentão *Capsicum annuum* altera a atratividade aos visitantes florais e reprodução da geração maternal, e se afeta a resistência da progênie contra herbívoros coespecíficos e não coespecíficos. Também foi avaliado se a herbivoria maternal por um inseto sugador, o pulgão *Myzus persicae*, altera as defesas direta e indireta das plantas da geração seguinte com consequências no alocamento energético para o crescimento e reprodução. Em campo, verificou-se que a herbivoria por *D. speciosa* diminuiu a abundância, riqueza e diversidade, além de ter alterado a composição da comunidade de insetos visitantes florais nas plantas, mudanças que foram associadas à redução no tamanho e número de frutos e sementes. A herbivoria por *D. speciosa* tornou as progênies das duas gerações seguintes mais suscetíveis à herbivoria de coespecíficos. Porém, esses descendentes tornaram-se mais resistentes ao pulgão, sugerindo que as vias de sinalização que regulam as defesas contra o mastigador e sugador são distintas. Ao mesmo tempo, a progênie de plantas infestadas por *D. speciosa* investiram maior energia no crescimento e reprodução, pois apresentaram maior taxa de germinação, maior peso seco e produziram mais flores, frutos e sementes comparadas com a progênie de plantas não infestadas. Já quando as plantas-mãe foram infestadas por *M. persicae*, a progênie foi mais resistente à subsequente herbivoria por *M. persicae*, ao mesmo tempo em que a taxa de germinação e o crescimento vegetativo foram menores em relação àquelas de plantas não infestadas. A maior resistência à herbivoria da progênie de plantas infestadas coincidiu com um incremento de aproximadamente 60% no nível de fenóis totais em relação à progênie de plantas não infestadas. Além disso, a concentração desse fitoquímico foi ainda maior na progênie de plantas infestadas, quando expostas a subsequente herbivoria por *M. persicae*. A herbivoria materna por *M. persicae* também provocou aumento das defesas indiretas na progênie, pois o parasitoide do pulgão, *Aphidius platensis* preferiu os voláteis induzidos pela herbivoria emitidos pela progênie de plantas infestadas frente àqueles emitidos pela progênie de plantas não infestadas. Em conclusão, os resultados mostraram que a herbivoria por *D. speciosa* implica em custos diretos e indiretos para a planta de pimentão e, dependendo da identidade do herbívoro, a planta transfere informações diferentes para os descendentes que implicam em estratégias distintas na partição energética entre crescimento, defesa e reprodução.

Palavras-chave: Defesa indireta. Defesas induzidas de plantas. Herbívoros. Interação inseto-planta; Plasticidade fenotípica. Resistência transgeracional. Visitantes florais.

ABSTRACT

Herbivorous insects feed on vegetative and reproductive structures, compromising energy resources for plant growth and reproduction. Herbivory also causes indirect costs when herbivory-induced phenotype changes reduce flower attractiveness to visitors with consequences to plant fitness. In general, these herbivory-induced phenotype changes are adaptive plant defense mechanisms that are activated only in the presence of herbivores. Thus, this plasticity in the energetic balance among growth, reproduction and defense is an adaptation to varying herbivore pressure in space and time. Some of the herbivory-induced traits can be transmitted to subsequent generations, phenomenon known as transgenerational resistance. This study aimed to evaluate if herbivory by beetle *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) in sweet pepper plants *Capsicum annuum* L. (Solanaceae) alters the attractiveness to floral visitors and plant reproduction of the maternal generation; and affects progeny resistance to conspecific and non-conspecific herbivores. It was also investigated if maternal herbivory by a sucking insect, the aphid *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae), enhances plant resistance of the next generation with consequences for energy allocation to growth and reproduction. In the field, it was verified that herbivory by *D. speciosa* in sweet pepper plants decreased abundance, richness and diversity, and altered the composition of the floral visiting insect community, changes that were associated with the reduction in size and number of fruits and seeds. Herbivory by *D. speciosa* progenies decreased progeny resistance to conspecifics. However, progeny were more resistant to the non-conspecific aphid, suggesting that the signaling pathways that regulate defenses against chewing and sucking are distinct. At the same time, progeny plants of herbivore-infested plants invested more energy to growth and reproduction, because they exhibited higher germination rates, greater dry weight and produced more flowers, fruits and seeds compared to progeny plants of uninfested plants. When mother plants were infested with *M. persicae*, the progeny became more resistant to the subsequent *M. persicae* herbivory, while germination rate and vegetative dry weight were reduced relative to progeny of uninfested plants. The higher herbivory resistance of the progeny of infested plants coincided with an increase of approximately 60% in the level of total phenols in relation to the progeny of uninfested plants. In addition, the concentration of this phytochemical was even higher in the progeny of infested plants when exposed to subsequent *M. persicae* herbivory. Maternal herbivory by *M. persicae* also caused an increase in indirect defenses in the progeny, because the parasitoid, *Aphidius platensis* (Brethes) (Hymenoptera: Braconidae) preferred herbivory-induced volatiles emitted by progeny of infested plants against those emitted by progeny plants of uninfested plants. In conclusion, the results showed that herbivory by *D. speciosa* causes direct and indirect costs for sweet pepper plant and, depending on the herbivore's identity, the plant transfers different information to the offspring, implying different strategies in the energy partition between growth, defense and reproduction.

Keywords: Floral visitors. Indirect defense. Induced plant defenses. Herbivores. Insect-plant interactions. Phenotypic plasticity. Transgenerational resistance.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	12
1 INTRODUÇÃO GERAL	12
REFERÊNCIAS	16
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	21
ARTIGO 1 Herbivory in sweet pepper plant affects attractiveness to floral visitors and the plant reproduction	21
ARTIGO 2 Plantas de pimentão sob herbivoria produzem descendentes com maior vigor vegetativo e reprodutivo, porém menos resistentes a <i>Diabrotica speciosa</i>	44
ARTIGO 3 A herbivoria em plantas de pimentão por <i>Myzus persicae</i> promove resistencia transgeracional com custos para o crescimento e reprodução	70
CONSIDERAÇÕES FINAIS	96

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

As plantas interagem com uma grande diversidade de insetos, que atuam como herbívoros, polinizadores, decompositores ou dispersores de sementes. Essas interações podem ser mutualísticas, como a polinização, ou antagônicas, sendo a herbivoria uma das mais importantes dessas relações (SCHOONHOVEN; VAN LOON; DICKE, 2005; PRICE et al., 2011; DICKE, 2016). Insetos herbívoros podem consumir tecidos vegetativos (folhas, brotos e caules), o que reduz a capacidade de fotossíntese e pode levar a consequências na reprodução, assim como os próprios tecidos reprodutivos (botões florais, flores e frutos), impactando diretamente o *fitness* das plantas (STRAUSS; CONNER; RUSH, 1996; SCHOONHOVEN; VAN LOON; DICKE, 2005; PRICE et al., 2011). Dessa forma, a pressão exercida pelos insetos herbívoros fez com que, evolutivamente, as plantas desenvolvessem mecanismos de defesa para diminuir ou evitar o ataque desses organismos, garantindo o seu sucesso reprodutivo (STRAUSS; AGRAWAL, 1999; KARBAN; AGRAWAL, 2002).

Os mecanismos de defesa das plantas consistem em características físicas e químicas constitutivas, isto é, que são expressas independente de qualquer estresse (GATEHOUSE, 2002). Estruturas físicas, como espinhos, ceras e tricomas, servem como barreiras físicas dificultando o acesso do herbívoro à planta. Já as defesas químicas constitutivas compreendem substâncias tóxicas, antinutritivas, deterrentes e/ou repelentes aos herbívoros (GATEHOUSE, 2002; CHAUDHARY et al., 2018). Mediante a ação de herbívoros, maior energia é alocada para a síntese de novos compostos de defesa, além do aumento da concentração dos já existentes. Essas defesas são denominadas induzidas e atuam diretamente no comportamento e biologia do herbívoro, e indiretamente, por meio da liberação de voláteis de planta induzidos pela herbivoria (*herbivore-induced plant volatiles*, HIPVs), que servem como importantes pistas químicas para os inimigos naturais na localização de suas presas/hospedeiros (PRICE et al., 1980; DICKE et al., 1990; TURLINGS; TUMLINSON; LEWIS, 1990; PARÉ; TUMLINSON, 1999). A síntese das defesas induzidas implica em alto custo energético para a planta devido à expressão de enzimas envolvidas em rotas bioquímicas moduladas pela ação dos fitormônios ácido jasmônico, ácido salicílico e etileno (REYMOND; FARMER, 1998; THALER, 1999; KESSLER; BALDWIN, 2002; PIETERSE; DICKE, 2007; PINTO-ZEVALLOS et al., 2013). Esses fitormônios são moléculas sinalizadoras que induzem resposta da planta à herbivoria, ativando genes responsáveis pela síntese de compostos de defesas, de

acordo com a identidade ou guilda alimentar do inseto herbívoro. A herbivoria por insetos sugadores geralmente ativa respostas moduladas pelo ácido salicílico (AS), enquanto insetos mastigadores ativam, principalmente, respostas reguladas pelo ácido jasmônico (AJ) (KEMPEMA et al., 2007; PINTO-ZEVALLOS et al., 2013; ZARATE; KEMPEMA; WALLING, 2007). Ecologicamente, esta especificidade na resposta das plantas dependendo do herbívoro é importante, pois mostra a íntima interação entre a alimentação do inseto e o sistema de defesa induzida da planta (OLIVEIRA; PAREJA, 2014). Assim, o mecanismo de defesa induzida pela herbivoria é uma estratégia importante para direcionar energia para defesa somente quando necessário (AGRAWAL; KARBAN, 1999).

Como consequência da infestação por herbívoros, o crescimento e reprodução da planta pode ser negativamente afetado devido ao realocamento energético em defesa contra a herbivoria, conhecido como *trade-off*, que é uma estratégia adaptativa da planta, pois permite a sua sobrevivência e reprodução frente a estresses (HERMS; MATTSON, 1992; AGRAWAL, 1999). Portanto, o *trade-off* no alocamento energético tem impactos fundamentais na evolução das estratégias de defesa da planta, uma vez que a alocação de recursos para a defesa pode ocorrer às custas do investimento na reprodução (SCHIESTL et al., 2014; MOTHERSHEAD; MARQUIS, 2000).

Além dos custos diretos da herbivoria, a expressão das defesas induzidas pode afetar de maneira indireta a reprodução da planta devido a alterações de pistas químicas que são importantes nas interações com insetos polinizadores. Alterações no alocamento energético para a expressão de defesas induzidas pela herbivoria, assim como as alterações químicas induzidas pela herbivoria, podem levar a modificações nas recompensas florais. Assim, se o investimento em energia da planta for direcionado para defesas induzida contra herbívoros, os investimentos em tecidos reprodutivos podem ser comprometidos, incluindo a produção de pólen e néctar (LUCAS-BARBOSA et al., 2011). Insetos herbívoros podem alterar qualitativa e quantitativamente o néctar e pólen, assim como a fragrância floral, recompensas importantes na atração de visitantes florais (STRAUSS; CONNER; RUSH, 1996; STRAUSS, 1997; ADLER et al., 2006; BRUINSMA et al., 2008; PAREJA et al., 2012; BRUINSMA et al., 2014). Dessa maneira, modificação na fragância floral torna as flores menos atrativas aos insetos visitantes florais (STRAUSS; CONNER; RUSH, 1996; LEHTILA; STRAUSS, 1997; KESSLER; HALITSCHKE, 2009; KESSLER; HALITSCHKE; POVEDA, 2011; LUCAS-BARBOSA; VAN LOON; DICKE, 2011) com consequências na produção de frutos e sementes (POVEDA et al., 2003; SCHIESTL et al., 2014; LUCAS-BARBOSA et al., 2015).

Um outro mecanismo adaptativo da planta contra a pressão pela herbivoria é a transferência do fenótipo induzido para a progênie, denominado de resistência transgeracional. Por meio da herança epigenética, a progênie torna-se mais bem defendida do que aquela cujos parentais não foram atacados por herbívoros (WEINHOLD, 2017). Assim, a herança epigenética da resistência induzida é um importante mecanismo fenotipicamente plástico para o aumento de defesa das plantas contra herbivoria entre gerações (AGRAWAL, 2001; RASMANN et al., 2012; HOLESKI et al., 2013). Esse fenômeno foi primeiramente comprovado nos estudos de Agrawal, Laforsch e Tollrian (1999) e Agrawal (2001) com *Raphanus raphanistrum* L. (Brassicaceae), sob a herbivoria da lagarta *Pieris rapae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae). Estudos subsequentes também comprovaram o efeito transgeracional da resistência induzida em plantas herbáceas, como tomate e tabaco (Solanaceae), e *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Brassicaceae), sob a herbivoria de insetos mastigadores (VAN DAM; BALDWIN, 2001; RASMAN et al., 2012). Até hoje, a resistência transgeracional induzida por fitopatógenos é mais conhecida (HOLESKI et al., 2012), enquanto pouco se sabe a respeito dessa herança induzida pela herbivoria e mais estudos são necessários abordando outros sistemas.

A planta de pimentão (*Capsicum annuum* L.) (Solanaceae) é originária da Mesoamérica (EBEN; MONTEROS, 2013; KRAFT et al., 2014), de um ancestral perene, de ciclo de vida curto, constituído de arbustos de quatro metros de altura, com frutos pequenos e dispersos por pássaros (HERNANDÉZ-VERDUGO; LUNA-REYES; OYAMA, 2001). Após serem domesticadas, plantas de pimentão são cultivadas como anuais e atualmente é considerada uma das dez espécies de maior importância econômica no mercado brasileiro de hortaliças (CHARLO et al., 2011; AGRIANUAL, 2018). Produz grande quantidade de sementes e hospeda uma ampla gama de insetos herbívoros, como besouros, afídeos, lagartas, e tripes, os quais acarretam perdas significativas na produção (FRANÇA; BARBOSA; ÁVILA, 1984). No entanto, o pimentão produz uma série de metabólitos secundários, dentre eles, compostos fenólicos, os quais desempenham um papel importante na defesa e resistência a insetos. Dessa maneira, o pimentão constitui um sistema modelo para estudar a influência da herbivoria na atração de visitantes florais, reprodução e na resistência transgeracional. Embora as flores de *C. annuum* sejam em grande parte monóicas e autógamias, a polinização por insetos, principalmente abelhas e sirfídeos, possui efeito positivo na qualidade dos frutos, reduzindo as malformações e produzindo frutos maiores (MCGREGOR, 1976; JARLAN et al., 1997; CRUZ et al., 2005).

Dentre os herbívoros presentes na cultura do pimentão, destacam-se o besouro desfolhador *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) e o pulgão-verde *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). Conhecidos popularmente como brasileirinhos, adultos de *D. speciosa*, apesar de polívoros, podem ser encontrados em plantas de pimentão consumindo folhas, flores e botões florais (WALSH, 2003; LEITE et al., 2011). As fêmeas do besouro, no entanto, não depositam seus ovos em plantas de pimentão, provavelmente, porque as raízes não são adequadas para a alimentação das larvas. Por isso, elas migram para cultivos vizinhos de milho para depositar seus ovos no solo e completar o ciclo (GASSEN, 1989). Já o pulgão-verde, *M. persicae*, é considerado uma das principais pragas do pimentão, pois suas infestações podem causar a morte da planta (de MOURA; GUIMARÃES; LIMA, 2015; ALASERHAT; CANBAY, 2017). A sucção da seiva do floema não só causa danos diretos, mas também indiretos por atuarem como vetores de viroses de plantas e excretarem *honeydew* que, sobre os tecidos vegetais, propicia o crescimento da fumagina (FRANÇA; BARBOSA, ÁVILA, 1984; ALEGBEJO; ABO, 2002; WEINTRAUB, 2007).

Assim, o objetivo geral dessa tese consistiu em investigar os custos da herbivoria pelo besouro *D. speciosa* na visitação floral e reprodução de plantas de pimentão, assim como os efeitos transgeracionais da herbivoria pelo besouro sobre o crescimento, defesa e reprodução. Por último, avaliou-se o efeito transgeracional da herbivoria materna por um inseto sugador, *M. persicae*, nas defesas diretas e indiretas. Para os dois últimos objetivos, foram mensurados os fenóis totais das gerações parentais e da progênie como um grupo fitoquímico *proxy* envolvido na resistência da planta de pimentão à herbivoria (VIJAIYA; RANI, 2017; MACEL et al., 2019). Foram testadas as seguintes hipóteses: (i) a herbivoria por *D. speciosa* altera a estrutura e composição da comunidade de visitantes florais com consequências para a produção de frutos e sementes; (ii) a herbivoria por *D. speciosa* em plantas de pimentão induz resistência na progênie de plantas de pimentão contra a herbivoria de coespecíficos e heteroespecíficos; (iii) a resistência da progênie provinda de plantas sob herbivoria por *D. speciosa* implica em custos para o crescimento/reprodução; (iv) a herbivoria materna por *D. speciosa* altera os níveis de fenóis da progênie (v) a herbivoria por *M. persicae* em plantas maternas induz resistência na progênie de plantas de pimentão contra coespecíficos; (vi) a resistência da progênie provinda de plantas sob herbivoria por *M. persicae* implica em custos para o crescimento/reprodução; e (vii) a herbivoria materna por *M. persicae* altera os níveis de fenóis constitutivos e induzidos da progênie. Dessa forma, este estudo buscou fornecer informações sobre algumas das complexas interações que ocorrem entre as plantas e seus herbívoros, e como afetam as relações da planta com os insetos visitantes florais.

REFERÊNCIAS

- ADLER, L. S. et al. Leaf herbivory and nutrients increase nectar alkaloids **Ecololy Letters**, v. 9, p. 960-967, 2006.
- AGRAWAL, A. A.; KARBAN, R. Why induced defenses may be favored over constitutive strategies in plants. In: TOLLRIAN, R.; HARVELL, C. D. (Eds.). **Ecology and evolution of inducible defenses**. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, p. 45-61, 1999.
- AGRAWAL, A. A.; LAFORSCH, C.; TOLLRIAN, R. Transgenerational induction of defences in animals and plants. **Nature**, v.401, n. 2, p. 60-63, 1999.
- AGRAWAL, A. A. Transgenerational Consequences of Plant Responses to Herbivory: An adaptive maternal effect? **The American Naturalist**, v. 157, p. 555-569, 2001.
- AGRIANUAL, F. N. P. Anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2018.
- ALASERHAT, Í.; CANBAY, A. Aphididae species, their parasitoids, predators, and parasitism rates on pepper (*Capsicum annum L.*). **Entomological News**, p. 36–50, 2017.
- ALEGBEJO, MD, ABO ME. Ecology, epidemiology and control of pepper veinal mottle virus (PVMV), genus Potyvirus, in West Africa. **Journal of Sustainable Agriculture**, p. 5-16, 2000.
- BRUINSMA, M. et al. Differential effects of jasmonic acid treatment of *Brassica nigra* on the attraction of pollinators, parasitoids, and butterflies. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 128, p. 109-116, 2008.
- BRUINSMA, M. et al. Folivory affects composition of nectar, floral odor and modifies pollinator behavior. **Journal of Chemical Ecology**, v. 40, p. 39-49, 2014.
- CAPINERA, J. **Handbook of vegetable pests**. Elsevier, 2001.
- CHARLO H. C. O. et al. Growth analysis of sweet pepper cultivated in coconut fiber in a greenhouse. **Horticultura Brasileira**, v. 29, p. 316-323, 2011.
- CHAUDHARY, A. et al. Plant defenses against herbivorous insects: A Review. **International Journal of Chemical Studies**, v.6, p.681-688, 2018.
- CRUZ, D. O. et al. Pollination efficiency of the stingless bee *Melipona subnitida* on greenhouse sweet pepper. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.40, p.1197-1201, 2005.
- DICKE, M. et al. Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals: Prospects for application in pest control. **Journal of Chemical Ecology**, v. 16, p. 3091-3118, 1990.
- DICKE, M. Plant phenotypic plasticity in the phytobiome: a volatile issue. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 32, p. 17-23, 2016.

de MOURA, A. P.; GUIMARAES, J.; LIMA, M. Guia prático para o reconhecimento e monitoramento das principais pragas na produção integrada do pimentão. **Embrapa Hortaliças Documentos (INFOTECA-E)**, 2015.

EBEN, A., & DE LOS MONTEROS, A.E. Tempo and mode of evolutionary radiation in Diabroticina beetles (genera *Acalymma*, *Cerotoma*, and *Diabrotica*). **ZooKeys**, 332, p. 207, 2013.

FRANÇA, F. H.; BARBOSA, S.; ÁVILA, A. C. Pragas do pimentão e da pimenta: características e métodos de controle. **Embrapa Hortaliças-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 1984.

GASSEN, D.N. Insetos subterrâneos prejudiciais às culturas no sul do Brasil. Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 49p. (Embrapa-CNPT. Documentos, 13), 1989.

GATEHOUSE, J. A. Plant resistance towards insect herbivores: A dynamic interaction. **New Phytologist**, v. 156, p.145-169, 2002.

HERMS, D. A.; MATTSON, W. J. The dilemma of plants: to grow or to defend. **The Quarterly Review of Biology**, v. 67, p. 283-335, 1992.

HERNÁNDEZ-VERDUGO, S.; LUNA-REYES, R.; OYAMA, K. Genetic structure and differentiation of wild and domesticated populations of *Capsicum annuum* (Solanaceae) from Mexico. **Plant Systematics and evolution**, v. 226, p. 129-142, 2001.

HOLESKI, L. M.; JANDER, G.; AGRAWAL, A. A. Transgenerational defense induction and epigenetic inheritance in plants. **Trends in ecology & Evolution**, v. 27, p. 618-26, 2012.

HOLESKI, L. M. et al. Transgenerational effects of herbivory in a group of long-lived tree species: maternal damage reduces offspring allocation to resistance traits, but not growth. **Journal of Ecology**, v. 101, p.1062-1073, 2013.

JARLAN, A.; OLIVEIRA, D. de; GINGRAS, J. Pollination of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) in greenhouse by the syrphid fly *Eristalis tenax* L. **Acta Horticulturae (ISHS)**, v.437, p.335-340, 1997.

KARBAN, R.; AGRAWAL, A. A. Herbivore Offense. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 33, p. 641-664, 2002.

KEMPEMA, L. A. et al. Arabidopsis transcriptome changes in response to phloemfeeding silverleaf whitefly nymphs. Similarities and distinctions in responses to aphids. **Plant Physiology**, v. 143, p. 849-865, 2007.

KESSLER, A.; BALDWIN, I. T. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 299–328, 2002.

KESSLER, A., HALITSCHKE, R. Testing the potential for conflicting selection on floral chemical traits by pollinators and herbivores: predictions and case study. **Functional Ecology**, v. 23, p. 901-912, 2009.

- KESSLER, A.; HALITSCHKE, R.; POVEDA, K. Herbivory-mediated pollinator limitation: negative impacts of induced volatiles on plant-pollinator interactions. **Ecology**, v. 92, p. 1769-1780, 2011.
- KRAFT, K. H. et al. Multiple lines of evidence for the origin of domesticated chili pepper, *Capsicum annuum*, in Mexico. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, p. 6165-6170, 2014.
- LEHTILA, K.; STRAUSS, S. Y. Leaf damage by herbivores affects attractiveness to pollinators in wild radish, *Raphanus raphanistrum*. **Oecologia**, v. 111, p. 396-403, 1997.
- LEITE, G. L.; PICANÇO, M.; ZANUNCIO, J. C. et al. Hosting capacity of horticultural plants for insect pests in Brazil. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 71, p. 383, 2011.
- LUCAS-BARBOSA, D.; VAN LOON, J. J. A.; DICKE, M. The effects of herbivore-induced plant volatiles on interactions between plants and flower-visiting insects. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1647-1654, 2011.
- LUCAS-BARBOSA, D. et al. Seed set of mustard plants is compromised in the absence of natural enemies of herbivores. In: LUCAS-BARBOSA, D. **Tales on insect-flowering plant interactions: The ecological significance of plant responses to herbivores and pollinators**. PhD thesis, Wageningen University, p. 115-132, 2015.
- MACEL M. et al. Metabolomics of Thrips Resistance in Pepper (*Capsicum* spp.) Reveals Monomer and Dimer Acyclic Diterpene Glycosides as Potential Chemical Defenses. **J. Chem. Ecol.**, v. 8, p. 1-2, 2019.
- MCGREGOR, S.E. **Insect pollination of cultivated crop plants**. DC: USDA, 1976. 411p.
- MOTHERSHEAD, K.; MARQUIS, R. J. Fitness impacts of herbivory through indirect effects on plant-pollinator interactions in *Oenothera macrocarpa*. **Ecology**, v. 81, p. 30-40, 2000.
- OLIVEIRA, M. S.; PAREJA, M. Attraction of a ladybird to sweet pepper damaged by two aphid species simultaneously or sequentially. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 8, p. 547-555, 2014.
- PARÉ, P. W.; TUMLINSON, J. H. Plant Volatiles as a defense against insect herbivores. **Plant Physiology**, v. 121, p. 325-331, 1999.
- PAREJA, M. et al. Herbivory by a phloem-feeding insect inhibits floral volatile production. **Plos One**, v. 7, e3197, 2012.
- PIETERSE, C. M. J.; DICKE, M. Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology. **Trends in Plant Science**, v. 12, p. 564-569, 2007.
- PINTO-ZEVALLOS, D. M. et al. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. **Química Nova**, v. 36, p. 1395-1405, 2013.

POVEDA, K. et al. Effects of below- and above-ground herbivores on plant growth, flower visitation and seed set. **Oecologia**, v. 135, p. 601-605, 2003.

PRICE, P. W. et al. Interactions among three trophic levels: Influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 11, p. 41–65, 1980.

PRICE, P. W. et al. **Insect ecology: behavior, populations and communities**. Cambridge University Press., 2011.

RASMANN, S. et al. Herbivory in the previous generation primes plants for enhanced insect resistance. **Plant Physiology**, v. 158, p. 854-863, 2012.

REYMOND, P.; FARMER, E. E. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 1, p. 404–411, 1998.

SCHIESTL, F. P. et al. Herbivory and floral signaling: phenotypic plasticity and tradeoffs between reproduction and indirect defense. **New Phytologist**, v. 203, p. 257-266, 2014.

SCHOONHOVEN, L. M.; VAN LOON, J. J. A.; DICKE, M. 2005. **Insect-Plant Biology**. 2nd ed. Oxford, 2005, 421 p.

STRAUSS, S. Y.; CONNER, J. K.; RUSH, S. L. Foliar Herbivory Affects Floral Characters and Plant Attractiveness to Pollinators: Implications for Male and Female Plant Fitness. **The American Naturalist**, v. 147, p. 1098-1107, 1996.

STRAUSS, S.Y. Floral characters link herbivores, pollinators, and plant fitness. **Ecology**, v. 78, p. 1640–1645, 1997.

STRAUSS, S. Y.; AGRAWAL, A. A. The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 14, p. 179-185, 1999.

THALER, J. S. Jasmonate-inducible plant defences cause increased parasitism of herbivores. **Nature**, v. 399, p. 686–688, 1999.

