

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA – PPGQB**

BENISIO FERREIRA DA SILVA FILHO

**ANÁLISE DA RESPOSTA ECOLÓGICA DA CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum sp*)
EM RESPOSTA À HERBIVORIA POR *Diatraea saccharalis***

MACEIÓ

2014

BENISIO FERREIRA DA SILVA FILHO

ANÁLISE DA RESPOSTA ECOLÓGICA DA CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum sp*)
EM RESPOSTA À HERBIVORIA POR *Diatraea saccharalis*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Ciências, área de concentração em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana.

Coorientador: Dr. Alessandro Riffel

Maceió
2014

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Maria Auxiliadora G. da Cunha

- S586a Silva Filho, Benisio Ferreira da.
Análise da resposta ecológica da cana-de-açúcar (*Saccharum sp*) em resposta à herbivoria por *Diatraea saccharalis* / Benisio Ferreira da Silva Filho. – 2014.
102 f. : il., gráfs. e tabs.
- Orientador: Antônio Euzébio Goulart Sant’Ana.
Co-orientador: Alessandro Riffel.
Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2014.
- Bibliografia. f. 93-102.
1. Cana-de-açúcar. 2. *Diatraea saccharalis*. 3. Herbivoria. I. Título.

CDU: 577.1:632.7



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Taboleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Doutorando **BENISIO FERREIRA DA SILVA FILHO**, intitulada: “Análise da Resposta Ecológica da Cana-de-Açúcar (*Saccharum spp*) em Resposta à Herbivoria por *Diatrea saccharalis*”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 07 de janeiro de 2014, às 13:00 h, no Auditório do NPM (Severinão).

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana
Orientador (PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dr. José Maurício Lima Bento
ESALQ/Piracicaba

Prof. Dr. Michael A. Birkett
Rothamsted/UK

Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima
CECA/UFAL

Prof. Dr. Luiz Antônio Ferreira da Silva
ICBS/UFAL

Prof. Dr. Alessandro Riffel
PPGQB/EMBRAPA

Dedico a Deus por ter concluído mais uma etapa da minha carreira.

Dedico aos meus pais por terem me dado estrutura e condições de chegar até aqui.

Dedico a minha esposa Angela por ter estado ao meu lado desde o início da caminhada.

Dedico a minha filha Maria Beatriz por ter sido a responsável por me impulsionar até o final.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter sido a força motriz.

À minha família, em especial a minha esposa Angela, que me acompanha nessa caminhada árdua desde o Mestrado. Angela, meu amor, muito obrigado por tudo!

Ao meu orientador Antonio Euzebio por ter me orientado e dado a oportunidade de ter realizado um trabalho fantástico como este, além das chances de ter enriquecido minha vida com experiências internacionais.

Ao meu co-orientador Alessandro Riffel pelos ensinamentos e amizade construída ao longo desse projeto (inclusive, e, sobretudo pela paciência).

Aos amigos do laboratório LPqRN, especialmente Thyago Ribeiro (Angú), Demetrius, Karlos Lisboa e Luciana Viana, pela contribuição científica, física e psicológica dadas ao longo do trabalho.

Ao meu imenso Anjo da Guarda, Jaim Simões, por ter me salvo nos momentos mais difíceis e ter me ensinado muito.

Ao meu supervisor na Inglaterra, Mike Birkett, pela confiança e sabedoria demonstradas.

A todos os membros de Rotamsted Research, especialmente, Jonh Pickett, Jing Jang Zhaou.

Ao meu pequeno anjo da guarda, Paulinha (Paula Salgueiro), por ter sido meus olhos e parte do meu cérebro na reta final da escrita deste trabalho e pela amizade construída ao longo do tempo.

À amiga Aryanna, pela imensa ajuda durante a etapa final deste trabalho.

RESUMO

A crescente demanda mundial para a produção de energias renováveis em substituição aos combustíveis fósseis tem dado grande destaque à cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), pois esta tem sido considerada como a cultura mais eficiente para a produção de energia. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar com uma produção de 652,02 milhões de toneladas na safra 2013/2014, em uma área de 8,1 milhões de hectares. Um dos grandes entraves à produção de cana-de-açúcar ainda é o ataque de pragas e doenças. Estima-se que cerca de 10% das perdas para esta cultura sejam ocasionadas por insetos, sendo a broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*) a mais importante. As plantas, durante a evolução, para reduzir os danos causados pelo ataque dos insetos, têm desenvolvido uma série de mecanismos de defesa, dentre eles, barreiras físicas, metabólitos tóxicos e metabólitos voláteis sinalizadores. Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos para decifrar os mecanismos de defesa da cana-de-açúcar ao ataque de insetos herbívoros, na tentativa de subsidiar programas de melhoramento genético e a biotecnologia de informação para o desenvolvimento de plantas mais resistentes, mas, muito destes mecanismos ainda permanecem a ser esclarecidos. Este projeto se propôs a avaliar a resposta da cana-de-açúcar na herbivoria por *Diatraea saccharalis* através da identificação de importantes compostos orgânicos voláteis, metabólitos secundários e proteínas produzidas durante o processo de resposta ao ataque. Investigamos a sequência de uma possível terpeno sintase, bem como genes Benzoxazinoides (Bx) de cana de açúcar e a expressão destes genes nas plantas infestadas. Nossos resultados mostram que a cana-de-açúcar apresenta uma resposta sistêmica quando atacada pela larva de *Diatraea saccharalis* produzindo o composto volátil β -cariofileno, com aumento da expressão do gene putativo *TPs* de cana, o aumento ácido hidroxâmico DIMBOA nas raízes junto com o aumento da expressão dos genes envolvidos na sua biossíntese e proteínas relacionadas a defesa na tentativas de inibir o ataque da larva e preservar a planta.

Palavras-chaves: Cana-de-açúcar. *Diatraea saccharalis*. Herbivoria.

ABSTRACT

The increasing global demand for renewable energy to replace fossil fuels has given great emphasis on sugar cane (*Saccharum* spp) As this has been considered as the most efficient crop for energy production. Brazil is the largest producer of sugar cane with a production of 652.02 million tonnes in the 2013/2014 season, in an area of 8.1 million hectares. One major barrier to the production of sugar cane is still the attack of pests and diseases. It is estimated that about 10 % of the crop losses to be caused by insects, and the bit of sugar cane (*Diatraea saccharalis*) the most important. Plants, during evolution, to reduce the damage caused by the attack of insects, have developed a number of defense mechanisms, among them physical, toxic metabolites and volatile metabolites. Many studies have been developed to decipher the mechanisms of defense sugar cane to attack by herbivorous insects in an attempt to support breeding and biotechnology information programs for the development of more resistant plants, but many of these mechanisms still remain to be clarified. This project aimed to evaluate the response of sugar cane in herbivory by *Diatraea saccharalis* identifying volatile organic compounds, secondary metabolites and proteins produced during the response to the attack. We investigated the possible sequence of a terpene synthase, and Benzoxazinoides (Bx) sugar cane genes and the expression of these genes in the infected plants. Our results show that sugar cane has a systemic response when attacked by the larva *Diatraea saccharalis* producing β - caryophyllene volatile compound with increased expression of *TPs* cane putative gene, hydroxamic acid DIMBOA in roots increased with the expression of genes involved in the biosynthesis and defense-related proteins in attempts to inhibit the attack of the larvae and preserve the plant.

.

Keywords: Sugar cane. *Diatraea saccharalis*. Herbivory.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 16 – Pagina do NCBI com a sequência de descrita por Zhuang <i>et al</i> , 2012 SbTPS4 (Sb07g005130)	62
Figura 17 – Pagina do TIGR Plant Transcript Assemblies com os resultados BLAST utilizando a sequência Sb07g005130	63
Figura 18 – Tela do software DNASTAR LaserGene 8, para localizar as regiões conservadas das sequências anteriormente encontrada	63
Figura 19 – Parcial ORF da Terpeno sintase putativa de <i>Saccharum</i> sp.	63
Figura 20 – Alinhamento em ClustalW2 entre as sequências de aminoácidos da Terpeno sintase putativa de cana-de-açúcar	64
Figura 21 – Amplificação em Gel de agarose 2% da Terpeno sintase putativa de <i>Saccharum</i> spp.	65
Figura 22 – Gráfico dos Níveis de expressão do gene putativo da <i>TPS</i> Padrão de DIMBOA e tempo de retenção	66
Figura 23 –Resposta comportamental da <i>Cotesia flavipes</i> em olfatômetro de quatro Braços Co-injeção para confirmação de DIMBOA em amostra de raiz	68
Figura 24 – Padrão de DIMBOA e tempo de retenção	69
Figura 25 – Co-injeção para confirmação de DIMBOA em amostra de raiz de canade-açúcar	69
Figura 26 – Comparação dos cromatogramas de amostras de raiz e a presença de DIMBOA	70
Figura 27 – Produção de DIMBOA em ng/g em raiz fresca	71
Figura 28 – Programa ClustalW2 utilizado para o alinhamento inicial em busca de regiões conservadas	73
Figura 29 – Programa BioEdit 7.1.5.0 e o alinhamento das sequências de Bx1	73
Figura 30 – Gel de agarose 2% com os amplicons dos genes putativos <i>Bx</i> de canade-açúcar	75

Figura 31 – Reprodução da tela do BLAST com os resultados para sequencia consenso <i>Bx1</i>	77
Figura 32 – Níveis de expressão dos genes putativos <i>Bx</i> nos três tratamentos analisados por qPCR	79
Figura 33 – Gel de poliacrilamida com perfil proteico de cana-de-açúcar	85

LISTAS DE TABELAS

Tabela - Mecanismos de resposta da planta em função de elicitadores	30
Tabela 2 - Etapas de execução do trabalho	40
Tabela 3 - Compostos orgânicos voláteis emitidos no ensaio de erbivoria real	53
Tabela 4 - Área absoluta do pico de β -cariofileno	53
Tabela 5 - Organização do experimento realizado em Rothamsted Research	59
Tabela 6 - Primers utilizados na reação multiplex para amplificação de trechos dos genes Bx em cana-de-açúcar	74
Tabela 7 - Lista de sequências consensus após sequenciamento	76
Tabela 8 - Primers específicos para as sequências consenso utilizados na reação qPCR para análise de expressão do genes Bx de cana-de-açúcar	77
Tabela 9 - Lista de proteínas diferenciadas e suas funções nos diferentes tratamentos	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COVs	Compostos orgânicos voláteis
EROS	Espécies reativas do oxigênio
CDPK	Proteínas quinases cálcio dependentes
AJ	Ácido Jasmônico
IPP	Isopentenil pirofosfato
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i>
MS	Espectrometria de massas
pI	Ponto isoelétrico
PMF	<i>Peptide mass fingerprinting</i> (Determinação da impressão digital pela massa de peptídeos)
PMSF	Fluoreto de fenilmetanosulfonila
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
TOF	<i>Time-of-flight</i>
μL	Microlitro
ng	Nanogramas
RNAm	Ribonucleic Acid Messenger (Ácido Ribonucléico mensageiro)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivos gerais	20
2.2	Objetivos específicos	20
3	REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1	A Cana-de-açúcar	21
3.2	A importância econômica da Cana-de-açúcar	22
3.3	Perdas econômicas por pragas	23
3.4	A broca da cana-de-açúcar (<i>Diatraea saccharalis</i>)	23
3.5	Herbivoria	24
3.6	Herbivoria por <i>Diatraea saccharalis</i>	25
3.7	Defesas de plantas frente a herbivoria	26
3.8	Mecanismos moleculares na resposta induzida a herbivoria	28
3.8.1	Voláteis e não voláteis como metabólitos secundários na resposta induzida por herbivoria....	33
3.9	Interação tritrófica e controle biológico	37
3.10	Perspectivas do uso de análises Proteômicas	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	Etapas de execução do trabalho	40
4.2	Material vegetal	41
4.3	<i>Diatraea saccharalis</i> e <i>Cotesia flavipes</i>	41
4.3.1	Coleta da secreção oral de <i>Diatraea saccharalis</i> para ensaios de herbivoria simulada.....	41
4.4	Aplicação de Cis-Jamona	42
4.5	Preparo dos ensaios de Herbivoria	42
4.5.1	Herbivoria simulada.....	42
4.5.2	Herbivoria real.....	43
4.6	Preparo dos sistemas de aeração	43
4.7	Deteção e quantificação de COVs emitidos	43
4.8	Bioensaio com o parasitoide <i>Cotesia flavipes</i>	44
4.9	Deteção e quantificação do Ácido Hidroxâmico DIMBOA durante a herbivoria	45
4.10	Análise de expressão gênica dos genes envolvidos na resposta a herbivoria	46
4.10.1	Construção dos primers para o gene putativo da terpeno sintase em cana-de-açúcar.....	46
4.10.2	Construção dos primers para o gene putativo Bx em cana-de-açúcar	46
4.10.3	Extração de RNA Total e preparo do cDNA total.....	47
4.10.4	PCR e corte das bandas em gel de agarose 2% para sequenciamento.....	47
4.10.5	Construção dos primers específicos para os genes putativos da terpeno sintase e Bx.....	47
4.10.6	Quantificação relativa (qPCR).....	47
4.11	Análise do perfil protéico e identificação das proteínas diferencialmente expressas	48
4.11.1	Extração e quantificação das proteínas.....	48
4.11.2	Eletroforese bidimensional.....	48
4.11.2.1	Primeira dimensão - Focalização Isoelétrica.....	48
4.11.2.2	Segunda Dimensão.....	49
4.11.2.3	Coloração de Géis.....	49
4.11.2.4	Aquisição e processamento de imagens.....	49
4.11.2.5	Identificação das Proteínas.....	50

4.11.2.6	Hidrólise.....	50
4.11.2.7	Espectrometria de Massa.....	50
4.11.2.8	Processamento.....	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1	Ensaio de herbivoria real e coleta dos COVs emitidos.....	52
5.2	Identificação do β-cariofileno.....	54
5.3	Análise estatística da emissão β-cariofileno por plantas de cana-de-açúcar, induzida pela herbivoria por larvas de <i>Diatraea saccharalis</i>.....	57
5.4	Confirmação da emissão do β-cariofileno.....	58
5.5	Identificação e quantificação da expressão do gene de uma terpeno sintase putativa de cana-de-açúcar.....	61
5.6	Bioensaio com parasitoide <i>Cotesia flavipes</i>: Teste de atração com olfatômetro.....	67
5.7	Detecção e quantificação do ácido hidroxâmico DIMBOA.....	68
5.8	Construção dos primers para genes putativos Bx envolvidos na produção de DIMBOA em cana-de-açúcar.....	72
5.9	Resposta da cana-de-açúcar a aplicação de Cis-Jamona.....	83
5.10	Análise do perfil proteico e identificação das proteínas diferencialmente expressas em resposta a herbivoria.....	84
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	92
	REFERÊNCIAS.....	93

1 INTRODUÇÃO

A sobrevivência de um organismo depende da sua capacidade de defesa contra seus inimigos naturais. Nos organismos autótrofos, como os vegetais, os quais convivem constantemente com a ameaça de serem consumidos por herbívoros, houve a necessidade de desenvolver, ao longo da evolução, uma série de mecanismos que auxiliam na resistência a esses agressores.

Dessa forma, as plantas respondem à herbivoria por meio de alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas a fim de reduzir e/ou compensar o ataque de um herbívoro. Os mecanismos bioquímicos de defesa contra os herbívoros são amplos, dinâmicos e mediados tanto pela defesa direta quanto indireta. Diretamente, os compostos de defesa são produzidos constitutivamente ou induzidos em resposta a danos nas plantas e afetam desde a alimentação, crescimento e sobrevivência dos herbívoros. Além disso, as plantas também liberam compostos orgânicos voláteis (COVs) que atraem os inimigos naturais dos herbívoros ou funcionam como sinalizadores para outras plantas, uma maneira indireta de defesa.

A produção de compostos voláteis varia de acordo com as espécies de plantas, o estágio de desenvolvimento e condições fisiológicas. O mecanismo funciona de forma que uma quantidade significativa de voláteis é normalmente liberada pelas plantas para a atmosfera, enquanto que uma mistura diferente dessas substâncias é produzida em resposta a herbívoros.

Apesar das estratégias defensivas complexas contra o ataque de insetos e patógenos, alguns destes herbívoros ainda são capazes de preteri-las causando perdas econômicas significativas em culturas cultivadas, como é o caso da broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*).

D. saccharalis é uma importante praga para gramíneas atacando o milho, sorgo, trigo, culturas de arroz e no Brasil principalmente a cana-de-açúcar. Este herbívoro é a mais importante praga desta cultura e destaca-se das outras por sua ampla distribuição, intensidade de ataque e dano econômico.

A importância da praga se traduz ainda pelo fato de o Brasil ser o maior produtor mundial de cana-de-açúcar segundo a União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA), o maior exportador de açúcar, segundo *United States Department*

of Agriculture (USDA) e o segundo maior produtor de etanol do mundo, segundo a F.O.Licht.

É estimado que a safra de 2013/2014 destinada a atividade sucroalcooleira seja em torno de 8.799.150 hectares e renderá uma produção de 652,02 milhões de toneladas, com aumento de 10,70% em relação à safra 2012/13.

Até o presente momento, os estudos de resposta da cana-de-açúcar a herbivoria têm se restringido principalmente à dinâmica de genes, proteínas e metabólitos específicos elicitados pelo ataque do inseto ou a análises transcricionais em grande escala de bibliotecas de macro e microarranjos.

Vários estudos têm demonstrado que alterações no proteoma de um organismo não podem ser inferidas simplesmente por meio das mudanças no transcriptoma. A obtenção de informações relevantes sobre processos normais e anormais que ocorrem no momento em que a planta está se defendendo podem mostrar que enzimas estão ligadas ao processo de resposta a herbivoria e em um próximo estágio sugerir elementos específicos para o desenvolvimento de plantas mais resistentes.

Além disso, em um determinado microambiente celular, proteínas e transcritos interagem com outras moléculas em vias específicas, e estas interações determinam a regulação, expressão, atividade e a estabilidade das moléculas de mRNA e proteínas.

Algumas abordagens para aumentar a defesa das plantas frente aos insetos herbívoros tem sido adotadas. Entretanto, a função de muitos genes que apresentam expressão modificada pela herbivoria permanece ainda desconhecida e os mecanismos de resposta a esse estresse biótico ainda continuam sendo um desafio à pesquisa.

Uma estratégia para o controle de pragas é utilizar inimigos naturais estabelecendo assim os benefícios da interação tritrófica ao produtor. No caso da cana-de-açúcar usa-se a *Cotesia flavipes*, parasitoide da *D. saccharalis*, tendo essa grande viabilidade, baixo custo de produção e fácil manipulação.

Outra estratégia é a aplicação da identificação dos COVs, genes e enzimas envolvidas na defesa para desenvolvimento de elementos no melhoramento genético da cana-de-açúcar.

É fundamental um melhor entendimento da resposta ao ataque da *D. saccharalis*. Com a identificação dos mecanismos de resposta será possível a utilização destes no aumento da resistência a resistência à essa praga.

Frente a essa realidade, este projeto se propôs a avaliar a resposta da cana de açúcar à herbivoria por *D. saccharalis* a partir da identificação de importantes compostos orgânicos voláteis, metabólitos secundários e proteínas envolvidas na defesa.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Identificar os mecanismos de resposta da cana-de-açúcar frente a herbivoria por *Diatrea saccharalis*.

2.2 Específicos

- Identificar os compostos voláteis emitidos na resposta à *Diatraea saccharalis*;
- Identificar os metabólitos secundários produzidos na resposta a herbivoria por *D. saccharalis*;
- Buscar o gene putativo da terpeno sintase em cana-de-açúcar e avaliar sua expressão no momento da herbivoria;
- Avaliar a atração do endoparasitoide *Cotesia flavipes* por voláteis liberados pela cana-de-açúcar após a herbivoria por *D. saccharalis*;
- Identificar, na cana-de-açúcar, os genes relacionados com a produção do metabólito secundário DIMBOA e avaliar sua expressão no momento da herbivoria;
- Verificar se há resposta da cana-de-açúcar quando exposta ao composto *cis*-jasmona;
- Identificar proteínas do tecido foliar de cana-de-açúcar que sejam elicitadas pela herbivoria de *D. saccharalis*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma gramínea perene, em sua forma natural, pertencente à família *Poaceae* e ao gênero *Saccharum*, que abrange várias espécies, sendo as mais estudadas do gênero *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinensis*, *S. barberi* e *S. robustum* (GUPTA et al., 2010; CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

Esse vegetal é originário do Sudeste Asiático, na região central da Nova Guiné e Indonésia (SACIOTO, 2003) e foi introduzido no Brasil pelos portugueses no século VXI, inicialmente em Pernambuco e São Paulo (BRAUNBECK; CORTEZ, 2008). É cultivada em regiões tropicais e subtropicais em todo mundo, com uma área maior que 20 milhões de hectares distribuídos em 121 países sendo considerada uma das principais espécies de vegetais cultivada em todo mundo (ROSILLO-CALLE et al., 2005; FAO, 2013).

De forma geral, a cana é composta por raízes e rizomas que fazem parte da área subterrânea e o colmo, as folhas e as flores pertencem a região aérea da planta (TRIANA et al., 1990). Basicamente, a região da planta de maior interesse é o colmo onde a sacarose é predominantemente estocada (MANTELATTO, 2005).

A maioria das variedades atualmente cultivadas são originadas da hibridação interespecífica entre diferentes espécies de *Saccharum*, particularmente entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* (DILLON et al., 2007). A espécie selvagem *S. spontaneum* possui um baixo teor de açúcar, colmo fino, alto teor de fibras e elevada resistência a estresses bióticos e abióticos (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). Enquanto que *S. officinarum* tem alto teor de açúcar, colmo grosso, baixo teor de fibras, baixa resistência a doenças e pragas (SCARPARI; BEAUCLAIR, 2008). Esta última, entretanto, destaca-se por apresentar fácil adaptação a solos pobres em fertilidade, alta produção agrícola, boa brotação em socarias e bom perfilhamento (FERNANDES, 2005).

Na hibridação de várias espécies com as variedades nobres de *S. officinarum* procura-se aliar a rusticidade e resistência a pragas e doenças à boas qualidades fisiológicas e o alto teor de açúcar (CASAGRANDE; VASCONCELOS, 2010).

3.2 Importância Econômica da Cana-de-açúcar

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar segundo a União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA), o maior exportador de açúcar, segundo United States Department of Agriculture (USDA) e o segundo maior produtor de etanol do mundo, segundo a F.O.Licht. A produção concentra-se nas regiões Centro-Sul e Nordeste do Brasil permitindo, dessa forma, duas safras por ano e, conseqüentemente o fornecimento de açúcar e etanol para o mercado interno e externo durante todo o ano (UNIÃO DA INDÚSTRIA DA CANA-DE-AÇÚCAR, 2013).

É estimado que a safra de 2013/2014 destinada a atividade sucroalcooleira tenha uma área plantada correspondente a 8.799.150 hectares rendendo uma produção de 652,02 milhões de toneladas, com aumento de 10,70% em relação à safra 2012/13. O estado de São Paulo permanece como o maior produtor com 51,31% (4.515.360 hectares). Alagoas ocupa o sexto lugar no cultivo da cana-de-açúcar no Brasil e o primeiro no Nordeste e possui atualmente uma área de cultivo correspondente a 5,02% do seu território (442.590 hectares) (CONAB, 2013).

Assim, só no primeiro trimestre do ano da safra de 2013/2014 o setor sucroalcooleiro movimentou R\$1,1 bilhão, o que representa um aumento de 18,7% em relação à safra de 2012/2013 (CONAB, 2013). De acordo com o Procana o setor sucroalcooleiro foi responsável por aproximadamente 2% do PIB nacional e por 8% do PIB da agricultura no Brasil em 2011, tendo empregado cerca de 4,5 milhões de pessoas, além de congregar mais de 72.000 agricultores e 373 usinas e destilarias, em operação ou projeto.

Com relação a produção de açúcar, estima-se o crescimento de 13,61%, passando de 38,34 milhões de toneladas para 43,56 milhões. A produção total de etanol deve chegar a 25,77 bilhões de litros contra 23,64 bilhões da safra 2011/12. Deste total, 9,85 bilhões de litros serão de etanol anidro e 12,79 bilhões de bioetanol (UNIÃO DA INDÚSTRIA DA CANA-DE-AÇÚCAR, 2013).

Os dados demonstram que o Brasil é hoje o maior produtor de cana-de-açúcar, reconhecido mundialmente como o líder na produção, responsável por 1/3 de toda a produção mundial. No entanto, o rendimento ainda é baixo, com média de 75 toneladas/ha (KOHLHEPP, 2010).

Atualmente a principal estratégia para o aumento da produtividade é através de programas de melhoramento genético, que buscam o desenvolvimento de

cultivares melhorados e mais produtivos, tolerantes a variações bióticas e abióticas, de modo a se extrair o potencial máximo da cultura sob condições específicas.

3.3 Perdas Econômicas por Pragas

A cana-de-açúcar pode ser atacada por mais de 80 espécies de pragas acarretando perdas de aproximadamente 20% do total de toda a produção por ano (ROSSETTO; SANTIAGO, 2007).

Apesar da facilidade de adaptação da cana-de-açúcar ao clima do Brasil, muitos fatores são responsáveis pela redução dos rendimentos agroindustriais da cultura. Dentre esses incluem-se as pragas, que causam significativas perdas por unidade de área, acarretando em prejuízo econômico para os produtores e impactando diretamente no rendimento dos produtos da indústria de cana (PEREIRA et al., 2010; BARBOSA et al., 2011).

Segundo Picanço (2010), organismos-praga reduzem a produção das culturas ao atacá-las, são carreadores de doenças, diminuem a qualidade dos produtos agrícolas e causam dessa forma, perdas econômicas. Com isso, é necessária uma medida sistemática e estratégica visando à minimização destas pragas, sem que isto, venha prejudicar a cultura de interesse industrial.

Segundo Rossetto e Santiago (2007), para cada 1% de intensidade de infestação da praga em uma produtividade de 80 toneladas por hectare as perdas ocasionadas pela broca equivalem, em média, a 616 quilos de cana, 28 quilos de açúcar e 16 litros de álcool.

A broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*) é responsável por perdas econômicas de aproximadamente 20% em todo mundo. E no Brasil, estudos realizados pelo Centro de Tecnologia Canaveira (CTC) demonstraram que em uma área de ocorrência com 8.000 mil (ha) há prejuízos em torno de 370 (R\$/há/ano), totalizando 2.960 milhões (R\$) (CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA, 2013).

3.4 A broca-da-cana de açúcar – *Diatraea saccharalis*

A *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) é uma importante praga em milho, sorgo, trigo, culturas de arroz e cana-de-açúcar (FIGUEIREDO, 2010). É encontrada no Caribe, América Central e nas regiões quentes da América do Sul até o norte da Argentina (SGRILLO, 1979; LIMA FILHO; LIMA, 2001).

Seu ciclo de vida apresenta quatro fases bem distintas: ovo, larva, pupa e adulto o que a caracteriza como uma espécie holometabólica (LIMA FILHO; LIMA, 2001; COSTA, 2010). A fase adulta é representada pelas mariposas de coloração amarelo-palha, manchas escuras nas asas anteriores e asas posteriores brancas em forma de “V” invertido. As fêmeas são maiores e possuem menos pigmentação nas asas em relação aos machos, que apresentam mais um fator morfológico diferencial, cerdas no último par de pernas (PANNUTI, 2012).

Os adultos apresentam hábito noturno, longevidade de aproximadamente cinco dias e as fêmeas durante esse período liberam feromônio para atrair o macho e copular. Após o acasalamento as fêmeas podem depositar na parte dorsal das folhas de cana-de-açúcar cerca de 200 a 400 ovos de formato oval achatado e coloração que varia de amarelo palha a marrom-escura (GALLO et al, 2002; PANNUTI, 2012).

As lagartas apresentam coloração branco leitosa, cápsula cefálica marrom-escura e linhas marrons dispostas ao longo do corpo (Figura 1). Seu tamanho máximo ao final da sexta ecdise é de 25mm que logo em seguida começa a fase de pupa que pode durar até 10 dias (BOTELHO; MACEDO, 2002).

Figura 1 – *Diatrea saccharalis* em dieta artificial utilizada em nossos experimentos.



