

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA DE CULTIVARES DE
CANA-DE-AÇÚCAR AO *Sugarcane yellow leaf virus*
(SCYLV) E AO SEU AFÍDEO VETOR
*Melanaphis sacchari***

**Mariana Pelegrini Rodrigues
Engenheira Agrônoma**

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA DE CULTIVARES DE
CANA-DE-AÇÚCAR AO *Sugarcane yellow leaf virus*
(SCYLV) E AO SEU AFÍDEO VETOR
*Melanaphis sacchari***

Mariana Pelegrini Rodrigues

Orientadora: Prof. Dra. Luciana Rossini Pinto

Coorientador: Dr. Marcos Cesar Gonçalves

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

2015

R696a Rodrigues, Mariana Pelegrini
Avaliação de resistência de cultivares de cana-de-açúcar ao
Sugarcane yellow leaf virus (SCYLV) e ao seu afídeo vetor
Melanaphys sacchari / Mariana Pelegrini Rodrigues. -- Jaboticabal,
2015
xii, 71 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientadora: Luciana Rossini Pinto
Coorientador: Marcos Cesar Gonçalves
Banca examinadora: Fernando Javier Sanhueza Salas, Gustavo
Vitti Mõro
Bibliografia

1. Antibiose. 2. Antixenose. 3. EPG. 4. Saccharum sp. 5. SCYLV. 6.
Sintomatologia. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.9:633.61

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

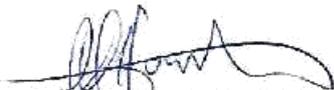
TÍTULO: AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA DE CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR AO Sugarcane yellow leaf virus (SCYLV) E AO SEU AFÍDEO VETOR *Melanaphis sacchari*

AUTORA: MARIANA PELEGRINI RODRIGUES

ORIENTADORA: Profa. Dra. LUCIANA ROSSINI PINTO

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCOS CESAR GONÇALVES

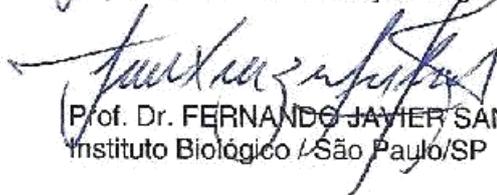
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS) , pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. MARCOS CESAR GONÇALVES
Instituto Biológico / São Paulo/SP



Prof. Dr. GUSTAVO VITTI MÕRO
Departamento de Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. FERNANDO JAVIER SANHUEZA SALAS
Instituto Biológico / São Paulo/SP

Data da realização: 21 de maio de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Mariana Pelegrini Rodrigues, nasceu 15/12/1989 em Uberlândia-MG, sendo filha única de Marina Gomes Pelegrini e Leandro Rodrigues. Em Dezembro de 2007 ao término do ensino médio ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal de Uberlândia. Durante a graduação recebeu bolsa de iniciação científica do CNPq por participação em projetos de pesquisas envolvendo fertilidade do solo, e entomologia. Teve participação como bolsista do PET (Programa de Educação Tutorial), sendo este programa financiado pelo Ministério da Educação. Realizou estágio por sete meses no programa de melhoramento da cultura da cana-de-açúcar do USDA (Departamento Americano de Agricultura) em parceria com a Universidade da Flórida (EUA) na cidade de Belle Glade-FL (USA). Realizou estágios na Monsanto na área de melhoramento de milho, acompanhando o time de melhoramento de Duplo-Haplóides (DH). Após a conclusão da graduação em 2013, ingressou no curso de mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) da Universidade Estadual —Júlio de Mesquita Filho”, campus Jaboticabal-SP, em Março de 2013, onde foi bolsista CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior), e desenvolveu as pesquisas pertinentes a dissertação em parceria ao Instituto Agronômico de Campinas (IAC) Unidade Cana-de-açúcar (Ribeirão-Preto, SP), sob orientação da Dr. Luciana Rossini Pinto, e no Instituto Biológico sob tutoria do Dr. Marcos Cesar Gonçalves e Dr. Fernando Javier Sanhueza Salas.