TURLINGS, T. C.; TUMLINSON, J. H.; LEWIS, W. J. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. **Science**, v. 250, p. 1251–3, 1990.

VAN DAM, N.; BALDWIN, I. Competition mediates costs of jasmonate induced defences, nitrogen acquisition and transgenerational plasticity in *Nicotiana attenuata*. **Functional Ecology**, v. 15, p. 406–415, 2001.

VIJAYA, M.; RANI, P. U. Defensive responses in *Capsicum annuum* (L) plants, induced due to the feeding by different larval instars of *Spodoptera litura* (F). **Arthropod-Plant Interactions**, v. 11, p.193-202, 2017.

WALSH, G. C. Host range and reproductive traits of *Diabrotica speciosa* (Germar) and *Diabrotica viridula* (F.) (Coleoptera: Chrysomelidae), two species of South American pest rootworms, with notes on other species of Diabroticina. **Environmental entomology**, v.32, p. 276-285, 2003.

WEINHOLD, A. Transgenerational stress-adaption: an opportunity for ecological epigenetics. **Plant cell reports**, v. **37**, p. 3-9, 2017.

WEINTRAUB, P. G. Integrated control of pests in tropical and subtropical sweet pepper production. **Pest Management Science**, v. **63**, p. 753-760, 2007.

ZARATE, S. I.; KEMPEMA, L. A.; WALLING, L. L. Silverleaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. **Plant Physiology**, v. **143**, n. **2**, p. 866-875, 2007.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS**ARTIGO 1 Herbivory in sweet pepper plant affects attractiveness to floral visitors and the reproduction: a field study**

(Manuscript written following Arthropod-Plant Interactions' guidelines)

Livia Aparecida de Souza¹, Brígida Souza¹; Ramom Vasconcelos Pereira¹, Mírian Nunes Morales¹, Maria Fernanda G. V. Peñaflor¹

¹Departament of Entomology, Universidade Federal de Lavras – UFLA, 37200-000 Lavras, MG, Brasil. liviasouzaento@gmail.com

* **Corresponding author:** Maria Fernanda G. V. Peñaflor. Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG, Brasil, Campus Universitário, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Telefone (35) 3829 - 1287
E-mail: fernanda.penaflor@gmail.com

1 Abstract

2 Herbivory induces changes in plants that may compromise the attractiveness to floral visitors
3 with potential consequences to reproduction. As a result of the strong selection pressure exerted
4 by herbivores, several plant defense mechanisms evolved to decrease or prevent the attack. One
5 of the adaptations developed by plants consists of a trade-off in energy allocation for synthesis
6 of induced defenses against herbivory at the expense of growth and reproduction. We
7 investigated how herbivory in sweet pepper plants, *Capsicum annuum* L. (Solanaceae), by
8 *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) affects the community structure
9 and composition of insect floral visitors and assessed costs to plant reproduction. The plants
10 were grown in an experimental field and were infested with adult beetles from the beginning of
11 the vegetative stage until flowering. Herbivory influenced flower attractiveness to insects
12 visiting flowers, as they more frequently visited flowers of uninfested plants than those of
13 herbivore-infested plants. The greatest abundance of floral visiting insects was *Apis mellifera*
14 (L.) (Hymenoptera: Apidae) *Toxomerus* spp. and *Trigona spinipes* (Fabr.) (Hymenoptera:
15 Apidae), and these species visited less infested plant than uninfested plants. Plants infested by
16 *D. speciosa* had lower species richness and diversity than uninfested plants. Plant reproduction
17 was also affected by herbivory. Herbivore-infested plants produced lower numbers of flowers
18 and fruits, and fewer seeds per fruit than uninfested plants. Our results suggest that the damage
19 caused by *D. speciosa* has resulted in direct and indirect costs to the plants, resulting in changes
20 in fitness.

21

22 **Keywords:** Bees. Cucurbit beetle. Induced defence. Syrphids.

23 **Introduction**

24 Insects play an important role in plant reproduction and survival, as approximately two-
25 thirds of plant species depend exclusively on these organisms for pollination (Myers 1996;
26 Klein et al. 2007; Davis et al. 2014). To ensure their reproductive success, plants produce
27 flowers that exhibit visual (color, size and shape) and chemical (olfactory and gustatory)
28 characteristics (Poveda et al. 2005; Harder and Barrett 2006; Lucas-Barbosa 2016) that assist
29 flower-visiting insects in locating floral resources over long and short distances.

30 Most plants need to attract floral visitors and at the same time defend against or escape
31 from herbivores. Plant survival and reproduction are threatened by a wide variety of herbivores
32 that consume vegetative tissues and reproductive structures (Schoonhoven et al. 2005).
33 Florivory may directly compromise reproduction via flower abortion or reduced attraction
34 resulting from quantitative and qualitative changes in floral rewards (pollen, nectar, flower oil)
35 (Quesada et al. 1995; Lehtila and Strauss 1997) as well as odor bouquet (Röse and Tumlinson
36 2004; Zangerl and Berenbaum 2009). In turn, leaf consumption decreases the plant
37 photosynthetic capacity, reducing resource availability for growth and reproduction (Karban
38 and Strauss 1993; Cardel and Koptur 2010; Schiestl et al. 2014). Furthermore, upon herbivore
39 attack, plants must invest more energy resources to reduce herbivory, consequently affecting
40 energy allocation to vegetative and reproductive tissue formation (Herms and Mattson 1992;
41 Agrawal 1999). Thus, a trade-off in the energy allocation may occur between defense, growth
42 and reproduction as a plant survival strategy under herbivore infestation.

43 In addition to limiting the energy available for reproduction, herbivore infestation
44 induces changes in the plant chemical profile, including an increase in existing metabolites and
45 synthesis of novel defensive compounds (Dicke 1999) that may alter interactions with floral
46 visitors (Kessler et al. 2011; Lucas-Barbosa et al. 2011; Schiestl et al. 2014). Because all these
47 traits are important visual and chemical cues, herbivory shapes the structure and dynamics of
48 floral visitor communities (Adler et al. 2001; Bruinsma et al. 2014; Schiestl et al. 2014; Lucas-
49 Barbosa 2016) and generally impacts flower visitation frequency and time, resulting in reduced
50 fruit and seed set (Strauss et al. 1996; Kessler and Halitschke 2009; Bruinsma et al. 2014).

51 Thus, herbivory results in plant fitness costs due to direct effects— resulting from the
52 reduced photosynthetic capacity and energy investment in defense synthesis – and indirect –
53 due to changes in interactions with the community of flower-visiting insects (Strauss 1997;
54 Lucas-Barbosa et al. 2011). Most studies have investigated the effects of herbivory on a few
55 floral visitor taxa (Lehtila and Strauss 1997; Kessler and Halitschke 2009; Kessler et al. 2011;

56 Lucas-Barbosa 2016; Rusman et al. 2018, 2019), while little is known about the influence of
57 herbivory on the composition of insect floral visitor community.

58 Plants of agricultural interest are interesting models to evaluate the effect of herbivory
59 on the interactions with flower visitors from the ecological and applied point of view. In
60 addition to addressing ecological issues, these studies may provide important information for
61 the development of strategies to increase the recruitment of floral visitors that are important for
62 crop production (Klein et al. 2007). In this sense, sweet pepper (*Capsicum annuum* L.)
63 (Solanaceae) is an easily cultivated, fast-growing plant that hosts a wide range of insects that
64 feed on its leaves, branches and flowers. In addition, flowers are white and contain nectar, and
65 despite being autogamous, visitation by bees, bumblebees and hoverflies leads to the formation
66 of larger and healthier fruits (Jarlan et al. 1997ab; Raw, 2000; Cruz et al. 2005; Serrano and
67 Guerra-Sanz 2006). Among the most common herbivores in sweet pepper fields, adults of South
68 American corn rootworm *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) are often
69 found feeding on leaves and flowers (Leite et al. 2011). Despite being polyphagous at adult
70 stage (Walsh 2003), this herbivore shares the same center of origin as sweet pepper (*C. annuum*)
71 (Eben and Monteros 2013; Kraft et al. 2014), which might be adapted to leaf and floral
72 herbivory by *D. speciosa*.

73 In the present study, we investigated, under field conditions, whether herbivory of sweet
74 pepper plants by adults of *D. speciosa* influenced the composition and richness of the floral
75 visitor community. In addition, we examined the consequences of herbivory by *D. speciosa* on
76 the production of sweet pepper flowers, fruits and seeds. We hypothesized that herbivory by *D.*
77 *speciosa* in sweet pepper plants reduces the attractiveness to floral visitors and impacts plant
78 reproduction.

79

80 **Materials and Methods**

81 **Study site**

82 Experiments were conducted in an experimental area of Palmital Farm, belonging to the
83 Federal University of Lavras (UFLA), in the south of Minas Gerais state, Ijaci, Brazil. The
84 location is between coordinates 21° 09' 53.4" S, 44° 55' 01.2" W, with an altitude of 836 m.
85 The farm is surrounded by corn and vegetable plantations for experimental studies and seed
86 production. The area set aside for the study measured 23 m x 9 m.

87 **Plants and insects**

88 The sweet pepper *C. annuum*, Mallorca hybrid, is a perennial plant; however, it is grown
89 annually and is characterized by bearing green unripe fruits that turn into red when ripe. *C.*
90 *annuum* flowers are white and each flower has, on average, six yellow stamens (Silva et al.
91 2005). *C. annuum* seeds were sown in seedling trays using commercial substrate (Carolina
92 Soil®, Carolina Soil Company, Brasil). The trays were kept in a greenhouse located at the farm,
93 at temperature of $26 \pm 2^\circ\text{C}$ and relative humidity of $70 \pm 10\%$. The plants were spray-irrigated
94 every 12 hours. After germination, seedlings were kept in the trays until they had six leaf pairs,
95 when they were transplanted to the experimental field.

96 The rearing of *D. speciosa* was initiated from adults collected in bean crops (Lavras,
97 MG, Brazil). The insects were maintained in the laboratory under controlled conditions ($25 \pm$
98 1°C , $70 \pm 10\%$ RH and 12-hour photophase) using the method from Ávila and Milanez (2004).
99

100 **Plant treatment and experimental design**

101 The field experiment was performed from February to June 2017. Plants in the
102 vegetative stage, with eight leaf pairs, were infested with adults of *D. speciosa* (2 female
103 beetles/plant), which remained in the plants until the beginning of flowering. Sweet pepper
104 plants without insect infestation were considered controls. The plants used for evaluation were
105 caged from the time they were transplanted to the cultivation area, including the control plants.
106 The cages consisted of a metal frame (60 cm long and 30 cm in diameter) covered with voile
107 fabric to prevent insect escape. The experiment was performed using a random blocks design
108 with 20 replicates (plants) per treatment. The experimental area (23 m x 9 m) had nine plantation
109 rows where 189 sweet pepper plants were grown (21 plants/line) 0.1 m apart with plant spacings
110 of 0.1 m. Experimental plants were surrounded by a border of four sweet pepper plants. Position
111 of the treatments were randomized for each row (Fig. 1).
112

113 **Responses of insect flower visitors to herbivory**

114 At the onset of flowering, in May 2017, the beetles and cages were removed for
115 evaluation of the floral visitor community. The flower-visiting entomofauna was monitored for
116 30 min for each plant in the morning (9:00 AM – 12:00 PM) for 10 consecutive days, and four
117 plants per day. This number of days for monitoring was related to the number of plants
118 analyzed. We quantified and collected all visitors that landed on the flowers of herbivore-

119 infested and uninfested plants during the observation period. We examined 20 plants per
120 treatment and each plant was observed only once. The insects were manually collected in plastic
121 pots (15 cm diameter \times 20 cm height) containing 70% ethanol. Subsequently, the samples were
122 taken to the laboratory to identify the specimens to the lowest possible taxonomic level.

123

124 **Plant fitness**

125 To determine whether herbivory by *D. speciosa* affects the reproduction of sweet pepper
126 plants, we counted the number of flowers, fruits and seeds/fruit from herbivore-infested plants
127 and uninfested plants. All red fruits were collected at the end of ripening (June 2017) and taken
128 to the laboratory. We measured the length and diameter of the fruits as well as the number of
129 seeds/fruit. Seeds were placed on filter paper sheets to let them dry. After three days, seeds
130 were randomly selected and individually weighted on an analytical balance (Marte AY220)
131 (Marte Balanças e Equipamentos de Precisão Ltda., Santa Rita do Sapucaí, Minas Gerais,
132 Brazil).

133

134 **Statistical analysis**

135 Normality and homocedasticity of the data were tested by Shapiro-Wilk and Bartlett's
136 test. Data that met those assumptions were analyzed by *t* test, otherwise, the data were analyzed
137 using a generalized linear model (GLM) with adjusted distribution. The residual dispersion
138 parameter was used as a criterion to select the best model. Species abundance and richness of
139 floral visitors were analyzed by glm with Poisson distribution. Diversity was estimated using
140 the Shannon-Wiener diversity index were performed with software PAST and the means were
141 compared using the *t* test. The flower, fruit and seed count data were analyzed using glm and
142 Poisson distribution with overdispersion (*Quasi*-Poisson). Fruit-related variables (length and
143 diameter) were compared using the *t* test and seed dry weight data were analyzed using GLM
144 with Gamma distribution. These analyses were performed with the R statistical package (versão
145 3.4.0, R Core Team 2017).

146 Similarities between the insect floral visitor communities associated to herbivore-
147 infested and uninfested plants were analyzed by ANOSIM (analysis of similarity) with
148 pairwise comparisons based on the Bray-Curtis similarity measure. Multidimensional scaling
149 analysis (MDS) using usando the *bootstrap* mean was performed to determine the variance

150 between the treatments (Clarke et al. 2014). Taxonomic distinction index (mean taxonomic
151 diversity) ($\Delta+$) was performed to assess alterations in the community composition of insect
152 floral visitors associated to herbivore-infested and uninfested plants. The analysis of mean
153 taxonomic diversity ($\Delta+$) was performed in the software Primer-e (7, 2017), using six
154 taxonomic levels: phylum (weight 100), class (weight 80), order (weight 60), family (weight
155 40), genus (weight 20) and species (weight 20) as variables for a matrix of species distribution
156 between herbivore-infested and uninfested plants (Clarke et al. 2014).

157

158 **Results**

159 **Community of insect floral visitors**

160 The mean number of floral visitors in herbivore-infested plants and uninfested plants
161 was quantified when plants began flowering. Herbivory influenced flower attractiveness to
162 insects, as they more frequently visited flowers of uninfested plants than those of herbivore-
163 infested plants ($F_{1,39} = 35.62$, $P < 0.001$, Fig. 2A). We collected 270 insects from flowers of
164 uninfested plants, while only 102 from flowers of herbivore-infested plants (Table 1).
165 Herbivory also influenced species richness and diversity. Plants infested with *D. speciosa*
166 attracted fewer species of floral visitors. We found insect floral visitors belonging to 17 taxa in
167 herbivore-infested plants and 22 in uninfested plants ($F_{1,39} = 12.70$, $P < 0.01$, Fig. 2B). In
168 addition, species diversity of insect floral visitors was lower in herbivore-infested plants than
169 in uninfested plants ($t_{1,39} = 3.40$, $df = 38$, $P < 0.01$, Fig. 2C).

170 Analysis of floral visitor community composition showed that nine species were
171 exclusively found in uninfested plants and only four in herbivore-infested plants (Table 1). *Apis*
172 *mellifera* (L.) (Hymenoptera: Apidae), *Toxomerus* spp. (Diptera: Syrphidae) and *Trigona*
173 *spinipes* (Fabr.) (Hymenoptera: Apidae) were the main insects observed visiting sweet pepper
174 plants, and all three species were more abundant in flowers of uninfested than herbivore-
175 infested plants (F test, *A. mellifera*: $F_{1,39} = 12.91$, $P < 0.001$; *Toxomerus*: $F_{1,39} = 16.57$, $P <$
176 0.001 ; *T. spinipes*: $F_{1,39} = 8.75$, $P < 0.01$, Fig. 3). Similarity comparisons showed that
177 composition of insect floral visitors associated to herbivore-infested plants were distinct from
178 that associated to uninfested plants ($R = 0.26$, $P < 0.001$). MDS analysis performed on the
179 composition of insect floral visitor community showed a clear separation between herbivore-
180 infested plants and uninfested plants (Fig. 4). Nevertheless, the mean taxonomic distinction of

181 the insect floral visitors was similar in herbivore-infested and uninfested plants ($t = 0.21$, $df =$
182 46 , $P = 0.838$, Fig. S1).

183

184 **Plant fitness**

185 Herbivory by *D. speciosa* had a significant effect on the reproduction of sweet pepper
186 (Table 2). The numbers of flowers and fruits per plant were lower in herbivore -infested plants
187 compared to uninfested plants (flowers: $F_{1,39} = 11.58$, $P < 0.01$; fruits: $F_{1,39} = 36.28$, $P < 0.001$).
188 In addition to the reduced number, fruits of herbivore-infested plants were smaller in length (t
189 $= -7.55$, $df = 38$, $P < 0.001$) and diameter ($t = -7.88$, $df = 38$, $P < 0.001$). The number of seeds
190 per fruit and dry weight of individual seeds were also lower in fruits of herbivore-infested plants
191 relative to those of uninfested plants (number of seeds: $F_{1,129} = 15.26$, $P < 0.001$; dry weight:
192 $\chi^2 = 4.79$, $df = 78$, $P < 0.001$).

193

194 **Discussion**

195 Attraction of pollinating insects promotes the formation of healthy and larger fruits and
196 increases the genetic variability of the plant population, reducing the chance of species
197 extinction (Ollerton et al. 2011). Even plants with autogamous pollination, such as sweet
198 pepper, invest in the production of flowers attractive to visitor insects that, in turn, mainly seek
199 nectar and pollen. However, leaf and flower herbivory cause a number of changes in the plant
200 physiological processes that can alter the flower attractiveness to certain visitor insect taxa, with
201 potential consequences for fruit and seed set (Lehtilä and Strauss 1997; Mothershead and
202 Marquis 2000; Adler et al. 2001; Cardel and Koptur 2010). Our study evaluated the effect of
203 herbivory by the South American corn rootworm *D. speciosa*, which feeds on both sweet pepper
204 leaves and flowers, on the community of flower-visiting insects and plant reproduction.

205 Our results confirmed our initial hypothesis that herbivory by *D. speciosa* in sweet
206 pepper plants altered the community structure and composition of insect floral visitors, with
207 consequences for plant fitness. In general, the flowers of herbivore-infested plants were 2.8
208 times less visited by insects than those of uninfested plants. The floral visitor community of
209 herbivore-infested plants exhibited lower species abundance, richness and diversity than that
210 associated with uninfested plants.

211 Among the taxa known as important sweet pepper pollinators, the abundance of both
212 bees (Apidae) and hoverflies (Syrphidae) (Jarlan et al. 1997ab; Raw 2000; Cruz et al. 2005;

213 Serrano et al. 2006; Pereira et al. 2015) was considerably reduced in the flowers of herbivore-
214 infested plants, even though two hoverfly species (*Toxomerus* sp. 3 and 4) were exclusively
215 found in this treatment. Two bee species (family Apidae) were exclusive to the community of
216 visitors associated with uninfested plants, including *Tetragonisca angustula* (Latreille)
217 (Hymenoptera: Apidae). There are controversies in the literature on the role of *T. angustula* as
218 a sweet pepper pollinator because, due to its small size, it has been reported as a bee that does
219 not pollinate the crop (Kuyhor 2001). However, other studies report that small bees, such as *T.*
220 *angustula*, act as sweet pepper pollinators (Faria-Junior et al. 2008; Pereira et al. 2015).
221 Although not exclusively found on uninfested plants, the honeybee and the stingless *T. spinipes*
222 were found in significantly higher numbers in the flowers of these plants. The honeybee and
223 species of the genus *Trigona* were previously reported as floral visitors of sweet pepper that
224 increase the fruit set and quality (Faria-Junior et al. 2008; Putra et al. 2015; Giannini et al.
225 2015).

226 The reduction in the attractiveness of flowers from herbivore-infested plants to bees and
227 hoverflies may be due to modifications in food resources. Nectar produced by sweet pepper
228 flowers is rich in fructose and glucose and is the most important energy source of this plant
229 species for bees (Roldán-Serrano and Sanz 2004). The sugar concentration in the floral nectar
230 of different sweet pepper cultivars was positively correlated with *A. mellifera* visitation
231 (Rabinowitch et al. 1993). As herbivory may decrease the sugar content in the nectar (Strauss
232 et al. 1996; Bruinsma et al. 2008; Rusman et al. 2019), it is plausible that the reduction in bee
233 visitation to the flowers of herbivore-infested plants results from changes in the nectar. In the
234 case of syrphids, in addition to nectar, pollen is an important food resource from sweet pepper
235 flowers, especially for females (Hickman et al. 1995; Jarlan et al. 1997c). Although some
236 syrphid species found in sweet pepper flowers are predators, such as *Allograpta exotica*
237 (Wiedemann) (Diptera: Syrphidae) and *Dioprosopa clavata* (Fabricius) (Diptera: Syrphidae)
238 (Belluire and Michaud 2001; Sturza et al. 2011; Fidelis et al. 2018), adults can explore floral
239 resources as an alternative source of food and water. Thus, it is possible that the reduced species
240 abundance and changes in syrphid species composition are associated to the reduction of nectar
241 and pollen in the flowers of herbivore-infested plants.

242 In addition to the floral rewards, there are other flower traits that play a role on the
243 attraction to bee and hoverflies, such as the floral fragrance and visual cues (Sutherland et al.
244 1999; Dinkel e Lunau 2001; Lunau et al. 2006; Majetic et al. 2009; Burger et al. 2010; Primante
245 and Dötterl, 2010) that can be altered by leaf and floral herbivory (Kessler and Halitschke 2009;
246 Cardel and Koptur 2010; Liao et al. 2013; Lucas-Barbosa et al. 2013; Bruinsma et al. 2014;

247 Schiest et al. 2014; Lucas-Barbosa et al. 2016; Rusman et al. 2018; Rusman et al. 2019). We
248 did not assess the composition of the floral fragrance in our study, however, we verified that the
249 *D. speciosa* herbivory reduced in 30% the number of flowers per plant, a parameter that is
250 involved in the visual attraction to insect floral visitors (Willmer 2011). As *D. speciosa* not only
251 damaged leaves, but also the flowers of sweet pepper plants, the reduction in the flower set
252 might result from floral herbivory and/or a trade-off in energy allocation to defenses in
253 detriment to reproduction (Strauss et al. 1996; Lehtila and Strauss 1997; Schiest et al. 2014).
254 Thus, in addition to the chemical and reward aspects mentioned above, visitation may have also
255 been affected by the reduction in the number of flowers in plants attacked by the herbivore
256 (Strauss et al. 1996; Lehtila and Strauss 1997).

257 Yet members of the orders Coleoptera, Hemiptera and specimens of parasitoid families
258 of the order Hymenoptera were less abundant, they were found less frequently in flowers of
259 herbivore-infested plants than those of uninfested plants, similarly to the pattern exhibited by
260 bees and syrphids. With the exception of coleopterans, these insects are occasional floral
261 visitors and mainly seek nectar and pollen as alternative or complementary food resources
262 (Wardhaugh 2015). *D. speciosa* adults, however, do not feed only on pollen and nectar but also
263 on petals and ovaries and, therefore, impact the seed and fruit sets from the attacked flowers.
264 Adults of *A. variegatus* are frequently found in flowers of various crops, which they use as
265 shelter and to feed on pollen (Nucci and Alves-Junior 2017; Oliveira and Rando 2017).
266 Although not known as sweet pepper pollinators, *Astylus variegatus* (Germ.) (Coleoptera:
267 Melyridae) adults can pollinate due to their frequent movement among flowers, as found for
268 another plant species (Mawdsley 2003; Silva et al. 2011).

269 Considering that sweet pepper flower visitation by insects affects the production and
270 quality of fruits (Jarlan et al. 1997ab; Raw, 2000; Cruz et al. 2005; Serrano et al. 2006), changes
271 in the community structure of flower visitors in plants infested with *D. speciosa* most likely
272 contributed to the reduction in plant reproduction, as also found in other studies (Strauss et al.
273 1996; Lehtila and Strauss 1997, Poveda et al. 2005; Cardel and Koptur 2010; Kessler et al.
274 2011; Schiestl et al. 2014). Although the number of flowers was lower in the herbivore-infested
275 plants, as previously mentioned, there was a drastic reduction in the fruit set, which was 44%
276 lower than that of uninfested plants. Furthermore, the size and weight of the fruits from
277 herbivore-infested plants were smaller and they contained approximately 25% fewer seeds.
278 This reduction may result both from the direct and indirect costs of herbivory by *D. speciosa*,
279 and future studies should investigate their contribution to sweet pepper reproduction separately.

280 Our study showed that herbivory by *D. speciosa* influences the community structure of
281 insect flower visitors and impacts sweet pepper reproduction. From the applied perspective, our
282 study provides relevant information about the importance of managing *D. speciosa* populations
283 in sweet pepper, as their attack has indirect implications on flower visitation and, consequently,
284 on crop yield. Clearly, the use of chemicals to control this pest should be avoided because of
285 the effects on the pollinator community. Future studies should investigate the mechanisms by
286 which the South American corn rootworm herbivory influences the recruitment of flower
287 visitors, such as food resources availability, floral fragrance profile, flower size and
288 morphology.

289

290 **Acknowledgments**

291 This study was supported by the Brazilian Federal Agency for the Support and
292 Evaluation of Graduate Education (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
293 Superior – CAPES) – Funding Code 001 and by the Department of Entomology of the Federal
294 University of Lavras (Universidade Federal de Lavras – UFLA). We thank the staff of Palmital
295 Farm for providing sweet pepper seeds and help in setting up the field experiment, Dr^a. Marise
296 Silva, for identifying the bees and MSc. Kulian Marques, for identifying various
297 hymenopterans.

