

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

Sheila dos Santos Tavares

**Ecologia Química da Cana-de-açúcar: Caracterização das respostas de
defesa em diferentes cultivares de cana-de-açúcar.**

Maceió
2016

Sheila dos Santos Tavares

Ecologia Química da Cana-de-açúcar: Caracterização das respostas de defesa em diferentes cultivares de cana-de-açúcar.

Trabalho de tese apresentado ao Instituto de Química e Biotecnologia como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof^o Dr. Antonio Euzébio Goulart Santana

Coorientador: Dr. Alessandro Riffel.

Maceió
2016

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

T231e Tavares, Sheila dos Santos.

Ecologia química da cana-de-açúcar: caracterização das respostas de defesa em diferentes cultivares de cana-de-açúcar / Sheila dos Santos Tavares. – 2016.

156 f.: il.

Orientador: Antonio Euzébio Goulart Santana.

Coorientador: Alessandro Riffel.

Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2016.

Bibliografia: f. 95-110.

Apêndice: f. 111-125.

1. Cana-de-açúcar. 2. *Diatraea saccharalis*. 3. Compostos orgânicos voláteis. 4. Metabólicos secundários. I. Título.

CDU: 547: 633.61



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



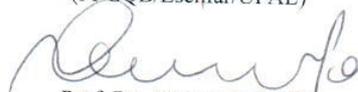
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

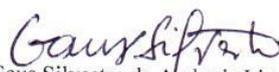
Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Doutorando **Sheila dos Santos Tavares** intitulada: **“Ecologia química da cana-de-açúcar: caracterização das respostas de defesa em diferentes cultivares de cana-de-açúcar”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 02 de setembro de 2016, às 09h, na Sala de Aulas do Renorbio/UFAL, na Universidade Federal de Alagoas.

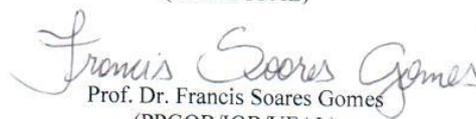
COMISSÃO JULGADORA


Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana
(PPGQB/Esenfar/UFAL)


Prof. Dr. Alessandro Riffel
(PPGQB/EMBRAPA)


Prof. Dr. Henrique Fonseca Goulart
(CECA/UFAL)


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


Prof. Dr. Francis Soares Gomes
(PPGQB/IQB/UFAL)


Prof. Dr. Jaim Simões de Oliveira
(UNIT)

*Dedico esta vitória a Deus.
A meus Pais.
Dedico também aos meus irmãos,
meus sobrinhos
e meu esposo
que nunca duvidaram do meu
potencial.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por me dar força e sustentação durante as adversidades encontradas na realização deste trabalho;

A Universidade Federal de Alagoas pelo apoio institucional;

A todos que fazem o Instituto de Química e Biotecnologia;

À CAPES pelo apoio com a bolsa de doutorado;

Ao Professor Dr Antonio Euzébio Goulart Santana e o Pesquisador Alessandro Riffel pela orientação, confiança, amizade e ensinamentos passados durante todo esse período. Sem eles nada disso seria possível;

Ao Professor Eraldo Lima, por ter apostado em minha capacidade mesmo sem me conhecer;

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, pelos ensinamentos transmitidos;

Em memória ao meu avô materno, José Vicente, e minha avó paterna, Edite Tavares, por acreditarem e ensinarem sempre que eu podia ser mais;

À minha mãe, Maria Selma dos Santos Tavares, ao meu pai Rivanildo Tavares da Silva pelo esforço e dedicação na minha criação;

Aos meus irmãos Rondinelle dos Santos Tavares e Rivanildo Tavares da Silva Filho, minhas cunhadas Stefanni Paula Vieira dos Santos e Meanne Raquel Santos Amorim Tavares meus sobrinhos que tanto amo Nathalia Maria Omena Tavares, Gabrielle Omena Tavares e Davi Vicente Vieira Tavares por estarem presentes em minha vida;

Ao Meu esposo Alesson Antônio Dantas Lira por todo amor, paciência, apoio, compreensão e por se fazer presente em todos os momentos;

Aos Amigos Aryanna, Abel, Merybeth, Nadia, Nubia, Saskya, Chrystian, Jakeline, Bruna, Antônio, Ianara e aos demais colegas do laboratório de Pesquisa em Produtos e Recursos Naturais (L.PqRN), pelos ensinamentos.

As amigas da Universidade Federal de Viçosa Glaucia, Jamile, Mary, Milaine, Aline, Josie, Antônio, Hernane, Evandro, Manuel, Nataly e Carla, pelo companheirismo e ensinamentos;

Aos técnicos Aldy pela atenção, colaboração e amizade;

Aos colegas do doutorado Maryana, Lourdinha, Jéssica, Thatiane e Jonh, pelo apoio e amizade;

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho;

E finalmente, agradeço a vida por ser tão gentil e me proporcionar tão bons momentos.

RESUMO

A cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*) é uma planta originária do sudeste da Ásia que adaptou-se bem ao clima e solo do Brasil, sendo a principal matéria-prima para a produção de etanol e açúcar. Um dos grandes entraves à produção de cana-de-açúcar ainda é o ataque de pragas e doenças. Dentre as pragas mais importantes para a cultura estão as que atacam o colmo e entre elas a broca-da-cana, *Diatraea saccharalis*. As plantas ao serem atacadas se protegem através da combinação de defesas constitutivas e induzidas que conseqüentemente, podem interromper a propagação do dano. Entre essas defesas está a síntese de compostos orgânicos voláteis (COVs) e a produção de metabólitos secundários tóxicos que lhes atribui proteção contra diferentes herbívoros. Este trabalho busca Identificar os metabólitos voláteis e as alterações metabólicas em diferentes cultivares de cana-de-açúcar que sejam induzidas em resposta a herbivoria, visando a busca de novas fontes de resistência. Além disso, avaliou-se o efeito de diferentes doses do ácido clorogênico sobre as diferentes fases do ciclo de vida de *D. saccharalis*. Primeiramente duas cultivares de cana-de-açúcar foram analisadas SP81-3250 e SP89-1115 (consideradas resistente e suscetível, respectivamente). Estas foram adquiridas junto ao banco de germoplasma do Programa de Melhoramento Genético de cana-de-açúcar da Universidade Federal de Viçosa (RIDESA). Num segundo momento utilizaram-se diferentes materiais do “complexo *Saccharum*”, entre elas *Saccharum officinarum*, *Saccharum officinarum* (Caiana), *Miscanthu* e *Erianthus* que foram adquiridos junto a EMBRAPA Tabuleiros Costeiros. Foram realizados bioensaios de preferência em túnel de vento, comportamento de oviposição e performance larval, além de extração e identificação de compostos fenólicos, DIMBOA e ácido clorogênico nas duas cultivares SP81-3250 e SP89-1115. No teste de oviposição com chance de escolha *D. saccharalis* a mostrou preferência de oviposição para a cultivar suscetível SP89-1115. As diferenças encontradas entre os perfis dos COVs podem auxiliar a explicar este comportamento. As duas cultivares também apresentaram diferenças quantitativas e qualitativas nos compostos fenólicos presentes nos tecidos foliares e radiculares com e sem infestação, entre eles, o ácido clorogênico que foi detectado apenas no tecido foliar e em maior concentração na cultivar resistente. Quando adultos de *D. saccharalis* foram alimentados com dietas adicionadas de ácido clorogênico, estes apresentaram má formação após emergirem das pupas. Os diferentes materiais do “complexo *Saccharum*” apresentaram também diferenças nos perfil de COVs. Os resultados obtidos demonstram que diferentes cultivares de cana-de-açúcar possuem respostas de defesa direta e indireta distintas, apresentando-se como potencial a ser explorado e aplicado em Programas Genético de cana-de-açúcar no desenvolvimento de materiais mais resistentes.

Palavras-chave: cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, COVs, metabólitos secundários

ABSTRACT

Sugarcane plants (*Saccharum* sp) originates from Southeast Asia but has adapted to the climate and soil in Brazil thus become the main crop for ethanol and sugar production. The main obstacles in sugarcane production are pests and plant diseases. Amongst the various sugarcane pests, *Diatrea saccharalis*, are of great importance as they attack the sugarcane stalk. Upon attack, sugarcane plants combine constitutive and induced defenses in order to prevent further damage. Volatile organic compounds and secondary metabolites are two mechanisms synthesized by the plant that provides protection against herbivores. Based on the attributes, secondary metabolites have gained great interest as a tool for pest management. This study aims to identify volatile metabolites and metabolite alterations upon herbivore attack in different sugarcane cultivars in order to determine resistance. In addition, the effect of various chlorogenic acid doses on the different life stages of *D. saccharalis* was evaluated. Initially, two sugarcane cultivars were analyzed, SP81-3250 and SP89-1115, that are considered to be susceptible and resistant, respectively. These cultivars were acquired by the germplasm bank of the Genetic Improvement Program of sugarcane at the Federal University of Viçosa (RIDESA). In addition, different material from the Saccharum Complex was used, including *Saccharum officinarum*, *Saccharum officinarum* (Caiana), *Miscanthus* and *Erianthus*, all acquired from EMBRAPA Tabuleiros Costeiros. The following behavioral assays were conducted: choice assays using wind tunnel, oviposition assays and larval performance when exposed to two plant cultivars (SP81-3250 and SP89-1115). Extraction and identification of phenolic compounds, DIMBOA and chlorogenic acid from SP81-3250 and SP89-1115 was conducted. Results from the no choice oviposition assay using *D. saccharalis* demonstrated a significant preference for oviposition on the SP89-1115 cultivar. There was a significant difference between the volatile profiles of the two different cultivars, which could explain the preference of *D. saccharalis*. The two cultivars also presented a quantitative difference of phenolic compounds present in both leaf and root tissue with and without infestation, chlorogenic acid was only detected in leaf tissue and at higher concentrations in the resistant cultivar. Feeding adult *D. saccharalis* with a diet containing chlorogenic acid resulted in deformation after emerging from the pupae. The various materials from the "Saccharum complex" presented a varied VOC profile. This study demonstrated that there is a difference between cultivars of sugarcane plants and their direct and indirect defense mechanisms. This provides a potential aspect that should be further explored within genetic programs of sugarcane and the development of resistant cultivars.

Keywords: Sugarcane, *Diatrea saccharalis*, COVs, secondary metabolites,

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Planta de cana-de-açúcar.	20
Figura 2 -	Ciclo de vida da Broca da cana-de-açúcar (<i>D. saccharalis</i>).	26
Figura 3 -	Fêmea e macho de <i>D. saccharalis</i> .	26
Figura 4 -	Estrutura de alguns elicitores derivados de herbívoros envolvidos na produção e emissão de voláteis.	31
Figura 5 -	Principais compostos e classes de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) de plantas.	34
Figura 6 -	Estrutura molecular da DIMBOA.	37
Figura 7 -	Biossíntese do Ácido Hidroxâmico DIMBOA. Cada gene <i>Bx</i> expressa uma proteína responsável pelas transformações do Indol até o produto final DIMBOA.	38
Figura 8 -	Produção das plantas de cana-de-açúcar.	41
Figura 9 -	Fêmeas em tubo de vidro dentro do túnel para avaliação de atratividade em voo e fonte de odor do lado oposto das fêmeas.	43
Figura 10 -	Tubo de vidro (15,0 x 3,0 centímetros) envolvido com folha de A4 e coberto em ambos os lados com uma película plástica de PVC.	45
Figura 11 -	Esquema da gaiola para teste de escolha com duas mudas e seis fêmeas por gaiola.	46
Figura 12 -	Esquema da gaiola para teste de escolha com duas mudas e uma fêmea por gaiola.	47
Figura 13 -	Esquema da gaiola para teste de escolha com uma muda e uma fêmea por gaiola.	48
Figura 14 -	Lagartas <i>D. saccharalis</i> aprisionadas em gaiolas para o Bioensaio sem chance de escolha.	49
Figura 15 -	Aeração das diferentes cultivares plantas do Complexo <i>Saccharum</i> .	50
Figura 16 -	(A) Vidro contendo dieta artificial para alimentação de <i>D. saccharalis</i> (B) Placas de Petri contendo dieta artificial cortada em forma de cubo e oferecida às lagartas.	55
Figura 17 -	Número médio de ovos de adultos de <i>D. saccharalis</i> com combinações de atrativos em tubo de vidro. Colunas com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis $p > 0.05$.	59
Figura 18 -	Oviposição de fêmeas de <i>D. saccharalis</i> em bioensaio com chance de escolha em cultivares de cana-de-açúcar. Colunas de Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si. Teste de Scott Knott a $p > 0.05$.	60
Figura 19 -	Oviposição de uma fêmea de <i>D. saccharalis</i> em bioensaio com chance de escolha em cultivares de cana-de-açúcar. Colunas de Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si. Diferença significativa pelo teste t a $P > 0.05$.	60
Figura 20 -	Oviposição de adultos de <i>D. saccharalis</i> em bioensaio sem chance de escolha em cultivares de cana-de-açúcar. Colunas de Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si. Teste de Scott Knott a $p > 0.05$.	61
Figura 21 -	Ganho de peso das lagartas de <i>D. saccharalis</i> alimentadas nas cultivares susceptível SP89-1115 e resistente SP81-3250 de cana-de-açúcar. Testes de wilcoxon $p > 0.05$.	64
Figura 22 -	Superposição dos cromatogramas das diferentes cultivares	

	SP81-3250 e SP89-1115 de cana-de-açúcar após tratamento de normalização e alinhamento dos dados. Foram avaliadas três amostras por cultivares, cada cor representa uma amostra.	65
Figura 23 -	PLS-DA scores plot da primeira componente.	65
Figura 24 -	Análise unidimensional STOCSY para a variável selecionada correspondente aos picos de interesse da cultivar resistente SP81-3250. O grau de correlação entre os espectros tem sido codificados por cores.	68
Figura 25 -	Análise unidimensional STOCSY para a variável selecionada correspondente aos picos de interesse da cultivar susceptível SP89-1115. O grau de correlação entre os espectros tem sido codificado por cores.	69
Figura 26 -	Superposição dos cromatogramas das diferentes cultivares de cana-de-açúcar após tratamento de normalização e alinhamento dos dados. Foram avaliadas três amostras por cultivares, cada cor representa uma amostra.	70
Figura 27 -	PLS-DA scores plot da primeira componente.	71
Figura 28 -	Cromatograma de correlação estatística S-Line (S) das diferentes cultivares de cana-de-açúcar que são estatisticamente relevantes diferenciando as classes. Coloração de picos de acordo com a barra lateral, as cores vermelhas e amarelas significa uma maior diferença significativa à nível de $p > 0,05$.	72
Figura 29 -	Quantificação relativa da intensidade Log do sinal em comparação pela ANOVA.	73
Figura 30 -	Rotas metabólicas para a produção dos dois principais grupos de voláteis induzidos após a herbivoria (Modificado de Schoonhoven et al.)	75
Figura 31 -	Estrutura dos compostos fenólicos.	78
Figura 32 -	Cromatogramas HPLC das cultivares suscetível e resistente. (a) parte aérea de plantas controle e infestada; (b) raízes de plantas controle e infestada. 1. Gálico/Tânico TR=1.14, 2. Ferúlico TR=1.41 e 3. Cinâmico TR=2.03	79
Figura 33 -	Cromatogramas HPLC. (A) Padrão DIMBOA e (B) Amostra da raiz sem a presença do composto.	81
Figura 34 -	Estrutura do ácido clorogênico.	82
Figura 35 -	Cromatogramas HPLC das cultivares suscetível e resistente. Parte aérea de plantas controle e infestada.	84
Figura 36 -	Peso de pupa da <i>D. saccharalis</i> em função das doses de ácido clorogênico adicionados à dieta artificial da fase larval. $P > 0,05$.	86
Figura 37 -	Ciclo de vida de larva a adulto de <i>D. saccharalis</i> em função das doses de ácido clorogênico adicionados à dieta artificial da fase larval. $P > 0,05$.	86
Figura 38 -	Número total de adultos de <i>D. saccharalis</i> com má formação em função das doses de ácido clorogênico adicionados à dieta artificial da fase larval. $P > 0,05$.	87
Figura 39 -	<i>D. saccharalis</i> na fase adulta com má formação em função das doses do ácido clorogênico.	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Compostos orgânicos voláteis identificados de plantas de cana-de-açúcar resistentes (SP81-3250) e susceptíveis (SP89-1115) a <i>D. saccharalis</i> .	66
Tabela 2 -	Compostos orgânicos voláteis identificados de plantas de cana-de-açúcar resistentes (SP81-3250) e susceptíveis (SP89-1115) a <i>D. saccharalis</i> .	74

LISTA DE ABREVIATURAS

COVs	Compostos orgânicos voláteis
IPP	Pirofosfato de isopentenil
DIMBOA	2,4-dihidróxi-7metóxi-1,4-benzoxazin-3-ono
RIDESA	Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético
MOVs	Metabólitos orgânicos voláteis
GC/MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
TR	Tempo de retenção
PLS-DA	Análise discriminante de Mínimos Quadrados Parciais
STOCSY	Statistics Total Correlation Spectroscopy
VFVs	Voláteis de folhas verdes
13HPOT	Ácido 13-hidroperoxi-linolênico
13HPL	13-hidroperoxidolase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
OBJETIVOS GERAIS	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 A cana-de-açúcar	20
2.2 Importância Econômica da Cana-de-açúcar	23
2.3 Perdas Econômicas por Pragas	24
2.4 A broca-da-cana de açúcar – <i>Diatraea saccharalis</i>	25
2.5 Mecanismos de defesa das plantas	28
2.6 Voláteis e não voláteis no mecanismo de defesa	32
3. MATERIAL E MÉTODOS GERAL	41
3.1 Produção das Plantas de cana-de-açúcar	41
3.2 Criação <i>Diatraea saccharalis</i>	42
3.3 Comportamento reprodutivo	42
3.4 Bioensaio de túnel de vento	43
3.5 Bioensaios de oviposição em tubo	44
3.6 Teste de preferência para oviposição de <i>D. saccharalis</i> em cultivares de cana-de-açúcar.....	45
3.6.1 Teste com chance de escolha	45
3.6.2 Teste com chance de escolha e uma fêmea por gaiola	46
3.6.3 Teste sem chance de escolha.....	47
3.7 Bioensaios performance larval sem chance de escolha	48
3.8 Coleta dos metabólitos voláteis emitidos pelas diferentes cultivares ..	49
3.9 Identificação dos compostos orgânicos voláteis das cultivares..	51
3.10 Compostos fenólicos totais	51
3.11 Extração e Identificação de Compostos Fenólicos	52
3.12 Identificação do Ácido Hidroxâmico DIMBOA e Ácido Clorogênico durante a herbivoria	53
3.13 Efeito de diferentes concentrações de Ácido Clorogênico sobre biologia de <i>D. saccharalis</i>	54
4. RESULTADOS E DISCURSSÃO	56
4.1 Bioensaio de túnel de vento	57
4.2 Bioensaios de oviposição	58

4.3 Bioensaios de performance larval sem chance de escolha	62
4.4 Compostos orgânicos voláteis das cultivares de cana-de-açúcar SP81-3250 e SP89-1115	64
4.5 Compostos orgânicos voláteis das seis diferentes cultivares de cana-de-açúcar	70
4.6 Compostos fenólicos	77
4.7 Ácido Hidroxâmico DIMBOA e Ácido Clorogênico.....	80
5. CONCLUSÃO	92
REFERÊNCIAS	93
APÊNDICE	

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*) é uma planta originária do sudeste da Ásia, que adaptou-se bem ao clima e solo do Brasil. A partir de então o plantio dessa gramínea só cresceu e é cultivada até os dias atuais, principalmente a espécie *S. officinarum*. Porém com o surgimento de doenças foi exigido a criação de híbridos através do cruzamento da *S. officinarum* com outras espécies do gênero *Saccharum* e, posteriormente, por meio de retrocruzamento obtiveram-se assim as cultivares modernas (MARAFANTE, 1993; BENEDINI e CONDE, 2008; JADOSKI et al, 2010)

A cana-de-açúcar é hoje a cultura mais produzida no mundo sendo a principal matéria-prima para a produção de açúcar. Além de serem atribuídas outras múltiplas utilizações. O colmo pode também ser consumido in natura (mastigado), ou então usado para fazer caldo de cana (garapa), melado e rapadura, podendo também ser usada na alimentação animal. O caldo da cana-de-açúcar através do processo de fermentação produz etanol, que além de bebidas destiladas como cachaça e outras bebidas alcoólicas, é utilizado como matéria prima para a produção de bioetanol, biocombustível renovável, altamente relevante na corrente tentativa de substituição dos combustíveis fósseis (MARAFANTE, 1993).

No entanto, muitos fatores são responsáveis pela redução dos rendimentos agroindustriais. Uma das principais limitações no cultivo da cana-de-açúcar é a ocorrência frequente de pragas. Esta cultura é atacada por diversos insetos-praga (MENDONÇA et al., 1996; ALMEIDA, 2005; SRIKANTH et al., 2011) que provocam perdas na produção. Apenas no Brasil estas perdas podem atingir 10% (OLIVEIRA et al., 2014). As pragas mais importantes para a cultura da cana-de-açúcar são as brocas do colmo, entre elas a broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis* Fabricius, 1794) Lepidoptera, família Crambidae. Essa broca ataca a cana-de-açúcar causando diversos danos, pois a praga se alimenta do tecido do colmo gerando galerias e causando diminuição do peso e de valores nutritivos da planta que conseqüentemente irão gerar redução da qualidade e quantidade dos produtos finais, além de deixar a cana-de-açúcar mais suscetível a um acamamento e tombamento, pois seu colmo estará fragilizado. Outros danos também estão relacionados com o acesso de microrganismos patogênicos que irão causar a inversão da sacarose e afetar a qualidade da matéria-prima da indústria sucroalcooleira.

Com os constantes surgimentos de novas pragas e formas de ataque, as plantas desenvolveram ao longo do tempo habilidades de reconhecer e responder defensivamente aos ataques aos herbívoros (HOWE, et al., 1996). Dentre estas, destacam-se a produção de barreiras físicas, espinhos e tricomas, dificultando o acesso dos insetos praga; a síntese de metabólitos primários e secundários tóxicos ao inseto praga (a produção de resina, aumento da concentração de lignina, acúmulo de sílica e cera em sua epiderme); e a síntese de compostos orgânicos voláteis (COVs), que podem ter a função de sinalização para plantas vizinhas, repelência da praga e de atração de inimigos naturais (AGRAWAL, 1999; MELLO e SILVA-FILHO, 2002).

Os COVs de plantas além de atuar na comunicação entre plantas e em interações com os próprios herbívoros, com ação repelente ou atraente (BALDWIN, 2002), podem exercer uma ação sobre outros organismos como nematóides entopatogênicos (RASMANN et al., 2005), plantas parasitas (RUNYON, et al., 2006), pássaros (MANTYLA et al., 2008) e a esporulação de fungos entomopatogênicos (HOUNTONDJI et al., 2005).

Quando o inseto herbívoro inicia o ataque, os componentes ativos localizados na secreção oral do herbívoro chamados de elicitores entram no interior da célula vegetal e desencadeiam uma cascata de sinalização de defesa, resultando na liberação de COVs no ar (HEIDEL e BALDWIN, 2004). Esta resposta também acontece nos tecidos não atacados, caracterizando uma resposta sistêmica que fornece uma maior proteção a planta (ERB et al., 2009). As plantas desenvolveram a capacidade de responder de forma diferente a danos mecânicos em comparação ao ataque por herbívoros mastigadores e por herbívoros sugadores, no qual o dano induz diferentes padrões de expressão gênica. Esta resposta da planta à herbivoria sugere a existência de um sistema de defesa sofisticado que otimiza a resposta em conformidade com o organismo (BALDWIN, 2002).

Poucos são os trabalhos sobre mecanismos de defesa em cana-de-açúcar. Por outro lado, a resposta das plantas contra herbivoria ou ferimento tem sido intensamente estudada em diversas culturas como tabaco (WANG et al., 2000; SCHITTKO et al., 2001), *Arabidopsis* (REYMOND e FARMER, 1998; GLAZEBROOK, 1999; SCHENK et al., 2000), tomate (MCGURL et al., 1992; THALER et al.; HOWE et al., 1996; STOUT et al.; FIDANTSEF et al., 1999), batata (BOLTER, JONGSMA, 1995; DAMMANN et al.; KORTH, DIXON, 1997), pimenta

(JUNG, HWANG, 2000; MOURA, RYAN; KIM et al., 2001) e arroz (SCHWEIZER et al., 1997; AGRAWAL et al., 2000; et al., 2001) .

Até o presente momento, os estudos de resposta da cana-de-açúcar a herbivoria têm se restringido principalmente a dinâmica de genes, proteínas e metabólitos específicos elicitados pelo ataque do inseto ou a análises transcricionais em grande escala de bibliotecas e microarranjos. Pouco se sabe sobre o sistema de defesa indireta de cana-de-açúcar e seu papel em interações planta-herbívoros, além do mais, pesquisas nesta área podem promover uma interação entre a ecologia química, utilizando a biologia molecular como ferramenta de estudo ecológico envolvendo pragas de importância econômica.

Voláteis de plantas são conhecidos por sua diversidade na composição química, complexidade das misturas, variabilidade no tempo e dependência às condições da cultura (MASSON et al., 1990). Diferentes espécies de plantas apresentam diferença em seu perfil de COVs (BOEVÉ et al., 1996), o que também pode ocorrer em plantas da mesma espécie, existindo diferenças claras entre as cultivares (LOUGHRIN et al., 1995; GOUINGUENÉ et al., 2001). GRISALES (2013), trabalhou com plantas de cana-de-açúcar, modernas e rústicas, ilesas e quando atacadas por *D. saccharalis* e encontrou uma diferença na composição no perfil dos COVs entre plantas das mesmas cultivares ilesas e atacadas. Essa diferença no perfil de COVs em cana-de-açúcar está relacionada com seu arranjo genético complexo, pois se trata de uma espécie poliploide, aneuplóide, além da variação que existe entre as próprias variedades de cana-de-açúcar (GRIVET; ARRUDA, 2002)

A obtenção de cultivares resistentes a *D. saccharalis* é de suma importância para o setor sucroalcooleiro, nos aspectos de redução de custos e no desenvolvimento dessa cultura, aspectos estes que resultarão em maior economia e longevidade das cultivares comerciais (DEMETRIO et al., 2008). Trabalhos que tratam da discriminação de cultivares de cana-de-açúcar quanto à resistência a *D. saccharalis* na literatura brasileira, foram especialmente conduzidos com as cultivares comerciais antigas (AMARAL e ARRUDA, 1964; 1972; DERNEIKA e LARA, 1991). DEMETRIO et al. (2008) selecionaram, os clones RB975311 e RB9755286 como portadores de resistência a *D. saccharalis* por apresentarem menor ocorrência de ataque por *D. saccharalis*, além de boa produtividade e qualidade tecnológica. Entretanto, poucas informações têm sido veiculadas acerca dos tipos de resistência a *D. saccharalis* e ao parasitóide *Cotesia flavipes*.

Esta tese visou elucidar os mecanismos de resposta da cana-de açúcar à herbivoria, buscando identificar metabólitos secundários e compostos fenólicos das cultivares SP81-3250 e SP89-1115 (consideradas resistente e suscetível, respectivamente) que sejam elicitados pela herbivoria da broca da cana-de-açúcar *D. saccharalis*. Desta forma, o trabalho pode contribuir para geração do conhecimento dos mecanismos de resposta desta espécie.

OBJETIVOS GERAIS

Verificar as respostas de defesa a *Diatraea saccharalis* em diferentes cultivares de cana-de-açúcar em busca de novas fontes de resistência.

Objetivos específicos:

- ❖ Identificar compostos voláteis da parte aérea de diferentes cultivares de cana-de-açúcar;
- ❖ Observar o comportamento de oviposição de *D. saccharalis* na presença de diferentes cultivares de cana-de-açúcar;
- ❖ Identificar e quantificar compostos fenólicos das diferentes cultivares;
- ❖ Identificar os metabólitos secundários produzidos na resposta à herbivoria por *D. saccharalis*;
- ❖ Avaliar o efeito das concentrações do ácido clorogênico sobre as diferentes fases do ciclo de vida de *D. saccharalis*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (Figura 1) é uma monocotiledônea que pertence à família das gramíneas (Poaceae), como arroz, milho, trigo e sorgo. Considerada uma das culturas mais antigas do mundo, originária do Sudeste Asiático, na região da Nova Guiné Indonésia e se estendeu para Borneu, Samatra e Índia (DANIELS; ROACH, 1987; SHUTZ N et al., 2014).).

Figura 1. Planta de cana-de-açúcar.



FONTE: autora 2016.

A cana-de-açúcar, introduzida no Brasil em 1502, adaptou-se bem ao clima e solo principalmente da região nordeste, a partir de então o plantio da gramínea só cresceu e é cultivada até os dias atuais. O gênero *Saccharum* foi primeiramente descrito no livro *Species Plantarum* por Carl Linnaeus (1800). Esse gênero é composto principalmente, pelas espécies *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinense*, *S. Barberi*, as quais são consideradas do velho mundo. No Brasil, inicialmente, foi introduzida a espécie *Saccharum officinarum*, conhecida como cana-nobre, pelo alto teor de açúcar. Com o surgimento de híbridos interespecíficos, tolerantes, e com grande adaptação às diversas condições ambientais, através do melhoramento genético, permitiu-se a consolidação e expansão da cultura pelo mundo (BENEDITE e CONDE, 2008; MARAFANTE, 1993; GUPTA et al., 2010; CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011; FIGUEIREDO et al., 2012).

De todas as espécies citadas anteriormente apenas *S. spontaneum* e *S. robustum* são consideradas puras, enquanto que as demais são de origem híbrida. Assim as cultivares de cana-de-açúcar atuais são originadas de espécies e híbridos do gênero *Saccharum*, porém alguns países como Índia e China usam outras espécies do mesmo gênero para produção comercial do açúcar, devido a isso é incorreto referir-se a cana-de-açúcar como sendo da espécie *S. officinarum* (STEVENSON, 1965).

A espécie *S. officinarum* ($2n = 80$) não é conhecida no seu estado selvagem. Em se tratando do centro de origem desta cultivar, ele não é exatamente conhecido, mas é possível encontrarmos descrito duas opiniões diferentes: uma que por meio da seleção natural ela se originou da *S. robustum* em Wallacea / Nova Guiné (Grassl 1974, 1977); e outra que evoluiu a partir de *S. spontaneum*, *Miscanthus* e *Erianthus arundinaceus* (DANIELS e ROACH, 1987). A primeira opinião é apoiada pelo fato de que todos os clones, com exceção 'Badilla', tem em sua parte foliar padrão de flavonoides semelhantes de *S. officinarum* (WILLIAMS et al., 1974). A espécie *S. spontaneum* ($2n = 40-128$) com indivíduos poliploides, apresenta alta adaptabilidade e é considerada uma espécie polimórfica, pois só na Índia são conhecidos mais de 300 ecotipos. Essa espécie pode ser encontrada desde o Japão, Indonésia, Papua-Nova Guiné até o Mediterrâneo e África (PANGE, 1933; RAO e BARU, 1955; FIGUEIREDO, 2012). A variabilidade dessa espécie contribui com características de interesse agrônomo como vigor, dureza, perfilhamento, capacidade de rebrota de

soqueira, resistência a estresse hídrico, salinidade, doenças e pragas (NAIDU e SREENIVASAN, 1987). A espécie *S. robustum* ($2n = 60, 80$) teve sua origem na Indonésia e Nova Guiné. Essa espécie surgiu a partir da hibridização natural de *S. spontaneum* com outros gêneros *Erianthus*, *Sclerostachya* e *Miscanthus*. A *S. robustum* possui colmos ricos em fibras e pouca sacarose, sendo também suscetível ao vírus do mosaico da cana-de-açúcar. (DANIEL et al., 1975).

Segundo DANIELS e ROACH (1987) os genomas: *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinens* e, *S. barberi* podem estar participando, ainda que parcialmente, dos híbridos interespecíficos (obtidos do cruzamento de diferentes espécies) atualmente cultivados. As cultivares modernas são altamente polianeuploides (com cromossomos duplicados ou ausentes), geralmente com o número de cromossomos acima de 100, derivadas principalmente de hibridizações interespecíficas entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*. A origem recente de cultivares derivadas de um germoplasma restrito pode resultar em perda de variabilidade genética. Geralmente uma das primeiras preocupações de um melhorista é a existência de variabilidade genética no germoplasma, que pode aumentar as chances de encontrar indivíduos superiores nas gerações segregantes (SANTOS et al., 2012).

Além dos híbridos interespecíficos, acredita-se que a cana-de-açúcar seja oriunda de um grupo de cruzamento bastante próximo, denominado de “Complexo Saccharum”, que compreende diferentes gêneros, *Saccharum*, *Erianthus*, *Sclerostachya* e *Narenga*, podendo ser acrescidos *Miscanthus* e *Diandra* (GARCIA, 2006), hipóteses estas que têm sido testadas com o auxílio de marcadores moleculares e sequenciamento de DNA (HODKINSON, 2002)

Uma cultivar comercial de cana-de-açúcar necessitará agregar um conjunto de características como: resistência ou tolerância a doenças e pragas, acúmulo elevado de sacarose, tolerância a seca, teor de fibra adequado, capacidade de brotação sobre palhas, uniformidade de colmo, hábito ereto de crescimento, rápido crescimento, tolerância a frio, entre outras. O estudo com diferentes cultivares realizado pelos programas de melhoramento de cana-de-açúcar vem desenvolvendo cultivares com tolerância ao estresse hídrico, maior resistência às pragas e doenças e melhor adaptação à colheita mecanizada (DINARDO-MIRANDA et al., 2010; LANDELL e BRESSIANI, 2010)

2.2 Importância Econômica da Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é hoje umas das culturas tropicais de grande importância, sendo a principal matéria-prima para a produção de açúcar. Além de serem atribuídas outras múltiplas utilizações: pois o colmo (caule) é esmagado e libera o caldo que é concentrado por aquecimento, resultando no mel, a partir do qual o açúcar é cristalizado, tendo como subproduto o melaço ou mel final. O colmo pode também ser consumido in natura, ou então utilizado para fazer o caldo de cana (garapa), melado e rapadura, podendo também ser utilizada na alimentação animal. O caldo da cana-de-açúcar através do processo de fermentação produz etanol, além de bebidas destiladas como cachaça, rum e outras bebidas alcoólicas. Os resíduos ou subprodutos que durante o processamento como a torta de filtro e vinhaça, podem ser utilizados na fertilização do canavial (MARAFANTE, 1993; DEMATTÊ, 2004).

Por motivos econômicos, geopolíticos e ambientais, as atenções do mundo se voltam para fontes alternativas de energia, em especial para o etanol. Essas atenções voltadas para o etanol não estão mais restritas ao etanol combustível, mas incorporam o etanol grau químico, fonte de matérias-primas (químicas) utilizadas em diversos setores da indústria de transformação. A alcoolquímica é o segmento da indústria química que utiliza o álcool etílico como matéria-prima para fabricação de diversos produtos químicos. Com efeito, boa parte dos produtos químicos derivados do petróleo pode ser obtida também do etanol (eteno e seus derivados acetatos e o éter etílico). Hoje, a indústria química mundial obtém mais de 90% da matéria-prima para síntese de moléculas orgânicas com base no petróleo. No futuro, por razões econômicas, a alcoolquímica poderá vir a substituir a petroquímica e o etanol poderá assumir o lugar do petróleo como fonte de matérias primas (BASTOS, 2007).

O novo conceito de etanol (ou bioetanol) corresponde a sua fabricação utilizando como matéria-prima a biomassa lignocelulósica. Essas matérias-primas provenientes de sobras e resíduos de produtos naturais (como o sabugo e a palha do milho, o bagaço, as pontas e as palhas da cana-de-açúcar) e o conceito de biorrefinarias emergem como fundamentais para a expressiva ampliação pretendida da produção de etanol, que hoje esbarraria em limitações para expansão da área plantada, seja por competir com a produção de alimentos, seja pelo nível de seus

preços relativos frente ao petróleo e aos próprios alimentos. É justamente por disputar matéria-prima e depender das cotações de preços do açúcar (no caso da cana) e dos alimentos (no caso do amido dos cereais), que ainda não foi possível o desenvolvimento de um mercado estável para o etanol (BASTOS, 2007).

A cana-de-açúcar tem como principal importância na economia brasileira a produção na agroindústria (açúcar, álcool e aguardente). Isso é decorrente da sua capacidade de armazenamento significativo de sacarose (OMETTO, 2000). A agroindústria sucroalcooleira brasileira é um dos principais segmentos econômicos na geração de empregos diretos, além de ser uma importante fonte de renda e desenvolvimento. O volume de cana-de-açúcar processado na safra 2015/2016 foi de 666.824 milhões de toneladas, enquanto que a região Norte-Nordeste atingiu 49.115 milhões de toneladas (ÚNICA 2016). Segundo dados do SINDAÇÚCAR (2016), o estado de Alagoas é classificado como o maior produtor nordestino de cana-de-açúcar, contabilizando uma produção de 16.382 milhões de toneladas (cana moída), 1.228 milhões de toneladas (açúcar) e 378 milhões/m³ (álcool), um produto considerado imprescindível em função da geração de emprego e renda que a atividade com a cana-de-açúcar proporciona à economia do estado.

2.3 Perdas Econômicas por Pragas

Apesar da facilidade de adaptação da cana-de-açúcar ao clima do Brasil, muitos fatores são responsáveis pela redução da produtividade e rendimentos agroindustriais da cultura. 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 (ROSSETTO e SANTIAGO, 2007). Assim 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).