Fonte: Silva Filho, BF, 2012.

3.5 Herbivoria

A herbivoria é definida como o consumo de estruturas vegetativas e reprodutivas das plantas por animais ou patógenos (MELLO, 2007). Este processo pode condicionar o sucesso das plantas nos mais diversos ambientes, sendo um

dos fatores responsáveis pela estrutura e composição das comunidades vegetais (WEIS; CAMPBELL, 1992).

Estudos sobre a relação entre plantas e insetos são complexos, pois além da necessidade que existe do equilíbrio das cadeias tróficas, neste caso, deve-se estudar a planta (produtor primário) e o inseto (consumidor primário). Dependendo do objeto de estudo há um terceiro nível trófico envolvendo o predador ou parasitoide (consumidor secundário) (SILVA et al., 2012).

Este processo de interação (inseto-planta) pode ser visto na polinização, principalmente quando há o uso de plantas para abrigo e alimentação do inseto sem causar danos à planta. Animais e insetos que se alimentam de partes não reprodutivas do vegetal (folhas, raiz, e caule) são considerados herbívoros (ANGELO; DALMOLIN, 2007).

Por causa desta relação de dependência positiva para os animais e insetos e negativa para as plantas, o resultado foi a evolução da reação contrária a este ataque por parte das plantas em que defesas selecionam alguns grupos de herbívoros e em que herbívoros influenciam a evolução das defesas nas plantas (COLEY; BARONE, 1996). Pode ser considerado um processo coevolutivo, já que os insetos melhoram suas formas de driblar as defesas da planta e as plantas por sua vez, aprimoram suas formas de defesa (JANZEN, 1980).

3.6 Herbivoria por *Diatrea saccharalis*

A broca da cana é considerada uma das mais importantes pragas da cana-de-açúcar no Brasil, pois reduz de forma significativa a produtividade e qualidade da matéria prima (DINARDO-MIRANDA, 2008).

A fase larval, especialmente os que correspondem a terceira, quarta e quinta ecdise causam danos significativos a planta. Quando eclodem as lagartas em suas duas primeiras ecdises ficam na área do cartucho da planta, alimentando-se do parênquima das folhas e da casca do entrenó em formação para logo em seguida começarem a perfurar o colmo (VENDRAMIN, 1987; PANNUTI, 2012). Suas quatro ecdises posteriores ocorrem dentro do colmo onde abrem galerias e lá se instalam até completar o desenvolvimento larval e tornarem-se pupa e recomeçar o ciclo (VENDRAMIN, 1987).

Dentre as pragas que acometem a cana-de-açúcar a broca da cana (*D. saccharalis*) destaca-se em virtude do seu poder “destruidor” (COSTA; FRANCEZ; SÁ, 2010). Entre os prejuízos causados, enfatiza-se a morte da gema apical (fenômeno conhecido como coração morto), o tombamento da planta (pela formação de galerias) e a inversão da sacarose (prejudicial na produção de açúcar) (GALLO et al., 2002; DINARDO-MIRANDA, 2008).

Existem dois tipos de prejuízos em cana-de-açúcar quando atacada por *D. saccharalis*: Diretos e Indiretos. Os prejuízos diretos são causados em qualquer estágio de desenvolvimento da planta. O sintoma conhecido como “coração morto” é um dos principais problemas de perdas em canaviais e frequentemente observado em plantas de até quatro meses de idade. Em plantas adultas é observado brotações laterais, enraizamento aéreo, perda de peso, afinamento e quebra do colmo causando morte da planta (BARSALOBRES, 2004).

Os prejuízos indiretos são uma consequência do comportamento da broca que quando inicia o ataque à planta e a formação de galerias adentrando no colmo podem ser acompanhadas por microrganismos oportunistas como os fungos *Glomerella tucumanensis* e *Colletotrichum falcatum* causadores da “podridão vermelha”. Em contra partida para se defender a planta produz substâncias de defesa a partir da conversão da sacarose, ocasionando consequentes perdas nos níveis de sacarose e comprometendo a produção de açúcar e álcool (MELO, 1984).

Trabalhos realizados pela Copersucar, hoje CTC (Centro de tecnologia canavieira), com cultivares no fim da década de 1990 revelaram que, a cada 1% de intensidade de infestação da broca, as perdas poderiam chegar a 1,50% na produtividade de colmos, 0,49% na produtividade de açúcar e 0,28% na produtividade de álcool (ARRIGONE, 2002).

3.7 Defesas de plantas frente a Herbivoria

As plantas apresentam diversos mecanismos de defesa, as quais muitas vezes podem ser inferidas se for considerada sua história evolutiva. Grande parte dessa informação vem da sua constituição genética estando diretamente relacionada a sua posição taxonômica (ANGELO; DALMONIN, 2007).

As defesas podem ser influenciadas pelo meio através de estímulos e por existir informações do genoma da planta específicos para uma resposta, é esperado

que a variedade de defesas apresentadas pelas plantas se altere quando ocorrer diferentes níveis de herbivoria (ABRAHAMSON; WEIS, 1997; WU; BALDWIN, 2010).

As defesas podem ser divididas de duas formas: constitutivas e induzidas. A defesa constitutiva são as que existem na planta antes de haver algum tipo de ataque. Defesa induzida é aquela que é produzida ou algo é alterado, translocado ou tem sua produção aumentada no momento em que ocorre ataque (herbivoria) ou microorganismos patógenos (KARBAN, 2008).

Defesas mecânicas ou morfológicas constituem formas existentes nas plantas para resistir ao ataque de herbívoros representam estratégias naturais com intuito de dificultar locomoção e dano mecânico provocado pelo inseto no momento em que morde ou perfura a epiderme da planta (sugadores).

Algumas dessas estratégias são: produção de resina, aumento da concentração de lignina, acúmulo de sílica e cera em sua epiderme, alterando assim a textura de seu tecido diminuindo sua palatabilidade e digestibilidade para o inseto (COOPER; NORMAN, 1996)

Outra estratégia é a de formar barreiras de superfície que restringem o movimento do herbívoro, tais como espinhos, tricomas e domácias, sendo esta última sem qualquer função fisiológica conhecida, mas que serve de abrigo para ácaros (predadores e fungívoros) que provêm benefícios às plantas (BOND; CRAINE, 2004).

Respostas induzidas por herbivoria são muitas vezes relativamente rápidas e reversíveis (KARBAN, 2008). As formas induzidas de defesa nas plantas caracterizam-se através de produção de substâncias químicas, alteração fisiológica, mudança de seu desenvolvimento como mecanismo de resistência a herbivoria, ajustar morfologias de espinhos, tricomas, tenacidade das folhas entre outros, bem como, onde alocar recursos (acima ou abaixo do solo) em resposta ao ataque (KARBAN; BALDWIN, 1997).

Alterações como estas ocorrem de forma dinâmica e permitem às plantas se defenderem somente quando necessário, pois esse mecanismo requer um consumo energético que se fosse contínuo comprometeria fontes necessárias de desenvolvimento e reprodução (TOLLRIAN; HARVELL, 1999).

3.8 Mecanismos de resposta induzida por herbivoria

Os mecanismos de defesa frente a herbivoria ocorrem de maneira sistemática e iniciam-se a partir da interação inseto-planta. O ataque herbívoro induz a uma série de eventos moleculares nas células vegetais que por sua vez, traduzem este alarme em sinais, resultando dessa forma, no acúmulo de metabólitos de defesa.

A composição química da pegada do inseto também serve como elicitador pois geralmente possui secreções semelhantes a cutícula do próprio inseto e contem lipídios específicos, refletindo qualitativamente como padrão químico específico do inseto (HILKER; MEINERS, 2010).

Segundo Meiners e Hilker (2000), o contato constante dos ovos após a ovoposição envolvem outros fatores além do contato físico entre ovos e folha. A secreção que ajuda a aderir os ovos a superfície da planta induz uma resposta contra a ovoposição e um dos elicitadores conhecidos de insetos da família *Bruchidae*, a Bruchina, cuja resposta da planta é o crescimento de tumores no local com a finalidade de impedir as larvas na planta (DOSS et al., 2000). Porém um conjunto de ações da fêmea durante a ovoposição desencadeará esta resposta sendo estas as principais:

- 1- A fêmea se alimenta na mesma folha que está ovopositando.
- 2- Para melhorar a adesão a fêmea morde o local (dano) onde serão postos os ovos.
- 3- Para evitar dessecação, a fêmea provoca danos mais profundos e insere os ovos no local.

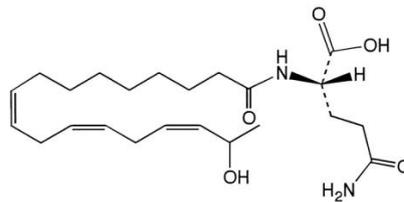
A alimentação dos herbívoros pode ser detectada por uma planta simplesmente como resultado de um dano físico. No entanto após inúmeros estudos sabemos que não basta ocorrer o dano físico para que a planta responda acelerando sua fisiologia, emitindo compostos orgânicos voláteis e metabólitos e proteínas de defesa.

Os herbívoros liberam regurgito no local da mordida, e estes compostos presentes no regurgito é que desempenham um papel na indução de respostas defensivas das plantas. Estes elicitadores presentes na saliva e secreção oral do inseto levam ao aumento da produção de fitormônios e liberação de compostos

voláteis com função de atrair inimigos naturais do herbívoro (TUMLINSON; ENGELBERTH, 2008).

Já isolados em amostras de regurgito de larvas de lepidópteros o composto N-(17-hidroxi-linolenil)-L-glutamina conhecido como volicitina (Figura 2) e outros conjugados de ácidos graxos, estes elicitadores desencadeiam respostas diretas bem como respostas indiretas, ou seja, induz a produção de voláteis nas plantas (SPITELLER; BOLAND, 2003).

Figura 2 – Estrutura molecular da volicitina.



Fonte: Wu e Baldwin, 2010.

Abaixo a tabela adaptada de Hilker e Meiners (2010) apresentando os elicitadores de cada fase do ataque do herbívoro e a resposta da planta.

Tabela 1 – Mecanismo de resposta da planta em função de elicitadores.

Elicitor	Resposta da Planta
Toque	
1 – Pressão	1 - Estiramento canais iônicos na membrana celular seguida de uma rápida alteração na concentração de Ca ⁺⁺ no citosol.
2 – Arranhões nas folhas causados pelo tarso	2 – Aumento das concentrações de GABA nas folhas
Ovoposição	
1 – Bruchinas liberadas durante a ovoposição	1 – Crescimento de neoplasias e mudança na transcrição de vários genes
2 – Cianeto de Benzila lançado com ovos <i>Pieris brassicae</i>	2 – Alteração na superfície foliar permitindo que parasitoides busquem os ovos do herbívoro.
3 – Secreção protéica dos ovos liberadas pelo oviduto de vespas e besouros	3 – Redução da fotossíntese, mudanças na transcrição de terpeno sintases consequentemente emissão de voláteis de defesa.
Alimentação	
1 – Ácidos graxos-aminoácidos conjugados presentes no regurgito principalmente de lepidópteros	1 - Produção de voláteis que atraem inimigos naturais das larvas; despolarização de membrana, influxo de Ca ⁺⁺ desencadeando produção de ácido jasmônico, produção de compostos de defesa e biossíntese de fitormônios.
2 – Caeliferinas presentes no regurgito de gafanhotos	2 – Produção de voláteis específicos
3 – Inseptinas presentes no regurgito de lepidópteros	3 – Aumento de fitormônios relacionados com a defesa e produção de voláteis.
4 – B-glicosidase presente no regurgito <i>Pieris brassicae</i>	4 – Mudanças nos voláteis para atração dos predadores do herbívoro

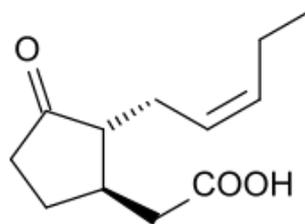
Fonte: Hilker e Meiners, 2010.

O toque do inseto na planta desencadeia respostas, pois o caminhar sobre as folhas ativa-as mecanicamente, por estiramento, canais iônicos na membrana celular seguida de uma rápida alteração na concentração de Ca⁺⁺ no citosol. Tais concentrações elevadas provocam a transdução de sinal adicional na planta induzindo genes envolvidos na defesa ou no crescimento (BRAAM, 2005)

As alterações no Ca⁺⁺ intracelular são traduzidas através de várias proteínas de sensor de Ca⁺⁺ de modo particular as proteínas quinases cálcio-dependentes (CDPKs). Estas são responsáveis pela fosforilação de NADPH-oxidase (de um modo dependente de Ca⁺⁺), o que por sua vez leva a produção de substâncias como O₂⁻, H₂O₂, ↑O₂ e OH⁻, coletivamente denominados de espécies reativas de oxigênio (EROs). A produção de EROs é uma parte essencial da resposta ao estresse da planta e sua função biológica tem sido muito bem reconhecida em interações planta-patógeno. Vários estudos têm revelado que EROS também estão envolvidos em respostas induzidas por herbivoria (BALDWIN, 1990).

A oxidação de proteínas pelas EROs ativa fatores de transcrição EROs-responsivos desencadeando a biossíntese de ácido jasmônico (AJ) (Figura 3). O papel fundamental do AJ no desenvolvimento das plantas está relacionado a resistência e a estresses bióticos. Muitos estudos demonstraram que AJ é o mais importante hormônio que controla a defesa da planta contra herbívoros. A diminuição drástica da resistência foi observada em plantas com deficiência na biossíntese ou a percepção de AJ (BALDWIN, 2010).

Figura 3 – Estrutura molecular do ácido Jasmônico.

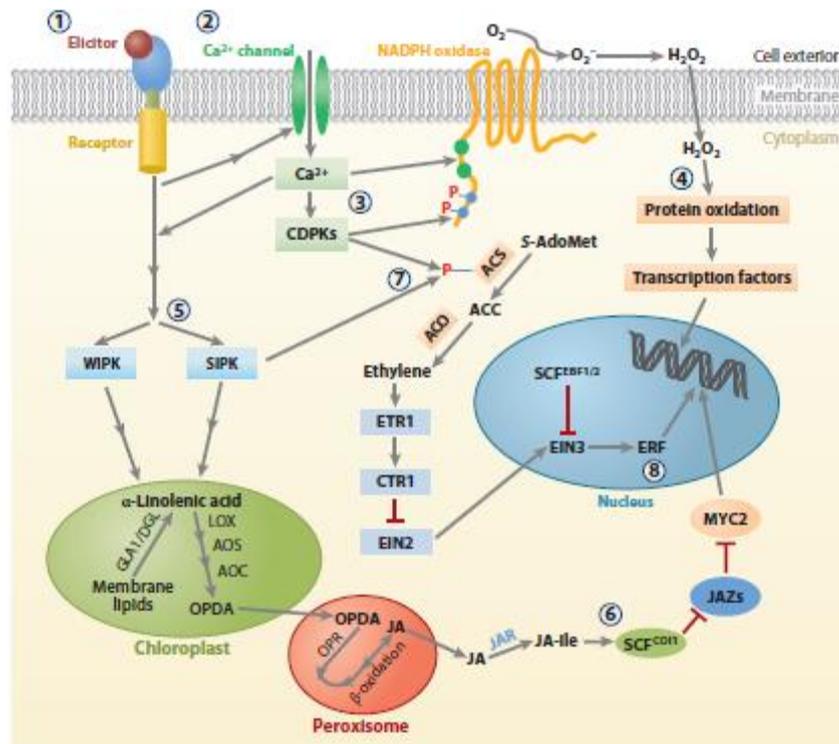


Fonte: Baldwin, 201

O AJ e seus metabólitos elicitam, após a herbivoria, a expressão de genes relacionados à defesa e promovem grandes alterações no mecanismo gênico da planta, o que ocorre paralelamente à repressão do seu desenvolvimento e crescimento. A sinalização química durante o mecanismo de resposta induzida das plantas é em grande parte mediada pelo fitormônio ácido jasmônico (AJ). A herbivoria pode primeiramente elicitar um acúmulo rápido e momentâneo de AJ, geralmente nas folhas.

Como sequência à cascata de reações presentes nesse processo, as plantas acumulam compostos defensivos produzidos, (não somente em folhas danificadas por herbívoros, mas também em folhas intactas). Claramente, um sinal se movimenta para outras partes da planta e transmite um alerta de herbivoria. A figura abaixo resume os eventos de sinalização no decorrer de todo o processo de resposta molecular durante a herbivoria.

Figura 4 – Eventos da sinalização no processo de resposta molecular à herbivoria.



Fonte: Wu e Baldwin, 2010

Notas: Passo 1: Potenciadores derivados do herbívoro são percebidos por receptores nas membranas plasmáticas. Passo 2: Ativação de canais de Ca^{++} . Passo 3: A ligação de Ca^{++} e fosforilação de NADPH-oxidase pela CDPKs levando a produção de EROS. Passo 4: Oxidação de proteínas por espécies reativas de oxigênio (EROS) Passo 5: Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) também são ativadas rapidamente e desencadeiam a biossíntese de AJ. Passo 7: Aumentar da produção de etileno. Passo 8: A produção elevada de etileno leva ao aumento da atividade de etileno-responsivos. Estes eventos de sinalização precoces são gradualmente convertidos para a acumulação de metabólitos que funcionam como defensivos

O mecanismo de defesa induzido nas plantas biologicamente construído através da seleção natural proposta por Darwin em 1859, com a finalidade de economizar energia, será utilizado pela planta apenas na presença do patógeno ou herbívoro (CARVALHO, 2000).

A indução de resistência de plantas quando colocada no contexto de proteção é vista como um importante método alternativo no controle de pragas e doenças que acometem diferentes tipos cultivares. Para que sejam encontrados os elementos reguladores de uma planta, os quais permitem que ela se adapte aos estresses bióticos de seus habitats, é fundamental investigar a diversidade genética associada às diversas formas de resistência de plantas a insetos (CARVALHO, 2000; WU; BALDWIN, 2010).

Ferramentas genômicas tais como microarranjos, sequenciamento para análise de transcritos e o desenvolvimento da proteômica à base de espectrometria de massas facilitam a compreensão da defesa da planta em um nível molecular (WU; BALDWIN, 2010).

3.8.1 Voláteis e não voláteis como metabólitos secundários na resposta induzida por herbivoria

Plantas defendem-se indiretamente do ataque dos insetos herbívoros emitindo uma mistura de compostos voláteis e não-voláteis que alteram as interações entre elas e seu ambiente. A composição e emissão desses produtos variam de acordo com os diferentes estágios de vida das plantas, localização, grau, tempo e tipo da injúria (ZHANG, 2010).

A atração de insetos para plantas e outros organismos envolve a detecção de semioquímicos específicos que apresentam-se como substâncias do metabolismo secundário do vegetal e relacionam-se à sua defesa (PRICE, 1984). Esses semioquímicos podem atuar como alomônios, cairomônios ou sinomônios, dependendo do contexto ecológico.

Alguns dos compostos voláteis produzidos funcionam como repelentes de pragas, além de atrair predadores e parasitoides. Por exemplo, compostos sintetizados pelas vias dos isoprenóides e da lipoxigenase, tais como o monoterpene (E)-ocimeno e o sesquiterpene (-)-germacreno-D produzidos em plantas que causam repelência aos herbívoros (PICKETT et al., 2006).

Um outro composto adicional muitas vezes emitido após danos herbívoros é o terpeno β -cariofileno. Os metabólitos secundários da classe dos terpenos são derivados de uma unidade de isopentenil pirofosfato (IPP) e desempenham inúmeras funções importantes na planta a exemplo de atração de polinizadores, defesa contra danos, sinalização para outras plantas, repelente de herbívoros, alelopáticos e reguladores de crescimento (KÖLNER et al., 2008).

O β -cariofileno foi encontrado em resposta ao dano herbívoro em vários parentes silvestres de milho (GOUINGUENÉ et al., 2001) e em linhagens de milho cultivadas a partir de programas de melhoramento genético da Europa. Abaixo do solo, o β -cariofileno foi encontrado como um sinal importante na atração de inimigos

naturais, especificamente nematoides entomopatogênicos, para outro herbívoro de milho, a praga *Diabrotica virgifera virgifera*. (RASMANN et al., 2005).

Outro exemplo bem estudado desse fato é também encontrado no milho em que o dano foliar provocado por larvas de lepidópteros faz com que o vegetal libere uma mistura volátil contendo indol, produtos da via da lipoxigenase, uma variedade de monoterpenos e olefinas sesquiterpênicas. Esses voláteis atraem vespas parasitas como *Cotesia marginiventris* para o local da lesão, onde eles ovipositam nas larvas de lepidópteros (TURLINGS, 2005)

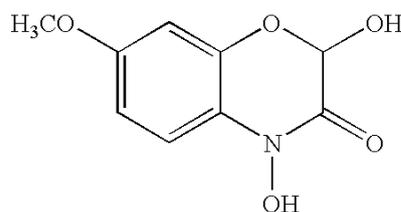
Nos últimos anos, grandes avanços foram registrados na compreensão das vias biossintéticas de voláteis emitidos por plantas e os mecanismos moleculares que regulam a sua formação. Este progresso deve-se tanto aos avanços gerais de técnicas bioquímicas e moleculares e para o desenvolvimento de novos instrumentos para a recolha e análise de substâncias voláteis.

Dentro do mecanismo de defesa do vegetal, os compostos produzidos por plantas para este fim são os ácidos hidroxâmicos e seus derivados, uma classe de metabólitos secundários de grande interesse, com a fórmula geral R - CO - NHOH e R-CO - NR'OH. Os ácidos hidroxâmicos são encontrados em exsudatos de raízes, bem como em tecidos não diferenciados, tais como células do meristema (NIEMEYER, 2009).

Os compostos cíclicos pertencentes a este grupo de ácidos também foram associados com a desintoxicação de herbicidas de triazina (HAMILTON, 1964), inibição de reguladores de crescimento de plantas (NIEMEYER, 2009).

A DIMBOA (2,4-dihidróxi-7metóxi-1,4-benzoxazin-3-ono) (figura 5) o mais abundante dos ácidos hidroxâmicos, é um composto intracelular, não volátil, e funciona como pesticida e inseticida e pode até ter propriedades alelopáticas (JONCZYK, 2008).

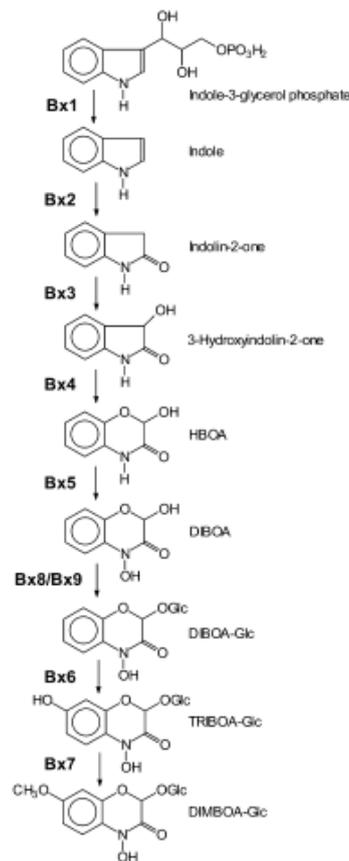
Figura 5 – Estrutura molecular da DIMBOA.



Fonte: Niemeyer, 2009.

Sua biossíntese (ver figura 6 abaixo) inicia-se com o metabolismo do *Indol-3-glicerol-fosfato*, um precursor na biossíntese do triptofano. O primeiro passo envolve a enzima *Indol-glicerol-fosfato-liase* no cloroplasto produzindo *indol*¹. Depois disso, quatro sucessivos passos de oxidação ocorrem no retículo endoplasmático (RE) através de *citocromo-P450-monooxigenases* levando ao mais simples dos ácidos hidroxâmicos, DIBOA. A enzima citosólica UDP-glucosil-transferases produz DIMBOA-glc que é oxidada por *2-oxoglutarato-dependente-dioxegnanase* presente no citosol, seguida de uma metilação por uma metiltransferase. Sobre danos ao tecido, glucosidases específicas presentes em plastídeos entram em contato com glucosídeos e as agliconas bioativas são produzidas (FALCO et al., 2001).

Figura 6 – Biossíntese do Ácido Hidroxâmico DIMBOA. Enzimas produzidas pelos genes *Bx* (*Bx1* – *Bx9*) realizam as transformações do Indol até o produtor final DIMBOA



Fonte: Niemeyer, 2009.

¹ Composto orgânico aromático heterocíclico com estrutura que consiste em um anel benzênico acoplado de um anel pinol. Pode ser produzido por bactérias como produto da degradação do triptofano (DELKER et al, 2006)

A atividade de DIMBOA como um inibidor de transferência de energia poderia explicar alguma da sua atividade inibidora em uma vasta gama de microrganismos. Experimentos preliminares com preparações mitocondriais mostram que estas organelas têm cerca de metade da sensibilidade de cloroplastos para DIMBOA (BIRKETT et al, 2000).

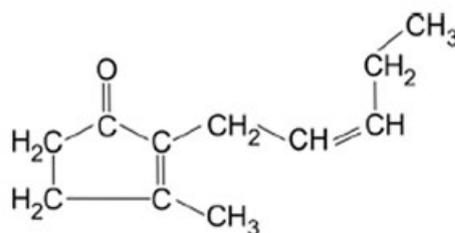
O projeto transcriptoma da cana-de-açúcar (SUCEST) identificou inúmeros genes ortólogos envolvidos na resposta ao dano do inseto, entre eles, gene semelhante ao *Bx1* do milho que serve como ponto de início para o metabólito secundário de defesa DIMBOA, sugerindo um mecanismo de resposta semelhante na cana-de-açúcar (FALCO et al., 2001).

Segundo Joshi & Viraktamath (2004) após tentativas na identificação de fontes de resistências em cana-de-açúcar contra afídeos os ácidos hidroxâmicos DIBOA e DIMBOA foram detectados.

Além da indução através da herbivoria, os mecanismos de defesa das plantas podem ser ativados através da aplicação exógena de fitormônios como jasmonato de metila, cis-jasmona ou ácido jasmônico (BIRKETT et al, 2000; PICKET et al., 2007). Moraes et al. (2008), observaram que plantas de trigo (*Triticum spp.*) tratadas com cis-jasmona induzem uma maior produção de ácidos hidroxâmicos, principalmente a DIMBOA.

O composto cis-jasmona (CJ) (Figura 7), produzido naturalmente pelas plantas (ROSE & TURLINSON, 2004), foi descoberto como um elicitador de defesa da planta inicialmente com favas, *Vicia faba L* (Fabaceae), quando então o tratamento CJ induziu a produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) de defesa que atraiu parasitóides de afídeos benéficos. (BIRKETT et al., 2000).

Figura 7: Estrutura molecular da cis-jasmona



Fonte: Picket et al., 2007

A liberação de CJ tem sido relatada para várias espécies de plantas. Folhas de algodão danificadas por *Spodoptera exigua*. Folhas de *Nicotiana sp.* emitiram CJ

quando em contato com secreções orais de larvas de *Manduca sexta* (LOU & BALDWIN, 2003) e para folhas de milho expostas a secreções de *Spodoptera littoralis* também emitiram CJ (DEGEN et al, 2004).

A CJ está envolvida na via do Ácido Jasmônico (AJ) sugerindo, dessa forma, que é um produto metabólico de AJ e representa um dissipador para esta através de uma etapa adicional de descarboxilação (KOCH; BANDEMER & BOLAND, 1997). No entanto, Picket et al. (2007) propuseram uma via alternativa na síntese de CJ, na qual é mediada pela conversão de ácido 12-oxofitodienoico (OPDA), por meio de uma isomerase, em iso-OPDA seguida por uma β -oxidação e descarboxilação espontânea para gerar CJ.

3.9 Interação Tritrófica e Controle Biológico

As relações tróficas entre os organismos de uma mesma comunidade, na natureza, geralmente, compõem uma extensa teia de interações que se estendem por vários níveis tróficos. Um bom modelo desse enredamento são as relações tróficas entre plantas, insetos herbívoros e seus parasitóides (CAVALCANTI, 2000). Essas interações tritróficas ocorrem dentro de um ambiente físico e químico espacialmente diversificado e dinâmico e incluem todas as várias interações agressivas e defensivas entre os níveis tróficos (incluindo as relações morfológicas, fisiológicas e comportamentais) (ZHANG, 2010).