298

References

- Adler LS, Karban R, Strauss SY (2001) Direct and indirect effects of alkaloids on plant fitness via herbivory and pollination. *Ecology* 82:2032–2044.
- Agrawal AA (1999) Induced responses to herbivory in wild radish: effects on several herbivores and plant fitness. *Ecology* 80:1713-1723.
- Ávila CJ, Milanez JM (2004) Larva-alfinete. In: Salvadori JR, Ávila CJ, Silva MTB. (ed.). *Pragas de solo no Brasil*. Passo Fundo: Embrapa Trigo; Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz Alta: Fundacep Fecotrigo, pp 345-378.
- Belliure B, Michaud JP (2001) Biology and behavior of *Pseudodorus clavatus* (Diptera: Syrphidae), an important predator of citrus aphids. *Annals of the Entomological Society of America* 94:91-96.
- Bruinsma M, IJdema H, Van Loon J.J.A et al (2008) Differential effects of jasmonic acid treatment of *Brassica nigra* on the attraction of pollinators, parasitoids, and butterflies. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 128: 109–116.
- Bruinsma M, Lucas-Barbosa D, Ten Broeke CJM et al (2014) Folivory affects composition of nectar, floral odor and modifies pollinator behavior. *Journal of Chemical Ecology* 40:39-49.
- Burger H, Dotterl S, Ayasse M (2010) Host-plant finding and recognition by visual and olfactory floral cues in an oligolectic bee. *Functional Ecology* 24: 1234–1240.
- Cardel YJ, Koptur S (2010) Effects of florivory on the pollination of flowers: an experimental field study with a perennial plant. *International Journal in Plant Sciences* 171:283-292.
- Clarke KR, Gorley RN, Somerfield PJ, Warwick RM (2014) *Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation*, 3rd edition. PRIMER-E: PlymouthCruz.
- Cruz DO, Freitas BM, Silva LA et al (2005). Pollination efficiency of the stingless bee *Melipona subnitida* on greenhouse sweet pepper. *Pesquisa agropecuária brasileira* 40:1197-1201.
- Davis CC, Schaefer H, Xi Z et al (2014) Long-term morphological stasis maintained by a plant pollinator mutualism. *Pnas* 111:5914-5919.
- Dicke M (1999). *Evolution of induced indirect defense of plants. The Ecology and Evolution of Inducible Defenses*. Princeton University Press, Princeton, NJ, pp 62-88.
- Dinkel T, Lunau K (2001) How drone flies (*Eristalis tenax* L., Syrphidae, Diptera) use floral guides to locate food sources. *Journal of Insect Physiology* 47:1111-1118.

- Eben, A., DE LOS MONTEROS, AE (2013) Tempo and mode of evolutionary radiation in Diabroticina beetles (genera *Acalymma*, *Cerotoma*, and *Diabrotica*). *ZooKeys*, 332, p. 207.
- Giannini TC, Boff S, Cordeiro GD et al (2015) Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. *Apidologie* 46:209–223.
- Faria Júnior LRR, Bendini JN, Barreto LMRC (2008) Eficiência polinizadora de *Apis mellifera* L. e polinização entomófila em pimentão variedade cascadura ikeda. *Bragantia* 67:261-266.
- Fidelis EG, do Carmo DD, Santos AA et al (2018) Coccinellidae, Syrphidae and Aphidoletes are key mortality factors for *Myzus persicae* in tropical regions: A case study on cabbage crops. *Crop protection* 112:288-294.
- Harder LD, Barrett SCH (2006) *The Ecology and Evolution of Flowers*. Oxford University Press, New York. 392 pp.
- Hermes DA, Mattson WJ (1992) The dilemma of plants: to grow or defend. *The Quarterly Review of Biology* 67: 283-335.
- Hickman JM, Lövei GL, Wratten SD (1995) Pollen feeding by adults of the hoverfly *Melanostoma fasciatum* (Diptera: Syrphidae). *New Zealand Journal of Zoology* 22:387-392.
- Jarlan A, De Oliveira D, Gingras J. (1997a) Pollination by *Eristalis tenax* (Diptera: Syrphidae) and seed set of greenhouse sweet pepper. *Journal of Economic Entomology* 90: 1646-1649.
- Jarlan A, De Oliveira, D, Gingras J (1997b) Effects of *Eristalis tenax* (Diptera: Syrphidae) pollination on characteristics of greenhouse sweet pepper fruits. *Journal of Economic Entomology*, 90: 1650-1654.
- Jarlan A, Oliveira D, Gingras J (1997c) Pollination of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) in greenhouse by the syrphid fly *Eristalis tenax* L. *Acta Horticulturae (ISHS)* 437:335-340.
- Karban R, Strauss SY (1993) Effects of Herbivores on Growth and Reproduction of their Perennial Host, *Erigeron Glaucus*. *Ecology* 74:39-46.
- Kessler A, Halitschke R (2009) Testing the potential for conflicting selection on floral chemical traits by pollinators and herbivores: predictions and case study. *Functional Ecology* 23:901-912.
- Kessler A, Halitschke R, Poveda K (2011) Herbivory-mediated pollinator limitation: negative impacts of induced volatiles on plant–pollinator interactions. *Ecology* 92: 1769-1780.
- Klein AM, Vaissiere BE, Cane JH et al (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society* 274:303-313.

- Kraft KH, Brown CH, Nabhan GP et al (2014) Multiple lines of evidence for the origin of domesticated chili pepper, *Capsicum annuum*, in Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: 6165-6170.
- Kuyhor T (2001) Foraging and pollination efficiency of *Tetragonisca angustula* on sweet pepper in a greenhouse, M.Sc. Thesis, Utrecht University, the Netherlands.
- Lehtila K, Strauss SY (1997) Leaf damage by herbivores affects attractiveness to pollinators in wild radish, *Raphanus raphanistrum*. *Oecologia* 111:396-403.
- Leite GL, Picanço M, Zanuncio JC et al (2011) Hosting capacity of horticultural plants for insect pests in Brazil. *Chilean Journal of Agricultural Research* 71: 383.
- Liao K, Gituru RW, Guo YH et al (2013) Effects of floral herbivory on foraging behaviour of bumblebees and female reproductive success in *Pedicularis gruinata* (Orobanchaceae). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 208:562-569.
- Lucas-Barbosa D, Van Loon JJA, Dicke M (2011). The effects of herbivore-induced plant volatiles on interactions between plants and flower-visiting insects. *Phytochemistry* 72:1647-1654.
- Lucas-Barbosa D, van Loon JJA, Gols R (2013) Reproductive escape: annual plant responds to butterfly eggs by accelerating seed production. *Functional Ecology* 27:245-254.
- Lucas-Barbosa D (2016) Integrating Studies on Plant–Pollinator and Plant–Herbivore Interactions. *Trends in Plant Science* 21:125-133.
- Lucas-Barbosa D, Sun P, Hakman A et al (2016) Visual and odour cues: plant responses to pollination and herbivory affect the behaviour of flower visitors. *Functional Ecology* 30:431–441.
- Lunau K, Fieselmann G, Heuschen B et al (2006) Visual targeting of components of floral colour patterns in flower-naive bumblebees (*Bombus terrestris*; Apidae). *Naturwissenschaften* 93:325-8.
- Majetic CJ, Raguso RA, Ashman TL (2009) The sweet smell of success: floral scent affects pollinator attraction and seed fitness in *Hesperis matronalis*. *Functional Ecology* 23: 480-487.
- Mawdsley, J. R (2003) The importance of species of Dasytinae (Coleoptera: Melyridae) as pollinators in western North America. *Coleopterists Bulletin* 57:154-160.
- Mothershead K, Marquis RJ (2000) Fitness impacts of herbivory through indirect effects on plant-pollinator interactions in *Oenothera macrocarpa*. *Ecology* 81:30-40.
- Myers N (1996) Environmental services of biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:2764-2769.

- Nucci M, Alves-Junior VV (2017) Comportamiento y diversidad de visitantes florales en *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). *Revista Colombiana de Entomologia* 43:106-13.
- Oliveira RA, Rando JS (2017) Diversidade de insetos em plantas hospedeiras próximas às áreas de cultivo de milho e algodão. *Journal of Neotropical Agriculture* 17:35-40.
- Ollerton J, Winfree R, Tarrant S (2011) How many flowering plants are pollinated by animals?. *Oikos* 120:321-326.
- Pereira ALC, Taques TC, Valim JO et al (2015) The management of bee communities by intercropping with flowering basil (*Ocimum basilicum*) enhances pollination and yield of bell pepper (*Capsicum annuum*). *Journal of insect conservation* 19: 479-486.
- Poveda K, Steffan-Dewenter I, Scheu S et al (2005) Floral trait expression and plant fitness in response to below- and aboveground plant–animal interactions. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 7:77-83.
- Primante C, Dötterl S (2010) A syrphid fly uses olfactory cues to find a non-yellow flower. *Journal of chemical ecology* 36: 1207-1210.
- Quesada M, Bollman K, Stephenson AG (1995) Leaf damage decreases pollen production and hinders pollen performance in *Cucurbita texana*. *Ecology* 76:437-443.
- R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rabinowitch HD, Fahn A, Meir TAL et al (1993). Flower and nectar attributes of pepper (*Capsicum annuum* L.) plants in relation to their attractiveness to honeybees (*Apis mellifera* L.). *Annals of applied biology* 123: 221-232.
- Raw A (2000) Foraging behaviour of wild bees at hot pepper flowers (*Capsicum annuum*) and its possible influence on cross pollination. *Annals of Botany* 85: 87-492.
- Roldán-Serrano AS, Guerra-Sanz JM. (2004). Dynamics and sugar composition of sweet pepper (*Capsicum annuum*, L.) nectar. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 79: 717-722.
- Röse USR, Tumlinson JH (2004). Volatiles released from cotton plants in response to *Helicoverpa zea* feeding damage on cotton flower buds. *Planta* 218: 824–832.
- Rusman Q, Lucas-Barbosa D, Poelman EH (2018) Dealing with mutualists and antagonists: specificity of plant-mediated interactions between herbivores and flower visitors, and consequences for plant fitness. *Functional Ecology* 32:1022–1035.

- Rusman Q, Poelman EH, Nowrin F et al (2019) Floral plasticity: herbivore-speciesspecific-induced changes in flower traits with contrasting effects on pollinator visitation. *Plant Cell Environment* 42:1882–1896.
- Schiestl FP, Kirk H, Bigler L et al (2014) Herbivory and floral signaling: phenotypic plasticity and tradeoffs between reproduction and indirect defense. *New Phytologist* 203:257-266.
- Schoonhoven LM, Van loon JJA, Dicke M (2005) *Insect-Plant Biology*. 2 nd ed. Oxford, 2005, 421 p.
- Serrano, AR, & Guerra-Sanz, JM (2006) Quality fruit improvement in sweet pepper culture by bumblebee pollination. *Scientia Horticulturae* 110: 160-166.
- Silva EMS, Freitas BM, Silva LM et al (2005) Biologia floral do pimentão (*Capsicum annuum*) e a utilização da abelha jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke) como polinizador em cultivo protegido. *Revista Ciência Agronômica* 36: 386-390.
- Silva MEP, Mussury RM, Vieira MDC et al (2011) Floral biology of *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae) and its relation with *Astylus variegatus* activity (Germar 1824) (Coleoptera: Melyridae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 83: 1251-1258.
- Strauss SY, Conner JK, Rush SL (1996) Foliar herbivory affects floral characters and plant attractiveness to pollinators: Implications for male and female plant fitness. *The American Naturalist* 147:1098-1107.
- Strauss SY (1997) Floral characters link herbivores, pollinators, and plant fitness. *Ecology* 76:1640-1645.
- Sturza VS, Dorfey C, Poncio S et al (2011) First record of larvae of *Allograpta exotica* Wiedemann (Diptera, Syrphidae) preying on *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera, Aphididae) in watermelon in Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia* 55:272-274.
- Sutherland JP, Sullivan MS, Poppy GM (1999) The influence of floral character on the foraging behaviour of the hoverfly, *Episyrphus balteatus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 93:157-64.
- Wardhaugh CW (2015). How many species of arthropods visit flowers?. *Arthropod-Plant Interactions* 9:547-565.
- Willmer P (2011). *Pollination and floral ecology*. Princeton University Press.
- Zangerl AR, Berenbaum MR (2009) Effects of florivory on floral volatile emissions and pollination success in the wild parsnip. *Arthropod Plant Interactions*

Tables

Table 1 Abundance and richness of insect floral visitors associated to sweet pepper plants (*Capsicum annuum*) infested with *Diabrotica speciosa* adults (herbivore-infested plants) and uninfested plants.

Composition			Uninfested plant	Herbivore-infested plant
Order	Family	Species	Abundance	
Coleoptera	Chrysomelidae	<i>Diabrotica speciosa</i>	11	4
	Melyridaeidae	<i>Astylus variegatus</i>	13	5
	Coccinellidae	NI*	0	1
Diptera	Syrphidae	<i>Allograpta exotica</i>	20	9
		<i>Dioprosopa clavata</i>	18	10
		<i>Toxomerus</i> sp. 1	40	16
		<i>Toxomerus</i> sp. 2	6	0
		<i>Toxomerus</i> sp. 3	18	7
		<i>Toxomerus</i> sp. 4	0	2
	Tachinidae	<i>Toxomerus</i> sp. 5	0	3
		NI	7	0
Hemiptera	Aphididae	NI	1	0
	Anthocoridae	<i>Orius</i> sp. 1	3	1
	Cicadellidae	NI	2	0
	Largidae	NI	8	3
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	27	9
		<i>Exomalopsis</i> sp.	2	0
		<i>Paratrigona subnuda</i>	11	5
		<i>Partamona helleri</i>	9	3
		<i>Tetragonisca angustula</i>	13	0
	Bethylidae	<i>Trigona spinipes</i>	4	0
	Braconidae	NI	9	0

Eupelmidae	NI	8	4
Mymaridae	NI	0	2
Pteromalidae	NI	6	0
	NI		
Total		270	102

* Not identified

Table 2 Effects of herbivory in sweet pepper plants (*Capsicum annuum*) by *Diabrotica speciosa* in plant reproduction. Parameters measured in flowers, fruits and seeds (mean \pm SE).

Traits	Uninfested	<i>D. speciosa</i>	<i>P</i> value
Flowers			
Number of flowers/plant	27.14 \pm 0.96	18.95 \pm 0.81	< 0.01
Fruits			
Number of fruits/plant	17.33 \pm 0.41	9.62 \pm 0.48	< 0.001
Length (cm)	30.42 \pm 0.42	21.95 \pm 0.34	< 0.001
Diameter (cm)	30.97 \pm 0.41	22.41 \pm 0.33	< 0.001
Seeds			
Number of seeds/fruit	427.89 \pm 10.7	325.06 \pm 6.89	< 0.001
Dry weight (mg)	4.46 \pm 0.12	2.05 \pm 0.11	< 0.001

Figures

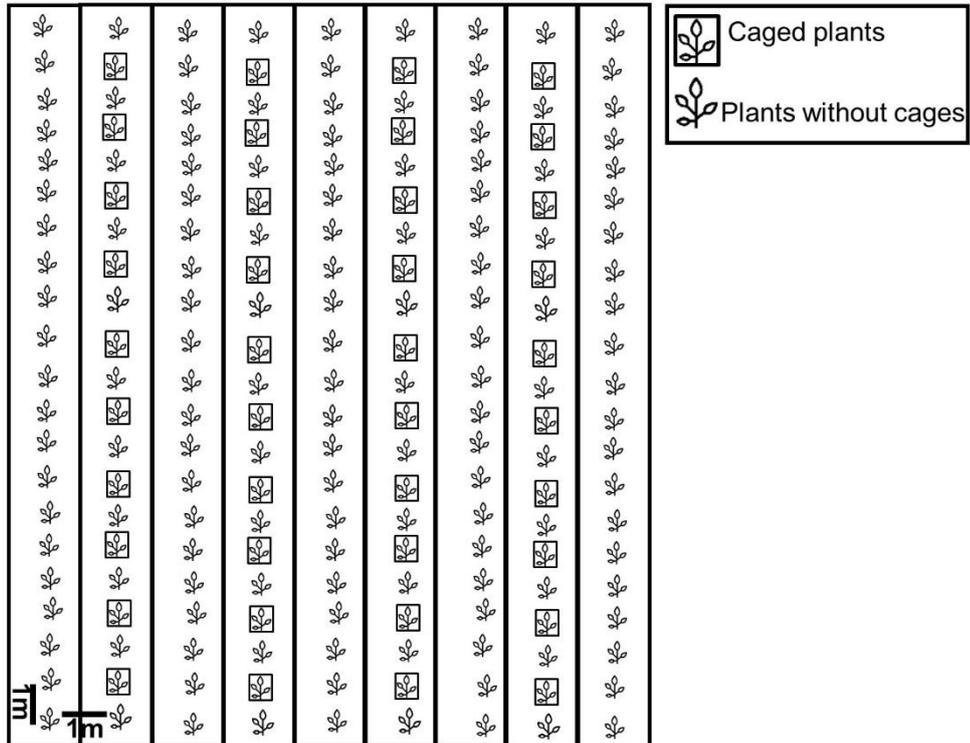


Fig. 1 Treatment distribution in the experimental field. Squares surrounding plants represent caged sweet pepper plants that were evaluated in the experiment. Uncaged plants were used as border sweet pepper plants.

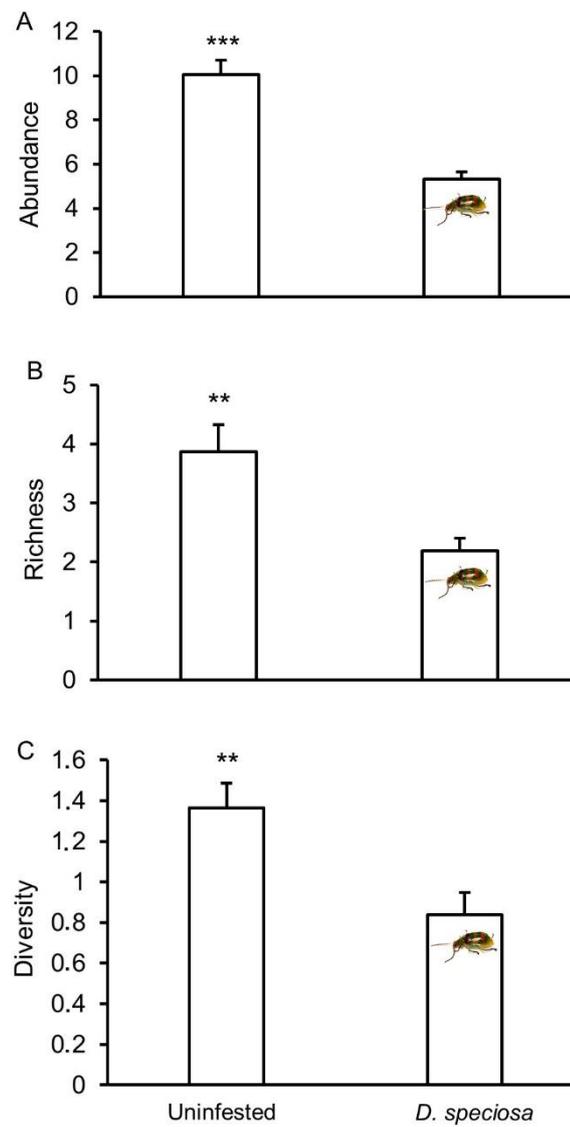


Fig. 2 Abundance, richness and diversity of flower visitors (mean \pm SE) to herbivore-infested plant with *Diabrotica speciosa* (*D. speciosa*) and uninfested plants (uninfested) of *Capsicum annum*, per 30 min of observation. (**: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$, $\alpha=0.05$).

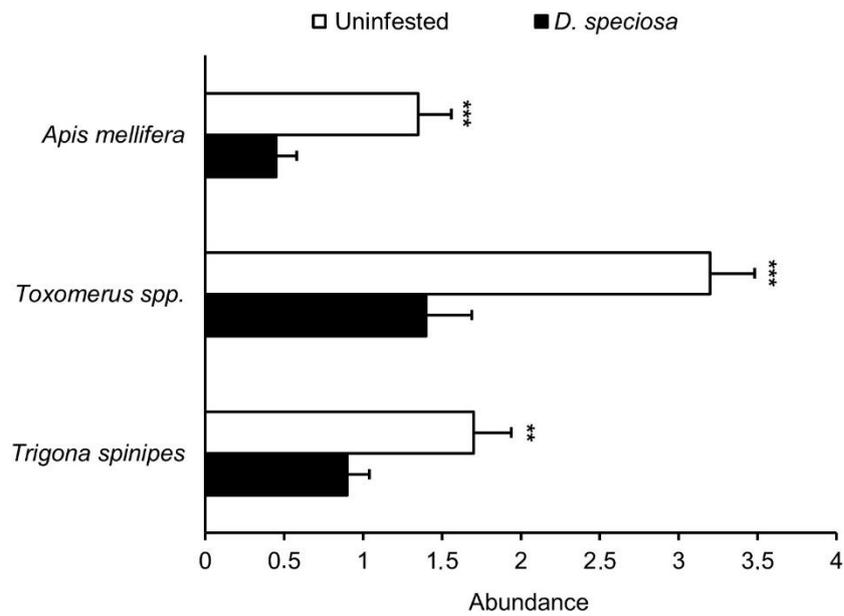


Fig. 3 Abundance of *Apis mellifera*, *Toxomerus* spp. and *Trigona spinipes* (Mean±SE) visiting flowers of sweet pepper plants (*Capsicum annuum*) infested with *Diabrotica speciosa* adults (*D. speciosa*) and uninfested plants (uninfested). ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

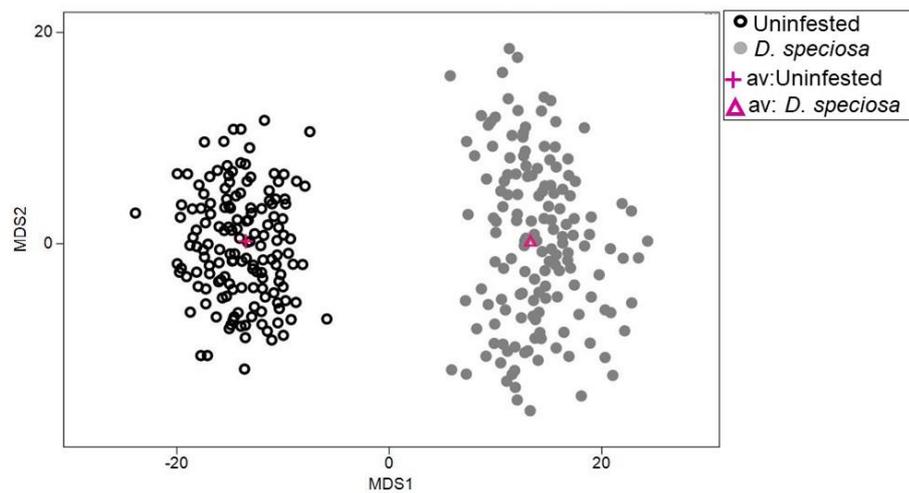


Fig. 4 Analysis of multidimensional scaling analysis (MDS) performed on the composition of insect floral visitors in sweet pepper plants (*Capsicum annuum*) infested with *Diabrotica speciosa* adults (*D. speciosa*) and uninfested plants (uninfested).

Supplementary material

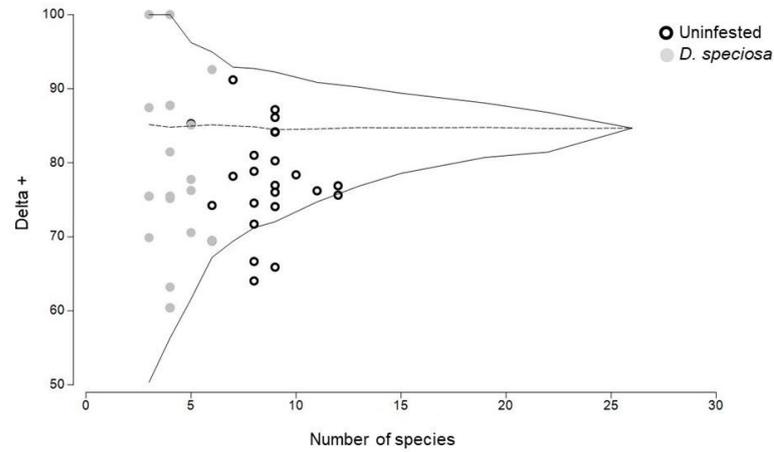


Fig. S1 Variation of the mean taxonomic distinction (Δ) of insect floral visitors associated to sweet pepper plants (*Capsicum annuum*) infested with *Diabrotica speciosa* adults (*D. speciosa*) and uninfested plants (uninfested). The dotted line indicates the estimated mean based on the total collected species in all plants, while solid lines indicate the confidence threshold of 95% for simulated values.

ARTIGO 2 Plantas de pimentão sob hebivoria produzem descendentes com maior vigor vegetativo e reprodutivo, porém menos resistentes a *Diabrotica speciosa*

(Artigo redigido nas normas da revista: Ecological Entomology)

Livia Aparecida de Souza¹; Marina Chaves de Oliveira¹; Ana Cristina Andrade Monteiro²;
Mario Lúcio Vilela Resende²; Maria Fernanda G. V. Peñaflo¹

¹Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Lavras - UFLA, 37200-000 Lavras, MG, Brasil. liviasouzaento@gmail.com

²Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras – UFLA, 37200-000 Lavras, MG, Brasil. monteiroaca@yahoo.com.br

**Autora correspondente*: Maria Fernanda G. V. Peñaflo. Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG, Brasil, Campus Universitário, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Telefone (35) 3829 - 1287
E-mail: fernanda.penaflor@gmail.com

1 **Resumo**

2

3 A indução de mecanismos de defesas após a herbivoria é uma importante estratégia utilizada
4 pelas plantas, pois investem energia somente quando sob ameaça. Estudos mostram que plantas
5 danificadas na geração materna podem transmitir características de resistência para plantas das
6 gerações seguintes para coespecíficos do herbívoro. Neste estudo nós investigamos se plantas
7 de pimentão (*Capsicum annuum* L.) (Solanaceae), induzidas pela herbivoria de *Diabrotica*
8 *speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) transmitem características de resistência para
9 a progênie contra o ataque de coespecíficos e heteroespecíficos. Nós também investigamos
10 possíveis custos no crescimento e reprodução da progênie. Nós avaliamos a preferência
11 alimentar de *D. speciosa* e o desempenho de *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae)
12 em duas gerações seguintes de plantas como parâmetros para avaliar a resistência da progênie.
13 A herbivoria não impactou o número de flores e sementes da planta-mãe, no entanto, reduziu o
14 número de frutos e de sementes por frutos. Plantas- progênie de plantas infestadas por *D.*
15 *speciosa* apresentaram mais flores, frutos e sementes, em relação às plantas-progênie de plantas
16 não infestadas. A taxa de germinação e massa seca das plântulas também foram maiores na
17 progênie de plantas infestadas do que a progênie de plantas não infestadas. Por outro lado,
18 plantas-progênie de plantas infestadas foram menos resistentes à herbivoria de coespecíficos,
19 pois fêmeas adultas de *D. speciosa* preferiram consumir mais tecidos delas do que de plantas-
20 progênie de plantas não infestadas. Por outro lado, a herbivoria nas plantas mãe aumentou a
21 resistência da progênie ao heteroespecífico (*M. persicae*), já que o tamanho das colônias foi
22 maior em plantas-progênie de plantas não infestadas. Os efeitos da herbivoria materna no
23 crescimento, reprodução e resistência da progênie persistiram por duas gerações subsequentes.
24 Esses resultados sugerem que as plantas de pimentão sob herbivoria de *D. speciosa* apresentam
25 uma estratégia diferente à resistência transgeracional descrita na literatura, pois o alocamento
26 energético foi direcionado para crescimento e reprodução em detrimento à resistência para
27 coespecíficos.

28

29 **Palavras-chave:** Alocação de recursos. Defesas de plantas induzidas. *Diabrotica speciosa*.
30 *Myzus persicae*.