As pragas reduzem a produção, diretamente são carreadores de doenças e diminuem a qualidade dos produtos agrícolas causando dessa forma, perdas econômicas. Com isso, faz necessária uma medida sistemática e estratégica visando à minimização destas pragas (PICANÇO et al, 2010). Como fator limitante à produção sucroalcooleira estão os danos causados por insetos na cultura, com

perdas de grande valor anualmente (DEMETRIO et al., 2007). Em se tratando da praga agrícola *D. saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae), conhecida como broca da cana-de-açúcar, o dano econômico é muito variável, dependendo da idade do canavial, do local da infestação, do nível da infestação e da cultivar. Estima-se que para cada 1% de índice de infestação de broca, as perdas industriais ficam em torno de 20 a 30kg de açúcar por hectare, representando, em média, 0,85% de decréscimo em produtividade (ROSSETTO E SANTIAGO 2007).

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

Dentre as pragas mais importantes para a cultura estão as brocas do colmo e entre elas a broca da cana-de-açúcar (*D. saccharalis* Fabricius, 1794) Lepidoptera, Crambidae. É nativa do hemisfério ocidental sendo a espécie mais amplamente distribuída do gênero, encontrada no Caribe, América Central e nas regiões quentes da América do Sul até o norte da Argentina (SGRILLO, 1979; LIMA FILHO e LIMA, 2001).

Seu ciclo de vida (Figura 2) apresenta quatro fases bem distintas: ovo, larva, pupa e adulto o que a caracteriza como uma espécie holometabólica (LIMA FILHO e LIMA, 2001; COSTA, 2010). A fase adulta é representada pelas mariposas com asas anteriores de coloração amarelo-palha e apresentam manchas escuras em forma de “V” invertido, enquanto que as asas posteriores são esbranquiçadas. As fêmeas são maiores que os machos com menos pigmentação nas asas, outro diferencial está na grande quantidade de cerdas no último par de pernas dos machos (Figura 3) (SEGATO et al. 2006; PANNUTI, 2012).

Figura 2 – Ciclo de vida da Broca da cana-de-açúcar (*D. saccharalis*).

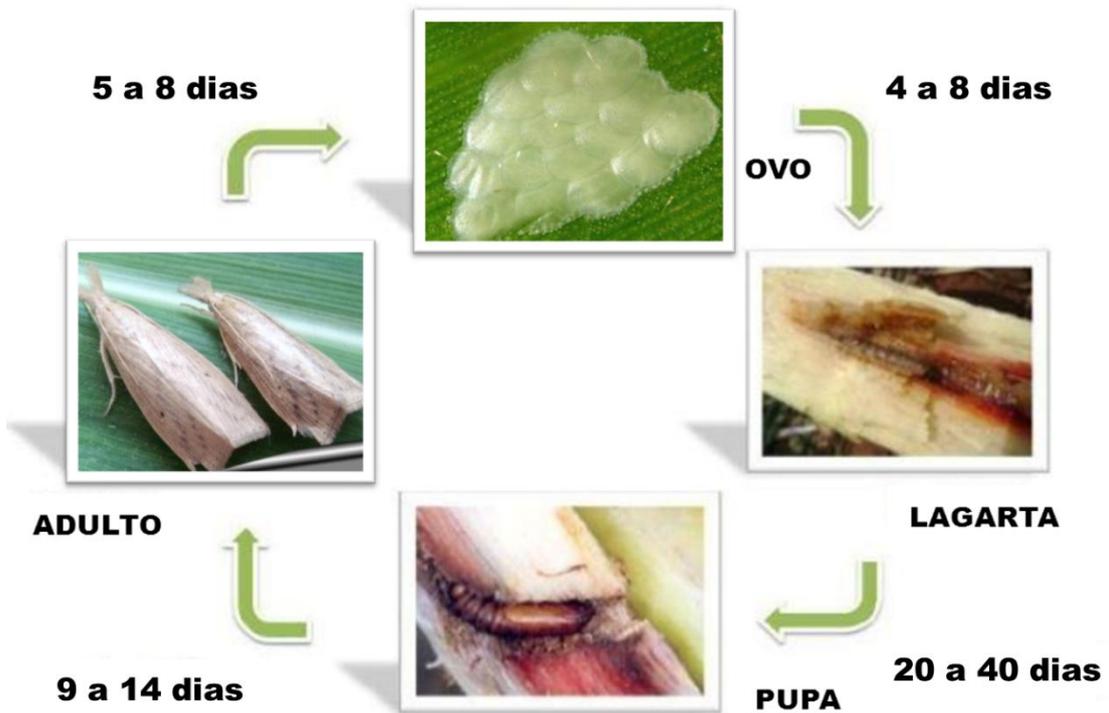
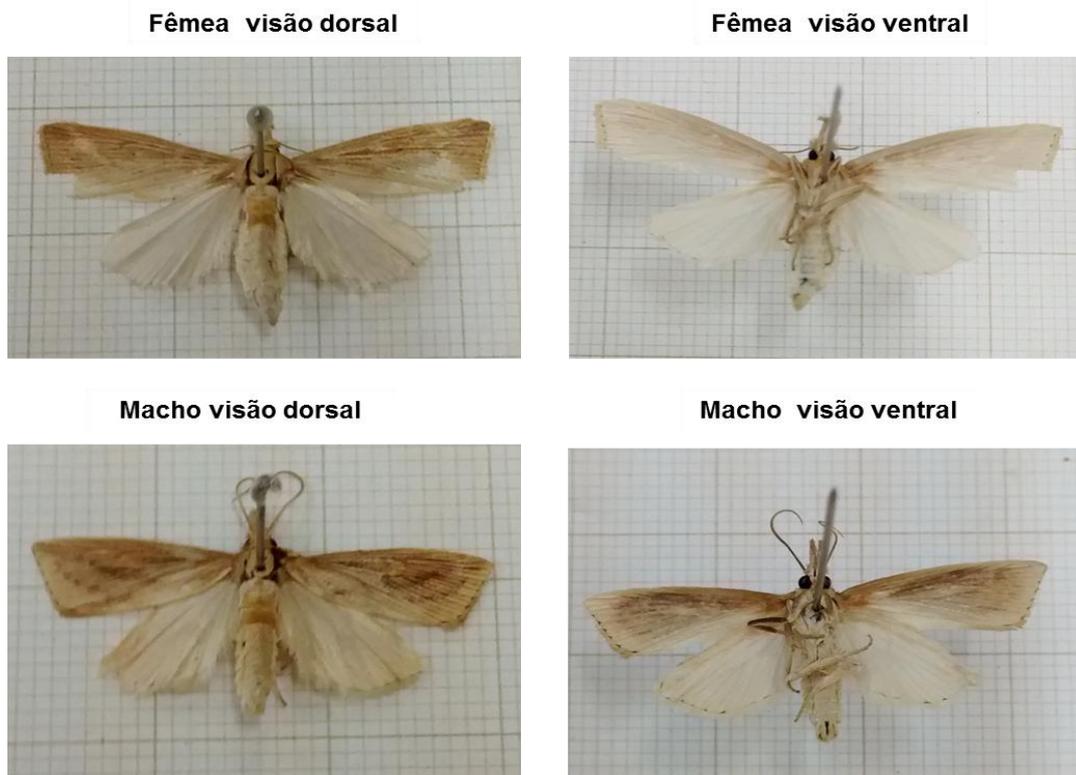


Figura 3 - Fêmea e macho de *D. saccharalis*.



Fonte: autora 2016.

Os adultos apresentam hábito noturno, longevidade de aproximadamente cinco dias e as fêmeas durante esse período liberam feromônio para atrair o macho e copular. O ciclo inicia-se após o acasalamento, onde as fêmeas ovipositam na parte dorsal das folhas. O número de ovos pode variar a cada postura, normalmente de 5 a 50, mas durante seu ciclo de vida as fêmeas podem colocar cerca de 200 a 600 ovos. Os ovos são de formato oval achatado e coloração que varia de amarelo palha a marrom-escura, além do mais são sensíveis ao ressecamento (BOTELHO e MACEDO, 2002; GALLO *et al*, 2002; PANNUTI, 2012).

As lagartas alimentam-se primeiramente das folhas do cartucho onde se abrigam e após a primeira ecdise penetram na porção mais macia do colmo, próximo às gemas. Este processo gera galerias que facilita a entrada de outros organismos como fungos. As lagartas apresentam coloração branco leitosa, cápsula cefálica marrom-escura e linhas marrons dispostas ao longo do corpo. A fase larval pode durar de 20 a 40 dias a depender da temperatura, seu tamanho máximo ao final da sexta ecdise é de 25 mm que logo em seguida começa a fase de pupa que pode durar até 9 a 14 dias. Nessa fase a pupa possui coloração castanha. Após a emergência do adulto ele sai do colmo para o exterior por meio de uma abertura que foi previamente aberta pela lagarta no colmo (BOTELHO e MACEDO, 2002; PINTO *et al*. 2004). O ciclo evolutivo da *D. saccharalis* leva em torno de 60 dias, e de acordo com as condições climáticas atingem quatro gerações. O milho também pode servir como hospedeiro alternativo à praga (GALLO *et al*. 2002).

Com relação aos danos esta praga destaca-se em virtude do seu poder “destruidor” (COSTA; FRANCEZ; SÁ, 2010). Os prejuízos em cana-de-açúcar quando atacada por *D. saccharalis* são classificados como diretos e indiretos. Os prejuízos diretos podem ser causados em todos os estágios de desenvolvimento da planta. O sintoma conhecido como “coração morto” é um dos principais problemas de perdas em canaviais. 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, causados pela ação de agentes patológicos, são consequência do comportamento da broca que quando inicia o ataque à planta e a formação de galerias adentrando no colmo, facilitam aos microrganismos como os fungos *Fusarium moniliforme* e *Colletotrichum falcatum*,

penetrar pelo orifício ou são juntamente disseminados com a lagarta causado, respectivamente, “podridão-do-fusarium” e a “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; SANDOVAL e SENÔ, 2010).

2.5 Mecanismos de defesa das plantas

Nas plantas existe uma correlação entre multiplicar-se e defender-se, e isso se deve a disponibilidade de recurso, pois as plantas quando atacadas por herbívoros tem o seu desenvolvimento vegetativo e/ou reprodutivo impactado. A amplitude desse impacto depende do tecido atacado, da disponibilidade dos recursos e da intensidade e constância do dano (DIRZO, 1984; COLEY et al., 1985; BEGON et al., 1996).

Herbívoros dependem das plantas para se alimentarem, e desenvolveram mecanismos para obter esse tipo de alimento. Com os constantes surgimentos de novas pragas e formas de ataque as plantas desenvolveram ao longo da evolução a habilidade de reconhecer e responder defensivamente ao ataque dos herbívoros que ocorre de maneira sistemática, iniciada a partir da interação inseto-planta. (HOWE, et al., 1996). Dentre estas, destaca-se a produção de barreiras físicas (espinhos e tricomas), dificultando o acesso dos insetos praga; a síntese de metabólitos primários e secundários tóxicos (a produção de resina, aumento da concentração de lignina e outros fenólicos, acúmulo de sílica e cera em sua epiderme) ao inseto praga; e a síntese de metabólitos voláteis, que podem ter a função de sinalização para plantas vizinhas e de atração de predadores dos insetos praga (AGRAWAL, 1999; MELLO E SILVA-FILHO, 2002).

As plantas podem ser classificadas como suscetíveis ou resistentes. A resistência à herbívoros é resultado de estratégias que as plantas utilizam para dificultar sua localização, tornar-se um alimento inadequado ou simplesmente sobreviver (CINGOLANI et al., 2005; MACDONALD; BACH, 2005) O mecanismo de defesa das plantas podem se expressar como constitutivo, composto por estruturas morfológicas e compostos químicos que dificultam o acesso dos herbívoros às plantas; e induzido, que se refere a qualquer mudança na morfologia ou fisiologia da

planta após o ataque. O ataque do herbívoro induz 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. (COLEY; BARONE, 1996; KARBAN; BALDWIN, 1997; LUCAS et al., 2000).

Um dos primeiros sinais de ataque para planta é a deposição de ovos na superfície foliar, pois possivelmente haverá a emergência das larvas e conseqüentemente a tentativa de dano. As plantas percebem a deposição dos ovos e esse contato constante envolve outros fatores além do físico. A secreção que auxilia a adesão dos ovos à superfície da planta induz uma resposta contra a oviposição. Porém um conjunto de ações da fêmea durante a oviposição também poderá desencadear esta resposta. A fêmea pode se alimentar na mesma folha que está ovipositando e para melhorar a adesão a fêmea morde o local (dano) onde serão depositados os ovos; ou para evitar dessecação, a fêmea provoca maiores danos e insere os ovos no local. (DOSS et al., 2000; MEINERS; HILKER 2000).

Muitas espécies de *Passiflora* são hospedeiras dos ovos de *Heliconius* e sua forma larval danifica excessivamente as plantas por meio de herbivoria. Devido a esse ataque as plantas desenvolveram um mecanismo de autodefesa mimetizando por meio das glândulas foliares ovos de *Heliconius*, desencorajando desta forma a oviposição por borboletas, pois as larvas dessa espécie tem comportamento canibal. (GILBERT 1975). Plantas tem também a capacidade de necrosar o tecido onde os ovos são depositados, fazendo com que os ovos caiam da planta e assim seja inviabilizado o desenvolvimento do inseto (BALBYSHEV; LORENZEN, 1997). Os mecanismos indiretos, por sua vez, são os de facilitar com que os parasitóides de ovos localizem seus hospedeiros. Assim, a oviposição induz a produção pela planta de um padrão específico de voláteis que será percebido pelos parasitóides que encontrarão os ovos mais facilmente (HILKER; MEINERS, 2006).

O rastro do inseto é outro fator físico percebido pelo planta pois geralmente a pisada possui composição química semelhante a cutícula do próprio inseto e contem lipídios específicos, refletindo qualitativamente como padrão químico específico do inseto (HILKER; MEINERS, 2010).

A alimentação dos herbívoros pode ser detectada por uma planta simplesmente como resultado de um dano físico. No entanto sabe-se que não basta ocorrer o dano físico para que a planta responda, a planta percebe a presença de elicitores presentes nas secreções orais acelerando sua fisiologia,

ativando a emissão induzida de compostos orgânicos voláteis e vias metabólicas de defesa. Os herbívoros liberam regurgito no local da mordida e compostos químicos presentes no regurgito 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).

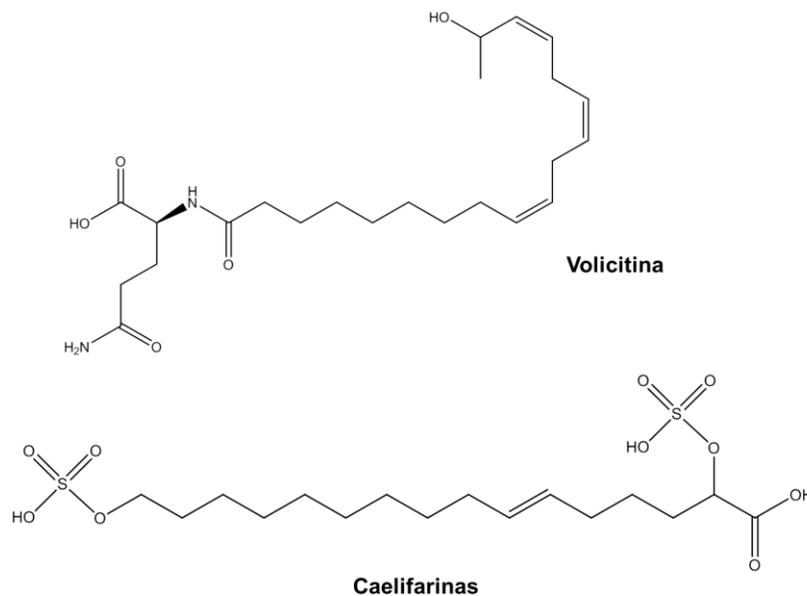
Entre os primeiros compostos já isolados de regurgitos em amostras de larvas de lepidópteros o composto N-(17-hidroxiolenolenoil)-L-glutamina conhecido como volicitina e outros derivados de ácidos graxos, desencadeiam respostas diretas bem como respostas indiretas de defesa, ou seja, induzem a produção de voláteis nas plantas (SPITELLER e BOLAND, 2003).

A volicitina (Figura 4), N-(17-hidroxiolenolenoil)-L-glutamina foi o primeiro conjugado de ácidos graxos e aminoácidos identificado. No início dos anos 90, este composto foi isolado, identificado e sintetizado a partir da saliva da lagarta *S. exigua*, e quando aplicado em plantas de milho causa a liberação dos mesmos voláteis liberados após o dano realizado por lagartas. Porém, não tem os mesmos efeitos no feijão-de-lima, também hospedeiro de *Spodoptera exigua*. Além de lepidópteros, também foram isolados ácidos graxos conjugados e aminoácidos da secreção oral de outros insetos como larvas de moscas das frutas e grilos que também induzem a emissão de voláteis (MAFFEI et al, 2012). Na secreção oral do gafanhoto-sul-americano *Schistocerca americana* Drury, 1773 (Orthoptera: Acrididae) foram identificados elicitores conhecidos como caeliferinas (Figura 4) que induzem a emissão de voláteis (ALBORN, 2007). As caeliferinas são compostas de ácidos graxos hidroxi sulfatados saturados e monoinsaturados, nos quais o carbono é funcionalizado com uma hidroxila sulfatada ou com uma carboxila ligada a uma glicina através de uma ligação amida.

No grupo das enzimas líticas, um segundo elicitador foi identificado alguns anos depois da volicitina, a β -glucosidase (MATTIACCI et al, 1995). Esta enzima lítica está presente no regurgito de lagartas de *Pieris brassicae* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pieridae) e, quando aplicado em folhas de couve (*Brassica oleraceae* L.) com danos mecânicos, resulta na emissão de voláteis que atraem parasitoides da espécie *Cotesia glomerata* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Braconidae). Outras enzimas líticas, tais como glicose oxidases de lepidópteros e

fosfatase alcalina de mosca branca, foram identificadas, mas suas funções como elicitores não foram comprovadas. Na saliva do pulgão-da-espiga *Sitobion avenae* (Fabricius, 1775) e *Schizaphis graminum* (Rondani, 1852) (Hemiptera: Aphididae) também foram encontrados elicitores (polifenol oxidases) de respostas de defesa em trigo (*Triticum aestivum* L.) (MA et al., 2010). Portanto, a indução da emissão de voláteis de plantas é causada por um elicitor presente na glândula salivar do inseto (Rodríguez-Saona et al., 2002).

Figura 4. Estrutura de alguns elicitores derivados de herbívoros envolvidos na produção e emissão de voláteis



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).

O mecanismo de defesa induzido nas plantas só será utilizado pela planta na presença do patógeno ou herbívoro. 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 de 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, 2012; WU; BALDWIN, 2010).

Em resposta ao ataque de herbívoros, as plantas possuem uma habilidade única de reconhecimento e conseqüentemente desencadeiam sua resposta para produzir desde uma simples toxina até substâncias que interfere no crescimento ou reprodução do inseto. Dentre estes metabólitos que estão presentes nos tecidos das plantas se incluem os aleloquímicos com atividades antinutricionais, tóxicas ou repelentes ao herbívoro, e como exemplo pode-se listar os glicosídeos cianogênicos, inibidores de enzimas digestivas, lectinas, glicosinolatos, alcaloides e terpenóides. A defesa indireta consiste da produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) que são liberados pelas plantas quando sofrem algum dano causado pelo herbívoro e podem atrair predadores ou parasitóides que protegerão a planta ou repelir a oviposição ou inseto herbívoro (KARBAN, 1993; VOELCKEL; BALDWIN 2004).

2.6 Voláteis e não voláteis no mecanismo de defesa

As plantas são constantemente atacadas por herbívoros e patógenos e desta forma elas devem destinar uma fração de seus recursos metabólicos para defender-se, emitindo uma mistura de compostos voláteis e não-voláteis que alteram essas interações. Ao investir em defesa, as plantas ganham proteção, mas, além disso, também podem beneficiar plantas vizinhas. A composição e emissão de voláteis variam conforme a idade da planta, local, grau, tempo e tipo da injúria (FEENY, 1976; JANSSEN et al., 2002; ZHANG, 2010). A sobrevivência das plantas depende, portanto, da habilidade de responder ao ataque de herbívoros, modificando seu metabolismo sintetizando desta forma, inúmeros compostos de defesa que combata o agressor de forma direta ou indireta (MYSORE; RYU 2004, JONES; DANGL 2006).

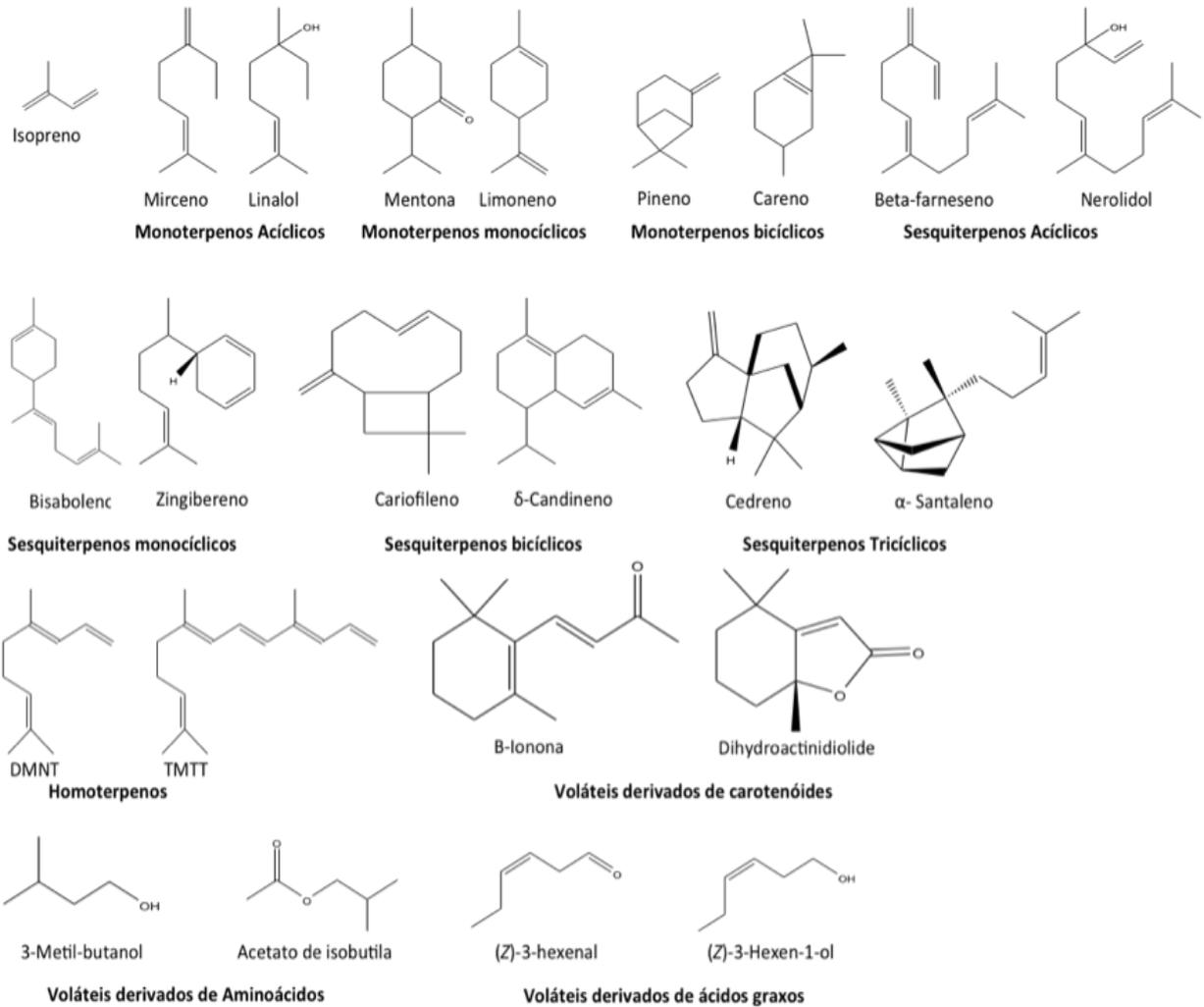
Os compostos orgânicos voláteis (COVs) das plantas são normalmente líquidos lipofílicos com elevada pressão de vapor, e podem atravessar membranas celulares facilmente sendo liberados na atmosfera ou no solo, quando não há alguma barreira de difusão (PICHESKY et al., 2006). Os COVs abrangem hidrocarbonetos saturados e insaturados (alcanos e alcenos) e hidrocarbonetos oxigenados, como ácidos carboxílicos, aldeídos, cetonas, éteres, ésteres e álcoois (MARTINS, 2004; SCHIRMER e LISBOA, 2008; LIGOR et al., 1998). Os COVs são liberados por praticamente todos os tecidos vegetais e classificados nas seguintes

classes: terpenóides, carotenóides, fenilpropanóides/benzenóides, derivados de ácidos graxos (incluindo os produtos da via da lipoxigenase) e os compostos C5-ramificados (Figura 5). Além desses, há também os derivados de aminoácidos, que são frequentemente encontrados como componentes em aromas liberados por flores e frutos (DUDAREVA; PICHERSKY, 2008). Desde a antiguidade, sabe-se que tecidos florais e vegetativos emitem substâncias com diferentes odores. O entendimento da importância, apesar de muitas vezes imperceptíveis aos humanos, e de que estes exercem alguma alteração fisiológica nas plantas, começou após a descoberta do hormônio gasoso etileno em 1934 (DUDAREVA et al., 2004). Hoje sabe-se que as plantas realizam um incalculável arsenal de diferentes reações biossintéticas e estima-se que dos 100.000 compostos químicos produzidos pelas plantas, aproximadamente 1.700 sejam voláteis (DICKE; LORETO, 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; ZARBIN et al, 2009). Esses semioquímicos podem atuar como alomônios, cairomônios ou sinomônios, dependendo do contexto ecológico.

Alguns COVs são emitidos a partir das plantas infestadas sendo apenas resultado da ruptura mecânica de células da planta, e não são específicas de herbivoria. No entanto, outros voláteis que são liberados após danos são indicadores específicos de herbívoros na planta (DICKE et al., 1990 a,b) chamados sinomônios. Por exemplo, o ácaro predador *Phytoseiulus persimilis* é atraído pela indução de sinomônios produzidos após dano causado pelo ácaro aranha *Tetranychus urticae* em plantas de feijão e pepino (DICKE et al., 1990a,b). 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, a liberação do composto indol aromático é específico do herbívoro e ocorre mais cedo do que outras respostas induzidas. Usando mutantes indol-deficiente e dispensadores de indol sintéticos, foi demonstrado que o indol induzida por herbívoro aumenta a indução de voláteis defensivas nas plantas vizinhas de milho de uma forma específica da espécie. Além do mais, esses voláteis atraem vespas parasitas como *Cotesia marginiventris* para o local da lesão, onde eles ovipositam nas larvas de lepidópteros (TURLINGS, 1995; Erb, 2015)

Figura 5 - Principais compostos e classes de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) de plantas.



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 pirofosfato de isopentenil (IPP) e desempenham inúmeras funções importantes na planta a exemplo de atração de polinizadores, defesa contra danos, sinalização para outras plantas, repelente de herbívoros, efeitos alelopáticos e reguladores de crescimento (KÖLNER et al., 2008).

O β -cariofileno foi encontrado em resposta ao dano por herbivoria em vários parentes silvestres de milho e em linhagens de milho cultivadas a partir de programas de melhoramento genético da Europa (GOUINGUENÉ et al., 2001). 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). Este composto em cana-de-açúcar está envolvido na defesa da planta em resposta a herbivoria por *D. saccharalis* sendo produzido apenas pelo tecido foliar e atrai o predador endoparasitóide *Cotesia flavipes* estabelecendo, dessa forma uma relação tritrófica (SILVA FILHO, 2014).

Dentro dos mecanismos de defesa vegetal, entre os compostos produzidos por plantas para este fim estão também os compostos fenólicos, que geralmente, apresentam o papel importante na defesa das plantas relacionada às suas propriedades antibióticas, antinutricionais e impalatabilidade. A relação entre insetos e plantas sofre a interferência de vários fatores, entre eles a composição química da planta. Os insetos possuem uma grande cultivar de quimiorreceptores (gustativos e olfativos), localizados principalmente em suas antenas e aparelho bucal, que são capazes de discriminar os compostos químicos com uma altíssima sensibilidade, ou seja, detectam diferentes concentrações desses compostos e processam essa informação no sistema nervoso central. Assim, os metabólitos secundários, e consequentemente os fenólicos, exercem um papel fundamental nos padrões de utilização das plantas pelos insetos. Quando o inseto está a procura de um hospedeiro ele deve primeiramente localizar e identificar a espécie de planta

apropriada. Pistas tigmotáticas, visuais e olfativas podem participar neste processo de reconhecimento e conseqüente migração ao hospedeiro. Quando a locomoção do inseto na planta cessa, o inseto faz a primeira prova e o balanço final entre o estímulo e a deterrência do material determinará se o inseto permanece no local e se alimenta. Portanto, a aceitação ou rejeição da planta pelo inseto depende em grande parte de sua composição química. Além disso, os compostos químicos presentes podem inibir a oviposição e a sobrevivência e performance da larva. Muitos compostos tem sido descritos com essas atividades e os compostos fenólicos estão entre os principais envolvidos na proteção de plantas (Latanzio et al., 2006).

Além de várias outras classes de compostos os fenóis têm sido implicado nos mecanismos de defesa da planta (ELGERSMA; LIEM, 1989; NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992; KUÉ, 1972). Alguns são formados em resposta à penetração dos agentes patogênicos, e a sua produção é considerado como parte de uma resposta de defesa ativa (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992). MATTA et al. (1988), observaram a ativação do metabolismo dos compostos fenólicos mediante a presença de patógenos nos vasos do xilema de tomate. Essa observação foi confirmada por COOPER et al. (1996), que encontraram dois compostos fenólicos, um triterpenoide e, muito raramente em um eucariota superior, como enxofre elementar S₈ cyclooctasulphur, em células associadas com patógenos vasculares em genótipos resistentes a doenças de *Theobroma cacao*.

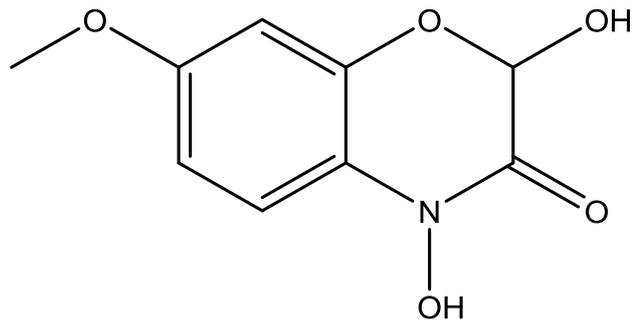
Plantas de *Pisum sativum* quando tratadas com rizobactérias promotoras de crescimento e infectadas com *Erysiphe pisi* tiveram a síntese dos compostos fenólicos ácido tânico, ácido gálico, ácido ferúlico, e ácidos cinâmico melhorada porque induziram uma maior quantidade desses compostos (SINGH et al. 2002)

Outros compostos produzidos por plantas como mecanismo de defesa 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 diversas espécies de gramíneas, incluindo o milho, o trigo e o centeio. Eles exercem várias funções na planta, tais como resistência a doenças e insetos, tolerância a herbicidas e regulação do crescimento (STOESSL, 1983; MAYORAL et al, 1994).

A DIMBOA (2,4-dihidróxi-7metóxi-1,4-benzoxazin-3-ono) (Figura 6) o mais abundante dos ácidos hidroxâmicos, é um composto intracelular, não volátil, e

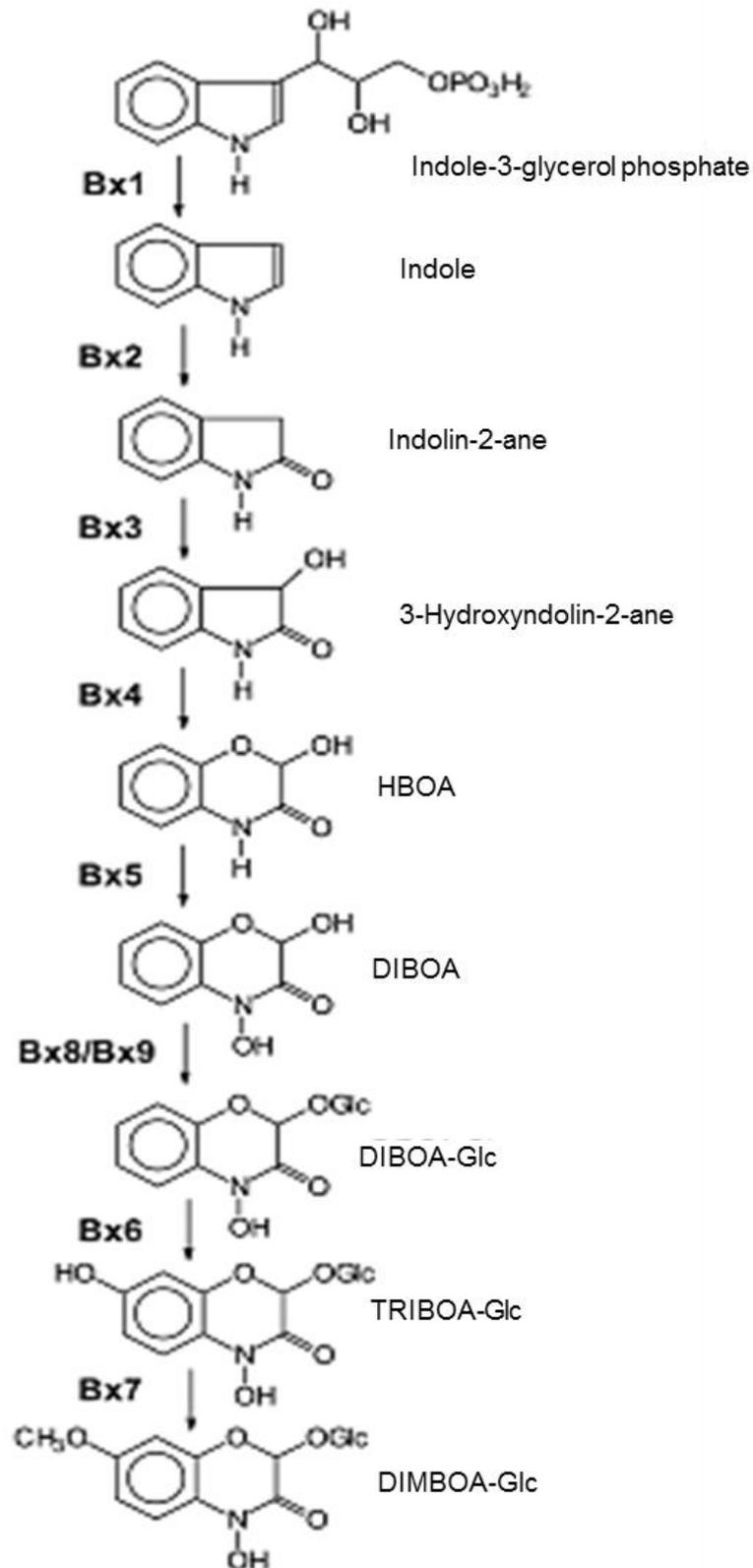
funciona como pesticida e inseticida e pode apresentar propriedades alelopáticas (JONCZYK, 2008).

Figura 6 - Estrutura molecular da DIMBOA



Sua biossíntese (Figura 7) 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 uma dioxegnanase *2-oxoglutarato-dependente* 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 7 - Biossíntese do Ácido Hidroxâmico DIMBOA. Cada gene *Bx* expressa uma proteína responsável pelas transformações do Indol até o produto final DIMBOA.



O projeto transcriptoma da cana-de-açúcar (SUCEST) identificou inúmeros genes ortólogos envolvidos na resposta ao dano por inseto, entre eles, gene similar 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 e VIRAKTAMATH (2004) após tentativas na identificação de fontes de resistências em cana-de-açúcar contra afídeos os ácidos hidroxâmicos DIBOA e DIMBOA foram detectados.

Em resposta ao ataque de herbívoros, as plantas emitem voláteis, e produzem metabólitos secundários que podem repelir as pragas e comunicar-se com plantas vizinhas e atraí os inimigos naturais desses herbívoros, essa resposta desencadeia cascatas químicas nas plantas, as quais podem alterar a expressão de genes envolvidos na resposta a tal dano. 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.

Ao longo dos anos, o melhoramento de plantas cultivadas visou melhorar a qualidade das plantas para uso humano em busca de aumentar a produtividade alterando assim tamanho, sabor e qualidade nutricional das partes de plantas de interesse, favorecendo a maturação síncrona, tamanhos de plantas homogêneas, dominância apical, crescimento determinado, ou outras características de relevância para o cultivo e colheita, bem como alterar os traços que facilitam o transporte e armazenamento, além da resistência a patógenos e estresses abióticos. Como consequências disso, as plantas foram perdendo a resistência a ataque de pragas. Como já se sabe, parentes silvestres de plantas cultivadas têm muitas características benéficas que não estão presentes nas culturas modernas, assim 'rewilding' tornou-se uma nova tendência na reprodução de culturas que abre oportunidades interessantes para o controle biológico e agricultura orgânica. No entanto, várias questões regulamentares e políticos atualmente impedem o uso da maioria das técnicas genéticas para fornecer cultivares com traços específicos de resistência, particularmente quando estas cultivares devem ser utilizados na agricultura orgânica (STENBERG et al., 2015).

Este trabalho visou elucidar os mecanismos de resposta de diferentes cultivares de cana-de açúcar. Desta forma, podendo contribuir para geração do

conhecimento dos mecanismos de resposta desta espécie, bem como identificar alvos para, através do melhoramento genético e transgenia, desenvolver plantas com aumento de resistência a insetos herbívoros.