—..Não diga que a canção esta perdida
Tenha fé em Deus,
Tenha fé na vida...”

Raul Seixas

Dedico

Dedico este trabalho a minha mãe Marina Gomes Pelegrini, por sempre estar ao meu lado, buscando me oferecer a melhor educação possível e incentivando meus sonhos, e por se esforçar sem limites para que eu realizasse-os.

Ofereço

A minha avó Ana, símbolo de força para mim; minha tia Beatriz pelo apoio desde o principio para realização desta etapa; ao meu namorado Sérgio por todo incentivo e força nessa etapa e nos momentos difíceis enfrentados. E a toda minha família por sempre estar presente na minha vida.

Agradeço

Reconheço a contribuição de todos que foram essenciais na realização desta pesquisa e agradeço imensamente por todos profissionais que contribuíram.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ter os melhores planos para a minha vida e por estar sempre me amparando nos caminhos trilhados.

A minha **mãe**, pelo incentivo, apoio, força e amor a todo o momento, mesmo nos momentos de desespero, e de dúvidas. Obrigada por sempre depositar sua confiança em mim.

A tia **Beatriz**, por ter lutado pelo início dessa etapa, para finalização da minha graduação a tempo de assumir o mestrado.

A minha **avó Ana**, **tia Aninha**, pelas orações e nossa ligação constante de força e pensamento me deixando mais forte nos momentos que sempre precisei.

Aos meus outros **tios**, **tia Alice**, tia **Maria Cleusa** em especial, meus **primos**, que são meus irmãos, eu agradeço por acreditarem tanto em mim, e me darem todo o carinho.

Ao meu namorado, **Sérgio**, sem palavras para descrever como conseguimos crescer mais uma etapa mais próximos, e como você foi essencial novamente nesse percurso da minha vida. Obrigada pelo amor, carinho, pelo incentivo, pela força. A sua família, obrigada também pela torcida!

A querida orientadora **Dra. Luciana Rossini Pinto**, que será uma grande amiga! obrigada pela paciência em ensinar. Obrigada pelo carinho, atenção e dedicação comigo. Obrigada pelos conselhos.

Ao **Dr. Marcos Cesar Gonçalves**, obrigada pela paciência e pelas contribuições como co-orientador. Obrigada! Instigou bastante o meu conhecimento pelo o que realmente eu não sabia.

Ao **Dr. Fernando Javier Sanhueza Salas**, e toda sua equipe do IB (aos Thiagos, Samantha, Ieda), agradeço imensamente a generosidade de poder desenvolver um trabalho com você. EPG não foi uma tarefa fácil, mas tornou-se incrivelmente vencível com sua ajuda e estímulo.

A **Dr. Silvana Aparecida Crestes** por toda a instrução para o desenvolvimento das plântulas na biofábrica do IAC.

Ao professor **Dr. Dilermando Percin**, pela paciência e imensa contribuição nas análises estatísticas.

Ao **Centro de Cana-de-açúcar (IAC-Cana)** pela oportunidade de desenvolvimento da dissertação do mestrado, e pelos aprendizados adquiridos na estação.

A **UNESP-Jaboticabal** pela oportunidade de estudos e aprendizados com professores excelentes e em uma Universidade com ótima estrutura para o curso de Agronomia. Fico muito lisonjeada de ter a UNESP no meu currículo.

A todos colaboradores do **IAC**: Marcos Bidoia, Thiago, Hector, Lúcia, Dona Marta, Camilla, Letícia, Débora, Nat, Thaís... Todos que eu lembro que tiveram participação direta e indireta na minha dissertação, meus sinceros agradecimentos por esta fase de grandes aprendizados e amizade.

Ao **Maicon**, obrigada inúmeras vezes, pelos inúmeros socorros a mim prestados! Você faz a diferença!