31

32 **Introdução**

33

34 Para garantir seu sucesso reprodutivo, as plantas precisam lidar com vários estresses
35 ambientais incluindo o ataque de grande variedade de herbívoros. Insetos herbívoros consomem
36 tecidos vegetativos (brotos e folhas) e reprodutivos (botões florais, flores e frutos), limitando
37 os recursos energéticos da planta para crescimento e reprodução (Strauss *et al.*, 1996;
38 Schoonhoven *et al.*, 2005; Price *et al.*, 2011). Assim, ao longo do processo evolutivo, as plantas
39 desenvolveram diversas estratégias para reduzir a herbivoria, que envolvem defesas físicas,
40 como espinhos, ceras e tricomas; e químicas, como metabólitos secundários com propriedades
41 tóxica, antinutritiva, deterrente e/ou repelente para os herbívoros, ou ainda, que recrutam o
42 terceiro nível trófico (Price *et al.*, 1980; Karban & Baldwin, 1997; Strauss & Agrawal, 1999;
43 Karban & Agrawal, 2002; Gatehouse, 2002; Dicke & Baldwin, 2010; Chaudhary *et al.*, 2018).

44 Como a produção de defesas físicas e químicas implica em um alto custo energético
45 para a planta, apenas uma parte delas é expressa constitutivamente nos tecidos vegetais. Ao ser
46 atacada por herbívoros, o alocamento energético é direcionado para o aumento dos níveis de
47 defesas na tentativa de deter a herbivoria e, assim, sobreviver (Kessler & Baldwin, 2002). No
48 entanto, a maior demanda energética para a produção de defesas induzidas pela herbivoria pode
49 implicar em um *trade-off* no balanço energético para o crescimento e reprodução (Herms &
50 Mattson, 1992; Mothershead & Marquis, 2000; Lucas-Barbosa, 2016). Essa plasticidade
51 fenotípica na expressão de defesas e regulação do alocamento energético são adaptações que
52 permitem a sobrevivência e reprodução das plantas frente ao estresse da herbivoria, que é
53 variável no espaço e tempo e, por isso, imprevisível (Agrawal, 1998; Agrawal, 2001a).

54 Nos últimos anos, alguns estudos mostraram que as plantas sob a pressão de herbívoros
55 transmitem parte do fenótipo induzido para os descendentes, tornando-os mais resistentes à
56 herbivoria. Esse fenômeno conhecido como resistência transgeracional foi primeiramente
57 descrito por Agrawal *et al.* (1999) em nabo selvagem *Raphanus raphanistrum* L.
58 (Brassicaceae). Após esse relato, alguns estudos confirmaram que descendentes de plantas-mãe
59 sob ataque de herbívoros exibem características de defesas induzidas anteriormente à infestação
60 por herbívoros em plantas anuais, como *R. raphanistrum* (Van Dam & Baldwin, 2001),
61 *Phaseolus lunatus* L. (Fabaceae) (Ballhorn *et al.*, 2016), *Arabidopsis thaliana* L. Heynh
62 (Brassicaceae) (Rasmann *et al.*, 2012), *Mimulus guttatus* D.C. (Phrymaceae) (Scoville *et al.*,
63 2011) e *Taraxacum officinale* L. (Asteraceae) (Verhoeven *et al.*, 2018), e perenes, como é o
64 caso de *Populus angustifolia* James e *Populus fremontii* Watson (Salicaceae) (Holeski *et al.*,
65 2013). Um outro estudo mostrou que a herbivoria materna induz um estado de *priming* nos

66 descendentes, os quais sob a infestação de herbívoros expressam as defesas induzidas mais
67 vigorosamente (Rasmann *et al.*, 2012).

68 As defesas químicas induzidas pela herbivoria podem ser transientes, não persistindo na
69 geração seguinte (Ballhorn *et al.*, 2016) ou, como mostram alguns estudos, a transmissão dessas
70 características de defesas pode ocorrer por mais de uma geração (Holeski *et al.*, 2007; Rasmann
71 *et al.*, 2012; Kellenberger *et al.*, 2018). Os mecanismos pelos quais o fenótipo induzido pela
72 herbivoria materna é transmitido à progênie ocorre por meio de herança epigenética ou
73 fornecimento materno (Holeski *et al.*, 2012). Os sinais epigenéticos são transmitidos por
74 processos de metilação do DNA e modificações nas histonas (Lippman *et al.*, 2003;
75 Chinnusamy & Zhu, 2009; Jablonka & Raz, 2009; Scoville, *et al.*, 2010). Já o fornecimento
76 materno ocorre através de retenção de nutrientes, proteínas ou pequenos RNAs nas sementes
77 (Holeski *et al.*, 2012). Dessa forma, esses mecanismos ajudam a entender como a retenção de
78 uma memória de estresse pode ser transmitida para as próximas gerações e, de certa forma,
79 tornar a prole mais resistente a subsequentes estresses.

80 A expressão da resistência transgeracional deve resultar em custos energéticos que
81 impactam o crescimento e/ou a reprodução da progênie. Ainda assim, esse aumento das defesas
82 da progênie resultante da herbivoria materna pode ser uma estratégia adaptativa,
83 principalmente, para plantas, cujos descendentes compartilham o mesmo ambiente que as
84 plantas-mãe e, por isso, sujeitos a uma pressão de herbivoria semelhante (Agrawal, 1999;
85 Weinhold, 2018). Nesse sentido, se a resistência transgeracional é espécie-específica de modo
86 que a herbivoria materna torna a planta resistente somente a coespecíficos do herbívoro, a
87 herança da resistência deve ser vantajosa apenas para interações nas quais a pressão da
88 herbivoria persiste no ambiente por períodos mais prolongados.

89 Apesar da relevância ecológica da herbivoria materna sobre os descendentes, pouco se
90 sabe sobre a especificidade da resistência transgeracional e os seus custos para o crescimento e
91 reprodução da progênie. Por isso, investigamos essa questão usando, como modelo, plantas de
92 pimentão *Capsicum annuum* L. (Solanaceae) sob herbivoria materna de adultos de *Diabrotica*
93 *speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) e avaliamos o crescimento, reprodução e
94 resistência a coespecíficos e heteroespecíficos de outra guilda alimentar, um sugador de seiva,
95 o pulgão-verde *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). Além disso, nós mensuramos
96 os níveis de fenóis totais nas plantas-mãe e plantas-progênie por ser um grupo de fitoquímico
97 importante em plantas de pimentão e com potencial de atuar como defesas contra insetos
98 mastigadores e sugadores (Dong *et al.*, 2017; Movva & Pathipati, 2017; Macel *et al.*, 2019).
99 Nós especificamente abordamos as seguintes questões: (i) a herbivoria materna afeta a

100 reprodução das plantas-mãe?; (ii) a herbivoria materna induz resistência transgeracional contra
101 coespecíficos do herbívoro?; (iii) a herbivoria materna induz resistência transgeracional contra
102 não coespecíficos?; (iv) a herbivoria materna altera os níveis de fenóis da progênie?; (v) os
103 efeitos da herbivoria materna sobre a resistência da progênie persistem por mais de uma
104 geração?; (vi) a resistência transgeracional implica em custos para o crescimento e reprodução
105 da progênie? Ainda que seja um herbívoro generalista (Walsh, 2003), *D. speciosa* e o ancestral
106 de *C. annuum* compartilham o mesmo centro de origem (Mesoamérica) e co-existem em
107 ambientes naturais há milhares de anos (Eben & Monteros, 2013; Kraft *et al.*, 2014). Por isso,
108 nós hipotetizamos que a herbivoria materna por *D. speciosa* em plantas de pimentão impacta a
109 reprodução e produz uma progênie mais resistente a um subseqüente ataque de coespecíficos
110 desse herbívoro. Além disso, a resistência herdada deve se estender a outros herbívoros
111 heteroespecíficos, como *M. persicae*, que é comumente encontrado em *C. annuum* e exerce
112 uma forte pressão sobre a sobrevivência e reprodução do pimentão (de Moura *et al.*, 2015;
113 Alaserhat & Canbay, 2017).

114

115 **Materiais e Métodos**

116 *Plantas e insetos*

117 *C. annuum* é uma planta arbustiva e perene, porém cultivada de forma anual. Originária
118 do México e América Central, possui folhas de coloração verde-escura, flores pequenas de
119 pétalas brancas frequentemente visitadas por abelhas e sirfídeos (Jarlan *et al.* 1997ab; Raw,
120 2000; Cruz *et al.* 2005; Serrano and Guerra-Sanz, 2006), e seus frutos variam em forma,
121 tamanho e coloração, sendo verde, amarelo e vermelho os mais comuns (Aguilar-Meléndez *et*
122 *al.*, 2009). Além disso, *C. annuum* é comumente atacada por uma diversidade de herbívoros
123 que incluem besouros, lagartas, afídeos e tripes (Weintraub, 2007).

124 Sementes de pimentão *C. annuum* (cv. Mallorca) coletadas de frutos maduros
125 (vermelhos) foram obtidas de uma unidade experimental de cultivo orgânico da Fazenda
126 Palmital (Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil). O plantio das sementes foi
127 iniciado em bandejas de produção de mudas (72 células) preenchidas com substrato comercial
128 (Carolina Soil®, Carolina Soil Company, Brasil) e mantidas em casa de vegetação, sem
129 controle de luz e temperatura e livre de insetos (Lavras, MG, Brasil, estação de verão
130 2016/2017). Após 40 dias da sementeira, as plântulas (com quatro pares de folhas) foram
131 transplantadas para vasos de plásticos (capacidade de 2,5 litros) contendo uma mistura de solo,

132 areia, e esterco bovino, em uma proporção de 2:1:1, respectivamente. As plantas foram irrigada,
133 todos os dias no período da manhã. A cada 30 dias, as plantas foram adubadas com 15 g de
134 uréia/vaso diretamente no solo.

135 Adultos de *D. speciosa*, foram coletados em campo, em cultivos de milho da
136 Universidade Federal de Lavras (UFLA), levados ao laboratório, onde foi iniciada a criação
137 desses insetos, utilizando a metodologia de Ávila & Milanez (2004). A criação dos insetos foi
138 mantida em laboratório, sob condições controladas ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de UR e 12 horas de
139 fotofase). Para a realização dos experimentos, foram utilizadas fêmeas adultas de besouros,
140 recém emergidas. Os pulgões *M. persicae* foram obtidos de uma criação já existente no
141 Departamento de Entomologia (UFLA, Lavras, MG, Brasil). A população foi mantida em
142 laboratório sob condições controladas ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de UR e 12 horas de fotofase) em
143 gaiolas contendo, como hospedeiro, plantas de *Nicandra physalodes* L. (Solanaceae), as quais
144 foram substituídas por novas plantas a cada três dias.

145

146 *Tratamentos*

147

148 A geração parental (plantas-mãe, Geração 0 ou G0) foi infestada no estágio vegetativo
149 (oito pares de folhas) com duas fêmeas adultas de *D. speciosa*, que permaneceram até o início
150 da frutificação (Fig. 1). As plantas infestadas foram cobertas com sacos de *voile* (1,0 x 0,5 m)
151 para evitar o escape dos insetos. As plantas não infestadas foram igualmente cobertas pelos
152 sacos, porém sem a adição dos besouros. As plantas-mãe não infestadas e plantas-mãe (G0)
153 infestadas por *D. speciosa* foram mantidas em casa de vegetação e distribuídas aleatoriamente
154 nas bancadas. As sementes (Geração 1, ou G1) obtidas das plantas-mãe não infestadas e
155 infestadas foram germinadas para obtenção das plantas-progênie da primeira geração. As
156 plantas-progênie das plantas não infestadas e infestadas por *D. speciosa* da primeira geração
157 foram mantidas na casa de vegetação sem sofrer qualquer infestação ou infecção por patógenos
158 até produzir frutos e sementes (Geração 2, ou G2), que foram semeadas para a obtenção de
159 plantas-progênie da segunda geração (Fig. 1). Assim, as plantas-progênie foram cultivadas sob
160 as mesmas condições das plantas-mãe, no entanto, sem indução da herbivoria. As plantas-
161 progênie da segunda geração (G2) foram cultivadas apenas até a fase vegetativa (Fig. 1).

162

163 *Efeito da herbivoria de D. speciosa na reprodução das plantas-mãe*

164

165 Para verificar se a herbivoria de *D. speciosa* afeta a reprodução das plantas-mãe de
166 pimentão, nós analisamos características reprodutivas como número de flores, frutos, sementes,
167 assim como o tamanho dos frutos de plantas-mãe não infestadas e infestadas por *D. speciosa*.
168 Quando as plantas iniciaram o estágio reprodutivo (novembro de 2017), a contagem das flores
169 foi realizada diariamente durante 10 dias, ou seja, até que todas as flores tivessem sido
170 quantificadas. A contagem dos frutos foi realizada no início da frutificação (frutos verdes) e
171 perdurou 20-25 dias até que todos estivessem formados. Após o amadurecimento dos frutos
172 (~120 dias após o plantio), quando estes já estavam vermelhos, todos foram coletados e levados
173 ao laboratório para avaliação do comprimento, diâmetro e número de sementes por fruto. O
174 comprimento e diâmetro dos frutos foram medidos com fita métrica e a contagem das
175 sementes/fruto com utilização de contador manual. As sementes foram retiradas dos frutos e
176 secas em temperatura ambiente dispostas em uma placa de Petri (15 cm de diâmetro) com papel
177 filtro, durante três dias. Após esse período, 50 sementes de cada tratamento foram
178 individualmente pesadas em balança analítica (Marte AY220) (Marte balanças e aparelhos de
179 precisão Ltda., Santa Rita do Sapucaí, MG, Brasil).

180

181 *Efeito da herbivoria materna no crescimento e na reprodução da progênie*

182

183 Para avaliar se a herbivoria materna afeta o crescimento e na reprodução da progênie,
184 nós analisamos características de vigor vegetativo e reprodutivas das gerações subsequentes. O
185 crescimento foi analisado pela taxa de germinação e massa seca de plântulas-progênie de
186 plantas infestadas por *D. speciosa* e não infestadas na primeira (G1) e segunda (G2) gerações.
187 Para a taxa de germinação, colocamos uma semente por cada célula de uma bandeja de
188 produção de mudas (72 células/bandeja), totalizando oito bandejas por tratamento, para cada
189 geração. Após 45 dias da semeadura, contabilizamos o número de plântulas germinadas em
190 cada bandeja e escolhemos aleatoriamente 35 plântulas (dois pares de folhas) de cada
191 tratamento, nas duas gerações. Nós cortamos as plântulas na base do caule, individualizamos
192 em sacos de papel (7cm x 10cm) e colocamos para secar em estufa a 60° por 24h. As plântulas
193 secas foram individualmente pesadas em balança analítica (Marte AY220), para obtenção da
194 massa seca. Com relação às características reprodutivas, foram avaliadas 17 plantas-progênie
195 de cada tratamento, somente da primeira geração, usando o mesmo método descrito no subitem
196 anterior.

197

198 *Efeito da herbivoria materna na resistência a *D. speciosa**

199 Para avaliar se a herbivoria de *D. speciosa* altera a resistência das plantas-progênie a
200 coespecíficos, nós mensuramos a preferência alimentar de fêmeas adultas de *D. speciosa* frente
201 a plantas-mãe (G0) e plantas-progênie de plantas infestadas por *D. speciosa* e não infestadas da
202 primeira e segunda gerações (G1 e G2) (Peñaflor *et al.*, 2016). O ensaio foi feito com chance
203 de escolha expondo um par de plantas em estágio vegetativo (seis pares de folhas), à herbivoria
204 por *D. speciosa*. A unidade experimental consistiu em uma arena composta por uma placa de
205 Petri de poliestireno (15 cm de diâmetro), com dois orifícios (3 cm de diâmetro cada) na parte
206 inferior, e apoiada em uma plataforma na altura dos pares de plantas. Uma folha de cada planta
207 (folha mais jovem expandida) foi posicionada abaixo da parte inferior da placa de Petri, sem a
208 excisão da folha, de modo que os orifícios delimitaram a área foliar de cada planta (Fig. 2).
209 Uma fêmea adulta de *D. speciosa* foi liberada no centro da placa de Petri, a qual foi fechada e
210 o ensaio iniciado às 10:00 h. Após 72 h, as folhas foram destacadas e escaneadas (HP
211 Photosmart C4200 series) para mensurar a área do tecido foliar consumido pelo besouro usando
212 o Software livre ImageJ (v. 1.49). Foram realizadas as seguintes combinações dos tratamentos:
213 (i) G0 não infestada vs. G1 não infestada; (ii) G0 não infestada vs. G2 não infestada; (iii) G0
214 não infestada vs. G1 infestada por *D. speciosa*; (iv) G0 não infestada vs. G2 infestada; (v) G1
215 não infestada vs. G2 não infestada; (vi) G1 infestada vs. G2 infestada e (vii) G1 não infestada
216 vs. G1 infestada. O experimento foi conduzido em laboratório sob condições controladas ($25 \pm$
217 2°C ; e umidade relativa de $70 \pm 10\%$). Para esse experimento foram realizadas oito repetições
218 de cada tratamento.

219

220 *Efeito da herbivoria materna na resistência a M. persicae*

221 Nós avaliamos o tamanho da colônia do pulgão-verde *M. persicae* em plantas-progênie
222 de plantas infestadas por *D. speciosa* e não infestadas na primeira e segunda gerações para
223 verificar se a herbivoria materna torna a planta mais resistente a herbivoria de um
224 heteroespecífico e de outra guilda alimentar, um sugador de seiva. As plantas-progênie, na fase
225 vegetativa (seis pares de folhas) foram inicialmente infestadas com 20 ninfas de primeiro ínstar,
226 que foram individualmente isoladas por um saco de tecido *voile* branco. Após dez dias, os sacos
227 foram removidos e foi contabilizado, com utilização de um contador manual, o número total de
228 pulgões em cada planta. O experimento foi realizado em casa de vegetação, sem controle de luz
229 e temperatura. Para esse experimento foram conduzidas 10 repetições para cada tratamento.

230

231 *Análise de fenóis totais*

232 Avaliamos se a herbivoria materna por *D. speciosa* altera os níveis constitutivos de
233 fenóis totais de plantas-progênie de plantas infestadas por *D. speciosa* e não infestadas em
234 relação às plantas-mãe. Foram coletadas as duas folhas jovens expandidas de cada planta e
235 imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Posteriormente, as amostras foram
236 liofilizadas por 24 h e trituradas com almofariz e pistilo até a obtenção de um pó fino. Uma
237 alíquota de 30 mg do material liofilizado foi transferida para microtubo de 2 mL,
238 homogeneizada com 1,5 mL de metanol a 80% e mantida sob agitação por 15 h, em agitador
239 rotativo, protegido da luz, à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada, a 14.000 rpm,
240 por 7 min e 150 uL do sobrenadante (extrato metanólico) foi transferido para um novo
241 microtubo. Foi adicionado 150 uL do reagente de Folin-Ciocalteu 0,25 N e as amostras
242 permaneceram descansando por 5 min em temperatura ambiente. Posteriormente foi adicionado
243 150 µL de Na₂CO₃ 1/M e as amostras foram homogeneizadas manualmente e ficaram
244 descansando por 10 min. Por fim foi adicionado 1mL de água destilada e as amostras
245 permaneceram à temperatura ambiente, por 1 h. Após esse tempo, 200 uL das amostras foram
246 colocadas em triplicatas em microplaca de microtitulação de 96 poços e a análise dos fenóis
247 totais foi realizada com seis repetições de cada tratamento e, em cada repetição foi retirada uma
248 triplicata. Os valores de absorbância desta reação foram determinados a 725 nm, em
249 espectrofotômetro de microplacas (Epoch 2, Biotek Instruments, EUA) e calculados com base
250 em curva de ácido clorogênico. Os fenóis totais foram expressos em equivalente a µg de fenol
251 por mg de massa seca. Para essa análise foram realizadas seis repetições de cada tratamento.

252

253 *Análises estatísticas*

254 A normalidade e homocedasticidade dos dados referentes às características reprodutivas
255 das plantas-mãe da primeira geração, taxa de germinação, massa seca das plântulas, preferência
256 alimentar de *D. speciosa* e desempenho do pulgão, foram testados pelo teste de Shapiro-Wilk
257 e de Bartlett, respectivamente. Quando os pressupostos foram atendidos, os dados foram
258 analisados pelo teste *t*, caso contrário, os dados foram analisados usando um modelo linear
259 generalizados (GLM) com distribuição de erros ajustada. Para comparação da massa seca das
260 sementes das plantas-mãe e progênie foi realizado o teste de Dunnet. O nível de fenóis totais
261 das plantas-mãe e progênie foi analisado pela *one-way* ANOVA. O teste de Dunnet foi realizado

262 no programa Minitab (19.2.0) (State College, Pennsylvania) e as demais análises estatísticas
263 foram realizadas no pacote estatístico R (versão 3.4.0) (Vienna, Austria).

264

265 **Resultados**

266 *Efeito da herbivoria de D. speciosa na reprodução das plantas-mãe*

267 Apesar das plantas-mãe não infestadas e infestadas por *D. speciosa* terem produzido
268 números similares de flores ($F_{1,39} = 28,95$; $P = 0,139$), plantas-mãe infestadas apresentaram
269 menor número de frutos ($F_{1,39} = 7,57$; $P < 0,01$, Tabela 1). No entanto, as dimensões dos frutos
270 e a quantidade de sementes/fruto das plantas-mãe não infestadas e infestadas por *D. speciosa*
271 foram similares (comprimento fruto: $t = 1,92$, $gl = 70$ $P = 0,059$; diâmetro fruto: $t = 1,40$; $gl =$
272 70 , $P = 0,164$; sementes/fruto: $F_{1,38} = 1,073$; $P = 0,304$, Tabela 1).

273

274 *Efeito da herbivoria materna no crescimento e na reprodução da progênie*

275 As sementes das plantas-mãe infestadas por *D. speciosa* apresentaram maiores taxas de
276 germinação do que aquelas de plantas-mãe não infestadas ($t = -5,06$, $gl = 14$, $P < 0,001$) e o
277 mesmo resultado foi observado para a progênie da segunda geração ($t = -4,23$, $gl = 14$, $P <$
278 $0,001$, Fig. 3a). As plântulas-progênie de plantas infestadas por *D. speciosa* tiveram maior
279 massa seca do que aquelas da progênie de plantas não infestadas tanto na primeira geração
280 quanto na segunda geração (G1: $\chi^2 = 392,86$, $gl = 1$, $P < 0,001$; G2: $\chi^2 = 28,98$, $df = 1$, $P <$
281 $0,001$) (Fig. 3b). Em relação à reprodução, que foi analisada somente na primeira geração,
282 plantas-progênie de plantas infestadas produziram maior número de flores e frutos do que
283 plantas-progênie de plantas não infestadas (flores: $t = -8,87$, $gl = 32$, $P < 0,001$; frutos: $F_{1,33} =$
284 $70,66$, $P < 0,001$, Tabela 1). Além disso, os frutos das plantas-progênie de plantas infestadas
285 apresentaram maior comprimento e diâmetro (comprimento: $t = -5,92$, $gl = 50$, $P < 0,001$;
286 diâmetro: $t = -4,32$, $gl = 50$, $P < 0,001$), e continham mais sementes do que os das plantas-
287 progênie de plantas não infestadas ($F_{1,32} = 23,85$, $P < 0,001$) (Tabela 1). A massa seca das
288 sementes G0, que originaram as plantas-mãe, foi similar a das sementes-progênie de plantas
289 não infestadas da primeira e segunda geração, porém, foi menor em relação às sementes-
290 progênie de plantas infestadas das duas gerações ($P < 0,05$, Fig. 4).

291

292 *Efeito da herbivoria materna na resistência da progênie a D. speciosa*

293 Os adultos de *D. speciosa* consumiram quantidades similares de tecido foliar das
 294 plantas-mãe (G0) não infestadas em relação às plantas-progênie da planta não infestada das
 295 duas gerações (G1 não infestada e G2 não infestada) (G0 não infestada vs. G1 não infestada :
 296 $\chi^2 = 0,12$, gl = 1, $P = 0,726$, Fig. 5a; G0 não infestada vs. G2 não infestada $\chi^2 = 0,14$, gl = 1, P
 297 = 0,704, Fig. 5b). Quando *D. speciosa* foi exposta ao mesmo tratamento, mas de diferentes
 298 gerações, *D. speciosa* não discriminou entre as gerações de plantas-progênie de plantas não
 299 infestada para a alimentação (G1 não infestada vs. G2 não infestada: $t = -0,15$, gl = 12, $P = 0,88$,
 300 Fig. 5e), e de plantas-progênie de plantas infestadas por *D. speciosa* (G1 infestada vs. G2
 301 infestada: $\chi^2 = 0,42$, gl = 1, $P = 0,524$, Fig. 5f). No entanto, quando os insetos foram expostos
 302 às plantas-mãe não infestadas (G0) e plantas-progênie de plantas infestadas da primeira ou da
 303 segunda geração, *D. speciosa* preferiu se alimentar de plantas-progênie (G0 não infestada vs.
 304 G1 infestada: $\chi^2 = 8,19$, gl = 1, $P < 0,01$, Fig. 5c; G0 não infestada vs. G2 infestada: $\chi^2 = 5,85$,
 305 gl = 1, $P < 0,05$, Fig. 5d). De forma similar, os besouros consumiram mais tecido foliar de
 306 plantas-progênie de plantas infestadas do que plantas-progênie não infestadas, ambos
 307 tratamentos da primeira geração (G1 não infestada vs. G1 infestada: $\chi^2 = 4,78$, gl = 1, $P < 0,05$,
 308 Fig. 5g).

309

310 *Efeito da herbivoria materna na resistência da progênie a M. persicae*

311 Após 10 dias da infestação inicial por *M. persicae*, a colônia de pulgões em plantas-
 312 progênies de plantas não infestadas foi aproximadamente duas vezes mais numerosa do que em
 313 plantas-progênies de plantas infestadas por *D. speciosa* na primeira geração ($F_{1,19} = 15,41$; P
 314 $< 0,001$, (Fig. 6). Em plantas-progênie da segunda geração, a colônia de pulgões foi maior em
 315 plantas-progênies de plantas não infestadas, porém esse valor foi de apenas 1,4 vezes superior
 316 em relação às plantas-progênies de plantas infestadas ($t = 3,88$, gl = 18, $P < 0,01$).

317

318 *Efeitos da herbivoria maternal nos níveis de fenóis totais*

319 Os níveis constitutivos de fenóis totais de plantas-mães (G0) e plantas-progênie,
 320 independente do tratamento e geração, foram similares ($F_{4,24} = 1,45$; $P = 0,252$) (Fig. 7).