Analisar as cadeias tróficas, constitui-se em um trabalho complexo. Em pesquisas entomológicas o que se observa é o estudo de três pontos dessa teia, geralmente com planta (produtor primário), inseto filófago (consumidor primário) e a influência dessa interação no predador ou parasitóide (consumidor secundário). Essas interações entre as plantas, pragas e seus inimigos naturais permeia diversos estudos, a fim de examinar possibilidades de integração entre diferentes táticas de controle de pragas (CAVALCANTI, 2000; MORAES et al, 2008; MOONEY, 2012).

O primeiro caso de sucesso no uso da interação tritrófica no controle biológico foi obtido com a introdução da *Rodolia cardinalis* levada da Austrália para os Estados Unidos para controle do pulgão branco *Icerya purchasi* em 1888, obtendo êxito após dois anos. A partir daí houve um grande avanço na área de controle biológico totalizando entre 1890 e 1975, 176 casos de sucesso parcial ou total através do uso de parasitas das pragas de plantações (PARRA, 2002).

A alternativa de se utilizar insetos entomófagos, especificamente o parasitoide da *D. saccharalis*, consequência da sua grande viabilidade pelo baixo custo de produção e fácil manipulação. Dessa forma, o endoparasitoide *Cotesia flavipes* tem sido alvo de muitos estudos diante da sua interação tritrófica com a cana de açúcar e a *D. saccharalis* e sua aplicação no controle biológico para essa praga constitui-se como um dos maiores programas de controle biológico do mundo (MORAES et al, 2008; MOONEY, 2012)

No Brasil, o aperfeiçoamento do uso da *C. flavipes* como controle biológico iniciou-se em 1971 apresentando resultados satisfatórios apenas sete anos mais tarde, em 1978, quando foi responsável pela diminuição em até quatro vezes, da intensidade de infestação por *D. saccharalis* (1979 – 8 a 10% de infestação nas plantações para 2,4% em 1980) (PINTO, 2006a; BOTELHO; MACEDO, 2002). Atualmente o emprego da *C. flavipes* continua sendo utilizada com sucesso como controle biológico nas plantações de cana-de-açúcar do Brasil (SIMÕES et al, 2012).

A *C. flavipes* é caracterizada por seu desenvolvimento holometabólico e ciclo de vida de aproximadamente 20 dias. Sua reprodução sexuada consiste na deposição dos ovos por meio da fêmea quando em contato com a lagarta de *D. saccharalis* (MAHMOUD, 2011; VOLPE, 2009). Por ser um parasitoide, só pode completar seu ciclo de vida associada a seu hospedeiro e, no Brasil, sua especificidade é por lagartas de *D. saccharalis* (PINTO et al., 2006b).

3.10 Perspectivas do uso de análises Proteômicas

As tentativas de melhoramento genético de plantas dependem principalmente do conhecimento da sua biologia durante determinada situação a qual se quer modificar. Sejam por meios convencionais ou moleculares, as melhorias serão conquistadas conhecendo principalmente quais os elementos biológicos que participam dessas mudanças. A este respeito, o conjunto de estratégias de análises somadas ao estudo do proteoma entregará inúmeros dados sobre proteínas e metabólitos associados fornecendo informações sobre desenvolvimento, respostas genéticas a diferentes tipos de perturbações, formas de defesa a agressões (WALT et al, 2010).

Mudanças no transcriptoma não significam exatamente que haverá alterações no proteoma, que será o fenótipo de determinada característica. Sendo

assim pode-se afirmar que o fenótipo para o aumento da resistência ainda é desconhecido, em grande parte porque as mudanças induzidas pelo ataque de herbívoros continuam com poucos dados. Além disso a complexidade num dado microambiente celular, interações entre proteínas e moléculas podem determinar a regulação ou expressão de genes, estabilidade de RNAm e até de proteínas específicas (GIRI et al, 2006).

O papel das proteínas vegetais envolvidas na defesa contra herbívoros mostra uma maior quantidade de proteínas envolvidas que o que foi pensando antes do desenvolvimento de técnicas de análise de perfis protéicos (FELTON, 2005). Algumas das proteínas já identificadas apresentam características de defesa como por exemplo a estratégia de dificultar a digestão do inseto, atrapalhando assim o sistema digestivo e a sua nutrição como a proteína inibidora de protease (SALZMAN et al, 2008).

Este é o desafio dos estudos em proteômica, oferecendo perspectivas de potenciais aplicações dessa tecnologia, complementando outras também utilizadas na investigação de elementos importantes da fisiologia vegetal da cana-de-açúcar para elucidação de diversas questões como a resposta ao diferentes tipos de estresses, vias de regulação, acúmulo de sacarose e defesa ao ataque de insetos herbívoros (WALT et al., 2010).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Etapas de execução do trabalho

O estudo visando as respostas da cana-de-açúcar à herbivoria por *D. saccharalis* envolveu técnicas de cromatografia gasosa e líquida, análise da expressão gênica e proteômica. O desenvolvimento experimental foi organizado em 7 (sete) etapas (ver tabela 2), tendo sido as etapas 6 (seis) e 7 (sete) realizadas apenas no Brasil (Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais - UFAL) enquanto as etapas 4 e 5 apenas na Inglaterra (Rothamsted Research – UK) e as demais em ambos os países.

Tabela 2 – Etapas de execução do trabalho experimental.

	Etapa	Procedimento desenvolvido
I N G L A T E R R A	1	Preparo das plantas (cana-de-açúcar) a serem utilizadas nos experimentos.
	2	Experimento de herbivoria em casa de vegetação.
	3	Identificação do perfil de VOCs e quantificação de β -cariofileno emitidos durante a herbivoria.
I N G L A T E R R A	4	Detecção e quantificação do ácido hidroxâmico DIMBOA durante a herbivoria;
	5	Análise de expressão gênica do gene putativo da terpeno sintase de cana-de-açúcar e dos genes putativos <i>Bx</i> da cana-de-açúcar
B R A S I L	6	Análise do perfil protéico e identificação das proteínas diferencialmente expressas na herbivoria por <i>Diatrea saccharalis</i>
	7	Bioensaio com o parasitóide <i>Cotesia flavipes</i> com extrato de herbivoria

Fonte: SILVA FILHO, BF, 2013.

4.2 Material Vegetal

Tanto as plantas de cana-de-açúcar utilizadas no Brasil (variedade SP79-1011) quanto as utilizadas na Inglaterra (*Saccharum* spp. variedade sul africana) foram multiplicadas através da técnica de propagação vegetativa de entrenós e cultivadas em vasos de 1L por 30-40 dias em casa de vegetação sob condições controladas. No Brasil a umidade era ambiente e não houve a necessidade de suplementação com luz artificial. Já na Inglaterra a casa de vegetação apresentava as seguintes condições: fotoperíodo de 12 horas, temperatura (18°C/dia e 30°C/noite) e umidade controladas (65%).

As estruturas físicas utilizadas no Brasil foram as da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizada no município de Rio Largo, Estado de Alagoas, enquanto que as plantas da Inglaterra foram cultivadas na casa de vegetação do Rothamsted Research localizado em West Common, Harpenden, AL5o 2JQ.

4.3 *Diatraea saccharalis* e *Cotesia flavipes*

Os insetos foram adquiridos junto a Usina Triunfo Agro-Industrial LTDA, situada na cidade de Boca da Mata, Alagoas. Para os experimentos de elicitación foram utilizadas lagartas com 10 dias (segundo instar) mantidas com dieta artificial em câmara climática e fotoperíodo controlado. Os ensaios comportamentais com *Cotesia flavipes* foram realizados exclusivamente com fêmeas de idades entre 24 e 48 horas.

4.3.1 Coleta da secreção oral de *Diatraea saccharalis* para ensaios de herbivoria simulada

O regurgito foi coletado em lagartas de *D. saccharalis* de segundo instar, que foram mantidas sob dieta de cana-de-açúcar por 48 horas antes da coleta. A coleta do regurgito foi efetuada com o auxílio de pipetas micrométricas e pressionando-se levemente o dorso das lagartas (Figura 8).

Figura 8 – Coleta de secreção oral de *Diatrea saccharalis* com pipeta micrométrica



Fonte: SILVA FILHO, BF, 2012. Créditos da foto: Jaim Simões Oliveira.

Nota: Em média, coleta-se entre 2,5 a 4 μ L de secreção oral por lagarta.

Imediatamente após a coleta, os regurgitos foram armazenados em banho de gelo. A cada $\pm 50\mu$ L coletados, o *pool* de regurgito foi aquecido a 90°C por 10 minutos, com o objetivo de inativar as enzimas hidrolíticas, seguido da adição de tampão fosfato de sódio pH 8,0 a fim de obter-se uma concentração final de 5 mmol. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 2000 g por 15 minutos e a fração solúvel armazenada em tubos de centrífuga de 1,5mL à -80°C.

4.4 Aplicação de Cis-Jamona

As plantas de cana-de-açúcar submetidas ao tratamento com cis-jasmona receberam spray de cis-jasmona (25 μ L de cis-jasmona e Nonil Fenol Etoxilado em 100mL de água deionizada) por aplicação hidráulica a 35 cm de distância.

4.5 Preparo dos ensaios de Herbivoria

4.5.1 Herbivoria Simulada

Três folhas de cada planta foram selecionadas e em cada uma delas foram feitos danos mecânicos com o auxílio de uma “roda de aço dentada” de diâmetro de 4cm. Logo em seguida, espalhou-se 6 μ L de regurgito sob os danos produzidos em cada folha e sob região do colmo próximo as folhas, totalizando 6 μ L por planta. Como controle, em outras plantas foi aplicado no lugar do regurgito o tampão fosfato de sódio 5mmol, pH 8,0.

4.5.2 Herbivoria Real

Seis lagartas de segundo instar de *D. saccharalis*, mantidas sem dieta por 48 horas, foram colocadas em plantas de cana-de-açúcar na região da base das folhas próximo aos entrenós até o fim de cada tempo analisado.

4.6 Preparo dos sistemas de aeração

Os sistemas de aeração foram preparados utilizando-se sacos plásticos para uso em microondas da marca *Multi-Purpose Cooking Bags*®, de volume aproximado de 4 L, tamanho aproximado de 25 x 38 cm e temperatura máxima suportada de 200° C (Sainsbury's Supermarkets Ltd., London, UK) (JONES; POPPY, 2006).

Para a coleta dos voláteis foram preparados tubos (*traps*) utilizando o polímero adsorvente tipo *PoraPak* (Brasil) e *Tenax* (Inglaterra). Ambos foram ativados (50µg para cada tubo) por lavagem com 1 mL de éter dietílico, seguido de uma lavagem com 1mL de hexano bidestilado e incubados à 130° C sob fluxo de gás nitrogênio por um período de 2 horas. Após esse período, apenas nos experimentos realizados com *Porapack*, os tubos foram eluídos com 200µL de hexano bidestilado.

Após a coleta dos COVs, os tubos foram selados a vácuo e congelados à -20°C (*Tenax*) e os extratos -80°C (*Porapak*) até o momento da análise. Um padrão com (E)- β -cariofileno (*SIGMA-ALDRICH*) foi utilizado para confirmação da presença através do tempo de retenção na coluna e posterior quantificação.

Em ambos os casos o ar do sistema de aeração passou por um filtro de carvão ativado para remover possíveis impurezas presentes no ambiente do experimento.

4.7 Detecção e quantificação de COVs emitidos

Após injetadas, os cromatogramas das amostras foram analisados e os possíveis compostos identificados usando-se as bibliotecas de espectro de massa NIST (National Institute of Standards and Technology) e WILEY. Um limite mínimo de 70% de similaridade entre os espectros de massa foi utilizado para a identificação mais provável dos compostos. Para análises estatísticas COVs significativos encontrados, especialmente o β -cariofileno, foram utilizados os testes de Postos com Sinais de Wilcoxon de diferenças entre as médias dos tratamentos. O programa

utilizado foi o SAEG (Sistema para análises estatísticas versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes UFV – Viçosa, 2007) e o nível de significância estabelecido de $p=0.001$.

As amostras de *Porapack* foram analisadas no sistema GC/MS 2010 Plus (*SHIMADZU*), coluna Rtx-1 (60m, d. i. 0,25mm) nas seguintes condições: modo splitless, temperatura de injeção de 250° C, volume de amostra injetado 4 μ L, temperatura inicial de 50° C por 5 minutos, gradiente 8°C/min até atingir a temperatura final 300°C, que foi mantida por mais 10 minutos. Para quantificação do β -cariofileno presentes nas amostras de VOCs coletadas, uma curva de calibração foi preparada com diferentes concentrações do padrão β -cariofileno diluídas em hexano bidestilado. Cada padrão de concentração foi injetado três vezes no GC/MS e as médias das áreas dos picos correspondentes ao β -cariofileno foram plotadas em um gráfico versus as concentrações respectivas.

Os dados foram ajustados por regressão não-linear a uma equação da reta e o coeficiente angular e o ponto de intersecção no eixo y foram estimados, sendo obtido um coeficiente de correlação linear (r^2). Estes parâmetros foram utilizados juntamente com a equação da reta para calcular a quantidade de β -cariofileno presente no pool de amostras oriundas da herbivoria, bem como no pool de amostras Controle.

As amostras dos COVs em *Tenax* foram analisadas em GC-FID Hewlett - Packard 6890 equipado com um injetor de coluna de sílica não polar HP - 1 (J & W Scientific, 50 m60.32 mm id, 0,52 milímetro) a espessura da película). A temperatura do forno foi mantida a 30°C para 1 min, e programado em 5°C min⁻¹ até 150°C, então 10°C min⁻¹ para 230°C e mantido por 20 min transportado por hidrogênio. Para confirmação do β -cariofileno foi realizado uma corrida no GC acoplado ao espectrômetro de massas. A quantificação foi realizada da mesma forma que a do experimento no Brasil.

4.8 Bioensaio com o parasitóide *Cotesia flavipes*

Para avaliação da reposta de *C. flavipes* por β -cariofileno foram realizados testes comportamentais de atração com fêmeas do parasitóide *Cotesia flavipes*, utilizando olfatômetro de quatro braços com escolha (PETTERSON, 1970). O olfatômetro foi iluminado com uma lâmpada difusa uniforme à uma temperatura de 25 ± 2 °C. A parte inferior do aparato foi forrada com papel filtro (Whatman N° 1), e o

ar foi succionado a uma razão de 400 mL/min. dos quatro braços em direção ao centro do aparelho.

Os insetos foram introduzidos na câmara pelo orifício central, e o tempo gasto e o número de entradas em cada braço foram registrados usando o software OLFA durante um período de 16 min. O aparelho foi girado a cada 4 minutos para eliminar o viés direcional.

Alíquotas (10 μ L) das amostras foram aplicadas a uma tira de papel filtro, e o solvente era deixado evaporar-se durante 30s. O papel filtro era então colocado no final do braço do lado tratado. Os três braços controle foram igualmente tratadas com 10 μ L de hexano em papel de filtro. O experimento foi repetido 32 vezes e os resultados analisados pelo teste do Qui-quadrado.

A média de tempo gasto nos braços do tratamento foi comparada com a média de tempo gasto nos braços dos controles. Foram testados os extratos de Herbivoria, Controle e o extrato Controle adicionado de 0,3ng/ μ L de β -cariofileno sintético (C 0,3).

4.9 Detecção e quantificação do Ácido Hidroxâmico DIMBOA durante a herbivoria

Após o tratamento e término da coleta de voláteis foi coletado um fragmento de cada planta na área correspondente ao ataque das lagartas de *D. saccharalis* nas plantas submetidas a herbivoria real. Um fragmento de mesmo tamanho foi retirado dos demais grupos. A área coletada da planta variou entre 2 e 3 cm da parte aérea e as raízes foram utilizadas na íntegra.

O protocolo consistiu em macerar o fragmento retirado da planta em nitrogênio líquido e alíquotas de 0.5g foram colocadas em tubo de centrifuga de 1,5 mL e armazenadas em nitrogênio líquido. Em seguida, para melhorar a qualidade do material macerado foram adicionadas duas esferas de aço e os tubos foram agitados no equipamento *TissueLyser* (Qiagen) por 5 minutos com frequência de 30Hz

Após a pulverização, 1mL de solução de metanol:ácido acético (98:2) foi adicionado aos tubos e estes submetidos por 10 minutos.

Os tubos foram centrifugados a 13.000rpm por 5 minutos e o sobrenadante retirado. O líquido sobrenadante foi colocado em *vial* apropriado para HPLC e

concentrado com fluxo constante de nitrogênio. Cada *vial* recebeu o sobrenadante de dois tubos (aproximadamente 2mL) correspondendo a 1g de tecido fresco

A análise dos ácidos hidroxâmicos dos extratos foi feita por HPLC, utilizando Cromatógrafo Líquido, marca Shimadzu, modelo LC-10A, dotado de detector Photo Diode Array (PDA) e UV/VIS, utilizando coluna analítica C-18 de fase reversa.

4.10 Análise de expressão gênica dos genes envolvidos na resposta a herbivoria

4.10.1 Construção dos primers para o gene putativo da terpeno sintase em cana-de-açúcar

Para encontrar o gene da terpeno sintase em cana de açúcar foi utilizada a sequência de *Sorghum bicolor* SbTPS4 (Sb07g005130) como sequência de referência para através do BLAST encontrar sequências de cana-de-açúcar depositadas no TIGR Plant Transcript Assemblies. Através do software DNASTAR LaserGene 8 o contig TPS putativo para cana-de-açúcar foi montado. Através do software Primer3 foram construídos primers (TpsA 5' CAGCTGCTTGCTGATGTTGT 3' ; TpsB 5' ATTGGAGGTGGCTCTTGTTG 3').

4.10.2 Construção dos primers para genes putativos Bx em cana-de-açúcar

Foram utilizadas sequências de genes Bx (genes envolvidos na biossíntese dos ácidos hidroxâmicos benzoxazinoides) de *Zea mays*, *Triticum aestivum*, *Sorghum bicolor*, *Oryza sativa*, *Hordeum lechleri*, *Hordeum vulgare* obtidas no GenBank. As sequências foram alinhadas pelo software online *Clustal W* e o arquivo do alinhamento analisado no software BioEdit 7.1.5.0. A análise mostrou as regiões conservadas de cada um dos genes e primers, que variavam entre 15 e 22 pares de base, foram sintetizados correspondendo a estas regiões.

A maioria dos primers possui mais de uma sequência devido a variações que existiam dentro das regiões conservadas. Os primers para terpeno sintase foram desenhados após o alinhamento apenas de sequências de *Sorghum bicolor*.

4.10.3 Extração de RNA Total e preparo do cDNA total

De cada amostra (de parte aérea e raiz) foi retirado 1g para extração de RNA total utilizando o kit PureLink RNA (Ambion/Applied Biosystems) seguindo o protocolo do fabricante. O RNA foi convertido em cDNA com o kit High Capacity cDNA kit (Applied Biosystems) seguindo o protocolo do fabricante.

4.10.4 PCR e corte das bandas em gel de agarose 2% para seqüenciamento

O cDNA foi amplificado com kit ReddyMix PCR Master Mix 2X w/ 1.5 mM MgCl₂ (Thermo Scientific) nas seguintes condições: 94°C por 30 segundos para desnaturação, 60°C por 30 segundos de anelamento e 72°C por 30 segundos extensão em 40 ciclos. Os fragmentos foram visualizados em gel de agarose 2% e as bandas recortadas, purificadas do gel e submetidas a seqüenciamento. Cada banda foi tratada com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System e enviado para seqüenciamento pela empresa Eurofins.

4.10.5 Construção dos primers específicos para os genes putativos da terpeno sintase e *Bx* de cana-de-açúcar

Após o seqüenciamento dos fragmentos, foram construídos primers específicos no software Primer3 para uso na análise por qPCR.

4.10.6 Quantificação relativa (qPCR)

Após o seqüenciamento e confirmação das sequências através do BLAST, *primers* específicos para TPS putativo de cana-de-açúcar foram construídos no programa Primer3. Para quantificação relativa foi utilizado 7900HT Fast Real-Time (*Applied Biosystems*) usando Power SYBR Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems*) em placas de 96 poços nas condições de amplificação de 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. A quantificação relativa foi baseada no método $2^{\Delta\Delta CT}$ usando *calibrator references*. O *threshold cycle* (Ct) foi definido como o número de ciclo fracionado em que a emissão de fluorescência excede o limite fixo de 0,2. Em todos os ensaios de qPCR foi utilizado como gene endógeno o GAPDH através de primers específicos. O uso desse gene foi descrito por Medeiros (2012) com número de acesso CA301409.

4.11 Análise do perfil protéico e identificação das proteínas diferencialmente expressas

4.11.1 Extração e quantificação das proteínas

Para extração das proteínas de folhas de cana-de-açúcar foi utilizado modificação do método de extração fenólica descrito por Wang *et al.* (2003). Em torno de 2g de tecido foliar de cana-de-açúcar foram utilizados para cada extração, os quais foram macerados com nitrogênio líquido em almofariz. A quantificação de proteínas foi feita segundo método descrito por Bradford (1976) utilizando albumina bovina (BSA) como padrão.

Para análise do perfil proteômico e identificação de proteínas diferencialmente expressas durante a herbivoria em cana-de-açúcar foram utilizados 2 grupos: Grupo Herbivoria simulada cujo seu controle eram plantas submetidas ao dano + tampão fosfato de sódio 5mmol, pH 8,0, e Grupo submetido a Herbivoria Real tendo como controle plantas não tratadas. Cada grupo foi formado por 5 plantas e o tempo de exposição aos tratamentos de 48 horas. Foram aceitas para análise as proteínas que apresentaram expressão diferencial estatisticamente significativa ($p > 0,001$) em no mínimo 3 géis por amostra analisada, alterados durante os processos de herbivoria simulada e herbivoria real em relação aos controles.

4.11.2 Eletroforese bidimensional

4.11.2.1 Primeira dimensão – Focalização Isoelétrica

Os extratos protéicos foram primeiramente focalizadas (IEF), utilizando tiras comerciais de gel de poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado (IPG). Foram utilizadas fitas IPG de 13 cm com gradiente de pH imobilizado linear de 4-7.

As fitas IPG foram reidratadas por um período de 12 horas a 20°C em aparato para focalização isoeletrica (IPGphorIII, GE Healthcare) utilizando 250 µL de amostra com 120 µg de proteína em tampão (Uréia 7M, Tiureia 2M, Triton x-100, 10 mM de DTT, 0,5% IPG buffer, 125 µL tampão de reidratação e 0,005% m/v de azul de bromofenol). As condições de corrida utilizadas foram: temperatura de 20°C e amperagem de 50 µA por fita. A IEF ocorreu em quatro etapas de 500 V/h (V/h), 3500 V/h, 3500 V/h, até completar 18 kVh.

4.11.2.2 Segunda Dimensão

Para a segunda dimensão, as fitas IPG após separação por ponto isoeletrico foram lavadas em água destilada por duas vezes, mantidas por 15 minutos em solução de equilíbrio e redução (Tris-HCl 50mM (pH 6,8, Uréia 6M, Glicerol 30%, SDS 2%, Azul de Bromofenol 0,002% e 2% de DTT). Após equilíbrio a fita foi transferida e mantida por 15 minutos em uma solução de alquilação (Tris-HCl 50mM pH 6,8, Uréia 6M, Glicerol 30%, SDS 2%, Azul de Bromofenol 0,002% e 2,5% iodoacetamida). A segunda dimensão foi constituída de eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% em condições desnaturantes contendo Tris-HCl 0,375M pH 8,8, SDS 0,1%, persulfato de Amônio 0,05% e TEMED 0,034%. Depois de equilibradas, as fitas IPG foram colocadas sobre o gel da segunda dimensão e seladas com solução de agarose 0,5% (m/v) em tampão de corrida Tris-Glicina (Tris 0,025M, Glicina 0,192M, SDS 0,1%). A separação eletroforética foi realizada em cuba modelo SE600 Standard Dual Cooled Vertical United (Amersham GE Healthcare). A amperagem utilizada foi de 15 mA por 30 minutos seguido de 30mA por gel de acordo com o protocolo descrito por GE Healthcare. Durante as corridas foram utilizados opadrão de peso molecular 225 KDa a 12 KDa (Benchmark Protein Ladder™ – Invitrogen).

4.11.2.3 Coloração dos Géis

Os géis foram corados utilizando corante azul de comassie coloidal, conforme modificação do método descrito por Candiano *et al.*, (2004). Os géis foram tratados primeiramente em solução fixadora (Etanol 40% v/v e Ácido Acético 10% v/v) por 12 horas e solução de coloração (Ácido fosfórico 10% v/v, sulfato de amônio 15% m/v, metanol 17% v/v e azul de comassie coloidal G2500,1% m/v) até o aparecimento das bandas. O excesso do corante foi removido com água deionizada e os géis conservados em solução de ácido acético 1%.

4.11.2.4 Aquisição e processamento de imagens

A aquisição de imagens dos géis foi obtida através do programa Labscan (Amersham GE Healthcare). As análises de imagem processadas no software ImageMaster 2D platinum 7.0 (Amersham GE Healthcare). A detecção dos spots e

sua determinação de volume realizada de modo automático pelo imageMaster adotando os seguintes parâmetros: smooth = 3, área mínima = 5 e saliência = =250. As correções realizadas com adição ou remoção dos spots foram realizadas manualmente. Foram selecionados os spots diferencialmente expressos onde a abundância foi no mínimo 2 vezes maior ou menor, e houve diferença estatística significativa segundo o teste t ($p \leq 0,015$).

4.11.2.5 Identificação das Proteínas

O procedimento de identificação das proteínas foi realizado no Laboratório de Venenos e Toxinas Animais, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) – Brasil, sob a supervisão do Prof. Dr. Adriano Monteiro de Castro Pimenta.

4.11.2.6 Hidrólise

Após identificação dos *spots* das proteínas diferencialmente expressas, os spots foram excisados individualmente do gel, com auxílio de ponteiros de 1000 μ L, descorados com 3 lavagens sucessivas em acetonitrila e posteriormente tratados com tripsina (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Os peptídeos resultantes foram dessalinizados através de micropurificação em *PerfectPure™ C-18 tip* (Barkhausenweg, Hamburg, Germany), seguindo recomendações do fabricante.

4.11.2.7 Espectrometria de Massas

As análises de espectrometria de massas foram realizadas em Espectrofotômetro de Massa sistema *MALDI-TOF-TOF MS (Autoflex III Smartbeam, Bruker Daltonics, Handelsregister, Bremen, Germany)*. A amostra foi preparada utilizando 0,5 μ L dos peptídeos resultantes da hidrólise e 0,5 μ L de matriz em placa *MTP AnchorChip 800/384 (Bruker Daltonics)*. A matriz utilizada foi o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA). Os espectros de massa em *tandem (MS/MS)* foram obtidos no modo positivo, aquisição *linear*, *Laser repetition rate* a 50Hz, *Íon source voltage 1* a 20 KV, *Ion source voltage 2* a 19,3 KV, *Ion source lens voltage* 6,75 KV e *number of shots* de 200. Para a fragmentação dos peptídeos tripsinolizados no PMF (*Peptide mass fingerprinting*) foi empregado o método CID (*Collision induced dissociation*).

4.11.2.8 Processamento

Os resultados da espectrometria foram obtidos na forma da razão massa/carga para cada amostra, utilizando o programa *FlexControl* 3.0. As análises dos conjuntos de dados foram adquiridos com o auxílio dos programas *FlexControl* 3.0 e *Biotoools* 3.0 (software MASCOT). O equipamento foi calibrado com padrões externos (*Protein Calibration Standard I e IV* – Bruker Daltonics). O perfil de massas moleculares obtidos pós MS e MS/MS foi submetido à análise comparativa utilizando software MASCOT identificando as proteínas mais prováveis comparando com banco de dados *Swissprot* e NCBI.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio de herbivoria real e coleta dos COVs emitidos

Várias estratégias para entender os mecanismo da resposta da cana foram traçadas. Primeiramente um total de 22 plantas de cana-de-açúcar, em três experimentos independentes, com 35 a 40 dias de crescimento, foram utilizadas nos experimentos para a coleta dos COVs. Onze plantas não foram submetidas ao estresse biótico, formando o grupo Controle, enquanto que 11 plantas foram submetidas à herbivoria por *D. saccharalis*, sendo cada planta infestada com 6 larvas de 2° (segundo) ínstar. Os COVs foram coletados por 48 horas em ambos os grupos.

