

CRISTIANE GAMARANO DE MELO

DIFERENÇAS MORFOFISIOLÓGICAS, ALOMÉTRICAS E ANATÔMICAS DE
DOIS GENÓTIPOS CONTRASTANTES DE CANA-DE-AÇÚCAR A NINFAS DE
CIGARRINHA DAS RAÍZES (*Mahanarva fimbriolata*)

Tese apresentada à Universidade Federal de
Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia,
para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

M528d
2014
Melo, Cristiane Gamarano de, 1979-
Diferenças morfofisiológicas, alométricas e anatômicas de
dois genótipos contrastantes de cana-de-açúcar a ninfas de
cigarrinha das raízes (*Mahanarva fimbriolata*) / Cristiane
Gamarano de Melo. – Viçosa, MG, 2014.
xi, 35f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Márcio Henrique Pereira Barbosa.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.29-35.

1. Cana-de-açúcar - Melhoramento genético. 2. Cigarrinha
(Inseto). 3. *Mahanarva fimbriolata*. 4. *Saccharum* spp.. 5.
Erianthus. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Fitotecnia. Programa de Pós-graduação em Fitotecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 633.61

CRISTIANE GAMARANO DE MELO

DIFERENÇAS MORFOFISIOLÓGICAS, ALOMÉTRICAS E ANATÔMICAS DE
DOIS GENÓTIPOS CONTRASTANTES DE CANA-DE-AÇÚCAR A NINFAS DE
CIGARRINHA DAS RAÍZES (*Mahanarva fimbriolata*)

Tese apresentada à Universidade Federal de
Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia,
para obtenção do título de Doctor Scientiae.

APROVADA: 28 de março de 2014.

Luiz Alexandre Peternelli

Kacilda Naomi Kuki

Domingos Sávio Queiroz

Felipe Lopes da Silva

Márcio Henrique Pereira Barbosa
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por me sustentar nos momentos difíceis, e conduzir os meus passos na estrada da vida.

À minha família, meus pais Afonso Paulo e Nívia, por todo o suporte, apoio, dedicação, por serem minha fortaleza e refúgio. Minhas irmãs Rejane, Eliane e Paula, por serem companheiras, amigas, por estarem sempre ao meu lado, me dando forças e encorajando a seguir em frente. Minha sobrinha Helena que tornou minha vida mais leve e colorida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao programa de pós-graduação em Fitotecnia pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Márcio Henrique Pereira Barbosa, pela orientação, ensinamentos e pela credibilidade em mim depositada.

Ao professor Valdir Diola (*in memorian*) pelos ensinamentos e pela disposição em ajudar.

À Karla, Pedro, Bruno, Alejandro, Guilherme, Vinicius, Willian, Luana e Lays por toda ajuda nas diferentes etapas deste trabalho.

À Kacilda Naomi Kuki, por suas valiosas sugestões e por estar sempre disponível para tirar as minhas dúvidas.

Ao professor Luis Alexandre Petternelli, pela ajuda na análise estatística.

Ao professor Marcelo Ehlers Loureiro por todo o apoio e conhecimentos passados.

Ao professor Felipe Lopes da Silva, por suas sugestões que foram muito importantes para o polimento do trabalho.

Ao pesquisador Domingos Sávio Queiroz pelas valiosas sugestões para o aprimoramento do trabalho.

À prof. Marília Contin Ventrella pela contribuição para realização dos testes histoquímicos.

A todos os meus professores pelos conhecimentos compartilhados, por serem peças fundamentais da minha formação.

À técnica do laboratório de biotecnologia e melhoramento vegetal, Telma Fallieri Nascimento Queiroz por toda a contribuição para a realização deste trabalho.

À amiga Elma, pelas conversas e contribuições para aprimorar este trabalho.

À amiga Cristiane Viana Costa, pela doce amizade e pelas longas conversas.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS-----	v
LISTA DE TABELAS-----	vii
RESUMO-----	viii
ABSTRACT-----	x
1-INTRODUÇÃO-----	1
2-REVISÃO DE LITERATURA-----	3
2.1- Interação planta <i>versus</i> insetos herbívoros-----	3
2.2 - Cana-de-açúcar <i>versus</i> cigarrinha das raízes-----	4
2.3- Danos físicos e fisiológicos causados por <i>Mahanarva fimbriolata</i> -----	6
2.4- Mecanismos de defesa-----	7
3-MATERIAIS E MÉTODOS-----	8
3.1- Plantio do material e condições de crescimento -----	8
3.2- Seleção das ninfas da cigarrinha das raízes -----	9
3.3- Avaliação das características fisiológicas-----	9
3.4- Avaliação das características morfológicas-----	10
3.5- Avaliação das características alométricas-----	11
3.6- Análises histoquímicas e anatômicas-----	11
3.7- Delineamento experimental-----	12
4-RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	12
4.1- Característica morfológica e grau de esverdeamento das folhas-----	12
4.2- Fotossíntese, carbono interno, transpiração e condutância estomática-----	17
4.3- Características alométricas-----	22
4.4- Características histoquímicas e anatômicas-----	26
5- CONCLUSÕES-----	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo de vida da cigarrinha das raízes (*Mahanarva fimbriolata*)-----5

Figura 2- Montagem do experimento. A- Plantio dos toletes em bandeja contendo substrato. B- Mudas antes de serem transplantadas em pequenos vasos. C- Vasos contendo as plantas. D- Enraizamento das plantas. E- Mudas devidamente infestadas por ninfas da cigarrinha das raízes. F- Plantas momentos antes da primeira análise-----9

Figura 3- Escala de nota do dano visual causado por ninfas de *M. fimbriolata* em *Saccharum spp.* 1 (ausência de dano), 2: 25% de dano, 3: 50%, 4: 75%, e 5: 100%. Fonte: Pabón Valverde (2012)-----11

Figura 4- Respostas fisiológica e morfológica dos genótipos. A- Grau de esverdeamento das folhas. B- Nota de nível de dano visual. Genótipo Kawandang (Tolerante) e SP813250 (Suscetível) em interação com as ninfas de cigarrinha das raízes (TI- Tolerante infestado e SI- Suscetível infestado) e controles (TNI- Tolerante não infestado e SNI- Suscetível não infestado), durante sete, quinze, trinta e trinta e sete dias-----13

Figura 5- Danos morfológicos causados pelas ninfas nos dois genótipos de cana-de-açúcar estudados. A-B- Genótipo Kawandang não infestado e infestado com ninfas durante 7 e 37 dias, respectivamente. C- Kawandang após 37 dias de exposição a ninfas. E-F- Genótipo SP813250 não infestado e infestado no sétimo e trigésimo sétimo dia da interação, respectivamente. G- SP813250 após 37 dias da interação. As setas apontam para as plantas que foram expostas ao ataque das ninfas-----14

Figura 6- Respostas fisiológicas. A- Fotossíntese líquida. B- Carbono interno. C- Transpiração. D- Condutância estomática dos genótipos Kawandang (Tolerante) e SP813250 (Suscetível) em interação (TI- Tolerante infestado e SI- Suscetível infestado) ou não (TNI- Tolerante não infestado e SNI- Suscetível não infestado) com três ninfas de *Mahanarva fimbriolata*, durante sete, quinze, trinta e trinta e sete dias-----17

Figura 7- Acúmulo de massa da parte aérea de dois genótipos de cana-de-açúcar em interação ou não com ninfas de *Mahanarva fimbriolata*. A- Massa Fresca. B- Massa Seca. SI e SNI- Genótipo Suscetível (SP813250) infestado e não, respectivamente; TI e TNI- Genótipo tolerante (Kawandang) infestado e não, respectivamente-----23

Figura 8- Acúmulo de massa de raiz em dois genótipos de cana-de-açúcar em interação ou não com ninfas de *Mahanarva fimbriolata*. A- Massa Fresca. B- Massa Seca. SI e SNI- Genótipo Suscetível (SP813250) infestado e não, respectivamente; TI e TNI- Genótipo tolerante (Kawandang) infestado e não, respectivamente-----25

Figura 9- Relação Raiz/Planta Inteira e Raiz/Parte Aérea de genótipos de cana-de-açúcar quando expostos ou não á interação com ninfas de *Mahanarva fimbriolata*. A- Relação Raiz/Planta Inteira. B- Relação Raiz/Parte Aerea. SI e SNI- Genótipo Suscetível (SP813250) infestado e não, respectivamente; TI e TNI- Genótipo tolerante (Kawadang) infestado e não, respectivamente-----26

Figura 10- Sessões transversais de raiz de cana-de-açúcar. A- Genótipo tolerante (Kawadang) infestado. B- Kawadang não infestado. C- Genótipo suscetível (SP813250) não infestado. D- SP813250 infestado. Observar a presença de aerênquima no córtex do genótipo suscetível C e D. Córtex (CO), cilindro vascular (CV), exoderme (ex), endoderme (en), epiderme (ep), aerênquima (ae), xilema (X), floema (F). Notar a presença de lignina, corada em vermelho, na exoderme A, C e D, e na endoderme D--27

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Resumo da análise de regressão das variáveis fisiológicas-----13
- Tabela 2-** Resumo da análise das alterações morfofisiológicas dos genótipos Kawandang e SP813250, durante o período de interação com as ninfas-----15
- Tabela 3-** Resumo da análise de regressão das variáveis fisiológicas-----18
- Tabela 4-** Resumo da análise das alterações fisiológicas dos genótipos Kawandang e SP813250, no início e ao final da interação com as ninfas-----19
- Tabela 5-** Resumo da análise de regressão das variáveis morfológicas e alométricas--22

RESUMO

MELO, Cristiane Gamarano de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2014. **Diferenças morfofisiológicas, alométricas e anatômicas de dois genótipos contrastantes de cana-de-açúcar a ninfas de cigarrinha das raízes (*Mahanarva fimbriolata*)**. Orientador: Márcio Henrique Pereira Barbosa. Coorientadores: Valdir Diola e Marcelo Ehlers Loureiro.

O objetivo do presente estudo foi analisar as diferenças morfofisiológicas, alométricas e anatômicas de dois genótipos contrastantes de cana-de-açúcar, Kawandang (tolerante) e SP813250 (suscetível), quando submetidos ao ataque das ninfas de cigarrinha-das-raízes (*Mahanarva fimbriolata*). As características morfofisiológicas e alométricas foram avaliadas em quatro diferentes tempos quais sejam: sete, quinze, trinta e trinta e sete dias após a exposição ou não (controle) ao ataque das ninfas. As características anatômicas de ambos os genótipos foram avaliadas no sétimo dia após o início dos tratamentos. A exposição das plantas ao ataque das ninfas resultou em reduções significativas na condutância estomática, transpiração e no grau de esverdeamento das folhas para o genótipo SP813250 comparativamente ao genótipo Kawandang na presença da praga. A concentração de carbono interno não sofreu alteração significativa ao longo do período experimental. Entretanto, a concentração foi significativamente superior no genótipo SP813250 infestado em relação ao seu controle. A nota do nível de dano visual nas folhas causado pelas ninfas foi sempre maior no genótipo SP813250 em comparação ao seu controle desde a primeira leitura. Já para o genótipo Kawandang a nota de dano visual somente diferiu do seu controle a partir do 30º dia do experimento. O ataque das ninfas resultou em paralisação no ganho de massa fresca da parte aérea em ambos os genótipos estudados. Por outro lado, houve paralisação no acúmulo de massa seca para o genótipo SP813250 e aumento significativo de massa seca para o genótipo Kawandang. SP813250 apresentou um aumento significativo da massa fresca e seca da raiz, durante o período da interação com a praga, ao passo que Kawandang não apresentou alterações significativas nestas variáveis. A análise da anatomia da raiz revelou a presença de aerênquima no córtex do genótipo SP813250, diferentemente de Kawandang que apresentou o seu córtex com células compactas e bem organizadas. Os resultados encontrados neste estudo demonstram a robustez do genótipo tolerante em responder ao ataque das ninfas de *M. fimbriolata* e enfatizam as diferenças morfofisiológicas, alométricas e anatômicas entre os dois genótipos que

podem auxiliar os programas de melhoramento que visam à obtenção de variedades tolerantes e/ou resistentes a ninfas de cigarrinha das raízes.

ABSTRACT

MELO, Cristiane Gamarano de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, march, 2014. **Morphophysiological, anatomical and allometric differences of two sugarcane contrasting genotypes to spittlebug's nymphs (*Mahanarva fimbriolata*)**. Adviser: Márcio Henrique Pereira Barbosa. Co-adviser: Valdir Diola and Marcelo Ehlers Loureiro.

This study aims at analyzing the differences morphophysiological, allometric and anatomical ones between two sugarcane contrasting genotypes, Kawandang (tolerant) and SP813250 (susceptible), when subjected to spittlebug's nymphs attack (*Mahanarva fimbriolata*). The morphophysiological and allometrical technical features were evaluated at four different stages: at seven, fifteen, thirty and thirty-seven days after the sugarcane had been exposed, or not (control group), to spittlebug's nymphs. Anatomical features of both sugarcane genotypes were measured seven days after treatment had begun. The exposure to spittlebug's nymphs resulted in significant reductions of stomatal conductance, transpiration, and leaf greenness degree for SP813250 genotype in comparison to the Kawandang genotype. Internal carbon concentration levels did not differ significantly throughout the period of testings. However, the levels were significantly higher on the exposed SP813250 variety in comparison to those measured in the control group for the same genotype. From the first readings, the damage caused by the nymphs on the leaves always received a higher visual damage assessment when the genotype considered was the SP813250, in comparison to the control group of that genotype. In its turn, the Kawandang's genotype visual damage assessment got a different result from the control group only at the thirtieth day. In both genotypes, the nymphs' attack resulted in stoppage of fresh weight gain by the shoots. On the other hand, there was a stoppage in the accumulation of dry mass in the SP813250 genotype and a significantly increase of dry mass in the Kawandang genotype. SP813250 has shown a significant increase of both dry and fresh mass of its roots during the time of interaction with the plague, whereas the Kawandang type showed no significant variations in those variables. The anatomical analysis of the roots has shown presence of aerenchyma in the cortex of SP813250 genotype, contrariwise to the Kawandang genotype, whose cortex cells were compact and well-organized. The results found in this study show how strong the tolerant genotype is in responding to the attack of *M. fimbriolata* nymphs, and emphasize the morphophysiological, allometric and

anatomical differences between the two genotypes. They could help genetic improvement programs to get a sugarcane variety that is tolerant and/or resistant to spittlebug's nymphs.