321

322 **Discussão**

323 A herança da resistência induzida em plantas pode conferir uma vantagem adaptativa
324 quando gerações parentais e progênie compartilham um ambiente sob alta pressão de
325 herbívoros. A resistência transgeracional à herbivoria de coespecíficos foi constatada em
326 algumas espécies vegetais (Agrawal, 1999, 2001b, 2002; Van Dam & Baldwin, 2001; Holeski
327 *et al.*, 2007; Scoville *et al.*, 2011; Rasmann *et al.*, 2012; Holeski *et al.*, 2013; Ballhorn *et al.*,
328 2016; González-Megías, 2016; Dong *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2017; Verhoeven & Gurr, 2012,
329 Verhoeven *et al.*, 2018; Neylan *et al.*, 2018), porém há poucos relatos de outras estratégias que
330 as plantas adotaram para a progênie sobreviver e reproduzir mesmo sob a pressão de herbívoros
331 (Holeski *et al.*, 2013). Nossos resultados negaram a nossa hipótese inicial que a herbivoria
332 materna em plantas de pimentão por *D. speciosa* aumentaria a resistência dos descendentes a
333 herbívoros coespecíficos. A progênie de plantas infestadas por *D. speciosa* tornou-se mais
334 suscetível ao besouro, ao mesmo tempo em que teve um maior vigor vegetativo e reprodutivo,
335 indicando uma estratégia distinta da resistência transgeracional (Agrawal, 1999, 2001b, 2002;
336 Gonzalez-Megías, 2016; Rasmann *et al.* 2012). Porém, surpreendentemente, a progênie de
337 plantas infestadas por *D. speciosa* tornou-se mais resistente ao herbívoro heteroespecífico, *M.*
338 *persicae*, do que a progênie de plantas não infestadas.

339 Ainda que a herbivoria de adultos de *D. speciosa* não tenha alterado alguns parâmetros
340 reprodutivos das plantas-mãe, como número de flores, tamanho de frutos e massa seca de
341 semente, o número de frutos foi 1,6 vezes menor em plantas infestadas em relação às não
342 infestadas. A florivoria por esses besouros é muito comum em solanáceas (Walsh, 2003) e deve
343 ter contribuído para a redução do número de frutos formados. O impacto da herbivoria por
344 adultos de *D. speciosa* na reprodução de plantas de pimentão parece ser mais acentuado em
345 condições de campo, onde o ataque reduz não só os números de flores e frutos, como também
346 o tamanho dos frutos e quantidade de sementes (Souza L.A., dados não publicados). Por outro
347 lado, a herbivoria por *D. speciosa* induziu nas plantas-mãe e progênie (*i.e.*, G1 e G2) a formação
348 de sementes maiores do que aquelas das plantas-mãe não infestadas ou das que originaram as
349 plantas-mãe (G0). Essas sementes maiores da G1 e G2 de plantas infestadas por *D. speciosa*
350 tiveram taxas de germinação maiores e também deram origem a plântulas maiores do que a
351 progênie de plantas não infestadas, provavelmente devido a uma maior reserva nutricional da
352 semente (Murray, 1984; Roach & Wulff, 1987; Sultan, 1996). No estágio reprodutivo, as
353 plantas-progênie de plantas infestadas não só produziram uma maior quantidade de flores e
354 frutos/planta, mas também frutos maiores, contendo mais de 2 vezes mais sementes do que a
355 progênie de plantas não infestadas.

356 A despeito do maior vigor vegetativo e reprodutivo da progênie de plantas infestadas, a
357 herbivoria maternal por *D. speciosa* tornou os descendentes mais suscetíveis a um subseqüente
358 ataque por coespecíficos, como os ensaios de preferência alimentar mostraram. As fêmeas
359 adultas preferiram se alimentar de plantas-progênie de plantas infestadas frente àquelas de
360 plantas não infestadas da primeira geração, ou frente às plantas-mãe (geração G0). Elas também
361 não diferenciaram entre plantas-progênie de plantas infestadas das duas gerações, sugerindo
362 que a maior suscetibilidade induzida pela herbivoria maternal foi mantida pelas duas gerações
363 subseqüentes.

364 A maior parte da literatura mostra que a herbivoria materna geralmente altera o tamanho
365 da semente, embora o efeito seja variável (Wuff, 1986; Agrawal 2001b; 2002; Van Dam &
366 Baldwin, 2001; González-Megías, 2016), e afeta negativamente a reprodução da progênie,
367 provavelmente refletindo os custos energéticos da resistência transgeracional (Kellenberger *et*
368 *al.* 2018). A indução da suscetibilidade foi reportada em apenas um sistema envolvendo uma
369 espécie arbórea (Holeski *et al.*, 2013). Esses autores constataram que a herbivoria materna não
370 impacta a germinação das sementes e características de crescimento da prole, contudo, afeta
371 negativamente as defesas, estratégia que difere da plasticidade transgeracional de resistência
372 encontradas nas plantas anuais (Holeski *et al.*, 2012).

373 A estratégia de *C. annuum* em direcionar o recurso energético para o crescimento e
374 reprodução dos descendentes em detrimento das defesas deve ser vantajosa pelo fato da
375 população de *D. speciosa* em pimentão ser transiente. Os besouros adultos de *D. speciosa* são
376 polípagos, mas o estágio larval alimenta-se de raízes de um grupo restrito de espécies vegetais,
377 como milho, batata e feijão (Gassen, 1989; Walsh, 2003). Sendo assim, a planta de pimentão é
378 um hospedeiro temporário para *D. speciosa* e, provavelmente, a transferência de caracteres de
379 defesas induzidas não seja vantajosa como a regulação do balanço energético para o
380 crescimento e reprodução. Vale ressaltar que no nosso estudo a reprodução das plantas-progênie
381 foi avaliada sem a influência da herbivoria. Para avaliar melhor se a plasticidade no balanço
382 energético é uma estratégia vantajosa para *C. annuum* contra o ataque de *D. speciosa*, seria
383 necessário verificar o *fitness* da progênie sob ataque dos adultos, além da flutuação populacional
384 do besouro, em campo, ao longo de gerações das plantas de pimentão.

385 Ao contrário do observado neste estudo, a herbivoria materna no pimentão pelo pulgão
386 *M. persicae* torna a progênie mais resistente a herbivoria de coespecíficos com custos para o
387 crescimento e reprodução das plantas (Souza L.A., dados não publicados). Dessa forma, essa
388 diferença observada na plasticidade do balanço energético da planta de pimentão em relação às

389 duas espécies de herbívoros provavelmente ocorre devido a uma maior pressão da herbivoria
390 de *M. persicae*, uma vez que a infestação por esses insetos pode ocasionar a morte das plantas.

391 Apesar da indução de suscetibilidade a herbívoros coespecíficos, a herbivoria materna
392 por *D. speciosa* induziu uma maior resistência da progênie ao herbívoro heteroespecífico, o
393 pulgão *M. persicae*, nas duas gerações subsequentes. As colônias de pulgões foram duas vezes
394 menores em plantas-progênie de plantas infestadas em relação àquelas em progênie de plantas
395 não infestadas na primeira geração. Na segunda geração, o mesmo efeito foi observado, porém
396 de forma menos drástica. Esse resultado não era esperado já que a hipótese da resistência
397 transgeracional não havia sido confirmada para a herbivoria dos coespecíficos e ambos
398 herbívoros são generalistas. Por se tratar de um inseto sugador, a herbivoria do pulgão aciona
399 vias de defesa das plantas diferentes em relação aos mastigadores, como aquelas moduladas
400 pelo ácido salicílico e o etileno (Kempema *et al.*, 2007; Zarate *et al.*, 2007; Pinto-Zevallos *et*
401 *al.*, 2013), que devem ter interagido com a regulação das defesas da progênie das plantas
402 infestadas por *D. speciosa*. Mas, são necessários mais estudos sobre os níveis de fitohormônios
403 e expressão gênica da progênie para revelar as causas proximais do aumento da resistência ao
404 pulgão induzido pela herbivoria materna de *D. speciosa*.

405 Os fenóis totais, ainda que representem um grupo importante de fitoquímico com papel
406 defensivo do pimentão (Vijaia & Rani, 2017; Macel *et al.*, 2019), não explicou a redução ou
407 aumento da resistência na progênie de plantas infestadas a coespecíficos ou heteroespecíficos.
408 Por outro lado, a herbivoria materna de *M. persicae* promove aumento dos níveis constitutivos
409 e induzidos dos fenóis totais nas folhas das plantas-progênie de plantas infestadas, que
410 coincidem com a maior resistência ao pulgão (Souza L.A., dados não publicados).

411 Diferentemente das plantas de ciclo de vida anuais estudadas até hoje (Agrawal, 1999;
412 Van Dam & Baldwin, 2001; Steets & Ashman, 2010; Rasman *et al.*, 2012; Ballhorn *et al.*, 2016;
413 González-Megías, 2016; Sing *et al.*, 2017; Kellenberger *et al.*, 2018; Neylan *et al.*, 2018), nosso
414 trabalho mostrou que *C. annuum* utiliza uma estratégia diferente para deixar descendentes mais
415 adaptados à pressão da herbivoria por adultos de *D. speciosa*. Nós sugerimos que a maior
416 susceptibilidade das duas gerações de plantas ao herbívoro coespecífico é decorrente de um
417 balanço energético que prioriza o crescimento e reprodução frente às defesas. Nossos resultados
418 são congruentes com aqueles de Holeski *et al.* (2013) para duas espécies de plantas perenes,
419 que utilizam uma estratégia de balanço energético entre crescimento/reprodução e defesa
420 semelhante à resposta do pimentão à herbivoria materna por *D. speciosa*. Tal semelhança pode
421 ser um padrão para plantas perenes, pois o pimentão *C. annuum* é descendente de um ancestral
422 de ciclo perene (Hernández-Verdugo *et al.*, 2001) e pode ter herdado características adaptativas

423 diferentes daquelas de plantas anuais. Outra hipótese é que a planta apresente uma plasticidade
424 transgeracional no alocamento energético que seja regulada dependendo da espécie do
425 herbívoro, pois o pimentão apresentou uma estratégia distinta sob herbivoria materna do pulgão
426 *M. persicae* (Souza L.A., dados não publicados). Estudos futuros devem investigar ambas as
427 hipóteses avaliando a plasticidade fenotípica transgeracional frente à herbivoria materna em
428 outras espécies perenes, para comparação com a literatura em plantas anuais; e a resposta de
429 uma espécie de planta sob herbivoria materna por herbívoros que exerçam variada intensidade
430 de pressão sobre a sobrevivência e reprodução da planta.

431

432 **Agradecimentos**

433

434 Este trabalho teve apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
435 Superior–Brasil (CAPES)–Código de Financiamento 001 e do Departamento de Entomologia
436 da Universidade Federal de Lavras, UFLA. Nós agradecemos ao laboratório de Fisiologia do
437 parasitismo do departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras pelo
438 fornecimento de alguns materiais e equipamentos para a análise de fenóis totais.

Referências

- Agrawal, A.A. (1998) Induced responses to herbivory and increased plant performance. *Science*, **279**, 1201-1202.
- Agrawal, A.A., Laforsch, C., Tollrian, R. (1999) Transgenerational induction of defences in animals and plants. *Nature*. **401**, 60-63.
- Agrawal, A.A. (2001a) Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science*, **294**, 321-326.
- Agrawal, A.A. (2001b) Transgenerational consequences of plant responses to herbivory: an adaptive maternal effect?. *The American Naturalist*. **157**, 555-569.
- Agrawal, A.A. (2002) Herbivory and maternal effects: mechanisms and consequences of transgenerational induced plant resistance. *Ecology*, **83**, 3408-3415.
- Aguilar-Meléndez, A., Morrell, P.L., Roose, M.L., & Kim, S.C. (2009) Genetic diversity and structure in semiwild and domesticated chiles (*Capsicum annum*; Solanaceae) from Mexico. *American Journal of Botany*, **96**, 1190-1202.
- Alaserhat, Í.; Canbay, A. (2017) Aphididae species, their parasitoids, predators, and parasitism rates on pepper (*Capsicum annum* L.). *Entomological News*, 36–50.
- Ávila, C.J. & Milanez, J.M. Larva-alfinete. (2004) In: Salvadori, J. R., Ávila, C.J., Silva, M.T.B. da (Ed.). Pragas de solo no Brasil. Passo Fundo: Embrapa Trigo; Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz Alta: Fundacep Fecotrigo, 345-378.
- Ballhorn, D.J., Kautz, S., & Laumann, J.M. (2016) Herbivore damage induces a transgenerational increase of cyanogenesis in wild lima bean (*Phaseolus lunatus*). *Chemoecology*, **26**, 1-5.
- Chaudhary, A. *et al.* (2018) Plant defenses against herbivorous insects: A Review. *International Journal of Chemical Studies*, **6**, 681-688.
- Chinnusamy, V., & Zhu, J. K. (2009) Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current opinion in plant biology*, **12**, 133-139.
- Cruz D.O, Freitas B.M., Silva L.A et al (2005) Pollination efficiency of the stingless bee *Melipona subnitida* on greenhouse sweet pepper. *Pesquisa agropecuária brasileira*, **40**, 1197-1201.
- de Moura, A. P.; Guimaraes, J. & LIMA, M. (2015) Guia prático para o reconhecimento e monitoramento das principais pragas na produção integrada do pimentão. *Embrapa Hortaliças Documentos (INFOTECA-E)*.
- Dicke, M. & Baldwin, I.T. (2010) The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the ‘cry for help’. *Trends in plant science*, **15**, 167-175.

- Dong, B., Fu, T., Luo, F.L., & Yu, F.H. (2017) Herbivory-induced maternal effects on growth and defense traits in the clonal species *Alternanthera philoxeroides*. *Sci. Total Env.* **15**, 114-23.
- Eben, A. & de Los Monteros, A.E. (2013) Tempo and mode of evolutionary radiation in Diabroticina beetles (genera *Acalymma*, *Cerotoma*, and *Diabrotica*). *ZooKeys*, 332, 207.
- Gassen, D.N. (1989) Insetos subterrâneos prejudiciais às culturas no sul do Brasil. Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 49p. (Embrapa-CNPT. Documentos, 13).
- Gatehouse, J.A. (2002) Plant resistance towards insect herbivores: A dynamic interaction. *New Phytologist*. **156**, 145-169.
- González-Megías, A. (2016) Within-and trans-generational effects of herbivores and detritivores on plant performance and reproduction. *Journal of Animal Ecology*, **85**, 283-290.
- Herns, D.A., & Mattson, W.J. (1992) The dilemma of plants: to grow or defend. *The quarterly review of biology*, **67**, 283-335.
- Hernández-Verdugo, S.; Luna-Reyes, R. & Oyama, K. (2001) Genetic structure and differentiation of wild and domesticated populations of *Capsicum annuum* (Solanaceae) from Mexico. *Plant Systematics and evolution*, **226**, 129-142.
- Holeski, L.M. (2007) Within and between generation phenotypic plasticity in trichome density of *Mimulus guttatus*. *Journal of evolutionary biology*, **20**, 2092-2100.
- Holeski, L.M., Jander, G. & Agrawal, A.A. (2012) Transgenerational defense induction and epigenetic inheritance in plants. *Trends in ecology & Evolution*, 27, 618-26.
- Holeski, L.M., Zinkgraf, M.S., Couture, J.J., Whitham, T.G. & Lindroth, R.L. (2013) Transgenerational effects of herbivory in a group of long-lived tree species: maternal damage reduces offspring allocation to resistance traits, but not growth. *Journal of Ecology*, **101**, 1062-1073.
- Jablonka, E., & Raz, G. (2009) Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. *The Quarterly review of biology*, **84**, 131-176.
- Jarlan A, De Oliveira D. & Gingras J. (1997a) Pollination by *Eristalis tenax* (Diptera: Syrphidae) and seed set of greenhouse sweet pepper. *Journal of Economic Entomology*, **90**, 1646-1649.
- Jarlan A, De Oliveira, D. & Gingras, J. (1997b) Effects of *Eristalis tenax* (Diptera: Syrphidae) pollination on characteristics of greenhouse sweet pepper fruits. *Journal of Economic Entomology*, **90**: 1650-1654.
- Karban, R. & Baldwin, I.T (1997) *Induced Responses to Herbivory*. University of Chicago Press, Chicago, IL.
- Karban, R. & Agrawal, A.A. (2002) Herbivore offense. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **33**, 641-664.

- Kellenberger, R.T., Desurmont, G.A., Schlüter, P.M. & Schiestl, F.P. (2018) Transgenerational inheritance of herbivory-induced phenotypic changes in *Brassica rapa*. *Scientific reports*, **8**, 3536.
- Kempema, L.A., Cui, X., Holzer, F.M., & Walling, L.L. (2007) Arabidopsis transcriptome changes in response to phloem-feeding silverleaf whitefly nymphs. Similarities and distinctions in responses to aphids. *Plant Physiology*. **143**, 849-865.
- Kessler, A. & Baldwin, I.T. (2002) Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annual review of plant biology*, **53**, 299-328.
- Kraft, K.H., Brown, C.H., Nabhan, G.P., Luedeling, E., Ruiz, J.D.J.L., d'Eeckenbrugge, G.C. & Gepts, P. (2014) Multiple lines of evidence for the origin of domesticated chili pepper, *Capsicum annuum*, in Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**, 6165-6170.
- Lippman, Z., May, B., Yordan, C., Singer, T. & Martienssen, R. (2003) Distinct mechanisms determine transposon inheritance and methylation via small interfering RNA and histone modification. *PLoS Biology*, **1**: 420–428.
- Lucas-Barbosa, D. (2016) Integrating studies on plant–pollinator and plant–herbivore interactions. *Trends in plant science*, **21**, 125-133.
- Macel M. *et al.* (2019) Metabolomics of Thrips Resistance in Pepper (*Capsicum* spp.) Reveals Monomer and Dimer Acyclic Diterpene Glycosides as Potential Chemical Defenses. *J. Chem. Ecol.* **8**, 1-2.
- Mothershead, K. & Marquis, R.J. (2000) Fitness impacts of herbivory through indirect effects on plant–pollinator interactions in *Oenothera macrocarpa*. *Ecology*, **81**, 30-40.
- Movva, V., & Pathipati, U. R. (2017) Feeding-induced phenol production in *Capsicum annuum* L. influences *Spodoptera litura* F. larval growth and physiology. *Arch. insect biochem. and physiol.* **95**, e21387.
- Murray, D.R. (1984) Accumulation of seed reserves of nitrogen. In *Seed Physiology*, Vol. 1. Development. ed. D. R. Murray, pp. 83-137. New York: Academic Press.
- Neylan, I.P., Dirzo, R., & Sobral, M. (2018) Cumulative effects of transgenerational induction on plant palatability to generalist and specialist herbivores. *Web Ecology*, **18**, 41-46.
- Peñaflor, M. F. G., Mauck, K. E., Alves, K. J., De Moraes, C. M., & Mescher, M. C. (2016). Effects of single and mixed infections of Bean pod mottle virus and Soybean mosaic virus on host-plant chemistry and host–vector interactions. *Functional Ecology*, **30**, 1648-1659.
- Pinto-Zevallos, D.M., Martins, C.B., Pellegrino, A.C., & Zarbin, P.H. (2013) Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. *Química Nova*, **36**, 1395-1405.

- Price, P.W., Denno, R.F., Eubanks, M.D., Finke, D.L. & Kaplan, I. (2011) *Insect ecology: behavior, populations and communities*. Cambridge University Press.
- Price, P.W, Bouton, C.E, Gross, P. *et al.* (1980) Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **11**, 41-65.
- R Core Team (2017) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rasmann, S., De Vos, M., Casteel, C.L., Tian, D., Halitschke, R., Sun, J.Y. & Jander, G. (2012). Herbivory in the previous generation primes plants for enhanced insect resistance. *Plant physiology*, **158**, 854-863.
- Raw A. (2000) Foraging behaviour of wild bees at hot pepper flowers (*Capsicum annuum*) and its possible influence on cross pollination. *Annals of Botany*, **85**, 87-492.
- Roach, D. A., & Wulff, R. D. (1987). Maternal effects in plants. *Annual review of ecology and systematics*, **18**, 209-235.
- Schoonhoven, L.M., Van Loon, J.J.A. & Dicke, M. (2005) *Insect-Plant Biology*, 2 nd ed. Oxford, 421 p.
- Scoville, A.G. & Pfrender, M.E. (2010). Phenotypic plasticity facilitates recurrent rapid adaptation to introduced predators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**, 4260-4263.
- Scoville, A.G., Barnett, L.L., Bodbyl-Roels, S., Kelly, J.K., & Hileman, L.C. (2011) Differential regulation of a MYB transcription factor is correlated with transgenerational epigenetic inheritance of trichome density in *Mimulus guttatus*. *New Phytologist*, **191**, 251-263.
- Serrano, AR., & Guerra-Sanz, J. M (2006) Quality fruit improvement in sweet pepper culture by bumblebee pollination. *Scientia Horticulturae*, **110**, 160-166.
- Schoonhoven, L.M., Van Loon, J.J.A. & Dicke, M. (2005) *Insect-Plant Biology*, 2 nd ed. Oxford, 421 p.
- Singh, P., Dave, A., Vaistij, F.E., Worrall, D., Holroyd, G.H., Wells, J.G. *et al.* R. (2017). Jasmonic acid-dependent regulation of seed dormancy following maternal herbivory in *Arabidopsis*. *New phytologist*, **214**, 1702-1711.
- Strauss, S.Y., Conner, J.K. & Rush, S.L. (1996) Foliar herbivory affects floral characters and plant attractiveness to pollinators: implications for male and female plant Fitness. *The American Naturalist*, **147**, 1098-1107.
- Strauss, S.Y. & Agrawal, A.A. (1999) The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends in Ecology & Evolution*, **14**, 179-185.
- Steets, J.A., & Ashman, T.L. (2010) Maternal effects of herbivory in *Impatiens capensis*. *International journal of plant sciences*, **171**, 509-518.

- Sultan, S. (1996). Phenotypic plasticity for offspring traits in *Polygonum persicaria*. *Ecology*, **77**(6), 1791-1807.
- Van Dam, N.M., & Baldwin, I.T. (2001) Competition mediates costs of jasmonate-induced defences, nitrogen acquisition and transgenerational plasticity in *Nicotiana attenuata*. *Functional Ecology*, **15**, 406-415.
- Verhoeven, K. J., & van Gurp, T. P. (2012) Transgenerational effects of stress exposure on offspring phenotypes in apomictic dandelion. *PloS one*, **7**, e38605.
- Verhoeven, K.J., Verbon, E.H., van Gurp, T.P., Oplaat, C., Ferreira de Carvalho, J., Morse, A.M. *et al.* (2018) Intergenerational environmental effects: functional signals in offspring transcriptomes and metabolomes after parental jasmonic acid treatment in apomictic dandelion. *New phytologist*, **217**, 871-882.
- Vijaya, M., & Rani, P. U. (2017). Defensive responses in *Capsicum annuum* (L) plants, induced due to the feeding by different larval instars of *Spodoptera litura* (F). *Arthropod-Plant Interactions*, **11**(2), 193-202.
- Zarate, S. I., Kempema, L. A., & Walling, L. L. (2007) Silverleaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. *Plant physiology*, **143**, 866-875.
- Walsh, G. C. (2003) Host range and reproductive traits of *Diabrotica speciosa* (Germar) and *Diabrotica viridula* (F.) (Coleoptera: Chrysomelidae), two species of South American pest rootworms, with notes on other species of Diabroticina. *Environmental entomology*, **32**, 276-285.
- Weinhold, A. (2018) Transgenerational stress-adaption: an opportunity for ecological epigenetics. *Plant cell reports*, **37**, 3-9.
- Weintraub, P. G. (2007) Integrated control of pests in tropical and subtropical sweet pepper production. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, **63**, 753-760.
- Wulff, R.D. (1986) Seed size variation in *Desmodium paniculatum*. 1. Factors affecting seed size. *Journal of Ecology*, **74**, 87-97

Tabela

Tabela 1. Efeito da herbivoria na reprodução (média \pm SE) das plantas-mães (G0) e na primeira geração (G1) de plantas originárias de plantas-mãe não infestadas e infestadas por *D. speciosa*. Níveis de significância: **P < 0,01; ***P < 0,001 ($\alpha = 0,05$).

Características	Gerações de plantas					
	G0			G1		
	Não infestada	<i>D. speciosa</i>	P Valor	Não infestada	<i>D. speciosa</i>	P Valor
Flores						
Número de flores/planta	4,35 \pm 0,41	3,55 \pm 0,33	0,140	7,78 \pm 0,39	11,00 \pm 0,67	< 0,001***
Frutos						
Número de frutos/planta	2,25 \pm 0,25	1,35 \pm 0,21	< 0,01**	3,55 \pm 0,19	7,35 \pm 0,76	< 0,001***
Comprimento (cm)	10,59 \pm 0,48	9,21 \pm 0,53	0,060	8,77 \pm 0,43	12,21 \pm 0,41	< 0,001***
Diâmetro (cm)	13,86 \pm 0,60	12,62 \pm 0,65	0,160	10,88 \pm 0,64	14,31 \pm 0,50	< 0,001***
Sementes						
Número de sementes/fruto	116,87 \pm 11,43	102,26 \pm 8,54	0,300	45,37 \pm 5,60	98,84 \pm 10,44	< 0,001***

Figuras

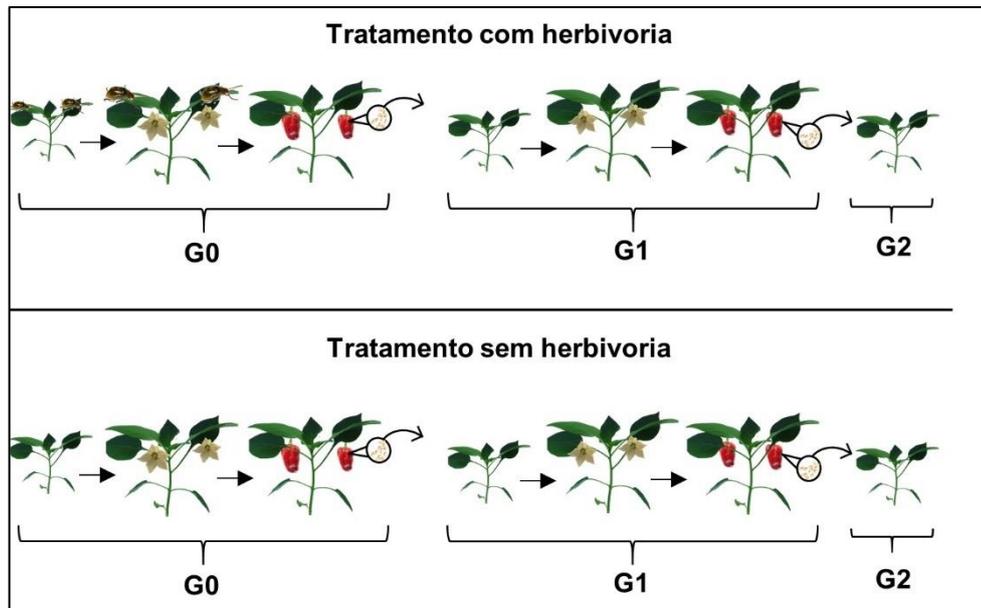


Figura 1. Esquema transgeracional do experimento mostrando a planta inicial (G0) com herbivoria de *D. speciosa* e sem herbivoria, a primeira geração (G1) sem herbivoria e a segunda geração (G2) sem herbivoria. A segunda geração foi cultivada apenas até a fase vegetativa.