Os COVs foram identificados pela análise por GC/MS das amostras Herbivoria e Controle. O resultado da separação dos compostos presentes nos extratos de herbivoria e extratos controle, na coluna Rtx-1, está demonstrado na tabela 3 com a média dos picos encontrados e seus respectivos desvio padrão. A indução do β -cariofileno devido a herbivoria por larvas de *D. saccharalis* é evidenciada pelo pico com tempo de retenção 25,59 min (Figura 9).

Os compostos das amostras do grupo Herbivoria, que foram emitidos em quantidades superiores e em maior frequência em relação as amostras do grupo Controle, foram identificados por similaridade de espectro de massas como provavelmente sendo 3-etil-2,4-dimetil pentano, 1-octeno-3-ol, 1,1-(1,4-fenileno) bis etanona, 2,6,10-trimetil pentadecano, 2,6,10,14-tetrametilhexadecano e Limoneno que é descrito na literatura como atrativo de pragas e microorganismo (RODRIGUEZ et al, 2011) sendo um composto de localização do hospedeiro. Observamos a diminuição do Limoneno nas plantas infestadas sugerindo uma estratégia da *Diatrea saccharalis* para evitar competição. O β -cariofileno por ter sido identificado em uma quantidade muito acima nas amostras de herbivoria (ver figura 10 e tabela 4) e ter sido reportado na literatura como um COV envolvido na resposta de plantas a ataques por insetos herbívoros (KÖLNER et al., 2008), foi escolhido para análises adicionais de identificação e realização de bioensaios.

Tabela 3 – Compostos orgânicos voláteis emitidos no ensaio de herbivoria real. Os compostos aqui apresentados são os que foram identificados em pelo menos cinco repetições do experimento.

Composto	Média das áreas dos picos ($\times 10^3$)	
	Controle	Herbivoria
2-nitro hexano	666 \pm 250	580 \pm 148
2,3,5-trimetil hexano	-	268 \pm 97
3,3-dimetil-2-hexanona	931 \pm 796	-
2-etil-1-hexanol	1.111 \pm 1.774	-
Limoneno	900 \pm 1.428	-
Nonanal	1.089 \pm 2.402	359 \pm 461
Undecano	403 \pm 587	134 \pm 83
Decanal	1.018 \pm 1.824	349 \pm 693
Ácido 2-metil-, 1,2-etanodiol ester, 2-propenóico	95 \pm 43	92 \pm 38
Tetradecano	226 \pm 219	767 \pm 887
1,1'-(1,4-fenileno) bis etanona	-	217 \pm 338
6,10-dimetil, 5,9-undecadieno-2-ona	461 \pm 680	174 \pm 373
β -cariofileno	-	1.378 \pm 2.668
Pentadecano	433 \pm 780	171 \pm 166
Octadecano	1.150 \pm 1.387	-
Ácido 1-metilelester dodecanóico	954 \pm 923	1.036 \pm 384
2,6,10-trimetil pentadecano	-	39 \pm 8
2,6,10,14-tetrametil pentadecano	272 \pm 522	376 \pm 487
Nonadecano	673 \pm 420	-
2,6,10,14-tetrametilhexadecano	-	121 \pm 151
Esqualeno	176 \pm 232	264 \pm 332

Fonte: ?????

Tabela 4 – Área absoluta do pico de β -cariofileno.

Amostras Controle	Área absoluta	Amostras Herbivoria	Área absoluta
1	0	1	1272873
2	0	2	188734
3	0	3	0
4	0	4	273289
5	0	5	261317
6	0	6	20860
7	85294	7	8888169
8	0	8	424113
9	329703	9	880106
10	0	10	988593
11	120808	11	579160

Fonte: Autor, 2013.

Nota: Valor da área dos picos das 11 (onze) plantas sob herbivoria e a emissão de β -cariofileno indicando que a quantidade produzida durante o ataque do inseto é muito superior a quantidade encontrada nas 11 (onze) plantas do grupo controle.

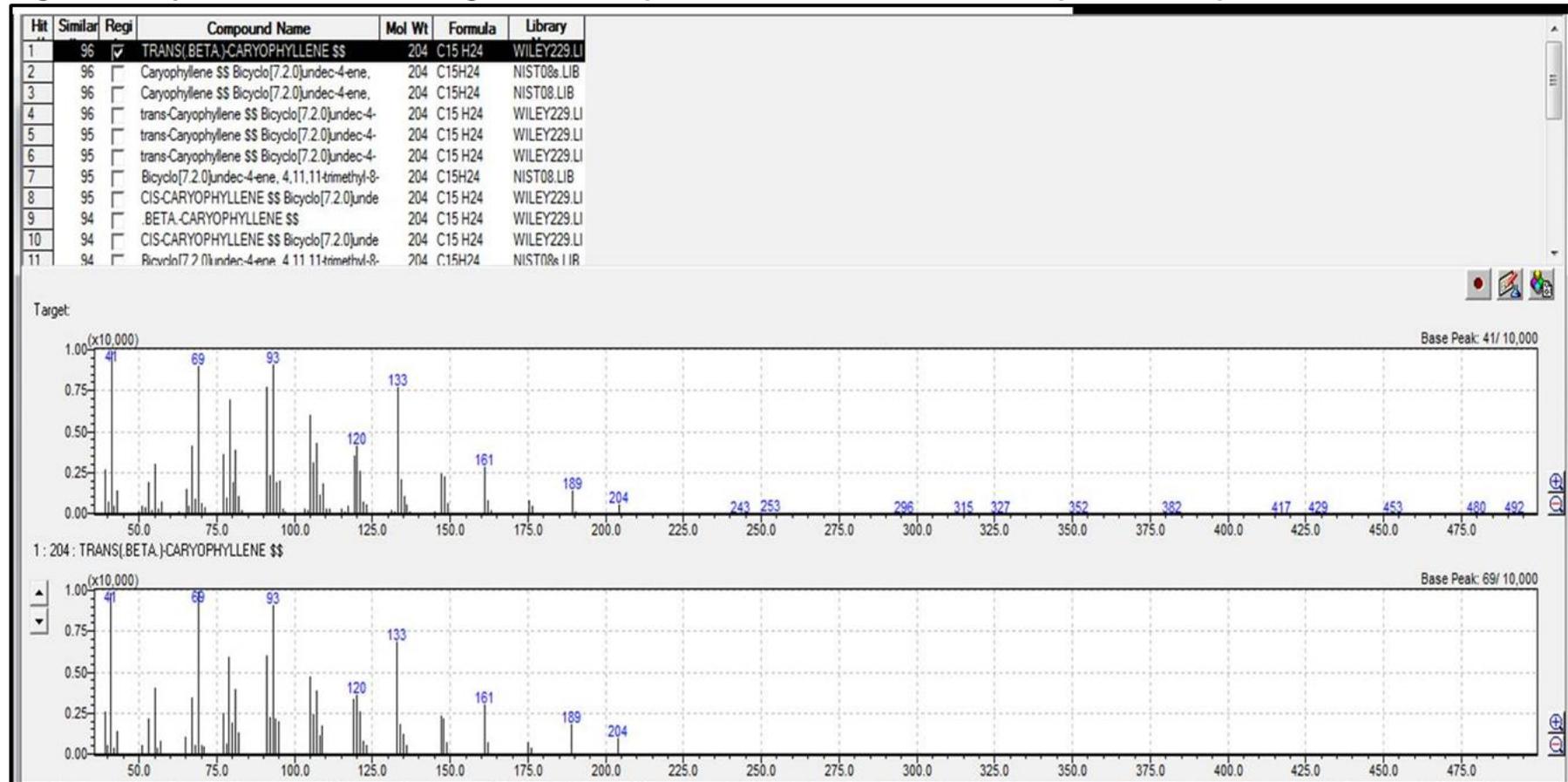
5.2 Identificação do β -cariofileno

Os cromatogramas de GC mostraram um pico com tempo de retenção de 25,60 min na análise com coluna RTX-1, cujo espectro de massas apresentou 96% de similaridade com o espectro do β -cariofileno presente nas bibliotecas NIST (National Institute of Standards and Technology) e WILEY.

A figura 9 mostra uma sobreposição de imagens dos voláteis encontrados em uma planta controle, uma planta sendo atacada, e do padrão de β -cariofileno. O pico correspondente ao β -cariofileno mostrou-se presente apenas na planta atacada.

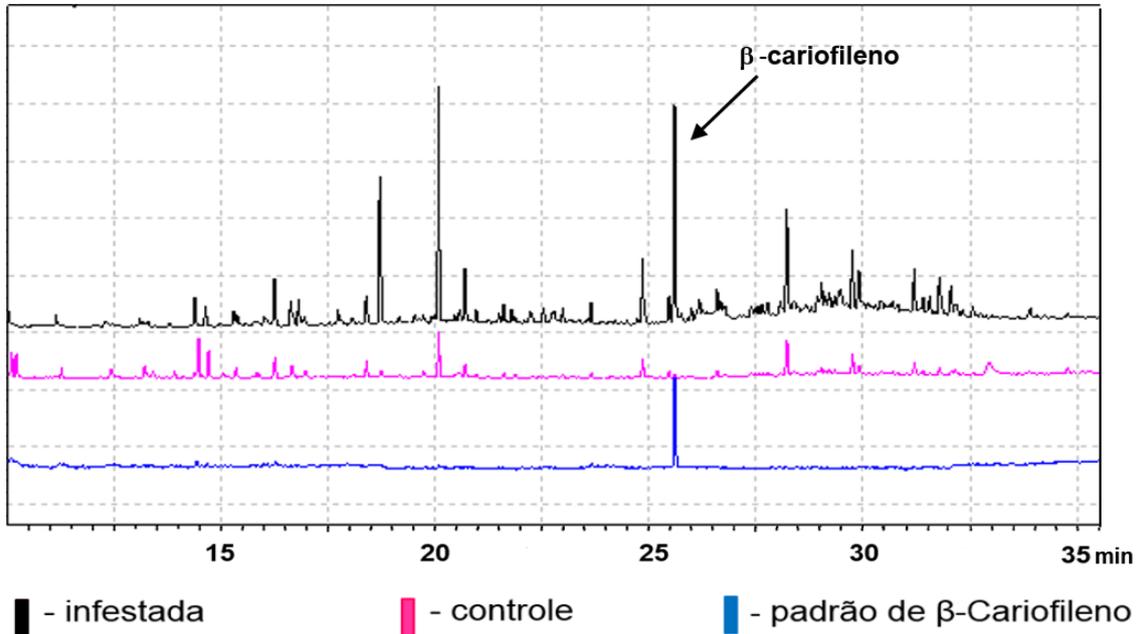
A confirmação da identidade do β -cariofileno foi realizada por co-injeção com um padrão de β -cariofileno em duas colunas de polaridades diferentes, Rtx-1 (60m, d.i. 0,25mm) e JW DB-5 (30m, d.i. 0,25mm). Um volume de 2 μ L de amostra foi co-injetado com 1 μ L do padrão de β -cariofileno (1350 pg/ μ L) dissolvido em hexano. Estes resultados estão apresentados na Figura 10. A grande proximidade dos valores de tempo de retenção obtidos e o aumento em torno de 2x da área do pico da amostra co-injetada com o padrão em relação ao pico da amostra sem padrão indicam que o pico em análise corresponde ao β -cariofileno.

Figura 9 – Espectro de massas de fragmentação do pico da amostra Herbivoria correspondente ao β -cariofileno.



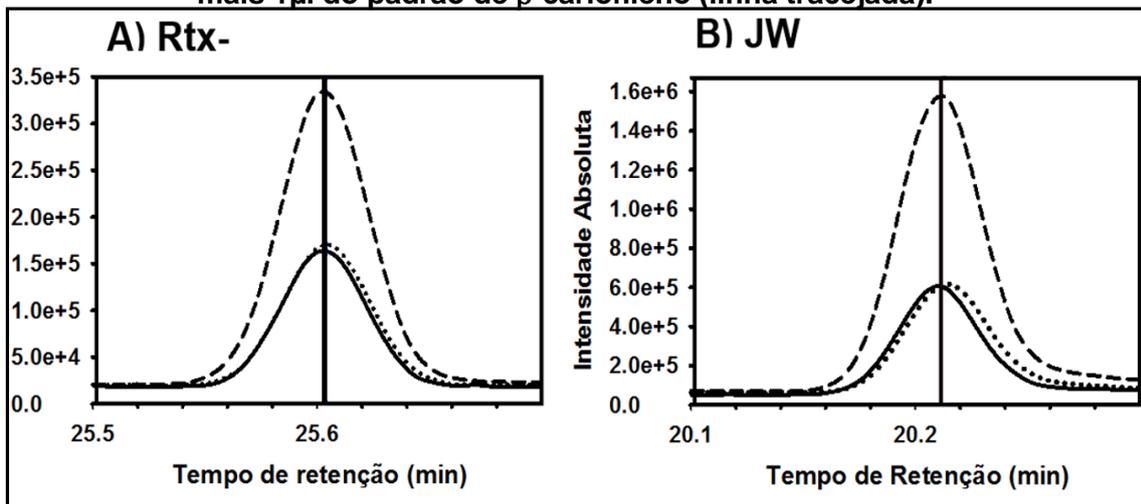
Fonte: ????????

Figura 10 – Cromatograma de GC/MS mostrando os compostos orgânicos voláteis emitidos por plantas de cana-de-açúcar após herbivoria por *D. saccharalis* em análise com coluna JW DB-5



Fonte: ????????

Figura 11 – Identificação e quantificação da presença do β -cariofileno:: 1 μ L do padrão de β -cariofileno 1,3ng (linha contínua) / 2 μ L da amostra coletada durante infestação (linha pontilhada) / co-injeção de 2 μ L da amostra infestada mais 1 μ L do padrão de β -cariofileno (linha tracejada).



Fonte: Autor, 2013

Nota: Em A tempo de retenção apresentado de 25.6min na coluna Rtx-1, em B tempo de retenção de 20.2min em coluna JW DB-5. O mesmo valor para o TR e o aumento em torno de 2x da área do pico da amostra co-injetada com o padrão em relação ao pico da amostra sem padrão indicam que o pico em análise corresponde ao β -cariofileno.

5.3 Análise estatística da emissão do β -cariofileno por plantas de cana-de-açúcar, induzida pela herbivoria por larvas de *Diatraea saccharalis*

A figura 11 mostra a média das áreas e os desvios padrões dos picos dos extratos de 11 plantas sob herbivoria e a emissão de β -cariofileno, indicando que a quantidade produzida durante o ataque do inseto foi muito superior a quantidade encontrada nas 11 plantas do grupo controle. Kölner *et al*, (2008) mostraram a emissão de beta cariofileno em milho (*Zea mays*), pertencente à família *Poaceae* assim como em cana-de-açúcar, em resposta a ataque por herbívoros.

Outros autores também relataram o aumento da emissão de β -cariofileno em milho como Gouinguene *et al* (2001) e Degen *et al* (2004) que observaram o aumento da emissão de voláteis em especial de terpenos e produtos da via da lipoxigenase, como por exemplo os voláteis de folha verde, após ataque por herbívoros.

Os resultados obtidos por Cheng *et al* (2007) e Yuan *et al*, (2008) com arroz, corroboram com os nossos resultados bem como os já citados acima em que outras gramíneas, respondem ao ataque de insetos emitindo voláteis específicos em que são observados uma grande concentração de terpenos, porém β -cariofileno não foi identificado. Além disso, em milho, após ataque por larvas de *Spodoptera littoralis* (mesma ordem da *D. Saccharalis*) também houve uma grande quantidade de voláteis emitidos, e em maiores teores do que após o ataque de afídeos (TURLINGS *et al* 1998 e SCHNEE *et al* 2006).

Os resultados da quantificação mostraram que o β -cariofileno foi emitido durante a herbivoria na concentração média de 0,3 ng por planta em 48h, enquanto que no Controle na grande maioria das repetições não foi possível detectar o pico correspondente (Figura 10) e, conseqüentemente não foi possível quantificar o composto em análise. A presença do pico de β -cariofileno em 3 repetições do controle possivelmente ocorreu devido a manipulação durante os experimentos.

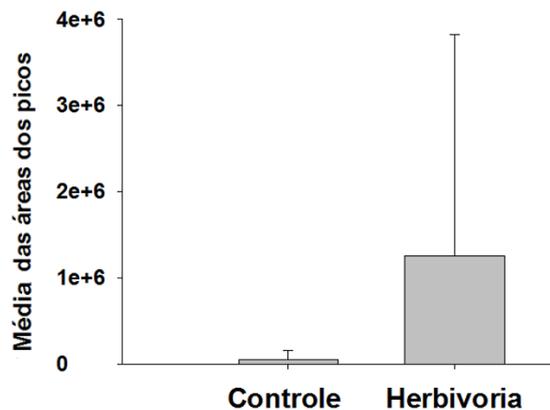
Dessa forma fica claro que há uma resposta específica quando ocorre o ataque pela *D. Saccharalis* e que o regurgito possui elicitadores que desencadeiam respostas de defesa. Por isso, o aumento do β -cariofileno observado em nossos resultados é, de fato decorrente de uma resposta à herbivoria.

Apesar dos nossos experimentos terem demonstrado o aumento da emissão desse volátil quando em condições de ataque à planta, Olson *et al*. (2009),

descreveram a diminuição da emissão de β -cariofileno e de compostos da mesma família como β -farneseno, α -bergamoteno, α -humuleno e γ -bisaboleno, em plantações de algodão, quando submetidas a um alto nível de nitrogênio, sendo importante ressaltar que nesse caso não houve ataque por herbívoros.

Estatisticamente, nossos resultados, através do Teste de Postos de Sinais de Wilcoxon mostraram que a diferença entre os valores médios dos dois grupos é maior que seria esperado ao acaso; existe uma diferença estatística significativa da emissão do grupo submetido a herbivoria em relação ao grupo controle ($p=0,001$).

Figura 12 – Gráfico das médias das áreas dos picos detectados de β -cariofileno nos grupos..



Fonte: Autor, 2013.

Nota: A produção nas plantas sob herbivoria indica que a emissão deste volátil ocorre em resposta ao ataque por *D. saccharalis*

5.4 Confirmação da emissão β -cariofileno por cana-de-açúcar

Outro experimento foi realizado para confirmação da emissão do β -cariofileno pela variedade de cana-de-açúcar sul africana (*Saccharum* spp.) também atacada por *Diatrea saccharalis*, porém desta vez com dois novos grupos e em diferentes tempos: O grupo de planta tratadas com herbivoria simulada e o grupo de plantas expostas a cis-jasmona. Todos os tratamentos analisados nos tempos nos tempos 12 horas, 24 horas e 48 horas (Tabela 5). Foram utilizadas ao todo nesta etapa do trabalho 48 plantas divididas em quatro grupos: Grupo Controle, Grupo Herbivoria Simulada, Grupo Herbivoria Real (6 *D. saccharalis* em segundo instar por planta) e Grupo CJ (Cis-jasmona).

Tabela 5 – Organização do experimento realizado em Rothamsted Research.

Tempo \ Tratamento	Controle	Real Herbivoria	Herbivoria Simulada	Cis-Jasmona
12 h	4 plantas	4 plantas	4 plantas	4 plantas
24 h	4 plantas	4 plantas	4 plantas	4 plantas
48 h	4 plantas	4 plantas	4 plantas	4 plantas

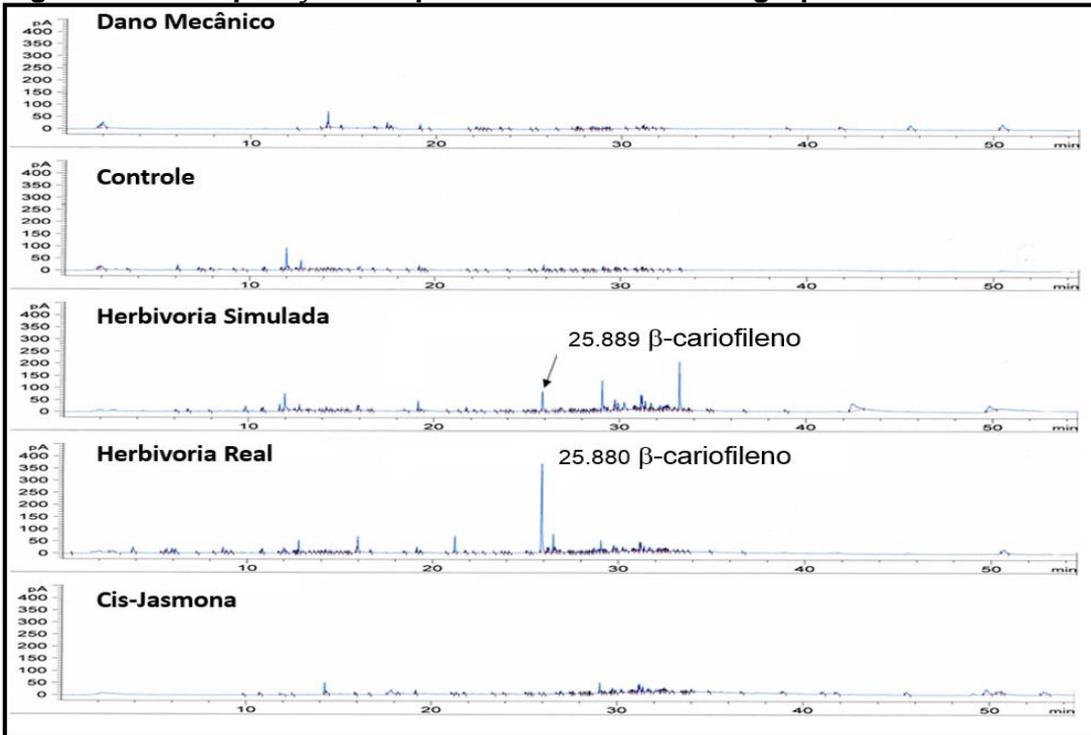
Fonte:Autor, 2013.

Os tubos com Tenax das 3 primeiras plantas foram usados para análise em GC-FID. O tubo da quarta planta foi submetido ao GC-MS para confirmação dos compostos encontrados.

Os resultados da coleta e análise mostram que o β -cariofileno também foi produzido nas plantas submetidas a herbivoria simulada e real herbivoria, não aparecendo nas plantas controle e submetidas a aplicação de CJ (Figuras 13 e 14). A emissão teve seu ápice no tempo 12h.

A figura 15 representa a quantidade de β -cariofileno encontrado nas plantas dos diferentes tratamentos, sendo uma quantidade significativa para os grupos herbivoria real e herbivoria simulada no tempo de 12 horas representando o máximo produzido. As médias de maior emissão foram de 7.64 ng e 7.53 ng por planta respectivamente.

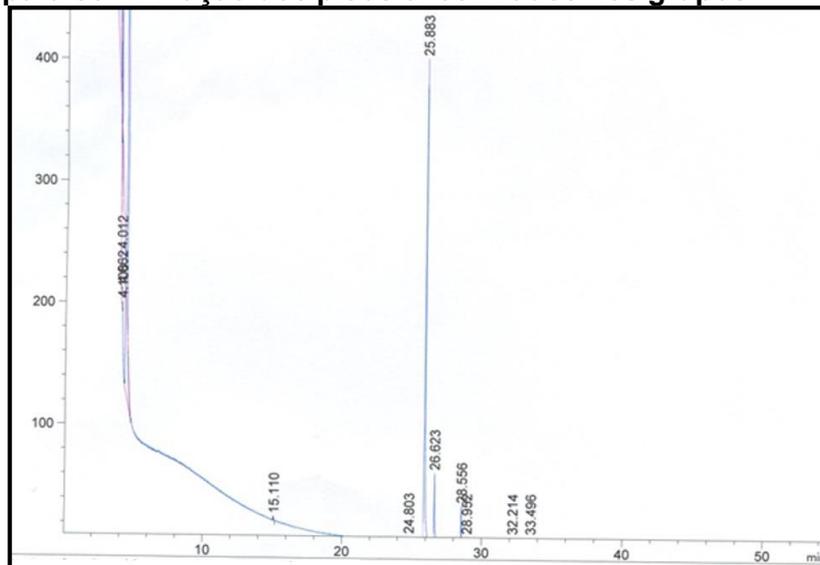
Figura 13 – Comparação dos perfis de COVs de cada grupo em GC-FID.



Fonte: Autor, 2013.

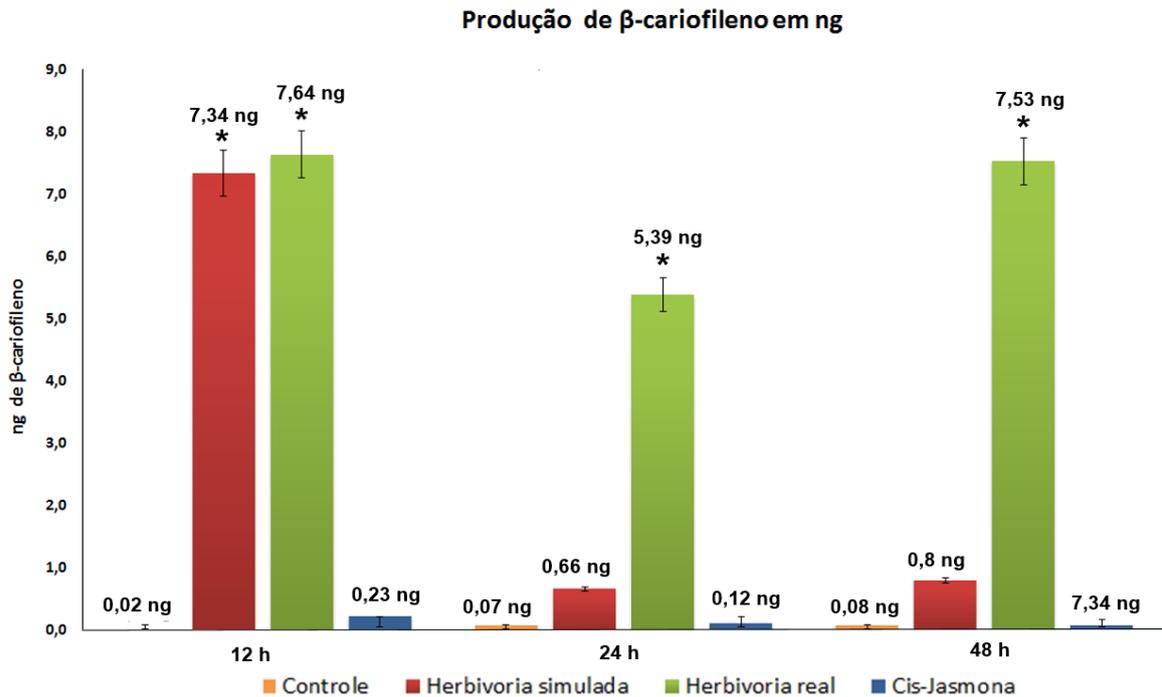
Nota: As amostras acima correspondem ao tempo de 48 horas de coleta de voláteis de cana-de-açúcar em coluna de sílica não polar HP-1 (J&W Scientific). As plantas submetidas ao dano mecânico não apresentaram emissões significativas de voláteis para nossa análise.

Figura 14 – Tempo de retenção do padrão de β-cariofileno (25.883 minutos) utilizado para confirmação dos picos encontrados nos grupos.



Fonte: Autor, 2013.

Figura 15 – Gráficos de produção de β -cariofileno nos quatro grupos por planta em nanogramas.



Fonte: Autor, 2013.

Nota: O gráfico mostra que durante o processo de herbivoria há uma clara resposta da planta produzindo β -cariofileno tenax, tempo de coleta media de 3 plantas

5.5 Identificação e quantificação da expressão do gene de uma Terpeno sintase putativa de cana-de-açúcar

A fim de complementar os resultados de detecção de β -cariofileno, objetivamos também identificar o gene de uma terpeno sintase putativa de cana de açúcar (TPS) induzido durante a herbivoria por *D. saccharalis*.