1-INTRODUÇÃO

No Brasil, a utilização da colheita mecanizada, sem a queima prévia da palha, possibilitou que a cigarrinha das raízes, *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) se tornasse um dos principais problemas fitossanitários nas plantações de cana-de-açúcar, causando severas perdas de produtividade (Ravaneli et al., 2011). Esse cenário é favorecido pela cobertura vegetal que é depositada sobre o solo após a realização da colheita mecanizada, proporcionando um ambiente com condições ideais de umidade e temperatura para o desenvolvimento das ninfas (Dinardo-Miranda, 2008). A cigarrinha das raízes tem impactado negativamente a qualidade tecnológica da cana-de-açúcar utilizada como matéria-prima na indústria, reduzindo a produtividade e o teor de açúcar nos colmos (Gonçalves et al., 2003).

Na agricultura mundial, as estimativas das perdas produtivas provocadas por pragas e doenças correspondem a 37% da produção (Silva-Filho & Falco, 2000), dos quais 14% são causadas por insetos fitófagos (Pimentel, 2009). Segundo Penatti (2006), as perdas causadas pelo ataque da cigarrinha das raízes podem representar de 15% a 80% na qualidade da matéria-prima e até 30% no teor de sacarose. Nesse contexto, a utilização de variedades resistentes ou tolerantes a insetos tem sido uma alternativa eficaz para o controle de pragas na agricultura, e o desenvolvimento dessas variedades pode ser melhorada com o conhecimento dos mecanismos de resistência das plantas (Broekgaarden et al., 2011).

A melhoria da eficiência na seleção de materiais genéticos resistentes ou tolerantes a pragas é uma demanda importante dos Programas de Melhoramento de Plantas. No entanto, dados experimentais e de áreas comerciais mostram que quase todas as variedades de cana-de-açúcar cultivadas comercialmente são atacadas pela cigarrinha das raízes e sofrem reduções significativas na produtividade e na qualidade tecnológica (Gassen, 2010). O genótipo SP813250, por exemplo, que é uma variedade comercial altamente produtiva (Almeida, 2012), foi classificado como suscetível. Esta variedade permite uma maior longevidade dos insetos adultos da cigarrinha das raízes, e um maior período de oviposição, sendo listada como a variedade com maior infestação natural deste inseto praga (Garcia et al., 2011). Em ensaios realizados por Pabón Valverde (2012), ao ser exposta ao ataque das ninfas de cigarrinha das raízes, a variedade SP813250 apresentou um alto nível de dano visual.

O Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar (PMGCA), da Universidade Federal de Viçosa, objetivando encontrar genótipos que apresentassem resistência ou tolerância a ninfas de *M. fimbriolata*, realizou ensaios experimentais, com diferentes genótipos do seu banco de germoplasma. O genótipo Kawandang foi classificado como tolerante a infestação. Este genótipo apresentou danos menores do que aos observados em outros genótipos de cana-de-açúcar quando sujeitos à mesma pressão do inseto praga (Pabón Valverde, 2012).

Kawandang é um genótipo não comercial, pertencente ao gênero *Erianthus* que é estreitamente relacionado ao gênero *Saccharum* sendo possível a obtenção de descendentes dos cruzamentos realizados entre eles (Cheavegatti-Gianotto et al., 2011). O gênero *Erianthus* apresenta uma série de características agrônômicas importantes, incluindo tolerância à seca e alagamento, resistência a pragas e doenças, sendo uma fonte potencial de germoplasma parental para os programas de melhoramento de cana-de-açúcar (Cai et al., 2005).

Nos programas de melhoramento genético, a compreensão dos mecanismos de resistência é uma ferramenta importante para a formulação de estratégias que objetivam o desenvolvimento de novas fontes de resistência. Entretanto, os mecanismos responsáveis pela resistência da cana-de-açúcar à ninfas das cigarrinhas das raízes, quer sejam de caráter morfofisiológico, alométrico ou anatômico, são ainda pouco conhecidos. Em genótipos suscetíveis, sabe-se que ocorrem reduções significativas na taxa fotossintética, no teor de clorofila e no acúmulo de biomassa (Dinardo-Miranda et al., 2014; Dinardo-Miranda, 2008).

Com a identificação do genótipo Kawandang como tolerante à interação com as ninfas de cigarrinha das raízes buscou-se compreender os processos responsáveis pela sua alta *performance* quando exposto ao ataque da praga. Portanto, foram realizadas análises morfofisiológicas, alométricas e anatômicas objetivando identificar as diferenças entre os genótipos contrastantes de cana-de-açúcar, Kawandang (tolerante) e SP813250 (suscetível), quando submetidos ao ataque das ninfas de cigarrinha das raízes.

2-REVISÃO DE LITERATURA

2.1-Interação Planta versus insetos herbívoros

Em ecossistemas naturais e manejados, plantas e insetos estão constantemente interagindo de forma complexa. Esta interação existe há aproximadamente 400 milhões de anos (Zagrobelny et al., 2009). Durante a co-evolução, tanto as plantas quanto os insetos desenvolveram estratégias para defenderem-se uns dos outros (War et al., 2012). Herbívoros desenvolveram estratégias para contornar os sistemas químicos de defesa (Zagrobelny et al., 2009), e usam de diferentes estratégias de alimentação para obter nutrientes de suas plantas hospedeiras. Por sua vez, as plantas respondem ao ataque dos herbívoros através de vários aspectos morfológicos, bioquímicos e mecanismos moleculares (War et al., 2012). As plantas quando atacadas desencadeiam os seus mecanismos de defesa para inibir, bloquear ou modificar o metabolismo da praga (Santamaria et al., 2013).

As plantas estão constantemente expostas a vários organismos herbívoros que se alimentam tanto da parte aérea quanto das suas raízes (Wondafrash et al., 2013). Insetos fitófagos representam um problema significativo na agricultura global, causando reduções na produtividade em todas as principais áreas agrícolas e custos consideráveis na adoção de medidas de controle (Kerchev et al., 2012). A perda de rendimento global entre os principais cereais, devido a pressões bióticas (por exemplo, insetos, doenças, vírus) chega a ser em média mais de 23% do rendimento potencial estimado (FAO, 2012).

Segundo Nutt et al. (2004) e Parsa et al. (2011), as plantas podem apresentar três formas de resistência antixenose, tolerância e antibiose/resistência; i) antixenose é verificada quando uma planta ou variedade é menos utilizada pelo inseto que outra para alimentação, oviposição ou abrigo, estando nas mesmas condições; ii) tolerância é a capacidade da planta de suportar uma densidade maior de insetos sem reduzir a produção ou a qualidade, entretanto pode ser quebrada quando a taxa de infestação for elevada; iii) antibiose/resistência tem efeito direto sobre a sobrevivência ou desenvolvimento da praga. A antibiose geralmente depende de um mecanismo químico, e as pragas podem desenvolver mecanismos alternativos para superar a defesa da planta (Nutt et al., 2004).

As plantas produzem substâncias químicas para sua defesa, de duas maneiras diferentes: i) como substâncias constitutivas que repelem herbívoros através da

toxicidade direta ou através da redução da digestibilidade dos tecidos vegetais e; ii) síntese induzida de substâncias em resposta aos danos causados pelos herbívoros (Mello & Silva-Filho, 2002). Fitohormônios, por exemplo, podem ser sintetizados após, a planta ser atacado por insetos. O ataque da praga regula a expressão do gene e controla a produção dos metabólitos de proteção (Maffei et al., 2007).

As barreiras físicas, tais como o fortalecimento da parede celular, é outro mecanismo de defesa que as plantas utilizam para se defenderem do ataque dos herbívoros. A presença de lignina e outros fenóis existentes nas paredes das células das plantas hospedeiras atuam como uma barreira que impede ou limita a oferta de alimentos para os insetos fitófagos, tornando a planta menos atrativa (Santiago et al., 2013).

2.2-Cana-de-açúcar versus cigarrinha das raízes

Em Minas Gerais aéreas com declividade inferior a 12% deverão ter mecanizado 100% da sua colheita em 2014 (SEAPA, 2009). Em São Paulo a safra 2014/2015 marca o fim da queima da cana-de-açúcar no estado. Em 2017, toda colheita de cana-de-açúcar deverá ser mecanizada (UDOP, 2014). A manutenção da palha da cana-de-açúcar gera um microclima favorável ao desenvolvimento da cigarrinha-das-raízes (Garcia et al., 2007). A fêmea faz a postura próxima ao colo das plantas. No período sem umidade os ovos entram em diapausa e eclodem no início do período chuvoso. As médias de duração do período de incubação dos ovos, da fase ninfal e a longevidade do inseto adulto são de 21, 37 e 21 dias respectivamente (Garcia et al., 2006). Entretanto, temperatura, disponibilidade de alimento e fotoperíodo interferem no desenvolvimento das ninfas, e a combinação fotoperíodo e temperatura influenciam no desenvolvimento do ciclo de vida da cigarrinha (Simões et al., 2013). Na figura 1, pode-se observar o ciclo de vida do inseto e a sua duração.

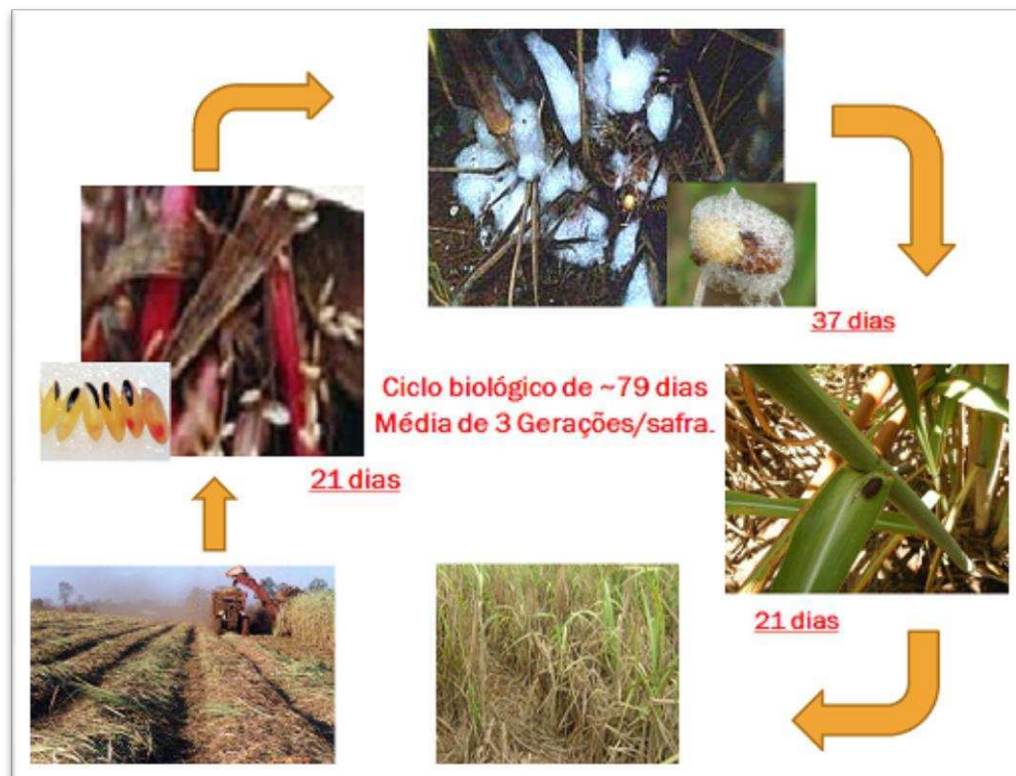


Figura 3- Ciclo de vida da cigarrinha das raízes (*Mahanarva fimbriolata*).

Garcia e colaboradores (2007) estudaram o sítio de alimentação das ninfas e adultos de *M. fimbriolata*. Estes pesquisadores observaram que as ninfas para sugarem a seiva nas raízes inserem seus estiletes pela epiderme, atravessam todo o córtex e atingem o cilindro vascular, realizando a alimentação no xilema (em 65% dos casos) e nos elementos do tubo crivado do floema primário. Enquanto os adultos, na lâmina foliar, introduzem seus estiletes preferencialmente pelos estômatos, atravessam as células do parênquima clorofiliano e atingem o metaxilema nos feixes vasculares.

As ninfas de *M. fimbriolata* alimentam-se principalmente da seiva do xilema de raízes jovens e tenras (Mendonça & Mendonça, 2005). Como a seiva do xilema é pobre em energia e aminoácidos grandes quantidades precisam ser sugadas para atender às necessidades nutricionais desses insetos (Fewkes, 1969). As ninfas produzem uma espuma característica que as envolve e protege contra dissecação e inimigos naturais (Batista et al., 2010). A espuma é formada pelo volume de seiva sugado e substância mucilaginosa excretada pela praga (Garcia, 2002). As ninfas excretam o líquido produzido a partir da seiva da planta, adicionam bolhas de ar criadas pela expansão e contração de seus abdomens, e misturam secreções provenientes de estruturas como as

glândulas Batelli e tubos de Malpighi (Kato, 1958; Marshall, 1965), sendo, estas secreções importantes para a estabilização da espuma (Valerio, 2009).

2.3- Danos físicos e fisiológicos causados por Mahanarva fimbriolata

Os prejuízos atribuídos à cigarrinha das raízes são decorrentes da extração de seiva nas folhas e nas raízes pelos adultos e ninfas, respectivamente, e da injeção de toxinas pelos adultos durante o processo de sucção (Penatti, 2006). São dois tipos de substâncias que são injetadas pelo inseto adulto: umas que se coagulam no interior dos tecidos da folha, possivelmente desorganizando o transporte da seiva; e outras, solúveis, que se distribuem nas folhas, predominantemente no sentido apical, determinando a morte dos tecidos (Valério, 2009). O aparelho bucal das cigarrinhas inclui dois pares de estiletes: o par externo (mandíbulas modificadas) que, com suas pontas serrilhadas, perfura o tecido vegetal, antecedendo e facilitando a penetração, então, do par interno (maxilas modificadas). Os estiletes que compõem o par interno acoplam-se, um ao outro, de tal forma a originarem dois canais: um para a sucção da seiva e, o outro, para a introdução de secreções salivares (Valério, 2009).