Figura 2. Teste de arena para avaliar a preferência alimentar de *D. speciosa*.

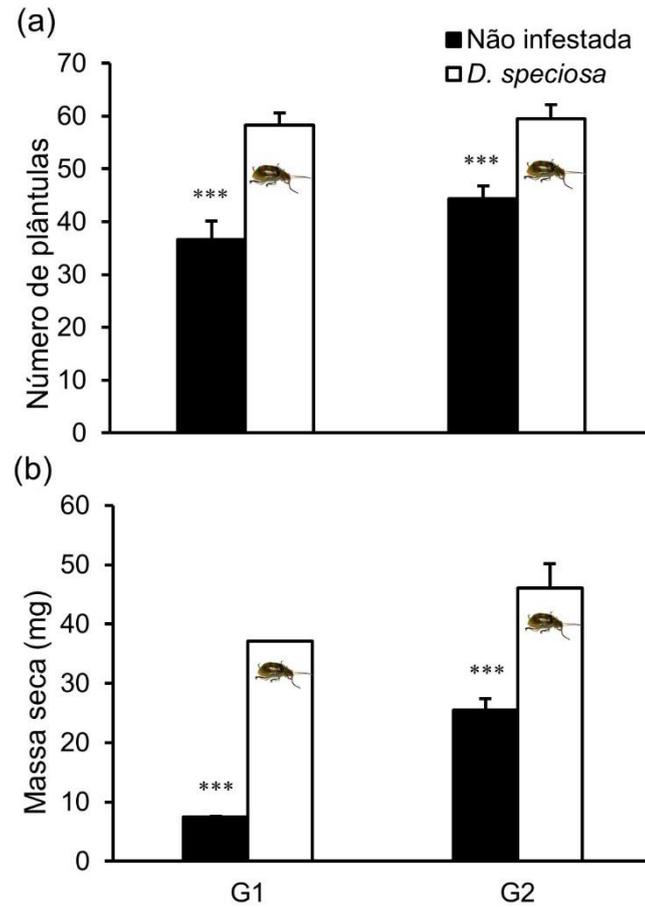


Figura 3. Efeitos da herbivoria materna na germinação e na massa seca de plântulas em duas gerações subsequentes a herbivoria de *D. speciosa*. **(a)** Número de plântulas da primeira (G1) e segunda (G2) geração (média \pm SE), após 45 dias de semeadura, originárias de plantas-mãe não infestadas e infestadas por *D. speciosa*. **(b)** massa seca (média \pm SE) das plântulas da primeira (G1) e segunda (G2) geração, após 45 dias de semeadura (média \pm SE), originárias de plantas-mãe não infestadas e infestadas por *D. speciosa*. Nível de significância: *** $P < 0,001$ ($\alpha = 0,05$).

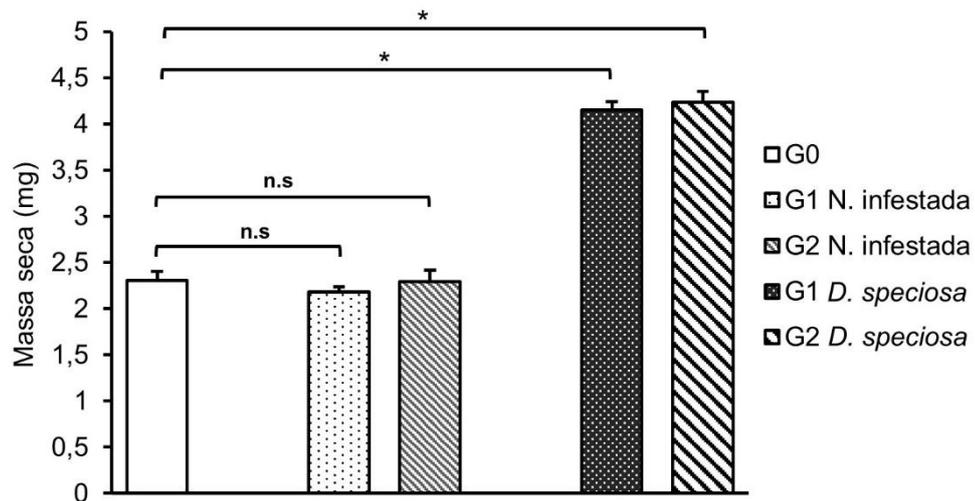


Figura 4. Massa seca das sementes (média \pm SE) de plantas-mãe (G0), plantas da primeira (G1) e segunda geração (G2) originárias de plantas-mãe não infestadas (N. infestada) e infestadas por *D. speciosa*. Teste Dunnett comparando cada geração a um grupo controle. Nível de significância: * $P < 0,05$, n.s= diferença não significativa. ($\alpha = 0,05$).

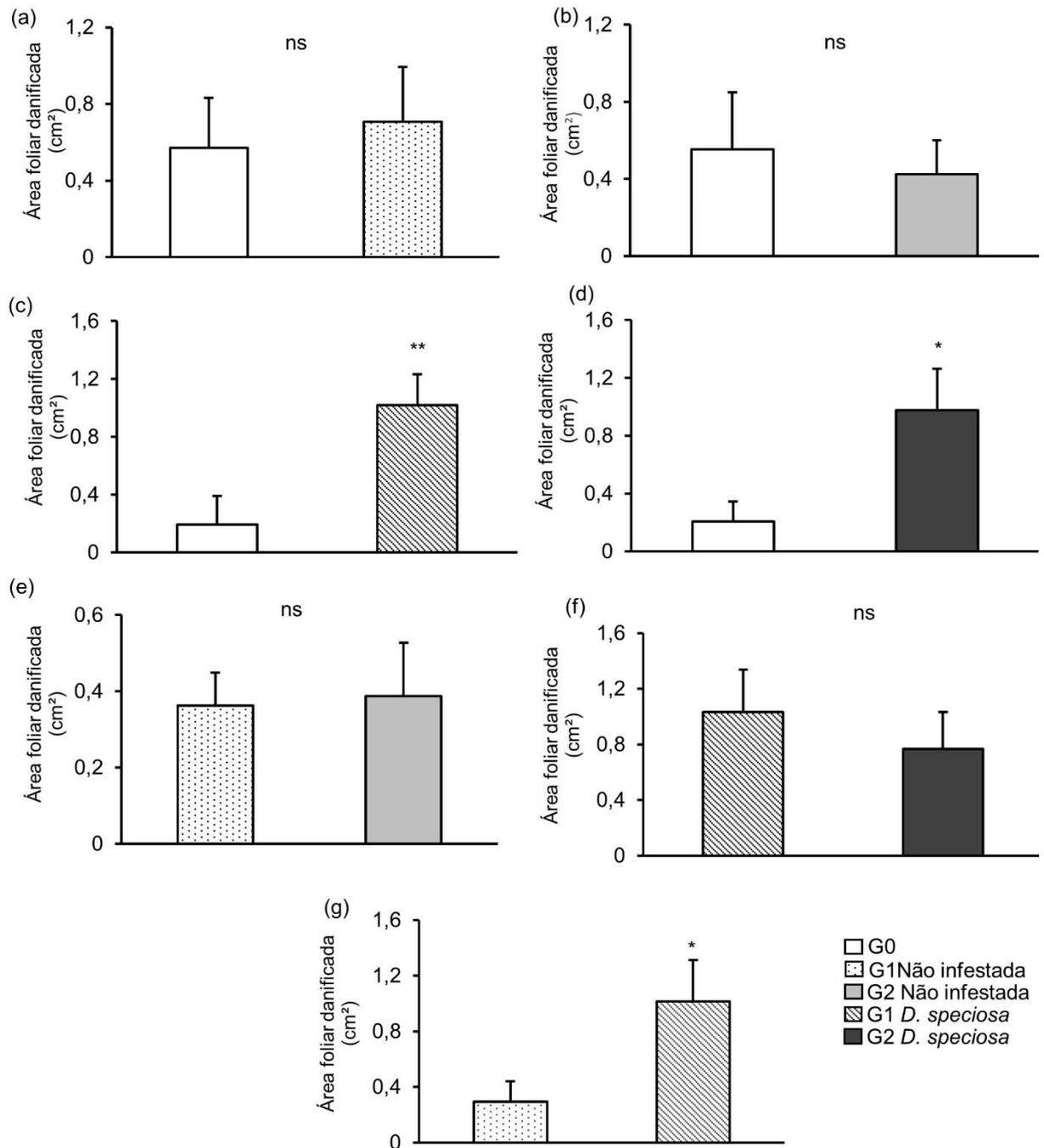


Figura 5. Área foliar danificada (média \pm SE) por *D. speciosa* entre plantas-mãe (G0), plantas da primeira (G1) e segunda geração (G2) originárias de plantas-mãe não infestadas e infestadas por *D. speciosa*. Níveis de significância: * $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, ns = diferença não significativa. ($\alpha = 0,05$).

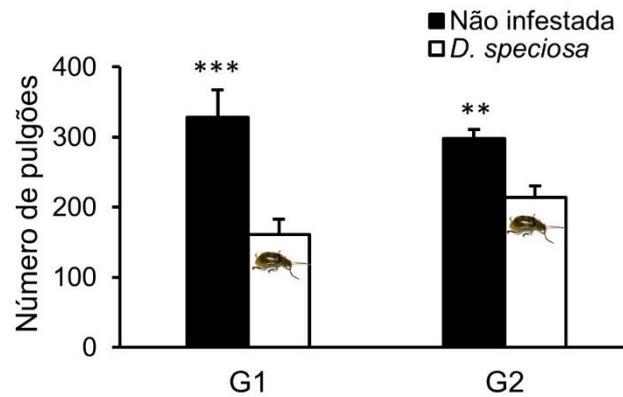


Figura 6. Número de pulgões *M. persicae* (mean \pm SE) em plantas da primeira (G1) e segunda geração (G2) originárias de plantas-mãe não infestadas e infestadas por *D. speciosa*. Níveis de significância: ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ ($\alpha = 0,05$).

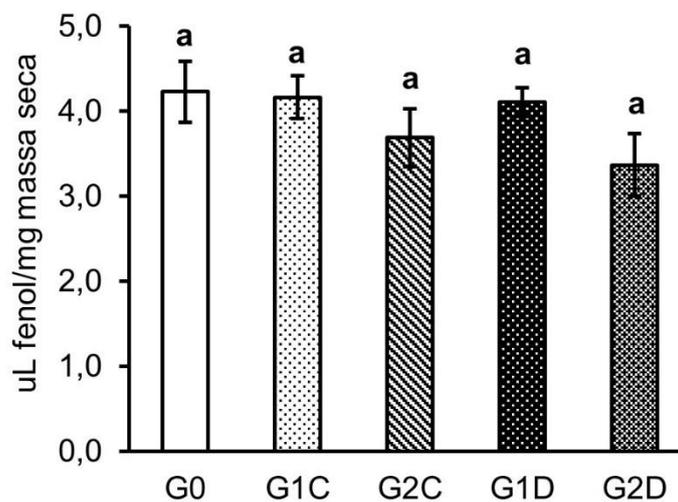


Figura 7. Quantidade de fenóis totais/mg de massa seca (mean \pm SE) de plantas-mãe, plantas da primeira (G1) e segunda (G2) gerações originárias de plantas-mãe não infestadas e infestadas por *D. speciosa*. ($P < 0,001$; a= letras iguais não tem diferença significativa, $\alpha = 0,05$)

**ARTIGO 3 A herbivoria em plantas de pimentão por *Myzus persicae* promove
resistencia transgeracional com custos para o crescimento e reprodução**

(Artigo redigido nas normas da revista: Scientific Reports)

Livia Aparecida de Souza¹; Maria Fernanda G. V. Peñaflor¹

¹Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Lavras - UFLA, 37200-000 Lavras, MG, Brasil. liviasouzaento@gmail.com

**Autora correspondente*: Maria Fernanda G. V. Peñaflor. Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG, Brasil, Campus Universitário, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Telefone (35) 3829 - 1287
E-mail: fernanda.penaflor@gmail.com

1 **Resumo**

2

3 Nos últimos anos, estudos têm mostrado que a resistência transgeracional a herbivoria induzida
4 é uma importante estratégia utilizada pelas plantas para lidar com o ataque de herbívoros.
5 Contudo, pouco se sabe se esse fenômeno é comum a diversas espécies de plantas e como a
6 herbivoria materna afeta as defesas induzidas indiretas da progênie. Nesse trabalho nós
7 investigamos se plantas de pimentão, *Capsicum annuum*, sob herbivoria do pulgão verde,
8 *Myzus persicae*, transferem características de resistência para plantas da próxima geração, e se
9 o alocamento energético em defesas afeta o crescimento e reprodução das plantas. Para tanto,
10 foram avaliados caracteres de vigor vegetativo, reprodução e resistência da progênie de plantas-
11 mãe infestadas por *M. persicae* e não infestadas. Plantas-mãe infestadas produziram menos
12 sementes por fruto, que apresentaram menores taxas de germinação e geraram plântulas
13 menores em relação às sementes de plantas-mãe não infestadas. Ao mesmo tempo, plantas-
14 progênie de plantas infestadas foram mais resistentes a *M. persicae*, pois, além de terem sido
15 menos preferidas como hospedeira para os pulgões, foram menos adequadas em relação às
16 plantas-progênie de plantas não infestadas. A maior resistência à herbivoria das plantas-
17 progênie de plantas infestadas coincidiu com um incremento de aproximadamente 60% no nível
18 constitutivo de fenóis total em relação às plantas-progênie de plantas não infestadas. Além
19 dessas mudanças, plantas-progênie de plantas infestadas emitiram uma mistura de voláteis
20 induzidos pela herbivoria mais atrativos ao parasitoide do pulgão *Aphidius platensis* do que a
21 mistura de voláteis de plantas-progênie de plantas não infestadas. Em conjunto, nossos
22 resultados indicam que a resistência induzida por *M. persicae* em plantas de pimentão é
23 transmitida para a progênie, que é expressa tanto em termos de defesas diretas quanto indiretas,
24 porém implica em custos para o crescimento vegetativo.

25

26 **Introdução**

27 A pressão exercida pelos insetos herbívoros e o impacto na sobrevivência das plantas
28 fez com que evolutivamente elas desenvolvessem diversas adaptações para lidar com o ataque
29 desses organismos^{1,2}. Barreiras físicas, substâncias químicas tóxicas e antinutritivas e o
30 recrutamento de inimigos naturais fazem parte do complexo sistema de defesas das plantas³⁻⁵.
31 Essas defesas podem ser constitutivamente expressas ou induzidas em resposta ao ataque dos
32 herbívoros^{6,7}. Além disso, as defesas podem atuar diretamente no comportamento e biologia do
33 herbívoro, ou indiretamente por meio da emissão de voláteis que recrutam inimigos naturais
34 dos herbívoros^{3,8,9}.

35 A síntese de defesas induzidas implica em alto custo energético para a planta, podendo
36 afetar o alocamento energético em seu crescimento e reprodução¹⁰. Apesar dos custos, alguns
37 estudos indicam que o investimento em defesas induzidas confere vantagens à planta, pois reduz
38 o risco de mortalidade decorrente da herbivoria¹¹⁻¹³. Assim, a indução de mecanismos de
39 defesas após a herbivoria é uma importante estratégia utilizada pelas plantas, pois investem
40 energia somente quando sob ameaça^{14,15}.

41 Nos últimos anos, há evidências crescentes mostrando que as defesas induzidas, tanto
42 químicas quanto físicas, podem persistir através das gerações de plantas¹⁶⁻²³. Assim, a
43 modificação do fenótipo da planta sob herbivoria pode ser transmitida às próximas gerações,
44 mecanismo conhecido como resistência transgeracional^{17,18,20,24}. Essa resistência induzida pela
45 herbivoria é transmitida, por meio de herança epigenética, à progênie, que se torna melhor
46 adaptada em ambientes de alta pressão por herbívoros^{20,25}. Em contrapartida, o alocamento
47 energético da progênie em defesas pode afetar o crescimento e reprodução das plantas, porém,
48 ainda não existe um padrão estabelecido quanto a esses efeitos da herbivoria materna, que
49 parecem ser variáveis dependendo da espécie de planta e herbívoro^{17,24,26,27}.

50 O efeito da herbivoria materna no aumento da resistência da progênie foi comprovada
51 em algumas espécies de plantas de ciclo anual, como nabo¹⁷, tomate²⁰, tabaco²⁸, feijão²⁹,
52 *Arabidopsis thaliana*²⁰, *Mimulus guttatus*³⁰ e dente-de-leão *Taraxacum officinale*³¹, e perene,
53 como é o caso de *Populus angustifolia* e *Populus fremontii*²³. Esses estudos mostram que a
54 resistência transgeracional pode ser transiente²⁹, manifestada previamente ao ataque, ou apenas
55 após o ataque, um efeito *priming* da via do ácido jasmônico (AJ), principal hormônio na
56 regulação de defesas contra a herbivoria^{20,26}. A maior parte desses estudos investigou o efeito
57 da herbivoria materna por mastigadores e pouco se sabe a respeito da herbivoria por sugadores
58 na transferência de resistência para as gerações subsequentes^{22,26}. Por induzir uma resposta

59 distinta na planta, moduladas principalmente pelo ácido salicílico que parece interagir
60 antagonisticamente com a rota modulada pelo AJ^{32,33,34}, a herbivoria materna por sugadores
61 pode resultar em uma resposta diferente sobre o crescimento, resistência e reprodução da
62 progênie. Além dessa lacuna no conhecimento sobre a herança genética da resistência induzida,
63 até hoje, apenas um estudo verificou o efeito da herbivoria materna nas interações das plantas-
64 progênie com o terceiro nível trófico mediadas pelos voláteis induzidos pela herbivoria²⁴.

65 Dentro desse contexto, o nosso estudo investigou se a herbivoria materna em plantas de
66 pimentão *Capsicum annuum* pelo sugador de seiva, o pulgão verde *Myzus persicae*, induz a
67 resistência na geração subsequente com custos para o crescimento da progênie. O pimentão
68 serviu como planta modelo para o nosso estudo por possuir um ciclo de vida curto, produzir
69 grande quantidade de sementes, e ser atacada por uma ampla gama de herbívoros, incluindo o
70 pulgão verde. No mais, o pimentão produz uma série de metabólitos secundários, dentre eles,
71 compostos fenólicos, os quais desempenham um papel importante nos processos ecológicos,
72 incluindo as interações planta-herbívoros e a resistência a insetos^{35,36,37}. Nós especificamente
73 abordamos as seguintes questões: (i) A herbivoria por *M. persicae* impacta a reprodução das
74 plantas?; (ii) A herbivoria pelo pulgão em plantas-mãe de pimentão tem efeitos sobre a
75 resistência da progênie?; (iii) A herbivoria materna altera o tamanho da semente, taxa de
76 germinação e o tamanho da plântula da progênie?; (iv) o nível de fenóis totais constitutivos e
77 induzidos das plantas da progênie sofre alteração em função da herbivoria materna? Para
78 responder a essas questões, foram avaliados parâmetros da reprodução das plantas-mãe
79 infestadas pelo herbívoro e do crescimento inicial da progênie. Na questão da resistência da
80 progênie, foram conduzidos ensaios para avaliar as defesas diretas (preferência hospedeira e
81 desempenho) das plantas-progênie de plantas infestadas por *Myzus persicae* e não infestadas, e
82 indiretas por meio de ensaios de preferência olfativa do parasitoide do pulgão, *Aphidius*
83 *platensis* aos voláteis induzidos pela herbivoria emitidos pelas plantas-mãe e progênie. Nós
84 hipotetizamos que a herbivoria materna por *M. persicae* em *C. annuum* impacta a reprodução
85 das plantas, mas a progênie se torna mais resistente ao ataque do herbívoro por meio de defesas
86 diretas e indiretas, com maior teor de fenóis totais.

87

88 **Resultados**

89 **Efeitos maternos da herbivoria na reprodução das plantas**

90 A herbivoria foliar por *M. persicae* reduziu o número de flores ($t = 4,79$, $gl = 24$, $P <$
91 $0,001$, Tabela 1) e frutos produzidos pela planta de pimentão (GLM, $F_{1,34} = 194,34$, $P < 0,001$)

92 (Tabela 1). Embora o comprimento dos frutos tenha sido semelhante entre plantas-mãe não
93 infestadas e infestadas por *M. persicae* ($t = 0,52$, $gl = 100$, $P = 0,599$), o diâmetro dos frutos foi
94 menor em frutos das plantas-mãe infestadas ($t = 3,74$, $gl = 100$, $P < 0,001$). Tanto o número de
95 sementes por fruto, assim como a massa seca de cada semente (sementes/fruto: GLM, $F_{1,99} =$
96 $9,02$, $P < 0,001$; massa seca: $\chi^2 = 7,22$, $gl = 1$, $P < 0,001$), foram reduzidos nas plantas-mãe
97 infestadas em relação àquelas das plantas-mãe não infestadas.

98

99 **Efeitos transgeracionais da herbivoria no crescimento da progênie**

100 A herbivoria materna por *M. persicae* em pimentão alterou a germinação e o tamanho
101 das plântulas da progênie. A germinação das sementes de plantas infestadas por *M. persicae* foi
102 menor em relação àquelas das plantas não infestadas ($t = 9,12$, $gl = 14$, $P < 0,001$, Fig. 1a). Além
103 disso, as plântulas-progênie das plantas infestadas pelo herbívoro apresentaram menor massa
104 seca comparadas com as plântulas-progênie de plantas não infestadas (GLM, $\chi^2 = 7,28$, $gl = 1$,
105 $P < 0,001$, Fig. 1b).

106

107 **Efeito da herbivoria no nível de fenóis totais**

108 A herbivoria materna por *M. persicae* alterou a concentração de fenóis totais
109 constitutivos e induzidos nas plantas-progênie de pimentão. Folhas de plantas-progênie de
110 plantas infestadas por *M. persicae* continham, em torno de duas vezes, maior concentração de
111 fenóis totais em relação às plantas-progênie de plantas não infestadas (GLM, $\chi^2 = 0,67$, $gl = 1$,
112 $P < 0,001$, Fig. 2). Quando induzimos plantas-mãe e plantas-progênie, a concentração de fenóis
113 foi 1,3 vezes maior nas folhas das plantas-progênie de plantas infestadas comparadas com
114 àquelas não infestadas. Além disso, as plantas-progênie de plantas não infestadas também
115 apresentaram a concentração de 1,3 vezes maior do que as plantas-mãe (tukey, $F_{2,17} = 37,02$,
116 $P < 0,001$, Fig 3).

117

118 **Efeito transgeracional da herbivoria na resistência a *M. persicae***

119

120 A herbivoria materna de *M. persicae* em plantas de pimentão induziu resistência na
121 progênie aos pulgões. Em testes de dupla escolha, adultos do pulgão *M. persicae* preferiram
122 plantas-progênie de plantas não infestadas do que as plantas-progênie de plantas infestadas por
123 *M. persicae*, ao longo do tempo (GLMM, $\chi^2 = 62,19$, $gl = 1$, $P < 0,001$, Fig. 4). Em teste sem
124 chance de escolha para avaliação do desempenho do pulgão, foi encontrado um número inferior

125 de pulgões nas plantas-progênie de plantas infestadas pelo herbívoro do que em plantas-
126 progênie de plantas não infestadas ($t = 8.55$, $gl = 18$, $P < 0,001$, Fig. 5).

127

128 **Resposta olfativa do parasitoide *Aphidius platensis***

129 A herbivoria materna por *M. persicae* promoveu maiores níveis de defesas induzidas
130 nas plantas da progênie. Entre as plantas-mãe, o parasitoide do pulgão *A. platensis* preferiu
131 odores emitidos pelas plantas infestadas por *M. persicae* frente aqueles emitidos pelas plantas
132 não infestadas (GLMM, $\chi^2 = 18,1$, $gl = 1$, $P < 0,001$). Quando os parasitoides foram expostos
133 aos odores das plantas-mãe infestadas *versus* plantas-progênie de plantas infestadas e induzidas
134 por *M. persicae*, não houve distinção entre os tratamentos (GLMM, $\chi^2 = 0,79$, $gl = 1$, $P = 0,372$).
135 Os parasitoides também não distinguiram entre os voláteis de plantas-mãe infestadas e plantas-
136 progênie de plantas não infestadas, mas induzidas por *M. persicae* (GLMM, $\chi^2 = 0,19$, $gl = 1$, P
137 $= 0,654$). No entanto, quando expostos aos odores das plantas-progênie de plantas infestadas e
138 não infestadas, ambas induzidas pela herbivoria, os parasitoides preferiram os voláteis
139 induzidos pela herbivoria liberados pelas plantas-progênie de plantas infestadas (GLMM, $\chi^2 =$
140 $24,59$, $gl = 1$, $P < 0,001$, Fig. 6).

141

142 **Discussão**

143 A literatura ainda carece de estudos sobre o efeito da herbivoria materna sobre a
144 progênie, principalmente considerando diferentes sistemas, para estabelecer se esse mecanismo
145 é comum às plantas, assim como conhecer melhor sobre a complexidade da transferência do
146 fenótipo induzido entre as gerações. Até o momento, existem poucos estudos que tratam do
147 tema envolvendo insetos sugadores^{22,26} que, diferentemente dos mastigadores, ativam vias de
148 sinalização distintas nas plantas e são conhecidos por manipularem o sistema de defesa da
149 planta^{38,32,33}. Assim, o nosso estudo investigou o efeito da herbivoria materna de plantas de
150 pimentão por um inseto sugador de seiva, o pulgão verde *M. persicae*, no crescimento e defesa
151 da progênie.

152 Primeiro, verificamos que a herbivoria por *M. persicae* reduziu em 21% o número de
153 flores das plantas-mãe e, em maior proporção, de frutos que foi 68% menor que plantas-mãe
154 não infestadas pelo pulgão. Além disso, os frutos das plantas-mãe infestadas por *M. persicae*
155 foram menores e continham menor número de sementes que, individualmente, foram 42% mais
156 leves que as provenientes das plantas não infestadas. O menor tamanho da semente pode

157 explicar a menor taxa de germinação das sementes das plantas-mãe infestadas que, contendo
158 uma menor reserva energética, afeta o embrião e seu desenvolvimento¹⁷. Estudos anteriores
159 relataram efeitos semelhantes da herbivoria materna no tamanho da semente e na taxa de
160 germinação^{17,18,39}. Agrawal (2001) mostrou que o maior o tamanho da semente foi
161 positivamente correlacionado à taxa de germinação na progênie de plantas infestadas. Além
162 disso, verificamos um efeito da herbivoria materna ainda mais drástico sobre o peso seco das
163 plântulas, que foram 28% menores do que as de plantas-progênie não infestadas. Assim, é
164 possível que a redução do vigor das mudas pode também ter sido decorrente do menor peso da
165 semente e não necessariamente de uma herança epigenética.

