

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JULIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IDENTIFICAÇÃO EM CANA-DE-AÇÚCAR DE GENES DE**  
**RESISTÊNCIA A *Mahanarva fimbriolata* (STÅL, 1854)**  
**(HEMIPTERA: CERCOPIDAE)**

**Fabricio Edgar de Moraes**

**Orientador: Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro**

**Co-orientador: Prof. Dr. Miguel Angelo Mutton**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Novembro de 2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

M827i Moraes, Fabricio Edgar de  
Identificação em cana-de-açúcar de genes de resistência a  
*Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) / Fabricio  
Edgar de Moraes. – – Jaboticabal, 2010  
xi, 67 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010  
Orientadora: Maria Inês Tiraboschi Ferro  
Banca examinadora: Lucia Maria Carareto Alves, Marcelo de  
Almeida Silva  
Bibliografia

1. cDNA-AFLP. 2. Cigarrinha-das-raízes. 3. *Saccharum* spp.  
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.61:632.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da  
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus  
de Jaboticabal.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**FABRICIO EDGAR DE MORAES** - nascido em 01 de março de 1980, no município de Itapira - SP, filho de João Edgar de Moraes e Teresinha Rossi de Moraes. Biólogo, graduado em Bacharelado pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) campus de Jaboticabal em dezembro de 2007. Em março de 2008 iniciou o curso de mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) nesta mesma faculdade.

*"Os milagres não acontecem em contradição com a natureza, mas apenas em contradição com o que conhecemos da natureza".*

**Santo Agostinho**

*À Deus e ao Cosmo, por me deixar concluir mais uma etapa de minha vida e pela grande ajuda durante meu caminho.*

*Ao meu Mestre, que me acompanha durante todas as fases da minha vida, com muita dedicação, paciência, carinho e amor.*

*Aos meus pais João Edgar de Moraes e Teresinha Rossi de Moraes, por todo apoio, ajuda, carinho e ensinamentos durante toda minha vida. Amo vocês.*

*Aos meus irmãos Guilherme Edmar de Moraes e Priscila Augusta de Moraes, pelo carinho, amizade, apoio, críticas e ensinamentos. Também Amo vocês.*

*Ao meu bebê Willy que Amo muito.*

*À baixinha que roubou meu coração, que me encontrou na fase mais difícil deste trabalho e conseguiu me aturar durante esta fase estressante. Você é o AMOR da minha vida, meu Chuchuzinho. Te AMO Paulinha.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro**, pela orientação, confiança e paciência.

Ao **Prof. Dr. Miguel Angelo Mutton**, pela co-orientação e a oportunidade de dar continuidade aos experimentos.

Ao **Dr. Eduardo Rossini Guimarães**, pela oportunidade da continuação de seus experimentos.

À **Profa. Dra. Eliana Gertrudes Macedo Lemos**, pela disponibilização do sequenciador para a continuidade deste projeto.

Ao **Dr. Haroldo**, pela ajuda na utilização do sequenciador 377.

À **Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza**, pela disponibilidade e ajuda durante a obtenção dos fragmentos.

Ao **Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro**, pela paciência com minhas dúvidas, sugestões e ensinamentos essenciais para a realização deste projeto.

Ao **Prof. Dr. André Luiz Julien Ferraz (Splinter)**, pela ajuda com minhas dúvidas e pelos ensinamentos de PCR em tempo real.

À **Dra. Karina Maia Dabbas**, pela sua grande contribuição para a execução deste trabalho e paciência com todas minhas dúvidas.

À doutoranda **Daniele Fernanda Revoredo Jovino**, pela ajuda na obtenção das células competentes, clonagem e todas minhas dúvidas.

À doutoranda **Juliana da Silva Vantini**, pelos ensinamentos sobre sequenciamento.

À **Dra. Agda Paula Facincani**, pela paciência com minhas dúvidas frequentes e ensinamentos.

À doutoranda **Gisele Cristina Dedemo** e a **Dra. Flavia Maria de Souza Carvalho**, pela contribuição para a execução deste trabalho.

À **Mônica**, pelas células competentes e ajuda na clonagem.

À **Aline (Space-Fox)**, por me ajudar em várias etapas deste trabalho e entender meus ensinamentos “complexos”.

À **Renata**, pelas sugestões em bioinformática.

À **Elaine**, por me ajudar com minhas dúvidas.

À **Flavinha**, por partilhar os termocicladores.

À todos participantes da banca de qualificação, **Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério Sena** e a **Dra. Karina Maia Dabbas**, pela disponibilidade, sugestões e ensinamentos.

À todos participantes da banca examinadora, **Prof. Dr. Marcelo de Almeida Silva** e a **Profa. Dra. Lúcia Maria Carareto Alves**, pela disponibilidade, sugestões e ensinamentos.

Ao ex-coordenador **Prof. Dr. Dilermando Perecin** e ao atual coordenador **Prof. Dr. Rinaldo Cesar de Paula** e demais professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) pelo atendimento, prontidão e paciência.

À todos os funcionários da **Seção de Pós-Graduação**, pela paciência e disponibilidade.

À todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste **trabalho** e minha formação acadêmica.

À todos os amigos do **LBM**.

Ao **CNPq** e **FAPESP** pela bolsa de mestrado.



## SUMÁRIO

RESUMO.....	x
SUMMARY .....	xi
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
Cana-de-açúcar .....	5
Cigarrinha-das-raízes.....	6
Biologia da cigarrinha-das-raízes.....	7
A praga e a cultura da cana-de-açúcar .....	8
Danos decorrentes do ataque da praga.....	9
Controle da cigarrinha-das-raízes .....	11
Controle físico .....	11
Controle químico.....	11
Controle biológico .....	12
Controle cultural.....	13
Resistência de plantas a insetos.....	14
Antixenose ou não-preferência .....	14
Antibiose .....	15
Tolerância .....	16
cDNA-AFLP.....	17
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
Material vegetal e condições experimentais .....	20
Criação e infestação de ninfas de cigarrinha-das-raízes .....	20
Extração de RNA .....	21
Síntese de cDNA.....	22
cDNA-AFLP.....	23
Preparo das Reações de Restrição .....	23
Anelamento dos Pares de Adaptadores .....	23
Preparo das Reações de Ligação dos Adaptadores após a Restrição .....	24
Amplificação Pré-seletiva.....	24

Reação de Amplificação Seletiva.....	24
Aplicação das Amostras e Eletroforese. ....	25
Teste de iniciadores seletivos.....	26
Análise dos dados do cDNA-AFLP .....	27
Reamplificação do fragmento.....	27
Clonagem.....	28
Sequenciamento .....	28
Análise dos fragmentos exclusivos da variedade resistente .....	29
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	30
Integridade e pureza do RNA extraído.....	30
Teste de Iniciadores Seletivos .....	31
cDNA-AFLP.....	32
V. CONCLUSÕES.....	48
VI. REFERÊNCIAS .....	49

## IDENTIFICAÇÃO EM CANA-DE-AÇÚCAR DE GENES DE RESISTÊNCIA A *Mahanarva fimbriolata* (STÅL, 1854) (HEMIPTERA: CERCOPIDAE)

**RESUMO** - A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma das gramíneas cultivadas mais importantes do mundo e o Brasil é hoje o maior produtor e exportador mundial de cana, de açúcar de cana e etanol de cana, com o estado de São Paulo sendo o maior produtor. Entretanto, esta cultura é ameaçada por várias pragas e doenças. Dentre essas pragas, uma das mais importantes na região centro-sul é a cigarrinha-das-raízes (*Mahanarva fimbriolata*), que assumiu este posto devido ao aumento da colheita mecanizada. Por meio da técnica de cDNA-AFLP este trabalho teve como objetivo identificar genes possivelmente envolvidos na resistência a ninfas de *Mahanarva fimbriolata* em cana-de-açúcar. Para isso, foi utilizada uma variedade suscetível (SP80-1816) e uma resistente (SP83-5073). Ambas foram infestadas com ninfas da cigarrinha 77 dias após o plantio e amostras de raízes foram coletadas antes da infestação (controle) e 1, 2 e 7 dias após a infestação, posteriormente foi feita a extração de RNA, síntese de cDNA e o cDNA-AFLP. Após a análise dos fragmentos foram encontrados 16 fragmentos expressos somente na variedade resistente. Nove fragmentos foram encontrados no 2º dia de infestação e sete no 7º dia. Dentre os 16 fragmentos, sete foram recuperados e sequenciados. Seis fragmentos não apresentaram homologia com proteínas já descritas e um fragmento, de 129 pb, apresentou homologia com uma proteína putativa associada à senescência. Todos os fragmentos podem representar genes relacionados com a resistência da planta contra o inseto.

**Palavras-chave:** cDNA-AFLP; cigarrinha-das-raízes; *Saccharum* spp; resistência a pragas, senescência.

**IDENTIFICATION OF SUGARCANE GENES INDUCED IN PEST-RESISTANT  
VARIETY UPON INOCULATION WITH *Mahanarva fimbriolata* (STÅL, 1854)  
(HEMIPTERA: CERCOPIDAE)**

**SUMMARY** - The sugarcane (*Saccharum* spp.) is the most important grass cultivated in the world and Brazil is now the world's largest producer and exporter of sugarcane, sugarcane sugar and sugarcane ethanol, with the São Paulo state being the largest producer. However, this culture is threatened by several pests and diseases. Among these pests, one of the most important in south-central region is the froghopper-roots (*Mahanarva fimbriolata*), that took this position because of increased mechanization. Through cDNA-AFLP technique this study aimed to identify genes possibly involved in resistance to nymphs of *Mahanarva fimbriolata* in sugarcane. Therefore we used a susceptible variety (SP80-1816) and a resistant (SP83-5073). Both were infested with spittlebugs 77 days after planting and root samples were collected before infestation (control) and 1, 2 and 7 days after infestation, was later made the extraction of RNA, cDNA synthesis and cDNA-AFLP. After fragments analyses were found 16 fragments expressed only in the resistant variety. Nine fragments were found on day 2 of infection and seven on day 7. Among the 16 fragments, seven were recovered and sequenced. Six fragments showed no homology to described proteins and a fragment of 129 bp showed homology to a putative protein associated with senescence. All fragments could represent genes related to the plant resistance against the insect.

**Keywords:** cDNA-AFLP; froghopper-roots; *Saccharum* spp; pest resistance; senescence.

## I. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma das gramíneas cultivadas mais importantes do mundo. O setor de produção de etanol e açúcar tem um enorme destaque na economia brasileira, considerando a sua geração de renda, emprego e divisas para o país. O etanol é um combustível renovável menos poluente que os derivados de petróleo e de custo relativamente baixo. Nos últimos anos, praticamente todas as montadoras de automóveis do país lançaram novos modelos bi-combustíveis, que funcionam com gasolina, etanol ou qualquer combinação de ambos.

O setor sucroalcooleiro possui atualmente uma área plantada com cana que é estimada em 8,1 milhões de hectares, o que representa menos de 1% da área nacional utilizada pela agricultura, onde a região centro-sul concentra cerca de 90% da produção de cana. O estado de São Paulo é o maior produtor de cana, com uma área de 4,37 milhões de hectares disponíveis para colheita, representando 53,60% de toda área utilizada na produção de cana-de-açúcar. A safra 2009/2010 de cana-de-açúcar na região centro-sul do Brasil apresentou uma produção de 604,5 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, 33,1 milhões de toneladas de açúcar e 25,8 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2010).

A colheita da cana pode ser feita manualmente, o que requer mão-de-obra barata e abundante, ou mecanicamente. A colheita mecanizada de cana sem queima prévia da palha tem crescido em muitos países por razões econômicas e também pela redução da emissão de CO<sub>2</sub>. No Estado de São Paulo uma lei estadual (Lei Estadual 11.241/02 regulamentada pelo decreto Estadual 47.700/03) impõe que, até o ano de 2021, em 100% das áreas mecanizáveis a cana seja colhida “crua”, ou seja, sem queima da palhada.

A queima da palhada previne o acúmulo de inóculo de doenças e pragas ao longo dos cortes da cana-de-açúcar. Por outro lado, a colheita sem queima pode resultar em diferentes padrões de infestação de pragas e plantas daninhas (MEYER et al., 2005).

A presença de cigarrinhas é relatada em várias partes do mundo, sendo encontradas, com maior frequência, nas regiões tropicais e subtropicais do globo e estão amplamente distribuídas nas Américas e no Caribe (FEWKES, 1969; THOMPSON, 2004). São consideradas pragas de importância econômica em diversas culturas, pois, além dos prejuízos diretos decorrentes da sucção contínua de seiva e das lesões e deformações que provocam, podem injetar substâncias tóxicas em seus hospedeiros (GALLO et al., 2002).

A espécie *Mahanarva fimbriolata* (STÅL, 1854) (Hemiptera: Cercopidae), também chamada de cigarrinha-das-raízes, não era considerada uma praga-chave da cana-de-açúcar na região centro-sul, uma vez que prejuízos significativos não ocorriam com frequência (MENDONÇA et al., 1996). Entretanto, ao longo dos últimos anos, com o aumento da colheita mecanizada de cana crua, a *M. fimbriolata* tornou-se uma das pragas mais importantes da região centro-sul do Brasil. No Estado de São Paulo, esta praga ocorre principalmente em áreas de colheita mecanizada de cana crua e, nos Estados de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso Sul, em soqueiras de cana queimada e também em cana-planta (DINARDO-MIRANDA, 2006). O sistema de colheita mecanizada deixa uma camada de palha abundante no solo, propiciando um ambiente de elevada umidade e temperatura estável que é favorável ao desenvolvimento de ninfas de cigarrinha (MENDONÇA et al., 1996; DINARDO-MIRANDA et al., 2001a). A queima da palha antes da colheita destrói todas as formas de cigarrinhas, especialmente os ovos em diapausa (DINARDO-MIRANDA et al. 1999; 2001b).

As fêmeas ovipositam na camada de palha, próxima aos colmos. As ninfas eclodem dos ovos e buscam raízes jovens para se alimentarem da seiva do xilema. O ataque de ninfas de cigarrinha resulta em desordem metabólica generalizada, desidratação dos colmos, secamento dos vasos condutores, colmos afinados e “coração morto” (GALLO et al., 2002; MACEDO & MACEDO, 2004).

As ninfas de *M. fimbriolata* sugam as raízes e atingem os vasos do xilema, deteriorando-os e dificultando ou até impedindo o fluxo de água e nutrientes (HORSFIELD, 1978). O ataque da cigarrinha-das-raízes tem como consequência a redução da taxa fotossintética, reduzindo conseqüentemente o desenvolvimento da planta e acarretando perdas de produtividade de colmos e sacarose (MENDONÇA et

al., 1996). Os danos podem ser severos para muitos genótipos de cana, especialmente variedades de meio e final de safra (DINARDO-MIRANDA et al., 1999).

Além de reduzir a produtividade da planta, a cigarrinha-das-raízes altera a qualidade tecnológica da cana-de-açúcar utilizada como matéria-prima na indústria, reduzindo o teor de açúcar nos colmos e aumentando o de fibra (DINARDO-MIRANDA et al., 2000; GONÇALVES et al., 2003). Os colmos mortos e secos, em decorrência do ataque da praga, diminuem a capacidade de moagem e, como muitas vezes estão rachados e deteriorados, os contaminantes dificultam a recuperação de açúcar e inibem a fermentação, reduzindo, portanto, os rendimentos industriais e dificultando a obtenção de açúcar de qualidade (DINARDO-MIRANDA, 2003).

Alterações metabólicas ocorrem na resposta da cana-de-açúcar à infestação de cigarrinha, produzindo uma variedade de ácidos orgânicos e compostos fenólicos. Essas substâncias reduzem a recuperação de açúcar e prejudicam o metabolismo da levedura durante a fermentação, diminuindo a produção de etanol e alterando a composição do produto final (MUTTON & MUTTON, 2002).

*M. fimbriolata* pode ser controlada biologicamente com pesticidas (DINARDO-MIRANDA et al., 2000) ou pela prática cultural como a retirada da palha das linhas de cultivo (DINARDO-MIRANDA et al., 2004a). DINARDO-MIRANDA et al. (1999) verificaram que um controle eficiente desta praga aumenta significativamente a qualidade da cana, e que isto pode promover um reflexo na fermentação por leveduras.

Apesar da redução na produtividade e na qualidade da cana em virtude do ataque de cigarrinhas, muito pouco se sabe sobre a interação dessa praga com a cana-de-açúcar. Diversos trabalhos estudaram o controle químico (DINARDO-MIRANDA et al., 2000; 2001a; 2002; 2006), biológico (DINARDO-MIRANDA et al.; 2000; GARCIA et al., 2006b) e cultural (DINARDO-MIRANDA et al., 2000). Entretanto, atualmente existe pouca informação no tocante à resistência varietal de cana-de-açúcar às cigarrinhas.

A técnica de cDNA-AFLP (*cDNA amplified fragment length polymorphism*) (BACHEM et al. 1998), pode ser considerada uma melhoria da técnica tradicional de *differential display* (LIANG & PARDEE, 1992). Ela permite a comparação a partir de uma pequena quantidade de amostras e menos de 5 µg de RNA são necessários para até 240 reações. Outra vantagem é que a técnica de cDNA-AFLP detecta pequenas

diferenças de expressão, a partir de 10%. A maior limitação da técnica é a alta ocorrência de falsos positivos, que pode ser minimizada pelo uso de repetições de cada reação e de mais de um indivíduo para cada condição (STEIN & LIANG, 2002).

Essa técnica é baseada na amplificação seletiva por PCR de fragmentos de restrição ligados a adaptadores a partir de cDNA e sua primeira aplicação foi descrita por BACHEM et al. (1996) analisando a expressão diferencial em batata durante a formação do tubérculo. Desde então, ela tem sido bastante utilizada para a identificação de genes diferencialmente expressos em uma larga variedade de tecidos, condições de estresse e estádios de desenvolvimento em plantas (CAMPALANS et al., 2001; ECKEY et al., 2004; GUIMARÃES, 2007; POLESANI et al., 2008).

GUIMARÃES (2007) verificou a existência de genes expressos exclusivamente em uma variedade de cana-de-açúcar resistente à *Mahanarva fimbriolata*. Utilizando a variedade de cana-de-açúcar SP80-1816 considerada suscetível (DINARDO-MIRANDA et al., 1999; DINARDO-MIRANDA, 2004; SILVA et al., 2005) e a variedade SP83-5073 considerada resistente (DINARDO-MIRANDA, 2003), foi encontrado por meio da técnica de cDNA-AFLP, dois genes expressos exclusivamente na variedade resistente após infestação por esta praga.