A *Mahanarva fimbriolata* causa impactos negativos na qualidade da cana-de-açúcar utilizada como matéria-prima na indústria, reduzindo a produtividade e o teor de açúcar nos colmos (Gonçalves et al., 2003). Essas perdas podem representar de 15% a 80% na qualidade da matéria-prima e até 30% no teor de sacarose (Penatti, 2006). O ataque das ninfas causa uma desordem metabólica generalizada na planta resultando na ocorrência do secamento dos vasos condutores, “coração morto”, desidratação e afinamento dos colmos (Gallo et al., 2002; Macedo & Macedo, 2004). A desordem metabólica ocorre em decorrência das picadas que atingem os elementos traqueais da raiz e os deterioram, dificultando ou impedindo o fluxo de água e de nutrientes, caracterizado pela desidratação do floema e do xilema (Garcia et al., 2007).

Em altos níveis de infestação, os sintomas nas plantas são muito semelhantes à restrição hídrica (Guimarães et al., 2008a). A alimentação das ninfas prejudica o transporte de água, o que resulta em sinais hidráulicos que estimulam o fechamento dos estômatos (Guimarães et al., 2008a). A deficiência hídrica, causada pelas ninfas ao se alimentarem da seiva do xilema e/ou do floema, altera a atividade fotossintética, nesta condição, a planta reduz as perdas de água pelo fechamento dos estômatos e, conseqüentemente, reduz o influxo de CO₂ (Floss, 2008), reduzindo a fotossíntese

devido à deficiência desse substrato. A redução no teor de clorofila é outro fator que resulta na redução da atividade fotossintética.

A fotossíntese é um processo central para a sobrevivência das plantas, fornecendo elementos essenciais para o seu crescimento e reprodução (Frier et al., 2012), mais de 90% da biomassa da cultura é derivada dos produtos da fotossíntese (Makino, 2011). A alimentação dos insetos fitófagos pode reduzir a atividade fotossintética da sua planta hospedeira (Velikova et al., 2010). As reduções na produtividade resultam, em parte, devido às alterações da capacidade fotossintética da planta provocada pela interação da planta com o inseto (Nabity et al., 2012). Segundo Larcher (2006), as plantas quando atacadas por pragas, podem aumentar a respiração, sintetizar hormônios do estresse, inibir a fotossíntese e sofrer distúrbios no crescimento. Essas respostas ao ataque do herbívoro visam minimizar o estresse gerado, assim como, preservar a vida da planta hospedeira. Genótipos de plantas que são capazes de manter a taxa fotossintética quando expostas ao ataque do inseto, muitas vezes apresentam uma maior resistência (Kerchev et al., 2012). A fotossíntese, provavelmente, exerce um papel chave na interação planta-inseto, devido ao fato de ser um importante processo físico-químico das rotas de sinalização da luz, carbono e nitrogênio (Kerchev et al., 2012).

2.4-Mecanismos de defesa

Plantas de cana-de-açúcar infestada por cigarrinhas apresentam redução no teor de sólidos solúveis, no teor de sacarose e açúcares redutores totais e pH, aumento nos compostos fenólicos, na acidez total e volátil do caldo, adicionalmente o processo de fermentação também é afetado o que resulta em vinhos com menor teor alcoólico (Ravaneli et al., 2011).

Em resposta ao ataque dos insetos e patógenos podem ocorrer reações bioquímicas nas plantas, que resultam na produção de lignina, polissacarídeos e compostos fenólicos, com o objetivo de protegê-las do ataque (Ravaneli et al., 2011). Os compostos fenólicos são metabólitos secundários das plantas, e constituem um dos grupos de substâncias mais comuns (Lattanzio et al., 2006). Guimarães et al. (2008b) observaram que os níveis constitutivos desses compostos foram maiores na variedade resistente (SP835073), porém não houve efeito da infestação da praga no teor de fenóis nessa variedade. Os pesquisadores concluíram que os níveis de compostos fenólicos

constitutivamente altos na variedade resistente podem estar envolvidos num mecanismo de resistência do tipo antibiose, pois houve uma maior mortalidade e duração da fase ninfal. Para Silva et al. (2005), níveis de compostos fenólicos mais elevados podem ser os responsáveis pela não preferência do inseto, e que somente uma caracterização destes compostos poderá indicar se existe uma resistência fenólica a insetos sugadores.

3-MATERIAIS E MÉTODOS

3.1-Plantio do material e condições de crescimento

Com base em estudos anteriores foram utilizados dois genótipos de cana-de-açúcar um tolerante (Kawandang) (Pabón Valverde, 2012) e um suscetível (SP813250) (Garcia et al., 2011) a infestação pela cigarrinha das raízes (*Mahanarva fimbriolata*). Segmentos nodais contendo uma única gema desses genótipos foram germinados em bandejas plásticas preenchidas com substrato à base de vermiculita (Plantmax[®]) fertilizado com a formulação de macronutrientes 4-14-8 (N-P₂O₅-K₂O). As bandejas foram irrigadas diariamente e mantidas na casa de vegetação (75% de umidade relativa, 25-27°C de temperatura) com fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro.

Após quatro semanas, as plântulas foram transplantadas para tubos de PVC (5,3 cm de diâmetro x 6,5 cm de comprimento) abertos em ambas às extremidades. Uma fita plástica adesiva foi colada na extremidade inferior do tubo para manter o substrato e possibilitar o escoamento do excesso de água. Em seguida, os tubos foram preenchidos com substrato à base de vermiculita (Plantmax[®]) e fertilizados com a mesma formulação descrita anteriormente. Cada tubo continha uma única planta e era irrigado diariamente e recebiam adubação nitrogenada a cada 15 dias (5g/L de Ureia). Os tubos contendo as plantas foram mantidos nas mesmas condições descritas anteriormente.

Antes da montagem do experimento, seis meses após o plantio das mudas, os tubos foram cobertos com uma tampa (4,8 cm de diâmetro x 3,0 cm de comprimento) contendo um furo central (2,5 cm de diâmetro) para a passagem da parte aérea da planta. O espaço vazio entre a planta e o furo central foi preenchido com uma espuma de poliuretano flexível. Essa metodologia foi utilizada visando gerar um ambiente ideal para a proliferação das raízes superficiais, substrato utilizado pelas ninfas de *M. fimbriolata*.

3.2-Seleção das ninfas da cigarrinha das raízes

Para iniciar a criação de *M. fimbriolata*, insetos adultos foram capturados, com auxílio de uma rede entomológica, na Estação Experimental do CECA (Centro de Pesquisa e Melhoramento da Cana-de-Açúcar), localizada em Oratórios-MG. Após a coleta, os insetos foram transportados para a Casa de Vegetação localizada no Campus da UFV em Viçosa, em gaiolas (30 cm de altura X 15 cm de diâmetro), contendo no seu interior folhas de cana-de-açúcar, para alimentar e garantir a sobrevivência dos insetos durante o transporte.

As ninfas foram criadas como descrito por Garcia (2002). A infestação com ninfas de primeiro instar, recém-eclodidas, foi realizada com auxílio de um pincel macio n. 4, nos níveis: zero (controle) e três ninfas por planta. Na figura 2 pode-se visualizar como o experimento foi montado.

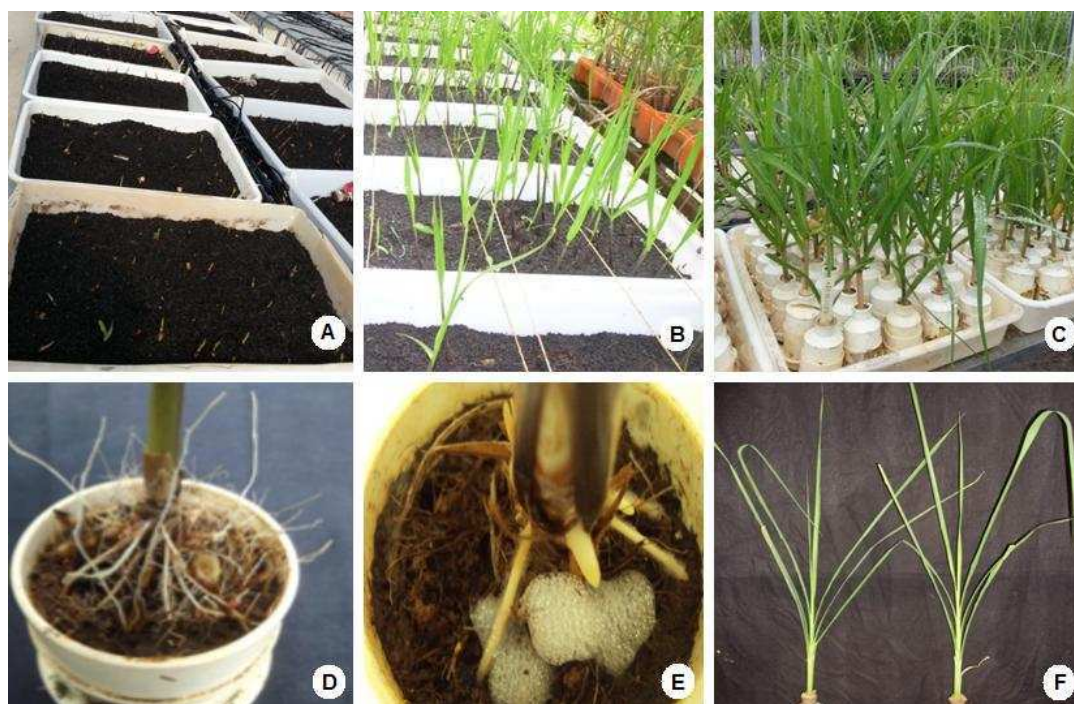


Figura 4- Montagem do experimento. A- Plantio dos toletes em bandeja contendo substrato. B- Mudas antes de serem transplantadas em pequenos vasos. C- Vasos contendo as plantas. D- Enraizamento das plantas. E- Mudas devidamente infestadas por ninfas da cigarrinha das raízes. F- Plantas momentos antes da primeira análise.

3.3-Avaliação das características fisiológicas

Para o estudo das respostas fisiológicas dos dois genótipos da cana-de-açúcar (Kawandang e SP813250) foram avaliadas as variáveis de trocas gasosas (taxa fotossintética líquida, transpiração, condutância estomática e carbono interno) e o grau

de esverdeamento das folhas (índice SPAD). O índice SPAD representa um indicativo do conteúdo de clorofila. As leituras foram realizadas, nos tempos sete, quinze, trinta e trinta e sete dias após as plantas terem sido infestadas.

As medições para a obtenção da taxa de condutância estomática, fotossíntese líquida, transpiração e carbono interno foram realizadas com um analisador de gases infravermelho portátil LCpro Portable (ADC BioScientific Ltd. Hoddesdon, UK). Sendo utilizada fonte de luz saturante artificial de $1000 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fornecida pelo próprio aparelho, concentração de carbono ambiental, temperatura da câmara foliar constante ($27 \text{ }^\circ\text{C}$) e vapor de água ambiental. O ar de referência foi coletado a 1,50 m de altura do solo e homogeneizado em um galão de 20 litros antes de alcançar a câmara foliar.

A avaliação do grau de esverdeamento das folhas foi realizada por meio de um clorofilômetro Soil Plant Analytical Division Value (SPAD) (Minolta Corp[®]). Todas as características fisiológicas descritas acima foram avaliadas entre 9h00 e 11h30 horas da manhã. Tais avaliações foram realizadas na porção mediana da segunda folha completamente expandida das plantas. Foram realizadas seis leituras para as trocas gasosas e três leituras para o grau de esverdeamento das folhas.

3.4- Avaliação da característica morfológica

Foi realizada uma avaliação visual do nível de dano causado pelas três ninfas de cigarrinha das raízes nos tempos sete, quinze, trinta e trinta e sete dias. O nível de dano foi obtido através de notas conforme a figura 4. A nota um foi dada a plantas que não apresentavam nenhum tipo de dano na sua parte aérea. As plantas que apresentavam 25, 50, 75 e 100% da sua parte aérea danificada recebiam as notas 2, 3, 4 e 5 respectivamente.



Figura 3- Escala de nota do dano visual causado por ninfas de *M. fimbriolata* em *Saccharum spp.* 1 (ausência de dano), 2: 25% de dano, 3: 50%, 4: 75%, e 5: 100%. Fonte: Pabón Valverde (2012).

3.5- Avaliação das características alométricas

As características alométricas massa fresca e seca da parte aérea e da raiz, relação raiz/parte aérea, relação raiz/planta inteira foram avaliadas. Após sete, quinze, trinta e trinta e sete dias da infestação, a parte aérea era cortada rente ao solo, e imediatamente pesada em balança de precisão, para a obtenção da sua massa fresca. Nestes mesmos períodos de tempo, as raízes foram lavadas em água corrente, secas em papel toalha e pesadas em balança de precisão, em seguida, para a obtenção da sua massa fresca. Após a pesagem, as amostras eram colocadas em sacos de papel e submetidas à secagem em uma estufa de circulação forçada de ar a 72°C durante 72 horas, determinando-se a massa seca. Com a obtenção da massa seca, em cada tempo, foi calculada a razão Raiz/Parte Aérea e a razão Raiz/Planta Inteira.

3.6- Análise Histoquímica e anatômica

Foram coletadas raízes, dos genótipos suscetível e tolerante, em interação com as ninfas, e dos seus controles. As raízes foram coletadas momentos antes da realização dos cortes e mantidas em água até serem processadas. As raízes foram seccionadas, transversalmente, em micrótomo de mesa. Para verificar a presença de compostos fenólicos, os cortes, foram corados com cloreto férrico e dicromato de potássio (Gabe, 1968). Para a presença de lignina e taninos os cortes foram corados com floroglucina ácida (Patten et al., 2005) e vanilina clorídrica (Mace & Howell, 1974), respectivamente. As imagens digitalizadas foram obtidas em microscópio de luz

(modelo AX70 TRF, *Olympus Optical*) com sistema *U-Photo*, acoplado a câmera fotográfica digital (modelo *Spot Insightcolour 3.2.0*, *Diagnostic Instruments Inc.*) e microcomputador com o programa de captura de imagens *Spot Basic*.