166 Ao mesmo tempo que as plantas-progênie de plantas infestadas apresentaram menor
167 vigor vegetativo, elas foram mais resistentes ao pulgão verde, pois constituem um hospedeiro
168 de menor qualidade, como os ensaios de desempenho e preferência hospedeira mostraram. Os
169 resultados ainda indicam que a maior resistência das plantas-progênie de plantas infestadas deve
170 se manifestar constitutivamente, pois o ensaio de preferência hospedeira do pulgão foi
171 conduzido com plantas intactas e, logo após 15 min da exposição às plantas, os pulgões
172 claramente preferiram a progênie de plantas não infestada. No teste de desempenho,
173 verificamos que as colônias cresceram 42% menos nas plantas-progênie de plantas infestadas
174 que aquelas plantas- progênie de plantas não infestadas, indicando que a resistência
175 transgeracional aos pulgões persistiu mesmo após a indução por 10 dias. Esses resultados
176 coincidiram com o incremento no nível constitutivo de fenóis totais das folhas das plantas-
177 progênie de plantas infestadas em relação às plantas-progênie de plantas não infestadas, além
178 do aumento mais acentuado de fenóis após a progênie de plantas infestadas ter sido induzida
179 pelo pulgão. Outros estudos, no entanto, mostraram que a herbivoria materna não altera o nível
180 dos fenóis²² ou ainda promove a redução da concentração em plantas da geração subsequente³¹.
181 Os fenóis de plantas de pimentão são relatados como compostos de defesas contra lagartas e
182 tripes^{37,40}, mas pouco se sabe a respeito do seu papel defensivo contra *M. persicae*. Nós
183 sugerimos que os fenóis podem ser responsáveis pela resistência das plantas de pimentão a *M.*
184 *persicae*, pois observamos que os resultados da preferência hospedeira e desempenho do pulgão
185 coincidiram com o aumento dos níveis constitutivos e induzidos de fenóis da progênie de
186 plantas infestadas em relação à progênie não infestada.

187 O incremento dos fenóis induzidos da progênie de plantas não infestadas em relação às
188 plantas-mães pode estar relacionado com fatores abióticos. Alguns desses fatores, como luz e
189 temperatura, podem ter efeitos transgeracionais em em características da prole⁴¹. Mesmo que
190 em nosso estudo, as plantas-mãe e a progênie tenham sido cultivadas simultaneamente para

191 avaliação no teor de fenóis, a origem das sementes dessas plantas são de ambientes distintos.
192 As sementes que deram origem às plantas-mãe foram obtidas de um cultivo de pimentão em
193 campo, enquanto que as sementes de plantas-progênie foram produzidas em casa de vegetação,
194 além de épocas distintas. Dessa maneira, sugerimos que o efeito transgeracional do incremento
195 de fenóis na progênie de plantas que não tiveram indução da herbivoria, possa estar relacionado
196 a algum efeito abiótico durante o cultivo dessas plantas.

197 Nós também avaliamos o efeito da herbivoria materna sobre o terceiro nível trófico, o
198 parasitoide do pulgão, uma questão pouco estudada até hoje. Primeiramente, verificamos que o
199 parasitoide *A. platensis* foi atraído pelos voláteis da planta de pimentão induzidos pela
200 herbivoria do seu hospedeiro, como demonstrado no teste em que se avaliou a preferência
201 olfativa aos voláteis da planta-mãe infestada e não infestada. Novamente, as plantas-progênie
202 de plantas infestadas mostraram ser mais resistentes porque os parasitoides preferiram os
203 voláteis induzidos pela herbivoria emitidos por elas frente àqueles emitidos pelas plantas-
204 progênie de plantas não infestadas, um resultado semelhante ao encontrado por Kellenberger et
205 al (2018)²⁴. Porém, esse efeito de maior atratividade dos voláteis induzidos pela herbivoria das
206 plantas-progênie de plantas infestadas e não infestadas não foi detectado quando contrastados
207 com aqueles emitidos pelas plantas-mãe infestadas. Esse efeito aparentemente contraditório
208 deve ser melhor investigado em ensaios subsequentes testando a atratividade do parasitoide aos
209 voláteis induzidos emitidos pela planta-mãe infestadas e plantas-progênie de plantas não
210 infestadas, além da caracterização química dos voláteis emitidos por todos os tratamentos.

211 Em geral, nossos resultados confirmaram as hipóteses iniciais da resistência
212 transgeracional induzida por um inseto sugador, e sugerem a ocorrência de um *trade-off* na
213 expressão da resistência transgeracional induzida pelo pulgão no pimentão, já que houve um
214 impacto negativo no crescimento da planta. Provavelmente, a síntese de novos compostos de
215 defesa e o aumento dos já existentes que conferiram maior resistência da progênie implicaram
216 em custos para o crescimento da planta. Nós não avaliamos a reprodução da progênie e a
217 resistência das gerações subsequentes para investigar a persistência do efeito da herbivoria
218 materna, que devem ser abordados em estudos futuros. Além disso, é importante que seja
219 investigado se essa plasticidade fenotípica transgeracional, que implica em custos energéticos
220 para o crescimento e, provavelmente, para a reprodução, aumenta o *fitness* da progênie em
221 condições de campo.

222

223 **Métodos**

224 **Plantas e insetos**

225 As sementes de *C. annuum* (cv Mallorca) foram obtidas de uma unidade experimental
226 de cultivo orgânico da Fazenda Palmital–UFLA, Universidade Federal de Lavras, Ijaci – MG,
227 Brasil, que foram cultivadas em casa de vegetação livre de insetos e sob condições naturais de
228 temperatura e umidade (novembro/2018 a fevereiro/ 2019). Inicialmente, as sementes foram
229 germinadas em bandejas de produção de mudas com utilização de substrato comercial (Carolina
230 Soil®, Carolina Soil Company, Brasil) e, após 30 dias, as plântulas com três pares de folhas
231 foram transplantadas para vasos de 2,5 L contendo uma mistura de terra, areia e esterco bovino,
232 na proporção de 2:1:1. As plantas foram mantidas na casa de vegetação até o uso nos
233 experimentos. cada 30 dias, as plantas foram adubadas com 15g de uréia diretamente no solo.

234 Os pulgões *M. persicae* foram obtidos de uma criação já existente no departamento de
235 Entomologia (UFLA, Lavras, MG, Brasil). A população foi mantida em laboratório sob
236 condições controladas ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de UR e 12 horas de fotofase) em gaiolas
237 contendo, como hospedeiro, plantas de *Nicandra physalodes* L. (Solanaceae), as quais foram
238 substituídas por novas plantas a cada três dias. Os pulgões da criação foram usados nas
239 infestações das plantas-mãe e nos experimentos.

240

241 **Criação do parasitoide *Aphidius platensis***

242

243 A colônia de *A. platensis* foi mantida no Laboratório de Controle Biológico do
244 Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas
245 Gerais, Brasil, sob condições controladas ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 10\%$ de UR e 12 horas de fotofase).
246 Os parasitoides foram criados em colônias de pulgões *M. persicae* mantidos em plantas de *N.*
247 *physalodes*, em gaiolas de acrílico (50 x 50 x 30 cm), alimentados com uma solução de mel a
248 10%. Após o parasitismo, as folhas que continham as múmias foram destacadas e colocadas em
249 placas de Petri (10 cm θ), seladas com filme plástico e mantidas no laboratório. As múmias
250 foram verificadas diariamente quanto à emergência dos parasitoides para uso experimental.
251 Após a emergência, foi realizada a sexagem dos insetos e as fêmeas previamente acasaladas
252 foram individualizadas em tubos de ensaio, privadas de alimentação por 24 h e posteriormente
253 utilizadas nos testes de olfatometria.

254

255 **Tratamentos**

256

257 As plantas-mãe (ou geração parental, G0), quando atingiram o estágio vegetativo com
258 oito pares de folhas, foram infestadas com ninfas de primeiro ínstar do pulgão *M. persicae*. Para
259 padronização da idade das ninfas de primeiro ínstar do pulgão, fêmeas adultas de *M. persicae*
260 foram isoladas em placas de Petri (5 cm θ), contendo disco foliar de pimentão (5 cm θ) sob uma
261 fina camada de ágar a 1%, e mantidas em câmaras climatizadas ($22 \pm 1^\circ\text{C}$, de $70 \pm 10\%$ UR e
262 fotofase 14h). Após 24h, o número de ninfas de primeiro ínstar em cada disco foliar foi
263 contabilizado, e foram mantidas 20 ninfas por disco, usado para a infestação de cada planta-
264 mãe (tratamento planta-mãe infestada pelo herbívoro). Foram infestadas 20 plantas de pimentão
265 com *M. persicae*, que foram mantidas em uma bancada separada (4 m x 0,84 m x 0,93 m) e
266 com cobertura de uma gaiola de tecido (6 m x 2,8 m x 1 m), para evitar a dispersão dos pulgões.
267 Paralelamente, 20 plantas, no mesmo estágio vegetativo, foram mantidas intactas,
268 representando o grupo controle (tratamento planta-mãe não infestada), que permaneceram em
269 uma bancada separada e também coberta por uma gaiola retangular de *voile*. Os insetos
270 permaneceram nas plantas-mãe até a formação dos frutos maduros e, durante esse período, as
271 plantas foram vistoriadas diariamente para manter a população com, aproximadamente, 100-
272 150 pulgões por planta. Assim, foram eliminados parte dos ápteros e todos os alados produzidos
273 para não haver dispersão entre as plantas. Esse procedimento foi necessário pois, em testes
274 preliminares, nós observamos que colônias de pulgões com centenas de indivíduos por planta
275 ocasionavam a morte das plantas. Além disso, quatro plantas-mãe não infestadas, nas quais a
276 presença de herbívoros foi detectada, foram descartadas. De modo similar, foi descartada uma
277 planta-mãe infestada na qual foi detectada a presença de uma outra espécie de herbívoro. Após
278 o amadurecimento dos frutos (120 dias após a semeadura), ou seja, quando estavam vermelhos,
279 eles foram coletados manualmente, levados para o laboratório e dissecados para a remoção das
280 sementes e avaliação do tamanho dos mesmos. As sementes foram distribuídas em fundos de
281 placa de Petri (15 cm de diâmetro) forrados com papel filtro e deixadas para secagem, em
282 temperatura ambiente, por três dias.

283 Plantas-progênie, (primeira geração, G1) foram cultivadas sob as mesmas condições das
284 plantas mãe, no entanto, sem indução da herbivoria, e até atingirem oito pares de folhas, quando
285 foram utilizadas nos experimentos de resistência transgeracional (Fig. 7).

286

287 **Reprodução da geração parental**

288

289 Para verificar se a herbivoria por pulgão *M. persicae* afeta a reprodução das plantas-mãe
290 de pimentão, nós analisamos características reprodutivas como número de flores, frutos e
291 sementes, assim como o tamanho dos frutos. Quando as plantas-mãe atingiram o período
292 reprodutivo (aproximadamente 90 dias), contabilizamos o número de flores por planta e, após
293 20 dias, o número de frutos. A coleta dos frutos maduros das plantas-mãe foi realizada no final
294 do amadurecimento, como descrito no subitem anterior. No laboratório, foram medidos o
295 comprimento e diâmetro dos frutos com fita métrica (cm) e as sementes/fruto foram contadas
296 com auxílio de um contador manual. Após a secagem das sementes, como descrito no subitem
297 anterior, elas foram individualmente pesadas em balança analítica (modelo Marte AY220,
298 Marte balanças e aparelhos de precisão Ltda., Santa Rita do Sapucaí, MG, Brasil). Os
299 parâmetros da reprodução foram avaliados em todas as plantas-mãe (16 infestadas pelo
300 herbívoro e 19 não infestadas).

301

302 **Crescimento da progênie (G1)**

303

304 Para avaliar se a herbivoria materna afeta o crescimento da progênie, foi mensurada a
305 taxa de germinação das sementes e massa seca de plântulas-progênie de plantas infestadas por
306 *M. persicae* e não infestadas. Nós colocamos uma semente por célula em uma bandeja de
307 produção de mudas com 72 células. Cada bandeja consistiu em uma repetição e foram
308 realizadas um total de oito bandejas por tratamento. Após 45 dias do plantio, quando as
309 plântulas apresentaram dois pares de folhas, foi contabilizado o número de plântulas em cada
310 bandeja. Para avaliação da massa seca, foram aleatoriamente selecionadas 35 plântulas de cada
311 tratamento das bandejas de germinação. As plântulas foram cortadas na base da raiz,
312 individualizadas em sacos de papel (7 cm x 10 cm) e colocadas em estufa a 60° por 24h para
313 secagem. Posteriormente, cada plântula foi individualmente pesada em balança analítica (Marte
314 AY220) (Marte balanças e aparelhos de precisão Ltda., Santa Rita do Sapucaí, MG, Brasil) para
315 obtenção da massa seca.

316

317 **Análise de fenóis totais constitutivos e induzidos pela herbivoria**

318

319 Para testar se a herbivoria materna altera as defesas químicas das plantas e se essa
320 alteração é transmitida para a próxima geração, foram avaliados os níveis constitutivo e
321 induzido pela herbivoria de *M. persicae* de fenóis total em plantas-mãe, plantas-progênie de
322 plantas infestadas por *M. persicae* e não infestadas. Para essa análise foram utilizadas seis
323 plantas de cada tratamento, e as comparações foram realizadas entre: (i) fenóis constitutivos de
324 plantas-progênie de plantas infestadas e não infestadas; (ii) fenóis induzidos de plantas-mãe não
325 infestada, plantas-progênie de plantas infestadas e de plantas não infestadas. Foram coletadas
326 duas folhas de cada planta, cortadas na base do pecíolo, colocadas em um envelope de papel
327 alumínio e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Posteriormente, as amostras foram
328 liofilizadas por 24 horas e trituradas com almofariz e pistilo até a obtenção de um pó fino. Uma
329 alíquota de 30 mg do material liofilizado foi transferida para microtubo de 2 mL,
330 homogeneizada com 1,5 mL de metanol a 80% e mantida sob agitação por 15 h, em agitador
331 rotativo, protegido da luz, à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada, a 14.000 rpm,
332 por 7min e 150uL do sobrenadante (extrato metanólico) foi transferido para um novo
333 microtubo. Foi adicionado 150 uL do reagente de Folin-Ciocalteau 0, 25 N e as amostras
334 permaneceram descansando por 5 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente foi
335 adicionado 150 µL de Na₂CO₃ 1/M e as amostras foram homogeneizadas manualmente e
336 ficaram descansando por 10 minutos. Por fim foi adicionado 1ml de água destilada e as amostras
337 permaneceram à temperatura ambiente, por 1h. após esse tempo, 200uL das amostras foram
338 colocados em microplaca de microtitulação de 96 poços e a análise dos fenóis totais foi
339 realizada com seis repetições de cada tratamento e, em cada repetição foi retirada uma triplicata.
340 Os valores de absorbância desta reação foram determinados a 725 nm, em espectrofotômetro
341 de microplacas (Epoch 2, Biotek Instruments, EUA) e calculados com base em curva de ácido
342 clorogênico. Os fenóis totais foram expressos em equivalente a µg de fenol por miligrama de
343 massa seca.

344

345 **Preferência hospedeira e desempenho de *M. persicae***

346

347 Para verificar se ocorre efeito transgeracional da herbivoria materna na resistência da
348 planta ao pulgão *M. persicae*, foi realizado o experimento de preferência hospedeira e
349 desempenho do pulgão frente a plantas-progênie de plantas infestadas pelo herbívoro e não

350 infestadas. A unidade experimental consistiu em uma arena retangular plástica (24,5 cm x 15,0
351 cm) forrada internamente com papel filtro e com duas aberturas nas laterais opostas, onde os
352 caules das plantas foram posicionados de modo que as folhas ficaram no interior da arena. Os
353 caules foram envoltos por algodão umedecido com óleo mineral para vedar as aberturas e evitar
354 o escape dos insetos. Dessa forma, cada arena continha um par de plantas no estágio de oito
355 pares de folhas, sendo uma planta-progênie de planta infestada e uma planta-progênie de planta
356 não infestada (S1a). O experimento foi iniciado com a liberação de 20 fêmeas ápteras de *M.*
357 *persicae* no centro de um disco de papel filtro (6 cm diâmetro) entre o par de plantas. Em
358 seguida, a arena foi fechada por uma tampa que permitiu ventilação por ser revestida de tecido
359 *voile* (S1b). As avaliações foram realizadas 5, 10, 15, 30 min, 1, 2, 6, 12 e 24 h após a liberação
360 das ninfas, registrando-se o número de pulgões presentes em cada planta. Para esse ensaio foram
361 utilizadas 20 repetições.

362 O desempenho de *M. persicae* foi avaliado com base no número de pulgões em plantas-
363 progênie de plantas infestadas e não infestadas na mesma idade fenológica do experimento
364 anterior. O experimento foi conduzido em casa de vegetação livre de insetos e sob condições
365 naturais de temperatura e umidade. Cada planta foi infestada com discos foliares contendo 10
366 ninfas de primeiro ínstar do pulgão com um dia de idade. Foi realizado o mesmo procedimento
367 que o descrito no subitem dos tratamentos para padronização da idade das ninfas (S2a). As
368 plantas foram individualmente cobertas com um saco de *voile* para evitar o escape dos insetos.
369 (S2b). As avaliações foram realizadas após 10 dias da infestação inicial por meio da contagem
370 número total de pulgões (ninfas e adultos) em cada planta, com utilização de contador manual.
371 Esse experimento foi realizado com 10 repetições.

372

373 **Atratividade das plantas ao parasitoide *Aphidius platensis***

374

375 A resposta olfativa de fêmeas do parasitoide *A. platensis* aos voláteis de plantas-mãe e
376 plantas-progênie, na mesma idade fenológica dos experimentos anteriores, induzidas e não
377 induzidas por *M. persicae*, foi avaliada em olfatômetro em 'Y' de vidro (15 cm de cada braço
378 e 4 cm de diâmetro). Os ensaios foram realizados no laboratório sob condições controladas ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 10\%$ de UR) entre 8:00 e 18:00 h. O olfatômetro foi colocado dentro de uma caixa
379 para evitar a influência de pistas visuais do ambiente, e posicionado verticalmente à superfície
380 da bancada (S3).
381

382 Para realização dos bioensaios, as plantas de pimentão foram colocadas individualmente
383 em câmaras de vidro (capacidade 3 L) com aberturas na tampa para a entrada de mangueiras de
384 silicone que conectaram os tratamentos às extremidades dos braços laterais do olfatômetro.
385 Uma bomba compressora de ar introduziu o ar do ambiente no sistema, que era filtrado e
386 umidificado pela passagem em um filtro de carvão ativado e umidificador e, em seguida,
387 conduzido às plantas nas câmaras (tratamentos) e braços laterais do olfatômetro, a uma vazão
388 de 0,6 L/min/braço.

389 No dia anterior aos experimentos, as fêmeas do parasitoide recém emergidas (até 24 h),
390 acasaladas, e sem experiência de oviposição, foram individualizadas em tubos de ensaios e
391 privadas de alimento por 24 h. Em cada bioensaio, foram utilizados quatro pares de plantas,
392 sendo avaliadas 40 a 47 fêmeas do parasitoide (aproximadamente 11 indivíduos/par de plantas).
393 Cada repetição consistiu na resposta de uma fêmea de *A. platensis*, que foi inserido no braço
394 central do olfatômetro e observado por 5 min, no máximo. A escolha do inseto foi registrada
395 quando este ultrapassou uma linha localizada no terço distal de um dos braços laterais do
396 olfatômetro e permaneceu nessa região por 10 s. Quando o inseto não escolheu um dos braços
397 por 5 min, a repetição foi considerada como ‘não resposta’.

398 Após cada teste, o inseto foi descartado e as posições dos tratamentos foram invertidas
399 no olfatômetro para detectar tendências de lado na escolha. Após 10 repetições, o olfatômetro
400 foi lavado com detergente neutro e enxaguado com água, acetato de etila (Acetato de Etila P.A.
401 ACS., Vetec Química Fina Ltda., Duque de Caxias, RJ, Brasil), álcool 70% (Start, Lima &
402 Pergher, São Paulo, SP, Brasil) e, por fim, seco em estufa a 100°C.

403 No sistema de olfatometria, as fêmeas do parasitoide foram expostas aos voláteis
404 emitidos pelas próprias plantas, nas combinações: (i) planta-mãe (G0) não induzida vs. planta-
405 mãe (G0) induzida por *M. persicae*; (ii) planta-progênie (G1) de planta-mãe não infestada,
406 induzida vs. planta-progênie (G1) de planta-mãe infestada, induzidas e (iii) planta-mãe (G0)
407 induzida vs. planta-progênie (G1) de plantas-mãe infestada, induzida. Neste experimento, os
408 tratamentos foram obtidos a partir das plantas-mãe e plantas-progênie cultivadas até a fase
409 vegetativa com oito pares de folhas, em casa de vegetação livre de insetos e sob condições
410 naturais de temperatura e umidade. As plantas do tratamento induzidas, foram induzidas com
411 150 ninfas de *M. persicae* de primeiro, segundo ou terceiro ínstar e mantidas individualmente
412 em gaiolas de tecido *voile* (30 x 15 cm) por três dias até serem utilizadas nos testes.

413

414 **Análises estatísticas**

415

416 Os dados referentes às características reprodutivas, taxa de germinação, massa seca das
417 plântulas, quantidade de fênois totais e desempenho do pulgão, foram testados quanto à
418 normalidade com o teste de Shapiro-Wilk e quanto a homocedasticidade pelo teste de Bartlett.
419 Quando esses pressupostos foram atingidos, os dados foram analisados pelo teste *t*, caso
420 contrário, os dados foram analisados usando um modelo linear generalizado (GLM) com
421 distribuição ajustada. Para a análise do teste de preferência hospedeira de *M. persicae* nós
422 realizamos um modelo linear generalizado misto (GLMM), com distribuição *Poisson*, sendo o
423 tempo como variável aleatória e tratamento como variável fixa. Os dados de escolha olfativa
424 no olfatômetro, desconsiderando os ‘não resposta’, foram analisados por GLMM com
425 distribuição binomial, e as plantas foram utilizadas como efeito aleatório. Todas as análises
426 estatísticas foram realizadas no pacote estatístico R (versão 3.4.0, R Core Team 2017) (Vienna,
427 Austria)⁴².

428

429 **Agradecimentos**

430

431 Este trabalho teve apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
432 Superior–Brasil (CAPES)–Código de Financiamento 001 e do Departamento de Entomologia
433 da Universidade Federal de Lavras, UFLA. Nós agradecemos a professora Rosangela Cristina
434 Marucci e ao Laboratório de Controle Biológico do Departamento de Entomologia da
435 Universidade Federal de Lavras pelo fornecimento dos parasitoides. Ao laboratório de
436 Fisiologia do Parasitismo do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de
437 Lavras, pelo fornecimento dos materiais para a análise de fênois totais. A Marvin Pec pelo
438 auxílio em algumas análises estatísticas.

439

440

441

Referências

1. Price, P. W. *et al.* Interactions among three trophic levels: Influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Ann. Rev. of Ecol. and Syst.* **11**, 41–65 (1980).
2. Agrawal, A. A. Macroevolution of plant defense strategies. *Trends Ecol. Evol.* **22**, 103-109 (2007).
3. Turlings, T. C., Tumlinson, J. H. & Lewis, W. J. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science.* **250**, 1251-1253 (1990).
4. Gatehouse, J. A. Plant resistance towards insect herbivores: A dynamic interaction. *New Phytologist.* **156**, 145-169 (2002).
5. Chaudhary, A., Bala, K., Thakur, S., Kamboj, R. & Dumra, N. Plant defenses against herbivorous insects: A Review. *Int. J. Chem. Stud.* **6**, 681-688 (2018).
6. Karban, R. & Myers, J. H. Induced plant responses to herbivory. *Ann. Rev. Ecol. and Syst.* **20**, 331-348 (1989).
7. Kessler, A. & Baldwin, I. T. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Ann. Rev. Plant Biol.* **53**, 299-328 (2002).
8. Dicke, M., Sabelis, M. W., Takabayashi, J., Bruin, J., Posthumus, M. A. Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals: Prospects for application in pest control. *J. Chem. Ecol.* **16**, 3091-3118 (1990).
9. Paré, P. W., Tumlinson, J. H. Plant Volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiol.* **121**, 325–331 (1999).
10. Koricheva, J. Meta-analysis of sources of variation in fitness costs of plant antiherbivore defenses. *Ecology.* **83**, 176-90 (2002).
11. Agrawal, A. A. Induced responses to herbivory and increased plant performance. *Science.* **279**, 1201-1202 (1998).
12. Agrawal, A. A. Induced responses to herbivory in wild radish: effects on several herbivores and plant fitness. *Ecology.* **80**, 1713-1723 (1999).
13. Machado, R. A., McClure, M., Herve, M. R., Baldwin, I. T., & Erb, M. Benefits of jasmonate-dependent defenses against vertebrate herbivores in nature. *Elife.* **5**, e13720 (2016).
14. Strauss, S.Y. & Agrawal, A.A. The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends in Ecol. Evol.* **14**, 179-185 (1999).
15. Núñez-Farfán, J., Fornoni, J. & Valverde, P. L. The evolution of resistance and tolerance to herbivores. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **1**, 541-66 (2007).

16. Agrawal, A. A., Laforsch, C., Tollrian, R. Transgenerational induction of defences in animals and plants. *Nature*. **401**, 60-63 (1999a).
17. Agrawal, A. A. Transgenerational consequences of plant responses to herbivory: an adaptive maternal effect?. *The American Naturalist*. **157**, 555-569 (2001).
18. Agrawal, A. A. Herbivory and maternal effects: mechanisms and consequences of transgenerational induced plant resistance. *Ecology*. **83**, 3408-3415 (2002).
19. Holeski, L. M. Within and between generation phenotypic plasticity in trichome density of *Mimulus guttatus*. *Journal of evolutionary biology*, **20**, 2092-2100 (2007).
20. Rasmann, S. *et al.* Herbivory in the previous generation primes plants for enhanced insect resistance. *Plant Physiology* **158**, 854–863 (2012).
21. Akkerman, K. C., Sattarin, A., Kelly, J. K., & Scoville, A. G. Transgenerational plasticity is sex-dependent and persistent in yellow monkeyflower (*Mimulus guttatus*). *Environmental epigenetics*, **2** (2016).
22. Dong, B. C., Fu, T., Luo, F. L., & Yu, F. H. Herbivory-induced maternal effects on growth and defense traits in the clonal species *Alternanthera philoxeroides*. *Science of the Total Environment*, **605**, 114-123 (2017).
23. Holeski, L. M., Zinkgraf, M. S., Couture, J. J., Whitham, T. G., & Lindroth, R. L. Transgenerational effects of herbivory in a group of long-lived tree species: maternal damage reduces offspring allocation to resistance traits, but not growth. *Journal of Ecology*, **101**, 1062-1073 (2013).
24. Kellenberger, R. T., Desurmont, G. A., Schlüter, P. M., & Schiestl, F. P. Trans-generational inheritance of herbivory-induced phenotypic changes in *Brassica rapa*. *Scientific Reports*. **8**, 3536 (2018).
25. Weinhold, A. Transgenerational stress-adaption: an opportunity for ecological epigenetics. *Plant Cell Reports*. **37**, 3-9 (2018).
26. Singh, P. *et al.* Jasmonic acid-dependent regulation of seed dormancy following maternal herbivory in *Arabidopsis*. *New Phytologist*. **214**, 1702-1711 (2017).
27. Steets, J. A. & Ashman, T. L. Maternal effects of herbivory in *Impatiens capensis*. *Int. J. Plant Sciences*. **171**, 509-518 (2010).
28. Van Dam, N. & Baldwin, I. Competition mediates costs of jasmonate-induced defences, nitrogen acquisition and transgenerational plasticity in *Nicotiana attenuata*. *Funct. Ecol.* **15**, 406–415 (2001).
29. Ballhorn, D. J., Kautz, S., & Laumann, J. M. Herbivore damage induces a transgenerational increase of cyanogenesis in wild lima bean (*Phaseolus lunatus*). *Chemoecology*. **26**, 1-5 (2016).