A classe de enzimas das Terpeno Sintases (TPS) catalisa a etapa crucial da biossíntese de terpenos voláteis, que converte o substrato prenil difosfato a olefinas ou alcoois e portanto determinam o esqueleto básico da estrutura dos terpenos. As sesquiterpeno sintases localizam-se no citossol e utilizam farnesil difosfato (FPP) como substrato (CHEN et al., 2011). Vários genes de sesquiterpeno sintases têm sido isolados de milho, arroz e sorgo. Em milho, por exemplo, sete genes de sesquiterpeno sintases já foram caracterizados. As terpenos sintases do milho TPS1, TPS10 e TPS23 são induzidas após o dano por lagartas e assim a planta produz os principais compostos do blend de voláteis induzidos pela herbivoria

(SCHNEE et al., 2002, 2006; KOLLNER et al., 2008a). Todas elas utilizam o mesmo FPP como substrato, no entanto formam produtos diferentes, (E)-b-farneseno, (E)-nerolidol e (E,E)-farnesol (pela a TPS1), (E)-a-bergamoteno, (E)- β -farnesene and sesquiphellandreno (pela a TPS10) e humuleno e (E)- β -cariofileno (para a TPS23).

Baseado nas sequencias acima, Zhuang et al, (2012) identificaram uma TPS em sorgo (*Sorghum bicolor*), classificada como SbTPS4 (Sb07g005130) e número de acesso no GenBank XM_002445120, e demonstraram que o principal produto desta enzima foi o sesquiterpeno B-cariofileno, tratando-se portanto da cariofileno sintase de sorgo. Por apresentar maior proximidade genética com a cana-de-açúcar, utilizamos essa TPS do sorgo como referência para iniciar trabalhos de busca dos ortólogos em cana-de-açúcar.

A sequência de figuras 16 a 19 abaixo representam a estratégia de bioinformática para construção do contig da TPS putativa de cana-de-açúcar e desenhos de primers para serem utilizados com o RNA total de cana.

Figura 16 – Pagina do NCBI com a sequência de cariofileno sintase descrita por Zhuang et al, 2012 SbTPS4 (Sb07g005130).

NCBI

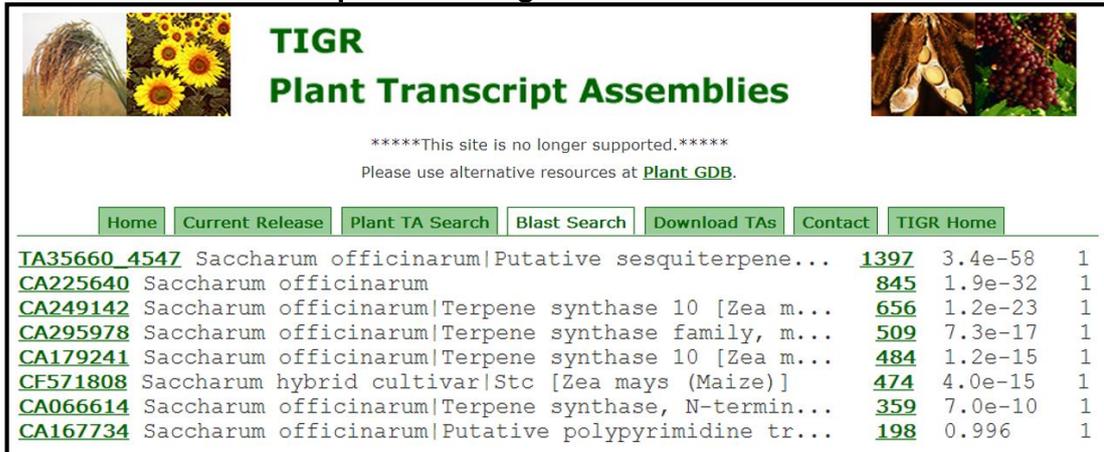
Sorghum bicolor hypothetical protein, mRNA

NCBI Reference Sequence: XM_002445120.1

FEATURES	Location/Qualifiers
source	1..1641 /organism="Sorghum bicolor" /mol_type="mRNA" /cultivar="BTx623" /db_xref="taxon:4558" /chromosome="7"
gene	<1..>1641 /locus_tag="SORBIDRAFT_07g005130" /gene_synonym="Sb07g005130" /db_xref="GeneID:8085003"
CDS	1..1641 /locus_tag="SORBIDRAFT_07g005130" /gene_synonym="Sb07g005130" /note="similar to Os08g0139700 protein" /codon_start=1 /product="hypothetical protein" /protein_id="XP_002445165.1"

Fonte: Autor, 2013.

Figura 17 – Pagina do TIGR Plant Transcript Assemblies com os resultados BLAST utilizando a sequência Sb07g005130.



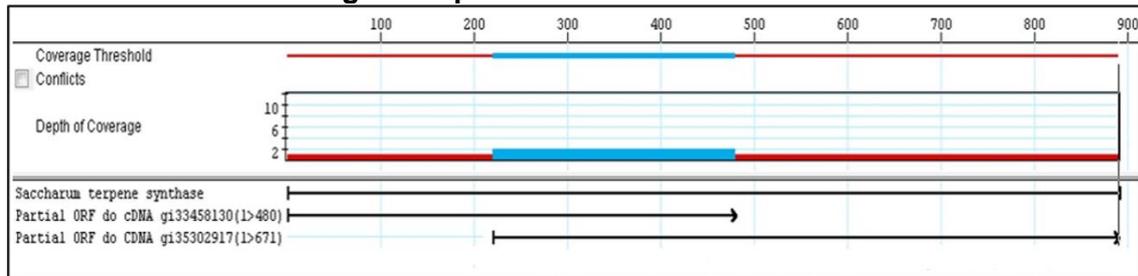
*****This site is no longer supported.*****
Please use alternative resources at [Plant GDB](#).

[Home](#) | [Current Release](#) | [Plant TA Search](#) | [Blast Search](#) | [Download TAs](#) | [Contact](#) | [TIGR Home](#)

TA35660_4547	Saccharum officinarum Putative sesquiterpene...	1397	3.4e-58	1
CA225640	Saccharum officinarum	845	1.9e-32	1
CA249142	Saccharum officinarum Terpene synthase 10 [Zea m...	656	1.2e-23	1
CA295978	Saccharum officinarum Terpene synthase family, m...	509	7.3e-17	1
CA179241	Saccharum officinarum Terpene synthase 10 [Zea m...	484	1.2e-15	1
CF571808	Saccharum hybrid cultivar Stc [Zea mays (Maize)]	474	4.0e-15	1
CA066614	Saccharum officinarum Terpene synthase, N-termin...	359	7.0e-10	1
CA167734	Saccharum officinarum Putative polypyrimidine tr...	198	0.996	1

Fonte: Autor, 2013.

Figura 18 – Tela do software DNASTAR LaserGene 8, para localizar as regiões conservadas das sequências anteriormente encontradas para o assembling de sequências.



Fonte: Autor, 2013.

Figura 19 – ORF parcial da Terpeno sintase putativa de *Saccharum* sp.

```
>Partial_cDNA_Saccharum_terpene_synthaseseq.seq "Saccharum terpene synthase" (891bp)
ATGCAGCTAGTAGCAGCCATCCTCTCCGATCCGGCTGTCCAATCCAGAGCCATCGAGATGGCCACCAGCAGCCCCATCC
CTCTGGTCTCGCAGGTGCAGCGCAAGCCACAGACATACACCCCAAGTCCATGGGGTGACTTCTTCTCCAGCATGTCCC
ATGCACTCCATCACAGTTCTTGTCATGAAGGAGAGGGCACAGAGCAAGAAGGAAGAAGTGAGGCAGATTATATTAGGA
ACCGTTGCCACCTCCAACCTGGTACAGAAGATGGAGCTCGTCGACACGCTGCAACGGATCGGGGTGGACTACCACTACA
AGGAGGAGATCRATGATTTGCTTTGCTCTGTCTACGATGACAAGGATGGAGGCTCTGACAATCTATATATCACCTCGCT
GAGGTTCTATTTGCTCAGGAAGCATGGGTACAGAGTCTTTTCAGATGTGTTTGAGAAATTTAGGGATGAGCATGGGAAC
ATTTCAAGTGATGATGTCAGCTGCTTGCTGATGTTGTATGATGCTGCGTATCTGAGAAGCTCGTGGGGAGGATATACTTG
ACAACATCATCACTTTCAACAAGAGCCACCTCCAATCTCTACTGCTGGCAAATTTGGAGCCAAAGCTACGAGAGGAAGT
GCAGTGCACCTTTGGAGACACCTCGGTTCCAGGCGGGTCAAGAGAGTGGAGACAAGGCGCTATATCTCTATATATGAGAAG
AAGGCTACACGAGATGCGACCATACTGGAGTTTGCAAACTAGACTACAACATCTTGCAAGCTATCTACTGTGATGAGT
TGAAAGAAGCTCACAGTATGGTGAAGGGGAGTCCANACAGAATAGATCTAAGCTTTCACAGGGACAGGATGGTGGAGCT
ACACTTTTGGATGCTTCGAGTG
```

Fonte: Autor, 2013.

Figura 20 – Alinhamento em ClustalW2 entre as sequências de aminoácido da terpeno sintase putativa de cana-de-açúcar e a cariofileno sintase de *Sorgum bicolor* Zhuang et al, 2012. (* = mesmo aminoácido; : = aminoácidos com propriedades estreitamente similares; . = propriedades similares)

```

EMBL-EBI
ClustalW2
Input form | Web services | Help & Documentation
Tools > Multiple Sequence Alignment > ClustalW2
Zhuang -----MATEAKIQIHQAQQIEDVHPKPHSSLWGDFFLH 33
Partial_Saccharum_terpene_synt MQLVAAILSDPAVQSRAIEMATSSPIPLVSQVQRKPQTYTSPWGDFFLQ 50
                                :  :. * ..*::  :. .* *****:

Zhuang HVPCCPPVQYLMMKDKVEIMKEEVKKMLL-DVDSFDLSDKLECIDTLERLG 82
Partial_Saccharum_terpene_synt HVPCTPSQFLSMKERAQSKKEEVRQIILGTVATSNLVQKMELVDTLQRIG 100
*****.* *:* **::: *****:::* * : :* :*: * :*: *

Zhuang LDYHYTKKEIDKLMCNIFKASDQDL-DPTTSHLFYLLRKHGYHISSDVFL 131
Partial_Saccharum_terpene_synt VDYHYKKEIXDLLCSVYDDKDGSDNLYITSLRFYLLRKHGYRVSDVFE 150
:****:.* .*:.*::. . * . * * * *****:;*****

Zhuang KFRDDKGNIVTDDARCLLLMYEAAHLRVKGEIILDNILIFTKSQLQ-CIV 180
Partial_Saccharum_terpene_synt KFRDEHGNISSDDVSCLLMLYDAAVLRTRGEDILDNIITFNKSHLQSLLL 200
*****:*** ;** .***:;*:***:***:***:***:***: * .**:* * :

Zhuang DDLEPQLKEEVKYALETPLFRRLKRVQTRQYISIEKNTAHNNMLLEFSK 230
Partial_Saccharum_terpene_synt ANLEPKLREEVQCTLETPRFRVVKRVETRRYISIEYKATRDATILEFAK 250
:***:;*:*** :**** *:*:***:***:***:***:***:***:***: * :***:*

Zhuang LDFNILLTYCEELKDLTLWTFEQTQANTSIYARDRMVEMHFMMGVFF 280
Partial_Saccharum_terpene_synt LDYNILQAIYCDELKELTVWVKGSPXRIDLS-FHRDRMVELHFVMLRV-- 297
*:*:*** :***:***:***:***. : : * : *****:***: *

Zhuang EPQYSYSRKMILTQLFMIVSILDDLYDNHCTTEEGNVFTAALERWDEEAVE 330
Partial_Saccharum_terpene_synt -----

```

Fonte: Autor, 2013.

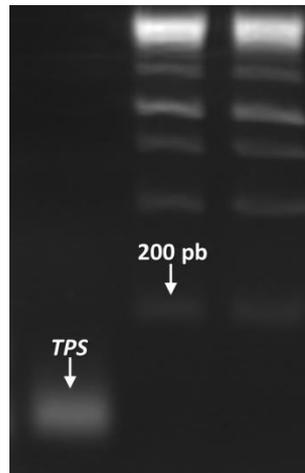
A partir da similaridade das duas sequências assumimos que a sequência por nós utilizada é de uma possível cariofileno sintase de cana-de-açúcar. Utilizando o software primer3, foram construídos os primers:

scTpsf 5' CAGCTGCTTGCTGATGTTGT 3'

scTpsr 5' ATTGGAGGTGGCTCTTGTTG 3'

De cada planta submetida a herbivoria real foi utilizado uma região de até 3 centímetros em volta da área atacada pelas lagartas, mascerado em nitrogênio líquido e extraído o RNA total para amplificação do fragmento de 100pb do RNAm putativo do gene *TPS* de cana-de-açúcar. A figura 20 mostra a amplificação do fragmento em amostra de cana-de-açúcar.

Figura 21 – Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos de amplificação por PCR com amostras de RNA total de parte aérea de cana-de-açúcar da terpeno sintase putativa corado com brometo de etídio.



Fonte: Autor, 2013.

O fragmento amplificado foi cortado do gel, e tratado para ser sequenciado. O sequenciamento obteve a seguinte sequência com 75pb:

5' CATACTGGAGACAAGGCGCTACATCTCTATATATGAGAAGAAGGCTACACGAG
ATGCGACCCATACTGGAGACAA 3'

Utilizando o Primer3 foram desenhados dois novos primers, dessa vez específicos do fragmento encontrado em cana-de-açúcar para quantificação da expressão gênica:

TPSsf: 5' CTGGAGACAAGGCGCTACAT 3'

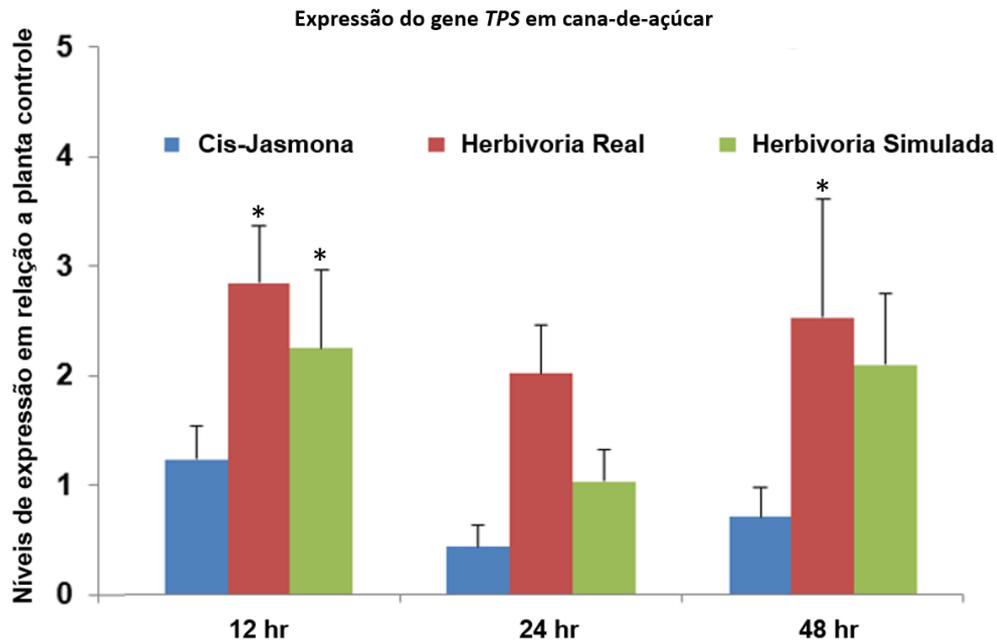
TPSsr: 5' TATGGGTCGCATCTCGTGTA 3'

Os primers TPSsf e TPSsr foram utilizados com o RNA total das partes aéreas e de raízes das mesmas plantas utilizada nos experimentos de coleta de COVs. Amostras de RNA total de raízes não apresentaram amplificação, sugerindo que não há expressão desse gene das raízes de cana de açúcar, diferentemente do milho, em que houve detecção de β -cariofileno em raiz como citado por Kölner et al., (2008). Em estudos realizados com o milho pertencente à linha híbrida Delprim, foi detectada a expressão de TPS23, que foi induzida de forma independente pelo ataque *Diabrotica virgifera* nas raízes e o seu controle ocorre a nível de transcrição.

Ainda nesse estudo o β -cariofileno foi identificado como único composto liberado significativamente pelas raízes após danos provocado pelo mesmo herbívoro.

Os resultados da quantificação relativa para avaliar o nível de expressão da TPS de cana-de-açúcar demonstra os níveis de expressão foram significativamente maiores durante a herbivoria em relação ao controle e *cis*-jasmona como pode ser visto na Figura 21.

Figura 22 – Gráfico dos níveis de expressão do gene putativo da TPS relativo ao tecido foliar por qPCR em relação a planta controle



Fonte: Autor, 2013.

Os resultados mostram que há uma expressão significativa do gene nas plantas sob herbivoria e que o nível de expressão é cerca de três vezes maior em relação ao grupo controle atingindo o máximo de expressão no tempo 12h após exposição aos tratamentos. O grupo herbivoria simulada também teve um aumento da expressão apenas no tempo 12h.

Comparando esses resultados aos de emissão de β -cariofileno verificamos que esse gene também teve expressão máxima no tempo 12 horas e está relacionado com a resposta à herbivoria. Esses resultados somados ao resultado de emissão de β -cariofileno encontrado nos grupos submetidos a herbivoria (real e simulada) é mais um indicativo de que a sequência descrita pode se tratar da cariofileno sintase de cana-de-açúcar. No entanto, para confirmação, a atividade dessa enzima deverá ser verificada em estudos posteriores.

5.6 Bioensaio com o parasitóide *Cotesia flavipes*: Teste de atração em olfatômetro

Com a finalidade de verificar a atividade biológica do β -cariofileno emitido por cana-de-açúcar foram desenvolvidos bioensaios para verificar a atratividade sob o parasitóide *C. flavipes* extensamente utilizada em programas de controle biológico na cultura da cana-de-açúcar e tem como característica o parasitismo das lagartas da broca da cana (*D. saccharalis*).

Quando analisados os resultados, verificamos que as análises estatísticas pelo teste do qui-quadrado mostraram que as fêmeas de *C. flavipes* foram atraídas pelos extratos das plantas submetidas a herbivoria. Quando adicionado de 0,3ng/ μ L de β -cariofileno sintético (C0,3) aos extratos das plantas controle, o extrato passou a ser ativo realçando a atividade do β -cariofileno à níveis de significância de $p < 0,001$, enquanto que a atração pelo extrato controle não foi estatisticamente significativo.

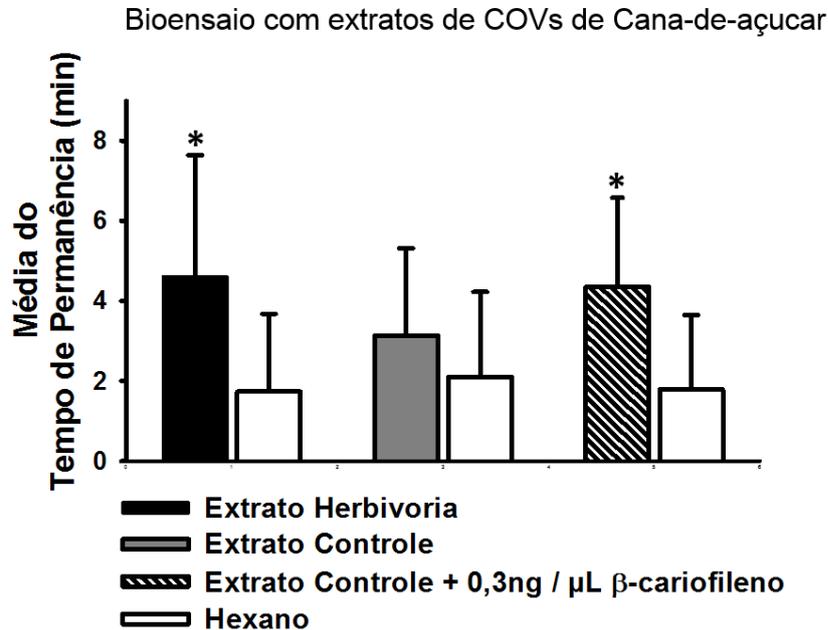
Inúmeras espécies de plantas liberam compostos voláteis em resposta ao ataque de herbívoros atraindo inimigos naturais para parasitá-los ou predá-los. Além do β -cariofileno ter demonstrado essa função em nossos resultados a atração de parasitoides de espécies de lepidópteros por este volátil liberado por milho, frente à herbivoria, foi reportada por Schnee et al. (2006).

Em estudos realizados com *Cotesia partellus*, a vespa foi capaz de distinguir entre tabaco, algodão e milho infestado com seu hospedeiro *H. virescens* e *H. zea*. Mesmo após a porção danificada da planta ter sido removida, as vespas continuaram sendo atraídas pela planta atacada, o que demonstra o efeito específico de *bouquet* de voláteis produzidos, especialmente do β -cariofileno (MORAIS et al., 1998).

Os dados também foram analisados pelo teste de Tukey para comparação entre as médias dos múltiplos pares. O tempo médio gasto pelas fêmeas de *C. flavipes* no braço do olfatômetro com o extrato de herbivoria diferenciou dos tempos gastos nos braços contendo hexano, quando testados a um limite de 5% de significância ($p < 0,05$).

No entanto, quando o extrato controle foi testado ($p < 0,05$), o tempo médio gasto no braço com extrato não diferiu significativamente dos tempos gastos nos demais braços que continham hexano (Figura 12).

Figura 23 – Resposta comportamental de *Cotesia flavipes* em ofatômetro de quatro braços frente aos extratos de voláteis de cana-de-açúcar para os tratamentos Herbivoria, Controle e Controle mais 0,3ng/μl de β-cariofileno.



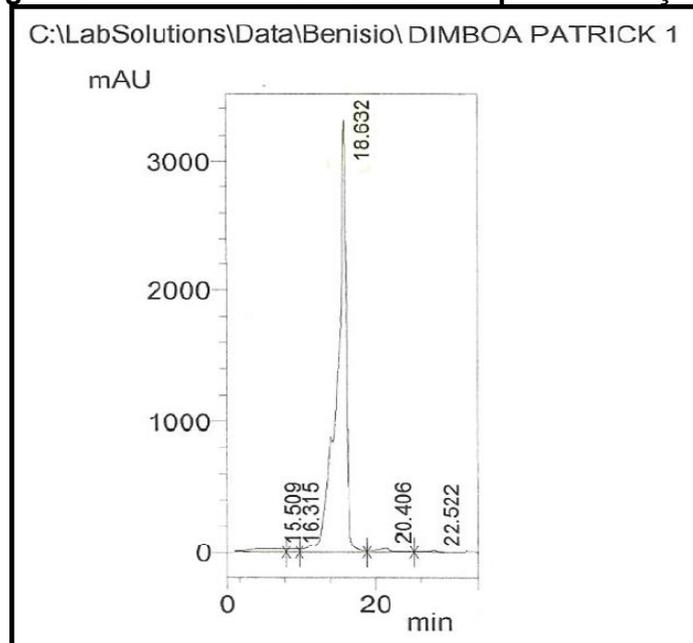
Fonte: Autor, 2013.

5.7 Detecção e quantificação do ácido hidroxâmico DIMBOA

O ácido hidroxâmico DIMBOA tem sido relacionado a uma série de atividades biológicas. Em extratos de milho e trigo, foi citado por desempenhar papel importante na resistência contra pragas e apresentar toxicidade contra bactérias e fungos. Estes efeitos foram atribuídos, dentre outros aspectos, à inibições de enzimas nucleofílicas tais como resíduos de cisteína (NIEMEYER, 2009).

Para a análise da produção de DIMBOA na cana-de-açúcar foram utilizadas amostras de folhas/colmo e raízes nas 4 plantas de cada grupo. As figuras 22 e 23 mostram a confirmação da presença de DIMBOA na cana-de-açúcar nos tratamentos avaliados.

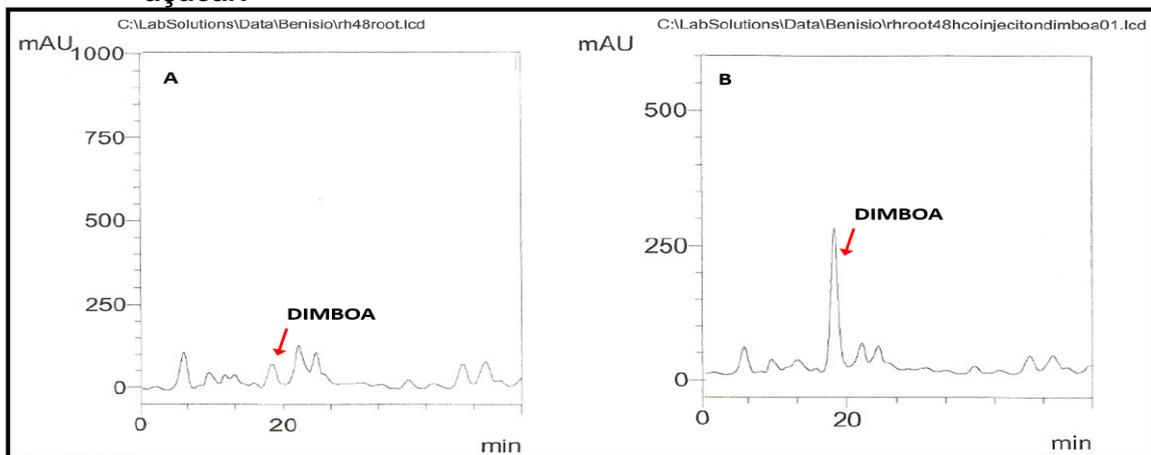
Figura 24 – Padrão de DIMBOA e tempo de retenção.



Fonte: Autor, 2013.

Nota: Concentração de 50µg/mL em HPLC Shimadzu LC-10A Coluna C-18 de fase reversa. Tempo de retenção do padrão de DIMBOA (18.632 minutos) utilizado para confirmação dos picos encontrados nos grupos.

Figura 25 – Co-injeção para confirmação de DIMBOA em amostra de raiz de cana-de-açúcar.



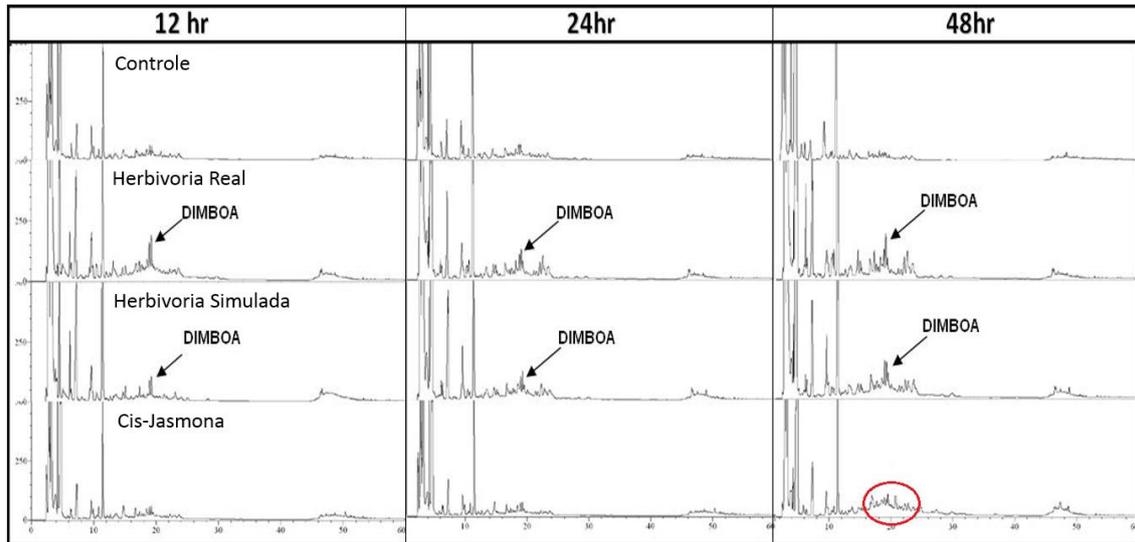
Fonte: Autor, 2013.

Nota: Em A o pico de DIMBOA em amostra de raiz em planta submetida a herbivoria por 48h. Em B a mesma amostra mais 1µL do padrão de DIMBOA com concentração de 50µg/mL em HPLC Shimadzu LC-10A Coluna C-18 de fase reversa.