3.7-Delineamento experimental

Cada unidade experimental foi constituída por um pequeno vaso contendo uma única planta. O delineamento experimental foi organizado em um esquema fatorial 2 X 2 X 4 [dois genótipos (Kawandang e SP813250), dois níveis de infestação (zero e três ninfas/planta) e quatro épocas de amostragem (sete, quinze, trinta e trinta e sete dias)] segundo o delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Foi realizado o teste F, o teste de média LSD a 5% de probabilidade e aplicou-se a análise de regressão linear simples. Os resultados obtidos foram analisados e interpretados, utilizando-se software livre R (R Development Core Team, 2013).

4-RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1-Característica morfológica e Grau de esverdeamento das folhas

Tanto o genótipo tolerante Kawandang quanto o suscetível SP813250, não expostos ao ataque das ninfas da cigarrinha das raízes, apresentaram uma redução significativa, no grau de esverdeamento das folhas durante o período experimental (Figura 4A, Tabela 1). O tratamento controle do genótipo SP813250 apresentou aumento significativo (Figura 4B, Tabela 1) do nível de dano visual ao longo do período experimental, o que não ocorreu no genótipo Kawandang (Figura 4B, Tabela 1).

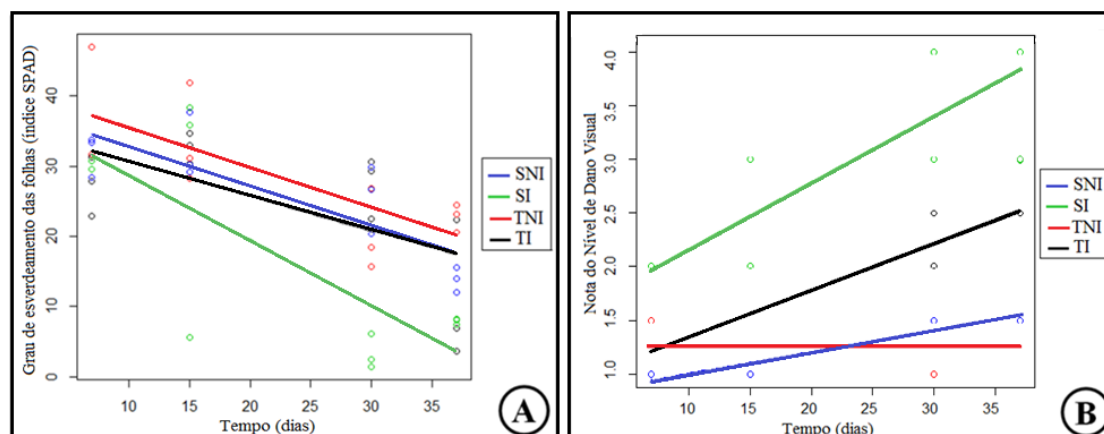


Figura 4- Respostas fisiológica e morfológica dos genótipos. A- Grau de esverdeamento das folhas. B- Nota de nível de dano visual. Genótipo Kawandang (Tolerante) e SP813250 (Suscetível) em interação com as ninfas de cigarrinha das raízes (TI- Tolerante infestado e SI- Suscetível infestado) e controles (TNI- Tolerante não infestado e SNI- Suscetível não infestado), durante sete, quinze, trinta e trinta e sete dias.

A redução no grau de esverdeamento das folhas observado nos tratamentos controles de ambos os genótipos estudados, e o aumento na nota do nível de dano visual apresentado pelo genótipo SP813250 é resultado da senescência foliar natural. A senescência é precedida pela degradação e conseqüente perda de clorofila. Esta redução natural está relacionada com a idade das plantas que estavam com seis meses e, possivelmente, a restrição imposta pelo pequeno volume dos vasos utilizados no experimento. A senescência é um processo que ocorre naturalmente com o aumento da idade das plantas. Seltmann et al. (2010), observaram uma redução de 78% no teor de clorofila de *Arabidopsis thaliana* com oito semanas de idade em comparação com as mesmas plantas quando estavam com seis semanas.

Tabela 1-Resumo da análise de regressão das variáveis fisiológicas.

Variáveis	SI			SNI			TI			TNI		
	β_0	β_1	X	β_0	β_1	X	β_0	β_1	X	β_0	β_1	X
Grau de esverdeamento	38.194	-0.938*	17.32	38.495	-0.565*	25.92	35.673	-0.495*	24.65	41.319	-0.573*	28.57
Nível de dano visual	1.529	0.062*	2.92	0.805	0.019*	1.25	0.888	0.044*	1.87	0.957	0.013	1.25

X- Média, SI- Suscetível infestado, SNI- Suscetível não infestado, TI- Tolerante infestado, TNI- Tolerante não infestado. β_1 e β_0 – Coeficientes de regressão, segundo o modelo de uma regressão linear simples. A estimativa de β_1 seguido de * apresenta diferença significativa pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade.

O primeiro sintoma do ataque das ninfas foi o amarelecimento e necrose nas pontas das folhas basais do genótipo Kawandang, e a ocorrência de necrose total da folha basal da SP813250 (Figura 5A e E). Estes sintomas foram observados, após sete dias da infestação das plantas. Ao final do experimento, os sintomas do ataque das ninfas foram mais evidentes no genótipo SP813250 que apresentava um aspecto completamente retorcido (Figura 5F e G). As folhas basais deste genótipo estavam completamente necrosadas, e as folhas recém-expandidas, assim como, as mais jovens amarelecidas e necrosadas da metade para o ápice (Figura 5F e G). Neste mesmo período, as folhas mais jovens do genótipo Kawandang não apresentavam nenhum sintoma do ataque, as folhas completamente expandidas estavam amarelecidas e apresentavam uma pequena área necrosada nas pontas (Figura 5B e C). Ao contrário do genótipo SP813250, o Kawandang foi capaz de limitar o desenvolvimento dos sintomas provocado pela constante sucção da seiva pelas ninfas o que reforça a seu potencial em tolerar o ataque.

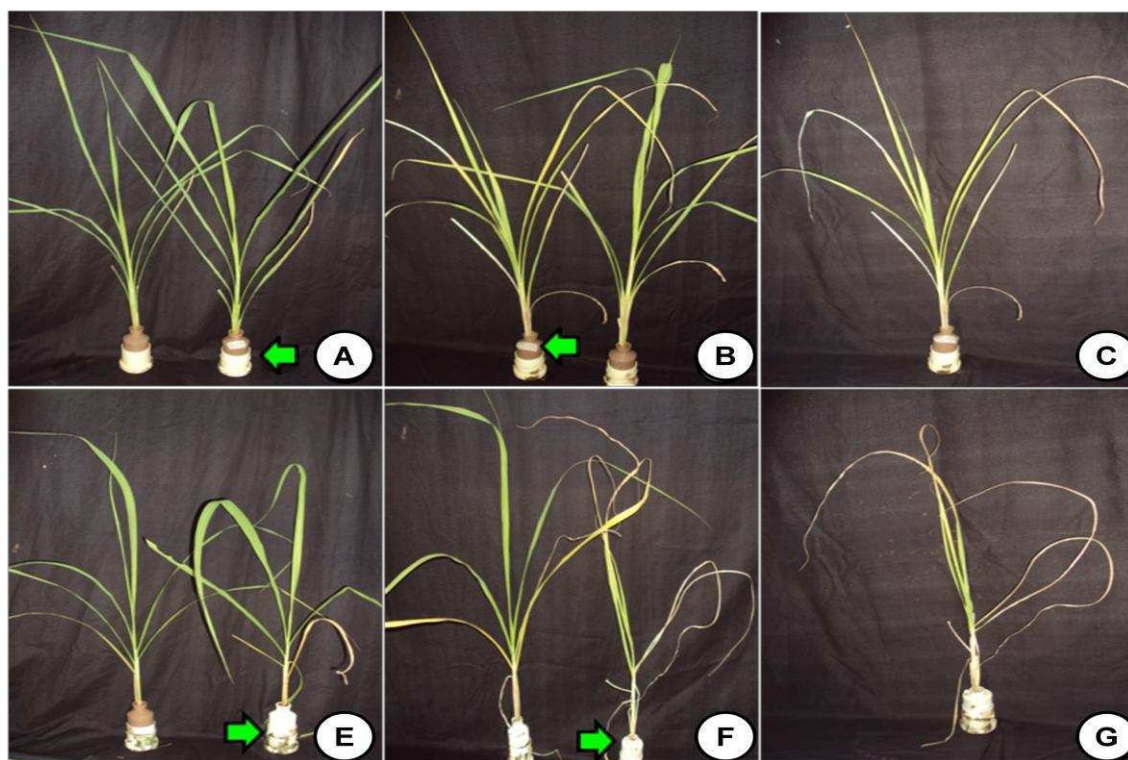


Figura 5- Danos morfológicos causados pelas ninfas nos dois genótipos de cana-de-açúcar estudados. A-B- Genótipo Kawandang não infestado e infestado com ninfas durante 7 e 37 dias, respectivamente. C- Kawandang após 37 dias de exposição a ninfas. E-F- Genótipo SP813250 não infestado e infestado no sétimo e trigésimo sétimo dia da interação, respectivamente. G- SP813250 após 37 dias da interação. As setas apontam para as plantas que foram expostas ao ataque das ninfas.

Com a progressão dos sintomas, devido ao maior período de exposição das plantas ao ataque das ninfas, ocorreu um aumento significativo da nota do nível de dano visual em ambos os genótipos (Figura 4B). Entretanto, o genótipo SP813250 apresentou sempre as maiores médias que diferiram significativamente do seu respectivo controle desde o início do experimento (Tabela 2). O genótipo Kawandang infestado embora apresentasse sempre maior nota de nível de dano visual que o seu controle, a diferença significativa somente ocorreu após trinta dias do ataque (Tabela 2).

Tabela 2- Resumo da análise das alterações morfofisiológicas dos genótipos Kawandang e SP813250, durante o período de interação com as ninfas.

Variável	7 dias		15 dias		30 dias		37 dias	
Grau de esverdeamento das folhas (Índice SPAD)	TI	36.10 a	TNI	31.50 a	SNI	23.03 a	SNI	31.77 a
	SNI	35.77 a	TI	32.06 a	TNI	21.86 ab	TNI	19.87 b
	TNI	34.73 a	SNI	34.86 a	TI	16.30 bc	TI	17.47 bc
	SI	32.50 a	SI	36.23 a	SI	13.7 c	SI	11.73 c
Nota do nível de dano visual	SI	2.00 a	SI	2.33 a	SI	3.67 a	SI	3.67 a
	TI	1.33 b	TI	1.33 b	TI	2.33 b	TI	2.50 b
	TNI	1.16 b	TNI	1.00 b	TNI	1.33 c	SNI	2.00 b
	SNI	1.00 b	SNI	1.00 b	SNI	1.50 c	TNI	1.50 c

SI- Suscetível infestado; SNI- Suscetível não infestado, TI- Tolerante infestado, TNI- Tolerante não infestado. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste LSD ao nível de 5% de probabilidade.

A alteração morfológica (Figura 5) sofrida pelos genótipos quando expostos ao ataque das ninfas, ao longo do tempo do experimento, foi acompanhada da alteração no grau de esverdeamento das folhas. Esta variável sofreu reduções significativas ao longo do tempo de exposição ao ataque do inseto (Figura 4A), em ambos os genótipos estudados. Na primeira avaliação das plantas, no sétimo dia pós-infestação não houve diferença significativa entre os tratamentos. Ao final do experimento no 37º dia, o genótipo SP813250 diferiu significativamente do seu controle. Enquanto, o genótipo tolerante não apresentou diferença significativa em relação ao seu controle (Tabela 2). Este resultado colabora com os encontrados por Dinardo-Miranda et al. (2014) que também observaram um menor teor significativo de clorofila nos genótipos suscetíveis de cana-de-açúcar em relação aos seus controles enquanto, o genótipo resistente não diferiu significativamente do seu controle.

A constante sucção da seiva das raízes pelas ninfas resultou no amarelecimento das plantas, que teve o seu transporte de água e nutrientes comprometidos. O amarelecimento das plantas é resultado da perda de clorofila nas folhas. Ao perder clorofila as folhas amarelecem e em consequência apresentam uma redução no grau de

esverdeamento das folhas. O amarelecimento das folhas devido à degradação dos cloroplastos e da clorofila é o processo mais obvio que ocorre durante a senescência das folhas (Seltmann et al., 2010). A senescência tem o seu processo induzido e/ou acelerado quando exposto ao estresse seja ele de natureza biótica ou abiótica. Neste trabalho, o ataque das ninfas provocou uma aceleração do processo de senescência.

A redução observada no grau de esverdeamento das folhas, no 37º dia pós-infestação, foi de 63.1% e 12.08% para o genótipo SP813250 e Kawandang respectivamente, quando comparados aos seus respectivos controles. A redução observada no grau de esverdeamento das folhas pode ser atribuída à maior sensibilidade do pigmento clorofila, às crescentes pressões geradas pela alimentação das ninfas. A infestação com mosca branca (*Bemisia tabaci*) e cochonilha (*Phenacoccus solenopsis*) também resultou em uma redução no teor de clorofila, em plantas de berinjela (Islam & Shunxiang, 2009) e tomate (Huang et al., 2013) respectivamente. Segundo Huang et al. (2013), a densidade de cochonilha e o tempo da interação significativamente afetaram o teor de clorofila relativo de folhas de tomate. Enquanto, o genótipo suscetível apresentou uma elevada redução no grau de esverdeamento das folhas, o genótipo tolerante apresentou uma pequena redução não significativa, sendo um indicativo da sua tolerância.