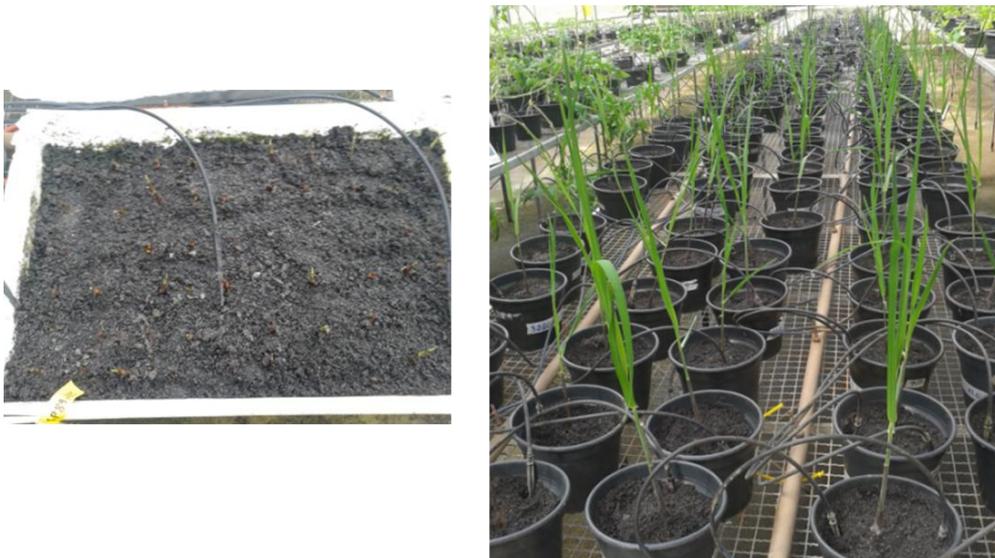
3 MATERIAIS E MÉTODOS GERAL

3.1 Produção das Plantas de cana-de-açúcar

Estacas maduras do terço médio da planta de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) das cultivares consideradas, pelos produtores rurais, resistente (SP81-3250) e suscetível (SP89-1115) a *D. saccharalis*, obtidas a partir da unidade de reprodução de germoplasma de cana-de-açúcar do programa da Universidade Federal de Viçosa, componente da RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético) (Barbosa et al., 2012) foram quinzenalmente semeadas em bandejas plásticas (Figura 8), utilizando um substrato comercial para mudas (substrato para plantas, Tropstrato HT hortaliças), mantidas em casa de vegetação com controle de temperatura, umidade, luz natural e regadas diariamente até atingirem a idade para transplante.

Ao atingirem 20 dias de semeadura, as mudas foram transplantadas para vasos plásticos preto de 2L contendo o substrato comercial (Figura 8). Feito isso, elas foram colocadas em bancadas com irrigação automatizada. As plantas utilizadas para os experimentos tinham a mesma idade fenológica (60 dias) e apresentavam sete folhas perfeitamente desenvolvida.

Figura 8. Produção das plantas de cana-de-açúcar.



Fonte: autora, 2016.

3.2 Criação *Diatraea saccharalis*

Os insetos utilizados para os experimentos de túnel de ventos e oviposição foram provenientes de criação mantida no Laboratório de Semioquímicos e Comportamento de Insetos da Universidade Federal de Viçosa, onde foram criados em dieta artificial (HENSLEY e HAMMOND, 1968). As pupas foram mantidas em recipientes com papel filtro umedecido, até a emergência dos adultos. Todos os insetos foram criados em condições controladas sob temperatura de $26\pm 2\%$, umidade relativa de $60\pm 2\%$ e fotoperíodo de 12 horas. Para obtenção dos ovos, foram utilizadas gaiolas de PVC de 30x20 cm com 50 casais de *D. saccharalis* onde foi fornecido algodão com água. As gaiolas foram vistoriadas diariamente para monitorar a ocorrência de cópulas e oviposições.

Os insetos utilizados para os demais experimentos foram fornecidos pela Usina Triunfo Agroindustrial LTDA, que fica localizada no município de Boca da Mata, estado de Alagoas, Brasil.

3.3 Comportamento reprodutivo

As observações sobre o comportamento reprodutivo foram realizadas em uma sala escura a uma temperatura de $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar de $80\%\pm 10\%$. Para facilitar as observações durante 12 horas da escotofase foi usada uma lâmpada vermelha de 15W.

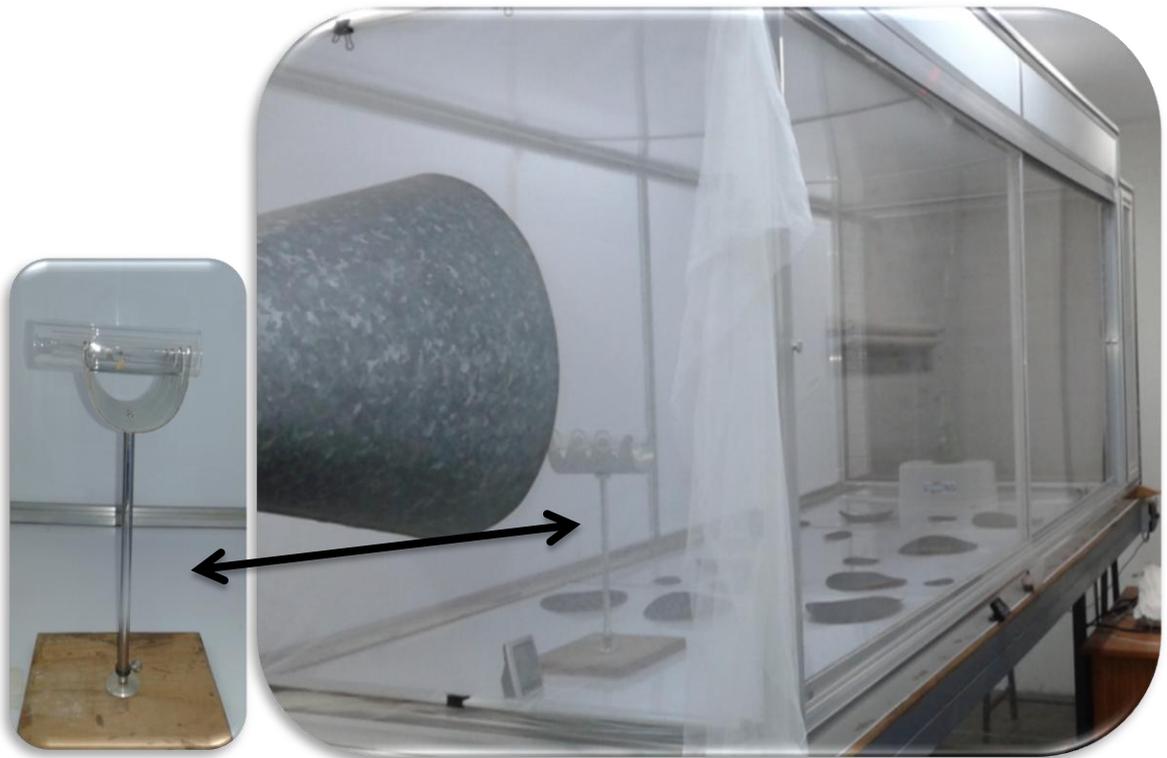
Pupas de fêmeas e machos foram colocadas no interior de uma câmara de acrílico, e observadas diariamente até casais emergirem. Após a emergência foram observados por 30 minutos a cada hora da fotofase e escotofase (12:12) desde o primeiro dia até 48 horas. Durante este período, os insetos foram alimentados através de um algodão embebido com solução de sacarose (10%).

As observações consistiram no registro da hora de emergência, a hora inicial e final em que a fêmea exibiu o comportamento de chamamento, determinação do tempo de cópula e tempo para iniciar a oviposição.

3.4 Bioensaio de túnel de vento

Os bioensaios para verificar as respostas de fêmeas de *D. saccharalis* a cana-de-açúcar foram conduzidos em túnel de vento. A sala exclusiva para os bioensaios em túnel de vento possuía iluminação, temperatura e umidade relativa controladas. Os bioensaios foram realizados em diferentes dias e horários. Após ligar e estabilizar o fluxo de ar do equipamento, as fêmeas de interesse que estavam acondicionadas em tubos de vidro foram colocadas dentro do túnel em um local que permitia a passagem de ar. Transcorridos dois minutos, as fontes de odor foram colocadas dentro do túnel na extremidade oposta das fêmeas, permitindo a passagem do ar (Figura 9). Foram utilizadas fêmeas virgens (90 indivíduos) e fêmeas acasaladas (120 indivíduos) de *D. saccharalis* em diferentes fotofases. Esses bioensaios foram realizados com o intuito de observar se elas responderiam a fonte de odor (COVs de cana-de-açúcar).

Figura 9 – Fêmeas em tubo de vidro dentro do túnel para avaliação de atratividade em voo e fonte de odor do lado oposto das fêmeas.



Fonte: autora, 2016.

Inicialmente, foram testadas fêmeas virgens (n=15) e fêmeas acasaladas (n=15). Os ensaios tiveram início uma hora antes de amanhecer e as primeiras fontes de odor foram uma planta da cultivar suscetível SP89-1115 ou resistente SP81-3250. No segundo experimento, foram testadas fêmeas virgens (n=24) e fêmeas acasaladas (n=24). A partir deste experimento as fêmeas foram expostas a fonte de odor por 5 minutos. Os ensaios tiveram início uma hora antes e uma hora após anoitecer. As fontes de odor foram duas plantas da cultivar suscetível SP89-1115 ou resistente SP81-3250. No terceiro experimento, foram testadas fêmeas virgens (n=21) e fêmeas acasaladas (n=21), uma hora antes e uma hora após anoitecer. As fontes de odor foram um extrato etanólico de folhas de cana-de-açúcar da cultivar suscetível SP89-1115 ou resistentes SP81-3250. No quarto experimento, foram testadas fêmeas virgens (n=30) e fêmeas acasaladas (n=30), uma hora antes e uma hora após anoitecer, utilizando como fonte de odor duas plantas da cultivar suscetíveis SP89-1115 ou resistentes SP81-3250. Neste a distância entre as fêmeas de interesse e a fonte de odor foi reduzida para um metro, pois anteriormente elas ficavam numa distância de dois metros e meio. No quinto experimento, foram testadas fêmeas acasaladas (n=30), uma hora após o acasalamento, utilizando como fonte de odor duas plantas da cultivar suscetível SP89-1115 ou resistente SP81-3250.

3.5 Bioensaios de oviposição em tubo

Para avaliar o efeito do tecido foliar da cana-de-açúcar como fonte de possíveis voláteis indutores de oviposição realizou-se experimento em tubos com e sem contato com a fonte de voláteis. A cana-de-açúcar utilizada foi a cultivar suscetível SP89-1115. Para tal, realizou-se a contagem de ovos após 24 h. Foram utilizadas fêmeas acasaladas mantidas individualmente em cada tubo de vidro (15,0 × 3,0 centímetros). Como substrato de oviposição foi utilizado uma folha de papel A4 instalada na parede do tubo de vidro cobrindo toda sua superfície. As extremidades dos tubos foram fechadas em ambos os lados com uma película plástica de PVC (Figura 10). O experimento foi realizado em blocos ao acaso com 17 repetições e três tratamentos. Os tratamentos foram 1) Fêmea com folha e sem separação por tela; 2) Fêmea com Folha e separada por tela; 3) Fêmea sem folha e sem tela.

Devido às características detectadas pelo teste de Normalidade e Homocedasticidade de Liliefors e Cochran & Bartlett, respectivamente, os dados foram submetidos à análise de variância não paramétrica e comparadas entre si pelo teste de Kruskal-Wallis. O software utilizado foi o SAEG. V5.1 1995–FURB/UFV.

Figura 10 - Tubo de vidro (15,0 × 3,0 centímetros) envolvido com folha de A4 e coberto em ambos os lados com uma película plástica de PVC.



Fonte: autora, 2016.

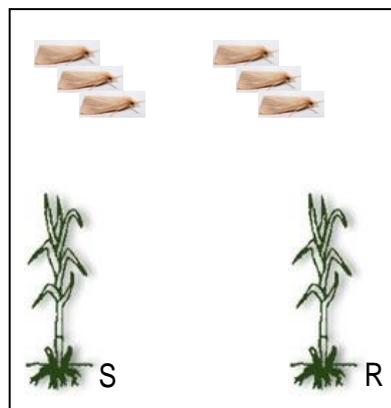
3.6 Teste de preferência para oviposição de *D. saccharalis* nas diferentes cultivares de cana-de-açúcar

3.6.1 Teste com chance de escolha

Para avaliação da preferência de fêmeas de *D. saccharalis* por sítios de oviposição em função do efeito atrativo de cultivares de cana-de-açúcar foi realizado o teste de preferência com chance de escolha. Foram utilizadas as duas cultivares de cana-de-açúcar SP89-1115 e SP81-3250. Foi utilizada uma planta de cada cultivar de cana-de-açúcar acondicionada aleatoriamente em uma gaiola (145 cm x 60 cm x 60 cm de dimensões, cobertas com *voil*), totalizando 2 mudas por gaiola. Foram liberadas 6 fêmeas por gaiola (Figura 11) em uma proporção de três fêmeas por cultivar. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com 20 repetições e dois tratamentos (SP89-1115 e SP81-3250) onde, cada gaiola representou um bloco. Após 24 horas após a liberação das fêmeas nas gaiolas procedeu-se a

contagem do número total de ovos depositados em cada tratamento ou cultivar testada. Para a análise dos resultados procederam-se os testes de Normalidade e Homocedasticidade de Liliefors e Cochran & Bartlett, respectivamente. De acordo com resultados dos testes supracitados os dados foram submetidos a Análise de Variâncias (Anova) e comparadas entre si pelo teste de Scott-Knott. O software utilizado foi o SAEG. V5.1 1995–FURB/UFV.

Figura 11 - Esquema da gaiola para teste de escolha com duas mudas e seis fêmeas por gaiola.



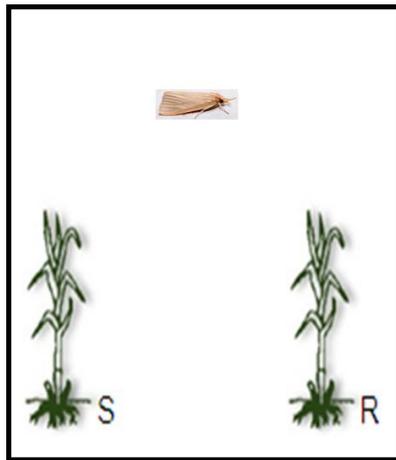
Fonte: autora, 2016.

3.6.2 Teste com chance de escolha e uma fêmea por gaiola

Para avaliação da preferência de fêmeas de *D. saccharalis* por sítio de oviposição em função do efeito atrativo de cultivares de cana-de-açúcar foi realizado o teste preferência com chance de escolha com uma fêmea, pois até então não era sabido se a *D. saccharalis* oviposita em plantas já ovipositadas por outras fêmeas. Foram utilizadas as duas cultivares de cana-de-açúcar SP89-1115 e SP81-3250. Foi utilizada uma planta de cada cultivar de cana-de-açúcar acondicionada aleatoriamente em uma gaiola (145 cm x 60 cm x 60 cm de dimensões, cobertas com *voil*), totalizando 2 mudas por gaiola. Foi liberada 1 fêmea por gaiola (Figura 12). O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com 12 repetições e dois tratamentos (SP89-1115 e SP81-3250) onde, cada gaiola representou um bloco. Após 24 horas após a liberação das fêmeas nas gaiolas procedeu-se a contagem do número total de ovos depositados em cada tratamento ou cultivar testada. Para a análise dos resultados procederam-se os testes de Normalidade e

Homocedasticidade de Liliefors e Cochran & Bartlett, respectivamente. De acordo com resultados dos testes supracitados os dados foram submetidos a Análise de Variâncias (Anova) e comparadas entre si pelo teste t. O software utilizado foi o SAEG. V5.1 1995–FURB/UFV.

Figura 12 - Esquema da gaiola para teste de escolha com duas mudas e uma fêmea por gaiola.

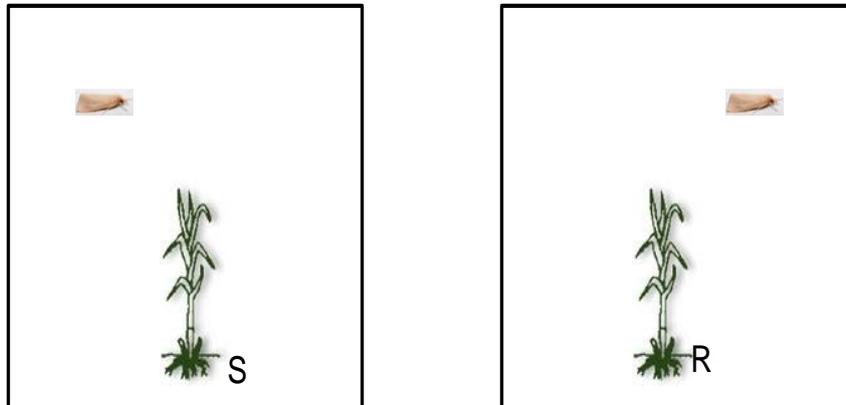


Fonte: autora, 2016.

3.6.3 Teste sem chance de escolha

Para avaliação da preferência de fêmeas de *D. saccharalis* por sítio de oviposição em função do efeito atrativo/repelente de cultivares de cana-de-açúcar foi realizado o teste preferência sem chance de escolha. Utilizou-se 1 muda de cada cultivar de cana-de-açúcar por gaiola com as dimensões 145 cm x 60 cm x 60 cm, cobertas com *voil*, onde foi liberada uma fêmea (Figura 13). A avaliação foi realizada 24 horas após a liberação dos insetos, procedendo-se à contagem do número de ovos por tratamento. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com 20 repetições, sendo 10 de cada tratamento (SP81-3250) e (SP89-1115). Para a análise dos resultados procedeu-se os testes de Normalidade e Homocedasticidade de Liliefors e Cochran & Bartlett, respectivamente. De acordo com resultados dos testes supracitados os dados foram submetidos a Análise de Variâncias (Anova) e comparadas entre si pelo teste de Scott-Knott. O software utilizado foi o SAEG. V5.1 1995–FURB/UFV.

Figura 13 - Esquema da gaiola para teste de escolha com uma muda e uma fêmea por gaiola.



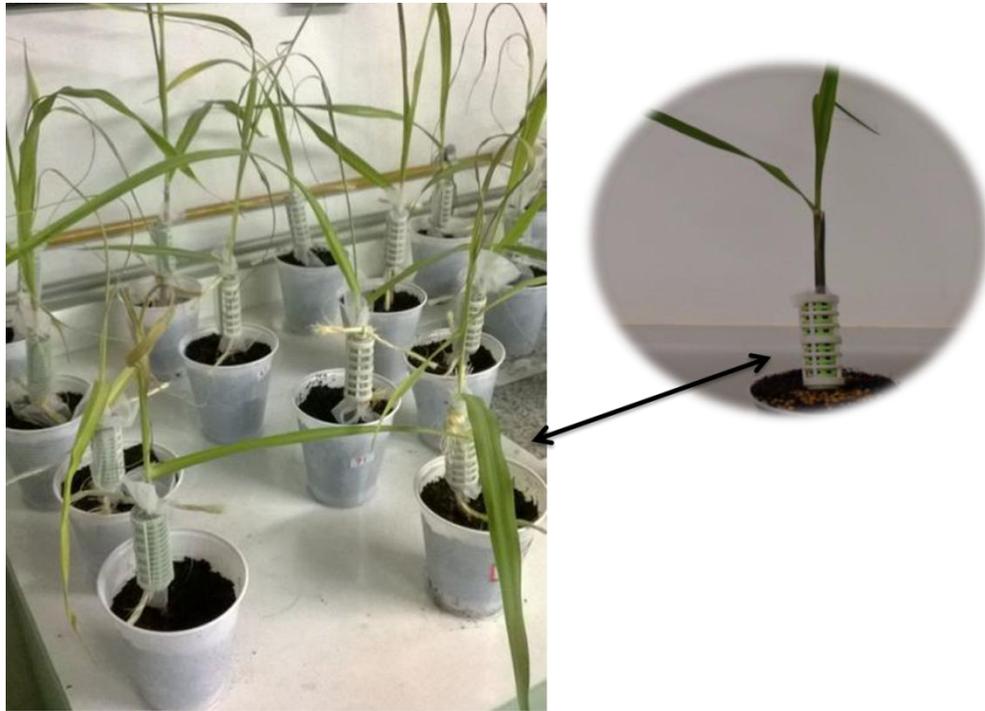
Fonte: autora, 2016.

3.7 Bioensaios de performance larval sem chance de escolha

Para avaliação da resistência por antibiose a taxa de crescimento das lagartas realizou-se um bioensaio sem chance de escolha de alimentação. O bioensaio foi realizado colocando-se a lagarta na base da planta e deixando-a alimentar por um período de 5 dias. Após esse período, as lagartas foram então cuidadosamente removidas do interior do colmo. A base do colmo das plantas foi quebrada e as lagartas retiradas com auxílio de uma pinça. Foram registradas as massas, em balança de precisão (0,1 mg), antes e após a liberação das lagartas na planta, calculando-se o ganho de peso. Para manter a lagarta na base do colmo da planta, utilizou-se uma gaiola telada (Figura 14). Cada repetição foi composta por de 15 plantas de cada tratamento e uma lagarta por planta.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com 15 repetições de uma planta e inoculada com uma lagarta de *D. saccharalis* cada. Para a análise dos resultados procederam-se os testes de Normalidade e Homocedasticidade de Liliefors e Cochran & Bartlett, respectivamente. De acordo com resultados dos testes supracitados os dados foram submetidos a Análise de Variâncias Não Paramétricas e comparadas entre si pelo teste de Wilcoxon. O software utilizado foi o Bioestat 5.1 Instituto Mamirauá.

Figura 14 - Lagartas *D saccharalis* aprisionadas em gaiolas para o Bioensaio sem chance de escolha.



Fonte: autora, 2016.

3.8 Coleta dos compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos pelas diferentes cultivares

Os compostos voláteis foram coletados de diferentes genótipos e cultivares das plantas do “Complexo Saccharum”, quais sejam: *Saccharum officinarum*, *Saccharum officinarum* (Caiana), *Miscanthus*, *Erianthus*, *Saccharum officinarum* cultivares SP81-3250 e SP89-1115 usando adsorvente Porapak Q (80/100 mesh, 0,05 g; Supelco). As plantas foram acondicionadas dentro de sacos de poliéster para microondas e freezer como descrito por STEWART_JONES & POPPY (2006), isolando o vaso com papel alumínio. Ar foi injetado no saco plástico passando antes por um filtro de carvão ativado a um fluxo de 400 mL/min. por planta. Tubos com o Porapak Q foram utilizados no topo do saco e o ar coletado a uma vazão de 400

mL/min. para cada planta (Figura 15) . As plantas foram aeradas por 48 horas. Ao término das aerações a dessorção foi realizada passando 500 μ L de hexano nos tubos contendo o Porapak Q e armazenado-se a -20°C até injeção em um sistema de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa (GC/MS) QP2010.

Os cromatogramas do GC/MS das cultivares ditas resistentes (SP81-3250) e susceptíveis (SP89-1115) foram analisados estatisticamente por análise multivariada supervisionada de PLS-DA (Orthogonal Projection of Latent Structures-Discriminant Analysis) sendo utilizados os softwares MatLab e SIMCA-P (versão 14.0, Umetrics, Umeå, Suécia) com escalonamento baseado no método de unidade de variância (UV). Inicialmente os dados no formato CDF foram inseridos no MatLab, sendo submetidos a normalização e alinhamento. Análise de STOCYSY (Statistics Total Correlation Spectroscopy) foi executada para a verificação de correlações entre os componentes das amostras. Um arquivo no formato de TXT gerado foi transferido para o SIMCA para a obtenção do gráfico de classificação de classes.

Figura 15 - Aeração das diferentes cultivares plantas do Complexo *Saccharum*.



Foto: Autora, 2016

3.9 Identificação dos compostos orgânicos voláteis das cultivares

Para a identificação dos compostos as amostras foram analisadas em cromatografo a gás acoplado a espectrômetro de massa (GC-MS, Shimadzu, Modelo QP2010), por meio da injeção manual de 2 μ L do extrato. O aparelho equipado com a coluna capilar de sílica fundida (5% difenol/95% dimetil-polisilaxano) revestida com Rtx-5 (df = 0,25 μ m; J W Scientific Folsom, CA, USA), utilizando o helio como gás carreador (1 mL/min.). A temperatura inicial da coluna foi de 50 °C, permanecendo por 5 minutos, elevando-se a uma taxa de 5 °C/min., até atingir 250 °C, permanecendo por mais 5 minutos, totalizando um tempo de análise de 50 min. As análises foram realizadas em modo splitless. Os dados foram analisados pelo programa GCMS solutions (Shimadzu Corporation) e a identificação baseou-se na comparação dos espectros de massa de cada composto com o banco de dados das bibliotecas NIST08 MS e Wiley. Por meio de comparação de tempo de retenção dos compostos com os padrões de hidrocarbonetos (C7 - C30), sendo calculados os índices de Retenção. A partir dessas informações, foram identificados os compostos das amostras.

3.10 Compostos fenólicos totais

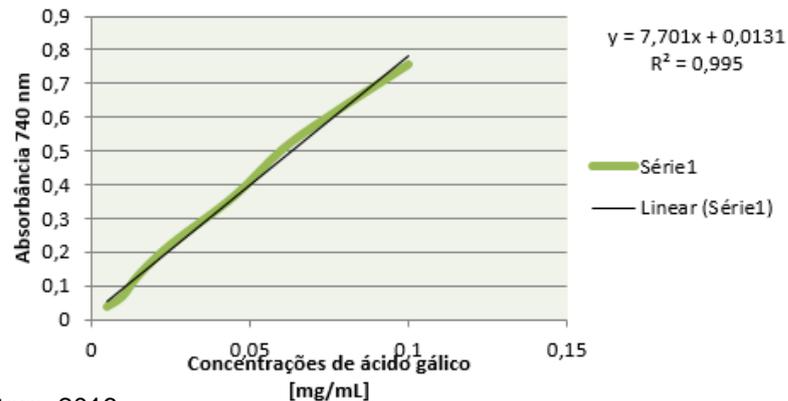
O extrato etanólico foi preparado através do método de maceração. Os pesos das amostras submetidas ao teste foi SP89-1115 - 7,609g e SP81-3250 - 7,610g, As amostras foram extraídas com 100 ml de etanol e submetidas ao evaporador rotatório a cada 72 horas para obtenção do extrato bruto.

A determinação espectrométrica de compostos fenólicos ocorreu fazendo-se uso do reagente de Folin-Ciocalteu segundo a metodologia descrita por Scherer, R.; Godoy, H.T,2014. Pesou-se 1 mg do extrato obtido e este foi diluído em 1 mL de MeOH. Em seguida, adicionaram-se 100 μ L da solução da amostra + 500 μ L solução aquosa de folin 1:11 (v/v) + 400 μ L da solução aquosa de Na₂CO₃ a 7,5%. Em seguida agitou-se em vortex por 30 segundos.

O ensaio foi preparado em microplacas. Para a leitura, adicionou-se em cada poço 250 μ L da solução da amostra e a placa foi mantida em ambiente escuro por 2h.

Foram tidas as absorvâncias das amostras e também preparada a curva de ácido gálico com a leitura em triplicata de absorbância em espectrofotômetro UV-VIS a 740nm. Os resultados obtidos foram expressos em mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato.

Gráfico 1 - Curva de calibração do ácido gálico.



Fonte: autora, 2016.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os dados das concentrações de cada amostra foram submetidos à análise de variância e aplicou-se o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. O software utilizado foi ASSISTAT Versão 7.7 beta (2015).

3.11 Extração e Identificação de Compostos Fenólicos

Seis plantas das cultivares resistente (SP81-3250) e suscetível (SP89-1115) com e sem herbivoria foram selecionadas para o estudo de alguns compostos fenólicos, separando-se parte aérea e raiz para serem estudados separadamente.

Um grama da parte aérea e raiz recentemente colhidas foram maceradas separadamente com pistilo em uma solução de 5 mL de etanol-água (80: 20; v/v). As amostras foram recolhidas em tubos de eppendorf de 1,5 ml e a suspensão foi submetida a ultrassonicação (Branson 3510E) em ciclos de funcionamento de 60% durante 15 min a 4 ° C, seguido por centrifugação a 7500 rpm durante 15 min. O sobrenadante foi transferido para tubos de vidro e evaporado sob vácuo.

(Buchi Rotavapor R-210). As amostras secas foram ressuspensas em 1,0 ml de metanol grau HPLC e armazenadas a 4 °C para posterior análise.

A cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada em um sistema de HPLC (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão) equipado com duas bombas Shimadzu LC-10 ATVP, um detector UV-VIS variável (Shimadzu SPD-10 AVP) e um integrador Winchrom (Winchrom). A análise cromatográfica de fase reversa foi realizada em condições isocráticas com coluna C18 fase inversa (150 x 2,0 mm id, tamanho da partícula 5 µm). As condições de funcionamento incluíram volume de injeção (20µL), fase móvel metanol:ácido acético 0,4% (80:20, v/v), fluxo de 1 mL/min, detecção a 290 nm. As amostras foram filtradas através de membrana de filtro (tamanho de poro 0,45 µm, Merck) antes da injeção no loop de amostra. Os ácidos tânico, gálico, ferúlico e cinâmico foram utilizados como padrões. Os compostos fenólicos presentes nas amostras foram identificados por comparação com tempos de retenção (TR) dos padrões.

3.12 Identificação do Ácido Hidroxâmico DIMBOA e Ácido Clorogênico durante a herbivoria

As cultivares SP81-3250 e SP89-1115 foram infestadas com *D. saccharalis* 48 horas antes da extração. Um fragmento da planta cana-de-açúcar infestada com *D. saccharalis* foram retiradas para maceração. O protocolo consistiu em macerar o fragmento retirado da planta em nitrogênio líquido e alíquotas de 0.5g foram colocadas em tubo de centrífuga de 1,5 mL e armazenadas em nitrogênio líquido. Logo em seguida, 1mL de solução de metanol:ácido acético (98:2) foi adicionado aos tubos que foram agitados 10 minutos. Os tubos foram centrifugados a 13.000rpm por 5 minutos e o sobrenadante retirado. O líquido sobrenadante foi colocado em frasco de vidro (*vial*) apropriado para HPLC e concentrado com fluxo constante de nitrogênio. Cada *vial* recebeu o sobrenadante de dois tubos (aproximadamente 2 mL) correspondendo a 1g de tecido fresco.

A análise dos ácidos hidroxâmicos dos extratos foi realizada com sistema HPLC (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão) equipado com duas bombas Shimadzu LC-10 ATVP, um detector UV-VIS variável (Shimadzu SPD-10 AVP) e um

integrador Winchrom (Winchrom). Os ácidos hidroxâmicos presentes nas amostras serão identificados por comparação do tempo de retenção (TR) dos padrões.

A cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada em um HPLC (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão) equipado com duas bombas Shimadzu LC-10 ATVP, um detector UV-VIS variável (Shimadzu SPD-10 AVP) e um integrador Winchrom (Winchrom). A análise cromatográfica de fase reversa foi realizada em condições isocráticas com coluna C18 fase inversa (250 x 4,6 mm id). As condições de funcionamento incluíram volume de injeção (20µl), fluxo de 1ml/min os dois solventes foram: A foi ácido acético 0,1% em água e solvente B foi 100% metanol. Os solventes foram desgaseificado e filtrado. A fase móvel foi iniciada em 80:20 (A/B), após a injeção o gradiente linear se manteve por 3 min em seguida foi alterado para 50:50 (A/B) e se manteve por 17 minutos, a eluição foi detectada a 290 nm. As amostras foram filtradas através de membrana de filtro (tamanho de poro 0,45 m, Merck) antes da injeção no loop de amostra. Os ácidos hidroxâmico e clorogênico foram utilizados como padrões. Os compostos presentes nas amostras foram identificados por comparação dos tempos de retenção (TR) dos padrões.

3.13 Efeito de diferentes concentrações de Ácido Clorogênico sobre biologia de *D. saccharalis*

Folhas de papel sulfite contendo posturas de *D. saccharalis* foram acondicionadas em recipiente de vidro contendo dieta artificial (Figura 16A). Sete dias após a eclosão, as lagartas foram transferidas com o auxílio de um pincel de cerdas macias para placas de Petri contendo dieta artificial cortada em forma de cubo e oferecida às lagartas (Figura 16B). Sete dias após o desenvolvimento larval foi acrescentado nas placas de Petri mais um cubo de dieta artificial para alimentação das lagartas até atingirem a fase de pupa.

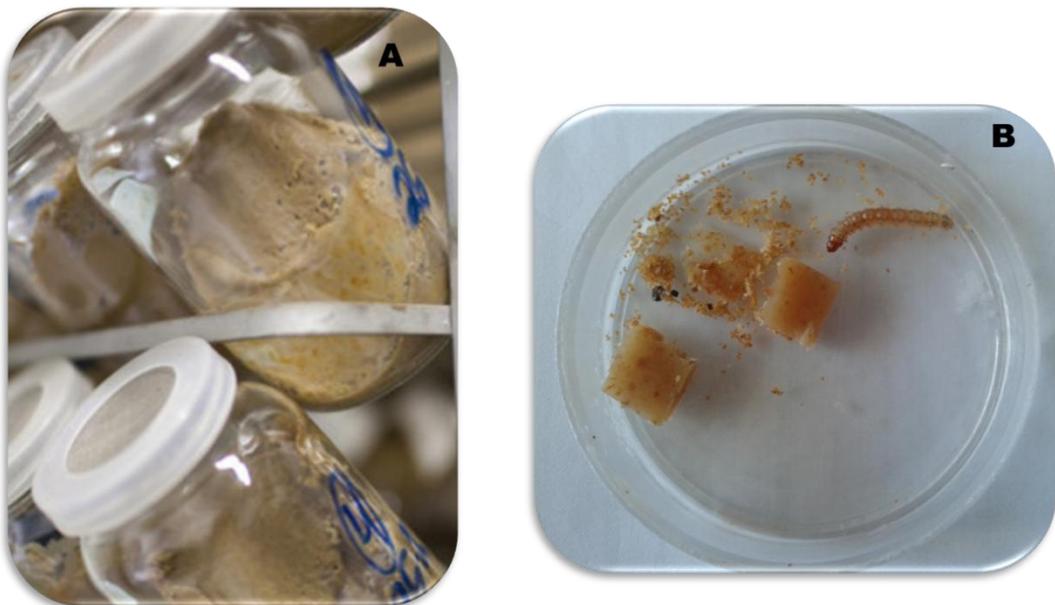
Foram preparadas diferentes porções de dieta artificial, nas quais foram acrescentadas as concentrações de ácido clorogênico: 2,25 mg/mL, 22,5 mg/mL e 225 mg/mL. Posteriormente, a dieta já solidificada foi cortada em cubos de 2,0 cm².

O experimento foi inteiramente casualizado, consistindo de quatro tratamentos (1 – apenas dieta artificial; 2 - dieta artificial + 2,25 mg/mL de ácido clorogênico; 3 - dieta artificial + 22,5 mg/mL de ácido clorogênico e 4 - dieta artificial + 225 mg/mL de ácido clorogênico) e 24 repetições. Cada repetição foi constituída de uma placa de Petri contendo a dieta e uma lagarta.

Para avaliar o efeito das concentrações do ácido clorogênico sobre as diferentes fases de *D. saccharalis*, foram observados o período larval, pupal e longevidade dos adultos, bem como as deformações morfológicas nas respectivas fases de desenvolvimento. As pupas obtidas foram sexadas, pesadas e acondicionadas em recipientes plásticos transparentes (com capacidade volumétrica de 150 mL) até a emergência dos adultos. Estes, por sua vez, foram sacrificados em freezer e posteriormente montados para melhor observar as deformações presentes.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística e as médias comparadas pelo teste de Tukey.

Figura 16 – (A) Vidro contendo dieta artificial para alimentação de *D. saccharalis* (B) Placas de Petri contendo dieta artificial cortada em forma de cubo e oferecida às lagartas.



Fonte: autora, 2016.

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

A obtenção de cultivares resistentes a *D. saccharalis* é de suma importância para o setor sucroalcooleiro, nos aspectos de redução de custos e no desenvolvimento dessa cultura, aspectos estes que resultarão em maior economia e longevidade das cultivares comerciais (DEMETRIO et al., 2008). Para a implementação de cultivares resistentes dentro de programas de melhoramento da cultura da cana-de-açúcar, torna-se necessário o conhecimento da biologia do inseto-praga e dos possíveis inimigos naturais (DERNEIKA e LARA, 1991). Trabalhos que tratam da discriminação de cultivares de cana-de-açúcar quanto à resistência a *D. saccharalis* na literatura brasileira, foram especialmente conduzidos com as cultivares comerciais antigas (AMARAL e ARRUDA, 1972; DERNEIKA e LARA, 1991). DEMETRIO et al. (2008) selecionaram, os clones RB975311 e RB9755286 como portadores de resistência a *D. saccharalis* por apresentarem menor ocorrência de ataque pela *D. saccharalis*, média de 1,7% e 3,5% de infestação, respectivamente, além de boa produtividade e qualidade tecnológica. Entretanto, poucas informações têm sido veiculadas acerca dos tipos de resistência a *D. saccharalis* em relação ao parasitóide *C. flavipes* (BOIÇA JUNIOR e JESUS, 2009).