O objetivo do presente trabalho foi de identificar genes associados à resistência da variedade SP83-5073 a *M. fimbriolata* utilizando as mesmas variedades de cana-de-açúcar e a mesma abordagem utilizada por GUIMARÃES (2007).



## II. REVISÃO DE LITERATURA

### **Cana-de-açúcar**

A cana-de-açúcar é uma monocotiledônea alógama e semi-perene, pertencente à família Poaceae e ao gênero *Saccharum*, e que provavelmente é originária do Sudeste Asiático, da grande região central da Nova Guiné e Indonésia (DANIELS & ROACH, 1987), sendo que a maioria das variedades comerciais foram obtidas do cruzamento interespecífico entre *S. officinarum*, *S. barbieri*, *S. sinense* e as espécies selvagens *S. spontaneum* e *S. robustum*. A principal utilização da cana-de-açúcar é a produção de açúcar e etanol, mas também são obtidos outros produtos e subprodutos de seu processamento, como a aguardente, o melado e a rapadura utilizados para o consumo, o bagaço como fonte de energia e a vinhaça como fertilizante.

O Brasil é hoje o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e atualmente a área destinada à atividade sucroalcooleira brasileira está estimada em 8,1 milhões de hectares, distribuídas em todos estados produtores, o que representa menos de 1% da área nacional ocupada pela agricultura, onde a região centro-sul concentra cerca de 90% da produção. O estado de São Paulo é o maior produtor do Brasil com uma área de 4,37 milhões de hectares disponíveis para colheita, representando 53,60% de toda área utilizada na produção de cana-de-açúcar. A safra 2009/2010 no Brasil apresentou uma produção de 604,5 milhões de toneladas, 33,1 milhões de toneladas de açúcar e 25,8 bilhões de litros de etanol, com a região centro-sul do Brasil apresentando uma produção de 542,8 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, 28,7 milhões de toneladas de açúcar e 23,7 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2010).

Conforme LAM et al. (2009), o Brasil ainda é um país modelo no desenvolvimento e uso comercial da cana-de-açúcar como biocombustível e para a geração de energia elétrica a partir de sua biomassa. Outro aspecto positivo são os variados usos possíveis como matéria-prima, que gerou aumento do interesse de produtores de vários países pela cultura.

A cana-de-açúcar possui um genoma altamente complexo, apresentando poliploidia, aneuploide e um número variável de cromossomos. Além disso, trata-se de um genoma extremamente grande, o que dificulta a compreensão de sua arquitetura genética. Por exemplo, o conteúdo de DNA de uma célula somática de *S. officinarum* é 7440 Mpb. Como esta espécie é octaplóide, o tamanho do complemento haplóide é 8 vezes menor, cerca de 930 Mpb. Este valor é comparável ao genoma de uma espécie diplóide, como o sorgo, que apresenta cerca de 760 Mpb (GRIVET & ARRUDA, 2002).

O sucesso do cultivo da cana-de-açúcar se deve à utilização de variedades adaptadas aos diferentes ambientes edafoclimáticos, obtidas por meio de melhoramento genético clássico pelos centros de pesquisa e estações experimentais. Este é um processo relativamente demorado, visto que, dentre as espécies cultivadas, a cana-de-açúcar possui um dos genomas mais complexos, o que dificulta a aplicação de técnicas convencionais de melhoramento nesta planta (VETTORE et al., 2001).

### **Cigarrinha-das-raízes**

A cigarrinha-das-raízes, *Mahanarva fimbriolata* (STÅL., 1854) pertence à ordem Hemiptera, superfamília Cercopoidea, família Cercopidae, subfamília Tomaspidinae e tribo Tomaspidini (GARCIA, 2002). São insetos sugadores e pragas de grande importância em diversas culturas, incluindo a cana-de-açúcar (GARCIA, 2002). As primeiras referências sobre cercopídeos atacando cana-de-açúcar no Brasil datam de 1918, quando um surto de cigarrinhas foi controlado por um fungo. *M. fimbriolata* foi descrita pela primeira vez atacando cana-de-açúcar em 1919 e 1920 (GUAGLIUMI, 1968). No Brasil, as principais espécies de cigarrinhas que ocorrem em cana-de-açúcar são a *Mahanarva fimbriolata* (cigarrinha-das-raízes); *Mahanarva posticata* (cigarrinha-da-folha) e *Mahanarva rubicunda indentata* (cigarrinha-do-cartucho). *M. fimbriolata* é uma praga de grande importância, principalmente nos estados do Maranhão, Sergipe, Bahia, Mato Grosso, Paraná, Santa Catarina, São Paulo e Goiás (MENDONÇA et al., 1996).

A cigarrinha-das-raízes, apesar de ser conhecida como praga dos canaviais da região nordeste, tem acarretado enormes prejuízos na região centro-sul, que é a maior

região produtora de cana-de-açúcar do país, constituindo-se um dos maiores problemas agrícolas atuais da cultura após o advento da colheita mecanizada da cana, sem a queima prévia da palhada (GONÇALVES et al., 2003). Sua ocorrência é mais séria no estado de São Paulo, mas sua distribuição geográfica estende-se também aos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Amazonas, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Mato Grosso e Goiás (MENDES et al., 1977, MACEDO et al., 2003).

Além da cana-de-açúcar as cigarrinhas vivem em outras plantas, principalmente em gramíneas, de forma análoga a cana-de-açúcar (GALLO et al., 2002), como no capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach) sendo sua principal praga (LEITE, 2002).

### **Biologia da cigarrinha-das-raízes**

Os ovos de *M. fimbriolata* são fusiformes, amarelados e medem aproximadamente 1 mm de comprimento e 0,25mm de diâmetro (MOREIRA, 1925). Ao eclodirem, as ninfas medem apenas 1 mm de comprimento e no final de seu desenvolvimento, após passarem por cinco ínstares, atingem cerca de 10 mm de comprimento (MOREIRA, 1925; MARICONI, 1963).

As ninfas sugam a seiva das raízes e radículas, onde permanecem durante todo o período ninfal, podendo também estar presente nas raízes adventícias, aéreas do colmo ou por baixo da palha nas entrelinhas da cana-de-açúcar (MENDONÇA et al., 1996). As ninfas da família Cercopidae caracterizam-se por produzir uma espuma típica, formada de líquidos eliminados pelo ânus e por uma substância mucilaginosa secretada por glândulas epidérmicas, que as envolve e protege contra a dessecação (GARCIA, 2002), contra o ataque de formigas (MOREIRA, 1921) e de outros inimigos naturais (CAMINHA FILHO, 1945; GUAGLIUMI, 1973) e, em alguns casos, pode reduzir a eficiência do controle químico por impedir o contato dos produtos com as ninfas (EL-KADI, 1977).

A quantidade de espuma produzida pela ninfa é função do volume de seiva retirada da planta. Pouco antes da última ecdise, a espuma deixa de ser produzida e

começa a secar em virtude da evaporação da porção líquida, formando em seu interior uma cavidade onde a ninfa se transforma em adulto (COSTA LIMA, 1942).

Os adultos medem cerca de 12 mm de comprimento, possuem coloração em geral avermelhada, com presença ou não de manchas longitudinais nas asas, onde as fêmeas são mais escuras que os machos e se alimentam normalmente da seiva das folhas (MENDONÇA et al., 1996).

FREIRE et al. (1968) verificaram, em média, uma oviposição de 50 a 70 ovos por fêmea, com valores máximos de 147 ovos por fêmea. Em laboratório, sob condições ideais de temperatura, umidade e fotoperíodo, GARCIA (2002) obteve uma fecundidade média de 342,1 ovos por fêmea. O ciclo médio de duração de *M. fimbriolata* é de aproximadamente 60 dias, 20 dias para a fase de ovo, 20 dias para a fase de ninfa e 20 dias para o adulto. Assim, podem ocorrer três a quatro gerações durante os períodos chuvosos, que na região Sudeste do Brasil é de setembro/outubro a fevereiro/março (GALLO et al., 2002; MACEDO & MACEDO, 2004). O período de maior atividade das cigarrinhas ocorre nos meses quentes e úmidos, pela umidade ser um fator limitante ao seu desenvolvimento. Durante os meses secos e frios, as ninfas e adultos desaparecem quase que totalmente, restando nas reentrâncias do solo e na base das touceiras grande quantidade de ovos em diapausa, que eclodirão com a vinda do período chuvoso, dando início às novas gerações (AZZI & DODSON, 1971; BOTELHO et al., 1976).

### **A praga e a cultura da cana-de-açúcar**

Com a expansão da colheita de cana-de-açúcar sem queima prévia da palhada, a infestação por *M. fimbriolata* tornou-se de relevante importância, pois esse sistema de colheita deixa no solo uma cobertura vegetal abundante, proporcionando condições de alta umidade e temperatura estável, favoráveis à ocorrência da cigarrinha (MENDONÇA et al., 1996; DINARDO-MIRANDA et al., 2001a).

A queima da cana-de-açúcar antes da colheita promove a destruição de todas as formas desta praga, especialmente os ovos em diapausa (DINARDO-MIRANDA et al. 1999; 2001b). Com isso a cigarrinha-das-raízes se tornou uma praga-chave da cultura e

um dos principais desafios técnicos a ser equacionado nesse sistema de colheita (MACEDO et al., 2002).

### **Danos decorrentes do ataque da praga**

As ninfas de *M. fimbriolata* se alimentam da seiva da cana-de-açúcar. Elas introduzem seu aparelho bucal através da epiderme das raízes e radículas das plantas, atravessando todo o córtex e atingindo o cilindro vascular, de onde retiram seu alimento (STINGEL, 2005; GARCIA, 2006). Em consequência, as plantas apresentam-se desnutridas e desidratadas, com folhas amareladas e, posteriormente, secas (MENDONÇA et al., 1996; GALLO et al., 2002). A saliva liberada pelas ninfas é rica em enzimas e aminoácidos que auxiliam no processo de digestão do alimento. Essa saliva é tóxica para a planta, causando necrose nos tecidos radiculares (FEWKE, 1969; DINARDO-MIRANDA, 2003).

A deterioração dos vasos lenhosos das raízes, provocada pela alimentação das ninfas, dificulta ou mesmo impede o fluxo de água e de nutrientes, causando, conseqüentemente, a morte das raízes e a alteração da fisiologia da planta, o que pode ser caracterizado pelo surgimento de colmos ocos e afinados (GALLO et al., 2002). Colmos mortos e secos, também decorrentes do ataque das ninfas, diminuem a capacidade de moagem e, como muitas vezes estão rachados e deteriorados, os contaminantes dificultam a recuperação de açúcar e inibem a fermentação, reduzindo, portanto, os rendimentos industriais e a qualidade do açúcar (DINARDO-MIRANDA et al., 2004b).

Os adultos se alimentam preferencialmente da seiva das folhas. Eles introduzem o estilete, preferencialmente através dos estômatos, atingindo o metaxilema nos feixes vasculares e atravessando as células do parênquima clorofiliano (GARCIA, 2006). Em decorrência da toxina injetada pelos adultos, surgem pequenas manchas amareladas nas folhas que, com o passar do tempo, tornam-se avermelhadas e, finalmente, opacas, reduzindo o processo fotossintético e a circulação da seiva do limbo foliar, ocasionando diminuição no conteúdo de sacarose do colmo e retardando a maturação (EL-KADI, 1977; MACEDO & MACEDO, 2004). Quando os estiletes dos insetos estão infectados

por microrganismos eles podem provocar a contaminação do líquido nutritivo da planta, causando deterioração de tecidos nos pontos de crescimento do colmo e, gradualmente, dos entrenós inferiores até as raízes subterrâneas, podendo causar a morte do colmo (MACEDO et al., 2003).

O ataque intenso da cigarrinha-das-raízes pode ocasionar reduções na produtividade, principalmente nas colheitas de meio e final de safra (DINARDO-MIRANDA et al., 1999). Os danos decorrentes podem ser classificados em diretos e indiretos. Os danos diretos estão relacionados à produção da cana-de-açúcar e se caracterizam pela morte, encurtamento, rachadura, brotações laterais e murchamento de colmos e redução na produtividade causada pela morte precoce de perfilhos. Já os indiretos estão relacionados ao processamento da cana-de-açúcar, como a redução da quantidade e qualidade do açúcar recuperável causado pelo aumento do teor de fibra, aumento de impurezas, redução da porcentagem de açúcar, redução na pureza do caldo e aumento de contaminantes no caldo (DINARDO-MIRANDA et al., 2004b; MACEDO & MACEDO, 2004).

Na década de 1970 foi relatado que o principal dano à cultura era decorrente das toxinas injetadas pelos adultos ao se alimentarem das folhas, causando redução no tamanho e diâmetro de entrenós, que ficam curtos e fibrosos (GUAGLIUMI, 1973). Entretanto, trabalhos mais recentes têm demonstrado que o principal efeito da praga é promovido pelas formas jovens, as ninfas (GONÇALVES, 2003).

DINARDO-MIRANDA et al. (2002) observaram, estudando a variedade de cana-de-açúcar SP80-1816, que as parcelas mantidas sob infestação da cigarrinha-das-raízes, apresentaram produtividade de açúcar 45% inferior às parcelas tratadas com inseticidas. Também segundo DINARDO-MIRANDA et al. (2004c), na ausência de cigarrinha-das-raízes, houve produção de cerca de 37% a mais de açúcar. Em outro estudo DINARDO-MIRANDA (2003) constatou que os danos causados pelo ataque da cigarrinha-das-raízes podem variar com a época de colheita do canavial. Resultados de experimentos realizados em áreas comerciais estimaram que em canaviais colhidos no início da safra (abril a junho) a cigarrinha pode causar entre 8 e 10% de redução na produtividade de açúcar, enquanto que para canaviais colhidos no meio (junho a

setembro) e no final da safra (setembro a dezembro), as perdas podem variar de 20 a 30% e de 30 a 50%, respectivamente.

### **Controle da cigarrinha-das-raízes**

Existem diversos métodos de combate às cigarrinhas, tais como: o controle físico, controle químico, controle biológico e controle cultural.

#### **Controle físico**

O controle físico consiste no controle pelo uso de fogo em áreas muito infestadas, para diminuir o foco da praga, uma vez que esse método destrói suas formas biológicas, inclusive os ovos em diapausa (BALBO JR. & MOSSIM, 1999). A prática da queima prévia da palhada em canaviais atuava como controle para esta praga (DINARDO-MIRANDA et al. 1999; 2001b). Quando a cana-de-açúcar é colhida mecanicamente, sem a queima da palhada, pode ser utilizado o afastamento mecânico da palha da linha de cana ou a retirada da palha da área, que proporciona menor infestação quando comparada à situação normal da palha, mas não evitam totalmente a ocorrência da praga (DINARDO-MIRANDA, 2002).

#### **Controle químico**

O controle químico contra as cigarrinhas se dá à base de inseticidas, mas é um controle inviável economicamente devido à cultura ser considerada de baixo valor econômico por unidade de área. Este tipo de controle também pode acarretar problemas ecológicos quando não utilizado corretamente, pela aplicação de agrotóxicos em extensas áreas e pelo elevado número de aplicações, eliminando controladores naturais da praga (BUENO, 1987; MARQUES, 1988). A dificuldade em atingir as ninfas, tanto por estas se localizarem na base das plantas como pela proteção que a espuma oferece, é outro fator da inviabilidade do uso do controle químico (NILAKHE, 1983; CARVALHO, 1985; KOLLER & VALÉRIO, 1987; ALVES, 1998; LEITE et al., 2002). Este

meio de controle, quando selecionado, deve ser utilizado aplicando-se produtos seletivos e em ocasiões necessárias, como após a constatação das primeiras cigarrinhas adultas, pois ao se detectar o sintoma dos danos nas plantas a maioria dos adultos já estarão mortos e o dano será irreversível, visto que os adultos aparecem três semanas após o início do ataque das ninfas (VALÉRIO & NAKANO, 1992).

### **Controle biológico**

O controle biológico consiste na utilização de organismos vivos no combate a um agente causador de danos à cultura. Para o controle da cigarrinha-das-raízes o principal organismo utilizado é o fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. A utilização deste fungo no combate a cigarrinha tem tido eficiência pouco elevada, estando entre 10,5 a 60%, conforme estudos de seleção de isolados de *M. anisopliae* contra *Mahanarva fimbriolata* (MACEDO et al., 2006). Por outro lado, DINARDO-MIRANDA et al. (2004c) avaliaram a eficiência de isolados de *M. anisopliae* no controle da cigarrinha-das-raízes em condições de campo, em três municípios do estado de São Paulo, e observaram redução de população de até 91,2% quando foram feitas duas aplicações, utilizando-se em cada uma a dose de 1kg/ha de arroz esporulado (aproximadamente  $9 \times 10^8$  conídios/g de arroz). A utilização do fungo visa controlar as ninfas das cigarrinhas, por serem mais suscetíveis e pode ser aplicado nas formulações pó molhável ou óleo emulsionável, utilizando-se dosagens entre  $1 \times 10^{12}$  e  $5 \times 10^{12}$  conídios por hectare (ALVES & LOPES, 2006).

Os resultados negativos obtidos com o controle biológico podem ser explicados pela exigência de condições favoráveis que o fungo necessita para se desenvolver, pela proteção que a espuma confere às ninfas, pelo método de aplicação do fungo e pela utilização de baixas dosagens do fungo (VALÉRIO, 2005). Para obtenção de melhores resultados neste método de controle é necessário a utilização de isolados específicos de *M. anisopliae* para a espécie de cigarrinha que se pretende controlar. Além disso, devem-se verificar as condições ambientais da região em que se fará o controle e realizar as aplicações com temperaturas mais amenas, nas primeiras horas do dia ou



ao entardecer, para que o fungo possa se estabelecer (COSENZA et al., 1982; ALVES, 1998).

Além do fungo *Metarhizium anisopliae* outros agentes de controle da cigarrinha estão presentes naturalmente nas áreas de plantio, como os micro-himenópteros parasitóides de ovos *Anagrus* sp. e *Acmopolynema herwali* (PIRES et al., 1993), a larva da mosca *Salpingogaster nigra* que é predadora de ninfas (MARQUES, 1988) e a mosca *Porasilus barbiellini* que é um eficiente predador de adultos de cigarrinhas (BUENO, 1987). Alguns nematóides também têm sido encontrados naturalmente atacando a cigarrinha-das-raízes, porém são ainda bastante escassos os estudos conclusivos recomendando esses agentes como alternativa de controle dessa praga (ALMEIDA et al., 2002).