O estresse oxidativo gerado pelo ataque dos insetos estimula as plantas a sintetizarem compostos antioxidantes. No início do estresse, pode haver redução de algumas atividades antioxidantes, contribuindo para um aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Soares & Machado, 2007). As ERO atuam como moléculas sinalizadoras regulando a expressão de genes de defesa. Estudos sugerem uma forte ligação entre as vias de sinalização das espécies reativas de oxigênio com a indução de respostas de defesa das plantas contra o ataque do inseto herbívoro (Kerchev et al., 2012). Entretanto, quando em alta concentração ocasiona a senescência, redução no teor de clorofila, redução no crescimento e desenvolvimento da planta, morte celular programada (Rosa, 2007). Assim, uma causa provável da elevada redução no grau de esverdeamento das folhas observada no genótipo SP813250 pode ter sido consequência de uma alta concentração das espécies reativas do oxigênio devido ao ataque das ninfas.

A avaliação do grau de esverdeamento das folhas se mostrou uma ferramenta rápida e eficaz na identificação de genótipos suscetíveis e tolerantes de cana-de-açúcar ao ataque de ninfas de cigarrinha das raízes. Lopez et al. (2009) avaliaram a perda de clorofila em genótipos de braquiária atacadas por cigarrinhas e concluíram que este

parâmetro é uma ferramenta importante na avaliação de danos causados pelo ataque do inseto.

4.2- Fotossíntese, carbono interno, transpiração e condutância estomática.

Tanto o genótipo suscetível SP813250 quanto o tolerante Kawandang expostos ao ataque das ninfas das cigarrinhas das raízes apresentaram redução significativa, ao longo do tempo estudado, nas variáveis fotossíntese, transpiração e condutância estomática (Figura 6A, C e D; Tabela 3). A concentração de carbono interno permaneceu constante durante todo o período experimental em ambos os genótipos infestados ou não (Tabela 3 e Figura 5B).

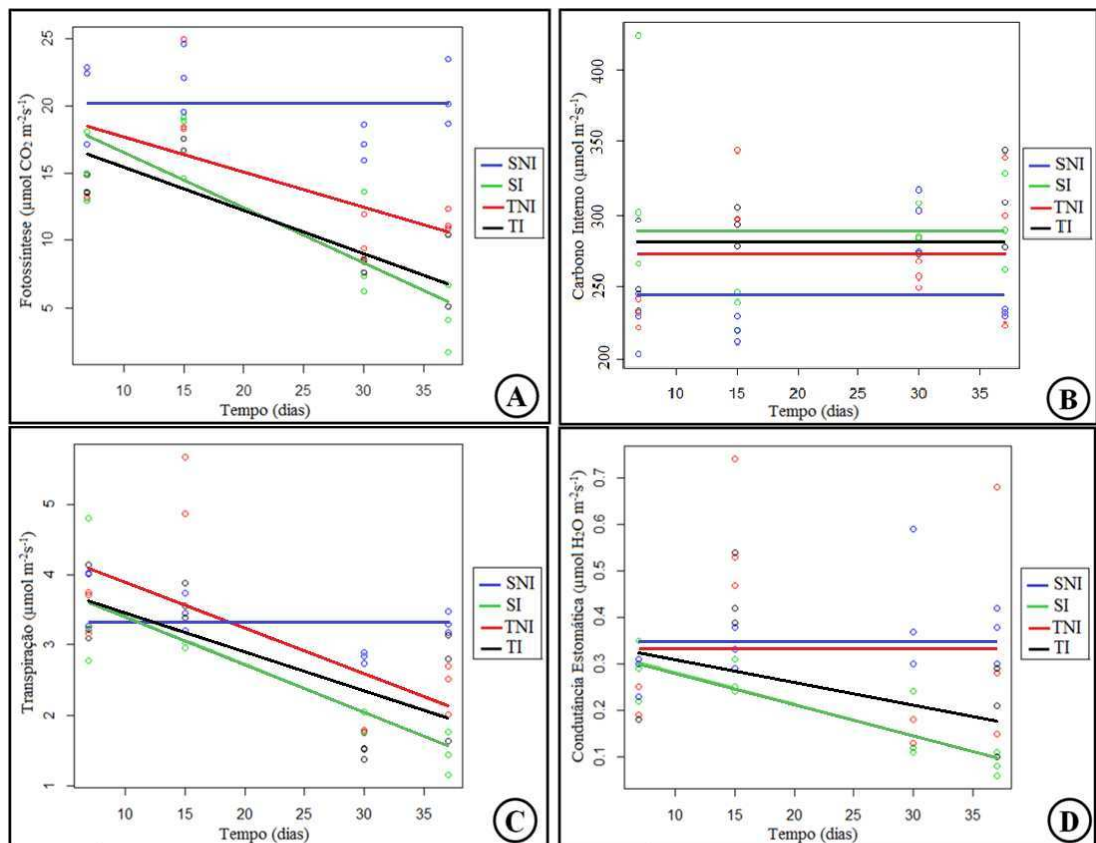


Figura 6. Respostas fisiológicas. A- Fotossíntese líquida. B- Carbono interno. C- Transpiração. D- Condutância estomática dos genótipos Kawandang (Tolerante) e SP813250 (Suscetível) em interação (TI- Tolerante infestado e SI- Suscetível infestado) ou não (TNI- Tolerante não infestado e SNI- Suscetível não infestado) com três ninfas de *Mahanarva fimbriola*, durante sete, quinze, trinta e trinta e sete dias.

Tabela 3- Resumo da análise de regressão das variáveis fisiológicas.

Variáveis	SI			SNI			TI			TNI		
	β_0	β_1	X	β_0	β_1	X	β_0	β_1	X	β_0	β_1	X
Fotossíntese	20.609	-0.408*	11.53	21.69	-0.07	20.22	18.75	-0.320*	11.59	20.40	-0.260*	14.53
Transpiração	4.109	-0.069*	2.57	3.815	-0.021	3.35	3.991	-0.055*	2.78	4.549	-0.066*	3.09
Condutância estomática	0.351	-0.007*	0.20	0.272	0.006	0.35	0.356	-0.005*	0.25	0.370	-0.002	0.33
Carbono interno	293.997	-0.280	287.76	217.04	1.219	244.2	259.40	1.022	282.15	255.53	0.774	272.75

X- Média, SI- Suscetível infestado, SNI- Suscetível não infestado, TI- Tolerante infestado, TNI- Tolerante não infestado. β_1 e β_0 – Coeficientes de regressão, segundo o modelo de uma regressão linear simples. A estimativa de β_1 seguido de * apresenta diferença significativa pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade.

O tratamento controle dos genótipos estudados não apresentaram variação significativa nas variáveis carbono interno e condutância estomática ao longo do tempo (Figura 6, Tabela 3). As variáveis fotossíntese e transpiração reduziram significativamente durante o período experimental no tratamento controle do genótipo Kawandang. O tratamento controle do genótipo SP813250 não diferiu estatisticamente ao longo do período experimental para estas mesmas variáveis.

A redução observada na taxa fotossintética no tratamento controle do genótipo Kawandang, assim como descrito anteriormente para a variável grau de esverdeamento das folhas, pode estar relacionada ao estresse gerado pelo pequeno volume dos vasos utilizados no experimento e/ou a idade das plantas. As diferenças observadas, entre os tratamentos controles, nas variáveis fisiológicas estudadas (Figura 6A, B, C e D e tabela 4) estão possivelmente relacionadas às características próprias dos genótipos, os quais pertencem a gêneros distintos. Calatayuda et al. (2011) também observaram diferenças significativas, entre diferentes espécies de carvalho (*Quercus ilex*, *Q. faginea*, *Q. pyrenaica* e *Q. robur*), para a maioria dos parâmetros de trocas gasosas avaliados.

A média da taxa fotossintética foi sempre menor nas plantas infestadas, independentemente do genótipo (Tabela 4). Esta variável sofreu redução significativa, ao longo do período experimental (Figura 5, tabela 3), sendo um indicativo que o ataque das ninfas provocou mudanças na fisiologia das plantas. O decréscimo observado, ao longo do tempo, nesta variável é devido ao maior período de exposição das plantas ao ataque do inseto. Assim, quanto maior o período da interação, maior será a quantidade seiva sugada pelas ninfas, conseqüentemente, maiores serão os danos causados na fisiologia das plantas. Huang et al. (2013) sugerem, que o nível do efeito

do ataque do fitófago na fisiologia da planta é dependente da intensidade da alimentação e do tempo de exposição à interação.

No sétimo dia após a exposição das plantas ao ataque do inseto, o genótipo suscetível SP813250 apresentou uma redução significativa de 32.46% na sua taxa fotossintética líquida, quando comparado ao seu controle (Tabela 4). Enquanto, neste mesmo período, o genótipo tolerante Kawandang apresentou uma ligeira redução, não significativa, de 4.71% em comparação ao seu controle. Ao final do experimento, após 37 dias de exposição das plantas ao ataque das ninfas, ambos os genótipos apresentaram redução significativa na fotossíntese. A redução apresentada foi de aproximadamente 80% para o genótipo SP813250 e de 42,79% para o genótipo Kawandang. Para Nabity et al. (2012), os mecanismos que governam essa redução na fotossíntese ainda não são bem compreendidos, mas em alguns casos referem-se a interrupções no transporte de água. A constante sucção da seiva pelas ninfas impediu ou dificultou a absorção de água pelas raízes, o que resultou no estresse fisiológico observado pela redução na taxa fotossintética, em ambos os genótipos estudados.

Tabela 4- Resumo da análise das alterações fisiológicas dos genótipos Kawandang e SP813250, no início e ao final da interação com as ninfas.

Variáveis	7 dias		37 dias	
	Tratamentos	Média	Tratamentos	Média
Fotossíntese ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	SNI	20.79 a	SNI	20.76 a
	TNI	16.12 b	TNI	11.45 b
	TI	15.36 b	TI	6.55 c
	SI	14.04 b	SI	4.17 c
Transpiração ($\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	SNI	3.77 a	SNI	3.33 a
	SI	3.60 a	TI	2.53 b
	TNI	3.55 a	TNI	2.40 b
	TI	3.49 a	SI	1.46 c
Condutância estomática ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	SI	0.29 a	TNI	0.37 a
	SNI	0.28 a	SNI	0.37 a
	TNI	0.22 a	TI	0.20 b
	TI	0.22 a	SI	0.08 b
Carbono interno ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	SI	330.29 a	TI	310.10 a
	TI	259.28 b	SI	293.14 a
	TNI	232.14 b	TNI	287.80 a
	SNI	225.99 b	SNI	231.87 b

SI- Suscetível infestado; SNI- Suscetível não infestado, TI- Tolerante infestado, TNI- Tolerante não infestado. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste LSD ao nível de 5% de probabilidade.

A redução observada na taxa fotossintética no genótipo Kawandang não era esperada, uma vez que, este genótipo foi classificado como tolerante por Pabón

Valverde (2012). Possivelmente isto ocorreu devido à reposição das ninfas. Neste trabalho o genótipo Kawandang apresentou uma elevada taxa de mortalidade das ninfas de primeiro instar, nos 10 primeiros dias após a exposição das plantas ao ataque das ninfas (dados não apresentados). Visando, sempre manter as plantas infestadas com três ninfas, as mesmas eram contadas diariamente e, caso fosse necessário, repostas. Assim, este genótipo foi forçado a manter a interação, e em consequência, sofreu danos fisiológicos que, não seriam observados caso os insetos não fossem repostos. Entretanto, mesmo com este procedimento, após 37 dias da infestação a redução na fotossíntese foi de 42,79 %. Enquanto, neste mesmo período o genótipo SP813250 sofreu uma redução de quase 80% nesta variável. A redução na taxa fotossintética observada no genótipo Kawandang, mesmo com a reposição das ninfas, foi consideravelmente inferior ao observado no genótipo suscetível SP813250, o que confirma o seu maior potencial em tolerar ao ataque das ninfas.

No início do experimento, no sétimo dia após a infestação, tanto o genótipo suscetível SP813250 quanto o tolerante Kawandang não apresentaram redução significativa na transpiração e condutância estomática quando comparados aos seus respectivos controles (Tabela 4). Ao final do experimento, o genótipo SP813250 sofreu uma redução significativa de aproximadamente 56% na sua transpiração e reduziu significativamente em aproximadamente 78% a sua condutância estomática, em comparação ao seu controle (Tabela 4). Enquanto, para o genótipo Kawandang houve uma redução não significativa de aproximadamente 5% na transpiração, e uma redução significativa de aproximadamente 46% na condutância estomática (Tabela 4). Resultados semelhantes foram encontrados por Sarwar (2013) ao estudar a interação entre o inseto sugador *Tetranychus* com folhas de algodão. O ataque do ácaro provocou danos na função do aparato estomático e causou fechamento do estômato, reduzindo a fotossíntese, condutância estomática e taxa de transpiração nas plantas do algodoeiro expostos à interação (Sarwar, 2013).

Os sintomas apresentados pelas plantas, nos dois genótipos estudados, expostos ao ataque das ninfas da cigarrinha das raízes foram os mesmos descritos por Anjum et al. (2011) para o déficit hídrico. Os sintomas foram redução na transpiração, condutância estomática, atividade fotossintética, senescência precoce das folhas e redução no teor de clorofila.

A redução na fotossíntese sofrida ao longo do tempo pelas plantas expostas ao ataque das ninfas é resultado da alimentação das ninfas que impediu e/ou dificultou o

transporte de água das raízes para a parte aérea. A constante sucção da seiva xilemática pelas ninfas gerou um déficit hídrico nas plantas. Quando ocorre uma redução no teor relativo de água, e o potencial hídrico das plantas diminui provocando uma queda na taxa fotossintética das folhas (Sato et al., 2010). Insetos sugadores que se alimentam da seiva do xilema ou floema, afetam diretamente o transporte de água, nutrientes e sacarose, o que resulta em alterações na abertura dos estômatos, e conseqüentemente na fotossíntese (Resende et al., 2012; Muller et al., 2011, Aldea et al., 2005).

Condutância estomática e a transpiração, assim como a fotossíntese, de ambos os genótipos infestados apresentaram funções lineares negativas (Figura 6A, C e D; Tabela 3). Estes resultados são condizentes com as observações de Kerchev et al. (2012) que descreveram o fechamento dos estômatos, redução na transpiração e fotossíntese e o aumento da fotorespiração como as respostas clássicas das plantas quando expostas ao estresse biótico e/ou abiótico.