Portanto, é necessário estudar as cultivares de planta de cana-de-açúcar e sua interação com a *D. saccharalis*, a fim de desenvolver um protocolo confiável para avaliar resistência da cana-de-açúcar a *D. saccharalis*. Além do conhecimento sobre as características de resistência em cultivares de cana-de-açúcar contra *D. saccharalis*, outro fator importante para os programas de melhoramento de cana-de-açúcar para o desenvolvimento de cultivares resistentes é o estudo da divergência genética em resposta a broca (SOUZA et al., 2013). Um grupo de cultivares pode ser avaliada de forma a identificar divergentes genótipos que podem ser usadas como progenitoras para a hibridação em programas de melhoramento de culturas (CRUZ, 2012). Estudos sobre divergência genética para uma resposta de pragas tem sido bem sucedidos, tais como *Tibraca limbativentris* Stal (Hemiptera: Pentatomidae) do arroz (SOUZA et al, 2013) e *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) em tomate (SUINAGA et al, 2004), indicando a importância do estudo da divergência genética para a resposta pragas. Assim outras avaliações, em fases de desenvolvimento mais avançadas da planta e do

inseto, poderiam demonstrar resultados distintos daqueles obtidos no presente trabalho e permanecem a ser desenvolvidos.

Na observação do comportamento sexual da *D. saccharalis* foi possível verificar que ao iniciar a escotofase as fêmeas e machos começaram a emergir da pupa. Este comportamento foi verificado em uma sala com iluminação, temperatura e umidade controladas. Após duas horas de emergência as fêmeas iniciavam o chamamento para a cópula e após escolher o macho, a cópula iniciava por volta da 0 hora que durava em médias duas horas. Durante o dia os insetos permaneciam praticamente imóveis e ao anoitecer a fêmea começava a ovipositar. Ao final da oviposição ela iniciava todo o processo de chamamento e acasalamento. Após essas observações foram definidos o horário e duração dos bioensaios

4.1 Bioensaio de túnel de vento

No teste de bioensaio de túnel de vento, foram testadas fêmeas virgens e fêmeas acasaladas em diferentes experimentos. Em todos os resultados as fêmeas não apresentaram atração pelas fontes de odor. Como controle positivo para o túnel de vento foram testados machos expostos a fêmeas selecionadas durante seu “horário de acasalamento” por 5 minutos. O comportamento dos machos observados no teste apresentou um padrão característico, pois o macho ao ser liberado orientou-se em direção a fêmea, possivelmente encontrando a pluma de feromônio.

Ao analisar as respostas das fêmeas nas tentativas descritas anteriormente não foi observado nenhum voo, portanto outros bioensaios tiveram que ser realizados.

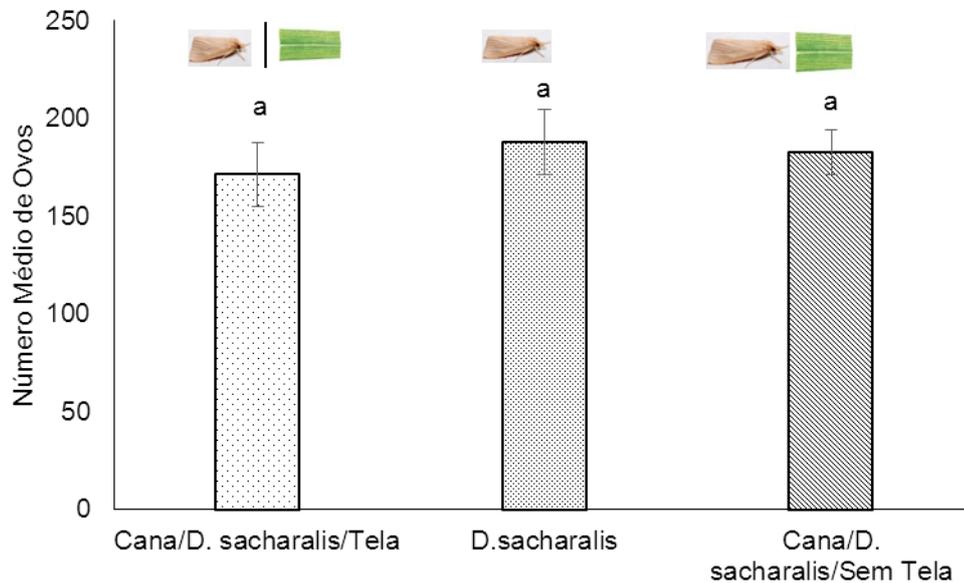
Apesar das fêmeas não terem sido atraídas, alguns autores relatam que na maioria dos insetos herbívoros, o comportamento de busca de acolhimento não se dá apenas pela percepção do olfato. Outros fatores como: percepção visual, maturação ovariana, produção de ovos e estado de acasalamento podem influenciar na resposta de insetos (THOMPSON; PELLMYR, 1991; YAN et al., 2001). Por exemplo, fêmeas acasaladas de *Lobesia botrana* (Denis e Schiffermüller) (Lepidoptera: Tortricidae) são atraídas por COVs de folhas, flores e frutos maduros de videira (MASANTE-ROCA et al., 2007); e fêmeas acasaladas de *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) em experimentos com túnel de vento utilizou voláteis das folhas de tomate como pistas (PROFFIT et al., 2011).

4.2 Bioensaios de oviposição

O experimento de oviposição em tubo de vidro sem chance de escolha realizado somente com a cultivar suscetível SP89-1115 objetivou analisar se a oviposição da *D. saccharalis* é estimulada por características olfativas, visuais ou por contato. Não houve diferença significativa (Figura 17) entre o número médio de ovos nos tratamentos 1) Fêmea com folha e sem separação por tela; 2) Fêmea com Folha e separada por tela; 3) Fêmea sem folha e sem tela. Os comportamentos de oviposição mostram-se bastante distintos entre os insetos. Algumas pragas como a *Tuta absoluta* (Lepidoptera:Gelechiidae), praga de cultivares de tomate (*Solanum lycopersicum*), aumentam significativamente o número de ovos quando em contato com folha de tomateiro, ovipositando no lado superior das folhas que são cobertas com tricomas, fornecendo assim, estímulos químicos e mecânicos (TORRES et al., 2001; PROFFIT, 2011). Por outro lado, *Tecia solanivora* e *Phthorimaea operculella* ovipositam no solo, próximo ao hospedeiro (batata) ao invés de ovipositar nas folhas ou no caule. Um dos motivos dessa não preferência para oviposição na planta se deve aos tricomas glandulares presentes nas folhas e ramos (FENEMORE, 1988; LOPES et al., 2000; HORGAN et al., 2007; KARLSSON et al., 2009). A mariposa fêmea de *D. saccharalis*, por sua vez, vive no máximo sete dias (BOTELHO e MACEDO, 2002) e realiza a oviposição frequentemente na face superior do limbo foliar, apresentando um período de oviposição de até quatro dias, quando são colocados a maioria dos ovos de forma agrupada e num total de 300 a 600 ovos, em massas de cinco a 50 ovos (PINTO et al., 2006).

Nos testes de preferência de oviposição com chance de escolha pelas cultivares suscetível SP89-1115 e resistente SP81-3250 de cana-de-açúcar. *D. saccharalis* depositou mais ovos na cultivar SP89-1115, enquanto que no teste sem chance não houve preferência por qualquer uma das duas cultivares de cana-de-açúcar testadas (Figura 18, 19 e 20).

Figura 17 - Número médio de ovos de adultos de *D. saccharalis* em bioensaio de tubo de vidro. Colunas com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis $p > 0.05$.



Os resultados mostram que na presença das duas cultivares a fêmea de *D. saccharalis* deu preferência a cultivar susceptível SP89-1115, porém na ausência dessa cultivar o comportamento de oviposição das fêmeas *D. saccharalis* manteve-se inalterado.

O comportamento de oviposição do inseto em um hospedeiro deve garantir o desenvolvimento de suas larvas, assim assegurando o desenvolvimento da espécie. Já a resistência nas plantas pode se manifestar de diferentes maneiras em testes com e sem chance de escolha. Estudos têm mostrado que uma cultivar pode se revelar resistente em teste com chance de escolha, mas não mantém essa característica quando cultivada isoladamente, permitindo a alimentação e oviposição dos herbívoros (LARA, 1991). Por exemplo, no teste de oviposição de *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) com chance de escolha em diferentes genótipos de feijão-caupi, os genótipos TE93-244-23 F-1 e TVU-36 apresentaram resistência pelo mecanismo de não preferência para oviposição. Porém no teste sem chance de escolha, apenas o genótipo TVU-36 apresentou resistência por esse mecanismo (CRUZ et al., 2012).

Figura 18 - Oviposição de três fêmeas por planta de *D. saccharalis* em bioensaio com chance de escolha em cultivares de cana-de-açúcar. Colunas de Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si. Teste de Scott Knott a $p < 0.05$.

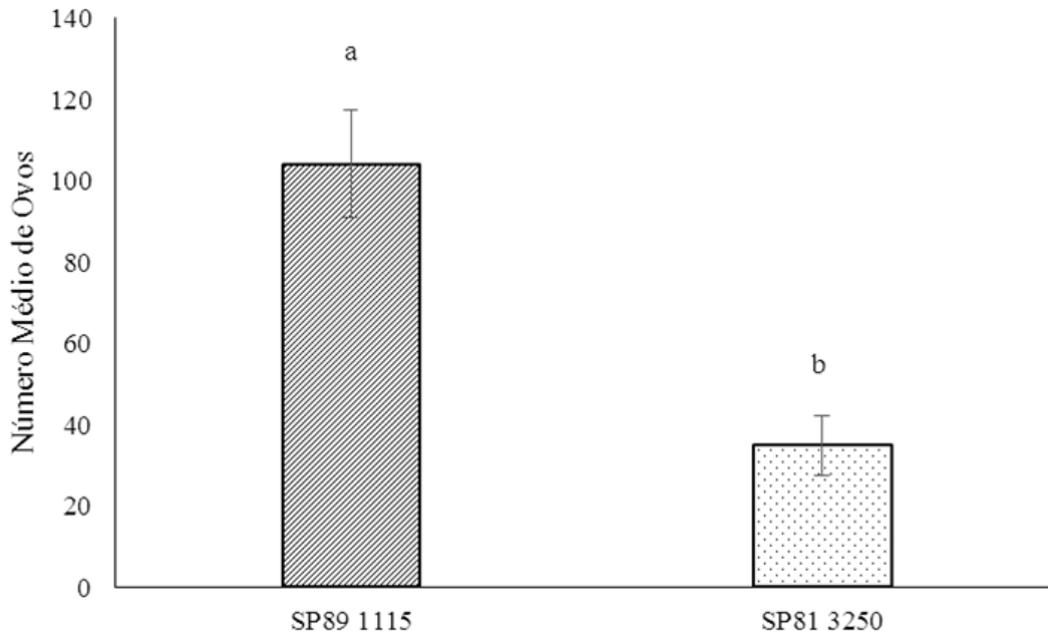


Figura 19 – Oviposição de uma fêmea de *D. saccharalis* em bioensaio com chance de escolha em cultivares de cana-de-açúcar. Colunas de Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si. Diferença significativa pelo teste t a $P < 0.05$.

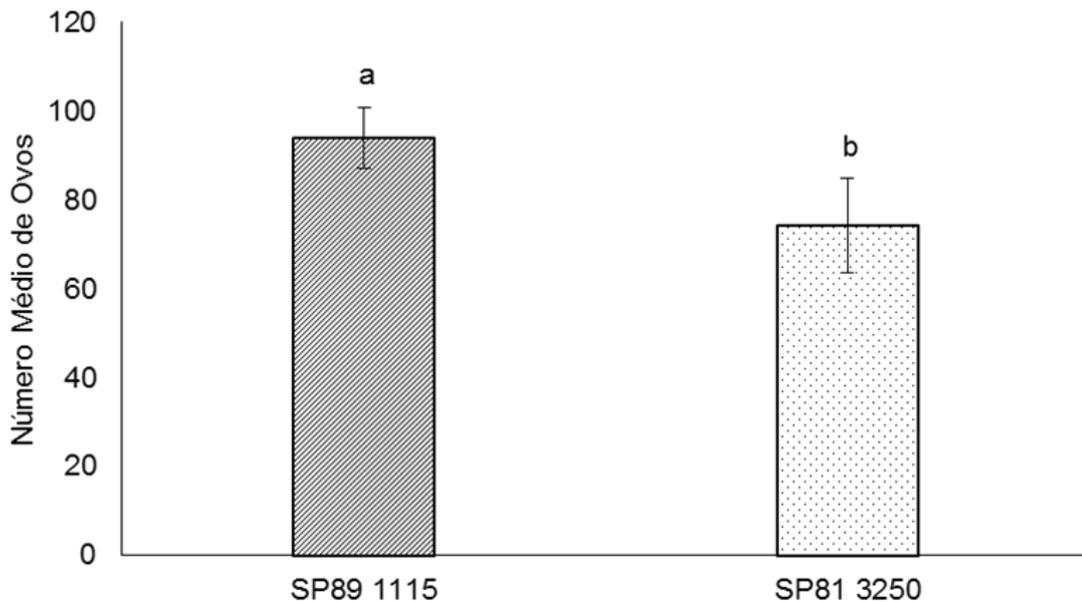
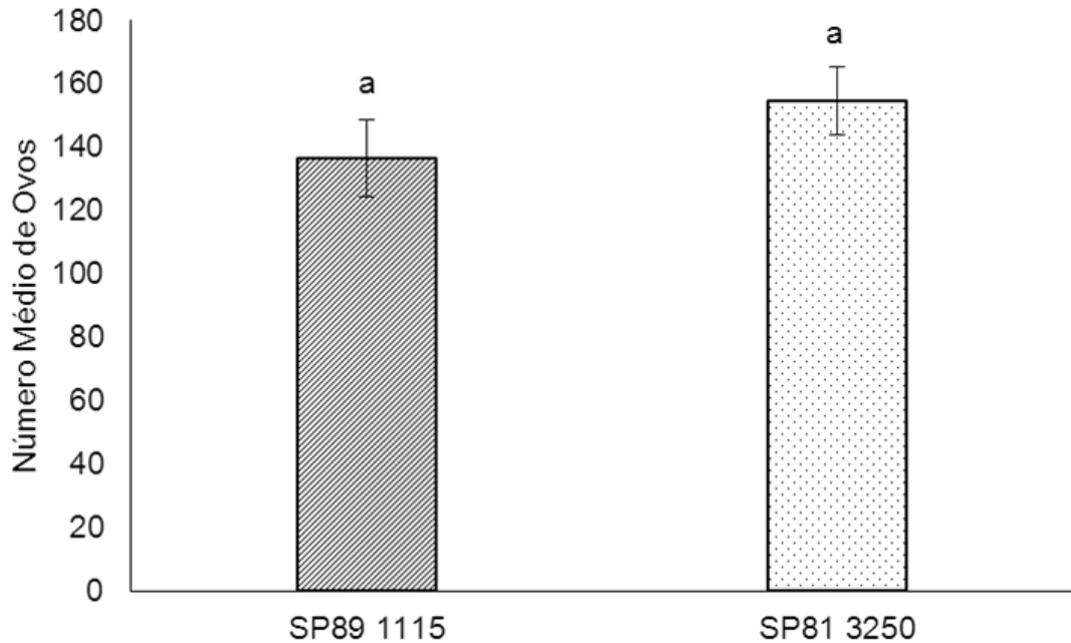


Figura 20 - Oviposição de adultos de *D. saccharalis* em bioensaio sem chance de escolha em cultivares de cana-de-açúcar. Colunas de Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si. Teste de Scott Knott a $p > 0.05$.



Na cultura da cana-de-açúcar existem fatores que influenciam a preferência de *D. saccharalis* para oviposição e estes atuam negativamente na capacidade reprodutiva da broca em função, principalmente, da cultivar em que se desenvolve (TERÁN et al., 1985; 1988). Para GUAGLIUMI (1973), em plantas de cana-de-açúcar, a pilosidade das bainhas presente na superfície das folhas é uma característica morfológica que confere tolerância das plantas à *D. saccharalis*.

De acordo com os resultados obtidos no teste com chance de escolha, a cultivar SP81-3250 foi a menos adequada para oviposição de *D. saccharalis*, pois apresentou menor quantidade de ovos, quando comparada com a cultivar SP89-1115, sugerindo que a cultivar SP81-3250 apresenta certa deterrência para oviposição a *D. saccharalis*. Assim o mecanismo de não preferência pode estar envolvido na possível resistência desta cultivar. Quando todas as plantas são visitadas pode ser iniciada a oviposição, mas a planta pode ser abandonada devido a algum atributo morfológico ou químico que desfavoreça a presença do inseto naquele local. Entretanto, no teste sem chance de escolha as duas cultivares SP81-3250 e SP89-1115 foram adequadas para a oviposição da broca, portanto, se faz

necessário a realização de mais estudos para investigar as diferenças químicas, fisiológicas e morfológicas entre essas cultivares.

A pilosidade das bainhas, lignificação dos nós, abundância de cera sobre o córtice, são características que conferem tolerância de plantas de cana-de-açúcar ao ataque da broca (GUAGLIUMI, 1973). Cultivares de ciclo de maturação precoce, mais ricas em sacarose (DINARDO MIRANDA, 2008) e menos fibrosas (PINTO et al., 2009) apresentam tendência para uma maior atratividade da broca nos canaviais. SILVA-NETO et al., (2014) avaliou diferentes características, entre elas o índice de sacarose de cultivares de cana-de-açúcar em 2010/2011 e a cultivar SP81 3250 apresentou um valor de 11,76% de sacarose na região do colmo sendo considerada baixa. A variedade SP89 1115 destaca-se tanto pela sua alta produtividade e ótima brotação de soqueira (inclusive sob a palha), como pela sua precocidade e alto teor de sacarose (Coopersucar União), e foi a mais escolhida para oviposição.

Dessa forma para o controle de *D. saccharalis* sugere-se a utilização de futuros bioensaios com linhagens da cultivar SP89-1115 considerada suscetível, e da cultivar SP81-3250 considerada portadora de resistência do tipo não-preferência para oviposição a *D. saccharalis*. Uma estratégia para o manejo de pragas poderia ser o plantio de diferentes cultivares, com uma cultivar armadilha. Assim as mariposas de *D. saccharalis* efetuariam uma maior quantidade de oviposições na cultivar suscetível, favoreceria dessa forma menor quantidade de plantas atacadas nas cultivares portadoras de resistência e possibilitaria uma aplicação de inseticida ou outras medidas de controle somente na cultivar armadilha.

4.3 Bioensaios de performance larval sem chance de escolha

Apesar de não apresentar um sistema imune de defesa que atue frente ao ataque de agressores ou até mesmo em condições adversas, as plantas apresentam estratégias de defesa que permitem o retardamento ou até mesmo impedimento da penetração de agentes fitopatogênicos, tais como, fungos, bactérias, vírus, nematóides e insetos. As plantas reagem ainda sob estresse abiótico, como por exemplo, variações de temperatura, ausência de água ou tratamento com agentes químicos. Esta defesa é composta de uma resposta constitutiva, a qual já está

presente nas plantas, e a resposta induzida, a qual ocorre após o ataque de fitopatógenos e herbívoros ou o início do estresse abiótico (FERNANDES et al, 2009).

Quando o inseto se alimenta de plantas e esta exerce um efeito adverso que afeta, diretamente a sobrevivência, desenvolvimento ou a fecundidade do herbívoro que tenta utilizar a planta como hospedeiro diz-se que a planta apresenta resistência do tipo antibiose. Percebe-se que uma planta que apresenta resistência do tipo antibiose afeta direta ou indiretamente a reprodução do inseto (LARA, 1991).

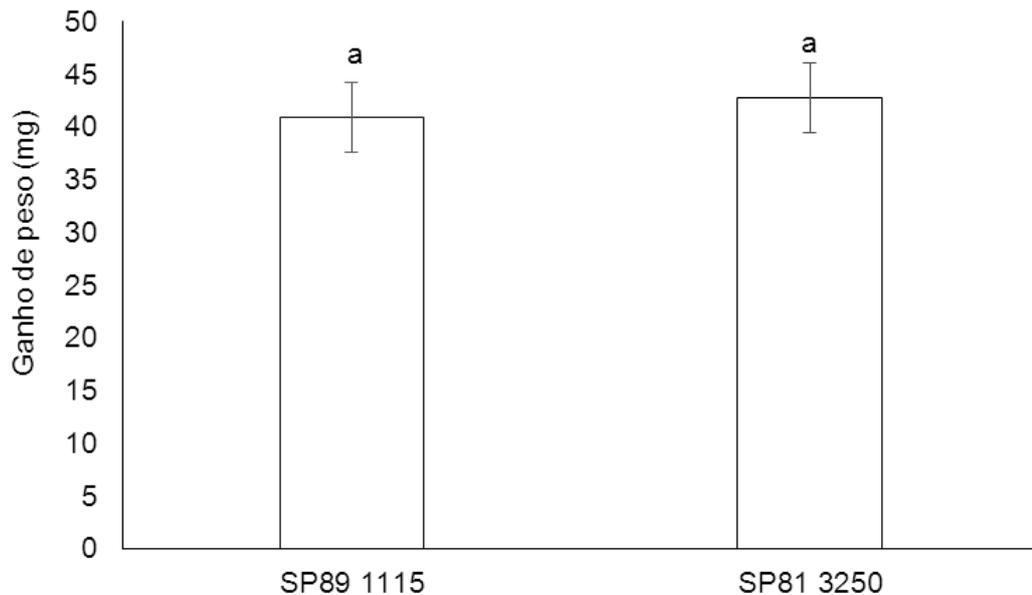
O ganho de peso das lagartas de *D. saccharalis* alimentadas com as diferentes cultivares foi mensurado, a fim de identificar um possível efeito da defesa da planta, como a produção de uma simples toxina ou substâncias que interfiram no crescimento ou reprodução do inseto. As avaliações efetuadas no bioensaio de performance larval sem escolha mostraram que não houve diferença significativa em relação ao ganho de peso das lagartas de *D. saccharalis* quando alimentando-se pelas cultivares suscetível SP89-1115 e resistente SP81-3250 de cana-de-açúcar por 5 dias (Figura 21).

Resultado semelhante foi encontrado por SOUZA (2013) quando ele avaliou a divergência genética de cultivares de cana-de-açúcar quanto à resistência a *D. saccharalis*. Os testes foram com dez cultivares entre elas SP89-1115 e SP81-3250. Ele elaborou dietas artificiais e incorporou às dietas com colmo seco triturado de cada cultivar de cana-de-açúcar. Ao término da fase larval ele concluiu que as cultivares SP89-1115 e SP81-3250 também foram as mais adequadas para a alimentação de *D. saccharalis*.

TOMAZ (2014) comparou injúria no colmo em cultivares de cana-de-açúcar e investigou fatores de resistência nas folhas, superfície do colmo e interior do colmo de seis cultivares de cana-de-açúcar brasileiras. As cultivares SP80-3280, RB92-8064 e RB83-5486 apresentaram as menores injúrias no colmo enquanto a cultivares SP89-1115 apresentou a maior injúria. As larvas gastaram mais tempo para penetrar nos colmos da cultivar SP803280 indicando que essa cultivar pode apresentar alguma característica na superfície do colmo que atrasa a entrada da lagarta. As análises de correlação entre os fatores de resistência indicaram que o tempo gasto pelas lagartas para entrar no colmo é o principal fator afetando injúria no colmo. Lagartas nos últimos ínstaes se alimentando no colmo de SP813250

apresentaram o menor ganho de massa indicando que essa cultivar apresenta algum fator de resistência que afeta o desenvolvimento da larva dentro do colmo.

Figura 21 - Ganho de peso das lagartas de *D. saccharalis* alimentadas nas cultivares susceptível SP89-1115 e resistente SP81-3250 de cana-de-açúcar.

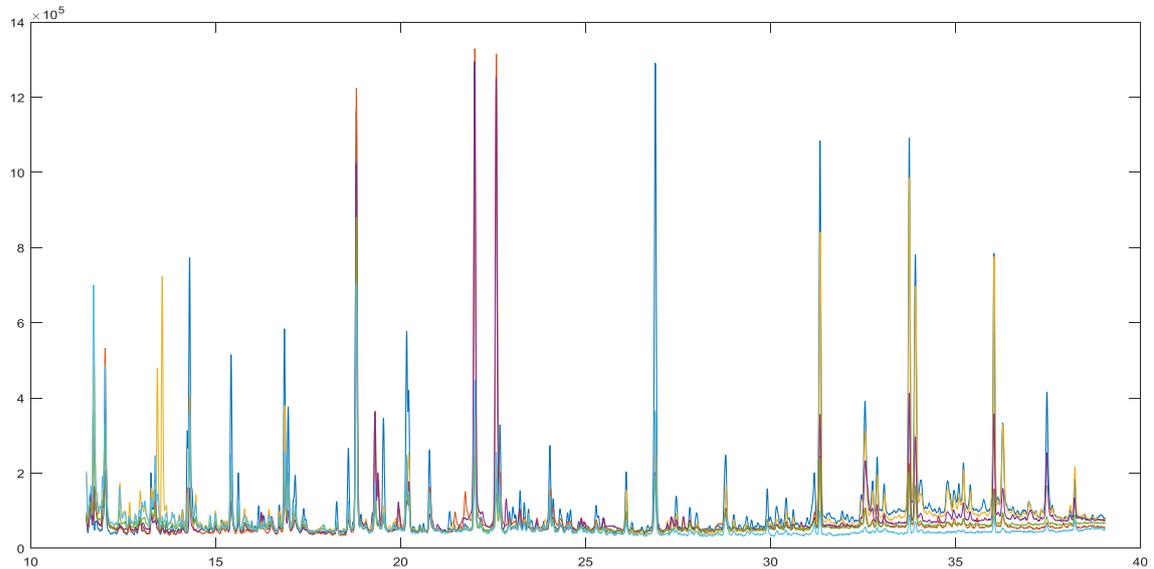


4.4 Compostos orgânicos voláteis das cultivares de cana-de-açúcar SP81-3250 e SP89-1115

Os compostos orgânicos voláteis foram coletados das plantas SP81-3250 e SP89-1115 e analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS). Foram analisados três repetições de cada cultivar, inicialmente foi feito uma sobreposição dos cromatogramas (Figura 22) e em seguida uma Análise discriminante de Mínimos Quadrados Parciais para observar o agrupamento dessas cultivares.

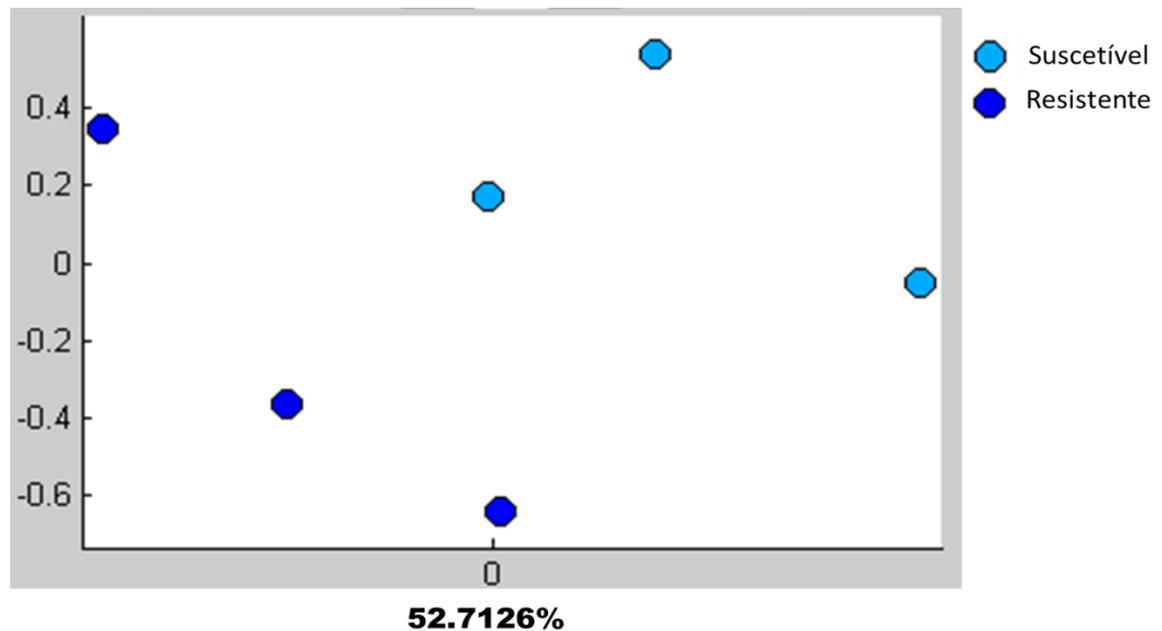
O gráfico de escores de um modelo PLS-DA (Análise discriminante de Mínimos Quadrados Parciais) construído a partir de dados de GC-MS (Figura 23) dos compostos orgânicos voláteis das plantas suscetíveis (SP89-1115) e resistentes (SP81-3250) de cana-de-açúcar mostra a separação entre o grupo formado pelas plantas, sendo o grau de diferença entre as classes de 52.7126%, onde essa diferença é observada longitudinalmente. Isto sugere que os conjuntos dos compostos orgânicos voláteis sintetizados pelas duas cultivares diferem.

Figura 22 - Superposição dos cromatogramas das diferentes cultivares SP81-3250 e SP89-1115 de cana-de-açúcar após tratamento de normalização e alinhamento dos dados. Foram avaliadas três amostras por cultivares, cada cor representa uma amostra.



Fonte: Autor, 2016.

Figura 23 - PLS-DA scores plot da primeira componente



Fonte: Autora, 2016.

A análise de aerações de plantas resistentes e suscetíveis demonstrou que o perfil de voláteis emitidos foi diferente entre as duas cultivares. Os resultados apontaram diferentes picos responsáveis por essa separação que tornam essas cultivares diferentes em sua constituição química.

Os compostos identificados nas cultivares de cana-de-açúcar resistente (SP81-3250) e suscetível (SP89-1115) a *D. Saccharalis* encontra-se discriminados na Tabela 1. Dentre os onze compostos identificados, apenas três compostos apresentou-se em maior quantidade, apresentando assim uma diferença estatística significativa, são da cultivar resistente (SP81-3250) enquanto que os demais compostos pertencem a cultivar suscetível. (SP89-1115). Os COVs foram identificados por similaridade de espectro de massas, tempo de retenção e confirmados com padrões químicos. Os cromatogramas de GC mostraram pico com tempo de retenção, porcentagem e similaridade do espectro de massas presente nas bibliotecas NIST08 MS (National Institute of Standards and Technology) e WILEY. A fragmentação dos compostos emitidos pelas plantas de cana-de-açúcar resistentes (SP81-3250) e suscetíveis (SP89-1115) a *D. saccharalis* encontram-se no apêndice.

Tabela 1 - Compostos orgânicos voláteis identificados de plantas de cana-de-açúcar resistentes (SP81-3250) e susceptíveis (SP89-1115) a *D. saccharalis*.

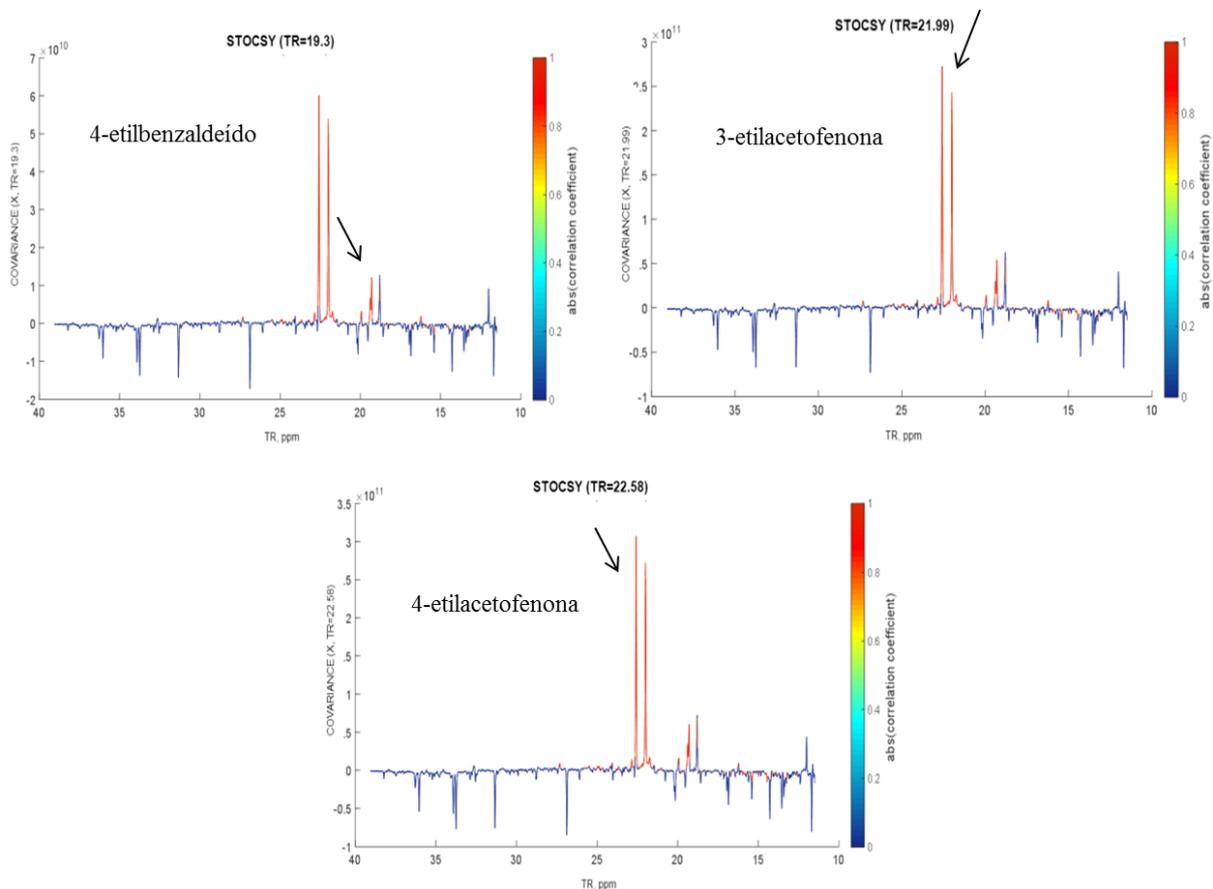
Cultivares	Composto	Índice de retenção
SP81-3250	4-etilbenzaldeído	1189
	3-etilacetofenona	1277
	4-etilacetofenona	1278
SP89-1115	Limoneno	961
	2-etil-hexanol	1027
	Naftaleno	1194
	1,10-Decanediol	1216
	Pentadecano	1499
	Hexadecano	1599
	Heptadecano	1699
	Eicosano	1964

As cultivares de cana-de-açúcar, resistente (SP81-3250) e suscetível (SP89-1115) a *D. saccharalis*, apresentam perfil de compostos orgânicos voláteis diferentes. Sabe-se que a emissão de COVs em plantas tanto de forma constitutiva quanto induzida podem ser modificada por melhoramento genético, existindo a possibilidade de melhorar a resistência de plantas contra pragas importantes tanto direta quanto indiretamente através do controle biológico melhorado (AHMAN et al., 2010).

Entre os compostos das amostras do grupo suscetível temos o Limoneno que é descrito na literatura como atrativo de pragas e microrganismo (RODRIGUEZ et al., 2011) sendo considerado um composto de localização do hospedeiro. SILVA FILHO (2014) também buscou identificar COVs na cultivar SP79-1011 nos tratamentos controle e com herbivoria (*D. Saccharalis*) e por espectrometria de massas Limoneno, 2-etil-1-hexanol e Pentadecano entre outros composto no tratamento controle. Também observou a diminuição do composto Limoneno nas plantas infestadas, e foi sugerido como uma estratégia da *D. saccharalis* de suprimir a emissão de alguns compostos atrativos para evitar competição. Nas figuras 24 e 25, encontramos a análise unidimensional STOCYSY para a variável selecionada correspondente aos picos de interesse das cultivares resistente (SP81-3250) e suscetível (SP89-1115), respectivamente.