### **Controle cultural**

O controle cultural consiste na utilização de variedades resistentes e é o tipo de controle mais indicado, pois apresenta a vantagem de ser um método de baixo custo, além de ser facilmente assimilado e adotado pelo produtor, uma vez que o controle estará sendo efetivado simplesmente através da aquisição da variedade (KOLLER & VALÉRIO, 1987; LAPOINTE & SONODA, 2001).

Esse tipo de controle para a cigarrinha-das-raízes ainda não é muito eficiente, embora tenham sido observadas variações significativas nos níveis de infestação e de danos conforme as variedades, mas todas as variedades cultivadas comercialmente são atacadas por esta praga e estão sujeitas a perdas expressivas quando a infestação na área é elevada (MACEDO, 2005). Com isso deve ser efetuado a redução da participação de variedades altamente suscetíveis à cigarrinha, tais como a SP80-1816 (SILVA et al., 2005; DINARDO-MIRANDA, 2004) e RB72454 (DINARDO-MIRANDA, 2004; DINARDO-MIRANDA et al., 1999), dando preferência para as variedades mais resistentes como a SP83-5073 (DINARDO-MIRANDA, 2003).

## Resistência de plantas a insetos

A resistência de plantas a insetos pode ser considerada como a soma relativa das características herdadas pela planta, que influenciam o grau de injúria que o inseto causará ao atacá-la. Em outras palavras, seria a capacidade que certas plantas possuem de alcançarem maior e melhor produção quando comparadas com outras variedades nas mesmas condições adversas (PAINTER, 1951). Essa resistência pode ser proveniente de características morfológicas desfavoráveis ao inseto, como a presença de tricomas ou pela produção de compostos secundários com a finalidade de proteção contra predadores (SEIGLER & PRICE, 1984). Para que uma planta seja considerada resistente, sua progênie deve apresentar a mesma resistência, portanto, a resistência é um caráter hereditário (LARA, 1991).

Existem três tipos de resistência a insetos que são definidos pelos mecanismos com que a planta interfere no comportamento do inseto. Esses mecanismos são: a antixenose ou não-preferência, a antibiose e a tolerância (LARA, 1991).

### Antixenose ou não-preferência

De acordo com LARA (1991), este tipo de resistência afeta o comportamento do inseto e assim a planta é menos utilizada tanto para a alimentação, oviposição ou abrigo.

Em um estudo sobre o comportamento de escolha de ninfas de *Deois flavopicta* em vasos contendo *Andropogon gayanus* cv. Planaltina, *Melinis minutiflora*, *Setaria anceps* cv. Kazungula e *Brachiaria decumbens* foi verificado que nos três primeiros capins as ninfas da cigarrinha sobiram até o caule, e ao se depararem com tricomas voltaram para o solo, se alimentando somente em *B. decumbens*, mostrando que o mecanismo de resistência dos capins foi de antixenose (COSENZA, 1981)

KOLLER & VALÉRIO (1987) testaram a preferência de *Zulia entreriana* e *Deois flavopicta* a *Brachiaria decumbens* para diferentes alturas e constataram que *Z. entreriana* não apresentou preferência para as diferentes alturas e que a *D. flavopicta* teve aumento populacional à medida que se diminuía a altura da gramínea.

CHANNARAYAPPA et al. (1992) observaram que o genótipo LA 1777 de *Lycopersicon hirsutum* apresenta resistência à mosca-branca mediada pelo mecanismo de antixenose. Em outro estudo com tomateiros atacados por mosca-branca, FERNANDES et al (2009) sugeriram que a baixa densidade de tricomas em genótipos resistentes à praga mostrou claramente a resistência por antixenose.

AUAD et al. (2007), avaliando genótipos de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) quanto à resistência à cigarrinha-das-pastagens (*Mahanarva spectabilis*), verificaram que o número e o tamanho médio das ninfas variaram significativamente em razão do genótipo de capim-elefante no estudo da não-preferência. Assim, constataram que os genótipos *Pennisetum purpureum* Schum cv. Cameroon e *Pennisetum purpureum* Schum cv. Cameroon Piracicaba possuem o mecanismo de resistência por antixenose.

### **Antibiose**

A resistência de plantas a insetos por antibiose é quando o inseto se alimenta normalmente da planta, mas tem sua biologia afetada, podendo morrer, sofrer alterações no ciclo de vida, reduzir sua taxa reprodutiva ou sofrer alterações de tamanho e peso (LARA, 1991). Vários autores consideram como uma resistência por antibiose quando ocorre uma alta mortalidade dos insetos ou o prolongamento da fase de ninfa (CARDONA et al., 1999; SOTELO et al., 2003; CARDONA et al., 2004; AUAD et al., 2007; PABÓN et al., 2007).

Esse tipo de resistência pode ser específico a uma espécie de inseto. CARDONA et al. (2004) utilizaram genótipos do gênero *Brachiaria*, CIAT 36062 tido como resistente e CIAT 0654 tido como suscetível, em testes para avaliar antibiose para cinco espécies de cigarrinhas-das-pastagens (*Aeneolamia varia* (F.), *Aeneolamia reducta* (Lallemand), *Zulia carbonaria* (Lallemand), *Zulia pubescens* (F.) e *Mahanarva trifissa* (Jacobi) ). De acordo com seus resultados, a suscetibilidade do genótipo CIAT 0654 foi confirmada para as cinco espécies citadas. O genótipo CIAT 36062 foi classificado como altamente resistente a *M. trifissa*, resistente a *A. varia* e a *A. reducta*, moderadamente resistente a

*Z. pubescens* e suscetível a *Z. carbonária*, demonstrando a especificidade do mecanismo de resistência por antibiose.

GUIMARÃES (2007), estudando a interação planta-praga em variedades de cana-de-açúcar resistentes e suscetíveis à *Mahanarva fimbriolata* observou, através da análise de crescimento, mortalidade do inseto e longevidade de ninfas que a variedade resistente provavelmente possui um mecanismo de defesa por antibiose ao ataque desta praga.

AUAD et al. (2007), avaliando genótipos de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) quanto à resistência à cigarrinha-das-pastagens (*Mahanarva spectabilis*), verificaram que o genótipo *Pennisetum purpureum* Schum cv. Pioneiro é resistente à praga pelo mecanismo de antibiose.

### **Tolerância**

A tolerância é uma resposta induzida por danos causados por insetos, onde uma variedade é menos danificada que as demais, sob um mesmo nível de infestação da praga sem afetar a biologia e o comportamento dos insetos (PAINTER, 1951). Como este mecanismo de resistência é definido em termos de produção, o objeto de análise é a planta e não o inseto. Uma das técnicas para quantificar e separar a tolerância da antibiose é a utilização de uma população fixa de insetos, adicionando-se ou removendo diariamente os insetos de maneira a manter sempre uma população constante de indivíduos (STARKS et al. 1983, WEBSTER et al. 1987, 1991)

Pelo fato da resistência por tolerância não estar relacionada ao comportamento e a biologia do inseto, o aparecimento de biótipos ou de raças fisiológicas resistentes é quase nula. Porém, o fato de não influir sobre o inseto também não afeta conseqüentemente sua população, podendo ser encarado como um mecanismo de defesa desvantajoso, embora se ajuste muito bem a programas de manejo integrado de pragas onde é utilizado o controle biológico (PAINTER, 1951; GALLO et al., 2002).

WOOD JR. et al. (1969), estudando diferentes genótipos de sorgo sob ataque do pulgão-verde *Schizaphis graminum* (Rond.), concluíram que o principal mecanismo de

resistência existente na linhagem SA 7536-1 era um alto grau de tolerância ao pulgão-verde.

COSENZA (1981), avaliando o tipo de resistência de várias espécies de gramíneas ao ataque da cigarrinha *Deois flavopicta*, constatou que *Brachiaria humidicola* e *Melinis minutiflora* apresentam o mecanismo de tolerância a essa praga. Posteriormente, COSENZA et al. (1989) confirmaram a tolerância de *B. humidicola* à mesma praga.

Em um estudo de ROSSETTO et al. (1984) sobre a resistência de soja a insetos, foi verificado que a linhagem de soja IAC 73/228 apresentou resistência a *Nezara viridula* (L.) pelo mecanismo de tolerância, pois apesar do grande ataque da praga, essa linhagem não teve redução significativa em sua produção.

HESLER (2005), avaliando a alteração no crescimento de plântulas de trigo e de triticales infestadas por *Rhopalosiphum.padi*, observou que os genótipos de trigo Arapahoe e KS92WGRC24 tiveram o crescimento das plântulas afetado, enquanto o genótipo de trigo MV4 e os genótipos de triticales 8TA5L, H7089-52 e Stniism 3 não foram afetados pela infestação, mostrando um mecanismo de resistência por tolerância.

### **cDNA-AFLP**

Para a análise da expressão gênica, sem o prévio conhecimento dos genes de interesse, existem várias metodologias que são utilizadas atualmente e, dentre as mais utilizadas, podemos destacar as técnicas de sequenciamento de ESTs (ADAMS et al., 1991), *Differential Display* (DD) (LIANG & PARDEE, 1992), *Serial Analysis of Gene Expression* (SAGE) (VELCULESCU et al., 1995), Polimorfismo *Amplified Fragment Length Polymorphism* baseado em cDNA (cDNA-AFLP) (BACHEM et al., 1996), *Supression Subtractive Hybridization* (SSH) (DIATCHENKO et al., 1996) e *Massively Parallel Signature Sequencing* (MPSS) (BRENNER et al., 2000).

A técnica de cDNA-AFLP é uma melhoria da técnica tradicional de *Diferencial display* (BACHEM et al., 1996, ALBA et al., 2004). Ela foi baseada na técnica de AFLP (VOS et al., 1995) mas com a utilização de cDNA em vez do DNA. Ela permite a comparação a partir de uma pequena quantidade de amostras e menos de 5 µg de

RNA são necessários para até 240 reações. Outra vantagem é a detecção de pequenas diferenças de expressão, a partir de 10%, tendo como sua maior limitação a alta ocorrência de falsos positivos, que pode ser minimizada pelo uso de repetições de cada reação e de mais de um indivíduo para cada condição (STEIN & LIANG, 2002). Esta técnica é baseada na amplificação seletiva por PCR de fragmentos de restrição ligados a adaptadores a partir de cDNA (BACHEM et al., 1998).

A primeira aplicação foi descrita por BACHEM et al. (1996) onde, analisando a expressão diferencial em batata durante a formação do tubérculo, conseguiram como resultado dois fragmentos de cDNAs codificantes de lipoxigenases.

Utilizando a técnica de cDNA-AFLP, CAMPALANS et al. (2001) analisaram a expressão gênica diferencial em amêndoeira (*Prunus Amygdalus* (L.) Batsch) para a identificação de genes envolvidos no mecanismo de tolerância à seca. Dos fragmentos diferencialmente expressos relacionados a tolerância, foram encontrados fragmentos que codificavam proteínas tais como um transportador de compostos nitrogenados, a 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferase, uma proteína de choque térmico de baixo peso molecular, uma cisteína proteinase e uma proteína rica em prolina expressa constitutivamente.

ECKEY et al. (2004), analisando a expressão de genes envolvidos nos eventos iniciais de resistência ao fungo *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* em cevada (*Hordeum vulgare* L.) através de cDNA-AFLP, identificaram que determinados fragmentos derivados de transcritos na variedade resistente apresentaram homologia com MAP quinases, fatores de transcrição e receptores com domínio quinase. A análise funcional de uma MAP quinase foi realizada através do nocaute do gene codificante levando à suscetibilidade plantas de cevada antes consideradas resistentes ao fungo.

GUIMARÃES (2007), estudando uma variedade resistente e outra suscetível de cana-de-açúcar ao ataque de *Mahanarva fimbriolata* através da técnica de cDNA-AFLP, conseguiu identificar dois fragmentos expressos somente na variedade resistente à praga que possivelmente estão ligados a um mecanismo de antibiose da planta.

Em um estudo com videiras infectadas com o patógeno *Plasmopara viticola*, 128 combinações de oligonucleotídeos seletivos foram testadas através da técnica de cDNA-AFLP e foram encontrados cerca de 7.000 fragmentos derivados de transcritos,

dos quais 1.196 foram expressos somente em folhas infectadas (POLESANI et al., 2008).

LAO et al. (2008), analisando a expressão diferencial por cDNA-AFLP em variedades de *Saccharum* spp. após inoculação com o fungo patogênico *Sporisorium scitamineum*, encontraram um total de 64 fragmentos derivados de transcritos expressos diferencialmente, com 67,2% dos fragmentos tendo um aumento de expressão na variedade resistente. A resposta da planta contra o patógeno nas primeiras 72 horas após a inoculação da planta levou à expressão de genes envolvidos no metabolismo oxidativo, resposta defensiva, vias do etileno e auxinas.

### **III. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **Material vegetal e condições experimentais**

Mini-toletes de uma gema das variedades SP80-1816 (suscetível, SILVA et al., 2005; DINARDO-MIRANDA, 2004) e SP83-5073 (resistente, DINARDO-MIRANDA, 2003) foram plantadas em copos plásticos descartáveis de 300 mL contendo o substrato à base de vermiculita (Plantmax HT ®, Eucatex) e irrigadas diariamente até a capacidade de campo. As plantas foram mantidas em uma câmara de crescimento (modelo 095E, Fanem, São Paulo) com temperatura ajustada para 25 °C e fotoperíodo de 14 h. Foram utilizadas duas plantas por tratamento para garantir raízes de qualidade para extração de RNA.

#### **Criação e infestação de ninfas de cigarrinha-das-raízes**

As ninfas foram criadas exatamente como descrito por GARCIA et al. (2006a). A infestação de ninfas de segundo instar com 21 dias de idade foi realizada aos 77 dias após o plantio das variedades de cana-de-açúcar, com auxílio de um pincel macio, utilizando cinco ninfas por planta. A espuma produzida pelas ninfas foi transferida abundantemente junto com as ninfas, para garantir a sobrevivência após a infestação.

Os copos plásticos foram cobertos com tela de náilon de 100 mesh para isolar o efeito dos adultos sugadores de folha e evitar a migração de ninfas (teste sem chance de escolha). A presença de adultos foi monitorada diariamente e os indivíduos encontrados foram imediatamente mortos. O efeito dos adultos não foi estudado para evitar novas oviposições que resultariam em variação indesejável. Além disso, de acordo com DINARDO-MIRANDA (2004), o dano mais importante da praga é causado pela alimentação das formas jovens.



## Extração de RNA

As amostras de raízes das duas variedades utilizadas foram coletadas pouco antes da infestação (controle) e 1, 2, e 7 dias após infestação (d.a.i.). Para os dias de coleta 1, 2 e 7 cada variedade possui uma amostra infestada e outra sem infestação (controle). Após a coleta as amostras foram imediatamente armazenadas em N<sub>2</sub> líquido até a extração de RNA total.

O RNA total foi extraído de 3 g de amostra de raízes (*pool* de duas plantas), utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de raízes foram transferidas para um gral pré-resfriado (-20 °C) contendo nitrogênio líquido e maceradas utilizando um pistilo e nitrogênio líquido. A homogeneização do pó do tecido foi feita em 2 mL de Trizol. O homogeneizado foi transferido para um tubo de centrifuga de vidro (Corex) de 15 mL. As amostras foram incubadas por cinco minutos à temperatura ambiente para a dissociação completa dos complexos nucleoprotéicos. Foram adicionados 0,8 mL de clorofórmio e as amostras foram agitadas vigorosamente em vortex e incubadas por 3 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo Corex de 15 mL e o RNA foi precipitado pela adição de 0,8 mL de isopropanol. A mistura foi mantida à temperatura ambiente por 10 minutos e depois centrifugada a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 2 mL de etanol 75%. As amostras foram agitadas vigorosamente em vortex e centrifugadas a 7.500 x g por 5 minutos. Após o descarte do sobrenadante o precipitado de RNA foi então seco sob vácuo (bomba de vácuo conectada a um dessecador) por 10 a 20 minutos. O RNA foi dissolvido em 0,1 mL de água livre de RNase (água tratada com dietilpirocarboneto - DEPC) e armazenado a 80°C.

A determinação da concentração e pureza do RNA foi determinada através da leitura da absorbância no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) nos comprimentos de onda de 260 nm, 280 nm e 230 nm. É utilizado o valor de absorbância a 260 nm para a determinação da concentração e a razão  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  para a determinação da pureza do RNA extraído. Para RNA ou DNA fita

simples,  $A_{260\text{nm}}$  igual a 1,0 corresponde a uma solução com concentração igual a 40  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto que para DNA fita dupla corresponde a 50  $\mu\text{g/mL}$  (SAMBROOK et al., 1989).

A razão  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  indica a pureza da preparação, sendo que valores entre 1,8 e 2,0 indicam uma preparação de boa qualidade, livre de proteína. A razão  $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$  é utilizada como uma medida secundária de pureza do ácido nucleico. Os valores da razão  $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$  para amostras de boa qualidade de ácidos nucleicos muitas vezes são superiores aos respectivos valores da razão  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ . Uma amostra muito pura de ácido nucleico irá apresentar valores próximos de 2,0. Se a razão  $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$  é significativamente menor do que o esperado, pode indicar a presença de contaminantes com absorbância no comprimento de onda de 230 nm, como EDTA, carboidratos, guanidina e compostos aromáticos (por ex., fenol). A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em condições desnaturantes (contendo formaldeído).

### Síntese de cDNA

Para eliminar qualquer resquício de DNA nas amostras de RNA total, 1 U de DNase I (Invitrogen) foi adicionada para cada  $\mu\text{g}$  de RNA, as amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 15 minutos, em seguida, a DNase foi removida por extração com fenol/clorofórmio de acordo com o protocolo descrito por SAMBROOK et al. (1989).

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1  $\mu\text{g}$  de RNA total tratado com DNase I, utilizando-se o *Kit Revertaid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis* (Fermentas) para a síntese da primeira fita e os volumes de 1  $\mu\text{L}$  de oligo(dT)<sub>18</sub> (100  $\mu\text{M}$ ), 4  $\mu\text{L}$  de 5X *reaction buffer* (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT), 20 U de *RiboLock™ RNase Inhibitor*, 2  $\mu\text{L}$  de dNTP Mix (10 mM) e 200 U de *RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase*. A reação foi mantida a 42 °C por 60 minutos. A segunda fita foi sintetizada adicionando-se 30 U de DNA Polimerase I (*E. coli*) (Fermentas), 1 U de RNase H (Invitrogen) e 12,5 U de T4 DNA Polimerase (Fermentas) e mantendo a reação a 16 °C por 2 horas. O cDNA foi purificado por extração com

fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1 v/v/v) conforme o protocolo descrito por SAMBROOK et al. (1989).

A determinação da concentração e pureza do cDNA foi determinada através da leitura da absorbância no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) nos comprimentos de onda de 260 nm, 280 nm e 230 nm.