Embora, a condutância estomática tenha reduzido significativamente ao longo do tempo (Figura 6 D), a concentração de carbono interno não apresentou a mesma tendência. Esta variável permaneceu constante durante o período da interação em ambos os genótipos expostos ou não ao ataque das ninfas (Tabela 3 e Figura 6 B). A média da condutância estomática foi sempre menor nos genótipos infestados. Entretanto, a média da concentração do carbono interno nas plantas infestadas foi superior aos seus respectivos controles. No genótipo Kawandang embora a média da concentração de carbono interno tenha sido maior nas plantas infestadas não houve diferença significativa quando comparada ao seu controle (Tabela 4).

No genótipo suscetível a concentração de carbono interno foi significativamente superior ao seu respectivo controle (Tabela 4). Este mesmo comportamento foi também observado por Delaney (2012), estudando a interação entre espirradeira (*Nerium oleander*) com a lagarta das folhas (*Spodoptera eridania*). Uma possível explicação para este resultado pode ser explicada pelo fechamento dos estômatos que impediu que as plantas eliminassem o CO₂ gerado durante a sua respiração, ficando este gás concentrado na câmara subestomática e conseqüentemente elevando a sua concentração.

A maior média de concentração do carbono interno observada nos genótipos infestados sugere que a limitação da fotossíntese está relacionada com os fatores não estomáticos. Os fatores não estomáticos englobam redução na atividade de enzimas fotossintéticas, redução na concentração de ATP, inibição na assimilação de nitrato, indução da senescência precoce, e mudanças na anatomia e ultraestrutura das folhas

(Ghannoum, 2008). Heng-Moss et al. (2006), observaram que gramíneas infestadas com percevejo apresentaram uma redução significativa no rendimento da eficiência fotoquímica do fotossistema II (PSII) e no transporte de elétrons fotossintéticos em relação as plantas não infestadas 20 dias após a interação. Esta redução, na atividade das enzimas fotossintéticas, resultou em uma redução de 66% na capacidade fotossintética das plantas infestadas.

O resultado encontrado neste trabalho levanta duas hipóteses sobre a maior concentração de CO₂ observada nas plantas expostas à interação com as ninfas. A primeira é que o fechamento estomático impediu a liberação do CO₂ proveniente da respiração da planta. A segunda é que o ataque das ninfas de *M. fimbriolata* pode ter incitado alterações no aparato bioquímico das plantas de cana-de-açúcar resultando em uma baixa atividade e/ou na quantidade de enzimas envolvidas na atividade fotossintética. Segundo Tang et al. (2006), a maior concentração de carbono interno nas plantas infestadas pode estar relacionada as alterações no PSII.

A constante sucção de seiva pelas ninfas das cigarrinhas das raízes gerou uma redução na fotossíntese líquida nas plantas de cana-de-açúcar. Esta redução pode ser explicada por alterações sofridas no PSII, sendo necessária a realização de trabalhos complementares para confirmação ou não desta hipótese. A senescência precoce das plantas, que causou redução no grau de esverdeamento das folhas, e o fechamento dos estômatos foram fatores que influenciaram na redução da fotossíntese observada neste trabalho. A redução na fotossíntese líquida é resultado da ocorrência de alterações na abertura dos estômatos, redução no teor de clorofila, danos nos centros de reações luminosas da fotossíntese, redução na quantidade e atividade das enzimas do ciclo de Calvin (Ney et al., 2013).

4.3- Características alométricas

No estudo das características alométricas da parte aérea das plantas observou-se que o ataque das ninfas resultou em uma estagnação de ganho de massa fresca ao longo do tempo, em ambos os genótipos estudados (Figura 7A). Enquanto, nos tratamentos controle houve aumento significativo nesta variável (Figura 7A e Tabela 5). As ninfas de *Mahanarva fimbriolata* se alimentam, preferencialmente da seiva do xilema (Garcia et al., 2007), conseqüentemente, o transporte de água e nutrientes das raízes para as folhas é prejudicado. Assim, as plantas tornam-se desidratadas e desnutridas, o que

resulta em uma estagnação na sua capacidade de acúmulo de reservas, e conseqüentemente aumento de peso. Tanto o genótipo Kawandang quanto o SP813250 reduziram o seu crescimento em resposta ao estresse da deficiência hídrica, gerada pela constante sucção da seiva xilemática pelas ninfas. Segundo Wilkinson & Davies (2010) e Taiz & Zeiger (2013), reduzir o crescimento é uma das respostas adotadas pelas plantas quando expostas á deficiência hídrica.

Houve acúmulo significativo de massa seca durante o período do experimento para todos os tratamentos, exceto para o tratamento SP813250 infestado (Figura 7B e Tabela 5). Embora o genótipo Kawandang infestado tenha apresentado um aumento significativo da massa seca da sua parte aérea, este acréscimo foi menor que o observado no seu tratamento controle. A média de aumento da massa seca do genótipo Kawandang infestado foi de 1.7 g enquanto, o seu controle apresentou um ganho médio de 4.0 g no período de 30 dias. Neste mesmo período, o genótipo SP813250 infestado teve um acréscimo médio, não significativo, de apenas 0.2 g enquanto, o seu controle teve um aumento significativo de 2,1 g na sua massa seca. Estes resultados demonstram que o ataque das ninfas causa perda na produtividade e afeta o desenvolvimento das plantas. Os resultados obtidos contradiz o trabalho realizado por Zvereva e colaboradores (2010) que concluíram que insetos sugadores de raiz não reduzem o desempenho da planta.

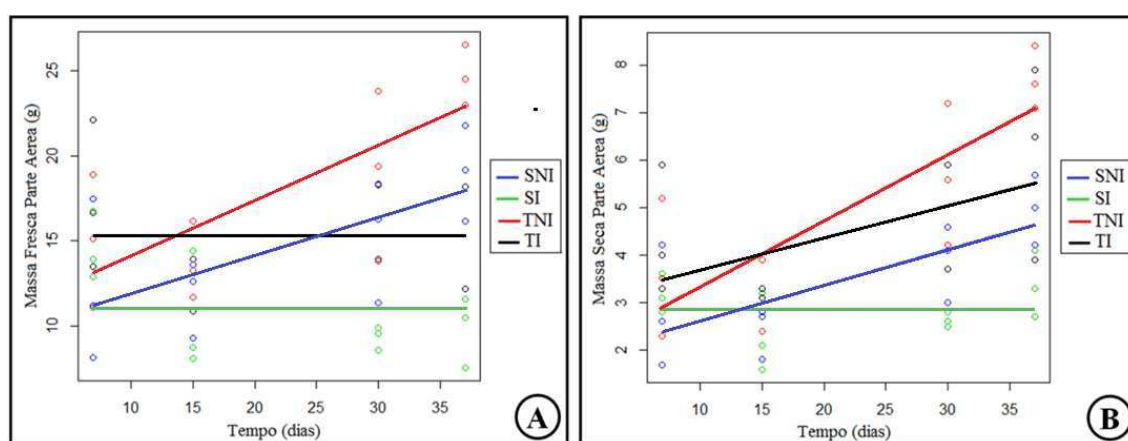


Figura 7- Acúmulo de massa da parte aérea de dois genótipos de cana-de-açúcar em interação ou não com ninfas de *Mahanarva fimbriolata*. A- Massa Fresca. B- Massa Seca. SI e SNI- Genótipo Suscetível (SP813250) infestado e não, respectivamente; TI e TNI- Genótipo tolerante (Kawandang) infestado e não, respectivamente.

Tabela 5- Resumo da análise de regressão das variáveis morfológicas e alométricas.

Variáveis	SI			SNI			TI			TNI		
	β_0	β_1	X	β_0	β_1	X	β_0	β_1	X	β_0	β_1	X
Massa fresca parte aérea	14.168	-0.139	11.06	9.621	0.226*	14.64	15.46	-0.005	15.35	10.90	0.324*	18.11
Massa seca parte aérea	2.665	0.009	2.87	1.848	0.076*	3.53	2.974	0.069*	4.52	1.942	0.139*	5.05
Massa fresca raiz	6.276	0.096*	8.41	5.726	0.124*	8.49	6.966	0.002	7.01	6.154	0.039	7.02
Massa seca raiz	0.960	0.025*	1.51	1.074	0.018	1.47	1.201	0.011	1.45	1.029	0.019*	1.46
Relação raiz/parte aérea	0.377	0.007*	0.53	0.574	-0.005	0.45	0.436	-0.003	0.36	0.430	-0.004	0.32
Relação raiz/planta inteira	0.273	0.003*	0.34	0.355	-0.002	0.31	0.286	-0.001	0.25	0.294	-0.002	0.24

X- Média, SI- Suscetível infestado, SNI- Suscetível não infestado, TI- Tolerante infestado, TNI- Tolerante não infestado. β_1 e β_0 – Coeficientes de regressão, segundo o modelo de uma regressão linear simples. A estimativa de β_1 seguido de * apresenta diferença significativa pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade.

A redução no acúmulo de massa seca, do genótipo Kawandang foi de 57.5%, o que é um valor próximo a redução observado na sua taxa fotossintética, que foi de 42.79% após 37 dias em interação com as ninfas. O genótipo SP813250 apresentou uma redução de 90.5% no acúmulo de massa seca, a redução na sua taxa fotossintética líquida no final do experimento foi de quase 80%. Segundo Huang et al. (2013), a injúria causada pelo ataque do herbívoro apresenta um efeito indireto no taxa de crescimento e no desempenho da planta hospedeira, devido ao fato do inseto provocar uma redução na taxa fotossintética líquida (Huang et al., 2013).

A exposição das plantas ao ataque das ninfas da cigarrinha das raízes resultou em um menor grau de esverdeamento das folhas, consequência da senescência precoce das folhas e de danos no aparato fotossintético. Com uma menor taxa fotossintética, as plantas acumularam menos reservas e conseqüentemente, ocorreu uma paralisação e/ou redução no aumento da massa fresca e seca. Segundo Dinardo-Miranda (2005), quando exposta ao ataque das ninfas além de não haver acúmulo de açúcar, os colmos apresentam-se desnutridos e desidratados, secando do topo para a base. Com isto, os colmos se tornam menores, mais finos, atrofiados, com os entrenós mais curtos, com perda de sacarose e aumento do teor de fibra (Dinardo-Miranda, 2005; Mendonça & Mendonça, 2005). As plantas podem reduzir e/ou inibir o seu crescimento como uma forma de economizar e redistribuir os recursos que podem tornar-se escassos em condição de extremo estresse (Skirycz & Inzé, 2010).

O genótipo tolerante não sofreu alterações significativas ao longo do tempo, no peso fresco de suas raízes, não havendo diferença entre o tratamento controle e o tratamento em interação com as ninfas (Figura 8 A). O genótipo suscetível apresentou um aumento significativo nesta variável tanto no tratamento controle quanto no tratamento infestado (Figura 8A e tabela 5). A massa seca da raiz apresentou aumento significativo nos tratamentos controle do genótipo tolerante e no genótipo suscetível infestado. Os tratamentos controle do genótipo suscetível e tolerante infestado não apresentaram diferenças significativas ao longo do tempo estudado (Figura 8B e tabela 5). O ataque das ninfas resulta em morte das raízes gerando um desequilíbrio na sua morfofisiologia (Garcia et al, 2007), assim, as plantas tem a absorção de água e nutrientes comprometidos. O aumento na produção de raízes, no genótipo suscetível, é um indicativo que a variedade SP813250, ao contrário do genótipo tolerante, durante o ataque investiu na produção de raízes, visando aumentar a sua área de absorção de água e nutrientes.

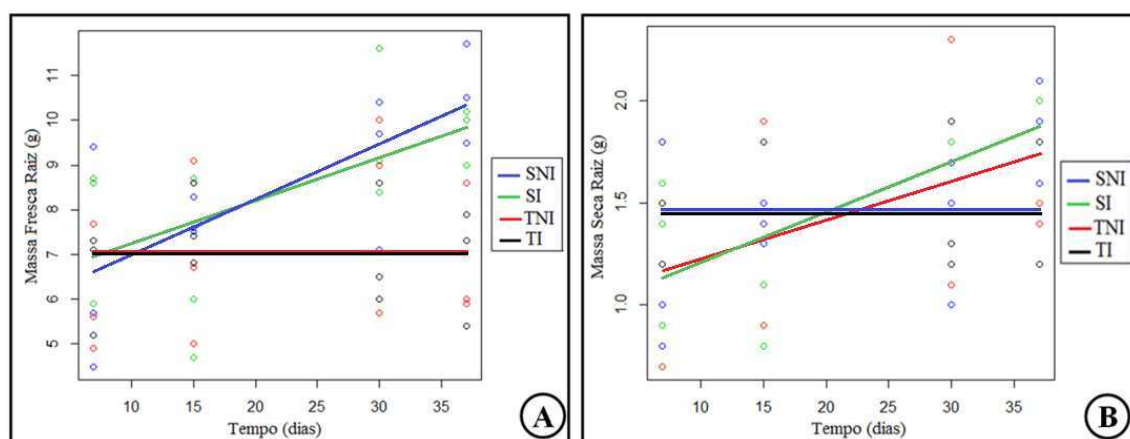


Figura 8- Acúmulo de massa de raiz em dois genótipos de cana-de-açúcar em interação ou não com ninfas de *Mahanarva fimbriolata*. A- Massa Fresca. B- Massa Seca. SI e SNI- Genótipo Suscetível (SP813250) infestado e não, respectivamente; TI e TNI- Genótipo tolerante (Kawadang) infestado e não, respectivamente.

A relação raiz/parte aérea e raiz/planta inteira não diferiram significativamente durante o período da interação analisado para os tratamentos tolerante infestado, e os tratamentos controles (Figura 9). O tratamento suscetível infestado apresentou um aumento das relações ao longo do tempo estudado. O tratamento tolerante infestado apresentou maior relação raiz/parte aérea e raiz/planta inteira que o seu respectivo controle. Estes resultados reforçam ao encontrado anteriormente sendo um indicativo

que o ataque das ninfas resulta em menor acúmulo de massa fresca e seca, que significa perda em produtividade.