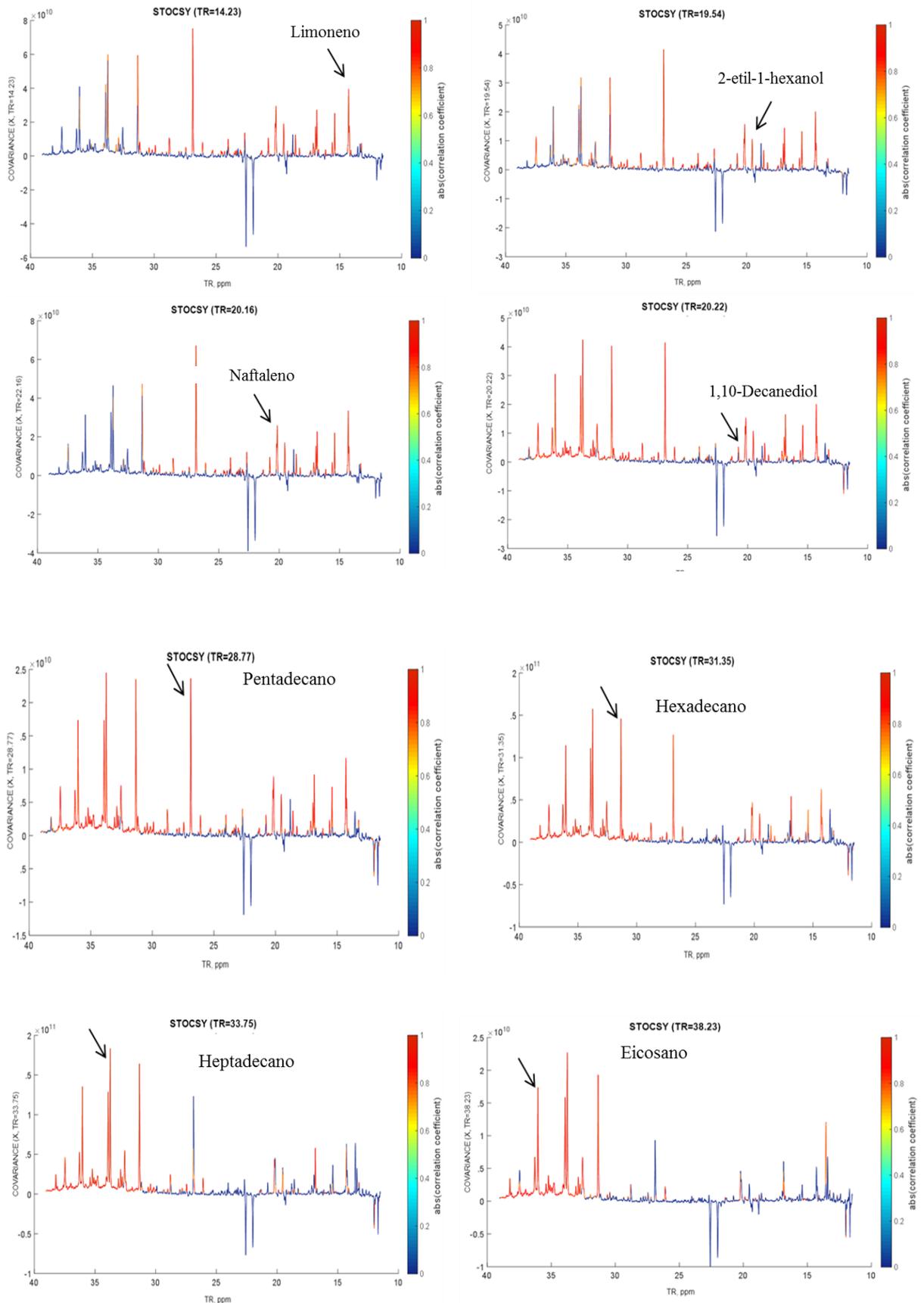
Reações sistêmicas induzidas pelo estresse em plantas são comuns e a produção e transporte de produtos químicos geralmente funcionam como defesa direta contra herbívoros e patógenos (GREEN e RYAN, 1972). As plantas tem se adaptado a melhorar a função de sinalização dos compostos voláteis, o que tem se traduzido da comunicação observada entre plantas e herbívoros (TURLINGS et al., 1995). Assim, muitos estudos tem sido realizados com relação a identificação destes compostos voláteis (BLEEKER et al., 2009; PROFFIT et al., 2011; COPOLOVICI et al., 2012) visando o melhor entendimento do complexo planta herbívoro na atração dos inimigos naturais. Finalmente, neste estudo apresentamos compostos voláteis que podem estar causando repelência a pragas e/ou na atração de inimigos naturais, sendo assim necessários estudos adicionais para entender os fatores de resistência e a interação planta-herbívoro-inimigo.

Figuras 24 - Análise unidimensional STOCSY para a variável selecionada correspondente aos picos de interesse da cultivar resistente SP81-3250. O grau de correlação entre os espectros tem sido codificados por cores.



Fonte: Autora, 2016.

Figura 25 - Análise unidimensional STOCSY para a variável selecionada correspondente aos picos de interesse da cultivar suscetível SP89-1115. O grau de correlação entre os espectros tem sido codificado por cores.



Fonte: Autora, 2016.

4.5 Compostos orgânicos voláteis das seis diferentes cultivares de cana-de-açúcar

Visando estudar a variabilidade dentro do complexo *Saccharum* e buscar possíveis novas fontes de resistência especialmente em genótipos mais rústicos, os compostos voláteis foram coletados de diferentes genótipos, os quais são: *Saccharum officinarum*, *Saccharum officinarum* (Caiana), *Miscanthus*, *Erianthus*, e as cultivares SP81-3250 e SP89-1115, os COVs foram injetados em um sistema de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa (GC/MS). Foram analisados três repetições de cada cultivar, inicialmente foi feito uma sobreposição dos cromatogramas (Figura 26) e em seguida uma Análise discriminante de Mínimos Quadrados Parciais para observar o agrupamento dessas cultivares.

O gráfico de escores de um modelo PLS-DA (Análise discriminante de Mínimos Quadrados Parciais) construído a partir de dados de GC-MS (Figura 27) dos compostos orgânicos voláteis das plantas *Saccharum officinarum*, *Saccharum officinarum* (Caiana), *Miscanthus*, *Erianthus*, SP81-3250 e SP89-1115 de cana-de-açúcar onde mostra a separação entre o grupo formado pelas plantas, sendo a diferença entre as classes de 55,5231%. Isto sugere que os conjuntos dos compostos orgânicos voláteis sintetizados pelas cultivares diferem.

Figura 26 - Superposição dos cromatogramas das diferentes cultivares de cana-de-açúcar após tratamento de normalização e alinhamento dos dados. Foram avaliadas três amostras por cultivares, cada cor representa uma amostra.

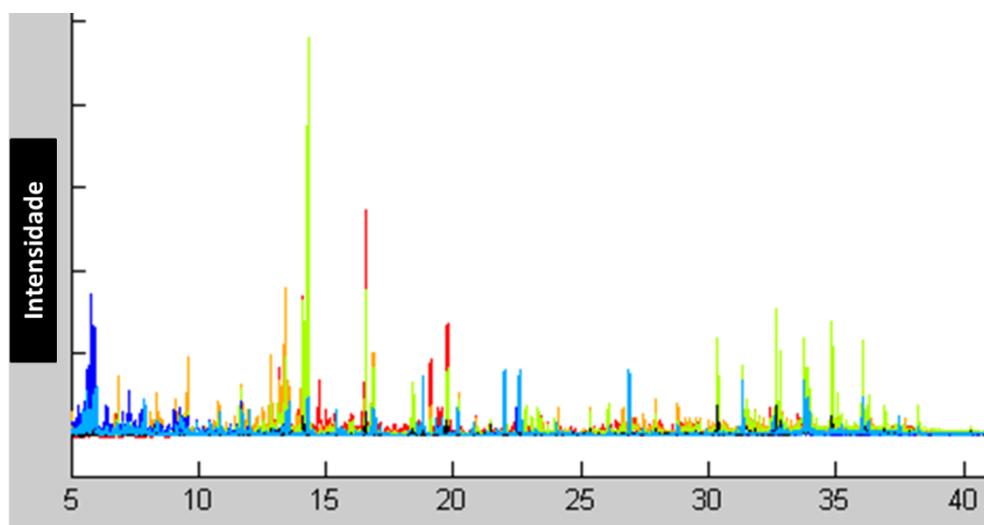
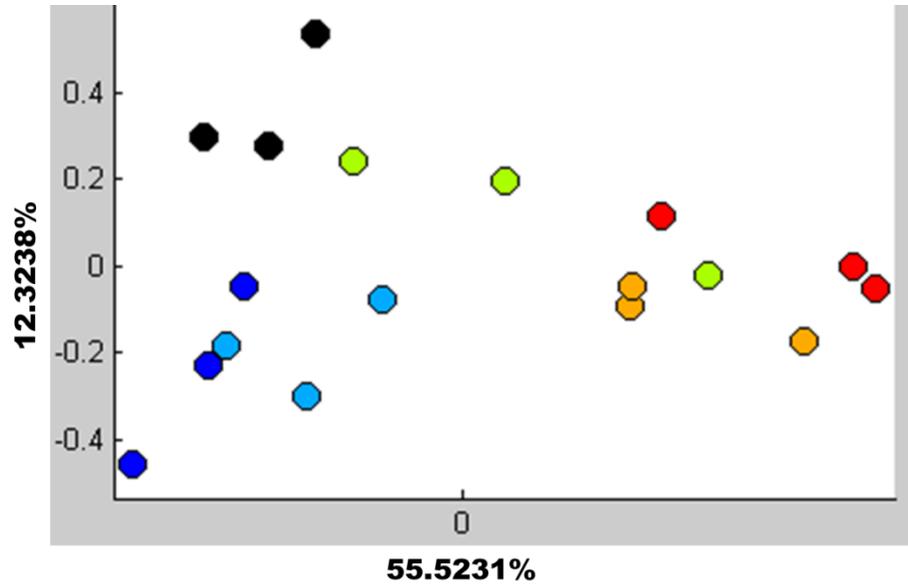


Figura 27 - PLS-DA scores plot da primeira componente.

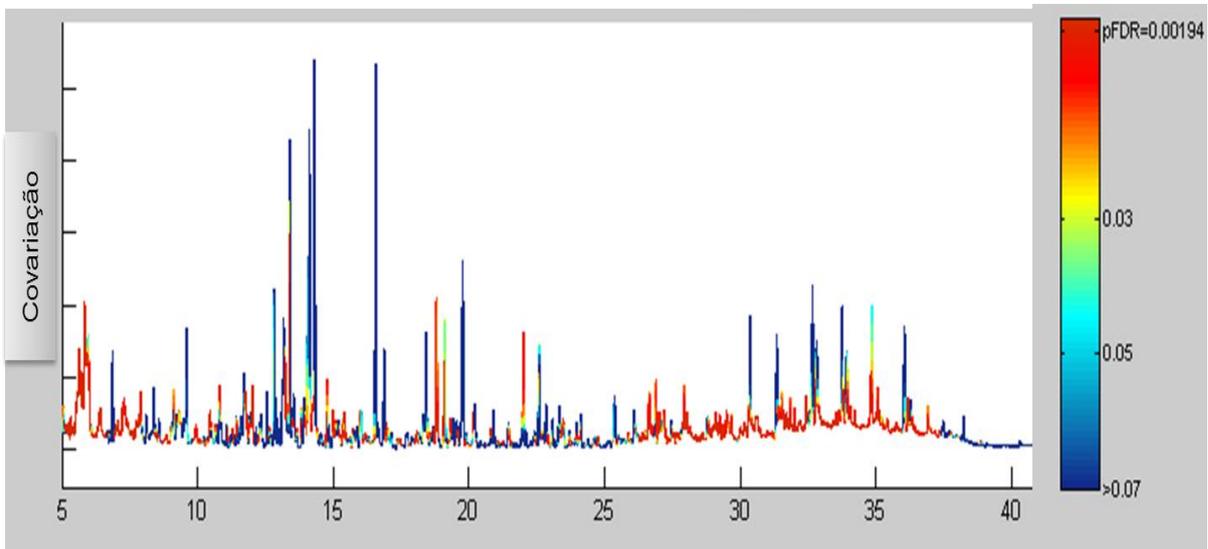


Fonte: Autora, 2016.

- *Saccharum officinarum* (Caiana)
- *Erianthus*
- *Miscanthus*
- SP81-3250
- *Saccharum officinarum*
- SP89-1115

A análise de aerção das diferentes cultivares de cana-de-açúcar demonstrou que o perfil de voláteis emitidos foi diferente entre as cultivares. Os resultados apontaram diferentes picos responsáveis por essa separação que torna essas cultivares diferentes em sua constituição química. A figura 28 trás os cromatogramas de correlação estatística que demonstra as substâncias que discriminam as cultivares, onde as cores vermelhas e amarelas significa uma maior diferença significativa à nível de $p < 0,05$ quantitativamente entre as classes.

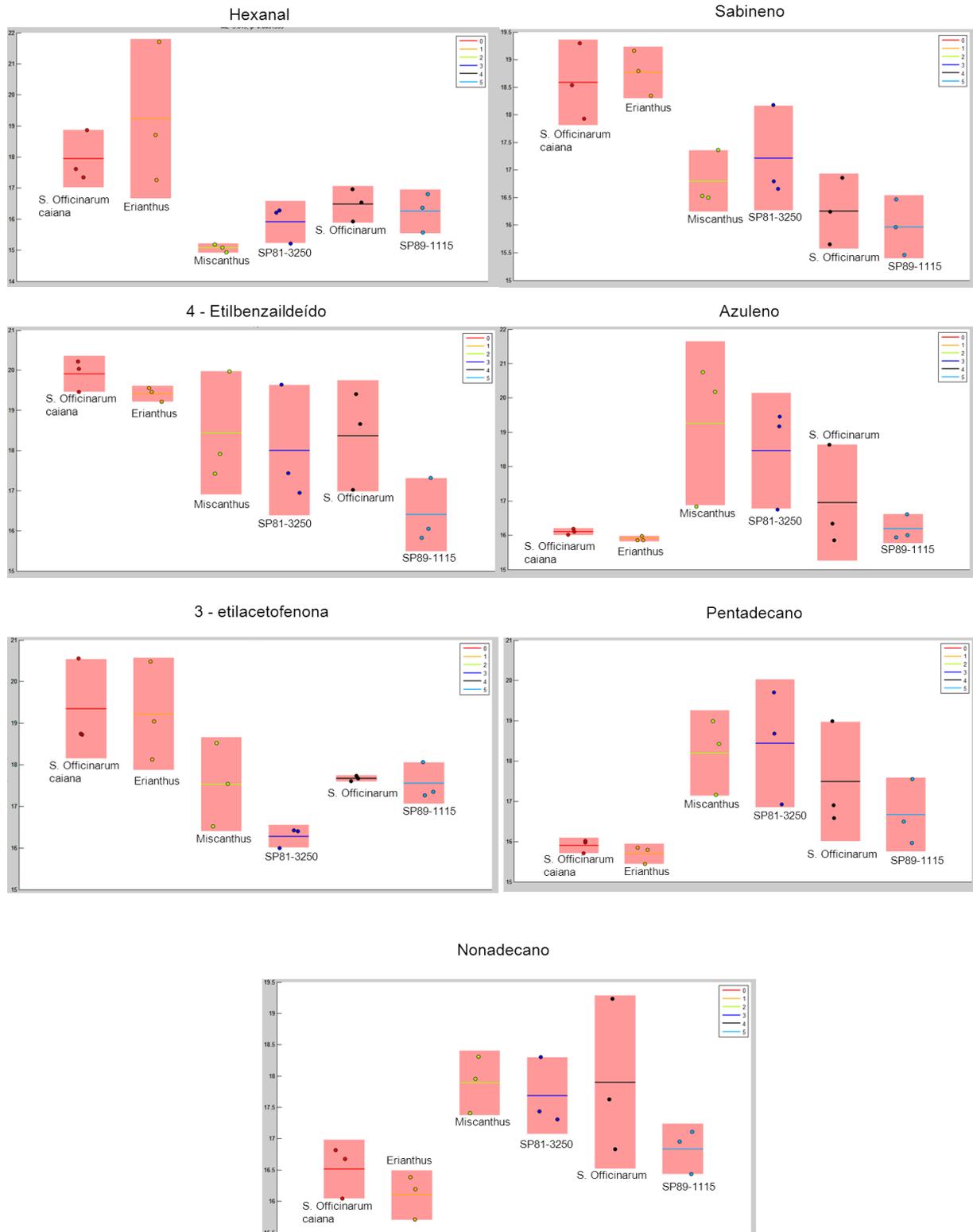
Figura 28 – Cromatograma de correlação estatística S-Line (S) das diferentes cultivares de cana-de-açúcar que são estatisticamente relevantes diferenciando as classes. Coloração de picos de acordo com a barra lateral, as cores vermelhas e amarelas significa uma maior diferença significativa à nível de $p < 0,05$.



Fonte: Autora, 2016.

Após observar o cromatograma de correlação estatística que demonstra as substâncias que discriminam as cultivares, foi selecionado os picos de interesse e feito uma quantificação relativa da intensidade Log do sinal em comparação pela ANOVA (Figura 29).

Figura 29 - Quantificação relativa da intensidade Log do sinal em comparação pela ANOVA,



Fonte: Autora, 2016.

Os compostos que diferem estatisticamente entre as cultivares de cana-de-açúcar *Saccharum officinarum*, *Saccharum officinarum* (Caiana), *Miscanthus*, *Erianthus*, SP81-3250 e SP89-1115 encontram-se discriminados na Tabela 2.

Os sete compostos identificados são encontrados nas cultivares estudadas mas apresentam uma diferença quantitativa estatisticamente significativa. Os COVs foram identificados por similaridade de espectro de massas, tempo de retenção e confirmados com padrões químicos. Os cromatogramas de GC mostraram pico com tempo de retenção, porcentagem e similaridade do espectro de massas presente nas bibliotecas NIST08 MS (National Institute of Standards and Technology) e WILEY. A fragmentação dos compostos emitidos pelas plantas de cana-de-açúcar encontra-se no apêndice.

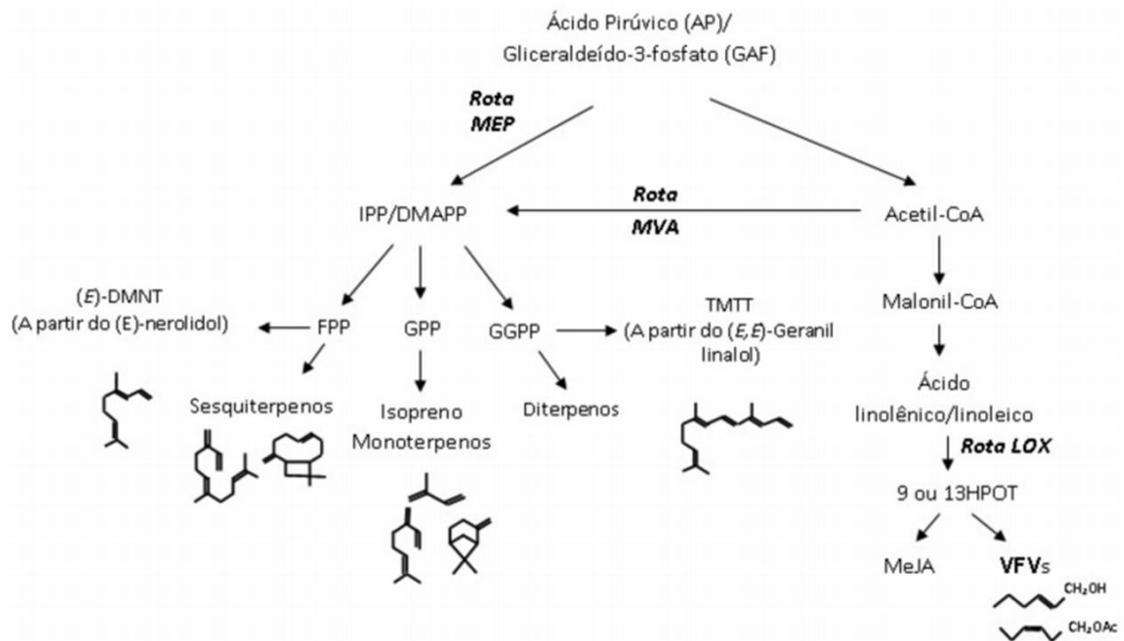
Tabela 2 - Compostos orgânicos voláteis identificados de plantas de cana-de-açúcar resistentes (SP81-3250) e suscetíveis (SP89-1115) a *D. saccharalis*.

Compostos	Índice de retenção
Hexanal	804
Sabineno	974
4 - Etilbenzaldeído	1189
Azuleno	1180
3 - etilacetofenona	1277
Pentadecano	1499
Nonadecano	1899

Fonte: Autora, 2016.

Em geral, os voláteis induzidos após a herbivoria são formados principalmente por aldeídos, e por álcoois C6 e seus ésteres, produzidos através da rota da enzima lipoxigenase LOX e terpenoides (Figura 30). Na rota de formação dos voláteis de folhas verdes (VFs), o composto (*Z*)-3-hexenal é o primeiro produto formado através da oxigenação do ácido linolênico pela ação da rota dos octadecanoides (via LOX), formando o ácido 13-hidroperoxi-linolênico (13HPOT). Posteriormente, o 13HPOT é metabolizado pela 13-hidroperoxidolase (13HPL) resultando na formação de (*Z*)-3-hexenal e do ácido 12-oxo-(*Z*)-9-dodecenoico. O composto hexenal é formado da mesma forma, mas a partir do ácido linoleico (D'AURIA et al., 2007).

Figura 30 - Rotas metabólicas para a produção dos dois principais grupos de voláteis induzidos após a herbivoria (Modificado de Schoonhoven et al.)



SIGNORETTI (2015) realizou um trabalho em busca de compostos voláteis para utilização no manejo comportamental de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). A resposta destes insetos foi avaliada frente às substâncias liberadas por plantas de laranja, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, variedade 'Pêra', enxertadas sobre limão-cravo, *C. limonia* Osbeck, sadias vs sintomáticas para Huanglongbing (HLB). Voláteis destas plantas, bem como seus extratos foram testados em olfatômetro 'Y' e analisados por GC-MS. Somente fêmeas foram

atraídas, tanto para os voláteis quanto para os extratos, e preferencialmente os de plantas doentes. Foram encontrados 47 compostos em extratos de plantas saudas e doentes, dos quais 11 (hexanal; α -tujeno; α -pineno; sabineno; β -mirceno; α -terpineno; limoneno; linalol; composto 37 (não identificado); β -elemeno e β -copaeno) presentes em maior quantidade nos extratos de plantas doentes, sendo que 3 desses compostos (sabineno, linalol e β -elemeno) foram majoritários nos extratos de ambas as plantas, doentes e saudas.

A variação genética dentro e entre populações fornece a matéria-prima para a evolução. Embora muitos estudos descrevem a variação de metabólitos de defesa, pouco se sabe sobre variação entre populações de plantas da mesma espécie em respostas a herbivoria ou pela secreções orais do herbívoro introduzidos no ferimento durante a alimentação. Wu (2008) comparou as respostas a herbivoria com metabólitos de defesa em dois acessos selvagem (Utah e Arizona) de *Nicotiana attenuata* e encontraram diferenças entre os dois acessos nas concentrações de vários metabólitos secundários que contribuem para a defesa direta e indireta de *N. attenuata*. Este estudo demonstra uma variação significativa em elementos reguladores que medeiam respostas das plantas ao ataque de herbívoros.

Outro estudo realizado com diferentes cultivares de pimentão *Capsicum* spp. e o pulgão do algodoeiro, *Aphis gossypii*, investigou o papel de semioquímicos voláteis na preferência de acolhimento. Após a análise dos compostos orgânicos voláteis liberados pelas plantas, antes e depois da infestação por *A. gossypii*, revelou que uma das cultivares não preferenciais emitiu nove compostos adicionais após a infestação, incluindo 6-metil-5-hepten-2-ona, conhecido como semioquímico de defesa da planta envolvido em interações planta-afídeos. Estes dados sugerem que as cultivares não preferidas emitindo este semioquímico têm o potencial de ser utilizados em programas de melhoramento para produzir cultivares resistentes a *A. gossypii* (COSTA et al, 2012)

A cultura do milho (*Zea mays* ssp.) é uma das mais importantes em todo o mundo e existem muitos relatos na literatura sobre defesas constitutivas e induzidas contra agentes patogênicos e insetos. No entanto, a pesquisa sobre seus ancestrais selvagens, os teosintos, no que diz respeito à resistência contra estes antagonistas é limitado. LANGE (2014) realizou um levantamento sobre o que se sabe em relação aos diferentes artrópodes e micróbios que estão associados com milho e teosintes no México e América Central, e avaliou os mecanismos de resistência contra

estresses bióticos das plantas. Ele concluiu que Teosintos parecem ter maior resistência contra certo número de pragas do que as cultivares modernas. Destacou-se também a necessidade de estudar os teosintos, a fim de identificar novas fontes de resistência em milho.

As plantas foram perdendo a resistência a ataque de pragas, no entanto parentes silvestres de plantas cultivadas têm muitas características benéficas que não estão presentes nas culturas modernas. Assim "rewilding" vem tornando-se uma nova tendência na reprodução de culturas que abre oportunidades interessantes para o controle biológico e agricultura orgânica (STENBERG et al., 2015).

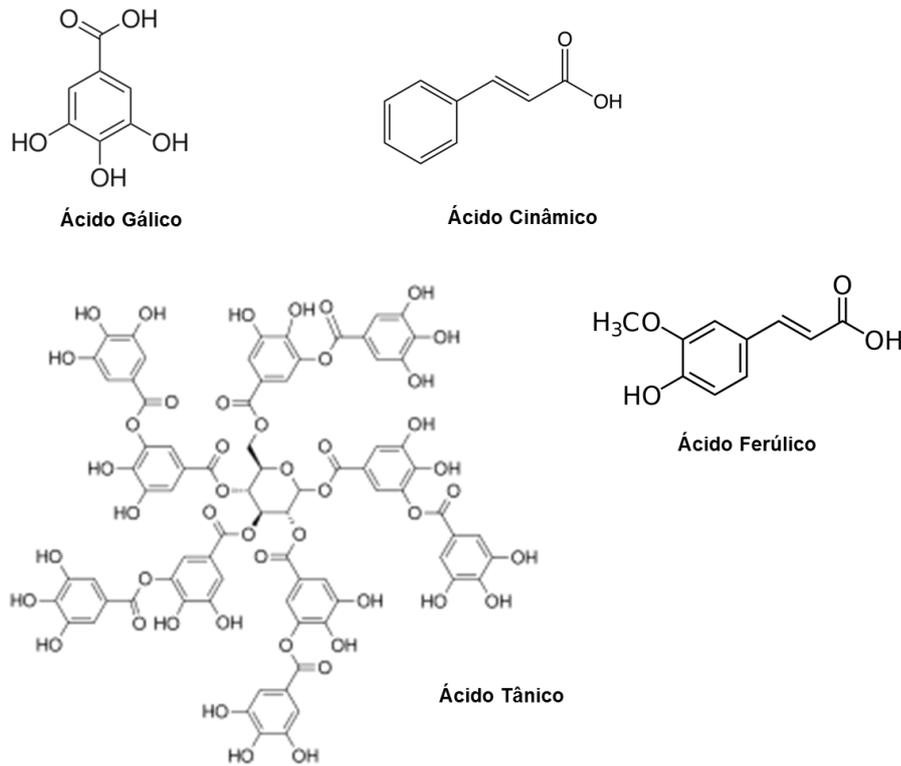
4.6 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos, ou polifenóis, são metabólitos secundários de plantas que constituem o mais comum e mais amplamente distribuído grupo de substâncias em plantas. Como regra geral, todos os compostos fenólicos são biossintetizados pelas vias do chiquimato-fenilpropanóides-flavonóides, produzindo assim todos os fenóis ou polifenóis monoméricos e poliméricos em plantas. As plantas utilizam compostos fenólicos principalmente na pigmentação, reprodução e resistência a patógenos e herbívoros, além de outras funções (HALBOURNE, 1989).

Convencionalmente, os métodos que demonstram que fenólicos constitutivos estão envolvidos na defesa da planta são os de quantificação de fenólicos totais. A análise de fenólicos totais nas cultivares suscetível e resistente do presente estudo mostra uma clara diferença na concentração entre elas. A cultivar resistente apresentou uma concentração de 198,68 mg/g de planta, enquanto que a cultivar suscetível apresentou a concentração de 119,47 mg/g de planta, isto representa um teor maior para a cultivar que apresenta resistência, podendo portanto estar implicado neste processo. A concentração de metabólitos tóxicos é sempre papel fundamental. No entanto, apesar de haver inúmeros exemplos que correlacionam um alto teor de fenólicos totais com a defesa da planta, são os compostos individualmente ou algumas subclasses que realmente exercem a atividade contra um herbívoro em particular. Além disso, há também a defesa induzida, ou seja, alguns fenólicos tóxicos podem ter a sua síntese aumentada após a herbivoria. Nas duas cultivares de cana-de-açúcar foram identificadas diferenças qualitativas no

ácido gálico/tânico (ambos apresentaram mesmo TR), no ácido ferúlico e no ácido cinâmico (Figura 31).

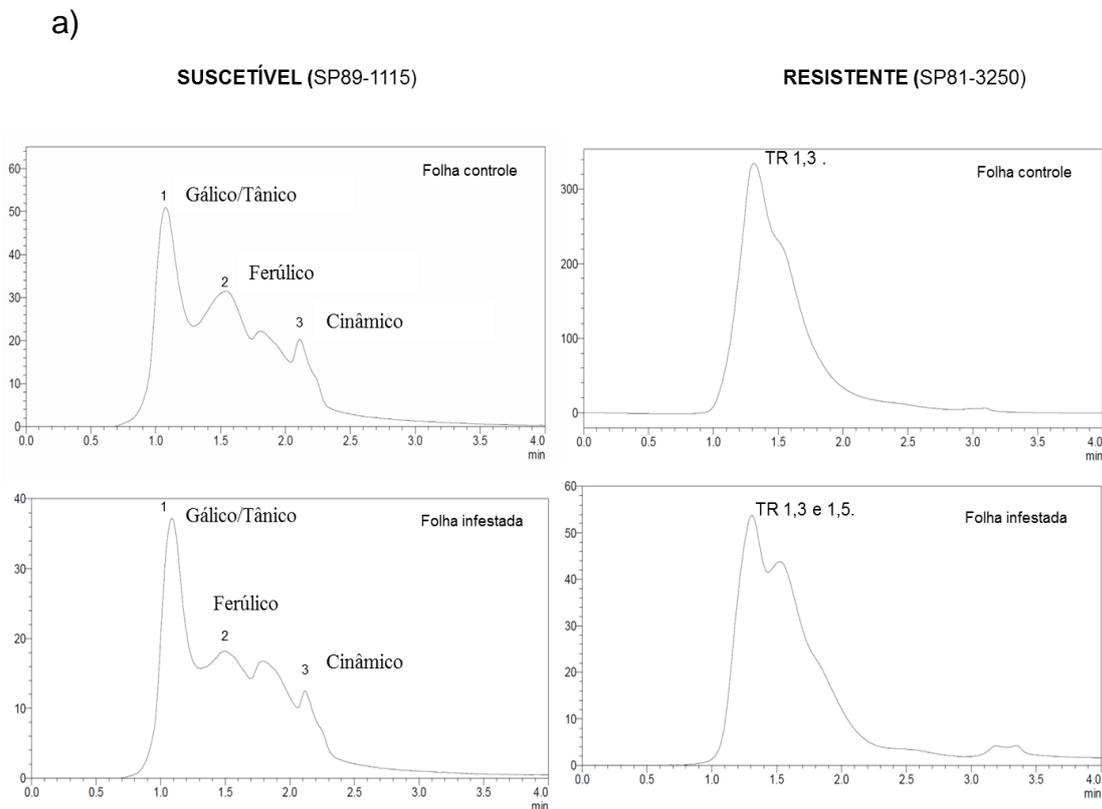
Figura 31 – Estrutura dos compostos fenólicos.



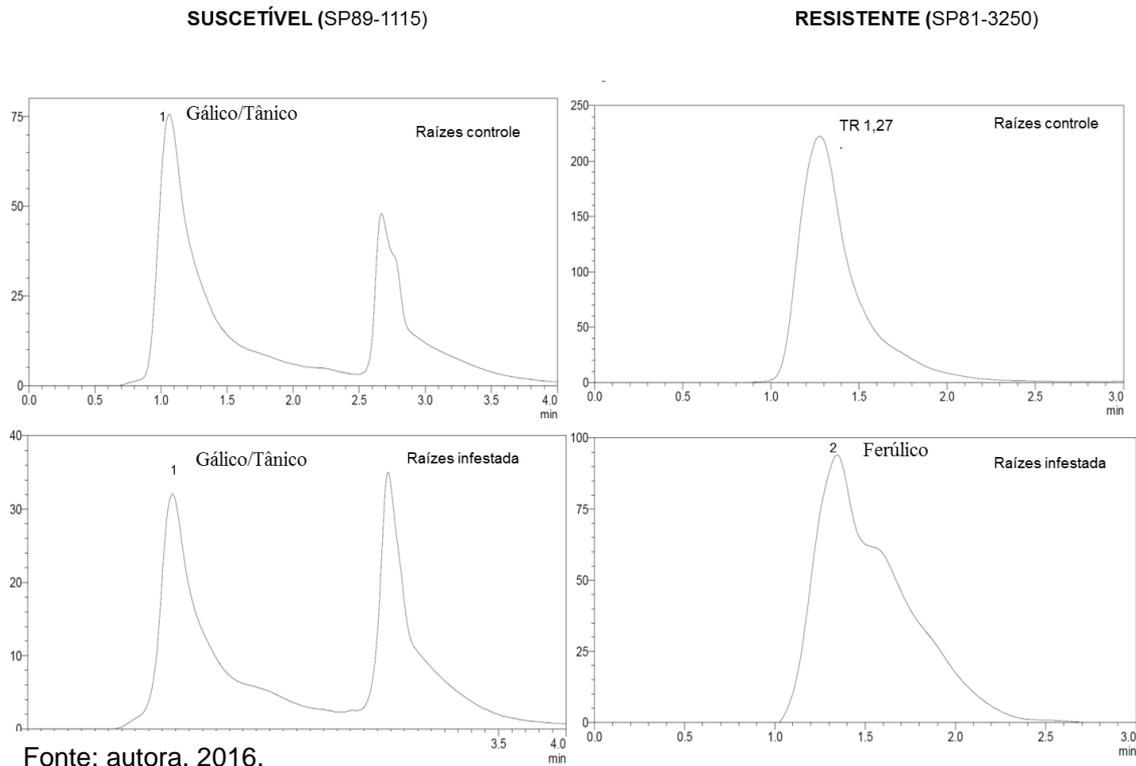
Os perfis de fenólicos de tecido foliar constitutivos apresentaram-se diferentes para as duas cultivares (Figura 32). Na cultivar suscetível, entre outros picos, identificou-se a presença de ácido gálico/tânico (ambos apresentaram mesmo TR), ácido ferúlico e ácido cinâmico, enquanto que na cultivar resistente, eles não foram detectados. Nesta cultivar houve a presença de outros compostos que não os fenólicos citados, com tempo de retenção diferentes, que permanecem ainda a ser identificados. No tecido radicular, o perfil dos fenólicos constitutivos mostrou-se novamente diferente entre as duas cultivares. Além disso, quando analisados os fenólicos induzidos após o dano do inseto, verificou-se que o ácido ferúlico foi produzido exclusivamente sob herbivoria, além de outros picos não identificados. Esses picos estiveram ausentes nas plantas controle, bem como não houve indução

de nenhum composto na cultivar suscetível. Interessante notar que, mesmo que o dano ocorra na parte aérea da planta (*D. saccharalis* ataca o colmo em cana-de-açúcar), as alterações se deram a nível de raiz da cultivar resistente. MANDAL (2010) estudou a indução de defesa em berinjela (*Solanum melongena* L.) em resposta ao ataque de *Ralstonia solanacearum* (Smith) e verificou o aumento do teor de fenólicos totais das raízes de berinjela. A partir desses dados, juntamente com os resultados da quantificação de fenólicos totais, especula-se que os compostos fenólicos podem estar contribuindo com a resistência da planta, no entanto são necessários bioensaios para confirmar esta hipótese.

Figura 32 – Cromatogramas HPLC das cultivares suscetível e resistente. (a) parte aérea de plantas controle e infestada; (b) raízes de plantas controle e infestada. 1. Gálico/Tânico TR=1.14, 2. Ferúlico TR=1.41 e 3. Cinâmico TR=2.03



b)



Os ácidos hidroxicinâmicos como o p-cumárico e ferúlico, este sendo encontrado exclusivamente em raízes atacadas da cultivar resistente, podem atuar como reservatórios de unidades de fenilpropanóides para a biossíntese de lignina e suberina. A biossíntese aumentada de lignina no tecido radicular após a herbivoria pode estar ligada a um possível reforço da parede celular e aumentando assim a barreira de proteção da planta. Estes ácidos também são precursores de outras classes de compostos de defesa como flavonóides, taninos entre outros, que podem atuar como adstringentes e/ou deterrentes (SOLECKA, 1997). Portanto, as diferenças qualitativas e quantitativas nos fenólicos das duas cultivares indicam uma participação desta classe de compostos na resistência da cultivar SP81-3250, porém um estudo mais aprofundado dos compostos formados (ainda não identificados) se faz necessário.

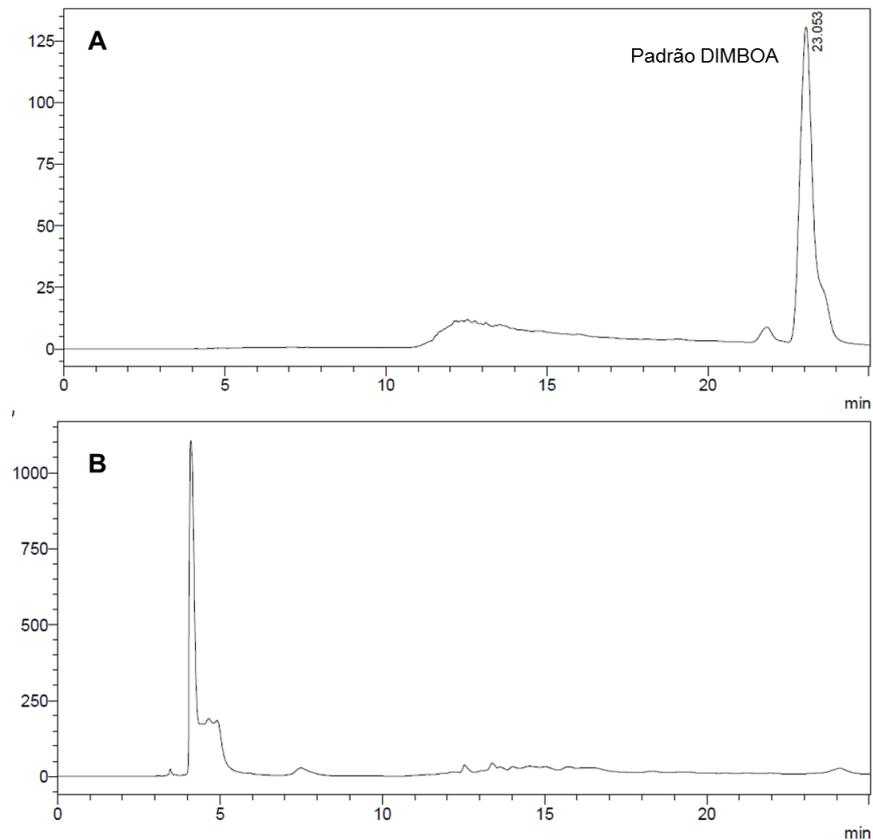
4.7 Ácido Hidroxâmico DIMBOA e Ácido clorogênico

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 com resíduos de cisteína (NIEMEYER, 2009). O DIMBOA também foi demonstrado ser produzido somente nas raízes de cana-de-açúcar (genótipo sul-africano) com função de defesa, sendo em cana-de-açúcar o gene *Bx2* gene da rota biossintética de DIMBOA, apresentou maior nível de expressão durante a herbivoria por *D. saccharalis* (SILVA FILHO, 2014).