## **cDNA-AFLP**

Os cDNAs foram utilizados na análise de cDNA-AFLP (BACHEM et al., 1998) utilizando-se o Kit *AFLP Plant Mapping* (Applied Biosystems), conforme recomendações do fabricante com algumas modificações.

### **Preparo das Reações de Restrição**

Para cada amostra foi utilizado 150 ng de cDNA, 1  $\mu\text{L}$  de EcoRI (10 U/ $\mu\text{L}$  - Invitrogen), 0,2  $\mu\text{L}$  de MseI (5U/ $\mu\text{L}$  - Invitrogen), 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão React1 (10x - Invitrogen) e água milli-Q até completar o volume de 25  $\mu\text{L}$ . As amostras foram mantidas em termociclador à 37°C por 3 horas, seguidas de 20 minutos a 70°C para a inativação das enzimas.

É importante usar preparações concentradas de enzimas de restrição (com alta atividade por volume) para evitar que exceda 5% de glicerol nas reações, prevenindo assim a atividade estrela da EcoRI, condição em que a enzima passa a restringir sítios diferentes do seu sítio de restrição habitual.

### **Anelamento dos Pares de Adaptadores**

Uma alíquota de 0,5  $\mu\text{L}$  de cada adaptador das enzimas de restrição EcoRI e da MseI foram aquecidos separadamente a 95°C por 5 minutos e resfriados a temperatura ambiente por 10 min. Depois os adaptadores foram misturados em um único tubo para utilização posterior.

### Preparo das Reações de Ligação dos Adaptadores após a Restrição

Foi utilizado 11,5  $\mu\text{L}$  do cDNA digerido, 4,0  $\mu\text{L}$  de tampão T4 DNA Ligase (5x - Invitrogen), 1,0  $\mu\text{L}$  de T4 DNA Ligase (1 U/ $\mu\text{L}$  - Invitrogen), 0,5  $\mu\text{L}$  de adaptador EcoRI previamente anelado, 0,5  $\mu\text{L}$  de adaptador MseI previamente anelado e 2,5  $\mu\text{L}$  de água milli-Q. As reações foram mantidas à 20°C por 2 horas em termociclador e depois foram diluídas 20x em TE<sub>0,1</sub> (20 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0).

### Amplificação Pré-seletiva

Os fragmentos de cDNA com os adaptadores ligados nas duas extremidades amplificam exponencialmente e predominam no produto final. Para a amplificação pré-seletiva foram utilizados 4,0  $\mu\text{L}$  do cDNA já com os adaptadores ligados, 1,0  $\mu\text{L}$  da mistura dos iniciadores pré-seletivos AFLP EcoRI e MseI e 15,0  $\mu\text{L}$  do AFLP Core Mix. As amostras foram amplificadas em termociclador de acordo com os parâmetros da **Tabela 1** e diluídas 20x em TE<sub>0,1</sub> (20 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0).

**Tabela 1.** Parâmetros utilizados para a amplificação pré-seletiva.

Início	20 Ciclos			Fim	
72°C	94°C	56°C	72°C	60°C	4°C
2 min	30 Seg	1 min	2 min	30 min	infinito

### Reação de Amplificação Seletiva

Para a amplificação seletiva foram utilizados 3,0  $\mu\text{L}$  do produto da reação de amplificação pre-seletiva já diluído, 1,0  $\mu\text{L}$  do iniciador seletivo de EcoRI (Iniciador-Axx - Marcado por fluorescência), 1,0  $\mu\text{L}$  do iniciador seletivo de MseI (Iniciador-Cxx) e 15,0  $\mu\text{L}$  do AFLP Core Mix. A amplificação seletiva ocorreu em termociclador de acordo com os parâmetros da **Tabela 2** e o produto foi estocado a 2-6°C até sua utilização.

**Tabela 2.** Parâmetros utilizados para a amplificação seletiva.

<b>Início</b>	<b>Ciclo</b>			<b>Número de Ciclos</b>
94°C 2min	94°C 1 min	66°C 1 min	72°C 2 min	1
-	94°C 1 min	65°C 1 min	72°C 2 min	1
-	94°C 1 min	64°C 1 min	72°C 2 min	1
-	94°C 1 min	63°C 1 min	72°C 2 min	1
-	94°C 1 min	62°C 1 min	72°C 2 min	1
-	94°C 1 min	61°C 1 min	72°C 2 min	1
-	94°C 1 min	60°C 1 min	72°C 2 min	1
-	94°C 1 min	59°C 1 min	72°C 2 min	1
-	94°C 1 min	58°C 1 min	72°C 2 min	1
-	94°C 1 min	57°C 1 min	72°C 2 min	1
-	94°C 30 seg	56°C 1 min	72°C 2 min	20
60°C				1
30 min				
4°C				1
infinito				

### **Aplicação das Amostras e Eletroforese.**

Para cada amostra foi utilizado 1,5 µL de formamida deionizada, 0,3 µL de blue dextran, 0,6 µL do padrão interno de tamanho molecular GeneScan-500 ROX (Applied Biosystems) marcado por fluorescência com a cor vermelha e 0,5 µL do produto de amplificação seletiva marcado por fluorescência com uma das três cores possíveis, a saber, amarela (NED), azul (FAM) ou verde (JOE), dependendo do conjunto de iniciador marcado que foi usado. As amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos para a desnaturação do cDNA e imediatamente colocadas em gelo. De cada amostra foram aplicados 1,5 µL em um gel 5% desnaturante Long Ranger usando TEB 1X como

tampão de corrida em uma placa de sequenciamento de 36 cm e o tempo de corrida foi de 3 horas, a 2500V, em um sequenciador ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems).

O padrão interno de peso molecular GeneScan-500 ROX utilizado era marcado por fluorescência com a cor vermelha (ROX), possuindo 15 fragmentos com os seguintes comprimentos (pb): 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490 e 500. O pico de 250 pares de base (pb) não é levado em conta na hora da análise do gel feita através do software Genotyper.

### Teste de iniciadores seletivos

O kit AFLP Plant Mapping (Regular Plant Genomes) dá uma possibilidade de 64 combinações de iniciadores EcoRI e MseI, sendo que apenas os iniciadores EcoRI são marcados por fluorescência na extremidade 5' com uma das três diferentes cores, a saber, amarela (NED), azul (FAM) ou verde (JOE), a depender do iniciador EcoRI usado. Foram testadas 12 combinações de iniciadores (**Tabela 3**), sendo 4 iniciadores com marcação azul (FAM), 4 com marcação amarela (NED) e 4 com marcação verde (JOE).

**Tabela 3.** Combinações de iniciadores (EcoRI-MseI) testadas com o cDNA-AFLP

<b>FAM</b>	<b>JOE</b>	<b>NED</b>
<b>(EcoRI – MseI)</b>	<b>(EcoRI – MseI)</b>	<b>(EcoRI – MseI)</b>
<b>A) ACA – CTG</b>	<b>E) AAG – CTA</b>	<b>I) ACC – CTG</b>
<b>B) ACT – CTG</b>	<b>F) AAG – CTC</b>	<b>J) AGC – CAT</b>
<b>C) ACT – CTT</b>	<b>G) AGG – CAT</b>	<b>K) ACC – CAT</b>
<b>D) ACA – CTC</b>	<b>H) ACG – CTG</b>	<b>L) AAC – CTG</b>

Para testar a eficiência de polimorfismo das combinações de iniciadores selecionadas, foi utilizada uma amostra de cDNA de cada variedade de cana-de-açúcar, uma da SP80-1816 e uma da SP83-5073.

## **Análise dos dados do cDNA-AFLP**

Os dados obtidos após a eletroforese das amostras no sequenciador foram analisados com o software *GeneScan Analysis* (Applied Biosystems), que coleta os dados obtidos dos produtos amplificados do gel de eletroforese e com o *Genotyper DNA Fragment Analysis* (Applied Biosystems), que usa como fonte de análise os dados obtidos através do software *GeneScan Analysis*, gerando eletroferogramas e tabelas binárias de presença (1) e ausência (0) de fragmentos.

As etapas de amplificação pré-seletiva, seletiva, aplicação das amostras no sequenciador e análise dos dados foram repetidas cinco vezes para os iniciadores que obtiveram um melhor desempenho quanto à quantidade de fragmentos polimórficos.

## **Reamplificação do fragmento**

Após a identificação dos fragmentos expressos apenas na variedade resistente, as amostras foram aplicadas em um gel de poliacrilamida 6% e coradas com prata de acordo com o protocolo descrito por CRESTE et al. (2001). Os fragmentos foram excisados, ressuspendidos em 50  $\mu$ L de tampão Taq 1X *Taq Buffer with KCl* (Fermentas) e aquecidos a 95° C por 20 min. Os fragmentos foram reamplificados utilizando uma alíquota de 5  $\mu$ L do ressuspendido juntamente com 0,5  $\mu$ L de cada iniciador específico utilizado no cDNA-AFLP, 2,5  $\mu$ L do tampão 10X *Taq Buffer with KCl* (Fermentas), 2  $\mu$ L de dNTP (10 mM de cada dNTP), 1  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2,5 U de Taq DNA Polimerase (Fermentas) e água estéril milliQ para um volume final de 25  $\mu$ L. Os parâmetros de amplificação para o termociclador foram os mesmos utilizados na amplificação seletiva do cDNA-AFLP (**Tabela 2**).

O produto de PCR contendo os fragmentos reamplificados foi purificado com o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean up system* (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. Após a purificação foi determinada a concentração e pureza do produto amplificado através da leitura da absorbância no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) nos comprimentos de onda de 260 nm, 280 nm e 230 nm.

## Clonagem

A clonagem foi realizada com o vetor *pGEM-T Easy Vector Systems* (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. Foi utilizada uma alíquota do produto da PCR purificado do fragmento, conforme os cálculos recomendados do fabricante que leva em consideração o tamanho do fragmento, 5 µL do Tampão de ligação 2x, 50ng do vetor, 3 U da enzima T4 DNA ligase e água estéril milliQ para um volume final de 10 µL. A reação foi mantida a 16 °C por 14 horas. Em seguida, os plasmídios recombinantes foram utilizados para transformar células competentes de *E. coli* (cepa DH10B) por eletroporação.

Para a transformação, foram utilizados 4 µL da reação de ligação e 40 µL de células competentes. As células foram transformadas em cubetas de eletroporação com fenda 0,2 cm (BioRad), utilizando uma descarga elétrica de 200 Ohm de resistência, 25 µF de capacitância e voltagem de 2,5 KV/cm (BioRad Gene Pulser). Em seguida, as células foram transferidas para 1,0 mL de meio de cultura SOC (1000 µL de SOB, 40 µL de glicose 20% e 40 µL de MgCl 1M) e incubadas a 37 °C por 1 h sob agitação de 150 rpm. Após esta incubação, a cultura foi espalhada em placa com meio LB sólido contendo carbenicilina 50 µg/mL, X-Gal e IPTG. As colônias contendo vetor com DNA clonado (cor branca) foram selecionadas, inoculadas em placas tipo ELISA contendo 200 µL de meio TY com 8% de glicerol e carbenicilina (50 µg/mL), incubadas a 37 °C por 16 h e em seguida foram estocadas a -80 °C.

## Sequenciamento

Para extração do DNA plasmidial para o sequenciamento do fragmento clonado foi utilizado o método de lise alcalina descrito por SAMBROOK et al. (1989).

O sequenciamento foi feito pelo método de terminação da cadeia por didesoxinucleotídeo (SANGER et al., 1977), utilizando-se a química do *BigDye Terminator* (Applied Biosystems). A reação de sequenciamento foi realizada em microplacas com 100 ng de DNA plasmidial, 2 µL de Tampão *Save Money* (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM Tris-HCl pH 9,0), 1 µL do iniciador de sequenciamento M13 *Forward*



ou M13 *Reverse* (10 pmoles/ $\mu$ L), 2  $\mu$ L do BigDye Terminator e água estéril milliQ para um volume final de 10  $\mu$ L. As amostras foram submetidas ao seguinte ciclo de amplificação (PCR) em termociclador: 96 °C por 2 minutos e 36 ciclos de desnaturação (96 °C por 45 segundos), anelamento do iniciador (58 °C por 30 segundos) e extensão (60 °C por 1 minuto), seguidos finalmente por uma temperatura de 4°C por tempo indeterminado.

A lavagem do produto da reação de amplificação foi feita adicionando-se 80  $\mu$ L de isopropanol 75% e mantendo as amostras a 24 °C por 15 minutos, após o que foram então centrifugadas a 3.040 x g por 45 minutos a 24 °C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado de DNA foi adicionado 200  $\mu$ L de etanol 70% para remoção do sal residual. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 3.040 x g por 10 minutos a 24 °C. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram secas por 10 minutos em dessecador submetido a vácuo (bomba de vácuo). Foram adicionados 10  $\mu$ L de formamida, as amostras foram desnaturadas a 95 °C por 5 minutos e colocadas imediatamente no gelo, e, em seguida, foram aplicadas em um sequenciador ABI 3100 (Applied Biosystems).

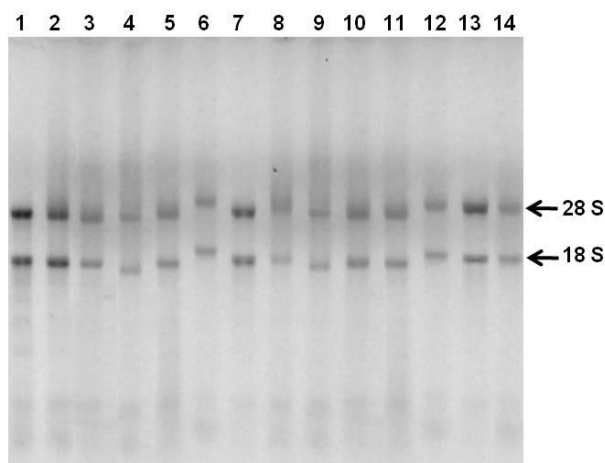
### **Análise dos fragmentos exclusivos da variedade resistente**

As sequências de nucleotídeos dos fragmentos expressos exclusivamente na variedade resistente foram analisadas pelos programas Phred (EWING et al., 1998; EWING & GREEN, 1998) e Phrap (GREEN, 1996) para a verificação da qualidade das sequências e, em seguida, foram promovidas análises utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (Blastx) (ALTSCHUL et al, 1990) para a identificação de homologias com sequências de proteínas já descritas na base de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Também foram realizadas buscas em bancos de dados públicos de EST (Etiquetas de Sequências Expressas), proteínas, motivos e domínios de proteínas como o SUCEST (<http://sucest.lad.dcc.unicamp.br/en/>) (VETTORE et al., 2001), Expasy, (<http://expasy.org/>), UniProt, (<http://www.uniprot.org/>), PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) e ProDom (<http://prodom.prabi.fr/prodom/current/html/home.php>).

#### IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### **Integridade e pureza do RNA extraído.**

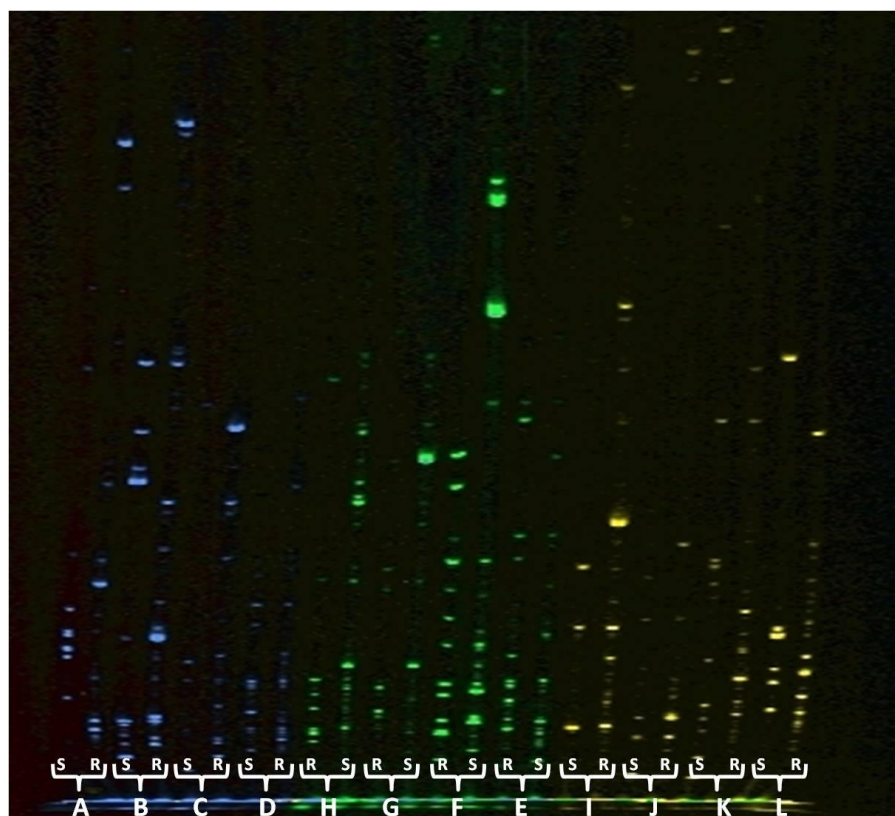
A análise da integridade do RNA total das amostras através de eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) desnaturante (contendo formaldeído) mostrou que, baseado na presença e quantidade relativa das bandas dos RNAs ribossômicos (rRNAs) 28S e 18S, pode-se afirmar que o RNA obtido de todas as amostras está íntegro (**Figura 1**). Além da visualização em gel de agarose, as amostras tiveram a absorbância determinada a 260 nm, 280 nm e 230 nm para verificar a concentração e a pureza do RNA em cada amostra. A razão  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  das amostras variou entre 1,8 e 2,0 e a razão  $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$  apresentou valores próximos de 2,0 (resultados não apresentados). De acordo com SAMBROOK et al. (1989), soluções puras de RNA (ou DNA) apresentam valor de  $A_{260\text{nm}}$  duas vezes maior que de  $A_{280\text{nm}}$ , dando uma relação  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  igual a 2,0. Assim, soluções de RNA (ou DNA) que apresentem valores desta razão entre 1,8 e 2,0 são consideradas livres de proteína e de outros contaminantes. Pode-se concluir então que os RNAs extraídos e utilizados nos experimentos estavam íntegros e puros.



**Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose, em condições desnaturantes, de RNA total extraído de raízes de cana-de-açúcar em diferentes períodos sob ataque da cigarrinha-das-raízes. Em cada canaleta do gel foi aplicado 1,0 µg de RNA total e a corrida procedeu-se a 88 V durante 1,5 horas. (1) SP80-1816 antes da infestação; (2) SP80-1816 1 d.a.i. (controle); (3) SP80-1816 1 d.a.i. (infestada); (4) SP83-5073 antes da infestação; (5) SP83-5073 1 d.a.i. (controle); (6) SP83-5073 1 d.a.i. (infestada); (7) SP80-1816 2 d.a.i. (controle); (8) SP80-1816 2 d.a.i. (infestada); (9) SP83-5073 2 d.a.i. (controle); (10) SP83-5073 2 d.a.i. (infestada); (11) SP80-1816 7 d.a.i. (controle); (12) SP80-1816 7 d.a.i. (infestada); (13) SP83-5073 7 d.a.i. (controle); (14) SP83-5073 7 d.a.i. (infestada). Os rRNAs 28S e 18S estão indicados pelas setas.

### Teste de Iniciadores Seletivos

A partir dos resultados obtidos com os testes preliminares com as 12 combinações de iniciadores seletivos (**Figura 2**), foram escolhidas as três combinações de iniciadores (**Tabela 4**) que apresentaram maior número de fragmentos para se fazer as cinco repetições do cDNA-AFLP.



**Figura 2.** Gel de cDNA-AFLP das 12 combinações de iniciadores seletivos (A a L) testados com uma amostra de cada variedade de cana-de-açúcar utilizada no experimento. (S) variedade suscetível SP80-1816 (controle); (R) variedade resistente SP83-5073 (controle)

**Tabela 4.** Combinações de iniciadores seletivos selecionados para o AFLP.

Combinação	Iniciador EcoRI marcado	Iniciador MseI
B (FAM)	TGA CTG CGT ACC AAT TCA <b>CT</b>	TGA TGA GTC CTG AGT AAC <b>TG</b>
F (JOE)	TGA CTG CGT ACC AAT TCA <b>AG</b>	TGA TGA GTC CTG AGT AAC <b>TC</b>
I (NED)	TGA CTG CGT ACC AAT TCA <b>CC</b>	TGA TGA GTC CTG AGT AAC <b>TG</b>

### cDNA-AFLP

A técnica de cDNA-AFLP foi realizada a partir das combinações de iniciadores seletivos B (ACT – CTG), F (AAG – CTC) e I (ACC – CTG). Foram realizadas cinco repetições dos géis de cDNA-AFLP para cada combinação de iniciadores selecionados. A combinação de iniciadores B gerou 68, 61, 70, 38 e 33 padrões de fragmentos

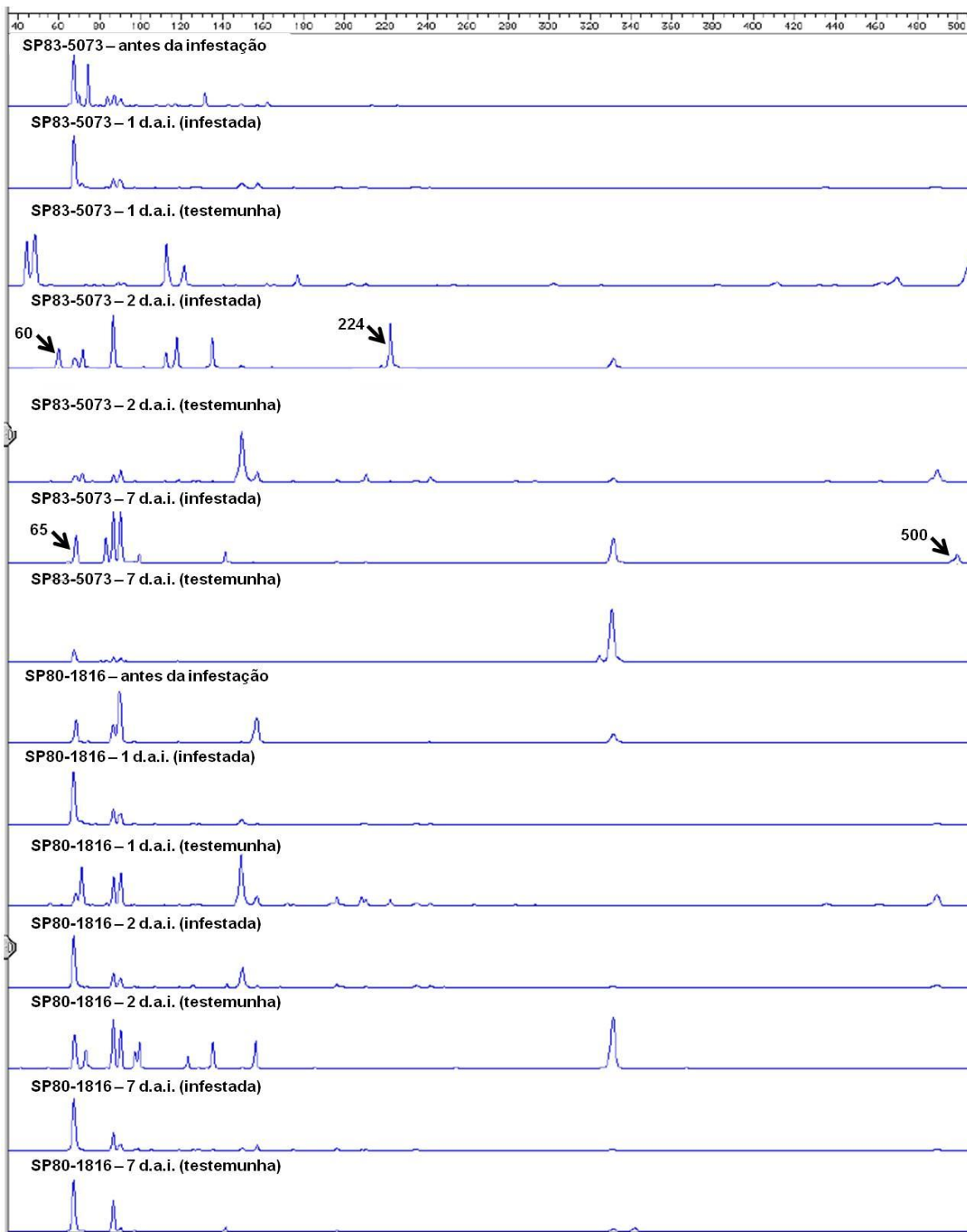
expressos, a combinação de iniciadores F gerou 62, 46, 33, 36, 25 padrões de fragmentos expressos e a combinação de iniciadores I gerou 55, 29, 33, 23, 23 padrões de fragmentos expressos, respectivamente, nas repetições de 1 a 5. Dentre todos os padrões de fragmentos expressos foram encontrados 16 fragmentos exclusivos na variedade resistente (SP83-5073), onde quatro fragmentos estavam presentes em três repetições e 12 fragmentos em duas repetições.

Na combinação B foram encontrados seis fragmentos expressos exclusivamente na variedade resistente (SP83-5073) na condição infestada (**Figuras 3 e 4**). Os fragmentos de 60, 178, 224 e 280 pb foram expressos no 2º dia após a infestação e os fragmentos de 65 e 500 pb foram expressos no 7º dia após a infestação.

Na combinação F foram encontrados seis fragmentos expressos exclusivamente na variedade resistente (SP83-5073) na condição infestada (**Figuras 5 e 6**). Os fragmentos de 60, 70, 77, 113 e 201 pb foram expressos no 2º dia após a infestação e somente o fragmento de 92 pb foi expresso no 7º dia após a infestação.

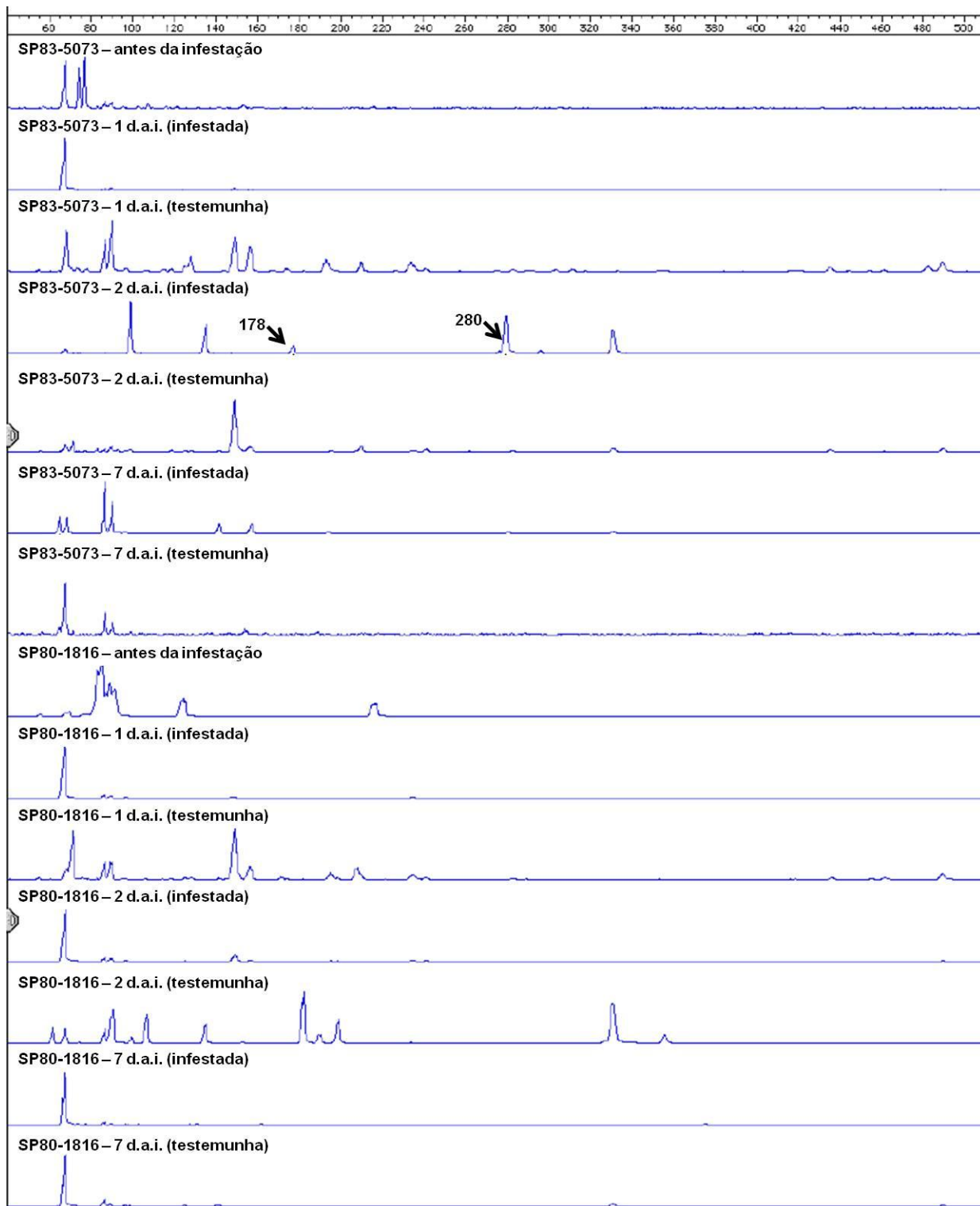
Na combinação I foram encontrados quatro fragmentos expressos exclusivamente na variedade resistente (SP83-5073) na condição infestada (**Figuras 7 e 8**), onde todos os fragmentos foram expressos no 7º dia após a infestação. Os fragmentos possuem 69, 85, 129 e 182 pb.

### Tamanho do Fragmento (pb)



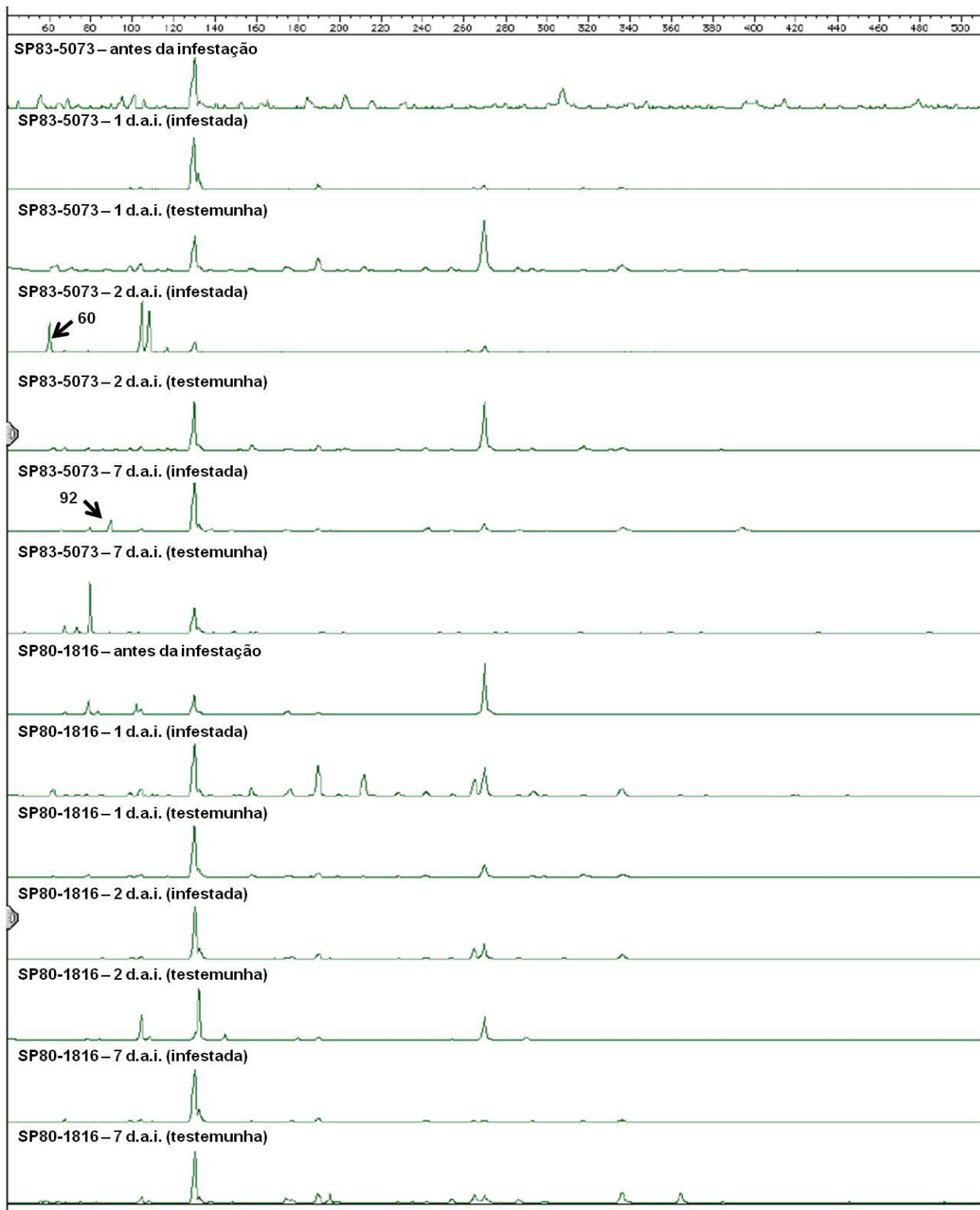
**Figura 3.** Eletroferograma resultante da repetição 2 do cDNA-AFLP com a combinação B de iniciadores seletivos analisado com o software *Genotyper DNA Fragment Analysis*. Os picos referentes aos fragmentos de 60, 65, 224 e 500 pb estão indicados pelas setas.

### Tamanho do Fragmento (pb)



**Figura 4.** Eletroferograma resultante da repetição 4 do cDNA-AFLP com a combinação B de iniciadores seletivos analisado com o software *Genotyper DNA Fragment Analysis*. Os picos referentes aos fragmentos de 178 e 280 pb estão indicados pelas setas.

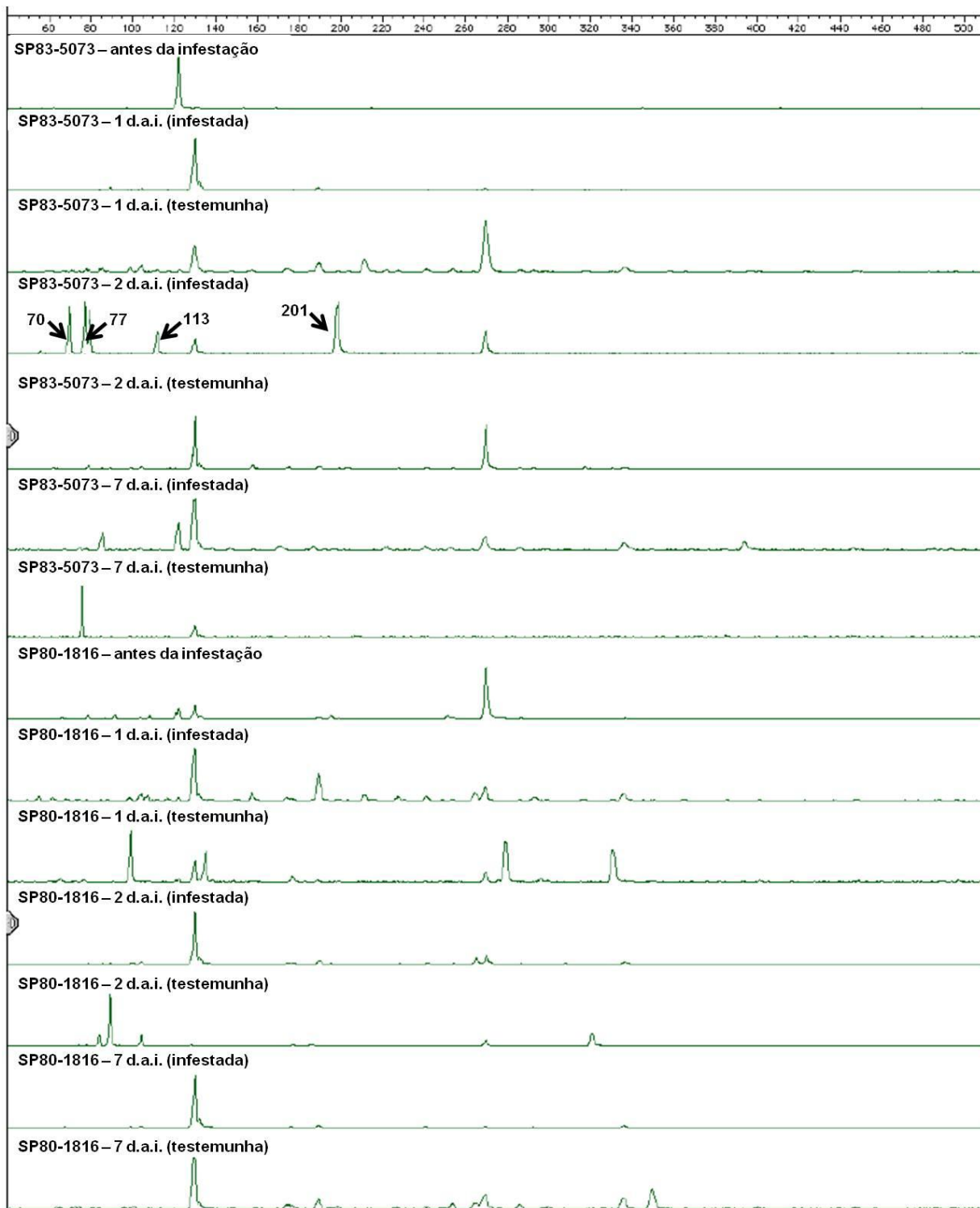
### Tamanho do Fragmento (pb)



**Figura 5.** Eletoferograma resultante da repetição 3 do cDNA-AFLP com a combinação F de iniciadores seletivos analisado com o software *Genotyper DNA Fragment Analysis*. Os picos referentes aos fragmentos de 60 e 92 pb estão indicados pelas setas.