Aos amigos **Alisson, Silvan, Marcel**, muito obrigada pela amizade, e principalmente por poderem compartilhar comigo as caronas Jaboticabal-Ribeirão.

Aos **amigos de Uberlândia sediados na Unesp Jaboticabal** (Carol, Pira, Fernando, Pedro..) obrigada por serem meu ponto de apoio e companhia para lanches e comidas principalmente nos finais de semana.

A amizade feita por uma mudança veio uma grande amiga: **Fernanda Fonsatti**. Obrigada por dividir comigo momentos bons e ruins. Conte comigo sempre... Sentirei muito sua falta!

As amigas que ficaram marcadas nessa fase de mestrado: **Carol e Isis**. Carol, obrigada pelo carinho, e pela grande ajuda principalmente nesta reta final. Isis, obrigada pela amizade sincera também, e por ser amiga de todas as horas!!

As amigadas feitas em Jaboticabal: **Andressa, Uliana, Janaína, Thalita!** Jamais serão esquecidas, por todos os bons momentos compartilhados!

Enfim, agradeço a todos que sempre torceram por mim, e que direta ou indiretamente me motivaram ou ajudaram!

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| SUMÁRIO..... | i |
| RESUMO..... | iii |
| ABSTRACT | iv |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 2.1 Cenário da Cana-de-açúcar no Brasil e no Mundo | 3 |
| 2.2 Síndrome do amarelecimento foliar (Amarelinho)..... | 4 |
| 2.3 Caracterização do SCYLV | 7 |
| 2.4 Transmissão do Vírus | 8 |
| 2.5 Cultura de micromeristemas | 11 |
| 2.6 Resistência de plantas a Insetos..... | 12 |
| 2.7 Electrical Penetration Graphs (EPG)..... | 14 |
| 2.8 Tricomas, metabólitos primários e secundários | 17 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 21 |
| 3.1 Cultivares utilizadas | 21 |
| 3.2 Criação dos pulgões | 21 |
| 3.3 Obtenção de plantas por cultura de meristemas..... | 22 |
| 3.4 Avaliação da resistência ao afídeo <i>M. sacchari</i> | 23 |
| 3.5 Ensaio de Antibiose | 24 |
| 3.6 Ensaio de Antixenose ou Preferência | 24 |
| 3.7 Obtenção dos registros de EPG..... | 25 |
| 3.8 Análise Estatística para Ensaio Resistência ao Inseto..... | 27 |
| 3.9 Contagem de Tricomas..... | 28 |
| 3.10 Inoculações e avaliação da resistência das cultivares ao SCYLV | 30 |
| 3.11 Extração de RNA total das plantas e diagnóstico por RT-PCR..... | 31 |
| 3.12 Ensaio de campo para avaliação da resistência ao SCYLV | 32 |
| 4 RESULTADOS | 35 |
| 4.1 Antibiose | 35 |
| 4.2 Antixenose | 36 |
| 4.3 EPG | 39 |

| | |
|---|----|
| 4.4 Tricomas | 43 |
| 4.5 Obtenção das Plantas por cultura de micromeristema..... | 44 |
| 4.6 Resistência ao SCYLV | 45 |
| 5 DISCUSSÃO | 49 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 56 |
| 7 REFERÊNCIAS..... | 57 |

**AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA DE CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR
AO *Sugarcane yellow leaf vírus* (SCYLV) E AO SEU AFÍDEO VETOR
*Melanaphis sacchari***