Para a análise da produção de DIMBOA na cana-de-açúcar foram utilizadas amostras de tecido foliar/colmo e raízes nas duas cultivares, resistente (SP81-3250) e susceptível (SP89-1115), em plantas controle e infestadas com *D. saccharalis*. Os resultados das análises das partes aéreas (folha e colmo) e parte subterrânea (raiz) dos tratamentos avaliados não apresentaram nenhuma quantidade detectável de DIMBOA (Figura 33).

Figura 33 – Cromatogramas HPLC. (A) Padrão DIMBOA e (B) Amostra da raiz sem a presença do composto.



Fonte: autora, 2016.

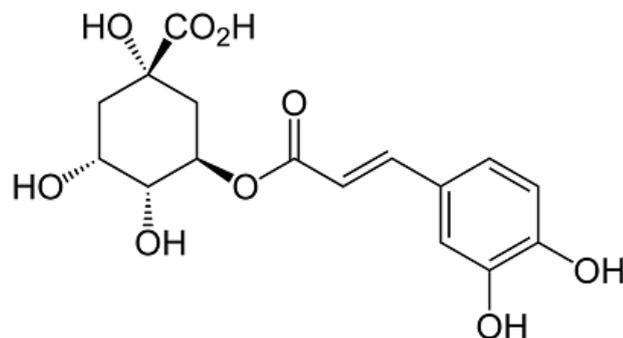
Encontramos na literatura relatos sobre a produção de grande quantidade de benzoxazinóides e seus glicosídeos atuando como elementos antialimentares por conta de sua toxicidade e alelopatia. Na cultura do milho a quantidade de DIMBOA foi relatada em maior quantidade em cultivar resistente a *Ostrinia nubilalis* (GUTHRIE et al., 1986). O trabalho de GUTIERREZ et al., (1988), com duas linhagens de milho, mostrou o aumento de DIMBOA após o ataque de *Sesamia nonagrioides* em comparação com as plantas controles que não foram infestadas.

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, variedade e do tecido da planta.

Nossos resultados negativos para quantificação de DIMBOA, podem estar relacionados com diferentes fatores: idade das plantas, pois trabalhamos com cultivares com 60 dias após a germinação; essas variedades podem ter perdido essas características devido aos cruzamentos durante o melhoramento genética e sua via metabólica pode está sendo utilizada para produção de outros compostos. No entanto, um estudo mais aprofundado do DIMBOA e até a busca por seus derivados se faz necessária.

O ácido clorogênico (Figura 34) é um metabolito secundário que fornece resistência contra pragas a vários insetos, entre eles a lagarta da espiga do milho (CORTEZ-CRUZ et al., 2003), é um composto derivado de fenilpropanóide e se acumula no tecido foliar acima do solo em resposta a herbivoria (BUSHMAN et al., 2002).

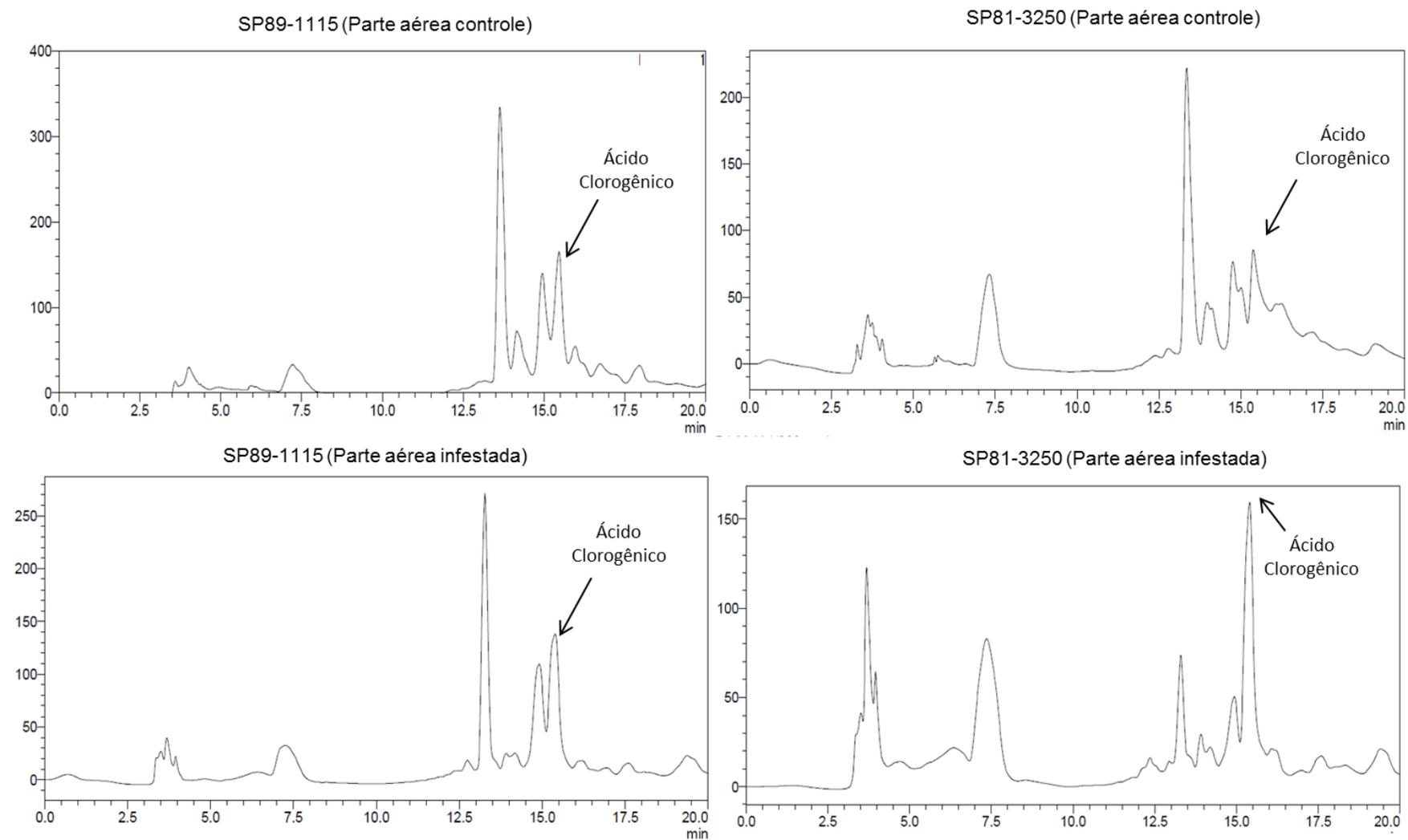
Figura 34 – Estrutura do ácido clorogênico.



A cultivar de Milho SH2 que apresenta o alelo P1 tem um papel importante na resistência contra a lagarta da espiga de milho, um alelo que foi perdido durante a seleção, e o alelo P1 tem efeitos significativos sobre biossíntese de compostos antibióticos que podem reduzir os danos da lagarta da espiga de milho na espiga. Além disso, milhos com mutação P1, que tem a biossíntese da produção do ácido clorogênico alterada, pois aumenta sua produção nas folhas. O ácido clorogênico foliar acumula em resposta a raízes tratadas com ácido abscísico ou herbivoria, fornecendo evidências de comunicação na defesa das plantas (ERB et al. 2009).

Para a análise da produção de ácido clorogênico na cana-de-açúcar foram utilizadas amostras de tecido foliar/colmo e radicular nas duas cultivares, resistente (SP81-3250) e suscetível (SP89-1115), em plantas controle e infestadas com *D. saccharalis*. Os resultados com material das partes aéreas (folha e colmo) e parte subterrânea (raiz) mostram a confirmação da presença do ácido clorogênico na cana-de-açúcar na parte aérea dos tratamentos avaliados (Figura 35).

Figura 35 – Cromatogramas HPLC das cultivares suscetível e resistente. Parte aérea de plantas controle e infestada.



Fonte: autora, 2016.

Os resultados com material da parte subterrânea (raiz) de cana-de-açúcar não apresentaram nenhuma quantidade detectável de ácido clorogênico. Já os resultados das partes aéreas (folha/colmo) demonstram que houve produção de ácido clorogênico e que esta aumentou no tratamento da cultivar resistente (SP81-3250) quando submetida à herbivoria.

O ácido clorogênico é amplamente distribuído em diferentes partes de muitas plantas e geralmente ocorre nos tecidos em quantidades facilmente detectáveis. Pode ser oxidado por enzimas do tipo polifenoloxidase, dando origem a quinonas altamente tóxicas (GOODMAN et al., 1986). O ácido clorogênico também pode funcionar nas plantas como um intermediário metabólico na formação de compostos fenólicos insolúveis (p.ex.: lignina e polímeros semelhantes à lignina) associados com a resistência (FRIEND, 1981b). Em função dessas características, o ácido clorogênico tem sido apontado como um composto importante na resistência das plantas. Como exemplo, pode-se citar a resistência da batata contra *Verticillium albo-atrum*. O conteúdo de ácido clorogênico nas raízes de plantas de batata é diretamente relacionado à resistência à murcha de *Verticillium* (PATIL et al., 1966).

Após obtenção dos resultados da presença do ácido clorogênico após herbivoria na cultivar resistente, fomos avaliar seu efeito em diferentes concentrações sobre as diferentes fases do ciclo biológico de *D. saccharalis*, observando o período larval, pupal e longevidade dos adultos, bem como as deformações morfológicas nas respectivas fases de desenvolvimento.

O sistema utilizado foi adequado já que a dieta artificial do tratamento controle apresentaram características nutricionais possibilitando às larvas a aquisição do alimento e, posteriormente, desenvolvendo até a fase adulta normalmente.

No que se refere ao peso de pupas, os resultados não revelaram diferença significativa entre as diferentes doses de ácido clorogênico e o controle, indicando que as mesmas apresentam desempenho similar (figura 36). No entanto, houve diferença significativa entre os tratamentos para as características biológicas período larval, pupal e longevidade dos adultos (ciclo de vida), bem como nas deformações em adultos (Figura 37 e 38) indicando que o ácido clorogênico afetou negativamente a biologia do inseto e pode estar relacionado com a resistência em cana-de-açúcar.

Figura 36 - Peso de pupa da *D. saccharalis* em função das doses de ácido clorogênico adicionados à dieta artificial da fase larval.

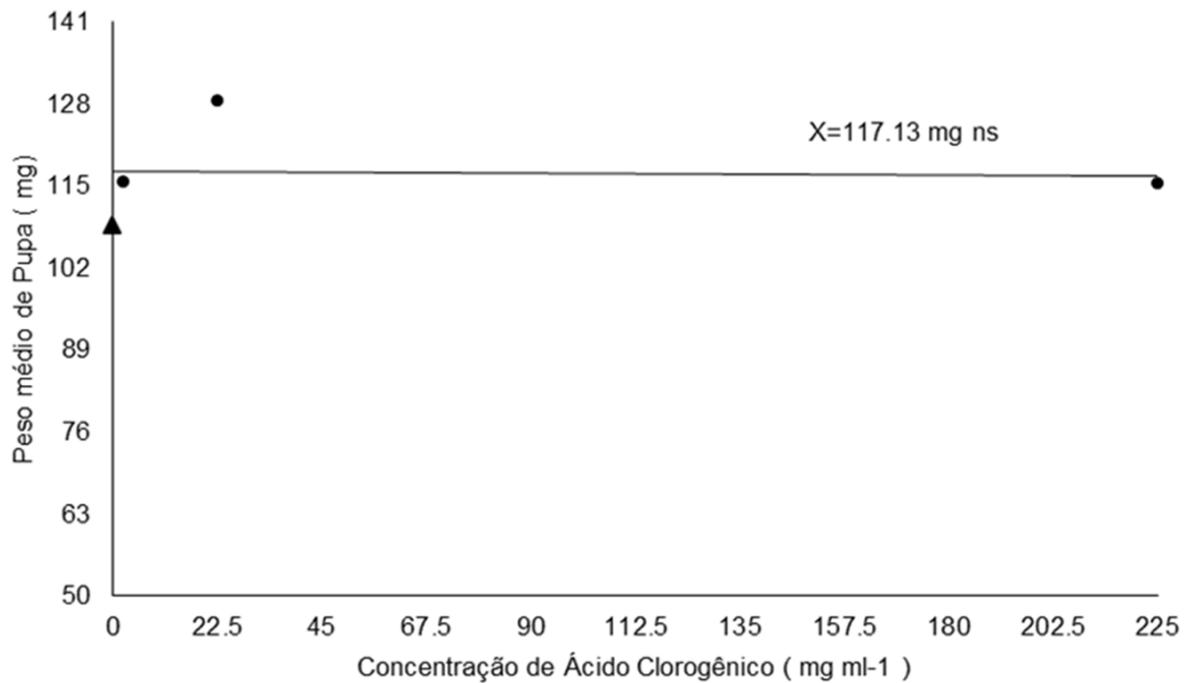


Figura 37 - Ciclo de vida de larva a adulto de *D. saccharalis* em função das doses de ácido clorogênico adicionados à dieta artificial da fase larval.

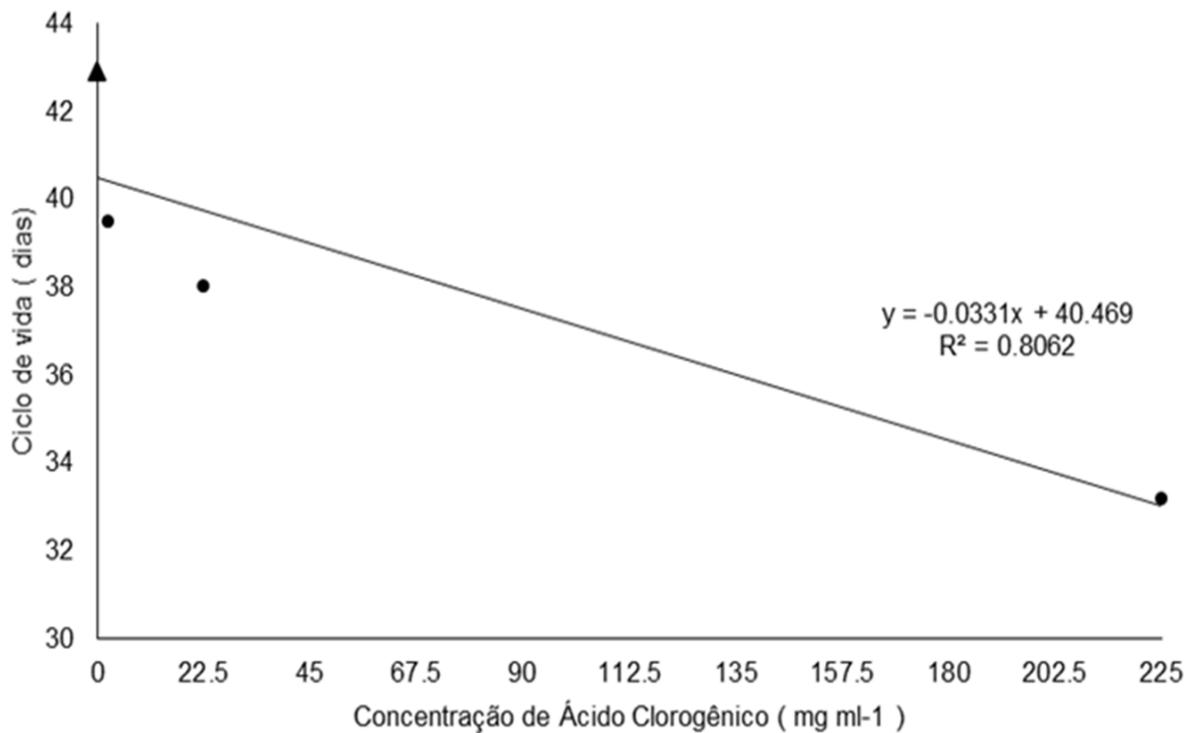
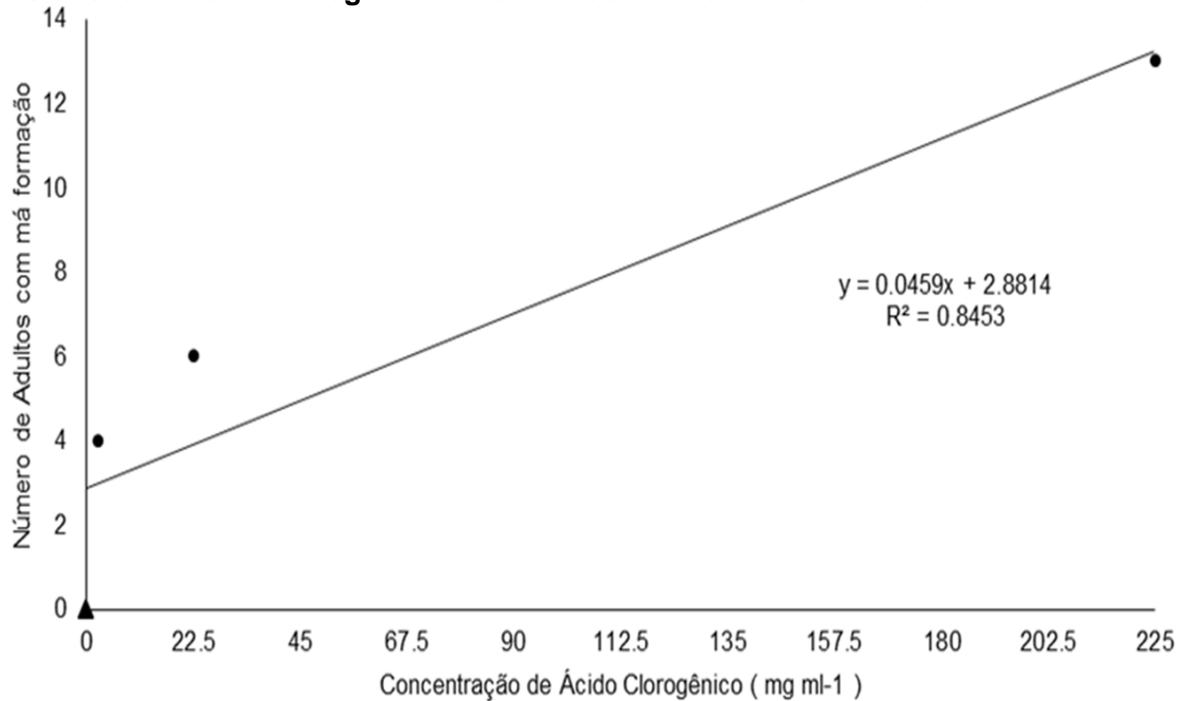


Figura 38 - Número total de adultos de *D. saccharalis* com má formação em função das doses de ácido clorogênico adicionados à dieta artificial da fase larval.



Fonte: autora, 2016.

Quando analisada a influência do ácido clorogênico sob o ciclo de vida de *D. saccharalis*, a medida que a dose de ácido clorogênico aumentava entre os tratamentos o ciclo foi encurtado. O período pupal das larvas que se alimentavam com a dose de 225 mg/mL de ácido clorogênico foi de 17 à 19 dias, indicando um sinal de estresse devido a presença desse metabólito secundário em sua dieta artificial, já as larvas do tratamento controle tiveram um período pupal de 23 à 25 dias.

O ácido clorogênico tem sido relatado como metabólito secundário que reduz a digestibilidade e palatabilidade em alguns insetos. O besouro *Lochmaea Capreae* quando alimentado com *Salicaceae* e ácido clorogênico teve sua alimentação impedida (NATSUDA; SENBO, 1986). A presença do mesmo também ocorre em tricomas de tomate e reduz o crescimento dos estádios iniciais da lagarta do algodão, *Helicoverpa zea*. Mais uma vez, o ácido 1-cafeoil-4-desoxiquinona, presente nas folhas do selvagem *Arachis paraguaensis*, inibe o crescimento da lagarta *Spodoptera litura* em tabaco (STEVENSON et al, 1993).

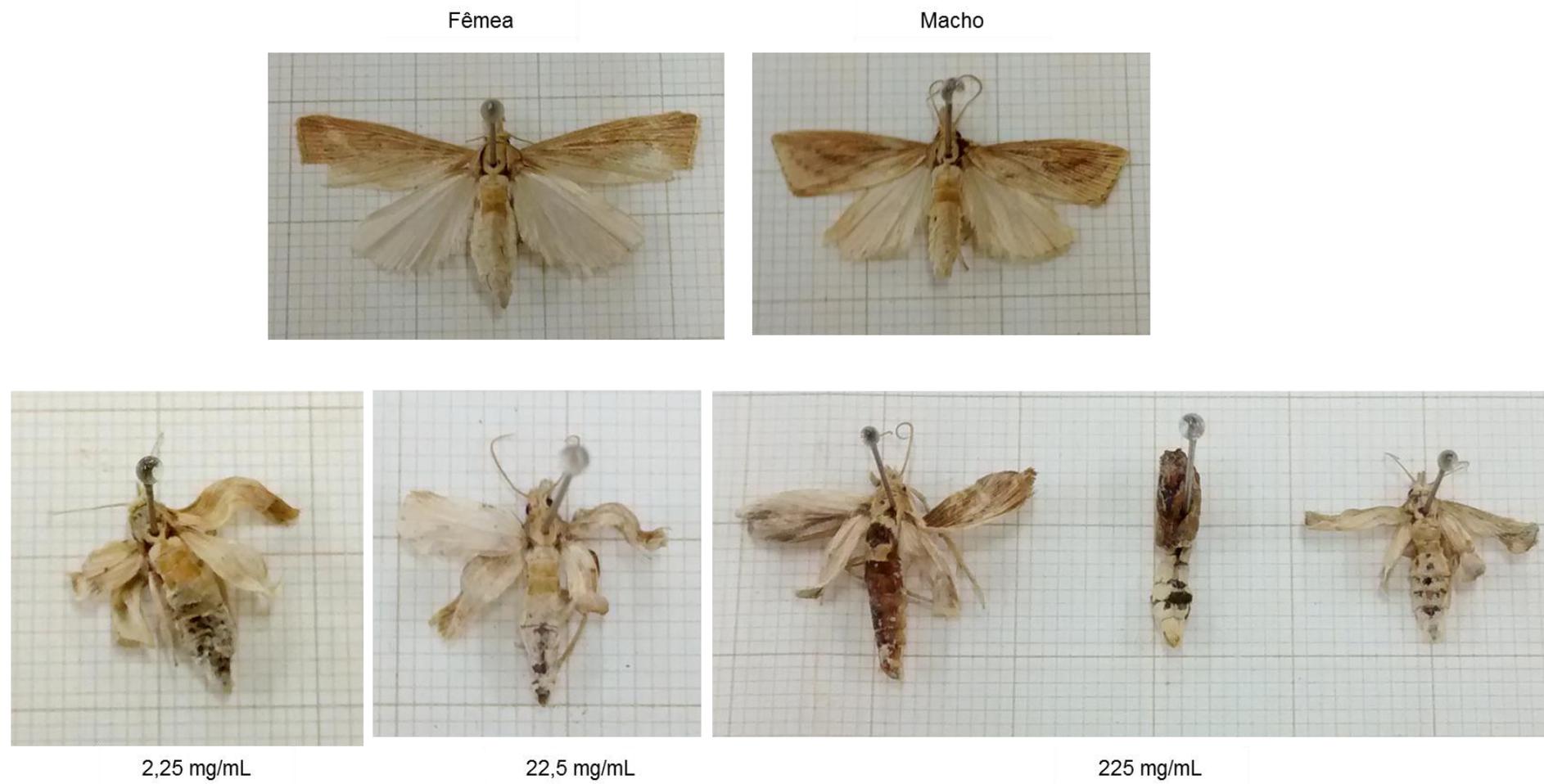
O trabalho de LEISS et al (2009) com crisântemos (*Dendranthema grandiflora*) e resistência à trips (*Frankliniella occidentalis*), uma praga chave de culturas agrícolas e hortícolas em todo o mundo, relatou diferença na taxa de

crescimento relativo da primeira fase larval de trips quando alimentada com dieta artificial e diferentes doses de ácido clorogênico.

A eficácia dos compostos fenólicos como um fator de resistência por meio da alimentação é aumentada por oxidação de polímeros, os quais reduzem a digestibilidade, palatabilidade e valor nutricional. Isto acontece no caso da alimentação do besouro-da-batata (*Leptinotarsa decemlineata*). A batata é rica em ácido clorogênico, que na presença de enzimas oxidantes produz polímeros prejudiciais ao inseto, este fato pode ser correlacionado com a elevada resistência ao besouro-da-batata entre os vários genótipos (CASTANERA et al, 1996).

Em relação ao número total de adultos de *D. saccharalis* com má formação em função das doses de ácido clorogênico, o maior valor foi verificado no tratamento com dose de 225 mg/mL, sendo que nas demais doses também foi observado a emergência de adultos deformados (Figura 39), ao contrário da dieta sem ácido clorogênico.

Figura 39- *D. saccharalis* na fase adulta com má formação em função das doses do ácido clorogênico



Fonte: autora, 2016.

Quando o mecanismo de resistência é de natureza química e afeta negativamente a biologia do inseto, sem que haja interferência em seu comportamento de alimentação ou oviposição, pode-se dizer que a planta é resistente por antibiose ao determinado inseto. Os principais efeitos desse tipo de defesa das plantas sobre os parâmetros biológicos dos insetos são mortalidade da fase imatura, menor crescimento e peso, deformação e aumento no ciclo de vida do inseto (BOIÇA JUNIOR et al., 2009). Em nosso trabalho observamos a deformação dos adultos após emergirem da pulpa, pois o ácido clorogênico causou esse efeito deletério.

O mecanismo de defesa das plantas produzem compostos orgânicos como os metabólitos secundários como: flavonóides, compostos fenólicos, alcalóides, aminoácidos não proteicos, saponinas, lectinas, quitinases, glucanases e inibidores de proteases, que são encontrados em inúmeras espécies de planta (BOWLES, 1990)

Encontramos trabalhos na literatura que envolvem a expressão de antibiose nas plantas como resistência ao ataque de inseto-praga. Por exemplo, BOTEGGA (2013) avaliou nove genótipos de feijoeiro ao cartucho *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae), observou que em vários genótipos, os cartuchos tiveram alta mortalidade larval e pupal, além de maiores durações nos ciclos de vida. Os genótipos foram classificados como altamente e moderadamente resistentes por antibiose ao cartucho.

Em outro estudo MORAES (2014) avaliou as categorias e mecanismos de resistência de genótipos de couve a *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797). Os genótipos Manteiga de Ribeirão Pires I-2620 e Manteiga de Mococa apresentaram resistência para *S. frugiperda* devido principalmente aos maiores teores de fenólicos na composição do genótipo Manteiga de Ribeirão Pires I-2620 e de sinigrina no genótipo Manteiga de Mococa. SOUZA (2014) observou a lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatilis* Hübner e a lagarta-militar *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) alimentadas com folhas do genótipo de soja PI 227687, tiveram sua biologia influenciada. Os mecanismos associados à expressão de antibiose nesse genótipo foram relacionados às menores concentrações dos nutrientes N, P, K e S; maiores concentrações dos nutrientes Cu, Fe e Ca; e maiores concentrações dos flavonoides rutina, isoquercetrina, daidzina, daidzeina e hesperidina.

Estudos futuros são necessários para melhor entender os mecanismos que governam a expressão da resistência por antibiose como defesa de planta, visando a desenvolver novas cultivares resistentes.

Os resultados indicam que a cultivar de cana-de-açúcar resistência SP81-3250 pode estar relacionada às defesas constitutiva e induzida a broca da cana *D. saccharalis*. Quando realizados os bioensaios com as duas cultivares, a broca mostrou uma preferência para ovipositar na cultivar SP89-1115, suscetível. Esse comportamento possivelmente é influenciado pela constituição química das cultivares, seja ela pela produção de compostos secundários voláteis, já que o perfil de COVs foram bastante diferentes entre elas, ou solúveis, haja vista a análise qualitativa dos compostos fenólicos também mostrou-se bastante diferentes.

O melhoramento genético tradicional vem utilizando uma base genética relativamente estreita, onde poucos parentais foram utilizando para os cruzamentos atuais. Portanto, apesar da base estreita variabilidade genética na defesa da planta foi encontrada, mostrando o potencial na busca por novas fontes de resistência. A segunda etapa do trabalho, visou verificar a variabilidade em diferentes genótipos do “complexo *Saccharum*”, a fim de encontrarmos mais contraste relacionados a defesa que encontra-se em curso. Os materiais testados mostraram ainda mais variabilidade nas características testadas. Esses resultados demonstram o potencial da busca de novas fontes de resistência na variabilidade genética encontrada dentro do “complexo *Saccharum*” que deve ser levada em consideração na implementação ou no desenvolvimento de novas cultivares em programas de melhoramento genético visando a obtenção de plantas resistentes.

5 CONCLUSÕES

- As fêmeas de *D. saccharalis* não voaram no teste do túnel de vento em direção a nenhuma fonte de odor proveniente das plantas de cana-de-açúcar;
- No teste de oviposição com chance de escolha as fêmeas de *D. saccharalis* mostraram preferência pela cultivar suscetível SP89-1115, porém no teste sem chance de escolha o comportamento de oviposição das fêmeas foi semelhante em ambas as variedades;
- Não houve diferença significativa em relação ao ganho de peso das lagartas de *D. saccharalis* quando se alimentando pelas cultivares susceptível SP89-1115 e resistente SP81-3250 de cana-de-açúcar por cinco dias;
- Houve diferença no perfil de voláteis entre as duas cultivares. Dentre os compostos identificados, apenas três compostos diferem estatisticamente entre cultivar resistente (SP81-3250) e a cultivar suscetível (SP89-1115). Os outros oito compostos diferem estatisticamente a cultivar suscetível (SP89-1115) da resistente (SP81-3250);
- Os COVs emitidos pelos genótipos do “Complexo *Saccharum*” estudados mostram-se diferentes;
- Os fenólicos totais nas cultivares suscetível e resistente do presente estudo mostram uma clara diferença na concentração entre elas. A cultivar resistente apresentou uma concentração de 198,68 mg/g de planta, enquanto que a cultivar suscetível apresentou 119,47 mg/g de planta;
- Na análise qualitativa dos fenólicos a cultivar suscetível, identificou-se a presença de ácido gálico/tânico, ácido ferúlico e ácido cinâmico, enquanto que na cultivar resistente, eles não foram encontrados. No tecido radicular, o perfil dos fenólicos constitutivos mostrou-se novamente diferente entre as duas cultivares. O ácido ferúlico foi produzido exclusivamente sob herbivoria, além de outros picos ainda não identificados;
- Na análise qualitativa do DIMBOA e do ácido clorogênico, identificou-se apenas a presença do ácido clorogênico da parte aérea (foliar e colmo), em maior quantidade na cultivar resistente;
- Em função das doses de ácido clorogênico os de adultos de *D. saccharalis* apresentaram má formação após emergirem das pupas.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, A.A.; STRAUSS, S.Y.; STOUT, M.J. Costs of induced responses and tolerance to herbivory in male and female fitness components of wild radish. **Evolution**, v. 53, p.1093-1104, 1999.
- AGRAWAL, A.A. Specificity of induced resistance in wild radish: causes and consequences for two specialist and two generalist caterpillars. **Oikos**, V. 89, p. 493-500, 2000.
- AGRAWAL, A.A. Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. **Science**, v. 294, p. 321-326, 2001.
- AHMAN, I., R. GLINWOOD; V. NINKOVIC. The potential for modifying plant volatile composition to enhance resistance to arthropod pests. **Plant Sciences Reviews**, p. 1-10, 2010.
- ALBORN, et al.** Disulfooxy fatty acids from the American bird grasshopper *Schistocerca americana*, elicitors of plant volatiles. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 104, p. 12976, 2007.
- ALMEIDA, L. C. Bicudo da Cana-de-açúcar. Piracicaba: Centro De Tecnologia Canavieira, **Boletim Técnico C.T.C**, p.1-3., 2005.
- ALMEIDA, L. C. Pragas em cana crua: Monitoramento e controle. Piracicaba, Outubro/2009. Disponível em . Acesso em: 02/05/2016.
- AMARAL, S.F.; ARRUDA, H.V. Susceptibilidade de novas variedades de cana-de-açúcar à *Diatraea saccharalis* (F., 1794) (Lepidoptera-Grambidae). **O Biológico**, v. 38, p. 73-75, 1972.
- ANDRADE, L.A.B.; CARDOSO, M. Das G. Cana-de-açúcar para produção de cachaça. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. cana-de-açucar. **Campinas: IAC**, p. 747-762, 2010.
- ARRIGONI, E. de B. Estudos sobre resistência da cana à broca em telado – V. **Boletim Técnico Copersucar**, v.48, p. 25-31, 1989.
- BALDWIN, I. T.; KESSLER, A.; HALITSCHKE, R. Volatile signaling in plant-plant-herbivore interactions: what is real?. **Biotic Interactions**, 2002.
- BALDWIN I. T. Microarray analysis of salicylic acid- and jasmonic acid-signaling in responses of *Nicotiana attenuata* to attack by insects from multiple feeding guilds. **Plant, Cell & Environment** , v. 27, p. 1362–1373, 2004
- BARBOSA, R. H. *et al.*. 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**. v.15, n. 5, p. 41-51, 2011.

BARBOSA, M.H.P., RESENDE, M.D.V., DIAS, L.A.S., et al. Genetic improvement of sugar cane for bioenergy: the Brazilian experience in network research with RIDESA. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** , p. 87 – 98, 2012.

BARSALOBRES, C.F. Análise de expressão gênica induzida por *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar via micro-organismos de colônias bactericidas. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.

BASTOS, V.D. Etanol, Alcoolquímica e Biorrefinarias. **BNDES Setorial**, n. 25, p. 5-38, mar. 2007

BEALE, M. H. M. A., et al. Aphid alarm pheromone produced by transgenic plants affects aphid and parasitoid behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 10509-10513, 2006.

BEGON, M., J. HARPER; C. TOWNSEND. Ecology: individuals, populations, and communities. Wiley-Blackwell, 1996.

BENEDINI, M. S.; CONDE A. J.: BROCA GIGANTE Nova praga da cana-de-açúcar na região centro-sul. **Revista Coplana** - Setembro 2008.

BLEEKER, P.M. et al. The role of specific tomato volatiles in tomato-whitefly interaction. **Plant Physiology**, v. 151, p. 925-935.

BOEVÉ, J. et al. Volatiles emitted by apple fruitlets infested by larvae of the European apple sawfly. **Phytochemistry**. v. 42, p. 373-381, 1996.

BOIÇA JR, A.L.; LARA, F.M. Avaliação da resistência de genótipos de *Sorghum bicolor* (L.) Moench a *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera, Pyralidae) e determinação dos tipos envolvidos. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.12, n.2, p. 261-272, 1983.

BOICA JUNIOR, A. L.; JESUS, F. G. de . Resistência de plantas: definições e aplicações como tática no controle de insetos. In: Anderson Gonçalves da Silva; Camila Alves Rodrigues; Camila Kauffmann Becaro; Daline Benites Bottega; Gianni Queiroz Haddad; Gleina Costa Silva Alves; Júlio César Janini. (Org.). **Tópicos em Entomologia Agrícola II**. : Atual Gráfica e Comunicação Visual Ltda - ME, p. 133-141, 2009.

BOLTER, C. J.; JONGSMA, M. A. Colorado potato Beetles (*Leptinotarsa decemlineata*) adapt to proteinase inhibitors induced in potato leaves by methyl jasmonate. **Journal of Insect Physiology**, v. 41, p. 1071-1079, 1995.

BORÉM, A. Melhoramento de Plantas. 3.ed. Viçosa: UFV. 500 p., 2001.

BOTELHO, P. S. M.; MACEDO, N. Cotesia flavipes para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; FERREIRA-CORRÊA, B. S.; BENTO, J. M. S. (Ed.). Controle biológico no Brasil Cotesia flavipes para o controle de *Diatraea saccharalis*. Manole, 2002.

BOTTEGA, D. B., et al. Resistência de genótipos de feijão-vagem ao ataque de *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann, 1833) (Coleoptera: Chrysomelidae). **Pesq. Agropec. Trop.**, v. 43, n. 1, p. 18-25, 2013

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.

BUSHMAN, B.S. Two loci exert major effects on chlorogenic acid synthesis in maize silks. **Crop Sc.** V. 42: p. 1669–1678, 2002.

CARVALHO, N.L.; BARCELLOS, A.L. Adoção do manejo integrado de pragas baseado na percepção e educação ambiental. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental - REGET/UFMS**, v.5, nº5, p. 749 - 766, 2012.

CASTANERA, P. STEFFEN, J. C. ; TINGEZ, J. W. M. **Chem. Ecol.**, v. 22, p. 1493, 1996.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, et al. 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.

CINGOLANI, A.M.; POSSE, G.; COLLANTES, M.B. Plant functional traits, herbivore selectivity and response to sheep grazing in Patagonian steppe grasslands. **Journal of Applied Acology**, v. 42, n. 1, p. 50-59, 2005.

COLEY, P.J. BRYANT.; F. CHAPIN. Resource availability and plant antiherbivore defense. **Science.** p. 230:895, 1985.

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.

COOPER, R.M., et al. Detection and localization of elemental sulfur in disease resistant genotypes of *Theobroma cacao*. **Nature**, v. 379, p. 159–162, 1996.

COPOLOVICI, L. et al. Emissions of green leaf volatiles and terpenoids from *Solanum lycopersicum* are quantitatively related to the severity of cold and heat shock treatments. **Journal of Plant Physiology**, v.169, p. 664–672, 2012.