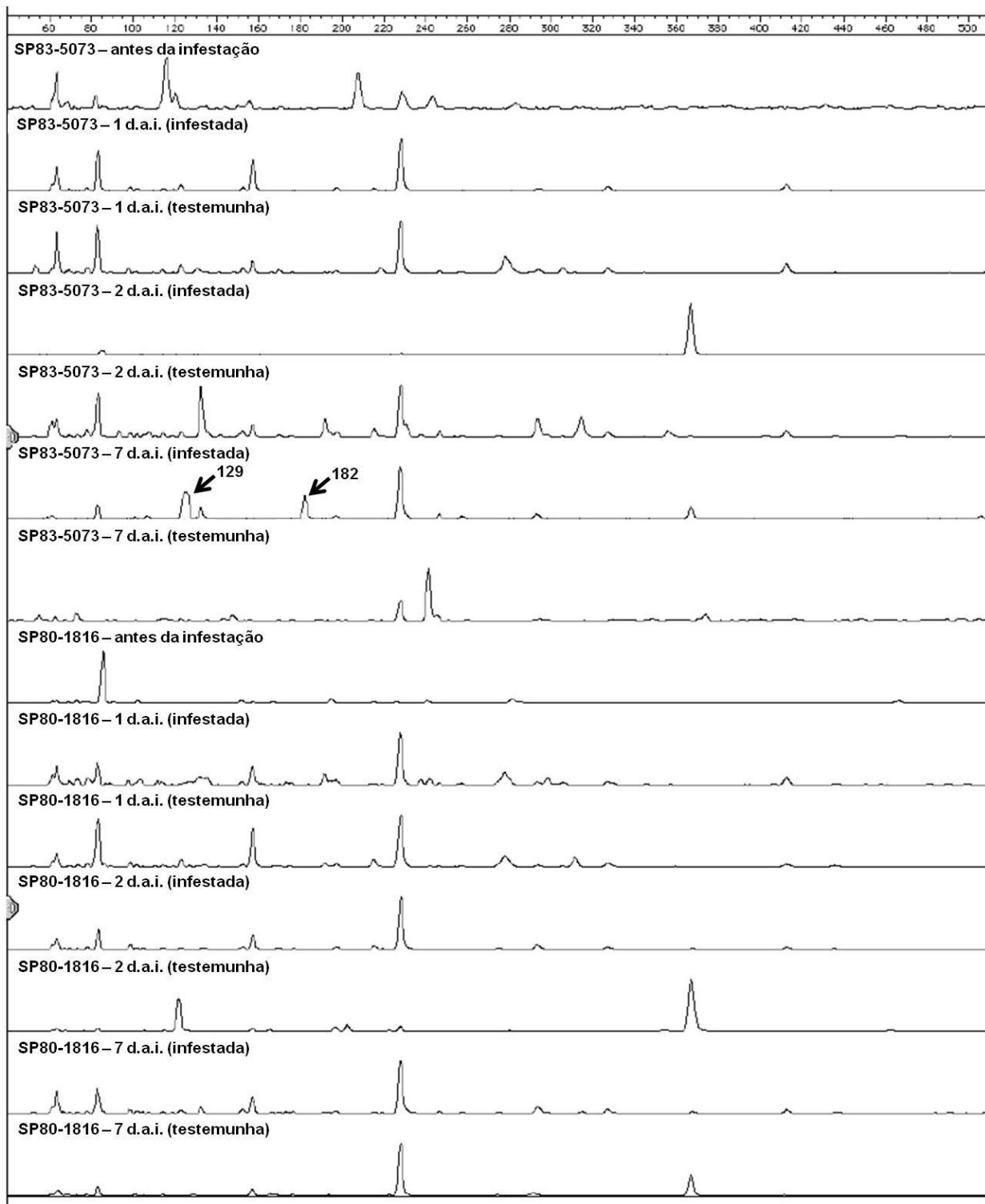


### Tamanho do Fragmento (pb)



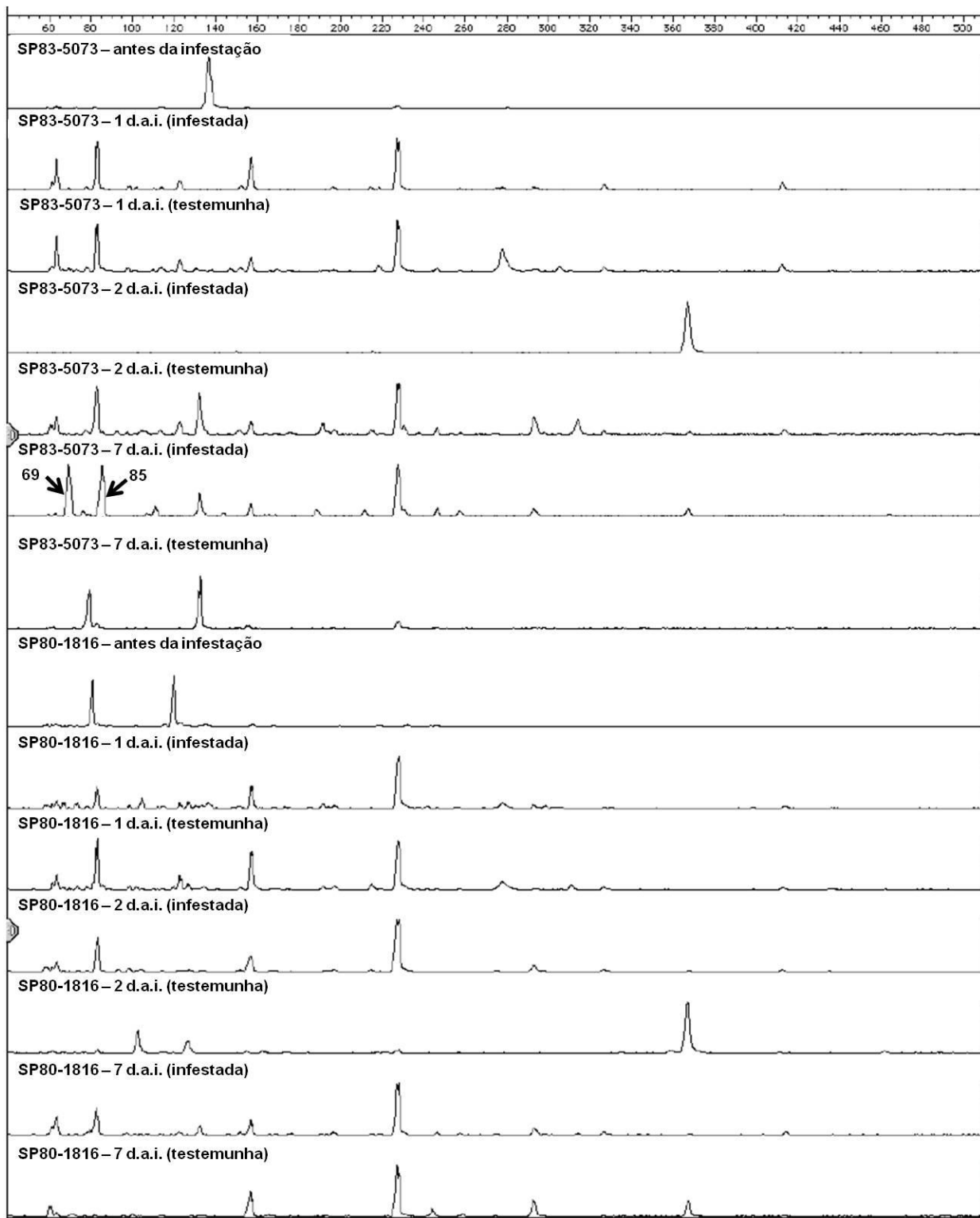
**Figura 6.** Eletroferograma resultante da repetição 4 do cDNA-AFLP com a combinação F de iniciadores seletivos analisado com o software *Genotyper DNA Fragment Analysis*. Os picos referentes aos fragmentos de 70, 77, 113 e 201 pb estão indicados pelas setas.

### Tamanho do Fragmento (pb)



**Figura 7.** Eletroferograma resultante da repetição 2 do cDNA-AFLP com a combinação I de iniciadores seletivos analisado com o software *Genotyper DNA Fragment Analysis*. Os picos referentes aos fragmentos de 129 e 182 pb estão indicados pelas setas.

### Tamanho do Fragmento (pb)



**Figura 8.** Eletróferograma resultante da repetição 4 do cDNA-AFLP com a combinação I de iniciadores seletivos analisado com o software *Genotyper DNA Fragment Analysis*. Os picos referentes aos fragmentos de 69 e 85 pb estão indicados pelas setas.

Todos os fragmentos expressos exclusivamente na variedade resistente foram encontrados no 2º (nove fragmentos) e no 7º (sete fragmentos) dia após a infestação, sugerindo uma provável resposta desta variedade de cana-de-açúcar à infestação de cigarrinha-das-raízes. GUIMARÃES (2007), comparando estas mesmas duas variedades de cana-de-açúcar, encontrou dois fragmentos (389 e 397 pb) expressos somente na variedade resistente após 24 h e 48 h da infestação, sugerindo que os genes referentes a esses fragmentos poderiam estar envolvidos em mecanismos de defesa do genótipo resistente, uma vez que foram expressos pouco tempo após a infestação.

Dos 16 fragmentos expressos exclusivamente na variedade resistente, sete fragmentos foram recuperados de um gel de poliacrilamida, reamplificados, clonados e sequenciados. Os sete fragmentos recuperados foram os de 178, 280 e 224 pb da combinação de iniciadores B, os de 92, 113 e 201 pb da combinação de iniciadores F e o de 129 pb da combinação de iniciadores I. A sequência de nucleotídeos obtida após o sequenciamento de cada um dos sete fragmentos está apresentada na **Tabela 5**.

Uma busca no banco de dados de proteínas do NCBI utilizando a ferramenta Blastx (ALTSCHUL et al., 1990) revelou que apenas a sequência do fragmento de 129 pb apresentou homologia com proteína já descrita. Os demais fragmentos não apresentaram homologia com proteínas já descritas e também não apresentaram homologia com sequências do banco de dados de EST e nem com os bancos de dados de motivos e domínios de proteínas, sugerindo que possam codificar proteínas que ainda não foram descritas e que estejam relacionadas com a resistência à *Mahanarva fimbriolata* da variedade de cana-de-açúcar SP83-5073.

O resultado obtido com a ferramenta Blastx para o fragmento de 129 pb foi de homologia com uma proteína putativa associada à senescência (*putative senescence-associated protein*), com *E value* de 2e-05 (**Tabela 6**) e fase de leitura +3. A tradução da sequência de nucleotídeos do fragmento de 129, na fase de leitura +3, foi obtida com o programa *Transeq* presente no *European Bioinformatics Institute* (EBI) (<http://www.ebi.ac.uk/>). A comparação entre a sequência de aminoácidos codificada pelo fragmento de 129 pb e 52 sequências presentes no NCBI com as quais ela apresentou homologia, revelou que a homologia é com um domínio de proteína

associado à senescência (ProDom: PD874509), o qual é apresentado na **Figura 9**. Dos 29 aminoácidos que constituem o domínio, o fragmento possui 24 idênticos e em sequência (do 2 ao 25).

Em termos de sequência de nucleotídeos, o fragmento de 129 pb, quando comparado com as sequências de nucleotídeo dos homólogos de milho, ervilha e soja, apresentou homologia em toda a extensão da sequência, apresentando apenas uma deleção em relação às demais sequências e 30 troca de bases (23,3%) (**Figura 10**).

**Tabela 5.** Sequência de nucleotídeos dos fragmentos diferencialmente expressos na variedade resistente (SP83-5073) em resposta ao ataque de *Mahanarva fimbriolata*.

<b>Fragmento</b>	<b>Sequência de Nucleotídeos</b>
<b>Combinação B</b>	
178	TGACTGCGTACCAATTCAGTACCTAAGACTTCCCAGGCTCCAGTGTTTTTCATT ACACAAAATAATACATTTTCCTTCTTGCTTAGGCTATTTTTAGTTTTGCAGCCCA AACATCTTCCCAGATACAAATTTTCATGTACTTTCGACAAAAGTGAAGTTCAGTTA CTCAGGACTCATCA
280	TGATGAGTCCTGAGTAACTGGTCTACAATTTGGTATGAATCCAGAGAAGTCAAC CATTACCAAAGTAAAGATTAGGGTCTGGGTCAAGGGAATGAAGATGAGGAGAAC AGACATGCACAAGAGCAAGAGAATGACACCAAGATAGCAGACAGGGGTCCAAC CAGAGGTCAGGTGTGAAAAGAACTAAAGCTAGGAGCAAGGAAGGTAAGGAGCT GAAGCTTTTAGTTGCAGCAAAGGCTAACAGGGCTCCTGAGTGTGAGCAGTGAA TTGGTACGCAGTCA
224	TGATGAGTCCTGAGTAACTGGCTGTGATTTTCGTAGTTACTGGCTGCCTAGTAAC TAGACTCTGGCACCCAGCTACCTAGTTTTGACTCCTGACTCTGTCACTAATTAG CTGAATAGCCAGGGACCAGTGACTTCTCTGTGCTTCTATAAAATGGGGAAGGT GGTGATGACAGATAACTGTCTCATACCATGGCATTGGGATTGAGTGAATTGGT ACGCAGTCA
<b>Combinação F</b>	
92	TGATGAGTCCTGAGTAACTCCGACACTCGTGATTCCGCCTTCGAAAGCAAATCT CGCATCATTTGGGGAGAGCTTGAATTGGTACGCAGTCA
113	TGATGAGTCCTGAGTAACTCCTATATCAATTTGTTTGAAGAACAGATGACACTTT GAATGGCCCAGCCCACAGCCCAGAATTTCAAGGGAAGACCTTGAATTGGTACG CAGTA
201	TGATGAGTCCTGAGTAACTCCTCCGCAATCGCGCTGGCAAAGCCTTGGTGCTT TTCTTCATAGGCTTGGGCATTTTGGATTTTCTTTGGGGTATAGACCCTGGTTTC GTAATACCCCGCCAGCGCATAAAGGGCCAACACTTCTTCTTGGCTGGCTTGAC CGATGCGCTCTTGCAGTGGTCTTGAATTGGTACGCAGTCA
<b>Combinação I</b>	
129	TGATGAGTCCTGAGTAACTGGCTTGTGGCAGCCAAGCGTTCATAGCGACGTTG CTTTTTGATCCTTCGATGTGGCTCTTCTATTGGTGGGTGAACAATCCAACAC TTGGTGAATTGGTACGCAGTCA

**Tabela 6.** Resultado do Blastx da sequência de nucleotídeos do fragmento de 129 pb contra o banco de proteínas do NCBI. Apenas os resultados onde o organismo é uma planta são apresentados.