RESUMO-Este trabalho teve como tema a avaliação da resistência de cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*) ao vírus do amarelecimento foliar (SCYLV) e ao seu principal afídeo vetor *Melanaphis sacchari* (Zehntner). Cinco cultivares de cana-de-açúcar (IACSP93 3046, IACSP95 5000, IACSP95 5094, IACSP96 3076 e SP71 6163) escolhidas devido à importância econômica para os canaviais brasileiros, foram multiplicadas por cultura de meristema e indexadas em uma biofábrica e avaliadas quanto à resistência ao seu inseto vetor *M. sacchari*, por meio do estudo do comportamento deste afídeo nessas cultivares através de testes de antibiose, antixenose e EPG (Electrical Penetration Graphs). Paralelamente, um segundo ensaio foi estabelecido para avaliar o desenvolvimento do amarelecimento foliar em campo, após inoculação do vírus (SCYLV) nas plantas indexadas. Os pulgões mostraram uma preferência para a cultivar IACSP96 3076 e melhor desenvolvimento populacional na IACSP95 5000. Parâmetros floemáticos favoráveis ao desenvolvimento de *M. sacchari* foram descobertos na cultivar SP71 6163 reforçando sua suscetibilidade a infecção de SCYLV, e comprovando por meio de avaliações de severidade de sintomas, que o amarelecimento da cana-de-açúcar expressa-se com maior rapidez e intensidade nesta cultivar.

Palavras-chaves: Antibiose, Antixenose, EPG, *Saccharum sp.*, SCYLV, Sintomatologia.

EVALUATION OF SUGARCANE CULTIVARS RESISTANCE TO *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) AND TO ITS APHID VECTOR *Melanaphis sacchari*

ABSTRACT-This research focused on the evaluation of resistance in sugarcane (*Saccharum* spp.) to the *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) and to its main vector, the sugarcane aphid *Melanaphis sacchari* (Zehntner). Five sugarcane varieties (IACSP93 3046, IACSP95 5000, IACSP95 5094, IACSP96 3076, and SP71 6163), chosen due to their economic importance to Brazilian sugarcane growing areas, were multiplied by tissue tip culture, indexed, and evaluated in terms of the aphids' behavior by the traditional antibiosis, antixenosis and EPG (Electrical Penetration Graphs). At the same time, a second test was set up for evaluating the development of yellowing leaf on field after inoculation with SCYLV. The aphid showed preference for IACSP96 3076 and higher population growths indexes on IACSP95 5000. We found out favorable parameters on the insect behavior over variety SP71 6163 that reinforce its previously known high susceptibility to SCYLV infection. We also demonstrate by these experiments the existence of pre and post-phloematic penetration factors that influence the behavior of *M. sacchari* and further transmission of SCYLV, and proving through initial assessments of symptoms severity that YLS yellowing of sugarcane expressed faster and more strongly in this cultivar.

Key words: Antibiosis, antixenosis, EPG, *Saccharum* sp., SCYLV, symptomatology.

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar está entre as principais culturas de importância econômica do Brasil se destacando como fonte de açúcar, álcool e biomassa. Grande parte da perda de rendimento na produtividade de cana-de-açúcar deve-se à suscetibilidade as doenças, destacando entre as doenças viróticas, o amarelinho e o mosaico da cana.

O amarelinho, causado pelo vírus do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar, *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV), é uma das principais viroses dos canaviais brasileiros, desde a metade da década de 1990, quando esta doença gerou perdas de até 50% no rendimento da variedade SP71 6163, uma das mais promissoras para a indústria açucareira na época (GONÇALVES, 2005).

Esta doença, caracterizada pelo amarelecimento foliar, evidenciado pelo amarelecimento da nervura central, pode ser de difícil detecção no campo por normalmente expressar sintomas apenas em folhas mais velhas. Muitas vezes, plantas infectadas com o vírus não apresentam sintomas, os quais podem aparecer no final do ciclo da cultura (VEGA et al., 1997)

A disseminação do vírus ocorre pela propagação de material infectado (gemas), e a transmissão da doença no campo ocorre principalmente por afídeos vetores *Melanaphis sacchari* (SCHENCK; LEHER, 2000). O tipo de transmissão do vírus pelo vetor se caracteriza como sendo persistente, circulativa e não propagativa (D'ARCY; DOMIER, 2005; VEGA et al., 1997, FARTEK et al., 2014). O vírus não é eliminado por tratamento térmico ou químico dos toletes de cana-de-açúcar, mas pode ser eliminado por cultura de meristemas (CHATENET et al., 2001).