CORTÉS-CRUZ, M. SNOOK, M.MCMULLEN, M.D. The genetic basis of C-glycosyl flavone B-ring modification in maize (*Zea mays* L.) silks. **Genome**, v. 46, p. 182–194, 2003.

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.

COSTA, J.G. et al. Differential preference of *Capsicum* spp. cultivars by *Aphis gossypii* is conferred by variation in volatile semiochemistry. **Euphytica.** v. 177, p. 299–307, 2012.

CRUZ, P.L. et al. Atratividade de genótipos de feijão-caupi para oviposição de *Bemisia tabaci* biótipo B. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.47, n.11, p.1563-1571, 2012

DAMMANN, C.; ROJO, E.; SANCHES-SERRANO, J. J. Abscisic acid and jasmonic acid activate wound-inducible genes in potato through separate, organ-specific signal transduction pathways. **The Plant Journal**, v. 11, p. 773-782, 1997.

DANIELS, J. AND ROACH, B.T. Taxonomy and evolution. p.7-84, 1987. *In* Heinz, D.J. (ed.) Sugarcane improvement through breeding. Elsevier, Amsterdam.

DANIELS J., et al. The origin of the genus *Saccharum*. **Sugarcane Breeding Newsletter**, v.36, p. 24-39, 1975.

D'AURIA, J. C., et al. Characterization of a BAHD acyltransferase responsible for producing the green leaf volatile (*Z*)-3-hexen-1-yl acetate in *Arabidopsis thaliana*. **Plant J.**, v. 49, p. 194, 2007

DEMATTE, J.L.I. Manejo e conservação de solos, na cultura da cana. **Visão Agrícola**, Piracicaba, p.8-17, jan/jun, 2004

DEMATTE, J.L.I. Recuperação e manutenção da fertilidade dos solos. **Revista Visão Agrícola**, v. 1, p. 49-52, 2004.

DEMETRIO, P. A.; ZONETTI, P. C.; MUNHOZ, R. E. F. Avaliação de clones de cana-de-açúcar promissores RB's quanto à resistência à broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*) na região noroeste do Paraná. **Cesumar**, v. 10, n.1, p. 13- 16, 2008.

DICKE, M., M. W., et al. Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through, allelochemicals: prospects for application in pest control. **Journal of Chemical Ecology**, v. 16, p. 3091-3118, 1990a.

DERNEIKA, O.; LARA, F. M. Resistência de cana-de-açúcar a *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera- Pyralidae): comportamento de variedades em três cortes e em quatro locais do Estado de São Paulo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 20, n. 2, p. 359-368, 1991.

DICKE, M. T., et al. Isolation and identification of volatile kairomone that affects acarine predator-prey interactions Involvement of host plant in its production. **Journal of Chemical Ecology**, v. 16, p. 381-396, 1990b.

DICKE, M.; LORETO, F. Induced plant volatiles: from genes to climate change. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 3, p. 115, 2010.

DINARDO-MIRANDA, L.L. Pragas. *In*: DINARDOMIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. (Ed.). **Cana-de-açúcar. Campinas: Instituto Agrônomo**, p.349-404, 2008.

- DINARDO-MIRANDA, L.L.; ANJOS, I.A.; COSTA V.P.; FRACASSO, J.V. Resistance of sugarcane cultivars to *Diatraea saccharalis*. **Pesq. agropec. bras.**, v.47, n.1, p.1-7, jan. 2010
- Dirzo, R. Insect-plant interactions: some ecophysiological consequences of herbivory. **Physiological Ecology of Plants of the Wet Tropics**, p. 209-224, 1984.
- DOSS, R. P.; et al. Bruchins: insect-derived plant regulators that stimulate neoplasm formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 11, p. 6218-6223, 2000.
- DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**, Rockville, v. 135, n. 4, p. 1893-1902, 2004.
- DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. Metabolic engineering of plant volatiles. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 181-189, 2008.
- ELGERSMA, D. M.; LIEM, J. I. Accumulation of phytoalexins in susceptible and resistant near-isogenic lines of tomato infected with *Verticillium albo-atrum* or *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 34, p. 545-555, 1989
- ERB, M. Belowground ABA boosts aboveground production of DIMBOA and primes induction of chlorogenic acid in maize. **Plant Signal Behav.** v. 4, p. 636–638, 2009.
- ERB, M.; FLORS, V.; KARLEN, D.; et al. Signal signature of aboveground-induced resistance upon belowground herbivory in maize. **The Plant Journal**, v. 59, p. 292-302, 2009.
- ERB, M., et al. Indole is an essential herbivore-induced volatile priming signal in maize. **Nature communications**, 2015.
- FERNANDES, C. F. et al. Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos. Embrapa Rondônia, 14 p, 2009. (Documentos / Embrapa Rondonia, 0103-9865; 133).
- FALCO, M.C., et al. Mechanisms of sugarcane response to herbivory. **Genet. Mol. Biol.**, v. 24, n. 1-4, 2001
- FEENY, P. Plant apparency and chemical defense. Pages 1-40 in **Biochemical interaction between plants and insects**. Springer, 1976.
- FENEMORE, P. G. Host-plant location and selection by adult potato moth, *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera, Gelechiidae) - a review. **J. Insect Physiol.** v. 34, p. 175–177, 1988.
- FIDANTSEF, A. L.; STOUT, M. J.; THALER, J. S. et al. Signal interactions in pathogen and insect attack: expression of lipoxygenase, proteinase inhibitor II and pathogenesis-related protein P4 in the tomato, *Lycopersicon esculentum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 54, p. 97-114, 1999.

FIGUEIREDO, P. Breve história da cana-de-açúcar e do papel do Instituto Agrônomo no seu estabelecimento no Brasil. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M. de; LANDELL, M.G. de A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, p.31-44, 2012.

GALLO, et al. Entomologia Agrícola. Piracicaba: FEALQ. p. 920, 2002.

GARCIA, A.A.F. Development of an integrated map of a sugarcane (*Saccharum* spp.) commercial cross, based on a maximum-likelihood approach for estimation of linkage and linkage phases. **Theoretical Applied Genetics**, v. 112, n.2, p. 298-314, 2006.

GILBERT, L.E. Ecological consequences of a coevolved mutualism between butterflies and plant. In: GILBERT, L. E.; RAVEN, P. H. (eds) Coevolution of animals and plant. Austin: University of Texas Press, p. 210-240. 1975.

GUAGLIUMI, P. Cigarrinha da raiz. In: GUAGLIUMI, P. (Ed.), Pragas da cana-de-açúcar. Nordeste do Brasil. Rio de Janeiro: **IAA**, p. 69-103. 1973. (Coleção canavieira)

GLAZEBROOK, J. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 280-286, 1999.

Grassl C.O. Problems relating to the origin of wild and cultivated *Saccharum*. *Indian J. sugarcane Res.* v. 8, p. 106– 116, 1974.

GRECO, N.M.; SARANDON, S.J.; PEREYRA, P.C. Parasitismo *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) eggs by *Trichogramma exiguum* (Hymenoptera, Tricogrammatidae): influence of *Zea mays* leaf pubescence. **Ecologia** I, v.8, n.1, p.31-35, 1998.

GREEN, T.R. RYAN, C.A. Wound-induced proteinase inhibitors from tomato leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science*, v. 175, p. 776-777, 1972.

GRISALES, L. F. P. Resposta de *Cotesia flavipes* a voláteis de plantas de cana-de-açúcar atacadas ou não por *Diatraea saccharalis*. Tese (mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, 2013.

GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 122-127, 2002

GOUGHUENE, 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, 2001.

GUO, B.Z. BUTRON, A. SCULLY, B.T. Maize silk antibiotic polyphenol compounds and molecular genetic improvement of resistance to corn earworm (*Helicoverpa zea* Boddie) in *sh2* sweet corn. *Int J Plant Biol, North America*, 2010. Available at: <<http://www.pagepress.org/journals/index.php/pb/article/view/pb.2010.e3>> Data de acesso: 09 Jun 2016.

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.

HEMBERGER, M.; CROSS, J. C.; ROPERS, H. H. et al. Unigene cDNA arraybased monitoring of transcriptome changes during mouse placental development. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 98, p. 13126-13131, 2001.

HILKER, M.; MEINERS, T. Early herbivore alert: insect eggs induce plant defense. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, n. 7, p. 1379-1397, 2006.

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

HODKINSON, T.R. Phylogenetics of *Miscanthus*, *Saccharum* and related genera (Saccharinae, Andropogoneae, Poaceae) based on DNA sequences from ITS nuclear ribosomal DNA and plastid trnL intron and trnL-F intergenic spacers. **Journal of Plant Research**, v. 115, n. 5, p. 381-392, 2002

HORGAN, F. G., et al. Variable responses of tuber moth to the leaf trichomes of wild potatoes. *Entomol. Exper.*, v. 125, p. 1–12, 2007.

HOUNTONDI, Y. C.; SOKPON, N.; OZER, P. Analysis of the vegetation trends using low resolution remote sensing data in Burkina Faso. **International Journal of Remote Sensing**, v.27, n.5, p.871-884, 2005.

HOWE, G. A., et al. An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. **The Plant Cell**, v. 8, p. 2067-2077, 1996.

JADOSKI, C.J. et al. Fisiologia do desenvolvimento do estágio vegetativo da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). *Pesquisa Aplicada e Agrotecnologia*. V. 3, n.2, p.169-179, 2010,

JANSSEN, A., M. W. SABELIS; J. BRUIN. Evolution of herbivoreinduced plant volatiles. **Oikos**, v. 97, p. 134-138, 2002.

JONCZYK, R., 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, J. D.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, p. 323-329, 2006.

JOSHI, S.. VIRAKTAMATH, C.A. The sugarcane woolly aphid, *Ceratovacuna lanigera* Zehntner (Hemiptera: Aphididae): its biology, pest status and control. **Current Science**, v. 87, p. 307–316, 2004.

- JUNG, H. W.; HWANG, B. K. Isolation, partial sequencing and expression of pathogenesis-related cDNA genes from pepper leaves infected by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 13, p. 136-142, 2000.
- KARBAN, R. Costs and benefits of induced resistance and plant density for a native shrub, *Gossypium thurberi*. **Ecology**, v. 74, p. 9-19, 1993.
- KARBAN, R.; BALWIN, I.T. Induced responses to herbivory. Chicago: University, 1997.
- KARLSSON, M. F.; BIRGERSSON, G.; PRADO, A. M. C.. Plant odor analysis of potato: response of Guatemalan moth to above- and belowground potato volatiles. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 5903–5909, 2009.
- KIM, J.; HARTEK, K.; THEOLOGIS, A. Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 94, p. 11786-11791, 1997.
- 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.
- KORTH, K. L.; DIXON, R. A. Evidence for chewing insect-specific molecular events distinct from a general wound response in leaves. **Plant Physiology**, v. 115, p. 1299-1305, 1997.
- KUÉ, J. Phytoalexins. Annual Review of Phytopathology, **Palo Alto**, v. 10, p. 207-232, 1972
- LANDELL, M.G.; BRESSIANI, J.A. Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M. de; LANDELL, M.G. de A. Cana-de-açúcar. Campinas: IAC, p. 101-156, 2010.
- LANGE, E.S. Insect and pathogen attack and resistance in maize and its wild ancestors, the teosintes. **New Phytologist**. v. 204. p. 329-341, 2014.
- LEISS, et al. Identification of Chlorogenic Acid as a resistance factor for thrips in chrysanthemum. **Plant Physiology**. v. 150, p. 1567-1575, 2009.
- LIGOR, T. GÓRECKA H., BUSZEWSKI B. Sorbents Trapping Organic Pollutants From Air. **International Journal of Occupational Safety and Ergonomics**. v.4, n.2, 1998
- LIMA FILHO, M.; LIMA, J.O.G. Massa de ovos de *Diatrea saccharalis* (Fabri) (Lepoptera: Pyralide) em cana-de-açúcar: número de ovos e porcentagem de parasitismo por *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em condições de campo. *Apud* PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M; CORREA-FERREIRA, B.S; BENTO, J.M.S. Controle Biológico no Brasil: Parasitoides e Predadores. Ed. Manole, SP. p. 609, 2001.

LOPES, M. T.R.; VENDRAMIM, J. D.; THOMAZINI, A. P.B.W..Biologia e preferência para oviposição de *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae) em folhas de genótipos de *Solanum tuberosum* (L.) e *Solanum berthaultii* (Hawkes). **An. Soc. Entomol. Bras.** v. 29, n.2, p.319-326, 2000.

LOUGHRIN, J. H., et al. Volatiles emitted by different cotton varieties damaged by feeding beet armyworm larvae. **Journal of Chemical Ecology.** v. 21, p. 1217-1227, 1995.

LUCAS, P.W.; TURNER, I.M.; DOMINY, N.J.; YAMASHITA, N. Mechanical defences to herbivory. **Annals of Botany**, v. 86. n.5, p. 913-920, 2000.

MA, R., et al. Activation of defense mechanism in wheat by polyphenol oxidase from aphid saliva. **J. Agr. Food Chem.**, vol. 58, p. 2410, 2010.

MACDONALD, K.P.; BACH, C.E. Resistance and tolerance to herbivory in *Salix cordata* affected by different environmental factors. **Ecological Entomology**, v. 30, n. 5, p. 581-589, 2005.

MANDAL, S. Induction of phenolics, lignina and key defense anzymes in eggplant (*solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. **African Journal of Biotechnology** V. 9(47), p. 8038-8047, 22 November, 2010

MANTYLA, E., et al. From plants to birds: higher avian predation rates in trees responding to insect herbivory. **Plos one**, v. 3, p. 1-8, 2008.

MARAFANTE, L. J. Tecnologia da fabricação do álcool e do açúcar. São Paulo: Ícone, p. 148, 1993.

MARTINS, D.O. Estudo do controle de emissões de compostos orgânicos voláteis em tanques de armazenamento de produtos químicos. 162f. Dissertação (Gerenciamento e Tecnologias Ambientais no Processamento Industrial) – Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Federal da Bahia, Salvador. 2004.

MASANTE-ROCA et al. Attraction of the grapevine moth to host and non-host plant parts in the wind tunnel: effects of plant phenology, sex, and mating status. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 122, p. 239-245, 2007.

MASSIMO, E. M.; GEN-ICHIRO, A.; AXEL, M. Natural elicitors, effectors and modulators of plant responses, **Nat. Prod. Rep.**, v. 29, p. 1288-1303, 2012.

MASSON, C.; et al. Chemical information processing in the olfactory system of insects. **Physiological reviews.** v. 70, p 199-245, 1990.

MATTA A, FERRARIS L, ABBATTISTA GI. Variations of phenoloxidase activities and the consequence of stress induced resistance to *Fusarium* wilt of tomato. **J Phytopathol**, v. 122, p. 45–53, 1988.

MATTIACCI, L.; DICKE, M.; POSSHUMUS, M. A. beta-Glucosidase: an elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps. **Proc. Natl. Acad.** v. 92, p. 2036, 1995;

MAYORAL et al. A high performance liquid chromatography method for quantification of Diboal, DIMBOA, and MBOA from aqueous extracts of corn and winter cereal plants. **Journal of Liquid Chromatography**. v. 17, 12, 1994

McGURL, B.; PEARCE, G.; OROZCO-CARDENAS, M. et al. Structure, expression and antisense inhibitor of the systemin precursor gene. **Science**, v. 255, p. 1570-1572, 1992.

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

MELO, A.B.P. Biologia da *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1974) (Lepidoptera: Pyralidae) em diferentes temperaturas para determinação das exigências térmicas. Tese (Mestrado) – Escola superior de agricultura de agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 1984

MELLO, M. O.; SILVA-FILHO, M. C. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 14, p. 71-81, 2002.

MENDONÇA, A. F. Guia das principais pragas da cana-de-açúcar In MENDONÇA, A.F. (Ed.). Pragas da cana-de-açúcar. Maceio: Insetos & Cia, p. 3-48, 1996.

MESQUITA, F.L.T., et al. Influence of *Saccharum officinarum* (Poales: Poaceae) variety on the reproductive behavior of *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae) and on the attraction of the parasitoid *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). **Florida Entomologist**, v.94, p.420-427, 2011.

MYSORE, K.S.; RYU, C. Nonhost resistance: how much do we know? **Trends in Plant Science**, v. 9(2), p. 97-104, 2004.

MORAES, R. F. O. Categorias e mecanismos de resistência de genótipos de couve a *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). 2014. 96 f. Dissertação (mestrado em agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, 2014.

MORÉ, M.; TRUMPER, E.V.; PROLA, M.J. Influence of corn, *Zea mays*, phenological stages in *Diatraea saccharalis* F. (Lep. Crambidae) oviposition. **Journal of Applied Entomology**, v.127, n.9-10, p.512-515, 2003.

MOURA, D. S.; RYAN, C. A. Wound-inducible proteinase inhibitors in pepper. Differential regulation upon wounding, systemin, and methyl jasmonate. **Plant Physiology**, v. 126, p. 289-298, 2001.

NAIDU, K.M.; SREENIVASAN, T.V. Conservation of sugarcane sugarcane germplasm. In: COOPERSUCAR INTERNATIONAL BREEDING WORKSHOP: COOPERSUCAR TECHNOLOGY CENTER. Piracicaba: Coopertiva de produção de cana, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo, p. 33, 1987.

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.

NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, H. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 30, p. 369-389, 1992.

OLIVEIRA, C. M.; AUAD, A. M.; MENDES, S. M.; FRIZZAS, M. R. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. *Crop Protection*, v. 56, p. 50- 54, 2014.

OMETTO, A. R. Discussão sobre os fatores ambientais impactados pelo setor sucroalcooleiro e a certificação socioambiental. São Carlos, SP. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. 2000.

PANGE, R.R. *Saccharum spontaneum* L. A comparative study of the forms grown at the imperial Sugarcane Breeding Station, Coimbatore. **Indian Journal of Agriculture Science**, v.3, n.1, p.1-10, 1933

PANNUTI, L. E. R. Incidência de *Diatraea saccharalis* Fabr., 1794 (Lepidoptera: Crambidae) e *Mahanarva fimbriolata* Stal, 1854 (Hemiptera: Cercopidae), produtividade e qualidade tecnológica da cana-de-açúcar em função da irrigação e da fertilização nitrogenada. 2012. 89 f. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas)- Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2012.

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, M.C.; LEITE, G.L.D.; MADEIRA, N.R.; et al. Efeito do tutoramento do tomateiro e seu policultivo com milho no ataque de *Scrobipalpus absoluta* e *Helicoverpa zea* no tomateiro. *Anais da sociedade Entomológica do Brasil* 25:175-180, 2010.

PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, v. 311, p. 808-811, 2006.

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

PINTO, A. de S., et al. Guia Ilustrado de Pragas e Insetos Benéficos do Milho e Sorgo. Ribeirão Preto: ESALQ, p. 34-37, 2004.

PRICE, P.W. Insect Ecology. Ed. 2 New York, Wiley, 1984.

PROFFIT, M., G., et al. Attraction and Oviposition of *Tuta absoluta* Females in Response to Tomato Leaf Volatiles. **J Chem Ecol**, v. 6, p. 565–574, 2011.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B; PINTO, C.A.B.P. 2001. Genética na agropecuária. 2.ed. Lavras: Editora UFLA. p. 472, 2001.

RAMASWAMY, S.B. Host finding by moth: sensory modalities and behaviours. **Journal of Insect Physiology**, v. 34, n.3, p.235-249, 1988.

RASMANN S, KÖLLNER TG, DEGENHARDT J, et al. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. **Nature**, v. 434(7034), p. 732–737, 2005.

RAO, J.T.; BABU, C.N. Chromosome numbers in *Saccharum spontaneum* L., **Current Science**, v. 24, n.1, p.53-54, 1955.

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

RIFFEL, A.; COSTA, J. G. Os voláteis de plantas e o seu potencial para a agricultura. Aracaju : Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2015. 48 p. (Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1678-1953; 201). Disponível em: www.bdpa.cnptia.embrapa.br. Acesso em: maio, 2016

RODRÍGUEZ-SAONA, C. et al. *Lygus hesperus* feeding and salivary gland extracts induce volatile emissions in plants. **Chem. Ecol.**, v. 28, p. 1733, 2002.

ROSSETTO, R.; SANTIAGO, A. D. Árvore do Conhecimento: plantio da cana-de-açúcar. 2007. Disponível em: < http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-deacucar/arvore/CONTAG01_33_711200516717.html>. Acesso em: abril, 2016.

RUNYON J. B., MESCHER M. C., DE MORAES C. M. Volatile chemical cues guide host location and host selection by parasitic plants. **Science** v. 313, p. 1964–1967, 2006

SANDOVAL, S.S.; SENÔ, K.C.A. Comportamento e controle da *Diatraea saccharalis* na cultura da cana-de-açúcar. **Nucleus**, v.7, n.1, abr. 2010

SANTOS, J. M. dos., et al. Genetic diversity of the main progenitors of sugarcane from the RIDESA germplasm bank using SSR markers. **Industrial Crops and Products** v. 40, p. 145–150, 2012.

SCHENK, P. M.; KAZAN, K.; HELLER, R. et al. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 97, p. 11655-11660, 2000.

SCHIRMER, W.N.; LISBOA, H.M. Química da Troposfera: constituintes naturais, poluentes e suas reações. **TECNOLOGICA** Santa Cruz do Sul, v. 12 n. 2, p. 37-46, 2008.

SCHITTKO, U.; HERMSMEIER, D.; BALDWIN, I. T. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuate* II. Accumulation of plant mRNAs in response to insect-derived cues. **Plant Physiology**, v. 125, p. 701-710, 2001.

SCHNEE, C., T. G., et al. The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 1129-1134, 2006.

SCHULTZ N., et al. Urquiaga S. Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. **R Bras Ci Solo.**, v. 38, p. 359-71, 2014.

SCHWEIZER, P.; BUCHALA, A.; METRAUX, J. Gene-expression patterns and levels of jasmonic acid in Rice treated with the resistance inducer 2,6-dichloroisonicotinic acid. **Plant Physiology**, v. 115, p. 61-7, 1997.

SEGATO, S. V.; MATTIUZ, C. F. M.; MOZAMBANI, A. E. Aspectos fenológicos da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V.; Pinto, A. S.; Jendiroba, E. Nóbrega, J. C. M. (org.) Atualização em produção de cana-de-açúcar. Piracicaba: CP 2, p. 19-36, 2006.

SEGATO, S. V., et al. (organizadores) Atualização em cana-de-açúcar. Piracicaba: CP2, 415 p., 2006.

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. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. p. 189, 1979.

SIGNOTTI, A.G.C. Identificação de voláteis de planta de citros em potencial para uso no manejo integrado de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae); Identification of volatiles from citrus plants with potential for use in integrated management of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). 2015. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de São Paulo. São Paulo, 2015)

SILVA-FILHO, M. C.; FALCO, M.C. Interação planta-inseto: adaptação dos insetos aos inibidores de proteinase produzidos pelas plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 2(12), p. 38-42, 2000.

- SILVA FILHO, B.F. Análise da resposta ecológica da cana-de-açúcar (*Saccharum* sp) em resposta à herbivoria por *Diatraea saccharalis*. 2014. 101 f. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2014.
- SILVA-NETO, H. F., et al. Porcentagem de sacarose aparente e potencial produtivo de açúcar em cultivares de cana. **Scientia Agropecuaria**, v. 5, p. 53 – 58, 2014.
- SING, U.P.; SARMA, B.K.; SINGH, D.P.; Amar Bahadur. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-Mediated Induction of Phenolics in Pea (*Pisum sativum*) After Infection with *Erysiphe pisi*. **Current microbiology** v. 44, p. 396–400, 2002.
- SOLECKA, D. Role of phenylpropanoid compounds in plant responses to different stress factors. **Acta Physiol Plant**. v.19, p. 257–268, 1997.
- SOUZA, J.RL, et al. Genetic divergence of sugar cane cultivars for resistance to *Diatraea saccharalis*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, p. 3367-3376, 2013.
- SOSA JR, O. Oviposition preference by the sugarcane borer (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**, v.83, n.3, p.866–868, 1990.
- SOSA JR, O. Pubescence in sugarcane as a plant resistance character affecting oviposition and mobility by the sugarcane borer (Lepidoptera; Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**, v.81, n.2, p.663-667, 1988.
- SOUZA, J.RL, et al. Genetic divergence of sugar cane cultivars for resistance to *Diatraea saccharalis*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, p. 3367-3376, 2013.
- SOUZA, B. H. S. Fatores e mecanismos que influenciam a resistência em soja a *Anticarsia gemmatalis* Hübner e *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). 2014. 142 f. Tese (Doutorado em agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticaba, 2014.
- SPITELLER, D., BOLAND, W.; Identification and synthesis of (17S)-N-(17-acyloxyacyl)-glutamine; novel surfactants from oral secretions of lepidopteran larvae. **J. Org. Chem**. v. 68, p. 8743-8749, 2003.
- SRIKANTH, J.; SUBRAMONIAN, N.; PREMACHANDRAN, M. Advances in transgenic research for insect resistance in sugarcane. **Tropical Plant Biology**, v. 4, p. 52–61, 2011.
- STENBERG et al. Optimizing Crops for Biocontrol of Pests and Disease. **Trends in Plant Science**, 2015
- STEVENSON, G.C. Genetics and breeding of sugar cane. London: Longmans, 1965. 284p., 1965.
- STEVENSON. P.C. et al. Developmental inhibition of *Spodoptera litura* (Fab.) larvae by a novel caffeoylquinic acid from the wild groundnut, *Arachis paraguariensis* (Chod et Hassl.). **J.Chem. Ecol.**, v. 19, p. 2917, 1993.

STOESSL, A. Secondary Plant Metabolites in Preinfectious and Postinfectious Resistance; Bailey, J. A., Deverall, B. J., Eds.; Academic: New York; Chapter 3, pp 71-122. 1983.

STOUT, M. J.; FIDANTSEF, A. L.; DUFFEY, S. S. et al. Signal interactions in pathogen and insect attack: systemic plant mediated interactions between pathogens and herbivores of the tomato, *Lycopersicon esculentum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 54, p. 115-130, 1999.

SUINAGA, Fábio A.; CASALI, Vicente W.D.; PICANCO, Marcelo C. and SILVA, Derly J.H. da. Capacidade combinatória de sete caracteres de resistência de *Lycopersicon* spp. à traça do tomateiro. **Hortic. Bras.** 2004, v.22, n.2, p.242-248, 2004.

THALER, J. S.; STOUT, M. J.; KARBAN, R. et al. Exogenous jasmonates simulate insect wounding in tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in the laboratory and field. **Journal of Chemical Ecology**, v. 22, p. 1767-1781, 1996.

TERÁN, F.O.; SÁNCHEZ, A.G.; PRECETTI, A.A.C.M. Estudos sobre resistência da cana à broca em telado: primeiros resultados. **Boletim Técnico Copersucar**, v.29, p.2-11, 1985a.

TERÁN, F.O.; SÁNCHEZ, A.G.; PRECETTI, A.A.C.M. Estudos sobre resistência da cana à broca em telado – II. **Boletim Técnico Copersucar**, v.33, p.57-64, 1985b.

TERÁN, F.O.; SÁNCHEZ, A.G.; PRECETTI, A.A.C.M. Estudos sobre resistência da cana à broca em telado – III. **Boletim Técnico Copersucar**, v.34, p.53-60, 1986.

TERÁN, F.O.; SÁNCHEZ, A.G.; PRECETTI, A.A.C.M. Estudos sobre resistência da cana à broca em telado – IV. **Boletim Técnico Copersucar**, v.40, p.9-14, 1988.

THOMPSON, J. N.; PELLMYR, O. Evolution of oviposition behavior and host preference in lepidoptera. **Annu. Rev. Entomol.** . V. 36: p. 65-89, 1991.

TOMAZ, A.C. Genetic divergence and resistance of sugarcane genotypes to *Diatraea saccharalis*. 2014. 46f. Tese (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia. Viçosa, MG. 2014.

TORRES, J. B.; FARIA, C. A.; EVANGELIS, W. S. Within-plant distribution of the leaf miner *Tuta absoluta* (Meyrick) immatures in processing tomatoes, with notes on plant phenology. **International Journal of Pest Management**. v. 47, p. 173-178, 2010

TUMLINSON, J. H.; ENGELBERTH, J. Fatty acid-derived signals that induce or regulate plant defenses against herbivory, p. 389-407. In A. Schaller (ed.), *Induced Plant Resistance to Herbivory*, Springer, 2008.

TURLINGS, T., et al. How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 92, p. 4169-4174, 1995.

VOELCKEL, C.; BALDWIN, I.T. Herbivore-induced plant vaccination. Plant II. Array-studies reveal the transience of herbivore-specific transcriptional imprints and a distinct imprint from atress combinations. **Plant Journal**, v. 38, p.650-663, 2004.

WANG, J.; SHEEHAN, M.; BROOKMAN, H. et al. Characterization of cDNAs differentially expressed in roots of tobacco (*Nicotiana tabacum* cv Burley 21) during the early stages of alkaloid biosynthesis. **Plant Science** v. 158 p. 19-32, 2000.

WAQUIL, J.M., et al. Resistance of commercial hybrids and lines of sorghum, *Sorghum bicolor* (L.) Moench, to *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera; Pyralidae). **Neotropical Entomology**, v.30, n.4, p. 661-668, 2001.

Williams CA, Harborne JB, Smith P. The taxonomic significance of leaf flavonoids in *Saccharum* and related genera. **Phytochemistry**. v. 13, p. 1141–1149, 1974.

Wu, J. et al. A comparison of two *Nicotiana attenuata* accessions reveals large differences in signaling induced by oral secretions of the specialist herbivore *Manduca sexta*. **Plant Physiol.** v. 146, p. 927-39, 2008.

WU, J.; BALDWIN, I.T. New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. **Annual Review of Genetics**, v. 44, p. 1-24, 2010.

YAMASAKI, M.; et al. Mapping of a gene ovicidal to whitebacked planthopper *Sogatella furcifera* Horváth in rice. In: Advances in rice genetics, Los Baños, Laguna, Philippines, 22-27 October 2000. World Scientific Publishing Co. Pte.Ltd, p. 272-274, 2003.

YAN XL; LIAO H; TRULL MC; BEEBE SE; LYNCH JP. Induction of a major leaf acid phosphatase does not confer adaptation to low phosphorus availability in common bean. **Plant Physiology**. v. 125., p. 1901-1911. 2001.

ZARBIN, Paulo H. G., et al. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. *Quím. Nova* [online]. v.32, n.3, pp.722-731, 2009.

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

Apêndices

Apêndice 1 - Espectros de massas e fragmentação do pico da amostra que difere as variedades resistente e suscetível de cana-de-açúcar.

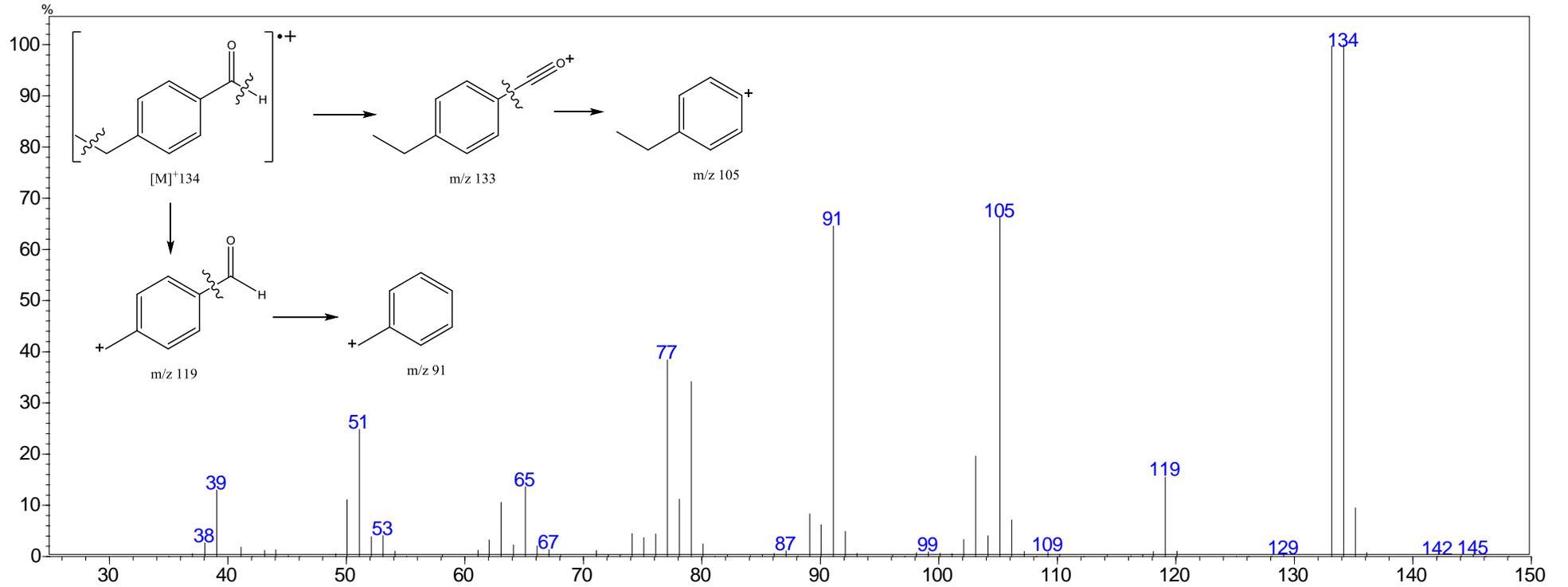
Tempo de retenção
19.3

Composto
4-etilbenzaldeído

Peso molecular
134

Fórmula química
 $C_9H_{10}O$

Índice de retenção
1189



Apêndice 2 - Espectros de massas e fragmentação do pico da amostra que difere as variedades resistente e suscetível de cana-de-açúcar.

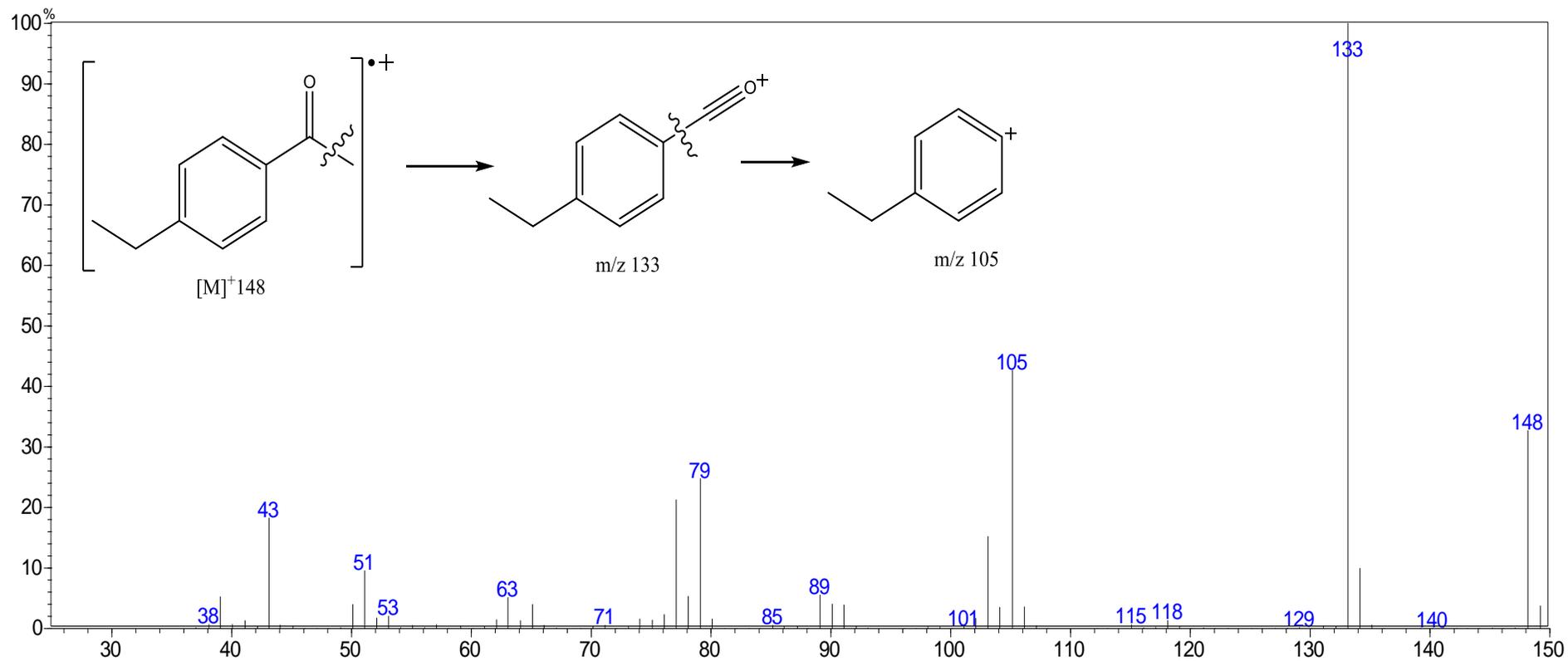
Tempo de retenção
22.58

Composto
4-etilacetofenona

Peso molecular
148

Fórmula química
 $C_{10}H_{12}O$

Índice de retenção
1278



Apêndice 3 - Espectros de massas e fragmentação do pico da amostra que difere as variedades resistente e suscetível de cana-de-açúcar.