<b>Número de Acesso</b>	<b>Descrição</b>	<b>Max score</b>	<b>E value</b>
BAB33421.1	putative senescence-associated protein [ <i>Pisum sativum</i> ]	52.4	2e-05
ACA30301.1	putative senescence-associated protein [ <i>Cupressus sempervirens</i> ]	52.4	2e-05
ABO20851.1	putative senescence-associated protein [ <i>Lilium longiflorum</i> ]	52.4	2e-05
AAR25995.1	putative senescence-associated protein [ <i>Pyrus communis</i> ]	52.4	2e-05
BAF01964.1	hypothetical protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	52.4	2e-05
BAF46313.1	putative senescence-associated protein [ <i>Ipomoea nil</i> ]	52.4	2e-05
ACA04850.1	senescence-associated protein [ <i>Picea abies</i> ]	52.4	2e-05
ABX10793.1	putative senescence-associated protein [ <i>Glycine max</i> ]	52.4	2e-05
XP_002337629.1	predicted protein [ <i>Populus trichocarpa</i> ]	52.4	2e-05
XP_002338057.1	predicted protein [ <i>Populus trichocarpa</i> ]	52.4	2e-05
ACR36970.1	unknown [ <i>Zea mays</i> ]	52.4	2e-05

```

Picea_abies -----
Arabidopsis_thaliana -----
Zea_mays -----
Micromonas_pusilla -----
Perkinsus_marinus -----
Pisum_sativum TAGAR IASS PDSDL EAFSHNPT HGSFA PLAFQPSAMTNCANQRFLSYVVELLLRHCHQWG 60
129 (pb) -----

Picea_abies -----MIGRADIEGSKSNVAMNAWLPQAS YPCGNF 30
Arabidopsis_thaliana -----MIGRADIEGSKSNVAMNAWLPQAS YPCGNF 30
Zea_mays -----MIGRADIEGSKSNVAMNAWLPQAS YPCGNF 30
Micromonas_pusilla -----MIGRADIEGSKSNVAMNAWLPQAS YPCG-- 28
Perkinsus_marinus -----MIGRADIEGSKSNVAMNAWLPQAS YPCGNF 30
Pisum_sativum KTNLS HDGLIPAHV PYWWVNPTLGEFCFTMIGRADIEGSKSNVAMNAWLPQAS YPCGNF 120
129 (pb) -----TAYQFTKCIWVHPP IGRADIEGSKSNVAMNAWLPQAS Y3GLI- 42
*****

Picea_abies SDTSS FKFRKSKGS IGHA FTVC IRTENQNQMSFYFPVPHE ISVLVELILGHLRYLLTDVP 90
Arabidopsis_thaliana SDTSS FKFRKSKGS IGHA FTVR IRTENQNQT SFYFPVPHE ISVLVELILGHLRYLLTDVP 90
Zea_mays SDTSS FKLRKSKGS IGHA FTVR IRTGNQNT SFYFPVPHE ISVLVELILGHLRYLLTDVP 90
Micromonas_pusilla -----S IGHA FTVR IRTENQNQT SFYFPVPHE ISVLVELILGHLRYLLTDVP 75
Perkinsus_marinus SDTSS CILHRFKGS IGHA FAVCVRTENQNQASFSFFGLRE ISVLT ELTLGHLRYHLTDVP 90
Pisum_sativum SDTSS FKFRSLKDR LATLSRFV FVLEIRIKRAFTLL FHTR FLFSLSSSLGHLRYLLTDVP 180
129 (pb) -----

Picea_abies PQQNS PPDNVFRPDRPVE TCLKAKNRGNAPS PPHGI SKIT LKVVV FHLRRKRLPLILHLS 150
Arabidopsis_thaliana PQQNS PPDNVLRPDRPAE ASLGTENRGCTPP PIHGVSKIT LKVVV FHLRRSSHLSYTSQV 150
Zea_mays PQQNS PPDNVFRPDRPGEAGFW SQEGRCPA SDPRNK----- 127
Micromonas_pusilla PQQNS PPDNVLRPDQLPKQAFG PRTGDD EAFGYLKRVIPT PAVYPRLVE FLHFDIQSTGQ 135
Perkinsus_marinus PQQNS PFENVIYTDWSMQASTVNPKLA TRRAQASA----- 125
Pisum_sativum PQQNS PPDNVFRPDRRETKVSLW IKKEGQRRP PDSRNKLNVRKSSGISTFAVSSSHLSYTS 240
129 (pb) -----

Picea_abies SHFTKSD----- 157
Arabidopsis_thaliana ISQSRTRVKLNRVFPFR----- 167
Zea_mays -----
Micromonas_pusilla KSHCVSIRRDHRNALF----- 151
Perkinsus_marinus -----
Pisum_sativum QVISQSRTRVKLNRVFFPADSAKAVPLLLVSLDSRKGQWEFR 282
129 (pb) -----

```

**Figura 9.** Alinhamento de aminoácidos de seis das 52 sequências que apresentaram homologia com a proteína codificada pelo fragmento de 129 pb. A região do domínio associado à senescência (ProDom: PD874509) é mostrado em destaque (amarelo). Descrição: *Picea abies* (ACA04850.1); *Arabidopsis thaliana* (BAF01964.1); *Zea mays* (milho) (ACR36970.1); *Micromonas pusilla* (EEH50839.1); *Perkinsus marinus* (EER00742.1); *Pisum sativum* (ervilha) (BAB3342.1); 129(pb) fragmento de 129 pb.





está envolvido na regulação de diferentes processos em plantas e foi identificado como sinal de alteração na expressão de genes em resposta a estresses bióticos e abióticos, assim como de estádios distintos de desenvolvimento da planta (CREELMAN & MULLET, 1997; WASTERNAK, 2004, 2006; CHEHAB et al., 2007), senescência (ROUET-MAYER et al. 1992) e resistência a insetos e patógenos (BELL & MULLET, 1993; MELAN et al., 1993; CROFT et al., 1993; SARAVITZ & SIEDOW, 1996; HEITZ et al., 1997; BOHLAND et al., 1997; SILVA, 1999). SILVA et al. (2001) observaram respostas de defesa através da via da lipoxigenase em soja resistente ao fungo *Diaphorte phaseolorum* F. sp. *Meridionalis*. FALCO et al. (2001) também observaram que genes relacionados a biossíntese de ácido jasmônico fazem parte da resposta de cana-de-açúcar à herbivoria.

Um dos promotores do envelhecimento e senescência em plantas é o etileno, um hormônio que também regula os processos de defesa em algumas plantas (BOLLER, 1991; LUND et al., 1998; MATTOO & HANDA, 2004). MORAM et al. (2002) observaram a indução de genes relacionados à biossíntese de etileno em *Arabidopsis thaliana* infestada com pulgão, sugerindo um papel defensivo deste composto na planta. O ataque de duas espécies de pulgões também estimulou a produção de etileno em cevada (ARGANDOÑA et al., 2001).

Alguns genes associados à senescência codificam proteínas relacionadas à defesa da planta que são induzidos durante uma resposta hipersensitiva, que é um mecanismo de defesa contra fitopatógenos (QUIRINO et al., 1999; GEPSTEIN et al., 2003). A infecção das plantas por bactérias ou fungos patogênicos também induz genes que são expressos em níveis elevados durante a senescência, como em *Arabidopsis thaliana*, onde a expressão de um gene que codifica uma metalotioneína putativa associada à senescência, foi detectada durante a resposta hipersensitiva induzida por bactérias e fungos que induzem sintomas necróticos (BUTT et al., 1998). Em tabaco, a expressão de uma protease de cisteína, uma proteína associada à senescência, é induzida durante a resposta hipersensitiva contra vírus e bactérias (PONTIER et al., 1999). Em dois mutantes alélicos de *Arabidopsis thaliana* foi observada uma aceleração na senescência e resposta espontânea de defesa contra patógenos, apoiando uma ligação entre estes processos (YOSHIDA et al., 2002).

A cigarrinha-das-raízes é um inseto sugador assim como o pulgão. PEGADARAJU et al. (2005) observaram que o aumento de genes associados à senescência promove uma maior resistência contra o pulgão *Myzus persicae* (SULZER, 1776) em *Arabidopsis thaliana*. Em cevada (*Hordeum vulgare*), a resistência ao pulgão do trigo russo foi acompanhada pela ativação da morte celular nas cultivares resistentes (BELEFANT-MILLER et al., 1994).

GUIMARÃES (2007), em seu estudo de resistência genotípica e interação planta-praga em cana-de-açúcar atacada por cigarrinha-das-raízes, utilizando a variedade de cana-de-açúcar SP80-1816 (suscetível) e a SP83-5073 (resistente) conseguiu identificar por meio da técnica de cDNA-AFLP dois fragmentos (389 e 397 pb) que foram expressos somente na variedade resistente à praga. Devido aos fortes indícios de resistência observados em sua análise de crescimento, mortalidade do inseto e longevidade de ninfas, postulou que esses fragmentos poderiam estar envolvidos com a resistência genética da variedade por meio de um mecanismo de antibiose. Nenhuma das sequências obtidas neste trabalho tem homologia com as duas sequências obtidas por GUIMARÃES (2007) (informação pessoal).

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que os 16 fragmentos encontrados apenas na variedade resistente, principalmente o fragmento de 129 pb, podem representar genes que estejam envolvidos com mecanismos de resistência da variedade de cana-de-açúcar SP83-5073 contra a cigarrinha-das-raízes. Entretanto, estudos adicionais se fazem necessários para esta comprovação.

## V. CONCLUSÕES

As duas variedades de cana-de-açúcar estudadas, SP80-1816 (suscetível) e a SP83-5073 (resistente), possuem padrões diferentes de expressão gênica em resposta ao ataque da cigarrinha-das-raízes.

O fragmento gênico de 129 pb, que codifica uma proteína putativa associada à senescência, encontrado apenas na variedade resistente, provavelmente está relacionado à defesa da variedade de cana-de-açúcar SP83-5073 ao ataque da cigarrinha-das-raízes.

Os fragmentos gênicos de 92, 113, 178, 201, 224 e 280 pb podem codificar proteínas não descritas e fazerem parte do mecanismo de defesa da variedade de cana-de-açúcar SP83-5073 ao ataque da cigarrinha-das-raízes.

## VI. REFERÊNCIAS

ADAMS, M. D.; KELLEY, J. M.; GOCAYNE, J. D.; DUBNICK, M.; POLYMEROPOULOS, M. H.; XIAO, H.; MERRIL, C. R.; WU, A.; OLDE, B.; MORENO, R. F.; KERLAVAGE, A. K.; McCOMBIE, W. R.; VENTER, J. C. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. **Science**, Washington, v. 252, p. 1651-1656, 1991.

ALBA, R.; FEI, Z.; PAYTON, P.; LIU, Y.; MOORE, S. L.; DEBBIE, P.; COHN, J.; D'ASCENZO, M.; GORDON, J. S.; ROSE, J. K. C.; MARTIN, G.; TANKSLEY, S. D.; BOUZAYEN, M.; JAHN, M. M.; GIOVANNONI, G. ESTs, cDNA microarrays, and gene expression profiling: tools for dissecting plant physiology and development. **The Plant Journal**, Oxford, v. 39, n. 5, p. 697-714, 2004.

ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A.; SANTOS, A. S.; ALVES, S. B.; ANDRADE, O. Controle de cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Homoptera: Cercopidae) com *Metarhizium anisopliae* em sistema de cultivo orgânico. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 8., 2002, Recife. **Resumos...** Recife: STAB, 2002. p. 79-83.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403-410, 1990.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998, p. 289-381.

ALVES, S. B.; LOPES, R. B. Controle biológico de pragas em pastagens. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 23, 2006, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2006. p. 395-412.

ANSTEAD, J.; SAMUEL, P.; SONG, N.; WU, C.; THOMPSON, G. A.; GOGGIN, F. Activation of ethylene-related genes in response to aphid feeding on resistant and susceptible melon and tomato plants. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 134, p. 170-181, 2010.

ARGANDOÑA, V. H. Effect of aphid infestation on enzyme activities in barley and wheat. **Phytochemistry**, Oxford, v. 35, p. 313-315, 1994.

AUAD, A. M.; SIMÕES, A. D.; PEREIRA, A. V.; BRAGA, A. L. F.; SOUZA-SOBRINHO, F.; LÉDO, F. J. S., PAULA-MORAES, S. V.; OLIVEIRA, S. A.; FERREIRA, R. B. Seleção de genótipos de capim-elefante quanto à resistência à cigarrinha-das-pastagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, p. 1077-1081, 2007.

AZZI, G. M.; DODSON, A. K. Infestação de cigarrinha-da-raiz em canaviais de Piracicaba-SP (*Mahanarva fimbriolata* Stål). **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, n. 5, p. 36-42, 1971.

BACHEM, C. W.; VAN DER HOEVEN, R. S.; DE BRUIJN, S. M.; VREUGDENHIL, D.; ZABEAU, M.; VISSER, R. G. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA finger-printing based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. **The Plant Journal**, Oxford, v. 9, p. 745-753, 1996.

BACHEM, C. W.; OOMEN R. J. F.; VISSER, R. G. Transcript imaging with cDNA-AFLP: A Step-by-Step Protocol. **Plant Molecular Biology Reporter**, Georgia, v. 16, p. 157-173, 1998.

BALBO JR., W.; MOSSIN, G. C. Ocorrência e tentativa de controle de pragas em cana crua na usina Santo Antônio. In: SEMANA DA CANA-DE-AÇÚCAR DE PIRACICABA, 4., Piracicaba, 1999. **Anais...** Piracicaba: AFOCAPI, 1999. p. 40-42.

BELEFANT-MILLER, H.; PORTER, D. R.; PIERCE, M. L.; MORT, A. J. An early indicator of resistance in barley to Russian wheat aphid. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 105, p. 1289-1294, 1994.

BELL, E.; MULLET, J. E. Characterization of an arabidopsis lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 103, p. 1133-1137, 1993.

BOHLAND, C.; BALKENHOHL, T.; LOERS G.; FEUSSNER I.; GRAMBOW, H. J. Differential induction of lipoxygenases isoforms in wheat upon treatment with rust fungus elicitor, chitin oligosaccharides, chitosan, and methyl jasmonate. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 114, p. 679-685, 1997.

BOLLER, T., Ethylene in pathogenesis and disease resistance, In: MATTOO, A. K.; SUTTLE, J. C. (Ed.). **The Plant Hormone Ethylene**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 293-314.

BOTELHO, P. S. M.; MENDES, A. C.; MACEDO, N.; SILVEIRA NETO, S. Atração da cigarrinha da raiz *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) (Homoptera, Cercopidae), por luzes de diferentes comprimento de onda. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 3, p. 37-42, 1976.

BRENNER, S.; JOHNSON, M.; BRIDGHAM, J.; GOLDA, G.; LLOYD, D. H.; JOHNSON, D. LUO, S.; McCURDY, S.; FOY, M.; EWAN, M.; ROTH, R.; GEORGE, D.; ELETR, S.; ALBRECHT, G.; VERMAAS, E.; WILLIAMS, S. R.; MOON, K.; BURCHAM, T.; PALLAS, M.; DUBRIDGE, R. B.; KIRCHNER, J.; FEARON, K.; MAO, J.; CORCORAN, K. Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, n. 6, p. 630-634, 2000.

BUENO, V. H. P. Aspectos biológicos e ritmo diário das atividades de *Porasilus barbiellinii* predador da cigarrinha-das-pastagens *Deois flavopicta* (Stål, 1854) (Homoptera: Cercopidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 903-915, 1987.

BUTT, A.; MOUSLEY, C.; MORRIS, K.; BEYNON, J.; CAN, C.; HOLUB, E.; GREENBERG, J. T.; BUCHANAN-WOLLASTON, V. Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein gene in *Arabidopsis* in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringae*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 16, p. 209-221, 1998.

CAMINHA FILHO, A. A cigarrinha dos canaviais em Sergipe. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 1, p. 92-97, 1945.

CAMPALANS, A.; PAGES, M.; MESSEGUER, R. Identification of differentially expressed genes by the cDNA-AFLP technique during dehydration of almond (*Prunus amygdalus*). **Tree Physiology**, Victoria, v. 21, p. 633-643, 2001.

CARDONA, C.; FORY, P.; SOTELO, G.; PABON, A.; DIAZ, G.; MILES, J.W. Antibiosis and tolerance to five species of spittlebug (Homoptera: Cercopidae) in *Brachiaria* spp.: Implications for breeding for resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 97, n. 2, p. 635-645, 2004.

CARDONA, C.; MILES, J. W.; SOTELO, G. An improved methodology for massive screening of *Brachiaria* spp. genotypes for resistance to *Aeneolamia varia* (Homoptera: Cercopidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 92, n. 2, p. 490-496, 1999.

CARVALHO, S. M. Preferência de postura de *Deois schach* em relação a diferentes espécies hospedeiras e tipos de solos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 6, p. 631-633, 1985.

CHANNARAYAPPA, C.; SHIVASHANKAR, G.; MUNIYAPPA, V. Resistance of *Lycopersicon* species to *Bemisia tabaci*, a tomato leaf curl virus vector. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 70, p. 2184-2192, 1992.



CHEHAB, E. W.; PEREA, J. V.; GOPALAN, B.; THEG, S.; DEHESH, K.. Oxylipin pathway in rice and *Arabidopsis*. **Journal of Integrative Plant Biology**, Carlton South, v. 49, n. 1, p. 43-51, 2007.

CONAB – **Companhia Nacional de Abastecimento**. 2010. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>> Acesso em: 13 jul. 2010.

COSENZA, G. W. Resistência de gramíneas forrageiras à cigarrinha-das-pastagens *Deois flavopicta* (Stål 1854). **EMBRAPA - CPAC**, Brasília, 1981. 16 p. (Boletim de Pesquisa, 7).

COSENZA, G. W.; ANDRADE, R. P.; GOMES, D. T.; ROCHA, C. M. C. O controle integrado das cigarrinhas-das-pastagens. **EMBRAPA - CPAC**, Brasília, 1982. 6 p. (Comunicado Técnico, 17)

COSENZA, G. W.; ANDRADE, R. P.; GOMES, D. T.; ROCHA, C. M. C. Resistência de gramíneas forrageiras à cigarrinha-das-pastagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 8, p. 961-968, 1989.

COSTA LIMA, A. **Insetos do Brasil**. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, 1942. v. 3, p. 65-80.

CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E. Biosynthesis and action of Jasmonates in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 355-381, 1997.

CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Georgia, v. 19, p. 1-8, 2001.

CROFT, K. P. C.; JUNTTER, F.; SLUSARENKO, A. J. Volatiles products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 101, p. 13-24, 1993.

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

DIATCHENKO, L.; LAU, Y. F.; CAMPBELL, A. P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E. D.; SIEBERT, P. D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 12, p. 6025-6030, 1996.

DINARDO-MIRANDA, L. L. **Cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agronômico, 2003, 72 p.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar. In: SALVADORI, J. R.; ÁVILA, C. J.; SILVA, M. T. B. **Pragas de Solo no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa, 2004, p. 495-516.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Manejo de nematóides e pragas de solo em cana-de-açúcar. In: CAMPOS, A. P.; VALE, D. W.; ARAÚJO, E. S.; CORRADI, M. M.; YAMAUTI, M. S.; FERNANDES, O. A.; FREITAS, S. **Manejo integrado de pragas**. Jaboticabal: FUNEP, 2006, p. 59-80.

DINARDO-MIRANDA, L. L. O papel da retirada da palha no manejo da cigarrinha das raízes. **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 20, n. 5, p. 23. 2002.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; COELHO, A. L.; FERREIRA, J. M. G. Influência da época de aplicação de inseticidas no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae), na qualidade e na produtividade da cana-de-açúcar. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 91-98, 2004a.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; FERREIRA, J. M. G.; DURIGAN, A. M. P. R.; BARBOSA, V. Eficiência de inseticidas e medidas culturais no controle de *Mahanarva fimbriolata* em cana-de-açúcar. **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 18, n. 3, p. 34-36, 2000.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; FERREIRA, J. M. G.; LANDELLE, M. G. A.; BIDÓIA, M. A. P. Infestação de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) em genótipos de cana-de-açúcar colhidos em três épocas. **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 22, n. 4, p. 46-49, 2004b.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; FIGUEIREDO, P.; LANDELL, M. G. A.; FERREIRA, J. M. G.; CARVALHO, P.A.M. Danos causados pelas cigarrinhas-das-raízes (*Mahanarva fimbriolata*) a diversos genótipos de cana-de-açúcar. **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 17, n. 5, p. 48-52, 1999.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; GARCIA, V.; COELHO, A. L. Eficiência de inseticidas no controle da cigarrinha das raízes, *Mahanarva fimbriolata*, em cana-de-açúcar. **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 20, n. 1, p. 30-33, 2001b.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; GARCIA, V.; PARAZZI, V. J. Efeito de inseticidas no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera:Cercopidae) e de nematóides fitoparasitos na qualidade tecnológica e na produtividade da cana-de-açúcar. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 4, p. 909-914, 2002.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; MOSSIN, G. C.; DURIGAN, A. M. P. R.; BARBOSA, V. Controle químico de cigarrinha-das-raízes, *Mahanarva fimbriolata*, em cana-de-açúcar. **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 19, n. 4, p. 20-23, 2001a.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; PIVETTA, J. P.; FRACASSO, J. V. Eficiência de inseticidas no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera:Cercopidae) e seus efeitos sobre a qualidade e produtividade da cana-de-açúcar. **Bioassay**, Piracicaba, v. 1, n. 5, p. 1-5, 2006.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; FERREIRA, J. M. G.; GARCIA JÚNIOR, C. A.; COELHO, A. L.; GIL, M. A. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 743-749, 2004c.