As principais formas de controle da disseminação da doença do amarelecimento foliar consistem no uso de cultivares resistentes, uso de material propagativo sadio e controle dos insetos-vetores. Uma vez que o vírus é transmitido pelos pulgões, a avaliação da resistência de cultivares de cana-de-açúcar ao SCYLV também deve ser abordada considerando o comportamento do inseto-vetor em relação aos cultivares, ou seja, o efeito da cultivar no ciclo reprodutivo do inseto (antibiose) e o efeito repelente na sua

preferência (antixenose). No entanto, algumas limitações podem ser observadas nos métodos convencionais empregados, visto que as avaliações quanto à resistência se limitam à porção externa da folha/planta, não detectando fatores que podem se situar em camadas mais internas, tais como floema e xilema (SALAS et al., 2010). Por este motivo, foi importante a realização da técnica de monitoramento eletrônico da alimentação (Electrical Penetration Graphs), possibilitando a observação de *M. sacchari* internamente nas diferentes cultivares testadas, auxiliando assim a observação de princípios de persistência que podem ajudar na redução do SCYLV (TJALLINGII, 1985).

No Brasil, existe pouca informação a respeito da resistência de cultivares comerciais de cana-de-açúcar ao amarelinho, ao mesmo tempo em relação ao comportamento do inseto vetor elas são inexistentes. Tal informação é importante, principalmente, na recomendação de cultivares em áreas de alta incidência do inseto-vetor, como estratégia de manejo da doença.

Vale ressaltar também que, paralelamente a cultura da cana-de-açúcar, o plantio de sorgo vem crescendo como cultura bioenergética associada ao cultivo da cana e, conseqüentemente, favorecendo as populações de insetos-vetores, incluindo *M. sacchari*, que coloniza a cultura, o que poderá, em curto prazo, colaborar para o aumento da incidência do amarelinho e mesmo de outras viroses da cana-de-açúcar.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência de cultivares comerciais de cana-de-açúcar, provenientes do Programa de Melhoramento de Cana-de-Açúcar do Instituto Agrônomo (cultivares IAC) quanto ao SCYLV, sendo este estudo complementado por meio do comportamento do principal afídeo vetor, através da avaliação da sua biologia, por antibiose e antixenose e lançando mão da técnica de EPG.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cenário da Cana-de-açúcar no Brasil e no Mundo

Com o centro de origem no Sudeste da Ásia, mais precisamente na Nova Guiné e Indonésia, a cana-de-açúcar é cultivada no mundo há mais de 4000 anos (BORRÁS-HIDALGO et al., 2005) e é hoje considerada uma cultura sucroenergética devido ao seus diversos potenciais de uso (HOFFMANN, 2014).

A cana-de-açúcar pertence à família Poaceae, e ao gênero *Saccharum* sp. (D'HONT et al., 1998). As cultivares modernas são complexos híbridos interespecíficos decorrentes do cruzamento principalmente, entre *Saccharum officinarum* e *S. spontaneum* (SANTOS, 2013; PANJE; BABU, 1960; PRICE, 1963). O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, respondendo por 22% da produção mundial de açúcar (Jornal da Cana, 2014), seguido pela Índia, e China, com uma participação aproximada de 14% e 8%, respectivamente do mesmo derivado (Grupo São Martinho, 2014).

Segundo estimativas da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) em parceria com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para safra de 2014/15, a área brasileira cultivada com cana-de-açúcar que será colhida e destinada à atividade sucroalcooleira será de aproximadamente 9.098,03 mil hectares, distribuídos em todos estados produtores. No Brasil, São Paulo detém mais de 50% da área cultivada com cana-de-açúcar (4.678,8 mil hectares), seguindo por Goiás (9,85%), Minas Gerais (8,8%), Mato Grosso do Sul (7,63%), Paraná (7,07%), Alagoas (4,41%), e Pernambuco (2,89%). A cana-de-açúcar expande-se no território brasileiro principalmente nos Estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais e Paraná, onde foi observado um crescimento de 3,3 % ou de 286,6 mil hectares em relação à safra 2013/14 (CONAB, 2014).