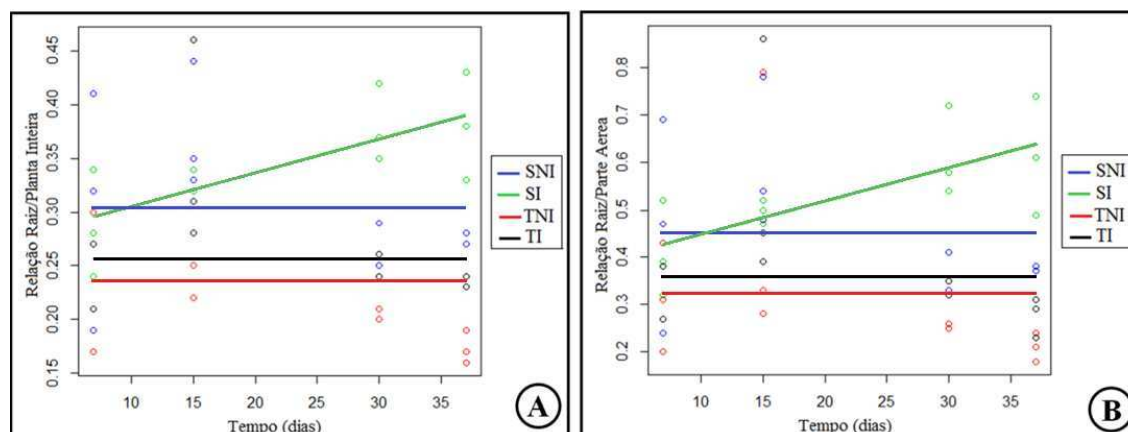


Figura 9- Relação Raiz/Planta Inteira e Raiz/Parte Aérea de genótipos de cana-de-açúcar quando expostos ou não á interação com ninfas de *Mahanarva fimbriolata*. A- Relação Raiz/Planta Inteira. B- Relação Raiz/Parte Aérea. SI e SNI- Genótipo Suscetível (SP813250) infestado e não, respectivamente; TI e TNI- Genótipo tolerante (Kawadang) infestado e não, respectivamente.

4.4- Características histoquímicas e anatômicas

Os testes para presença de fenóis (dado não apresentado) e taninos (Figura 10 B) deram negativos, portanto, não são estes os compostos responsáveis pela defesa das plantas de cana-de-açúcar ao ataque das ninfas da cigarrinha das raízes. O teste histoquímico detectou uma camada de lignina na exoderme e endoderme (Figura 10A, C e D) de ambos os genótipos.

O genótipo SP813250, independentemente, de estar ou não exposto á interação com as ninfas apresentou presença de aerênquima no seu córtex (Figura 12). A ocorrência do aerênquima foi limitada apenas à região cortical. As células da epiderme, exoderme e o cilindro esclerenquimatoso apresentavam-se intactas e lignificadas. A formação de aerênquima é induzida por fatores ambientais como deficiência nutricional (Siyiannis et al., 2012), alagamento (Xu et al., 2013), densidade do solo e temperatura (Bouranis et al., 2007), assim como, níveis de etileno elevado (Yin et al., 2013). Entretanto, Leite (2013) estudando a presença de aerênquima em raiz de cana-de-açúcar observou que esta característica ocorre independentemente dos fatores ambientais externos, sendo sua formação constitutiva.

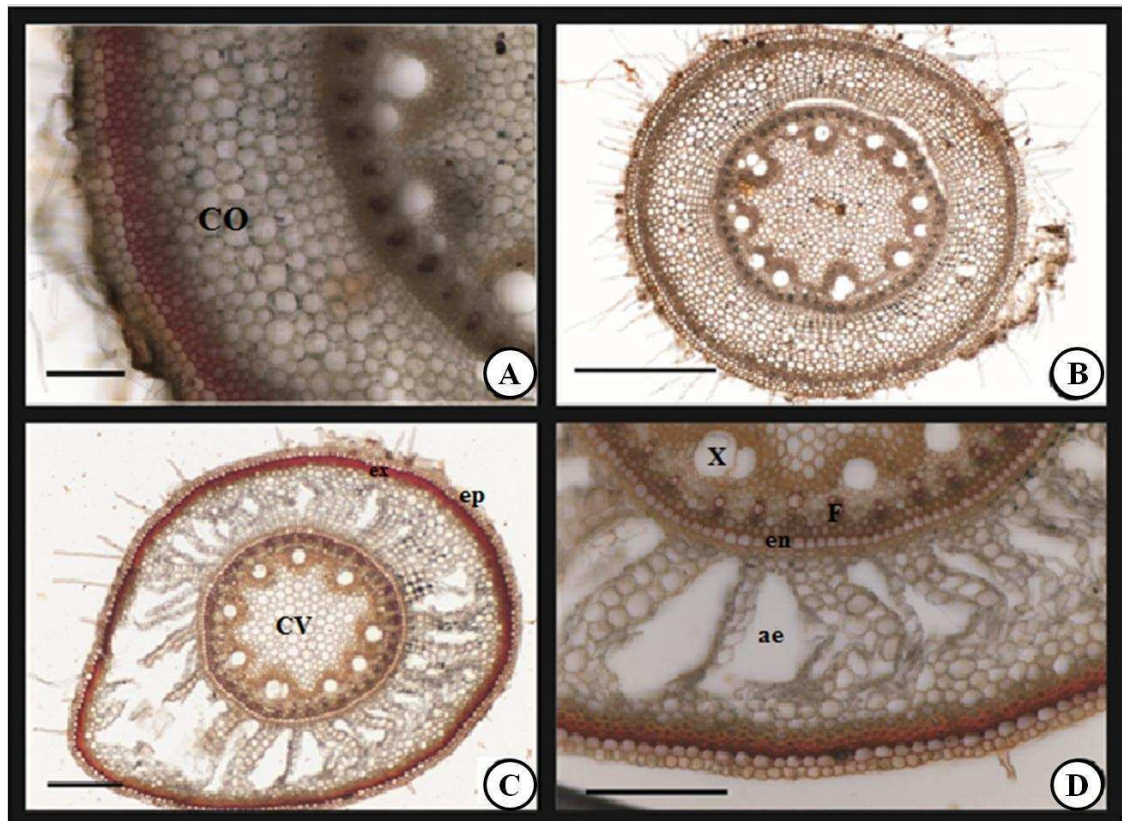


Figura 10- Sessões transversais de raiz de cana-de-açúcar. A- Genótipo tolerante (Kawadang) infestado. B- Kawadang não infestado. C- Genótipo suscetível (SP813250) não infestada. D- SP813250 infestado. Córtex (CO), cilindro vascular (CV), exoderme (ex), endoderme (en), epiderme (ep), aerênquima (ae), xilema (X), floema (F). Observar a presença de aerênquima no córtex do genótipo suscetível C e D. Notar a presença de lignina, corada em vermelho, na exoderme A, C e D, e na endoderme D.

A presença do aerênquima nas células do córtex do genótipo suscetível atua como um agente facilitador para que os estiletes das ninfas atinjam o cilindro vascular plantas, uma vez que, o estilete conseguindo vencer a barreira imposta pela camada de lignina, não encontra nenhum outro obstáculo para atravessar o córtex. Segundo Thimmaiah et al. (1994), a suscetibilidade de genótipos de algodão ao ataque de pulgão está diretamente relacionada à menor compactação dos tecidos. Segundo estes pesquisadores, a menor compactação fornece espaços intercelulares que facilita o estilete do pulgão atingir o floema. Na ausência do aerênquima o estilete tem que perfurar várias células até atingir o xilema e/ou floema. É sabido que a parede celular atua como uma defesa direta das plantas, assim como a suberina, calose e a cutícula. A parede celular é uma barreira física que impede a entrada de patógenos e/ou artrópodes nos seus tecidos. A lignina é considerada substância resistente aos patógenos, pois dificulta sua colonização. Porém, isso não inviabiliza o acesso dos patógenos ao interior das plantas (Silva et al., 2005).

Tecidos parenquimáticos podem exibir resistência aos patógenos, mesmo sem apresentar lignificação. A resistência nesse caso é atribuída à organização e às características das células (Silva et al., 2005). No genótipo tolerante as células parenquimáticas eram compactas, ou contrário, do genótipo suscetível. As raízes do genótipo Kawandang eram mais densas que a do genótipo SP813250 (dados não apresentados). A maior densidade pode ser considerada como resultado da melhor aglomeração e organização das células do parênquima cortical, que também pode atuar como uma barreira que dificultou o acesso dos estiletes das ninfas ao xilema. Assim, a alta taxa de mortalidade das ninfas de primeiro instar observada no genótipo Kawandang, ocorreu devido organização e compactação das células do córtex que atuou como uma barreira defensiva das plantas.

A barreira imposta pela compactação das células impediu/dificultou o acesso do estilete das ninfas ao cilindro vascular, o que reduziu a virulência do inseto, e fez com que a planta tolerasse a interação com as ninfas. Este resultado colabora com os encontrados por Thimmaiah et al. (1994) que também detectaram células mais densas e compactas nos genótipos resistentes de algodão ao ataque do pulgão. Segundo estes pesquisadores, células densas e compactas dificultam o acesso do estilete do pulgão ao floema e, portanto, poderia ser um dos fatores responsáveis pela resistência da planta hospedeira.

5- CONCLUSÕES:

- A avaliação das características fisiológicas permitiu discriminar o genótipo tolerante do genótipo suscetível ao ataque das ninfas da cigarrinha das raízes.
- A morfologia de ambos os genótipos sofreram modificações após a exposição das plantas ao ataque das ninfas. Entretanto, os danos morfológicos apresentados pelo genótipo SP813250 foram mais evidentes.
- As características alométricas indicaram que o ataque das ninfas causa perda na produtividade e afeta o desenvolvimento das plantas. Entretanto, as perdas são maiores no genótipo suscetível.
- A análise da anatomia das plantas permitiu separar o genótipo tolerante do suscetível ao ataque das ninfas. A melhor *performance* do genótipo Kawandang pode ser explicada pela organização das suas células parenquimáticas que são compactas e

densas atuando como uma barreira que dificulta o acesso dos estiletes das ninfas ao xilema.

- Os resultados encontrados neste estudo demonstraram a robustez do genótipo tolerante em responder ao ataque das ninfas de *M. fimbriolata*.
- A avaliação das características morfofisiológicas, alométricas e anatômicas são ferramentas que podem auxiliar o programa de melhoramento da cana-de-açúcar na seleção de variedades tolerantes a ninfas de cigarrinha-das-raízes.

6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDEA, M.; HAMILTON, J.G.; RESTI, J.P.; ZANGERL, A.R.; BERENBAUM, M.R.; DeLUCIA, E.H. Indirect effects of insect herbivory on leaf gas exchange in soybean. **Plant, Cell and Environment**, 28:402–411, 2005.

ALMEIDA, R.M. de. Variedades CTC para as regiões de Ribeirão Preto e Piracicaba. **Revista Opiniões**. 2012.

ANJUM, S.A.; XIE, X.; WANG, L.; SALEEM, M.F., MAN, C.; LEI, W. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. **African Journal of Agricultural Research**, 6(9): 2026-2032, 2011.

BATISTA, E.; AUAD, A.M.; BRAGA, A.L.F.; FERREIRA, R.B.; HALLACK, N.M.R. Aspectos do Comportamento da Cigarrinha-das-Pastagens *Mahanarva spectabilis* (Distant) (Hemiptera: Cercopidae) na Produção de Espuma. **EntomoBrasilis**, 3(2): 25-28, 2010.

BROEKGAARDEN, C; SNOEREN, T.A.L.; DICKE, M.; VOSMAN, B. Exploiting natural variation to identify insect-resistance genes. **Plant Biotechnology Journal**: 1–7, 2011.

CAI, Q.; AITKEN, K.; DENG, H.H.; CHEN, X.W., FU, C.; JACKSON, P.A.; MCINTYRE, C.L. Verification of the introgression of *Erianthus arundinaceus* germplasm into sugarcane using molecular markers. **Plant Breeding**, 124: 322-328, 2005.

CALATAYUDA, V.; CERVERÓA, J.; CALVOA, E.; GARCÍA-BREIJO, F.J.; REIG-ARMIÑANAC, J.; SANZ, M.J. Responses of evergreen and deciduous *Quercus* species to enhanced ozone levels. **Environmental Pollution**, 159: 55-63, 2011.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; ABREU, H.M.C DE; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J.C.; BURNQUIST, W.L.; CRESTE, S.; CIERO, L. DI; FERRO, J.A.; FIGUEIRA, A.V.O; FILGUEIRAS, T.S.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; GUZZO, E.C.; HOFFMANN, H.P.; LANDELL, M.G.A.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; REINACH, F.C.; ROMANO, E.; SILVA, W.J. da; SILVA FILHO, M.C.; ULIAN, E.C. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, 4(1): 62-89, 2011.

DELANEY, K.J. *Nerium oleander* indirect leaf photosynthesis and light harvesting reductions after clipping injury or *Spodoptera eridania* herbivory: High sensitivity to injury. **Plant Science**, 185-186: 218-226, 2012.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Nematóides e pragas de solo em cana-de-açúcar. **Encarte do informações agronômicas nº 110 – junho/2005**, 2005. p. 25-32. Disponível em: <[http://www.ipni.net/publication/iabrasil.nsf/0/B1FA44831820884083257AA1006BC838/\\$FILE/Enc25-32-110.pdf](http://www.ipni.net/publication/iabrasil.nsf/0/B1FA44831820884083257AA1006BC838/$FILE/Enc25-32-110.pdf)>. Acesso em: 14 out. 2013.

DINARDO-MIRANDA, L.L. Pragas. In: Dinardo-Miranda, L.L.; Vasconcelos, A.C.M.; Landell, G.A. (Orgs.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2008. cap. 17, p. 349-404.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; COSTA, V.P.; FRACASSO, J.V.; PERECIN, D.; OLIVEIRA, M.C. de; IZEPI, T.S.; LOPES, D.O.P. Resistance of Sugarcane Cultivars to *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae). **Neotropical Entomology**, 43:90–95, 2014.

FEWKES, D.W. The biology of sugar cane froghoppers. In: Williams, J.R. et al. (Org.) **Pests of sugar cane**. Amsterdam: Elsevier Publishing, 1969. cap. 14, p. 281-307.