Os resultados com material das partes aéreas (folhas e colmo) de cana não apresentaram nenhuma quantidade detectável de DIMBOA. Esse resultado foi confirmado utilizando HPLC-MS (dados não mostrados).

A produção de DIMBOA por planta (nas raízes) atingiu seu ápice no tempo 48h nas plantas submetidas a Herbivoria simulada e especialmente Herbivoria real. (Figura 24).

Figura 26 – Comparação dos cromatogramas de amostras de raiz e a presença de DIMBOA visto em HPLC Shimadzu LC-10A Coluna C-18 de fase reversa

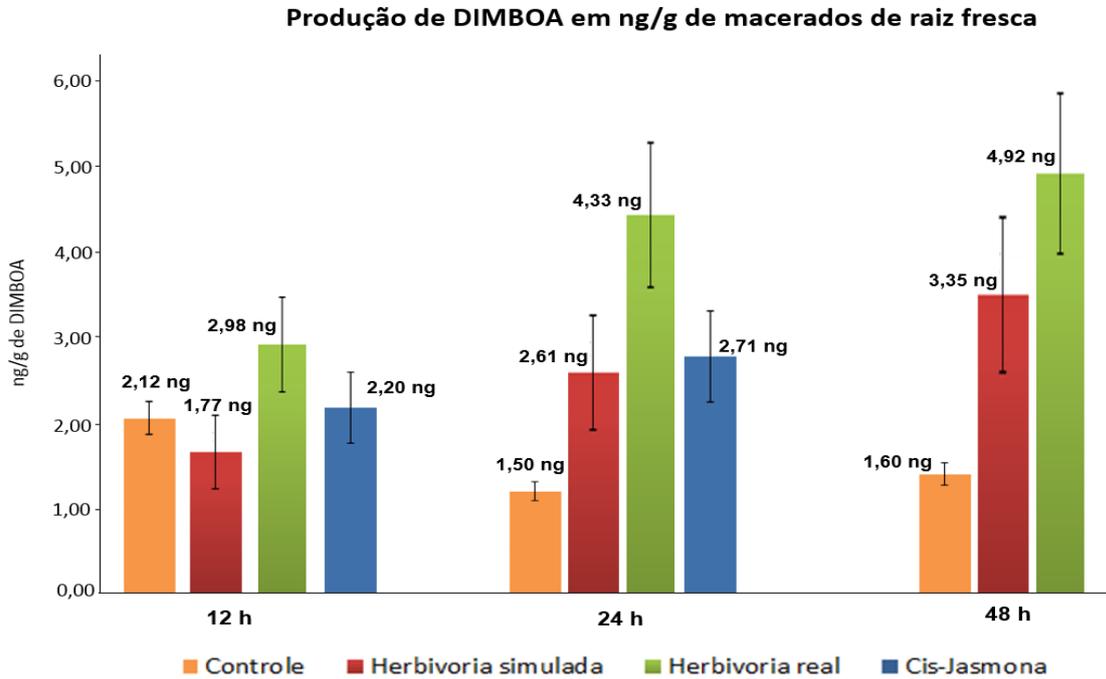


Fonte: Autor, 2013.

Nota: O círculo em vermelho mostra o conjunto de picos que surgiram no tratamento 48h do grupo Cis-Jasmona impedindo a determinação da área do pico de DIMBOA para calcular sua quantidade.

Os resultados mostram que houve produção de DIMBOA apenas nas raízes e que esta aumenta gradativamente nos tempos analisados nas amostras submetidas à herbivoria simulada sendo mais pronunciados na herbivoria real no tempo 48h (Figura 25).

Figura 27 – Produção de DIMBOA em ng/g de peso fresco de raiz de cana-de-açúcar em HPLC Shimadzu LC-10A Coluna C-18.



Fonte: Autor, 2013.

Milho, trigo e outras gramíneas produzem grandes quantidades de benzoxazinoídeos e seus glicosídeos, atuando como elementos antialimentares por conta de sua toxicidade e alelopáticos. Provavelmente essas atividades ocorrem devido à natureza eletrofílica das agliconas, porém isso ainda não está claro necessitando maiores informações. Sabe-se que em sistemas biológicos a glutathiona (GSH) é o principal composto eletrofílico, reagindo com DIMBOA em milho.

Dixon et al (2012) dizem que a DIMBOA esgota os níveis de GSH de forma irreversível inativando enzimas ativas com resíduos de cisteína, e dessa forma, tornando a planta tóxica, principalmente quando jovens, caso sejam ingeridas por insetos.

O trabalho de Guthrie et al., 1986 com plantas de milho resistentes a broca do milho (*Ostrinia nubilalis*) e plantas suscetíveis mostrou-se que a quantidade de DIMBOA presente nas plantas resistentes era maior além de observar que as plantas mais jovens também apresentaram as maiores concentrações.

Um interessante trabalho sobre a quantidade de DIMBOA encontrada em milho, é o de Chandra et al., 2013 que mostra a influência da luminosidade na síntese de DIMBOA. Seus resultados mostraram que plantas cultivadas à luz

apresentavam concentrações de DIMBOA mais elevadas em relação as plantas cultivadas na ausência de luminosidade.

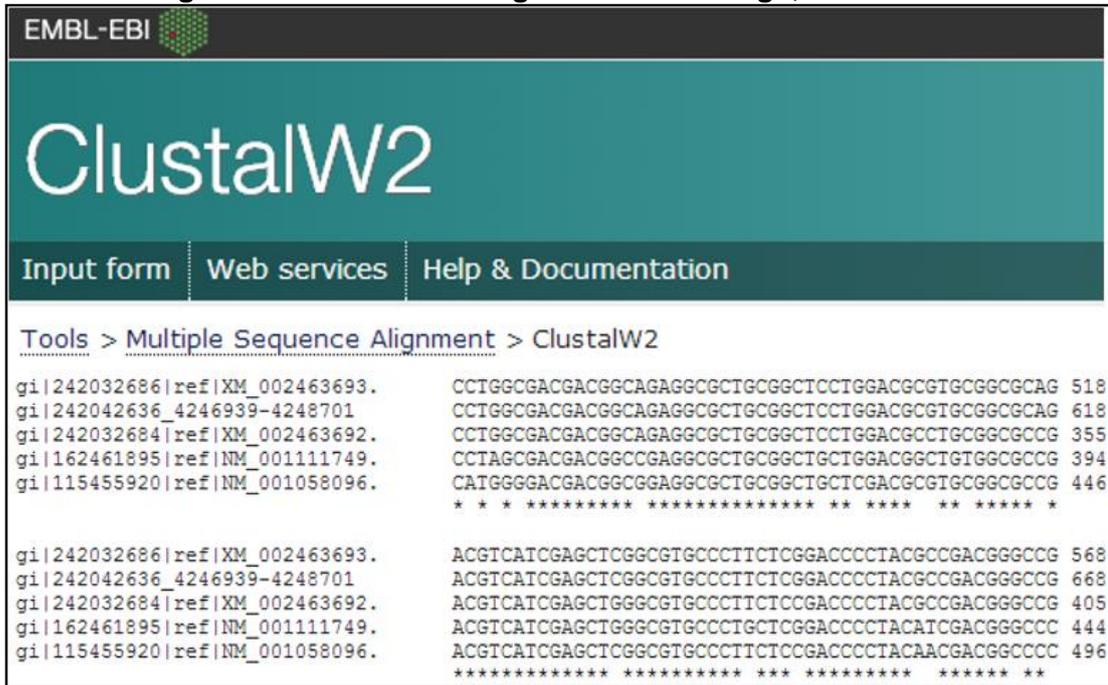
O aumento de DIMBOA após o ataque por insetos foi mostrado por Gutierrez et al, (1988) quando utilizou duas linhagens de milho que apresentam diferentes concentrações de DIMBOA (A-619 com maior concentração e W-117 com menor). As plantas foram infestadas com *Sesamia nonagrioides* e tanto a linhagem com alta concentração quanto a de baixa concentração, aumentaram a produção de DIMBOA em comparação com as plantas controle que não foram infestadas. Observou também que no milho a quantidade encontrada nas folhas não difere da encontrada no caule.

5.8 Construção dos primers para genes putativos Bx envolvidos na produção de DIMBOA em cana-de-açúcar

Um caminho de sinalização encontrado em plantas monocotiledôneas, resulta na ativação do gene codifica o indole-3-glicerol fosfato liase (IGL) que em milho catalisa a formação de indol livre e é seletivamente ativado por volicitina, um elicitor presente na secreção oral de insetos. As propriedades enzimáticas do *IGL* são semelhantes a do gene *BX1*, uma enzima de milho, que serve como ponto de entrada para a biossíntese dos metabólitos secundários defesa DIBOA e DIMBOA. Esta via de sinalização, a via associada ao triptofano (TAP), possivelmente deve ocorrer também em cana de açúcar já que alguns dos genes ortólogos foram identificados, sugerindo um mecanismo de resposta similar (FALCO et al, 2001).

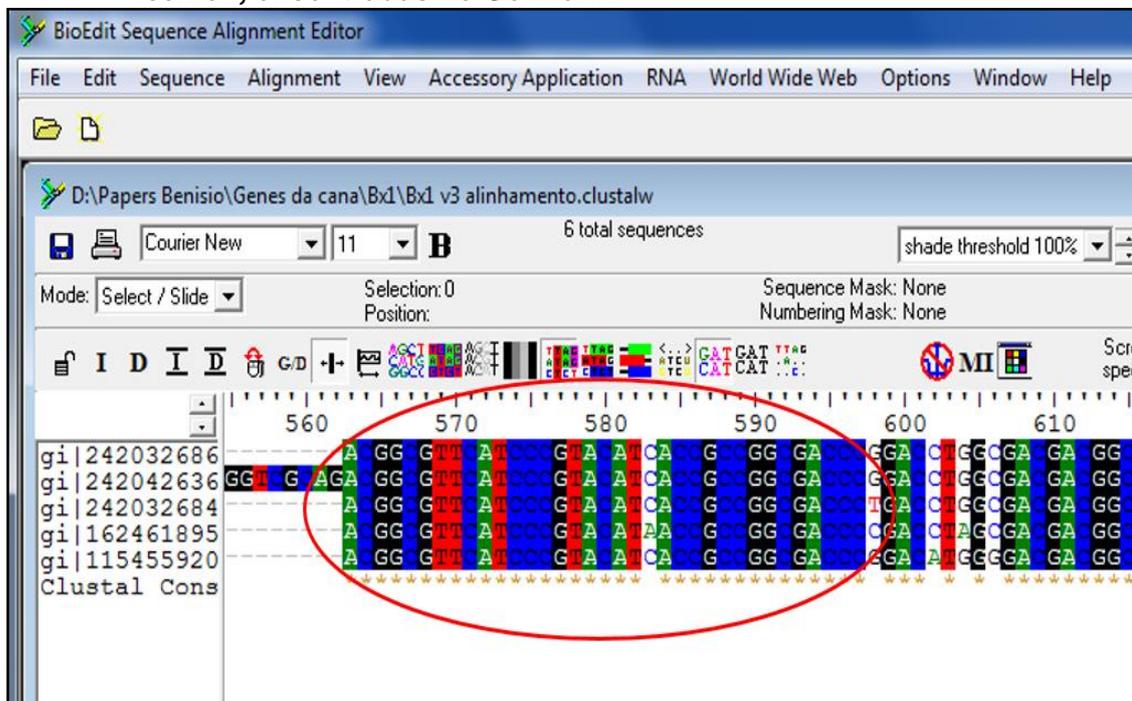
Foi realizada uma busca no GenBank por sequências dos genes da família Bx de *Zea mays*, *Triticum aestivum*, *Sorghum bicolor*, *Oryza sativa*, *Hordeum lechleri* e *Hordeum vulgare*. As sequências encontradas foram alinhadas inicialmente no programa ClustalW2 (Figura 26) e o arquivo do alinhamento utilizado no software BioEdit 7.1.5.0 (Figura 27) para localização de regiões conservadas entre os genes.

Figura 28 – Programa ClustalW2 utilizado para o alinhamento inicial em busca de regiões conservadas dos genes *Bx1* de sorgo, milho e arroz.



Fonte: Autor, 2013.

Figura 29 – Programa BioEdit 7.1.5.0 e o alinhamento das seqüências de *Bx1* de *Zea mays*, *Triticum aestivum*, *Sorghum bicolor*, *Oryza sativa*, *Hordeum lechleri*, encontradas no GenBank.



Fonte: Autor, 2013.

Nota: A elipse em vermelho destaca uma região bem conservada com uma única variação (C ou A) para construção de primers

Os primers construídos para localizar os genes da família Bx em cana de açúcar foram sintetizados e dependendo da quantidade de variações, mais de um primer foi construído para a mesma região. Foi adotada a mesma estratégia (Figura 26 e 27) para a busca de todos os genes Bx (Bx1 a Bx9). A tabela 6 abaixo lista os primers utilizados para localizar os RNAs mensageiros de cada gene Bx em cana-de-açúcar:

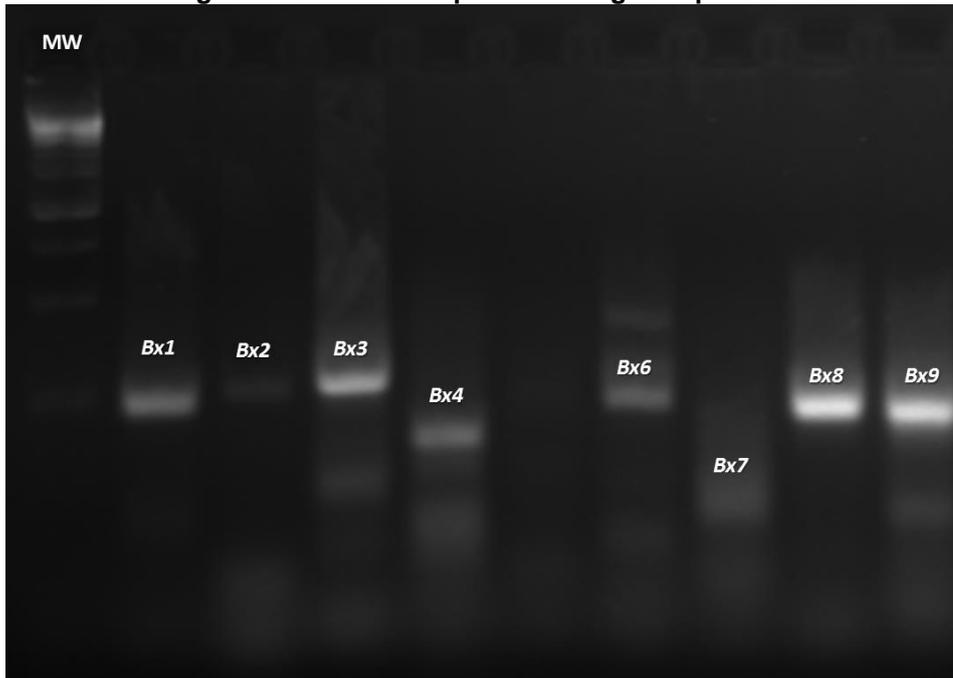
Tabela 6 – Primers utilizados na reação multiplex para amplificação de trechos dos genes Bx em cana-de-açúcar

Gene	Primers
<i>Bx1</i>	Bx1fa – 5' ACGGCGTTCATCCCGTACAT 3' / Bx1ra - 5' ACAGCTCCGGCGTCACCTCC 3'
<i>Bx2</i>	Bx2fa - 5' TGGACATGAGCGAGCTCCTG 3' / Bx2fb - 5' TGGACATGACCGAGCTCCTC 3' Bx2ra - 5' TCGTCGATGAGCTTGTCGAG 3' / Bx2rb - 5' TCGTCAATTAGCTTGTCGAG 3' Bx2rc - 5' TCATCGATGAGCTTGTCGAG 3'
<i>Bx3</i>	Bx3fa - 5' GCTGCCCATCATCGGCCACC 3' / Bx3fb - 5' CCTGCCAATCATCGGCCACC 3' Bx3ra - 5' CTGGCCTGCCGCCAGTACTC 3' / Bx3rb - 5' CTGCCCTGCCGCCAGTACTC 3' Bx3rc - 5' CTGGCCTGCCGCCAGTGCTC 3'
<i>Bx4</i>	Bx4fa - 5' GCTCCCCATCATCGGGCACC 3' / Bx4fb - 5' GCTACCCATCATCGGCCACC 3' Bx4fc - 5' GCTCCCCATCGTCGGCCACC 3' / Bx4ra - 5' CACGTGGTCGTGCGTGCG 3' Bx4rb - 5' GATGTGGTCCTGCGTGCG 3'
<i>Bx5</i>	Bx5fa - 5' TGGTCCATGGCCTCCCACAT 3' / Bx5ra - 5' GCGGCCAGAACTCGTTCAT 3' Bx5rb - 5' GCCGCCAGCACCTCGTTCAT 3'
<i>Bx6</i>	Bx6fa - 5' CTGGCGCGACACGCTCTTC 3' / Bx6fb - 5' CTGGCGCGACACCCTCTTC 3' Bx6ra - 5' TCCGGGCACGGCGGGTAGTA 3' / Bx6rb - 5' TCCGGGCACGCCGGTAGTA 3'
<i>Bx7</i>	Bx7fa - 5' TCGCTCGTCGACGTGCGCGG 3' / Bx7fb - 5' TCCCTCGTCGACGTGCGCGG 3' Bx7fc - 5' TCGCTCGTGGACGTGCGCGG 3' / Bx7ra - 5' GTGCAGAATCCACTTGAGCA 3' Bx7rb - 5' GTGCAGGATCCACTTGAGCA 3'
<i>Bx8</i>	Bx8fa - 5' GTGCTGTACGTGAGCTTCGG 3' / Bx8fb - 5' GTGCTCTACGTGAGCTTCGG 3' Bx8ra - 5' AGCACCTCCTCCTGCGGCGC 3'
<i>Bx9</i>	Bx9fa - 5' GTGCTCTACGTGAGCTTCGG 3' / Bx9fb - 5' GTGCTCTACGTGAGCTTCGG 3' Bx9fc - 5' GTGCTGTACGTGAGCTTCGG 3' / Bx9fd - 5' GTGCTGTACGTGAGCTTCGG 3' Bx9fe - 5' GTGCTGTACGTGAGCTTCGG 3' / Bx9ra - 5' ACCTCCTCTTGCGGCCGCCA 3' Bx9rb - 5' ACCTCCTCCTGCGGCCGCCA 3' / Bx9rc - 5' ACCTCCTGCTGCGGCCGCCA 3'
<i>GAPDH</i>	GAPH1- 5' CGCTGCTGTCTATGCTGAG 3' / GAPH2 - 5' GGGATGGTAGCAGAAATGGA 3'

Fonte: Autor, 2013.

Os primers foram utilizados com o RNA total extraído de 1g das partes aéreas e de raízes de cada planta utilizada nos experimentos em reações de multiplex PCR para cada conjunto. Amostras de partes aéreas não apresentaram amplificação, sugerindo que não há expressão desses genes nas folhas e colmo de cana de açúcar corroborando com a não detecção de DIMBOA na parte aérea. A figura abaixo mostra um gel de agarose a 2% com os produtos de amplificadores de cada grupo.

Figura 30 – Gel de agarose 2% com os amplicons dos genes putativos *Bx* de cana-de-açúcar.



Fonte: Autor, 2013.

Nota: Da esquerda para direita: Marcador de peso molecular de 100pb; amplicon do *Bx1* com 200pb; amplicon do *Bx2* acima de 200pb; amplicon do *Bx3* acima de 200pb; amplicon do *Bx4* abaixo de 200pb; amplicon do *Bx6* acima de 200pb; amplicon do *Bx7* abaixo de 200pb aproximadamente 150pb; amplicon do *Bx8* com 200pb; amplicon do *Bx9* com 200pb. Não houve amplificação do *Bx5*.

Os fragmentos foram recortados, isolados da agarose e submetidos ao sequenciamento pela empresa Eurofins MWG Operon Uk (<http://www.eurofinsgenomics.eu/>). O resultado de cada sequenciamento foi organizado de acordo com o grupo. No programa BioEdit 7.1.5.0 os grupos foram alinhados e gerada uma sequência consenso. Cada sequência consenso (Tabela 7) foi submetida ao BLAST para confirmação do produto (Figura 29) e em seguida submetida ao software Primer3 para construção de primers específicos para os fragmentos encontrados em cana-de-açúcar (Tabela 8).

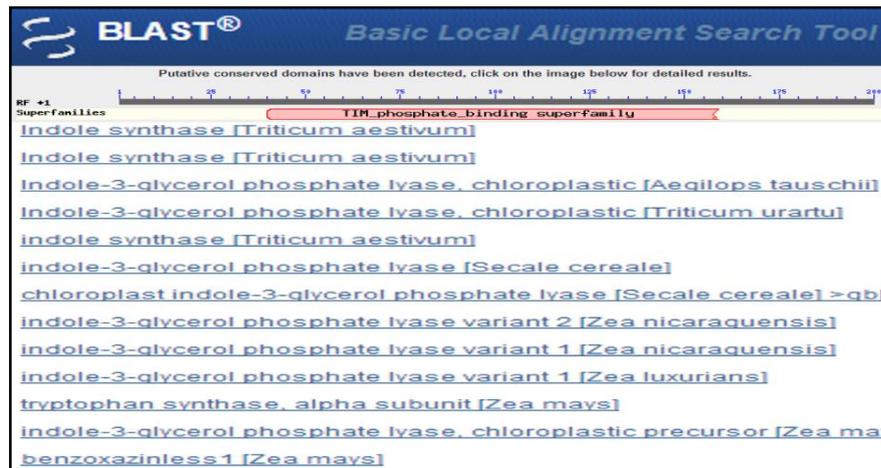
Tabela 7 – Lista de sequências consensus após sequenciamento dos fragmentos e confirmação através do BLAST para construção de primers específicos.

Gene	Sequências consensus
Bx1	GAATGACGACACAGCGGAGGAGGCGTTGTGCCTACTAAAGCCTGTGGCGCCACGTCATCGAGCTGGATCC CTAAGTCGACAGCCCCATCATCCAGGCTTCTAGCTTCCGGGCTCTGGTGGGGGGCATCAGGCATGATGATAT GGATGGCGTGCTGGAGATAATGCTAGCTCATGCAGGGAGGTGACGGCAGAGCTGT
Bx2	CTGGTGTGCCGCGCGGTGTCGGGCAAGTTCTCCATGGAGGAAGGCCGGAACAGGCTGTCCGGGAGCTCAC CGACATCAACGCGCAGCTCCTGGGCGGGTTCCACATCCAGGACTACTTCCCCGGCTGGGGAGGATCGAGC TCGTCAGGAAGGTGGCGTGCGCCAAGACTAGACGAGTGAGGAAGCGCTGGGACGATCTTCTCGACAAGCT AATTGACGAAA
Bx3	TCCTGACCGTGGACGCGGGACGCGACGCGAACACATGGTCGTGAGTGCGCATGATCGCCTGCGCGGCCCGC GGGGAGGACACGATGAGGGTGGGGACGGCGCCGAGGCGGAGGAGCATGAGGCCGTGCGGGCCATG
Bx4	AGACGATGAGTGTTGGTACGGCGCCGAGGTGGAGGAGCATGAGGCCATCACGGCCATGCCTGGCGGCGAG GTCACGGAGGGAGACGTGCGGGAGGGAGCCAATGAGGTGCAGGTGGCCGACGATGGGGAGCCCTT
Bx6	CGCGCAGCCATCTCGCGCAGGTGGTTCGCTGGCCAGCCGAGGGACTCCGACAGCAGCTCCAACACCCGCA GCGCCAGCTTCGTCGCCGCTCGCCGACTCCAGCATCACGTACCTGACAGCCTCGGGGAGCTCCTCTAGCC GTGGCGGGTCCGGCGCCA
Bx7	TTGAAGTGCGGGAAGCCACTTGTGACGTCAACCGGAGAAGGGCCTCGCTCAGGCCGGCGACGTCGACGAG GGAAT
Bx8	CGGGACTGGTGGAGACGGCGTGGGGCATCGCCGGCAGCGGCGTGCCGTTCTCTGGGTGGTCCGGCCGGG CATGGTCCACGGGTCCGCGGACGACCACCGTCTCCCCGAGGGGTTGCGGGCAAAGTCGTGGCGT
Bx9	CGGGACTGGTGGAGACGGCGTGGGGCATCGCCGGCAGCGGCGTGCCGTTCTCTGGGTGGTCCGGCCGGG CATGGTCCACGGGTCCGCGGACGACCACCGTCTCCCCGAGGGGTTGCGGGCAAAGTCGTGGCGTGGGGCGCC GCAGGAGGAG

Fonte: autor, 2013.

Nota: As sequências estão apresentadas no sentido 5' → 3

Figura 31 – Reprodução da tela do BLAST com os resultados para sequencia consenso *Bx1*



Fonte: Autor, 2013.

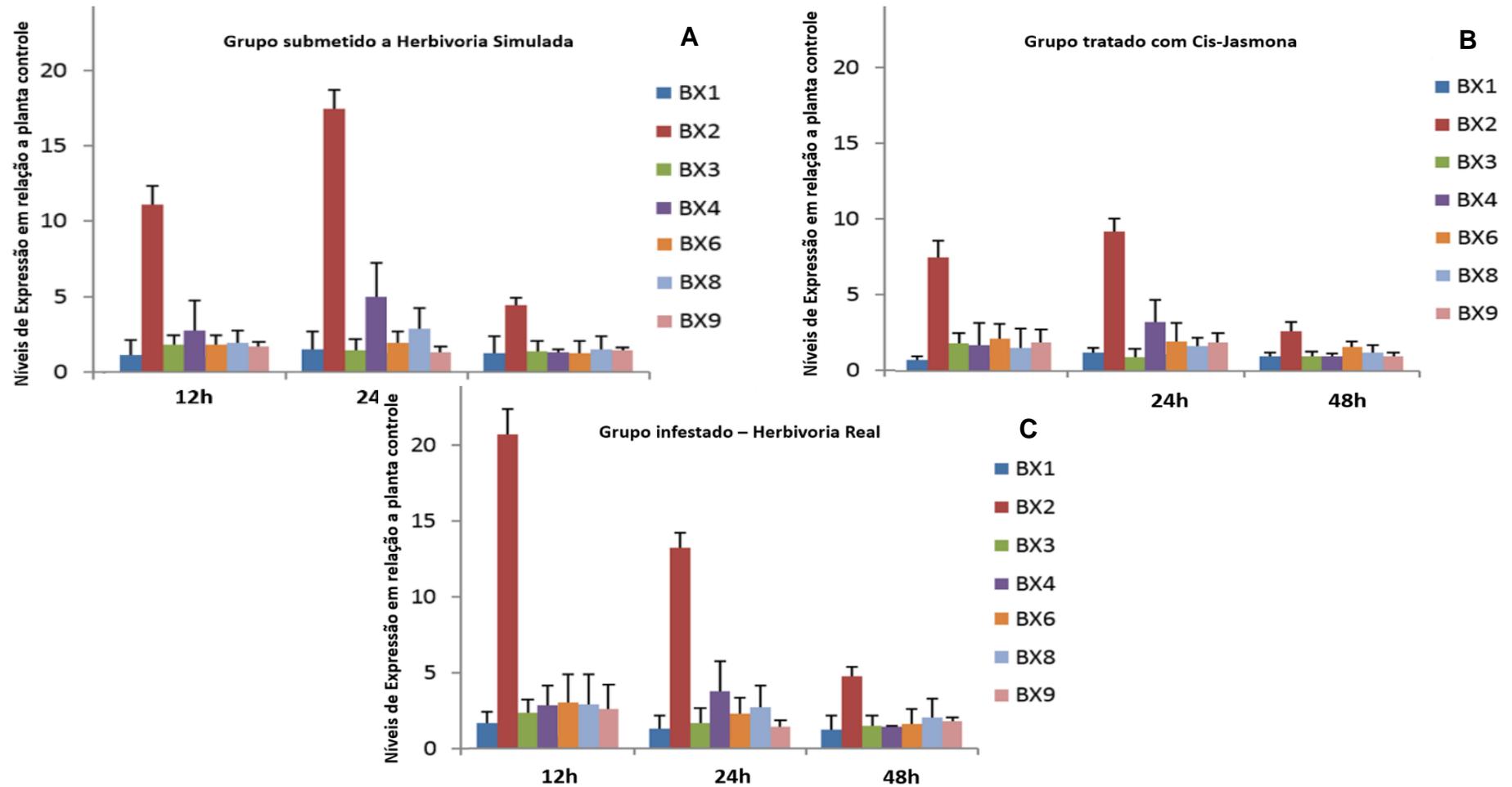
Tabela 8 – Primers específicos para as sequências consenso utilizados na reação qPCR para análise de expressão do genes *Bx* de cana-de-açúcar.