O aumento de produção e de produtividade da cultura se deve ao aumento necessário para atender a demanda populacional. A produção de açúcar em todo o mundo dobrou desde o início da década de 1970, passando

de aproximadamente 71 milhões de toneladas de açúcar bruto na safra de 1971, para aproximadamente 160 milhões safra 2011/2012 (Grupo São Martinho, 2014). A produção de etanol obteve um crescimento rápido de 57% no período de 2008-2012, na escala global.

Para atender a essas demandas de produtividade e visando o melhor desempenho das cultivares nos diferentes ambientes, atualmente, no Brasil, as cultivares de cana-de-açúcar são desenvolvidas por quatro grupos de pesquisa. Em termos de área plantada no Brasil, o grupo Ridesa (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético) lidera com 62% da área com seus cultivares, o Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) detém 33,8%, enquanto o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC-Cana) ocupa 0,9% e o grupo Canaviallis 0,01% (BATISTA, 2014).

2.2 Síndrome do amarelecimento foliar (Amarelinho)

A doença do amarelinho da cana-de-açúcar foi primeiramente relatada no Brasil em 1989, e durante toda a década de 90 gerou grandes dificuldades no manejo dos canaviais do estado de São Paulo, onde cultivares altamente produtivas, como a SP71 6163 tiveram que ser eliminadas, devido à grande suscetibilidade a esta virose (GONÇALVES, 2005; VEGA et al., 1997).

No início do aparecimento, a doença era denominada de síndrome do amarelecimento foliar da cana e foram levantadas hipóteses sobre fatores abióticos (solo, clima) e bióticos (fungos, nematóides, fitoplasmas, vírus) como o possível agente causal da doença (SILVA et al., 2008).

A intensidade dos sintomas do amarelinho é diferencialmente expressa nas cultivares de cana infectadas. Em cultivares mais suscetíveis, as plantas infectadas apresentam amarelecimento da face abaxial da nervura central das folhas, seguindo posteriormente por todo limbo foliar. Folhas mais velhas (+6; +7) apresentam uma coloração avermelhada na face adaxial da nervura central e, posteriormente perda de pigmentação distribuída no limbo foliar, progredindo do ápice para a base, seguida pela necrose do tecido (GONÇALVES et al., 2005). Abu Ahmad et al. (2007) relatam que esta descoloração das folhas

geralmente ocorre quando a lâmina foliar ainda encontra-se verde. Cronjé et al. (1998), afirmam que estes sintomas são verificados principalmente em folhas maduras sob condições de baixas temperaturas e estresse.

As plantas afetadas pelo amarelinho apresentam redução no teor de sacarose e amido nos colmos (IZAGUIRRE-MAYORAL 2002; LOCKART et al., 2000), aparentemente por alterações no floema, dificultando o transporte de açúcares e resultando no acúmulo destes na nervura central da folha, além de ter sido observado um pior desenvolvimento do sistema radicular (VEGA et al., 1997; GONÇALVES et al., 2005; VASCONCELOS et al., 2009). Outros sintomas incluem encurtamento dos entrenós, amarelecimento e necrose de folhas mais velhas (ABU AHMAD et al., 2007), o que pode comprometer a produção significativamente conforme foi observado para a cultivar SP71 6163, com perdas de até 50% (VEGA et al., 1997).

Muitas vezes é difícil detectar os sintomas desta doença no campo, e quando se faz a identificação, dependendo da incidência do afídeo-vetor, o vírus pode ter disseminado para outras plantas e variedades da usina canavieira. A cultivar SP71 6163 que era uma das mais produtivas por apresentar alto teor de sacarose e boa produção de massa, foi banida dos canaviais, por ter sido a mais suscetível ao vírus do amarelecimento foliar. Vega et al. (1997) citaram que os sintomas de infecção pelo SCYLV na variedade SP71 6163 só eram identificados em folhas mais velhas, quando a doença já havia disseminado para grande parte dos canaviais, o que possivelmente foi a causa da eliminação rápida desta cultivar dos canaviais brasileiros.