FLOSS, E. **Fisiologia das plantas cultivadas: o estudo que está por trás do que se vê**. 4. ed. Passo Fundo: UPF, 2008. 733p.

FRIER, J.P.D.; HERNÁNDEZ, C.V.S.; TIESSSEN, A. Friend or foe? Exploring the factors that determine the difference between positive and negative effects on photosynthesis in response to insect herbivory. In: NAJAFPOUR, M.M. (Org.) **Artificial Photosynthesis**. Rijeka, 2012. cap. 8, p. 155-206.

GABE, M. **Techniques histologiques**. Paris: Masson & Cie, 1968. 1113p.

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**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

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

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 Agricola**, 63(4): 317-320, 2006.

GARCIA, J.F.; BOTELHO, P.S.M.; PARRA, J.R.P.; APPEZZATO-da-GLÓRIA, B. Feeding site of the spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) on sugarcane. **Scientia Agricola**, 64(5): 555-557, 2007.

GARCIA, J.F.; PRADO, S.S.; VENDRAMIM, J.D.; BOTELHO, P.S.M. Effect of sugarcane varieties on the development of *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae). **Revista Colombiana de Entomología**, 37(1): 16-20, 2011.

GASSEN, M.H. **Produção e eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. no controle da cigarrinha-das-raízes da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae).** 2010, 78 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP, 2010.

GHANNOUM, O. C4 photosynthesis and water stress. **Annals of Botany**, 103:635–644, 2008.

GONÇALVES, T.D.; MUTTON, M.A.; PERECIN, 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**, 22(2): 29-33, 2003.

GUIMARÃES, E.R.; MUTTON, M.A.; MUTTON, M.J.R.; FERRO, M.I.T.; RAVANELI, G.C.; SILVA, J.A. da. Free proline accumulation in sugarcane under water restriction and spittlebug infestation. **Scientia Agricola**, 65(6): 628-633, 2008 a.

GUIMARÃES, E.R.; MUTTON, M.A.; FERRO, M.I.T.; SILVA, J.A. da; MUTTON, M.J.R. Níveis constitutivos de compostos fenólicos podem estar relacionados à resistência da cana-de-açúcar à cigarrinha-das-raízes. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, 1(3): 357-365, 2008 b.

HENG-MOSS, T.; MACEDO, T.; FRANZEN, L.; BAXENDALE, F.; HIGLEY, L.; SARATH, G. Physiological responses of resistant and susceptible buffalograsses to *Blissus occiduus* (Hemiptera: Blissidae) feeding. **Journal of Economic Entomology**, 99(1): 222-228, 2006.

HUANG, J.; ZHANG, P.-J.; ZHANG, J.; LU, Y.-B.; HUANG, F.; LI, M.-J. Chlorophyll content and chlorophyll fluorescence in tomato leaves infested with an invasive Mealybug, *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae). **Environmental Entomology**, 42(5):973-979, 2013.

ISLAM, Md.T.; SHUNXIANG, R. Effect of sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) infestation on eggplant (*Solanum melongena* L.) leaf. **Journal of Pest Science**, 82:211–215, 2009.

KATO, K. Origin and composition of spittle made by spittlebugs. **The science reports of Saitama University: Series B**, 3(1): 33-53, 1958.

KERCHEV, P.I.; FENTON, B.; FOYER, C.H.; HANCOCK, R.D. Plant responses to insect herbivory: interactions between photosynthesis, reactive oxygen species and hormonal signalling pathway. **Plant, Cell and Environment**, 35: 441–453, 2012.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: RiMa, 2006. 550 p.

LATTANZIO, V.; LATTANZIO, V.M.T; CARDINALI, A. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: IMPERATO,

F. (Org.) **Phytochemistry: Advances in Research**. Kerala: Research Signpost, 2006. cap. 2, p. 23-67.

LEITE, D.C.C. **Modificações da parede celular durante a formação do aerênquima em raízes de cana-de-açúcar**. 2013. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2013.

LOPEZ, F.; CARDONA, C.; MILES, J.W.; SOTELO, G.; MONTOYA, J. Screening for resistance to adult spittlebugs (Hemiptera: Cercopidae) in *Brachiaria* spp.: methods and categories of resistance. **Journal of Economic Entomology**, 102(3): 1309–1316, 2009.

MACE, M.E.; HOWELL, C. R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. **Phytopathology**, 64: 1297-1302, 1974.

MACEDO, N.; MACEDO, D. As pragas de maior incidência nos canaviais e seus controles. **Visão agrícola**, 1: 38-46, 2004.

MAFFEI, M.E.; MITHÖFER, A.; BOLAND, W. Before gene expression: early events in plant–insect interaction. **Trends in Plant Science**, 12(7): 310-316, 2007.

MAKINO, A. Photosynthesis, grain yield, and nitrogen utilization in rice and wheat. **Plant Physiology**, 155: 125–129, 2011.

MARSHALL, A.T. Batelli glands of cercopoid nymphs (Homoptera). **Nature**, 205: 925, 1965.

MELLO, M.O.; SILVA-FILHO, M.C. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 14(2):71-81, 2002.

MENDONÇA, A.F.; MENDONÇA, I.C.B.R. Cigarrinha da raiz *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae). In: MENDONÇA, A.F. (Org.). **Cigarrinhas da cana-de-açúcar**. Maceió: Insecta, 2005. cap. 3, p. 95-200.

MULLER, B.; PANTIN, F.; GÉNARD, M.; TURC, O.; FREIXES, S.; PIQUES, M.; GIBON, Y. Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. **Journal of Experimental Botany**, 62(6): 1715–1729, 2011.

NABITY, P.D.; HILLSTROM, M.L.; LINDROTH, R.L.; DeLUCIA, E.H. Elevated CO₂ interacts with herbivory to alter chlorophyll fluorescence and leaf temperature in *Betula papyrifera* and *Populus tremuloides*. **Oecologia**, 169:905–913, 2012.

NEY, B.; BANCAL, M.O.; BANCAL, P.; BINGHAM, I.J.; FOULKES, J.; GOUACHE, D.; PAVELEY, N.; SMITH, J. Crop architecture and crop tolerance to fungal diseases and insect herbivory. Mechanisms to limit crop losses. **European Journal of Plant Pathology**, 135:561–580, 2013.

NUTT, K.A.; O'SHEA, M.G.; ALLSOPP, P.G. Feeding by sugarcane whitegrubs induces changes in the types and amounts of phenolics in the roots of sugarcane. **Environmental and Experimental Botany**, 51: 155–165, 2004.

FAO, Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura. **Novo anuário estatístico da fao aponta tendências em agricultura e alimentação**. 2012. Disponível no site: <<https://www.fao.org.br/naeFAOataa.asp>>. Acesso em: 05 set. 2013.

PABÓN VALVERDE, A.H. **Screening for resistance and identification of tolerance in sugarcane genotypes to spittlebug *Mahanarva fimbriolata***. 2012. 58 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

PARSA, S.; SOTELO, G.; CARDONA, C. Characterizing herbivore resistance mechanisms: spittlebugs on *Brachiaria* spp. as an example. **Journal of Visualized Experiments**, 2011.

PATTEN, A.M.; CARDENAS, C.L.; COCHRANE, F.C.; LASKAR, D.D.; BEDGAR, D.L.; DAVIN, L.B.; LEWIS, N.G. Reassessment of effects on lignifications and vascular development in the *irx4 Arabidopsis* mutant. **Phytochemistry** 66: 2092-2107, 2005.

PENATTI, C. Cigarrinha das raízes da cana-de-açúcar. **Coplana**: 24-25, 2006.

PIMENTEL, D. Pesticide and pest control. In: PESHIN, P.; DHAWAN, A.K. (Org.) **Integrated pest management: innovation-development process**. New York: Springer, 2009. cap. 3, p. 83–87.

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>, 2013.

RAVANELI, G.C.; MUTTON, M.J.R.; GARCIA, D.B.; MADALENO, L.L.; STUPIELLO, J.P.; MUTTON, M.A. Danos promovidos pela cigarrinha-das-raízes sobre a qualidade tecnológica da cana. **Ciência & Tecnologia: FATEC-JB**, 3 (1): 16-27, 2011.

RESENDE, T.T.; AUAD, A.M.; FONSECA, M.G.; SANTOS, T.H. dos; VIEIRA, T.M. Impact of the spittlebug *Mahanarva spectabilis* on signal Grass. **The ScientificWorld Journal**, 2012. 6 p.

ROSA, S.B. **Caracterização funcional das isoformas citosólicas e peroxissomais de ascorbato peroxidase em arroz (*Oryza sativa* L.)**. 2008. 156 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2008.

SANTAMARIA, M.E.; MARTÍNEZ, M.; CAMBRA, I.; GRBIC, V.; DIAZ, I. Understanding plant defence responses against herbivore attacks: an essential first step towards the development of sustainable resistance against pests. **Transgenic Research**, 22: 697–708, 2013.

SANTIAGO, R.; BARROS-RIOS, J.; MALVAR, R.A. Impact of cell wall composition on maize resistance to pests and diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, 14: 6960-6980, 2013.

SARWAR, M. Comparing abundance of predacious and *Phytophagous mites* (Acarina) in conjunction with resistance identification between Bt and non-Bt cotton cultivars. **African Entomology**, 21(1):108-118, 2013.

SATO, A.M.; CATUCHI, T.A.; RIBEIRO, R.V.; SOUZA, G.M. The use of network analysis to uncover homeostatic responses of a drought-tolerant sugarcane cultivar under severe water deficit and phosphorus supply. **Acta Physiologiae Plantarum**, 32:1145–1151, 2010.

SEAPA, Secretaria de Estado de Agricultura Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais. **Protocolo regula queima da cana-de-açúcar em Minas**. 2009. Disponível em: <<http://www.agricultura.mg.gov.br/noticias/719>>. Acesso em: 19 fev. 2014.

SELTMANN, M.A.; STINGL, N.E.; LAUTENSCHLAEGER, J.K.; KRISCHKE, M.; MUELLER, M.J.; BERGER, S. Differential impact of lipoxygenase 2 and jasmonates on natural and stress-induced senescence in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, 152:1940-1950, 2010.

SILVA, L.M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V.J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botanica Brasilica** 19(1): 183-194, 2005.

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

SIMÕES, A.D.; LIMA, E.R.; AUAD, A.M.; RESENDE, T.T.; LEITE, M.V. Development of the spittlebug *Mahanarva fimbriolata* under varying photophase conditions. **Journal of Insect Science**, 13(105), 2013.

SIYIANNIS, V.F.; PROTONOTARIOS, V.E.; ZECHMANN, B.; CHORIANOPOULOU, S.N.; MÜLLER, M.; HAWKESFORD, M.J.; BOURANIS, D.L. Comparative spatiotemporal analysis of root aerenchyma formation processes in maize due to sulphate, nitrate or phosphate deprivation. **Protoplasma**, 249:671–686, 2012.

SKIRYCYZ, A.; INZÉ, D. More from less: plant growth under limited water. **Opinion in Biotechnology**, 21:197–203, 2010.

SOARES, A.M.S.; MACHADO, O.L.T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, 1(1): 9p., 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5^o ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

TANG, J.Y.; ZIELINSKI, R.E.; ZANGERL, A.R.; CROFTS, A.R.; BERENBAUM, M.R.; DeLUCIA, E.H. The differential effects of herbivory by first and fourth instars of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) on photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, 57:527–536, 2006.

THIMMAIAH, K.K.; PANCHAL, Y.C.; KADAPA, S.N.; PRABHAKAR, A.S.N. Comparative anatomical studies in insect pest resistant and susceptible cotton genotypes. **Journal of Agricultural Science**, 7(4): 410-416, 1994.

UDOP, União dos Produtores de Bioenergia. **Com fim da queimada, professor cria colheitadeira para produtor de cana**. 2014. Disponível em: <<http://www.udop.com.br/index.php?item=noticias&cod=1109180#nc>>. Acesso em: 19 fev. 2014.

VALÉRIO, J.R. Cigarrinhas–das-pastagens. Vol. 1. **Embrapa Gado de Corte**, Campo Grande, 2009. 51p.

VELIKOVA, V.; SALERNO, G.; FRATI, F.; PERI, E.; CONTI, E.; COLAZZA, S.; LORETO, F. Influence of feeding and oviposition by phytophagous pentatomids on photosynthesis of herbaceous plants. **Journal of Chemical Ecology**, 36:629–641, 2010.

WAR, A.R.; PAULRAJ, M.G.; AHMAD, T.; BUHROO, A.A.; HUSSAIN, B.; IGNACIMUTHU, S.; SHARMA, H.C. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant Signaling & Behavior**, 7(10): 1306-1320, 2012.

WILKINSON, S.; DAVIES, W.J. Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant community. **Plant Cell & Environment**, 33:510–525, 2010.

WONDAFRASH, M.; Van Dam, N. M.; TYTGAT, T.O.G. Plant systemic induced responses mediate interactions between root parasitic nematodes and aboveground herbivorous insects. **Frontiers in Plant Science**. 4: 87, 2013.

XU, Q.T.; YANG, L.; ZHOU, Z.Q.; MEI, F.Z.; QU, L.H.; ZHOU, G.S. Process of aerenchyma formation and reactive oxygen species induced by waterlogging in wheat seminal roots. **Planta**, 238:969–982, 2013.

YIN, D.; CHEN, S.; CHEN, F.; JIANG, J. Ethylene promotes induction of aerenchyma formation and ethanolic fermentation in waterlogged roots of *Dendranthema* spp. **Molecular Biology Reports**, 40:4581–4590, 2013.

Zagrobelny, M.; SCHEIBYE-ALSING, K.; JENSEN, N.B.; MØLLER, B.L.; GORODKIN, J.; BAK, S. 454 pyrosequencing based transcriptome analysis of *Zygaena filipendulae* with focus on genes involved in biosynthesis of cyanogenic glucosides. **BMC Genomics**, 10:574, 2009.

ZVEREVA, E.L.; LANTA, V.; KOZLOV, M.V. Effects of sap-feeding insect herbivores on growth and reproduction of woody plants: a meta-analysis of experimental studies. **Oecologia**, 163:949–960, 2010.