ECKEY, C.; KORELL, M.; LEIB, K.; BIEDENKOPF, D.; JANSEN, C.; LANGEN, G.; KOGEL, K. H. Identification of powdery mildew-induced barley genes by cDNA-AFLP: functional assessment of an early expressed MAP kinase. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 55, n. 1, p. 1-15, 2004.

EL-KADI, M. K. Novas perspectivas no controle de cigarrinhas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 4., Goiânia, 1977. **Resumos...** Goiânia: SEB, 1977, p.58-67.

EWING, B.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, New York, v. 8, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER L.; WENDL M. C.; GREEN P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, New York, v. 8, p. 175-185, 1998.

FALCO, M. C.; MARBACH, P. A. S.; POMPERMAYER, P.; LOPES, F. C. C.; SILVA-FILHO, M. C. Mechanisms of sugarcane response to herbivory. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, n. 1-4, p. 113-122, 2001.

FERNANDES, M. E. S.; SILVA, D. J. H.; FERNANDES, F. L.; PICANÇO, M. C.; GONTIJO, P. C.; GALDINO, T. V. S. Novos acessos de tomateiro resistentes à mosca-branca biótipo B. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 11, p. 1545-1548, 2009.

FEWKES, D. W. The biology of sugar cane froghoppers. In: WILLIAMS, J. R.; METCALFE, J. R.; MUNGOMERY, R. W.; MATHES, R. **Pests of sugar cane**. Amsterdam: Elsevier Publishing, 1969, p. 281-307.

FREIRE, A. M.; SOUTO, C. E. R.; MARQUES, E. J. Combate biológico das cigarrinhas da cana-de-açúcar. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 71, n. 4, p. 41-44, 1968.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. ed. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GARCIA, J. F.; BOTELHO, P. S. M.; PARRA, J. R. P. Biology and fertility life table of *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) in sugarcane. **Scientia agrícola**, Piracicaba, v. 63, n. 4, 2006a.

GARCIA, J. F.; GRISOTO, E.; VENDRAMIM, J. D.; BOTELHO, P. S. M. Bioactivity of Neem, *Azadirachta indica*, Against Spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae) on Sugarcane. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, n. 6, p. 2010-2014, 2006b.

GARCIA, J. F. **Bioecologia e manejo da cigarrinha das raízes, *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) (Hemiptera: Cercopidae), em cana de açúcar**. 2006. 99 f. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

GARCIA, J. F. **Técnica de criação e tabela de vida de *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) (Hemiptera: Cercopidae)**. 2002. 59 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

GEPSTEIN, S.; SABEHI, G.; CARP, M. J.; HAJOUJ, T.; NESHER, M. F.; YARIV, I.; DOR, C.; BASSANI, M. Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. **The Plant Journal**, Oxford, v. 36, p. 629-642, 2003.

GONÇALVES, T. D. **Danos causados por *Mahanarva fimbriolata* em cana-de-açúcar: reflexos na qualidade da matéria-prima e fermentação etanólica.** 2003. 51 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

GONÇALVES, T. D.; MUTTON, M. A.; PEREIRA, D.; CAMPANHÃO, J. M.; MUTTON, M. J. R. Qualidade da matéria-prima em função de diferentes níveis de danos promovidos pela cigarrinha-das-raízes. **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 22, n. 2, p. 29-33, 2003.

GREEN, P. **PHRAD documentation.** 1996. Disponível em: <<http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>>. Acesso em: 13 mar. 2010.

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

GUAGLIUMI, P. As cigarrinhas dos canaviais no Brasil. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 72, n. 3, p. 34-43, 1968.

GUAGLIUMI, P. Cigarrinha da raiz. In: GUAGLIUMI, P.(Ed.). **Pragas da cana-de-açúcar. Nordeste do Brasil.** Rio de Janeiro: IAA, 1973. p. 69-103 (Coleção canavieira, 10).

GUIMARÃES, E. R. **Cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar: resistência genotípica e interação planta-praga.** 2007. 53 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

HEITZ, T.; BERGEY, D. R.; RYAN, C. A. A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 114, p. 1085-1093, 1997.

HESLER, L. S. Resistance to *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) in three triticale accessions. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 98, p. 603-610, 2005.

HORSFIELD, D. Evidence for xylem feeding by *Philaenus spumarius* L. (Homoptera: Cercopidae). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 24, p. 95-99, 1978.

KOLLER, W. W.; VALÉRIO, J. R. Preferência de cigarrinhas-das-pastagens por plantas de *Brachiaria decumbens* STAPF cv. Basilisk com diferentes características morfológicas. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 16, n. 1, p. 131-143, 1987.

LAM, E.; SHINE JR, J.; DA SILVA, J.; LAWTON, M.; BONOS, S.; CALVINO, M.; CARRER, H.; SILVA-FILHO, M. C.; GLYNN, N.; HELSEL, Z.; MA, J.; RICHARD JR, E.; SOUZA, G. M., MING, R. Improving sugarcane for biofuel: engineering for an even better feedstock. **Global Change Newsletter**, Stockholm, v. 1, p. 251-255, 2009.

LAO, M.; ARENCIBIA, A. D.; CARMONA, E. R.; ACEVEDO, R.; RODRIGUEZ, E.; LEON, O.; SANTANA, I. Differential expression analysis by cDNA-AFLP of *Saccharum* spp. after inoculation with the host pathogen *Sporisorium scitamineum*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, n. 6, p. 1103-1111, 2008

LAPOINTE, S. L.; SONODA, R. M. The effect of arthropods, disease, and nematodes on tropical pastures. In: SOTOMAYOR-RÍOS, A.; PITMAN, W. D. (Ed.). **Tropical forage plants: development and use**. Boca Raton: CRC Press, 2001. p. 201-218.

LARA, F. M. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. 2. ed. São Paulo: Ícone, 1991. 336 p.

LEITE, L. G. **Ocorrência, produção e preservação de micélio seco de *Batkoa* sp. e *Furia* sp., patógenos das cigarrinhas das pastagens.** 2002. 151 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

LEITE, L. G.; ALVES, S. B.; TAKADA, H. M.; BATISTA FILHO, A.; ROBERTS, D. W. Occurrence of entomophthorales on spittlebugs pests of pasture in eastern São Paulo state, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 3, p. 63-68, 2002.

LIANG, P., PARDEE, A. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, Washington, v. 257, p. 967-971, 1992.

LUND, S. T.; STÅLL, R. E.; KLEE, H. J. Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. **Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 371-382, 1998.

MACEDO, D. **Seleção e caracterização de *Metarhizium anisopliae* visando o controle de *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera:Cercopidae) em cana-de-açúcar.** 2005. 87 f. Tese (Doutor em Ciências: Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MACEDO, D.; ALVES, S. B.; VIEIRA, S. A. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. a *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) (Hemiptera: Cercopidae). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 47-52, 2006.

MACEDO, N.; BOTELHO, P. S. M.; CAMPOS, M. B. S. Controle químico da cigarrinha-da-raíz em cana-de-açúcar e impacto sobre as populações de artrópodes. **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 21, p. 30-33, 2003.

MACEDO, N.; BOTELHO, P. S. M.; RIBEIRO, L. D.; STUPIELL O, J. J.; PETRI, J.; OLIVEIRA, P. F. M.; SOARES, R. A. B. Número e época de aplicações de inseticidas no controle de cigarrinha da raiz *Mahanarva fimbriolata*, em cana-de-açúcar. In:



CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 19., 2002, Manaus. **Anais...** Manaus: SEB, 2002. 1 CD-ROM.

MACEDO, N.; MACEDO, D. As pragas de maior incidência nos canaviais e seus controles. **Visão Agrícola**, Piracicaba, v. 1, p. 38-46, 2004.

MARICONI, F. A. M. **Inseticidas e seu emprego no combate às pragas**. 2. ed. São Paulo: Biblioteca Agronômica Ceres, 1963. 607 p.

MARQUES, I. M. R. Distribuição de *Salpingogaster nigra* (Diptera, Syrphidae) predador específico de ninfas de cigarrinhas da raiz (Homoptera, Cercopidae) em algumas regiões do Brasil. **Anais da Sociedade de Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 67-74, 1988.

MATTOO, A. K.; HANDA, A. K. Ethylene signaling in plant cell death. In: NOODEN, L. D. (Ed.) **Plant cell death processes**. San Diego: Elsevier/Academic Press, 2004. p. 125-142.

MELAN, M. A.; DONG, X.; ENDARA, M. E.; DAVIS, K. R.; AUSUBEL, F. M.; PETTERMAN, T. K. An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 101, p. 441-450, 1993.

MENDES, A. C.; BOTELHO, P. S. M.; MACEDO, N.; SILVEIRA NETO, S. Behavior of the adults of the root froghopper, *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) (Homoptera: Cercopidae), according to climatic parameters. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS CONGRESS, 3., 1977, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo: ISSCT, 1977. p. 617-631.

MENDONÇA, A. F.; BARBOSA, G. V. S.; MARQUES, E. J. As cigarrinhas da Cana-de-Açúcar (Hemiptera:Cercopidae) no Brasil. In: MENDONÇA, A. F. (Ed.) **Pragas da Cana-de-Açúcar**. Maceió: Insetos & Cia. 1996. p. 171-192.

MEYER, E.; NORRIS, C. P.; JACQUIN, E.; RICHARD, C.; SCANDALIARIS, J. The impact of green cane production systems on manual and mechanical farming operations. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 25., 2005, Guatemala City. **Proceedings...** Guatemala City: D. M. Hogarth. 2005. p. 500-511.

MORAN, P. J.; CHENG, Y. F.; CASSELL, J. L.; THOMPSON, G. A. Gene expression profiling of *Arabidopsis thaliana* in compatible plant-aphid interactions. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 51, p. 182-203, 2002.

MOREIRA, C. A cigarrinha da cana de assucar. **Almanak Agrícola Brasileiro**, São Paulo, v. 10, p. 141-142, 1921.

MOREIRA, C. A cigarrinha vermelha da cana de assucar (*Tomaspis liturata* Lep. & Serv.). **Boletim do Instituto Biológico de Defesa Agrícola**, Rio de Janeiro, v. 4, p. 1-23, 1925.

MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. Maturadores químicos em cana-de-açúcar: III – Efeitos na fermentação etanólica e microbiota do mosto. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 8., Recife, 2002. **Anais...** Recife: STAB, 2002. p. 452-457.

NILAKHE, S. S. Sugestões para uma tática de manejo das pastagens para reduzir as perdas por cigarrinhas. Campo Grande: **EMBRAPA - CNPQC**, Brasília, 1983. 11 p. (Boletim de Pesquisa, 16).

PABÓN, A.; CARDONA, C.; MILES, J. W.; SOTELO, G. Response of resistant and susceptible *Brachiaria* spp. genotypes to simultaneous infestation with multiple species

of spittlebugs (Hemiptera: Cercopidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 100, n. 6, p. 1896-1903, 2007.

PAINTER, R. H. **Insect resistance in crop plants**. 1. ed. New York: McMillan, 1951. 520 p.

PARIASCA, J. A. T.; SUNAGA, A.; MIYAZAKI, T.; HISAKA, H.; SONODA, M.; NAKAGAWA, H.; SATO, T. Cloning of cDNAs encoding senescence-associated genes, ACC synthase and ACC oxidase from stored snow pea pods (*Pisum sativum* L. var *saccharatum*) and their expression during pod storage. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 22, p. 239-247, 2001.

PARTHIER, B. Hormonal regulators or stress factors in leaf senescence? **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 9, p. 1-7, 1990.

PEGADARAJU, V.; KNEPPER, C.; REESE, J.; SHAH, J. Premature leaf senescence modulated by the *Arabidopsis thaliana* PAD4 gene is associated with defense against the phloem-feeding green peach aphid. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 139, p. 1927-1934, 2005.

PIRES, C. S. S.; FONTES, E. M. G.; SUJII, E. R.; FERNANDES, H. M. C.; GOMES, D. F. Ocorrência de *Anagrus* sp. (Hymenoptera, Mymaridae) parasitando ovos de *Deois flavopicta* Stål. (Homoptera, Cercopidae) em pastagens do Brasil central. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 22, n. 2, p. 411-413, 1993.

POLESANI, M.; DESARIO, F.; FERRARINI, A.; ZAMBONI, A.; PEZZOTTI, M.; KORTEKAMP, A.; POLVERARI, A. cDNA-AFLP analysis of plant and pathogen genes expressed in grapevine infected with *Plasmopara viticola*. **BMC Genomics**, London, v. 9: n. 142, 2008.

PONTIER, D.; GAN, S.; AMASINO, R. M.; ROBY, D.; LAM, E. Markers for hypersensitive response and senescence show distinct patterns of expression. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 39, p. 1243-1255, 1999.

QUIRINO, B. F.; NORMANLY, J.; AMASINO, R. M. Diverse range of gene activity during *Arabidopsis thaliana* leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related genes. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 40, p. 267-278, 1999.

ROSSETTO, C. J.; LOURENÇÃO, A. L.; MIRANDA, M. A. C.; IGUE, T. Resistência de soja a insetos. II. Teste de livre escolha entre a linhagem IAC 73/228 e o cultivar Paraná, infestados por *Nezara viridula* (L.) em telado. **Bragantia**, Campinas, v. 43, n. 1, p. 141-153, 1984.

ROUET-MAYER, M.; BUREAU, J.; LAURIERI, C. Identification and characterization of lipoxygenase isoforms in senescing carnation petals. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 98, p. 971-978, 1992.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANNIATS, T. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989. 720p.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SARAVITZ, D. M.; SIEDOW, J. N. The differential expression of wound-inducible lipoxygenase genes in soybean leaves. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 110, p. 287-299, 1996.

SEIGLER, D.; PRICE, P. W. Secondary compounds in plants: primary functions. **The American Naturalist**, Chicago, v. 110, p. 101-105, 1976.

SILVA, M. D. **Avaliação bioquímica da Via das Lipoxigenases em plantas de soja infectadas com cancro da haste**. 1999. 43 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

SILVA, M. D.; OLIVEIRA, M. G. A.; LANNA, A. C.; PIRES, C. V.; PIOVESAN, N. D.; JOSÉ, I. C.; BATISTA, R. B.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Caracterização da via das lipoxigenases em plantas de soja resistentes e susceptíveis a *Diuraphis phaseolorum* f.sp. *meridionalis*, agente causal do cancro-da-haste. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v. 13, n. 3, p. 316-328, 2001.

SILVA, R. J. N., GUIMARÃES, E. R., GARCIA, J. F.; BOTELHO, P. S. M.; FERRO, M. I. T.; MUTTON, M. A.; MUTTON, M. J. R. Infestation of froghopper nymphs changes the amounts of total phenolics in sugarcane. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 6, p. 543-546, 2005.

SOTELO, G.; CARDONA, C.; MILES, J. Desarrollo de híbridos de *Brachiaria* resistentes a cuatro especies de salivazo (Homoptera: Cercopidae). **Revista Colombiana de Entomología**, Bogotá, v. 29 n. 2, p. 157-163, 2003.

STARKS, K. J.; BURTON, R. L.; MERKLE O. G. Greenbugs (Homoptera: Aphididae) plant resistance in small grain and sorghum to biotype E. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 76, p. 877-880, 1983.

STEIN, J., LIANG, P. Differential display technology: a general guide. **Cellular Molecular Life Science**, Basel, v. 8, p. 1235-1240, 2002.

STINGEL, E. **Distribuição espacial e plano de amostragem para a cigarrinha-das-raízes, *Mahanarva fimbriolata* (Stål,1954), em cana-de-açúcar.** 2005. 75 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005

THOMPSON, V. Associative nitrogen fixation, C4 photosynthesis, and the evolution of spittlebugs (Hemiptera: Cercopidae) as major pests of neotropical sugarcane and forage grasses. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 94, p. 189-200, 2004.

UEDA, J.; KATO, J. Isolation and identification of a senescence promoting substance from wormwood (*Artemisia absinthium* L.). **Plant Physiology**, Lancaster, v. 66, p. 246-249, 1980.

VALÉRIO, J. R. Insetos-praga em pastagens tropicais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 226, p. 98-110, 2005.

VALÉRIO, J. R.; NAKANO, O. Sintomatologia dos danos causados pelo adulto da cigarrinha *Zulia entreriana* (Berg, 1879) (Homoptera: Cercopidae) em *Brachiaria decumbens* Staff. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 21, n. 1, p. 95-100, 1992.

VELCULESCU, V. E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Serial analysis of gene expression. **Science**, Washington, v. 270, p. 484-487, 1995.

VETTORE A. L.; DA SILVA, F. R.; KEMPER, E.; ARRUDA, P. The libraries that made SUCEST. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, n. 1-4, p. 1-7, 2001.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, London, v. 23, n. 21, p. 4407-14, 1995.

WASTERNAK, C. Jasmonates - biosynthesis and role in stress responses and developmental processes. In: NOODEN, L. D. (Ed.) **Plant cell death processes**. San Diego: Elsevier/Academic Press, 2004. p.143–155.

WASTERNAK, C. Oxilipins: biosynthesis, signal transduction and action. In: HEDDEN P.; THOMAS S. (Ed.) **Plant hormone signaling. Annual Plant Reviews**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2006. p.185–228.

WASTERNAK, C; HAUSE, B. Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and plant development. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**. New York, v. 72, p. 165-221, 2002.

WEBSTER, J. A.; BAKER, K. C. A.; PORTER, D. R. Detection and mechanisms of russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) resistance in barley. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 84, p. 669-673, 1991.

WEBSTER, J. A.; STARKS, K. J.; BURTON, R. L. Plant resistance studies with *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae), a new United States wheat pest. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 80, p. 944-949, 1987.

WOOD JR, E. A.; CHADA, H. L.; SAXENA, P. M. Reaction of small grains and grain sorghum to three greenbug biotypes. **Oklahoma Agricultural Experiment Station Progress Report**, Stillwater, v. 618, p. 1-5, 1969.

YOSHIDA, S.; ITO, M.; NISHIDA, I.; WATANABE, A. Identification of a novel gene HYS1/CPR5 that has a repressive role in the induction of leaf senescence and pathogen-defence responses in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 29, p. 427-437, 2002.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)