30. Scoville, A. G., Barnett, L. L., Bodbyl-Roels, S., Kelly, J. K., & Hileman, L. C. Differential regulation of a MYB transcription factor is correlated with transgenerational epigenetic inheritance of trichome density in *Mimulus guttatus*. *New Phytologist*. **191**, 251-263 (2011).
31. Verhoeven, K. J. *et al.* Intergenerational environmental effects: functional signals in offspring transcriptomes and metabolomes after parental jasmonic acid treatment in apomictic dandelion. *New phytologist*. *217*, 871-882 (2018).
32. Kempema, L. A., Cui, X., Holzer, F. M., & Walling, L. L. Arabidopsis transcriptome changes in response to phloem-feeding silverleaf whitefly nymphs. Similarities and distinctions in responses to aphids. *Plant Physiology*. **143**, 849-865 (2007).
33. Zarate, S. I., Kempema, L. A., & Walling, L. L. Silverleaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. *Plant physiology*, **143**, 866-875 (2007).
34. Pinto-Zevallos, D. M., Martins, C. B., Pellegrino, A. C., & Zarbin, P. H. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. *Química Nova*, **36**, 1395-1405 (2013).
35. Appel, H. M. Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. *J. Chem. Ecol.* **19**, 1521-1552 (1993).
36. Movva, V., & Pathipati, U. R. Feeding-induced phenol production in *Capsicum annuum* L. influences *Spodoptera litura* F. larval growth and physiology. *Arch. insect biochem. and physiol.* **95**, e21387 (2017).
37. Macel M. *et al.* Metabolomics of Thrips Resistance in Pepper (*Capsicum* spp.) Reveals Monomer and Dimer Acyclic Diterpene Glycosides as Potential Chemical Defenses. *J. Chem. Ecol.* **8**, 1-2 (2019).
38. Moran, P. J. & Thompson, G. A. Molecular responses to aphid feeding in *Arabidopsis* in relation to plant defense pathways. *Plant Physiol.* **125**, 1074–85 (2001).
39. Moreira X. *et al.* Specificity of induced defenses, growth, and reproduction in lima bean (*Phaseolus lunatus*) in response to multispecies herbivory. *Am. J. Bot.* **102**, 1300-1308 (2015).
40. Vijaya, M., & Rani, P. U. Defensive responses in *Capsicum annuum* (L) plants, induced due to the feeding by different larval instars of *Spodoptera litura* (F). *Arthropod-Plant Interactions*, **11**, 193-202 (2017).
41. Galloway, L. F., & Etterson, J. R. Transgenerational Plasticity Is Adaptive in the Wild. *Science*, **318**, 1134–1136 (2007).
42. R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Tabela

Tabela 1 Efeitos da herbivoria maternal nas características reprodutivas de plantas-mãe de pimentão *Capsicum annuum* infestadas pelo herbívoro *Myzus persicae* e não infestadas (média \pm SE). As comparações dos tratamentos foram feitas com teste F e teste *t* ($\alpha = 0,05$; ***: $P < 0,001$).

Características reprodutivas	Plantas-mãe		P Valor
	Não infestadas	Infestadas	
Flores			
Número de flores/planta	24,31 \pm 0,88	19,26 \pm 0,57	< 0,001
Frutos			
Número de frutos/planta	11,50 \pm 0,52	3,68 \pm 0,28	< 0,001
Comprimento (cm)	13,71 \pm 0,33	13,47 \pm 0,32	0,59
Diâmetro (cm)	17,69 \pm 0,34	15,9 \pm 0,33	< 0,001
Sementes			
Número de sementes/frutos	117,27 \pm 8,16	84,78 \pm 7,09	< 0,001
Massa seca/semente (mg)	14,47 \pm 0,35	8,42 \pm 0,19	< 0,001

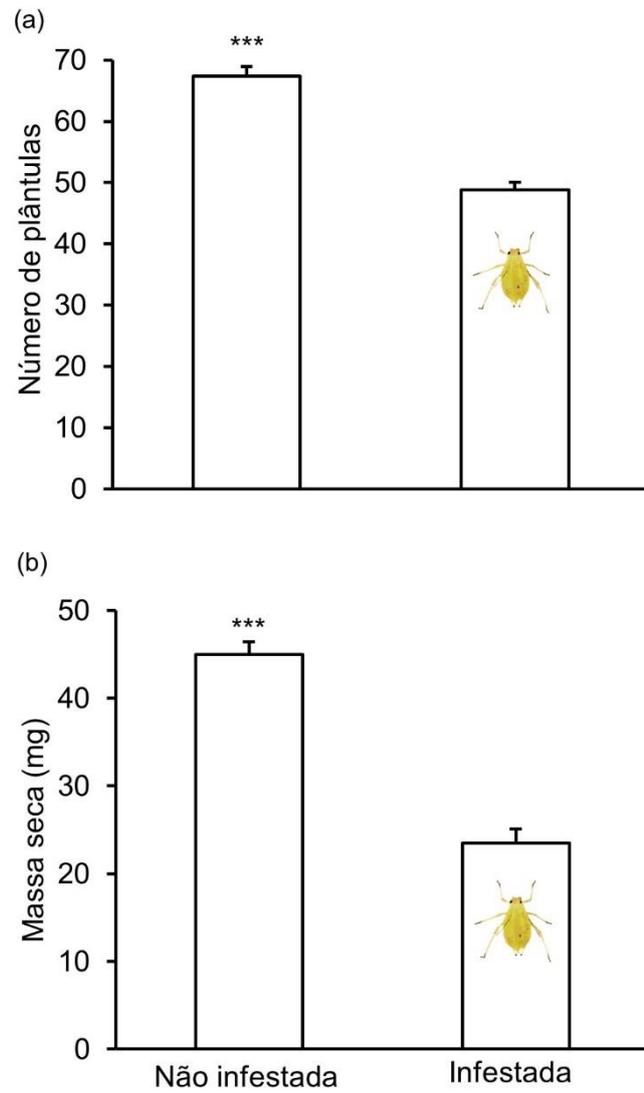
Figuras

Figura 1. (a) Número de plântulas-progênie de plantas-mãe de *Capsicum annuum* infestadas por *Myzus persicae* e não infestadas e (b) massa seca de plântulas-progênie de plantas infestadas não infestadas (média \pm SE). ($\alpha=0,05$; ***:P<0,001).

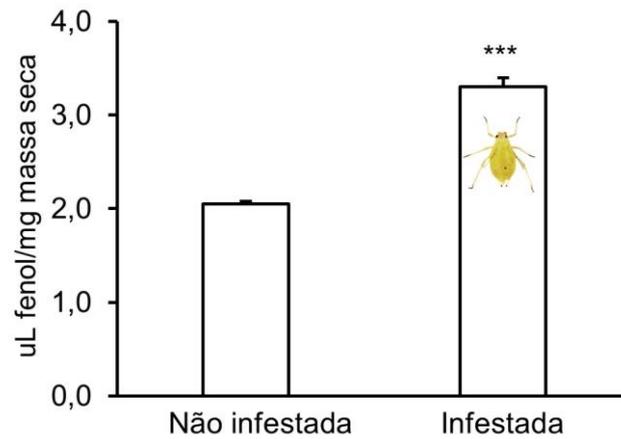


Figura 2. Concentração de fenóis totais constitutivos (média \pm SE) em folhas de plantas-progênie de pimentão *Capsicum annuum* de plantas infestadas por *M. persicae* não infestadas e não infestadas. ($\alpha = 0,05$; ***: $P < 0,001$).

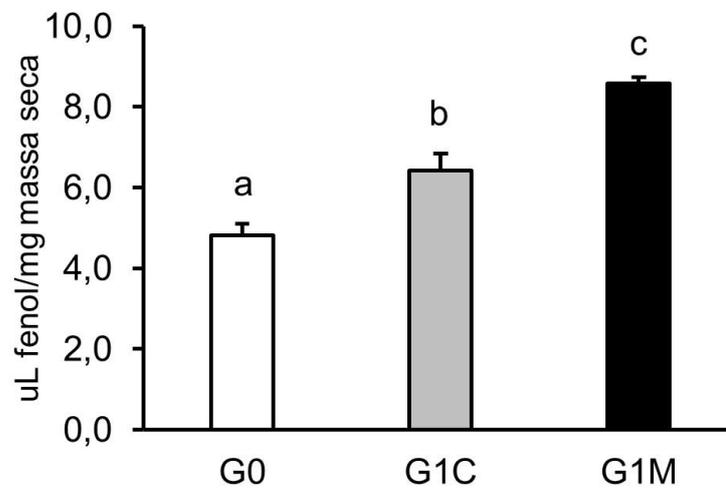


Figura 3. Concentração de fenóis totais (média \pm SE) em folhas de plantas-mãe (G0), plantas-progênie de pimentão *Capsicum annuum* de plantas infestadas por *Myzus persicae* (G1M) e não infestadas (G1C), induzidos pela herbivoria. As letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($\alpha = 0,05$; ***: $P < 0,001$).

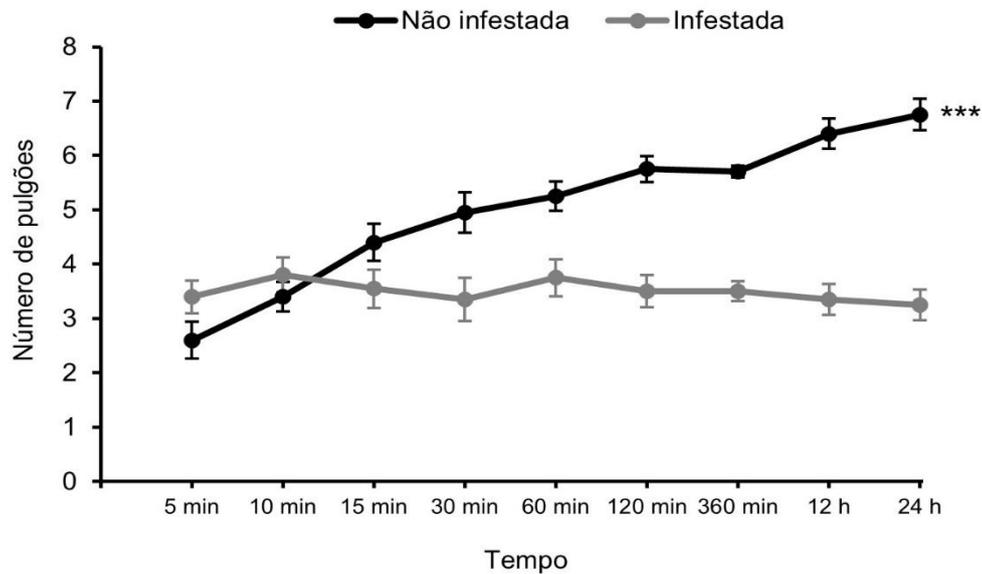


Figura 4. Teste de escolha hospedeira com adultos ápteros do pulgão *Myzus persicae* avaliado após 5, 10, 15, 30, 60, 120, 360 minutos e 12 e 24 horas, em plantas-progênie de pimentão *Capsicum annuum*, infestadas e não infestadas por *M. persicae*. (***) diferença significativa em 0,1% de acordo GLMM, considerando o tempo como variável aleatória e tratamento como variável fixa).

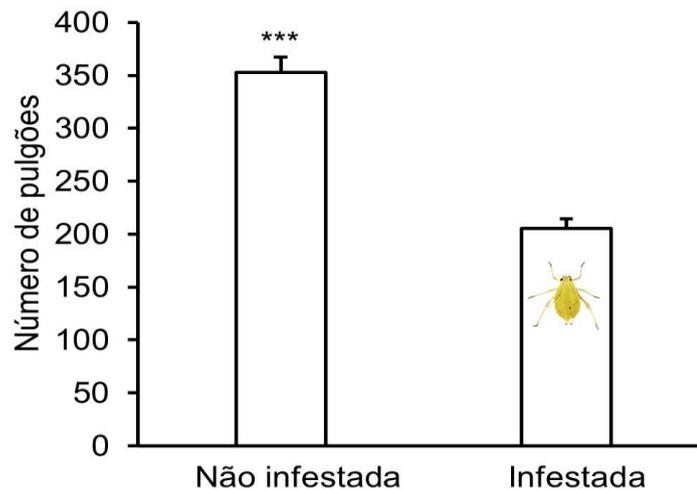


Figura 5. Teste de desempenho do pulgão *Myzus persicae* em plantas-progênie de plantas-mãe de pimentão *Capsicum annuum*, infestadas por *M. persicae* e não infestadas. ($\alpha = 0,05$; ***: $P < 0,001$).

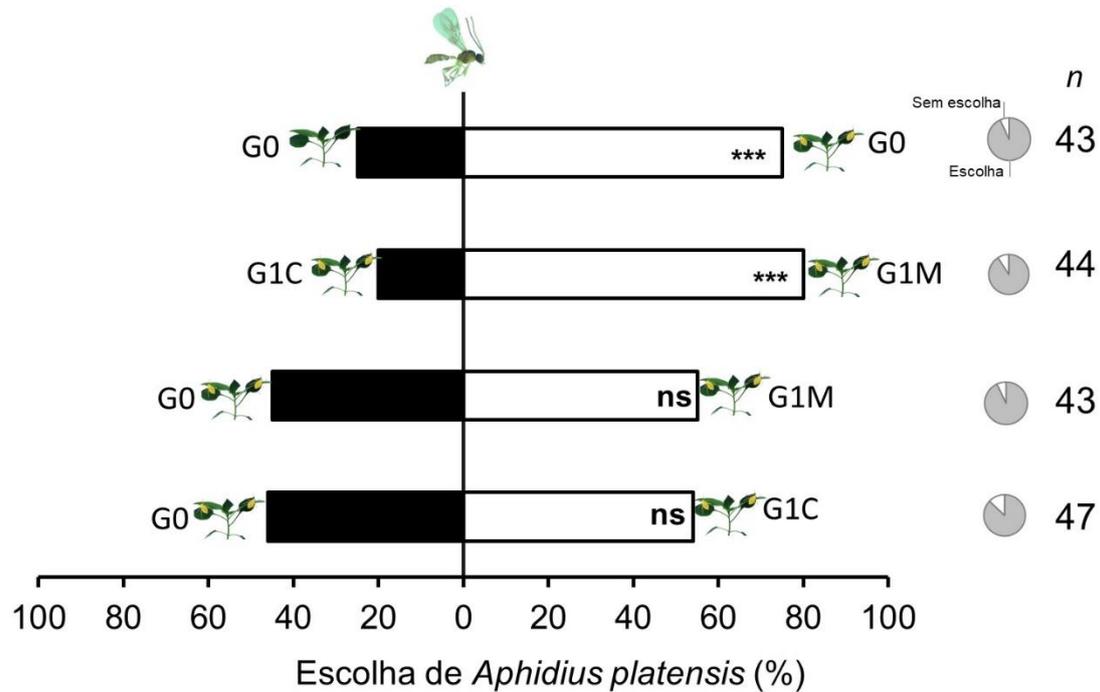


Figura 6 Teste de preferência olfativa de *Aphidius platensis* frente aos voláteis da planta de pimentão *Capsicum annuum*. As fontes de odor consistiram em: planta-mãe não infestada (G0NI); planta-mãe infestada por *Myzus persicae* (G0IN); planta-progênie de planta-mãe não infestada (G1CIN); planta-progênie de planta-mãe infestada por *M. persicae* (G1MM). À direita, os valores em n correspondem ao número de fêmeas avaliadas. ($\alpha=0.05$; ***: $P < 0.001$; ns= diferença não significativa).

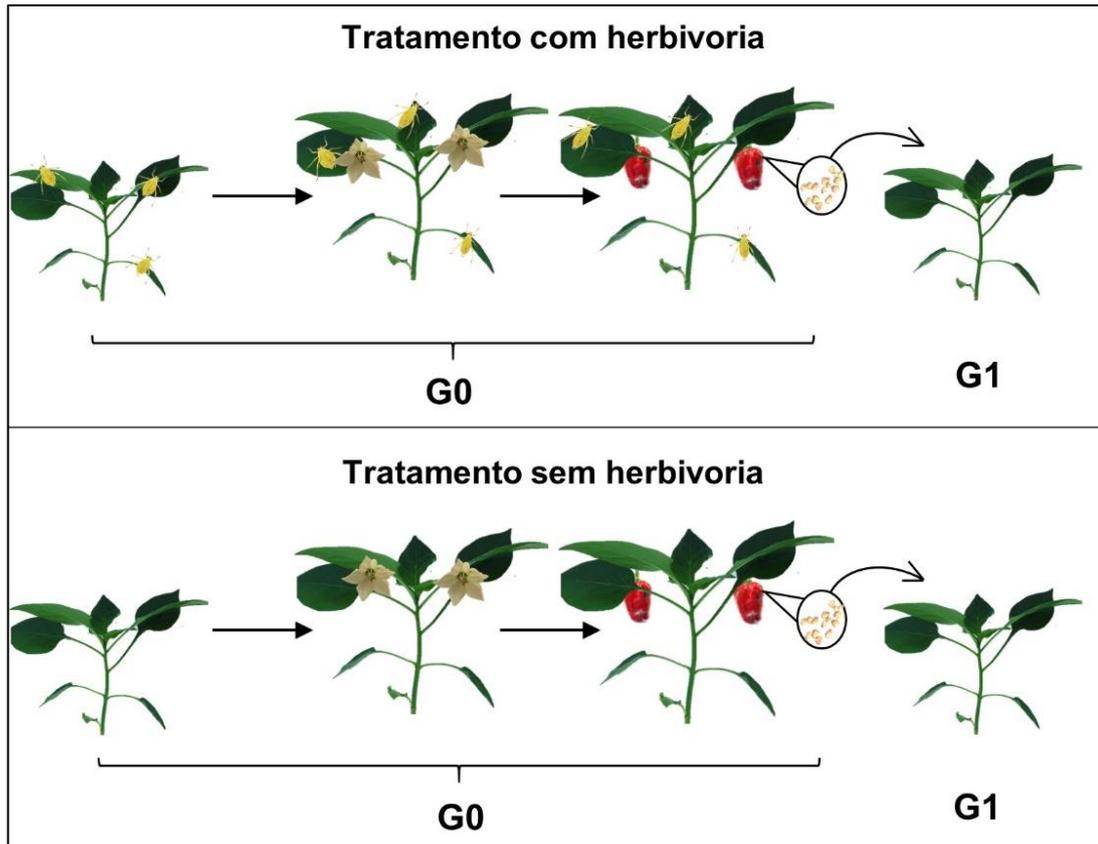


Figura 7. Esquema transgeracional do experimento mostrando a planta-mãe (G0) infestada por *M. persicae* e não infestada, e a primeira geração (G1) representada por planta-progênie de planta-mãe infestada e não infestada; as plantas-progênie foram mantidas intactas e cultivadas somente durante a fase vegetativa.

Material suplementar

S1. Arena feita para o teste de preferência hospedeira com adultos ápteros de pulgão *Myzus persicae* avaliado ao longo do tempo, em plantas-progênie de plantas-mãe de pimentão *C. annuum* infestadas por Inão infestadas. (a) preparação da arena para liberação dos pulgões e início do experimento. (b) arena fechada com uma tampa de plástico para evitar o escape dos insetos. a tampa contém uma abertura de tecido *voil* para ventilação.



S2. Teste de desempenho do pulgão *Myzus persicae* em plantas da progênie de plantas-mãe infestadas pelo pulgão *M. persicae* e não infestadas. (a) Infestação das plantas-progênie de pimentão *C. annuum* com ninfas de primeiro instar do pulgão. (b) plantas envolvidas com gaiolas de *voile*.



S3. Teste de olfatometria com o parasitoide *Aphidius platensis*.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Essa tese explorou como as plantas de pimentão respondem à herbivoria de duas espécies de insetos, *Diabrotica speciosa* e *Myzus persicae*. No primeiro artigo confirmamos a hipótese de que a herbivoria por *D. speciosa* altera a estrutura da comunidade de visitantes florais com consequências para a reprodução (Figura 1A). As flores de plantas que foram infestadas com adultos do besouro recrutaram uma menor abundância e riqueza de insetos visitantes. Esse efeito da herbivoria sobre a visitação floral pode ter contribuído com o impacto sobre a reprodução das plantas. No segundo artigo, a nossa hipótese de que a herbivoria materna por esse mesmo herbívoro aumentaria a resistência na progênie das plantas contra a herbivoria de coespecíficos e heteroespecíficos com custos para o crescimento e reprodução não foi confirmada. Nós constatamos que as plantas progênie de plantas infestadas por *D. speciosa* foram mais susceptíveis à herbivoria de coespecíficos, ao mesmo tempo em que foram mais resistentes à herbivoria de *M. persicae*. Nossos dados sugerem que a maior suscetibilidade da progênie de plantas infestadas a coespecíficos é resultante de um *trade-off* no alocamento energético, pois a progênie teve maior crescimento vegetativo e reprodução (Figura 1A). Já no terceiro artigo, a nossa hipótese de resistência transgeracional foi comprovada, pois as plantas-progênie de plantas que foram induzidas por *M. persicae* na geração materna, foram mais resistentes à herbivoria de coespecíficos comparadas com a progênie de plantas não infestadas. A maior resistência dessas plantas coincidiu com um incremento no nível constitutivo de fenóis totais e um aumento ainda maior quando expusemos as plantas-progênie à herbivoria dos pulgões (Figura 1B).

Em geral, nosso trabalho mostra que a planta de pimentão apresenta uma plasticidade fenotípica na herança transgeracional que depende da identidade do herbívoro. Nós hipotetizamos que essa plasticidade na estratégia da progênie em lidar com *D. speciosa* e *M. persicae* deve-se a diferenças na intensidade da pressão da herbivoria pelas duas espécies. Apesar da herbivoria por adultos de *D. speciosa* em pimentão impactar a reprodução da planta (artigo 1), ela geralmente não ocasiona na mortalidade da planta. Além disso, o pimentão é uma planta hospedeira esporádica para *D. speciosa*, pois as fêmeas depositam ovos em outras espécies vegetais. Já a infestação por *M. persicae*, além de causar impacto significativo sobre a reprodução da planta (artigo 3), pode causar a morte da planta. Dessa maneira, futuros estudos devem investigar se essa plasticidade na estratégia transgeracional confere à planta-mãe e progênie uma adaptação ao ataque pela espécie de herbívoro. Além disso, o resultado inesperado do aumento da resistência da progênie ao herbívoro heteroespecífico, mas não ao

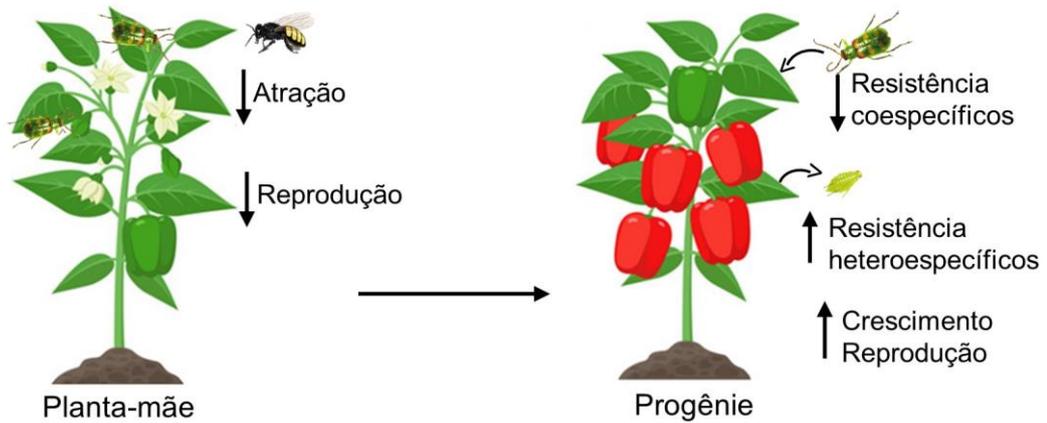
coespecífico, deve ser melhor investigado ao nível molecular e bioquímico. Como o pulgão *M. persicae* não compartilha um histórico evolutivo longo com *C. annuum*, já que é nativo da Ásia (CAPINERA, 2001), esse resultado pode não ter um significado adaptativo para a planta. Em se tratando do impacto da herbivoria por *D. speciosa* na reprodução das plantas de pimentão, estudos futuros devem investigar os mecanismos pelos quais o dano desses besouros influencia o recrutamento de visitantes de flores, como disponibilidade de recursos alimentares, perfil de fragrâncias florais, tamanho e morfologia das flores.

Sob a perspectiva aplicada, nosso estudo fornece informações relevantes sobre a importância do manejo de populações de *D. speciosa* e *M. persicae* no pimentão, pois os efeitos causados pela herbivoria desses insetos têm implicações diretas e indiretas no rendimento da cultura do pimentão. A redução da visitação floral em plantas infestadas com *D. speciosa* é um impacto a ser considerado sob o ponto de vista econômico, pois o besouro não tem um *status* de praga relevante na cultura, mas é possível que ele tenha sido subestimado com base na área foliar consumida. Além disso, futuros trabalhos podem ser realizados com o intuito de produzir sementes mais resistentes, uma vez que demonstramos em nosso estudo que a herbivoria induzida na geração materna pode ocasionar a produção de descendentes mais resistentes. No entanto, é importante conhecer as estratégias da planta de pimentão na alocação de recursos para resistência e/ou crescimento entre várias gerações, dependendo da espécie de herbívoro analisada.

Figura 1 - Efeitos da herbivoria por *D. speciosa* e *M. persicae* em plantas de pimentão *Capsicum annuum*. (A) A herbivoria materna por *D. speciosa* diminui a atração de visitantes florais e a reprodução das plantas. A progênie é menos resistente a *D. speciosa*, contudo, mais resistente a *M. persicae*, além de apresentar maior crescimento vegetativo e reprodução. (B) A herbivoria por *M. persicae* impacta a reprodução e a progênie é mais resistente a coespecíficos do herbívoro, possui maior teor de fenóis totais, contudo, o crescimento vegetativo é menor.

A

Efeito da herbivoria por *D. speciosa*



B

Efeito da herbivoria por *M. persicae*