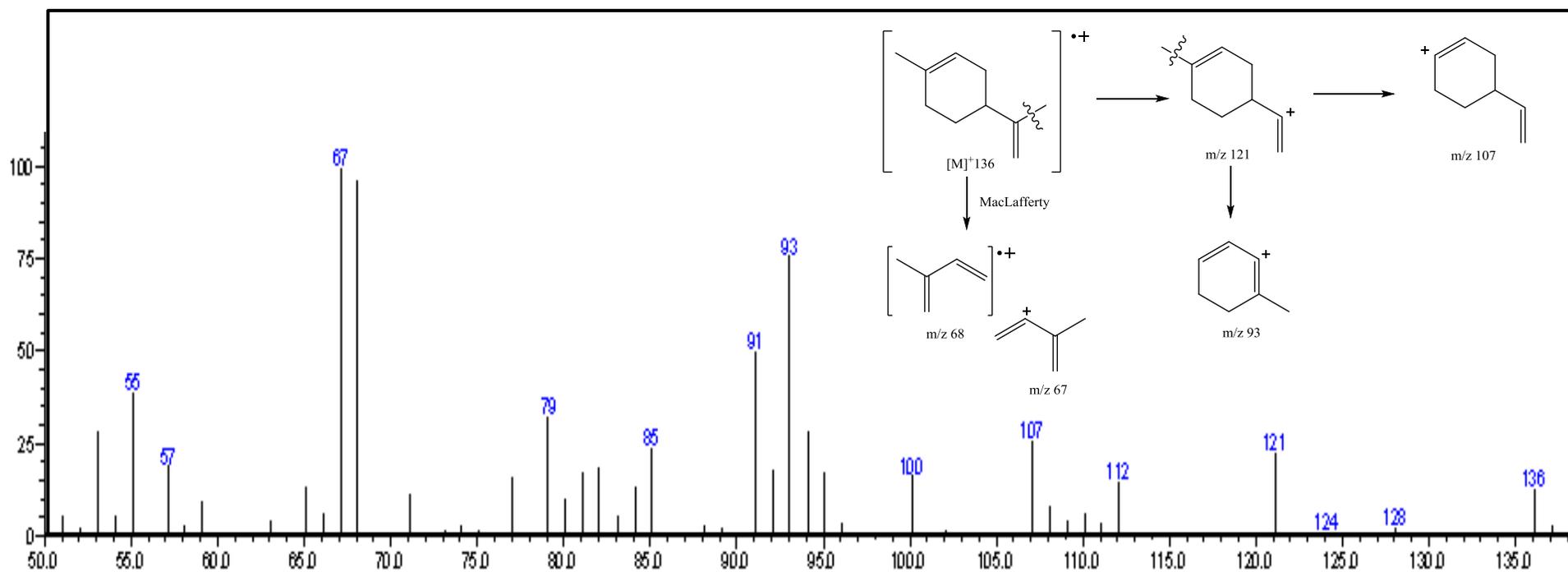
Tempo de retenção
11.68

Composto
Limoneno

Peso molecular
136

Fórmula química
 $C_{10}H_{16}$

Índice de retenção
961



Apêndice 4 - Espectros de massas e fragmentação do pico da amostra que difere as variedades resistente e suscetível de cana-de-açúcar.

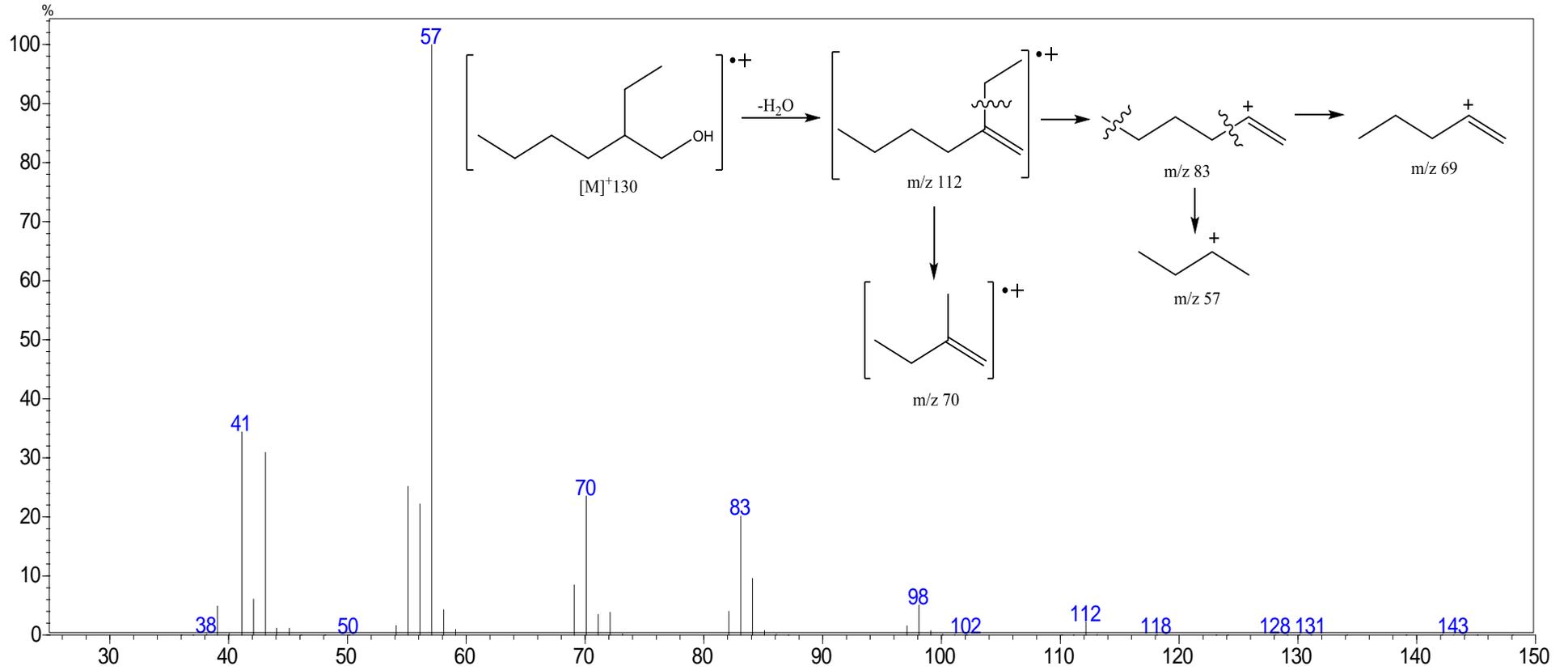
Tempo de retenção
14.23

Composto
2-etil-1-hexanol

Peso molecular
130

Fórmula química
C₈H₁₈O

Índice de retenção
1027



Apêndice 5 - Espectros de massas e fragmentação do pico da amostra que difere as variedades resistente e suscetível de cana-de-açúcar.

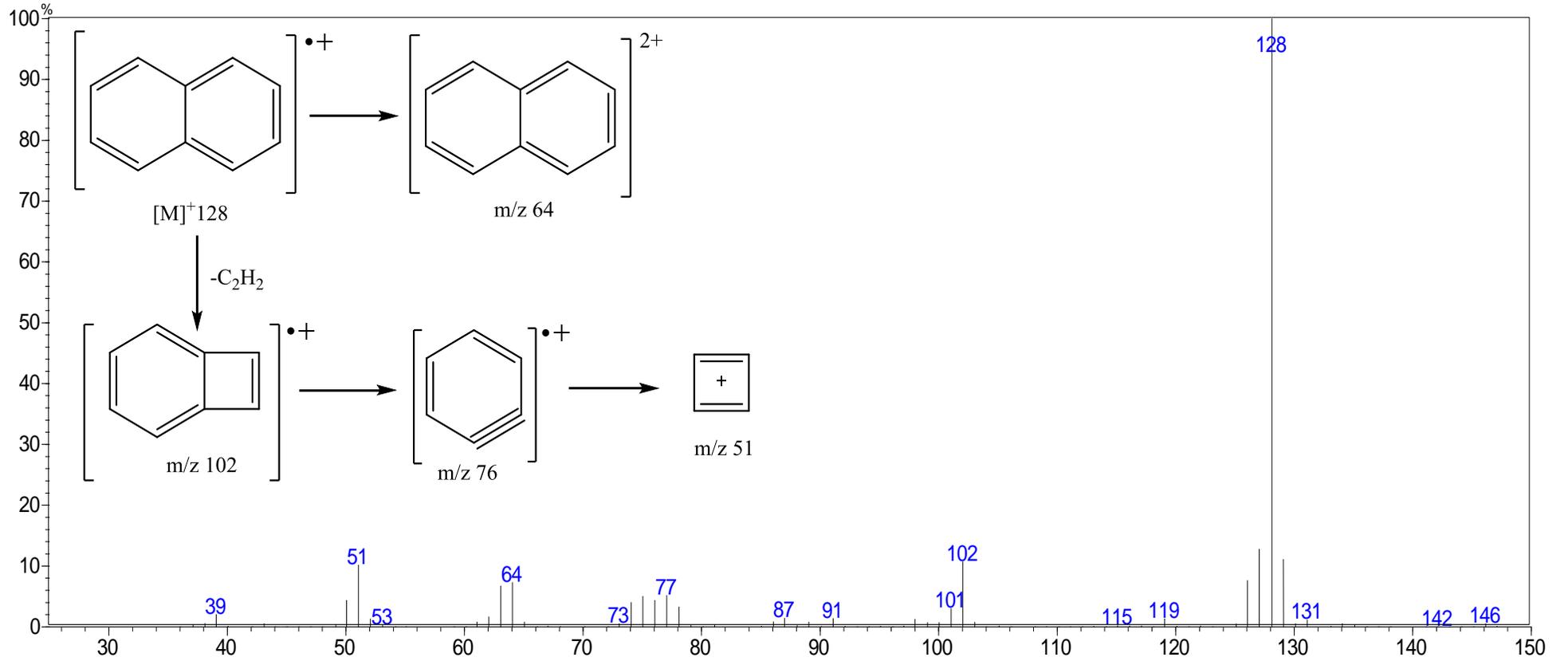
Tempo de retenção
19.54

Composto
Naftaleno

Peso molecular
128

Fórmula química
C₁₀H₈

Índice de retenção
1194



Apêndice 6 - Espectros de massas e fragmentação do pico da amostra que difere as variedades resistente e suscetível de cana-de-açúcar.

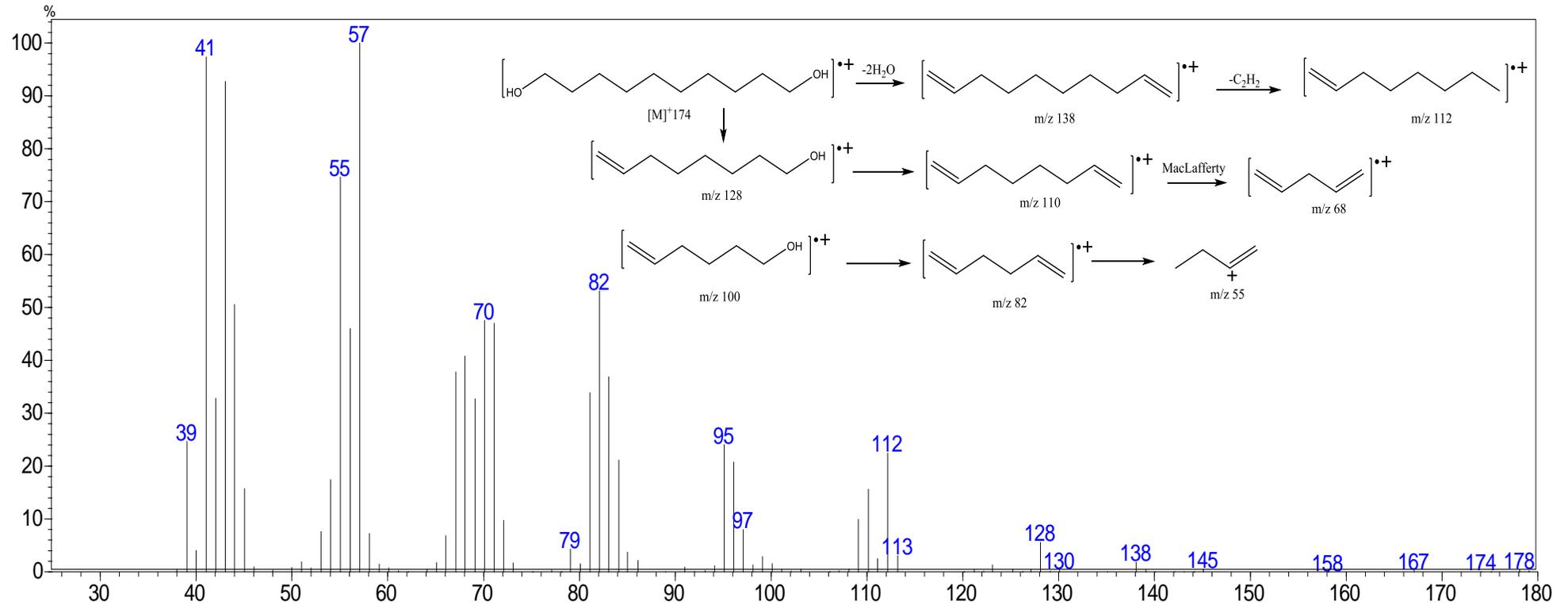
Tempo de retenção
20.22

Composto
1,10-Decanediol

Peso molecular
174

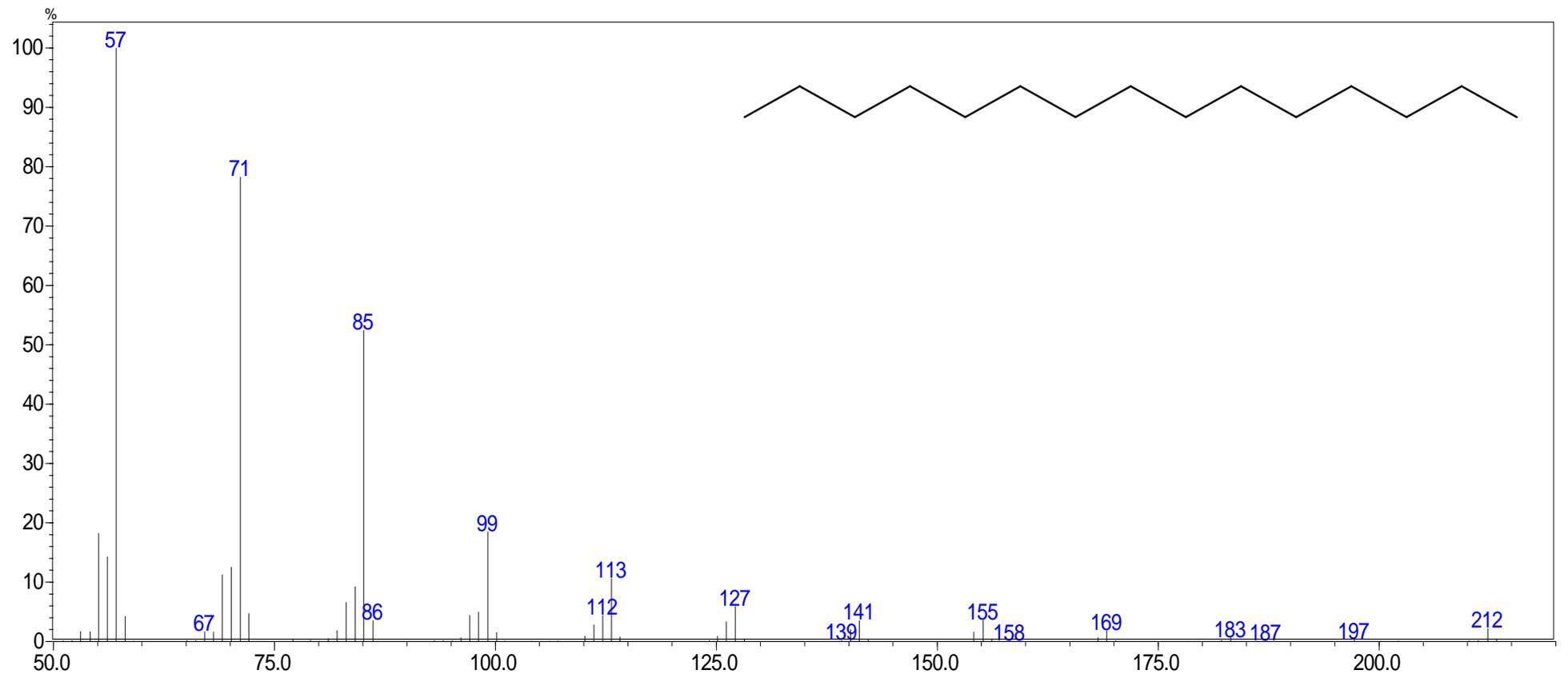
Fórmula química
 $C_{10}H_{22}O_2$

Índice de retenção
1216



Apêndice 7 - Espectros de massas e fragmentação do pico da amostra que difere as variedades de cana-de-açúcar.

Tempo de retenção 28.77	Composto Pentadecano	Peso molecular 212	Fórmula química C ₁₅ H ₃₂	Índice de retenção 1499
-----------------------------------	--------------------------------	------------------------------	---	-----------------------------------



Apêndice 8 - Espectros de massas e fragmentação do pico da amostra que difere as variedades resistente e suscetível de cana-de-açúcar.

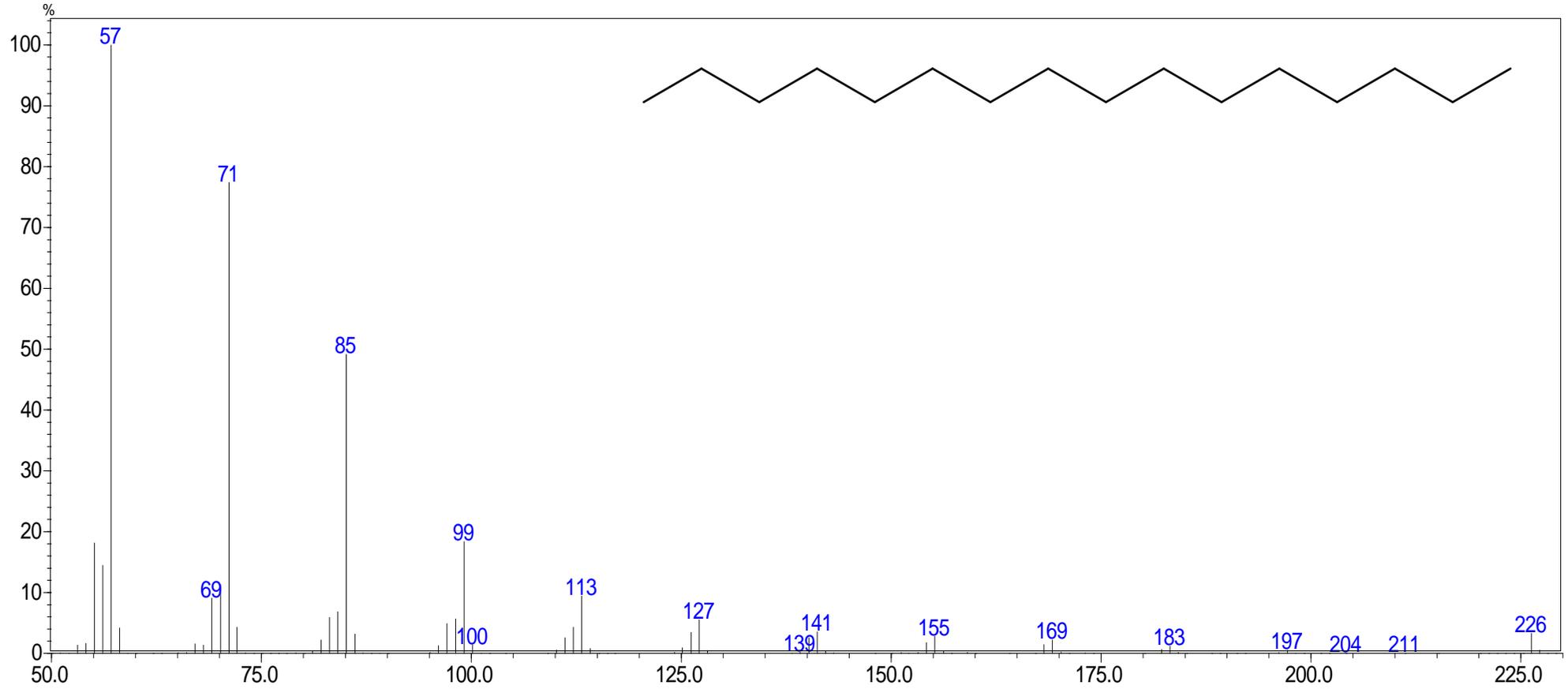
Tempo de retenção
31.35

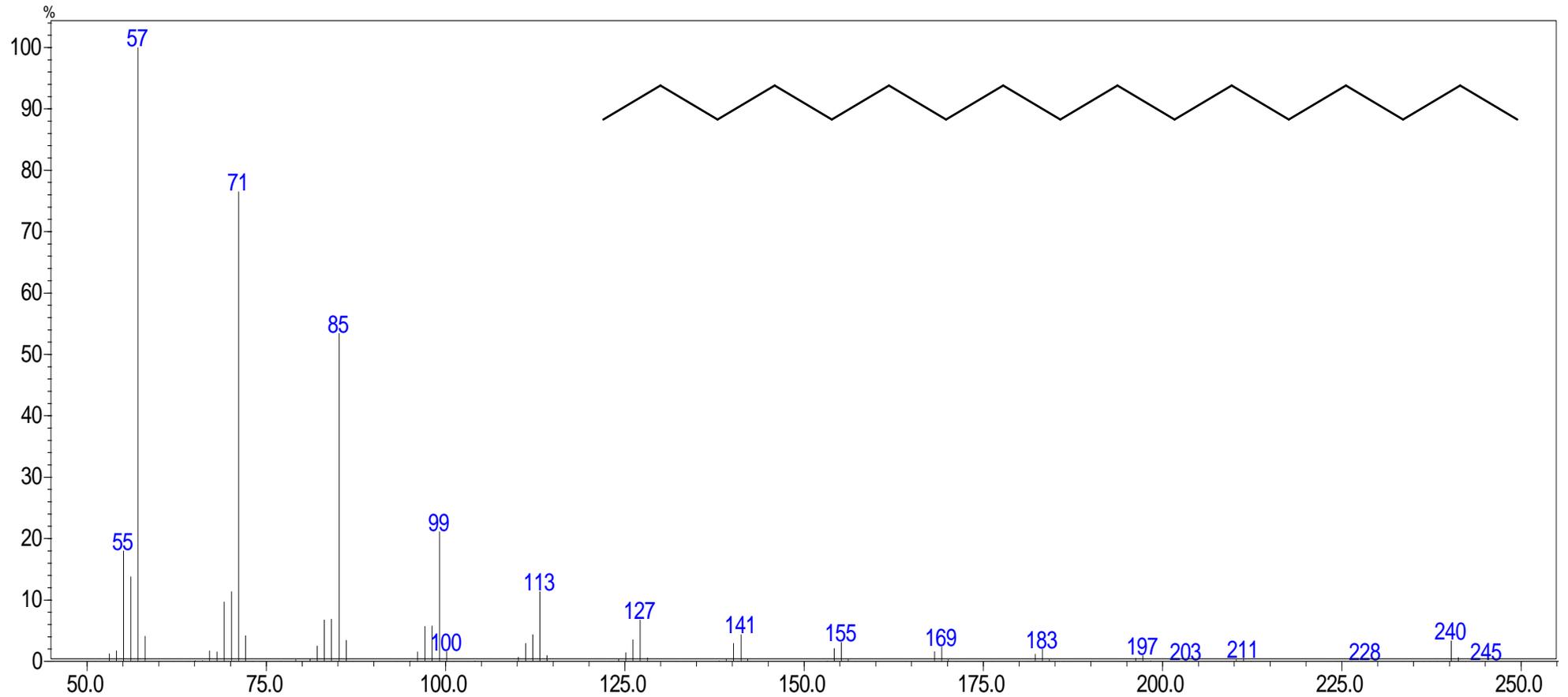
Composto
Hexadecano

Peso molecular
226

Fórmula química
C₁₆H₃₄

Índice de retenção
1599



Apêndice 9 - Espectros de massas e fragmentação do pico da amostra que difere as variedades resistente e suscetível de cana-de-açúcar.**Tempo de retenção**
33.75**Composto**
heptadecano**Peso molecular**
240**Fórmula química**
 $C_{17}H_{36}$ **Índice de retenção**
1699

Apêndice 10 - Espectros de massas e fragmentação do pico da amostra que difere as variedades resistente e suscetível de cana-de-açúcar.

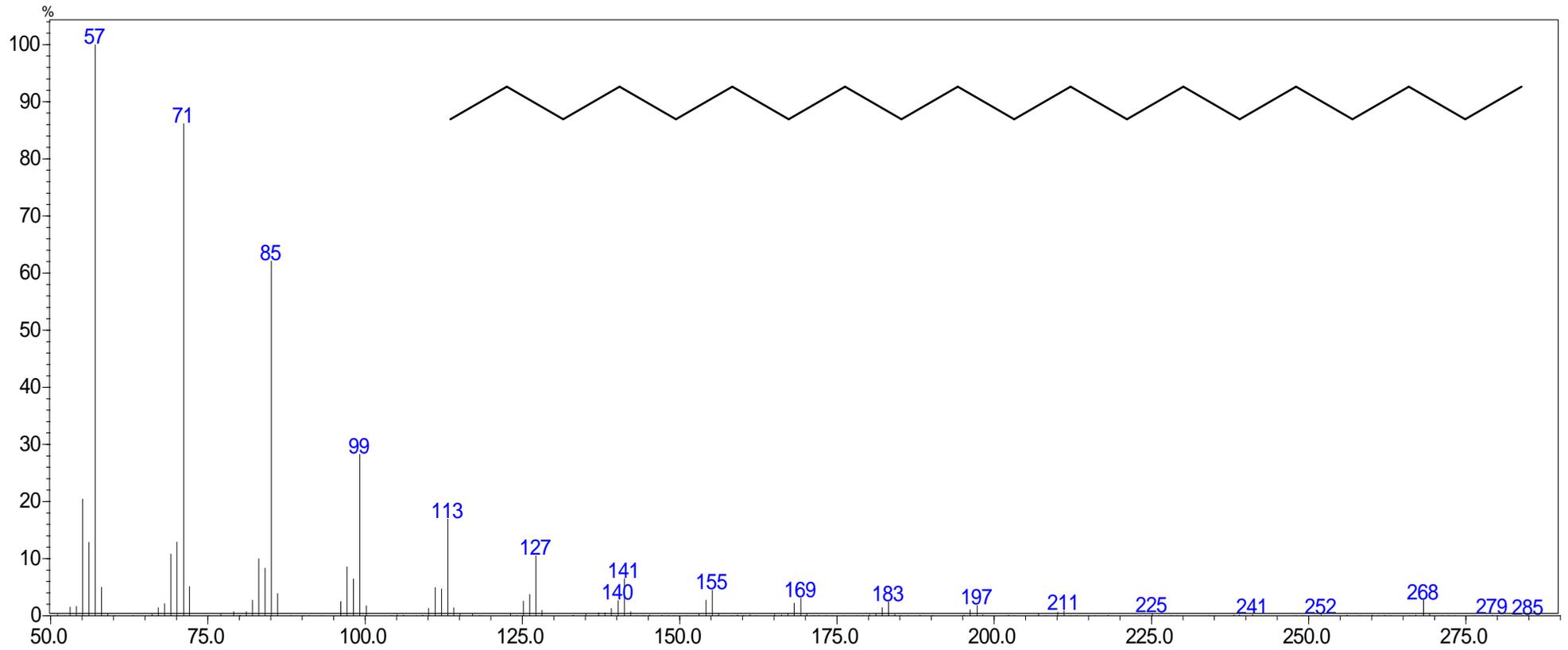
Tempo de retenção
38.23

Composto
Eicosano

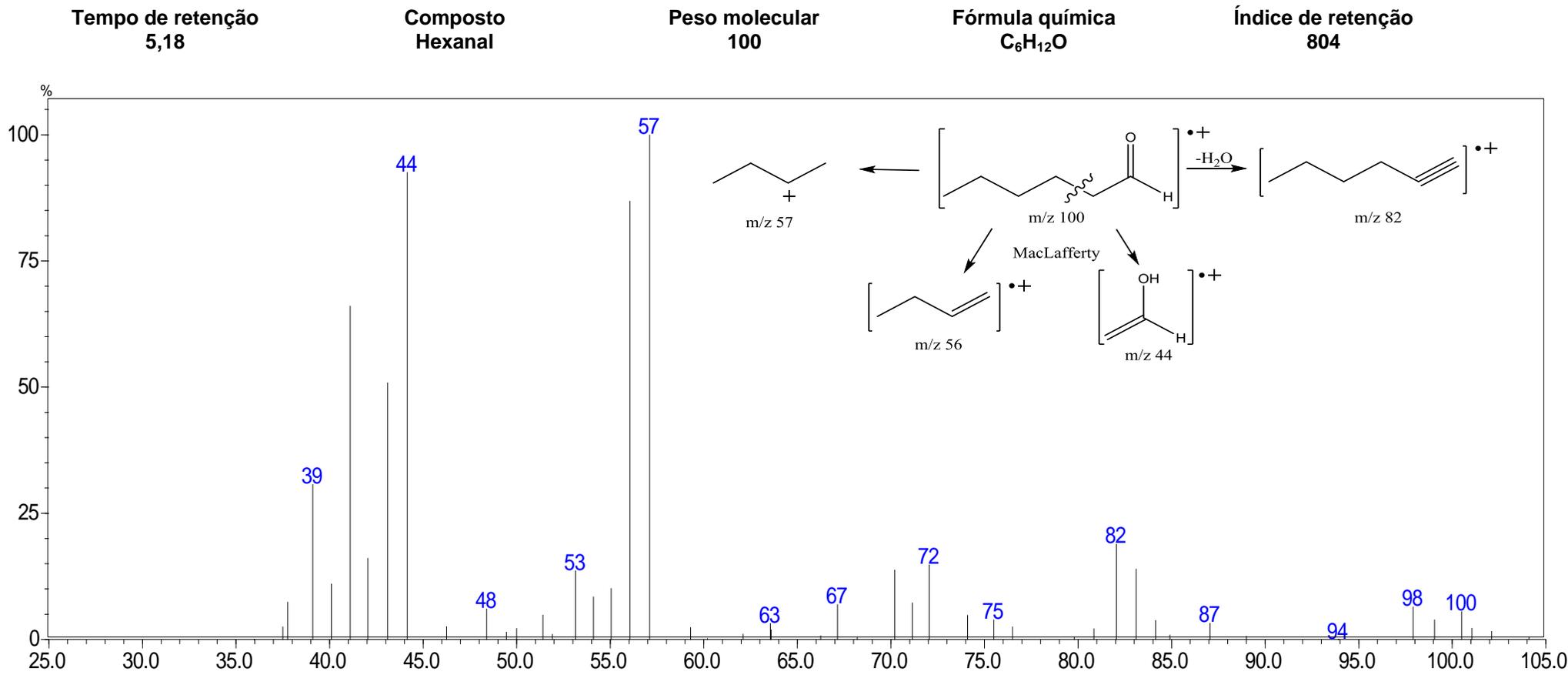
Peso molecular
282

Fórmula química
 $C_{20}H_{42}$

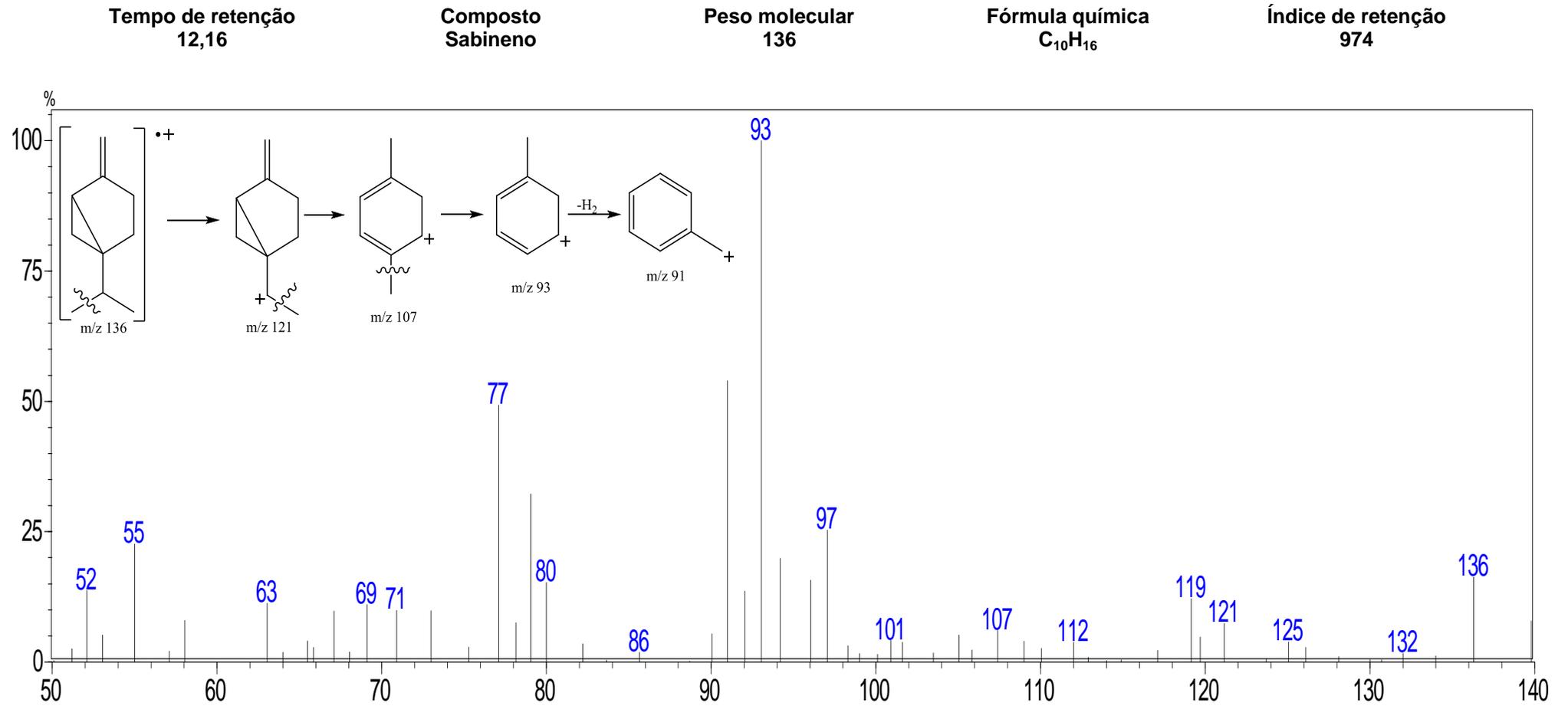
Índice de retenção
1964



Apêndice 11 - Espectros de massas e fragmentação do pico da amostra que difere as variedades de cana-de-açúcar.



Apêndice 12 - Espectros de massas e fragmentação do pico da amostra que difere as variedades de cana-de-açúcar.



Apêndice 13 - Espectros de massas e fragmentação do pico da amostra que difere as variedades de cana-de-açúcar.

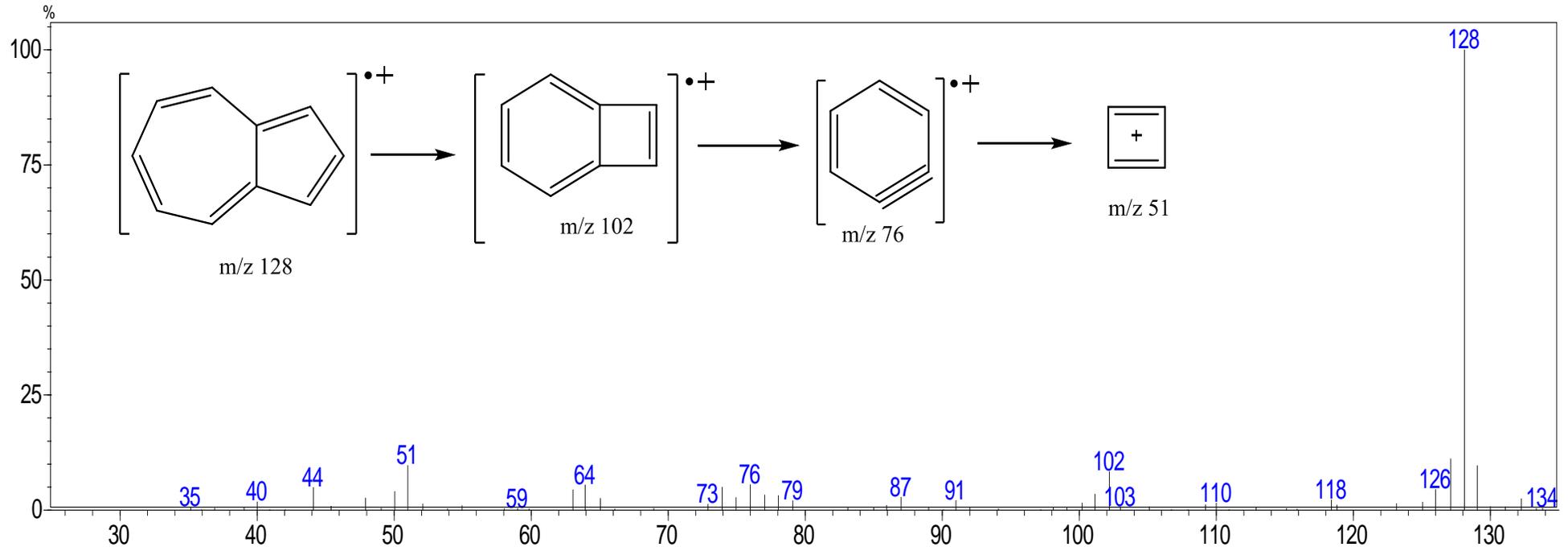
Tempo de retenção
19,09

Composto
Azuleno

Peso molecular
128

Fórmula química
 $C_{10}H_8$

Índice de retenção
1180



Apêndice 14 - Espectros de massas e fragmentação do pico da amostra que difere as variedades de cana-de-açúcar.