Gene	Primers específicos para <i>Bx</i> de cana-de-açúcar
<i>Bx1</i>	Bx1f – 5' AGGAGGCGTTGTCCTACTA 3' Bx1r – 5' TCGACTTAGGGATCCAGCTC 3'
<i>Bx2</i>	Bx2f – 5' GAGCTCACCGACATCAACG 3' Bx2r – 5' CGGGGAAGTAGTCCTGGAT 3'
<i>Bx3</i>	Bx3f – 5' AACACATGGTCGTGAGTGC 3' Bx3r – 5' CCACCTCATCGTGCCTC 3'
<i>Bx4</i>	Bx4f – 5' GAGGTGGAGGAGCATGAGG 3' Bx4r – 5' CACGTCTCCCTCCGTGAC 3'
<i>Bx6</i>	Bx6f – 5' CTCCGACAGCAGCTCCAA 3' Bx6r – 5' GTCAGGTACGTGATGCTGGA 3'
<i>Bx7</i>	Bx7f – 5' AAGTGCGGGAAGCCAATT 3' Bx7r – 5' GTCGCCGGCCTGAGC 3'
<i>Bx8</i>	Bx8f – 5' CCGTTCCTCTGGGTGGTC 3' Bx8r – 5' GGGAGACGGTGGTCGTC 3'
<i>Bx9</i>	Bx9f – 5' CCGTTCCTCTGGGTGGTC 3' Bx9r – 5' GGGAGACGGTGGTCGTC 3'

Fonte: Autor, 2013.

Os resultados demonstram um aumento na expressão, em relação ao grupo controle, de todos os genes, porém não foi observado diferenças significativas entres os grupos para os genes *Bx1*, *Bx3*, *Bx4*, *Bx6*, *Bx7*, *Bx8* e *Bx9*. Foi detectado um aumento diferencial para o gene *Bx2* e em uma menor escala para os demais genes no grupo herbivoria real. Os níveis de expressão de cada um dos grupos nos tempos analisados para os genes *Bx* encontram-se nos gráficos abaixo (Figura 28).

Figura 32 – Gráficos A, B e C: Níveis de expressão dos genes putativos *Bx* de cana-de-açúcar nos três tratamentos analisados por qPCR



Fonte: Autor, 2013.

As razões pelas quais não foram encontradas respostas significativas para os demais genes, estão sendo analisadas, uma vez que há descrito na literatura que em outras plantas eles estão ativos e são importantes (AHMAD et al., 2011). Acreditamos ser cedo para afirmar que os demais genes não tenham participação nesse mecanismo ou que isso seja algo exclusivo da cana-de-açúcar.

Durante o ataque pelo herbívoro, componentes presentes no regurgito das larvas funcionam como elicitadores induzindo respostas da planta. Um desses elicitadores é um derivado de ácidos graxo o N-(17-hidroxiolenolil)-L-glutamina, mais conhecido como volicitina, que desencadeia a síntese e liberação de componentes voláteis, incluindo terpenóides e indol no milho (SAWADA et al., 2006). Nossos resultados revelam que tanto as plantas infestadas por *D. saccharalis* quanto as submetidas a herbivoria simulada apresentaram um aumento da produção do volátil β -cariofileno e de ácidos hidroxâmicos (DIMBOA).

Frey et al., 2000 mostrou que a enzima (IGL), catalisa a formação de Indol livre é ativada seletivamente por volicitina, além disso, mostrou que a análise das sequências dos genes *IGL* e *Bx1* possuem evolutivamente uma relação com a triptofano-sintase subunidade alfa. Essa relação também foi citada por Ahmad et al 2011, mostrando que a produção dos metabólitos secundários, ácidos hidroxâmicos benzoxazinoídes como a DIMBOA, são catalisados pela ação do gene *Bx1* ou do IGL. O Gene *Bx1* inicia as reações subsequentes (genes *Bx1* ao *Bx9*) para produção de DIMBOA, sendo no milho o principal responsável para produção de DIMBOA, enquanto que o IGL é induzido por ferimentos de herbivoria. Nossos resultados demonstram que o gene da biossíntese de DIMBOA mais ativado após a herbivoria em cana-de-açúcar foi o gene *Bx2*.

O gene *Bx5* não apresentou resultados satisfatórios durante o processo de busca do gene com os primeiros conjuntos de primers, por esta razão ficou fora de nossa análise. Os poucos fragmentos que apareciam nos géis de agarose, também foram cortados e sequenciados apresentando resultados insatisfatórios durante a análise de busca de similaridade pelo BLAST.

Durante nossos experimentos de herbivoria real, observamos que as larvas de *D. saccharalis* quando construía as galerias no colmo da planta, iam em direção a raiz, porém, em nenhum dos casos observados elas chegaram até as raízes. Um

dos motivos pode ser a presença de DIMBOA, no entanto carecem ainda estudos adicionais.

Segundo Melo (1984), fungos oportunistas *Glomerella tucumanensis* e *Colletotrichum falcatum* infectam a cana-de-açúcar no momento em que a *D. saccharalis* adentra no colmo causando o fenômeno conhecido por “podridão vermelha”. Nair et al., 1990 citam que a DIMBOA é um metabólito secundário de defesa das plantas contra fungos, tais como *Fusarium nivale*. Outro modo de ação mostrado por Niemeyer, (2009) é o da resistência contra a mastigação de herbívoros que causa danos teciduais. Acreditamos que o motivo para o surgimento desta fitopatogenia, a podridão vermelha de cana-de-açúcar, se dê pelo fato de não existir a produção DIMBOA nas partes aéreas da cana-de-açúcar como demonstrado em nossos resultados. A presença ou a manipulação de DIMBOA nas parte aéreas da planta poderia surgir como potencial alvo para aumento de resistência da cana aos fungos.

Além disso, Nair et al, 1990 descrevem que a DIMBOA exerce um efeito tóxico para numerosas larvas nos cereais, como por exemplo, as larvas de *Ostrinia furnacalis* que demoram muito mais tempo para atingir o núcleo da planta quando seus tecidos secretam DIMBOA além de aparentemente diminuir seu apetite.

Outro trabalho que cita a DIMBOA presente no milho e atuando com efeito tóxico é o apresentado por Campos et al. (1990), em que larvas de *Ostrinia nubialis* sofreram maior ataque pelo endoparasitóide *Diadegma terebans* quando fornecido em dieta artificial com 0,3mg de DIMBOA. Além disso foi observado também diminuição do peso das pupas e aumento da mortalidade.

Cambier et al., 2000 estudou a variação da quantidade de DIMBOA em relação a idade e órgão do milho e seus resultados mostraram que a concentração de DIMBOA é elevada após a germinação das sementes, continua a ser sintetizada até os 10 primeiros dias e em seguida diminui com a idade da planta e, diferente do que foi visto em nossos resultados, também mostra que ela está presente nas partes aéreas do milho.

O trabalho de Neal et al., 2012 mostrou que em milho DIMBOA é o principal composto em exsudatos radiculares desta gramínea. Plantas expostas a *Pseudomonas putida* KT2440, bactéria colonizadora competitiva, sendo benéfica a planta, apresentavam aumento da produção de DIMBOA, neste caso, atuando como

elemento de quimiotaxia e atraindo uma quantidade maior de *P. putida* em relação a plantas mutantes que não expressavam o *Bx1* gene envolvido na biossíntese dos benzenoxanóides. Isso mostra um papel de semioquímico para DIMBOA recrutando rizobactérias benéficas ao milho nas fases iniciais de crescimento e nas vulneráveis.

Outra informação muito importante mostrando o papel dos ácidos hidroxâmicos como metabólitos de defesa encontra-se nos resultados de Ahmad et AL., 2011 utilizando milho do tipo selvagem e deficientes do gene *Bx1* e do gene *Igl*. As plantas foram infestadas com o pulgão do cereal *Rhopalosiphum padi* e observados os níveis de resistência ao fungo *Setosphaeria turtica*. As plantas deficientes dos genes *Bx1* e *IGL* apresentaram melhor desenvolvimento do pulgão e menor resistência a penetração ao fungo em relação a planta selvagem. Observou-se ainda que nos casos de grande ruptura de tecido durante o ataque houve o aumento da produção de DIMBOA. Assim, as funções DIMBOA como um sinal regulamentar de defesa no milho além da sua atividade bem caracterizada como um metabolito de defesa biocida.

Nossos resultados corroboram com o observado com Ahmad et al. (2011), que também concluiu que a quantidade de DIMBOA atua como um sinal de feedback negativo transcricional extracelular para o início da transcrição dos genes *Bx*. Dessa forma, visto que nossas análises mostraram o aumento da concentração de DIMBOA ao longo do tempo (12h>24h>48h) e diminuição do nível do gene *Bx2* ao longo do mesmo período (Figura 30), possivelmente esse mecanismo de feedback negativo tenha ocorrido na cana-de-açúcar.

A produção mundial de grãos sofre perdas inestimáveis todos os anos tanto em quantidade quanto em qualidade. A cana-de-açúcar, mesmo apresentando aumentos na sua produção nos últimos anos, ainda apresenta, uma quantidade que não é utilizada pela indústria devido a perdas consequentes a pragas. Segundo Sant'Anna et al. (2001) a investigação de mecanismos naturais de defesa das plantas contra organismos agressores é uma alternativa para o desenvolvimento de novas classes de inseticidas. Metabólitos secundários produzidos pelas plantas com função de defesa, como no caso dos benzoxazenoides, que podem atuar contra enzimas digestivas de insetos herbívoros, são uma alternativa promissora.

5.9 Resposta da cana-de-açúcar a aplicação de Cis-Jasmona

Explorar a indução de vias de defesa em plantas para controle de pragas, doenças e ervas daninhas é uma das estratégias mais pesquisadas atualmente, pois a substituição de pesticidas sintéticos, por elementos naturais trariam inúmeros benefícios, como menor impacto ao meio ambiente e a saúde humana.

Segundo Pickett et al. (2007), essa abordagem envolve processos de aplicação de produtos naturais patenteados em plantações para a indução de defesa da planta, na qual esses compostos teriam a capacidade de ligar o sistema defensivo da planta sem agredir o meio ambiente.

A cis-jasmona, é bem conhecida como um componente volátil de plantas e sua liberação pode ser induzida por danos que ocorrem durante a herbivoria. Birkett et al, (2000) demonstraram que a CJ induz defesa em feijão (*Vicia faba*) produzindo (E)-omiceno, atraindo o parasitóide do herbívoro e iniciando assim uma interação tritrófica e conseqüente proteção da planta.

CJ foi descrita também na indução de defesa indireta em *Arabidopsis thaliana* L. (Brassicaceae) onde houve a atração do inimigo natural do pulgão *Aphidius ervi* (BRUCE et al., 2008) e em soja, *Glycine max* L. (Fabaceae), onde ocorreu a atração de parasitóides de ovos e inimigos naturais de percevejos (MORAES et al., 2009).

O tratamento de plantas de algodão, *G. hirsutum*, com CJ resultou em alteração nos níveis de compostos orgânicos voláteis emitidos para defesa e repelência do pulgão do algodoeiro. Estas plantas pareceram emitir níveis mais elevados de quatro compostos relacionados a defesa, ou seja, o composto volátil folha (Z) -3-hexenilo de etilo, o homomonoterpeno (e) -4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (DMNT), o salicilato de metila e o homossesquiterpeno (e, E) -4,8,12 - trimetiltrideca-1,3,7,11-tetraeno (TMTT) (HEGDE et al. 2012). Nossos resultados demonstraram que a CJ não induziu a produção de voláteis em cana-de-açúcar.

Estudos realizados em trigo (*T. aestivum*) por Moraes et al., (2007) revelaram a produção mais elevada de metabolitos de defesa, entre eles DIMBOA, nas partes aéreas e raízes em plantas submetidas ao tratamento com CJ quando comparado com plantas não tratadas. Comprovou-se pela primeira vez que a cis-jasmona também induz a produção selectiva de metabolitos secundários que são capazes de reduzir diretamente o desenvolvimento de pragas.

As plantas de cana-de-açúcar tratadas com CJ não apresentaram emissão de voláteis e não apresentaram aumento da expressão do gene *TPS*, ficando bem abaixo dos níveis encontrados nos outros tratamentos. No entanto, quando analisada a produção de DIMBOA houve uma resposta similar a encontrada nas plantas submetidas a herbivoria. O tempo de 48h não pôde ser analisado devido ao surgimento de outros picos juntos com o pico de DIMBOA impedindo assim sua análise (Figura 24), porém foi possível confirmar sua presença através da espectrometria de massas da amostra (dados não mostrados). A expressão dos genes *Bx* mesmo sendo similar ao padrão encontrado no grupo Herbivoria simulada, foi menos pronunciada. No entanto, para o gene *Bx2*, houve um aumento de aproximadamente 10 vezes na expressão de plantas tratadas com CJ em relação ao controle.

O estabelecimento de CJ como um ativador potencialmente útil a planta permitiu seu patenteamento e iniciou-se um programa de melhoramento que envolve o *British Wheat Breeders* (BBSRC Research Grant, 2007 - 2010, “*The potential to control insects and other organisms antagonistic to wheat by upregulation of hydroxamic acids*” - O potencial para o controle de insetos e outros organismos antagônicos ao trigo por regulação positiva de ácidos hidroxâmicos') (Pickett et al, 2007).

Realizamos os testes com um grupo de plantas expostas a cis-jasmona para verificar se haveria resposta como já visto em outras plantas. Ficou claro que não houve indução para emissão de voláteis, porém há uma produção de DIMBOA na raízes induzida pela cis-jasmona e uma expressiva indução do gene *Bx2*, possivelmente regulador da biossíntese de DIMBOA em cana-de-açúcar.

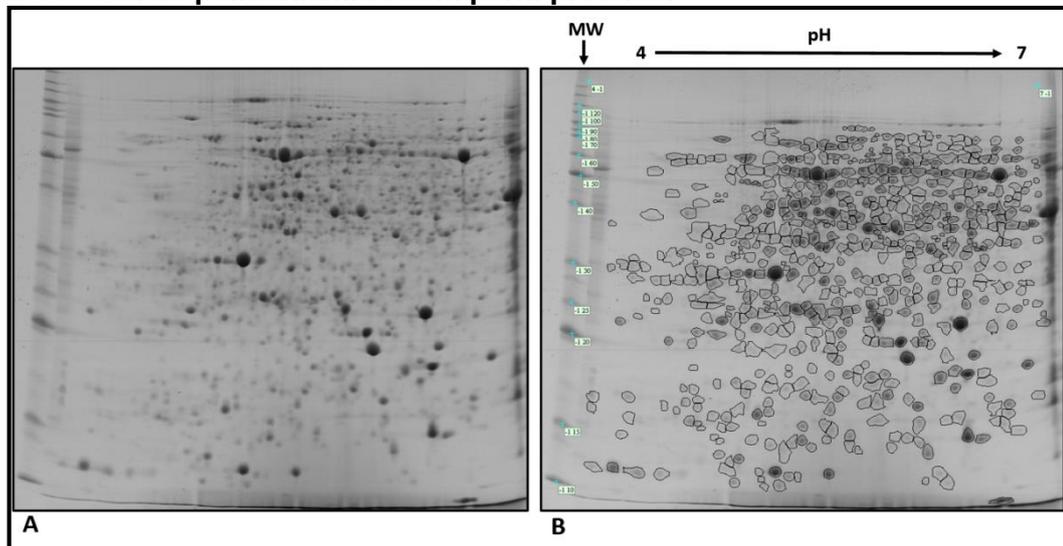
5.10 Análise do perfil proteico e identificação das proteínas diferencialmente expressas em resposta a herbivoria

As plantas, durante a evolução, para reduzir os danos causados pelas pragas, têm desenvolvido uma série de mecanismos de defesa, dentre eles, barreiras físicas, metabólitos tóxicos, voláteis sinalizadores e proteínas. Neste contexto, através da análise proteômica, identificamos proteínas de extratos fenólicos de tecido foliar de cana-de-açúcar elicitadas pela herbivoria e secreção oral de *D. saccharalis*.

Através da identificação destas proteínas, observamos que houve uma redução na taxa fotossintética e na glicólise após elicitação. Frequentemente tem-se descrito para outras plantas uma supressão sistêmica da fotossíntese na herbivoria por lagartas. Por outro lado, proteínas envolvidas na defesa da planta, como na detoxificação e proteção celular, tem sua síntese aumentada após a elicitação (GIRI et al, 2006; THIVIERGE et al., 2010).

Os perfis protéicos das partes aéreas das plantas apresentaram 650 spots (Figura 33) sendo 143 que apresentaram com diferenças nos níveis de expressão entre os tratamentos. As proteínas significativas identificadas estão listadas com suas respectivas funções na tabela 9.

Figura 33 – Gel de poliacrilamida com perfil proteico.



Fonte: Autor, 2013.

Nota: A) Imagem de Gel de poliacrilamida com perfil protéico de folha/colmo; B) após o tratamento da imagem no software ImageMaster 2D Platinum 7.0 os 650 spots localizados. Marcador de peso molecular (MW) Full-Range Rainbow Molecular Weight (225kDa – 12kDa). Cada spot foi reconhecido pelo software e delimitado para iniciar o processo de comparação com os demais grupos.

Tabela 9 – Lista das proteínas diferenciadas e suas funções nos diferentes tratamentos.

Proteína	Função	Padrão de Indução		
		C	HS	HR
Ribulose bisfosfato carboxilase oxigenase (RUBISCO)	Fotossíntese	↑	↓	-
Proteína 1 potencializadora envolvida com Oxigênio (PsbO)	Fotossíntese	↑	↓	-
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase B (GADPH)	Metabolismo	↓	↑	-
Peroxirredoxina (Putativa)	Via reativa de oxigênio	*	-	-
Glutationa S-Transferase 1 (GST)	Defesa	↓	↑	-
Proteína ribossomal 50S L12-1	Biossíntese de proteínas	↓	↑	-
Proteína de ligação ao DNA	Transcrição e tradução	-	*	-
O-acetil serina(tiol)liase	Metabolismo de aminoácidos	-	*	-
Fator de alongamento termo instável (EF-Tu)	Chaperonina	↓	↑	-
Monotiol Glutarredoxina-S12	Defesa	-	-	*
Hypothetical protein SORBIDRAFT_07g027960 [Sorghum bicolor]	-	-	-	*

Fonte: Autor, 2013.

Nota: (-) Ausente (*) exclusiva (↑) expressão aumentada (↓) expressão diminuída

Muitas vezes, uma supressão sistêmica da fotossíntese está associada a herbivoria por lagartas. Thivierge et al., (2010) encontrou cinco proteínas de milho modificadas de um modo específico por lagartas *Spodoptera exigua*, entre elas, duas ribulose bifosfato carboxilase/oxigenas, também conhecida como Rubisco (Rubisco e Rubisco Activase) que estão associadas com modificações oxidativas da fotossíntese.

A Rubisco é uma proteína envolvida na fixação do carbono durante a fotossíntese e por esta razão acredita-se que seja a proteína mais abundante no planeta. Apesar dessa enzima catalisar funções de carboxilação, estudos realizados por Pausen e Lane (1966) confirmam a noção de que uma parte da Rubisco não está disponível para este fim e desempenha o papel de proteína de armazenamento. Esta ideia foi sugerida no início dos anos 1960, quando a Rubisco foi descoberta e encontrada para compensar até 60% do proteína solúvel no cloroplasto.

Quando em condições de diminuição ou ausência de CO₂ atmosférico, para as plantas, a Rubisco é degradada ou diminuída (CAEMMERER et al., 2005). Também foi relatado que espécies reativas de oxigênio (ROS) podem modificar a Rubisco, facilitando a sua degradação por proteases. Esse fato sugere a explicação na diminuição dessa proteína quando em condições de ataque ao vegetal, visto que a produção de ROS está envolvida em respostas induzidas por herbivoria. Nós observamos uma diminuição na expressão desta proteína no grupo submetido a herbivoria simulada.

Demonstrou-se que a diminuição da concentração de proteínas induzidas por herbívoros que participam da fotossíntese são maiores nas áreas atacadas por herbívoros, um resultado que aponta para a redução induzida por herbívoros na proteína Rubisco em cana-de-açúcar como uma explicação potencial para a inesperada diminuição na taxa fotossintética em folhas atacadas (GIRI et al., 2006).

A diminuição no teor de proteínas envolvidas na fotossíntese durante a herbivoria, possivelmente representa uma economia de energia para produção de outras proteínas e metabólitos secundários relacionados a defesa. A Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase B (GADPH-B) teve sua expressão aumentada quando as plantas foram submetidas a herbivoria simulada. Por ser uma proteína envolvida na glicólise (metabolismo energético) onde o gliceraldeído-3-fosfato é convertido em piruvato, culminando na formação de acetil-CoA, molécula central no metabolismo geral (FARIAS; MARTINEZ-DE-DRETS, 1976) e acreditamos que a necessidade do

aumento da produção desta proteína sirva para o aumento do metabolismo energético e produção dos compostos de defesa, uma vez que proteínas envolvidas na fotossíntese tiveram sua expressão diminuída durante o ataque. Importante ressaltar que utilizamos em nossos experimentos de expressão gênica, a sequência do trabalho de Medeiros (2012) de RNAm de cultivar híbrido de cana-de-açúcar, correspondente a subunidade GAPDH2 ou GAPC2 diferente da encontrada nos géis 2D, que é a GAPDH B. Em milho, este mesmo gene, o GAPDH2, foi utilizado como gene de referência para experimento de qPCR por Negeri et al., (2013). Segundo informação encontrada site do UniProt.org (*The Universal Protein Resource*) as plantas possuem dois tipos de GAPDH codificadas por genes distintos, sendo uma forma citosólica (GAPDH2) que participa da glicólise e a forma encontrada nos cloroplastos (GAPDHB) que participa da fotossíntese.

A produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) é parte do mecanismo de resposta a herbivoria onde há a oxidação de proteínas, ativando assim fatores de transcrição para produção de compostos de defesa. Na herbivoria em cana-de-açúcar houve a diminuição da proteína Proteína 1 potencializadora envolvida com Oxigênio (PsbO) (Figura xx) e pode ser consequência da necessidade de uma maior concentração de oxigênio dentro da planta para produção de metabólitos secundários. A proteína PsbO é extrínseca e onipresente no fotossistema, presente em todos organismos que utilizam oxigênio. Parece desempenhar um papel central na estabilização do aglomerado de manganês e é uma fator essencial para a estabilizar eficientemente o oxigênio (DE LAS RIVAS et al., 2004; MURAKAMI et al., 2005).

Em abordagens proteômicas algumas proteínas são rotineiramente detectadas por serem abundantes são as Peroxirredoxinas ou Tiorredoxinas peroxidases (TPx). Elas modulam a sinalização intracelular relacionada com espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (DIETZ et al., 2006) e constituem um grupo de proteínas antioxidantes comuns na natureza encontradas nos mais diversos compartimentos celulares, presentes em vários organismos como plantas e mamíferos. Muito estudadas pela sua atuação na decomposição de diversos tipos de peróxidos, como H₂O₂, peróxido nitritos e peróxidos de lipídeos tóxicos ao ambiente celular (IMMENSCHUH; BAUNGART-VOGT, 2005; JOHNSON;

LOWTHER, 2007). Observamos a diminuição de sua expressão sendo encontrada apenas nas plantas controle.

Glutarredoxinas (Grxs) são proteínas catalisadoras eficazes para a redução de dissulfuretos mistos em proteínas, usando a tioredoxina redutase para a sua regeneração. Glutarredoxinas Grxs são tioredoxina reductase dependente oxidoreduções envolvidas na manutenção da homeostase redox celular ou seja trabalham contra o stress oxidativo (CULTURIER et al., 2009). Nesta condição biológica, a produção de espécies reativas de oxigênio de importante no mecanismo de resposta, necessita de uma sistema biológico que remova ou repare o dano causado pela produção de ROS. Detectamos a presença desta proteína apenas em plantas infestadas, o que condiz com uma resposta ao ataque do herbívoro para remoção destas espécies reativas.

A proteína Glutathione S-Transferase 1 (GST) tem também sido relacionada com funções de defesa. GST apresentou síntese aumentada no grupo Herbivoria simulada Pemble et al. (1996) descreveram a capacidade restrita dessa proteína em conjugar xenobióticos (compostos orgânicos estranhos). A sua presença em plantas foi reconhecida pela primeira vez pouco depois em 1970, quando a atividade de GST foi mostrada em milho como sendo responsável por conjugar a atrazina cloro-S-triazina com GSH, protegendo assim a cultura de uma lesão por este herbicida (EDWARDS; DIXON, 2000). Desde então, as atividades da GST, enzimas correspondentes ou sequências de genes, foram identificados em todos os animais, plantas e fungos analisados até o momento na detoxificação de moléculas tóxicas à célula.

O papel da O-acetil serina(tiol)liase (OASTL) na cadeia de produção de outros aminoácidos sulfurados como a glutathione sugere uma resposta para a apresentação dos níveis de GST frente a herbivoria. Esta enzima está envolvida com a síntese de cisteína (Cys), um aminoácido que contém enxofre. O metabolismo desse aminoácido possui ligação com a assimilação de enxofre em plantas que por sua vez, depende em grande parte da formação de Cys e íon sulfato. Cys é o primeiro precursor orgânico para a formação de metabolitos que contenham enxofre, tais como glutathione (LEUSTEK; SAITO, 1999; SAITO, 2000; 2004). Enquanto que esta última (GST) apresenta-se elevada durante a defesa do vegetal (herbivoria simulada) a OASTL encontra-se exclusiva desse processo, o que sugere uma

relação de interdependência entre essas duas proteínas. Além disso, o aumento da expressão dessa enzima pode levar a um desbalanço na biossíntese de aminoácidos, especificamente cisteína, e funcionar como fator antinutricional na defesa da planta (GIRI et al., 2006).

Diversos estudos sobre os genes de proteínas ribossomais de plantas revelaram a presença de famílias multigênicas em que ambos os membros apresentam padrões de sobreposição e diferenciais de acumulação de RNAm (LARKIN et al., 1989. REVENKOVA et al., 1999). A evidência de que a expressão do gene *rpl12* que transcreve proteína ribossomal 50S L12-1 a pode ser controlada a um nível pós-transcricional foi observado em raízes anóxicas de milho (FENNOY; BAILEY-SERRES, 1998). O aumento da proteína durante a herbivoria simulada pode indicar que sua atividade esteja voltada para a produção de mais proteínas de defesa uma vez que está diretamente ligada a síntese proteica.

Li et al., (1999) mostrou que em culturas de arroz, os genes do Factor de alongação (EF-Tu) são induzidos em resposta a várias estresses ambientais e para o tratamento com ácido abscísico. O trabalho de Giri et al., 2006 demonstrou mudanças em *Nicotiana attenuata* sob herbivoria na tradução da proteína EF-Tu e várias proteínas ribossomais sugerindo uma reorganização maciça que ocorre na biossíntese de proteínas após danos por herbívoro de tecidos foliares. Da mesma forma, observamos a diminuição desta proteína nas plantas de cana-de-açúcar submetidas a herbivoria simulada.

Faz-se necessário então que o mecanismo de transcrição tenha algum tipo de aumento o que justifica que a proteína aqui identificada como de ligação ao DNA esteja presente apenas nas plantas submetidas a herbivoria simulada. Proteínas compostas de domínios de ligação ao DNA, conseqüentemente uma afinidade específica para interagir com DNA tanto de fita dupla ou simples, podendo ser também específicas para polimerases (SAUER et al., 1982).

Uma provável proteína Tilacóide luminal foi detectada apenas em géis de plantas submetidas a infestação por *D. saccharalis*. A análise da sequência *Hypothetical protein SORBIDRAFT_07g027960 [Sorghum bicolor]* apresentou maior similaridade com a sequência *thylakoid lumenal 19 kDa protein [Zea mays]*, com número de acesso NP_001148434. Essas proteínas podem ser previstas computacionalmente com base em seus sinais de fragmentação. Em *Arabidopsis*

thaliana, as proteínas luminais previstas possuem em sua maioria funções de processamento de proteínas, auxílio na fotossíntese, no metabolismo, e defesa (PELTIER et al., 2002; FRISO et al., 2004).

Através da análise destes resultados, verificamos que a proteômica surge como ferramenta adicional no estudo da ecologia química das interações planta-inseto. A combinação destas abordagens nos permitiram ampliar o conhecimento sobre os mecanismos de resposta das plantas à herbivoria, bem como possibilitou identificar possíveis alvos para, através do melhoramento genético e transgenia, desenvolver plantas mais resistentes a insetos herbívoros.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cana-de-açúcar apresenta uma resposta sistêmica quando atacada pela larva de *D. saccharalis* produzindo o composto volátil β -cariofileno, ácido hidroxâmico DIMBOA e proteínas relacionadas a tentativas de inibir o ataque da larva e preservar a planta.

A produção β -cariofileno em cana-de-açúcar como substância envolvida na defesa da planta, é desencadeada por compostos presentes na secreção oral da *D. saccharalis* decorrente de uma resposta à herbivoria. Este volátil é produzido apenas pelo tecido foliar e possui a função de atrair o predador endoparasitóide *Cotesia flavipes* estabelecendo, dessa forma uma relação tritrófica.

O ácido hidroxâmico DIMBOA é produzido somente nas raízes com função de defesa, sendo em cana-de-açúcar o gene *Bx2* o que apresenta maior nível de expressão durante a herbivoria por *D. saccharalis*.

O conjunto de proteínas diferencialmente expressas durante herbívora por *D. saccharalis* caracterizam-se por participar do conjunto de respostas da planta ao ataque, modificando seu metabolismo para economia de energia e produção de proteínas que participarão diretamente na defesa.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSON, W.G.; WEIS, A.E. Evolutionary Ecology Across Three Trophic Levels: Goldenrods, Gallmakers, and Natural Enemies. **Monographs in Population Biology**. Princeton: Princeton University Press. p 456, 1997.
- ANGELO, A. C.; DALMOLIN, A. Interações Herbívoro-Planta e suas implicações para o Controle Biológico: Que tipos de inimigos naturais procurar? In: PEDROSA-MACEDO, J. H.; DALMOLIN, A.; SMITH, C. W. **O Araçazeiro: Ecologia e Controle Biológico**. FUPEF. 2007.
- ARRIGONI, E.B. Broca da cana-de-açúcar: Importância econômica e situação atual. In: ARRIGONI, E.B.; DINARDO-MIRANDA, L.L.; ROSSETO, R. **Pragas da cana-de-açúcar: Importância econômica e enfoques atuais**. Piracicaba: STAB : IAC :CTC, 2002. CD-ROM.
- BARBOSA, ROGÉRIO HIDALGO.; KASSAB, SAMIR OLIVEIRA; FONSECA, PAULO ROGÉRIO BELTRAMIN DA; ROSSONI, CAMILA; SILVA, ALAN DE SOUZA. Associação de *Metarhizium anisopliae* (Hyp.: Clavicipitaceae) com thiamethoxam para o controle da cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar. **Ensaio de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde**. São Paulo. v.15, n. 5, 2011.p. 41-51.
- BARSALOBRES, C.F. **Análise de expressão gênica induzida por *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar via micro-organismos de colônias bactericidas**. 2004. 00f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- BALDWIN, I.T. Herbivory Simulations in Ecological. **Trend in Ecology & Evolution**. Departamento de Ciências Biológicas da Universidade de Buffalo, EUA v. 5, n. 3, 1990.
- BALDWIN Ian T.; JIANQIANG Wu. New Insights into Plant Responses to the Attack from Insect Herbivores. **Annual Review of Genetics**. V. 44, p. 1-24, 2010.
- BOTELHO, P. S; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: PARRA, J. R. P. et al. **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, p. 409-425, 2002
- BRAAM, J. Rain, Wind and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes In: _____. **Arabidopsis**. Cell. Maryland Heights, v. 60, p. 357-364, 2005.
- BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p.248-254,1976.
- BIRKETT, M. A. et al. New roles for cis-jasmone as na insect semiochemical na in plant defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. Washington. v. 97, p. 9329-9334, 2000.

BOND, W; CRAINE, J. **Plant structural defences against browsing birds: a legacy of New Zealand's extinct moas.** *Oikos*. v. 104, n. 3, p. 500–508, 2004.

BOTELHO, P.S.M.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatrea saccharalis*. In: PARRA, J. R.P. et al. **Controle biológico do Brasil: parasitoides e predadores.** São Paulo: Manole, 2002. p. 409-429.

BRAUNBECK, O.A. e CORTEZ, L.A.B. O cultivo de cana-de-açúcar e o uso dos resíduos. In: FRANCK ROSILLO-CALLE; BAJAY. S.V.; ROTHMAN, H. **Uso da biomassa para produção de energia na indústria brasileira.** Campinas, SP. UNICAMP. 2008. cap. 5. 215.

CAEMMERER, S.V.; HENDRICKSON; QUINN, V.; VELLA; MILLGATE, A.G.; FURBANK, R.T. Reductions of Rubisco Activase by Antisense RNA in the C4 Plant *Flaveria bidentis* Reduces Rubisco Carbamylation and Leaf Photosynthesis. **Plant Physiology**. 2005.

CAVALCANTI, Maria das Graças; et al. Interação tritrófica Entre *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae), *Eucalyptus* e lagartas de *Thyrinteina arnobia* (Stoll) (Lepidoptera: Geometridae): I Visitação. **Uma. Soe. Entomol. Bras.** , Londrina, v 29, n.4, 2000.

CARVALHO, J. S. et al. Pragas da cana-de-acucar: descrição dano e controle. In: ARAUJO, E. S. et al. (Org.). **Tópicos em Entomologia Agrícola.** Ribeirao Preto: Maxicolor Grafica e Editora, 2008, v. 1, p. 57-75.

CASAGRANDE, A.A.; VASCONCELOS, A.C.M. Fisiologia da parte aérea. In: DINARDO-MIRANDA L.L; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. **Cana-de-açúcar.** Campinas: IAC, cap. 3, p. 57-78, 2010.

CHANDRA, A.; SINGH, S.B.; KUMAR, P. Effect of light on DIMBOA synthesis in maize leaves as revealed by modified cost-effective extraction method. **Environ Monit Assess**. v. 185, p. 9917-9924, 2013.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, Adriana, ABREU, Hellen Marília Couto de; ULIAN, Eugenio César. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. **Trop Plant Biol**. v. 4, n. 1, p. 62-89, 2011.

CHENG, A.X. et al. The rice (E)-beta-caryophyllene synthase (OsTPS3) accounts for the major inducible volatile sesquiterpenes. **Phytochemistry**. v. 68, p. 1632–1641, 2007

COLEY, P. D.; BARONE, J. A. Herbivory and plant defenses in tropical forests. **Annual Review of Ecology and Systematics**. v. 27, p. 305-335, 1996

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira de cana-de-açúcar.** Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento. 2013.

COSTA, D.M; FRANCEZ, A.C.C.; SÁ, R. Biologia da broca da cana-de-açúcar (*Diatrea saccharalis*) (Lepidoptera: Crambidae) em dieta artificial. **Ciência et práxis**. v. 3, n. 5, p. 13-16, 2010.

COOPER, Susan M.; NORMAN, Owen-Smith. Effects of plant spinescence on large mammalian herbivores. **Oecologia**. v. 68, n. 3, p. 446–455, 1996.

COUTURIER, J. et al. Structure-Function Relationship of the Chloroplastic Glutaredoxin S12 with an Atypical WCSYS Active Site. Enzyme Catalysis and Regulation. **J. Biol. Chem.** v. 284, p. 9299-9310, 2009.

CENTRO DE TENCNOLOGIA CANAVIEIRA. **Censo varietal e de produtividade 2013**. Disponível em: <<http://www.ctcanavieira.com.br/downloads/Censo2013.pdf>> Acesso em: 20 dez. 2013.

DE LAS RIVAS, J.; BARBER, J. Analysis of the Structure of the PsbO Protein and its Implications. **Photosynth Res.** v. 81, n. 3, p. 329-343, 2004.

DEGEN, T. et. al. High genetic variability of herbivore-induced volatile emission within a broad range of Maize inbred lines. **Plant Physiology**. v. 135, p. 1928–1938, 2004.

DELKER, C. et al. Jasmonate Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* - Enzymes, Products, Regulation. **Plant Biology**. v.8, n. 3, p. 297–306, 2006.

DILLON, S.L. SHAPTER, F.M.; ROBERT H.J.; CORDEIRO, G.I.L; LEE, S.L. Domestication to Crop Improvement: Genetic Resources for *Sorghum and Saccharum*(*Andropogoneae*). **Annals of Botany**. v. 5, p. 975 -989, 2007.

DIETZ, K. J.; JACOB, S. OELZE, M.L.; LAXA, M. TOGNETTI, V. The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. **Journal of Experimental Botany**. v. 57, n. 8, p. 1697–1709, 2006.

DINARDO-MIRANDA, L.L. Pragas. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**. São Paulo: IAC, p.349-404, 2008.

DIXON, D.P.; SELLARS, J.D.; KENWRIGHT, A.M.; STEEL, P.G.; The maize benzoxazinone DIMBOA reacts with glutathione and other thiols to form spirocyclic adducts. **Phytochemistry**. v. 77, p. 171-178, 2012.

DOSS, R.P. Role of glandular scales of lepidote rhododendrons in insect resistance. **J Chem Ecol**. v. 10, n. 12, 1984.

EDWARDS, R; DIXON, D.P. The role of glutathione transferases in herbicide metabolism. **Sheffield Academic Press**, p. 33-71, 2000.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Disponível em: <<http://apps.fao.org>> Acesso em: 25 ago. 2013.

FALCO, M.C. et al. Mechanisms of sugarcane response to herbivory. **Genet. Mol. Biol.** São Paulo , v. 24, n. 1-4, 2001

FARIAS, A.; MARTINEZ-DE-DRETS, G. Glycerol metabolism. In:_____.
Rhizobium. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 66, p. 150-153, 1976.

FELTON, G.W. Indigestion is a plant's best defense. **Proc Natl Acad Sci.** v. 102, p.18771–18772.

FENNOY, S.L; BAILEY-SERRES, J. Transcriptional and post-transcriptional processes regulate gene expression in oxygen-deprived roots of maize. **Plant J.** v.15, p. 727-735, 1998.

FERNANDES, Oscar William Barbosa. Avaliação de variedades de cana-de-açúcar para a produção de cachaça artesanal e a interferência dos resultados no comportamento do produtor na região de Salinas-MG: uma contribuição extensionista. **Dissertação (Mestrado em Agronomia)**. UFRRJ/EDUCAÇÃO AGRÍCOLA, 2005.

FIGUEIREDO, P. Breve história da cana-de-açúcar e o papel do Instituto Agrônomo no seu estabelecimento no Brasil. In: Cana-de-Açúcar. 1.ed. Campinas, SP: Instituto Agrônomo, 2008. Cap. 1, p.31-44.

FRISO G., GIACOMELLI L. YTTERBERG A., PELTIER J., RUDELLA A., RUN Q., WIJK. In-Depth analysis of the Thylakoid Membrane Proteome of Arabidopsis thaliana Chloroplasts: New Proteins, New Functions, and a Plastid Proteome Database. **Plant Cell**, v. 16, n. 2, p.478-99.

GALLO, D. et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

GIRI, A.P. et. al. Molecular Interactions between the Specialist Herbivore Manduca sexta (Lepidoptera, Sphingidae) and Its Natural Host Nicotiana attenuata. VII. Changes in the Plant's Proteome. **Plant Physiology**. v. 142, p.1621–1641, 2006.

GOUINGUENE, S.P. TURLINGS, T.C.J. The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. **Plant Physiol**. v. 129, p.1296–307, 2002.

GOUINGUENÉ, S.; DEGEN, T.; TURLINGS, T.C.J. Variability in herbivore-induced odour emissions among maize cultivars and their wild ancestors (teosinte). **Chemoecology**, v.11, p. 9–16, 2001.

GUTHRIE, W.D. et al. DIMBOA Content at Seven Stages of Plant Development in Maize Synthetic Cultivar. **Journal of the Kansas Entomological Society**. v. 59, n. 2, p. 356-360, 1986.

GUTIERREZ, C.; CASTAÑERA, P.; TORRES, V. Wound-induced changes in DIMBOA (2, 4 dihydroxy-7-methoxy-2H-1, 4 benzoxazin-3(4H)-one) concentration in maize plants caused by *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of Applied Biology**. v. 113, p.447–454, 1988.

GUPTA, V. et al. The water-deficit stress- and red-rot-related genes in sugarcane. **Funct Integr Genomics**. v. 10, n. 2, p.207-214, 2010.

HILKER, M.; MEINERS, T.. How do plants "notice" attack by herbivorous arthropods? **Biol Ver**. v. 85, p. 267-280, 2010

IMMENSCHUH, S.; BAUMGART-VOGT, E. Peroxiredoxins, Oxidative Stress, and Cell Proliferation. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 7, p. 768-777, 2005.

JANZEN, D.H. When is it coevolution? **Evolution**. v.34, n. 3, p. 611-612, 1980.

JONCZYK, Rafal et al. Elucidation of the Final Reactions of DIMBOA-Glucoside Biosynthesis in Maize: Characterization of Bx6 and Bx7. **Plant Physiology**. v. 146, p. 1053-1063, 2008.

JONES, A.; POPPY, G.M. Comparison of glass vessels and plastic bags for enclosing living plant parts for headspace analysis. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, p.845 – 864, 2006.

JÖNSSON, T. J.; LOWTHER, W. T. The Peroxiredoxin Repair Proteins. **Subcell Biochem**. v.44, p. 115-141, 2007

JOSHI, S.; VIRAKTAMATH, C.A. The sugarcane woolly aphid, *Ceratovacuna lanigera* Zehntner (Hemiptera: Aphididae): its biology, pest status and control. **Current Science**. v. 87, n. 3, 2004.

KARBAN, R. Plant behaviour and communication. **Ecol. Lett**. v. 11, p.1-13, 2008.

KARBAN, R; BALDWIN, J.T. **Induced responses to herbivory**. Chicago, USA: The University of Chicago Press, p. 319, 1997

KOCH, T.; BANDEMER, K.; BOLAND, W.; Biosynthesis of CJ: a pathway for the inactivation and the disposal of the plant stress hormone jasmonic acid to the gas phase? **Helv Chim Acta**. v. 80, p. 838–850, 1997.

KOHLHEPP, Gerd. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos Avançados**. v. 24, n. 68, 2010.

KÖLLNER, T.G. et al. A Mayze (E)- β caryophyllene synthase implicated in indirect defense responses against herbivores is not expressed in most American maize varieties. **The Plant cell**. v. 20, p. 482-494, 2008.

LARKIN, J.C. et al. The organization and expression of maize ribosomal protein gene family. **Genes Dev**. v. 3, p. 500-509, 1989.

LEUSTEK, T; SAITO, K. Sulfate transport and assimilation in plants. **Plant Physiol**. v. 120, p. 637–643, 1999.

LIMA FILHO, M.; LIMA, J.O.G. Massa de ovos de *Diatrea saccharalis* (Fabri.) (Lepolptera: Pyralide) em cana-de-açúcar: número de ovos e porcentagem de

parasitismo por *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em condições de campo. In: PARRA, J.R.P. et al. **Controle Biológico no Brasil: Parasitoides e Predadores**. Ed. Manole, SP. p. 609, 2002.

LI ZY, ZHANG J.S, CHEN S.Y. Molecular cloning, expression analysis and chromosomal mapping of salt-responsive cDNAs in rice (*Oryza sativa* L.). **Sci China C Life Sci.** [S:l : s.n], v.42, p.506–516, 1999.

LOU, Y, BALDWIN I.T. Manduca sexta recognition and resistance among allopolyploid *Nicotiana* host plants. **Proc Natl Acad Sci.** v. 2, 2003.

MAHMOUD, A.M.A; LUNA-SANTILLANA, E.J. de; PEREZ, Rodríguez-M. A. Parasitism by the endoparasitoid, *Cotesia flavipes* induces cellular immunosuppression and enhances susceptibility of the sugar cane borer, *Diatraea saccharalis* to *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Insect Science**. Novo Mexico, v. 11, n. 119, 2011.

MEINERS, T.; HILKER, M. Induction of plant synomones by oviposition of a phytophagous insect. **J. Chem. Ecol.** v. 26, p. 221-232, 2000.

MANTELATTO, P. E. **Estudo do processo de cristalização de soluções impuras de sacarose por resfriamento**. 2005. 235 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

MEDEIROS, A.H. **Identificação e caracterização de genes induzidos por *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera:Crambidae) em cana-de-açúcar**. 2008. 152 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2008.

MELO, A.B.P. **Biologia da *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1974) (Lepidoptera: Pyralidae) em diferentes temperaturas para determinação das exigências térmicas**. Piracicaba. 1984. 32 f. Dissertação (Mestrado Agronomia) – Escola Superior de Agricultura de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 1984.

MORAES, C. M. et al. Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. **Nature**. v. 393, p.570-572, 1998.

MORAES, Consuelo M. de; LEWIS, WJ; Tumlinson, James H.. Examinando interações plantas-parasitoides em sistemas tritróficos. **Uma. Soe. Entomol. Bras.** , Londrina, v 29, n. 2, Junho de 2008.

MORAES, M.C. et al. Cis-Jasmone induces accumulation of defence compounds in wheat, *Triticum aestivum*. **Fitoquímica**. v. 69, n. 1, p. 9-17, 2007.

MELLO, MAR. Influence of herbivore attack patterns on reproductive success of the shrub *Piper hispidum* (Piperaceae). **Ecotropica** 13: 1-6. 2007.

MORI, N.; ALBORN, H.T., TEAL, P.E., TUMLINSON, JH. Enzymatic decomposition of elicitors of plants volatiles in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea*. **Journal of Insect Physiology**. v. 47, p. 749-757, 2001.

MOONEY, Kailen A.; et al. The tri-trophic interactions hypothesis: interactive effects of host plant quality, diet breadth and natural enemies on herbivores. **PLoS ONE**. EUA, v 7, n. 4, 2012.

MURAKAMI, R. et al. Functional dissection of two Arabidopsis PsbO proteins PsbO1 and PsbO2. **FEBS Journal**. v. 272, p. 2165–2175, 2005.

NEGERI ADISU, Guan-Feng Wang et al. Characterization of temperature and light effects on the defense response phenotypes associated with the maize Rp1-D21 autoactive resistance gene. **BMC Plant Biology** v. 13; p.106, 2013.

NIEMEYER, H.M. Hydroxamic acids derived from 2-hydroxy-2H-1,4-Benzoxazin-3(4H)-one: key defense chemicals of cereals. **J. Agric Food Chem**. v. 57, p. 1677-1696, 2009.

OLSON, D.M. et al. Nitrogen and water affect direct and indirect plant systemic induced defense in cotton. **Biol. Control**. v. 49, p.239–44, 2009.

PANNUTI; Luiz Eduardo da Rocha. **Incidência de Diatrea Saccharalis. (Fabr., 1974 (Lepidoptera: Crambidae) Mahanarva fimbriolata Stal 1854 (Hemiptera: Cercopidae) produtividade e qualidade tecnológica de cana-de-açúcar em função da irrigação e de fertilização nitrogenada**. 2012. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

PAULSEN JM, LANE D.M. Spinach ribulose diphosphate carboxylase. Purification of the enzyme. **Biochemistry**. v. 5, p. 2350–2357, 1966.

PARRA, J. R. P. **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, p. 2, 2002

PEMBLE, S.E.; WARDLE, A.F.; TAYLOR, J.B. Glutathione S-transferase class kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. **Biochem J**. v. 319, p. 749-754, 1996.

PELTIER, J. et al. Central functions of the luminal and peripheral thylakoid proteome of Arabidopsis determined by experimentation and Genome-Wide Prediction. **Plant Cell**, v. 14, n. 1, p. 211-236, 2002.

PEREIRA, J.M.; FERNANDES, P.M.; VELOSO, V.R.S. Efeito fisiológico do inseticida thiamethoxam na cultura da cana-de-açúcar. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.77, n.1, p.159-164, 2010.

PICANÇO, Marcelo Coutinho. **Manejo Integrado de Pragas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa : Departamento de Biologia Animal, 2010.

PICKETT, J.A. et al. Cis-Jasmone as an allelopathic agent through plant defence induction. **Allelopathy Journal**. v. 19, p. 109-117, 2007.

PICKETT, J.A. et al. Plant volatiles yielding new ways to exploit plant defence. In: DICKE, M.; TAKKEN, W. (Ed.). *Chemical Ecology: From Gene to Ecosystem*. **Ecosystem**. p. 161–174, 2006.

PINTO, A. de S. O controle biológico de pragas da cana-de-açúcar. In: PINTO, A. de S. *Controle de pragas da cana de açúcar*. **Sertãozinho: Biocontrol**, p. 9-13, 2006.

PINTO, A. S.; GARCIA, J. F.; BOTELHO, B. S. M. Controle Biológico da cana-de-açúcar. In: PINTO, A. S.; NAVA, D. E.; ROSSI, M. M.; MALERBO-SOUZA, D. T. (Ed.). **Controle Biológico de Pragas na Prática**. Piracicaba, p. 287, 2006.

PRICE, P.W. et al. Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v. 11, 1980.

PRICE, P.W. **Insect Ecology**. 2nd ed. New York: Wiley, 1984.

RASMANN, S. et al. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. **Nature**. v. 434, n. 7034, 2005.

RODNINA MV, FRICKE R, KUHN L, WINTERMEYER W. Codon-dependent conformational change of elongation factor Tu preceding GTP hydrolysis on the ribosome. **Embo J**. v. 14, p. 2609-2613, 1995.

REVENKOVA, E.; MASSON, J.; KONCZ, C.; AFSAR, K.; JAKOVLEVA, L; PASZKOWSKI, J. Involvement of *Arabidopsis thaliana* ribosomal protein S27 in mrna degradation triggered by genotoxic stress. **Embo J**. V. 18, p. 490-499, 1999.

ROSE, U.S.; TUMLINSON, J.H. Volatiles released from cotton plants in response to *Helicoverpa zea* feeding damage on cotton flower buds. **Plant**. v. 218, n. 5, p. 824 – 832, 2004.

ROSSETTO, R.; SANTIAGO, A. D. **Adubação: resíduos alternativos**. Brasília, DF: **EMBRAPA**, 2007.

ROSILLO-CALLE, F.; BEZZON, G. Produção e Uso Industrial de Carvão Vegetal. In: ROSILLO-CALLE, F.; BAJAY, E. ROTHMAN (Org.) **Uso da Biomassa para Produção de Energia na Indústria Brasileira**. Campinas, São Paulo: UNICAMP, 2005.

SACIOTO, R. F. Z. **Inserção do gene PR5K em cana-de-açúcar visando induzir resistência ao fungo da ferrugem *Puccinia melanocephala***. 2003. 111f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SCARPARI M.S., BEAUCLAIR, E.G.F. Anatomia e botânica. In: Dinardo-Miranda LL, Vasconcelos, ACM, Landell MGA (Ed.). **Cana-de-Açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico; 2008, p. 45-56.

SAITO, K. Regulation of sulfate transport and synthesis of sulfur containing amino acids. **Curr Opin Plant Biol.** v. 3, p. 188–195, 2000.

SAITO, K. Sulfur assimilatory metabolismo: The long and smelling road. **Plant Physiol.** v. 136, p.2443–2450, 2004.

SALZMAN, K.Z.; LUTHE, D.S.; FELTON, G.W. Arthropod-Inducible Proteins: Broad spectrum Defenses against Multiple Herbivores. **Plant Physiology.** v. 146, p. 852–858, 2008.

SANT'ANNA, Carlos Mauricio R.; SOUZA, Vivian Passos de. Estudo semi-empírico de ácidos hidroxâmicos: ácido formoidroxâmico e derivados do aleloquímico dimboa. **Quím. Nova.** v. 24, n.5, p. 583-587, 2001.

SAUER, R.T. et al. Homology among DNA-binding proteins suggests use of a conserved super-secondary structure. **Nature.** v. 298, 1982.

SCHNEE, C. et al .The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 103, p. 1129-1134.

SGRILLO, R.B. **Desenvolvimento de modelo matemático para população de broca de cana-de-açúcar, *Diatrea saccharalis* (Fabr., 1974) e simulação de técnica de indivíduo estéril.** 1979. 189 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1979.

SIMÕES Renata A. et al. Biological and behavioral parameters of the parasitoid *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) are altered by the pathogen *Nosema* sp. (Microsporidia: Nosematidae). **Biological Control,** v. 63, p. 164–171, 2012

SILVA, Ana Paula Lopes et al. Defesas induzidas por herbivoria e interações específicas no sistema tritrófico soja, percevejos, parasitoides de ovos. **Pesq. agropec.** v.47, n.6, p.875-878, jun. 2012.

SPISELLER, D., BOLAND, W.; Identification and synthesis of (17S)-N-(17-acyloxyacyl)-glutamine; novel surfactants from oral secretions of lepidopteran larvae. **J. Org. Chem.** 2003, v. 68, p. 8743-8749.

THIVIERGE Karine et. al. Caterpillar- and Salivary-Specific Modification of Plant Proteins. **Journal of Proteome Research,** v.9, p.5887–5895, 2010

TUMLINSON, J. H.; ENGELBERTH, J. Fatty acid-derived signals that induce or regulate plant defenses against herbivory7. In: SCHALLER, A. (Ed.). **Induced Plant Resistance to Herbivory.** [S.l.]: Springer, . p. 389-340, 2008.

TURLINGS, Ted C.J. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. **Nature**. v. 434. p. 732–737, 2005.

TOLLRIAN, R; HARVELL, C. D. The Evolution of inducible defenses: current ideas, In: TOLLRIAN, R.; HARVELL, C. D. (Ed.). **The Ecology and Evolution of Inducible Defenses**. Princeton: Princeton University Press, 1999.

TRIANA, Omar. Atlas del Bagazo de la Caña de Azúcar. **GEPLACEA** . Novo Mexico, p.143, 1990.

UNIAO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR (ÚNICA). **A indústria da cana-de-açúcar: Etanol, açúcar e bioeletricidade**. 2009.

VENDRAMIN, J.D. **Técnicas para avaliação de infestação de Diatrea Saccharalis (Fabr., 1974, Lepidoptera: Pyralidae) em cultivares de cana-de-açúcar, com base no complexo broca-podridões**. 1987. 156f. Dissertação (Mestrado em Livre Docência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1987.

VOLPE, Haroldo Xavier Linhares. **Distribuição espacial do parasitismo de Cotesia flavipes (Cameron, 1891) (ymenoptera: Braconidae) em cana-de-açúcar**. 2009. 67 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campos Jaboticabal. São Paulo, 2009.

WANG, M.C. BOHMANN, D., JASPER, H. JNK signaling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in Drosophila. **Dev. Cell**. v. 5, n.5, p. 811--816, 2003.

WATT, D.; BUTTERFIELD, M.; HUCKETT, B. Proteomics and Metabolomics. IN: HENRY, R.; KOLE C. Genetics, Genomics and Breeding of Sugarcane. **Science Publishers Enfield**, New Hampshire, p. 193, 2010.

WEIS, A. E.; CAMPBELL, D.R. Plant genotype: a variable factor in insect-plant interactions. In : HUNTER, M. D. ; OGUSHI, T.; PRICE , P. W. (Ed.), **Resource Distribution and Animal- Plant Interactions**. San Diego: Academic Press, p. 75-111, 1992.

WU, J; BALDWIN, IT. New insights into plants responses to the attack from insect herbivores. **Annu Rev Genet**. v. 44, p. 1-24, 2010.

YUAN, J.S. et al. Molecular and genomic basis of volatile-mediated indirect defense against insects in rice. **Plant J**. v. 55, p. 491–503, 2008

ZHANG, Sufang; et al. Functional Synchronization of Biological Rhythms in aTritrophic System. **PLoS ONE**. EUA, v. 5, n. 6, Jun. 2010.