Esta doença pode causar perdas no rendimento nas cultivares suscetíveis mesmo quando as plantas infectadas não expressam os sintomas típicos desta virose (LOCKART e CRONJÉ, 2000). Lehrer e Komor (2008) verificaram redução de até 30% no rendimento de cultivares de cana-de-açúcar assintomáticas, porém infectadas com o SCYLV. Na Louisiana, Estado Unidos, alguns trabalhos demonstraram perdas significativas no rendimento nas plantas infectadas com o SCYLV (GRISHAM et al., 2002). Izaguirre-Mayoral et al. (2002), observaram redução no diâmetro dos colmos e perdas de qualidade no caldo de cana extraído de plantas assintomáticas, porém infectadas.

No Brasil, a maioria das variedades atuais são assintomáticas quando infectadas pelo SCYLV. No entanto, amostras foliares coletadas de diferentes regiões produtoras de cana-de-açúcar no período de 2005-2010, foram positivas para a presença do vírus pelo teste de RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) (GONÇALVES et al., 2012).

Estudos realizados na Florida e no Havaí caracterizaram *S. spontaneum* como um dos germoplasmas mais resistentes ao vírus, com até 93% dos clones analisados isentos de infecção) enquanto *S. officinarum* mostrou-se mais suscetível, com variações de 24 a 48% dos clones livres de vírus (KOMOR, 2011; COMSTOCK et al., 2001; SCKENCK e LEHER, 2000).

Atualmente, esta virose tem sido encontrada de forma endêmica nos canaviais brasileiros, mas seus danos são frequentemente ignorados pelos produtores, devido ao uso de cultivares tolerantes, e ausência de sintomas visuais até os últimos estádios produtivos da cana-de-açúcar (GONÇALVES et al., 2012).

No Brasil, a medida de controle para a o amarelinho foi a erradicação dos canaviais brasileiros da variedade mais suscetível ao vírus, a SP71 6163 e a sua substituição por outras cultivares mais resistentes, reduzindo a incidência da doença nos campos de cultivo (SILVA et al., 2008). Em experimento de campo, Casagrande (2007) constatou a redução de 31% de produção em cultivares doentes comparadas a plantas assintomáticas. Vasconcelos et al. (2009) ressalta que o vírus tornou-se endêmico e mostra-se com um grande potencial de danos aos canaviais, sendo necessário o desenvolvimento de cultivares resistentes através dos programas de melhoramento genético.

Por ser uma doença de difícil visualização nas plantas jovens, em alguns programas de melhoramento de cana-de-açúcar, a exemplo do Programa de Melhoramento de Canal Point nos Estados Unidos (Canal Point - Breeding Program), é observado que a incidência de clones com SCYLV aumenta dos primeiros estádios de seleção até o último do programa (COMSTOCK; MILLER, 2004).

2.3 Caracterização do SCYLV

O amarelecimento foliar foi primeiramente descrito no Havaí em 1988. No entanto, as partículas virais somente foram identificadas no floema, com a técnica de TBIA (*Tissue Blot Immunoassay*) empregando-se antissoro para o *Barley yellow dwarf virus*, da família *Luteoviridae* (VEGA et al., 1997). Estudos posteriores desenvolvidos com sequências de RNA viral confirmaram ser este vírus pertencente à família *Luteoviridae* e ao gênero *Polerovirus* (MAIA et al., 2000; MOONAN et al., 2000). Acredita-se que este vírus provém da ressurgência da murcha amarela (Yellow Wilt), observada nos anos 60 na África (RICAUD, 1968). Abu Ahmad e colaboradores (2007) fizeram uma caracterização geográfica de SCYLV em quatro grupos: BRA (Brasil), CUB (Cuba), PER (Peru) e REU (Ilhas Reunião).

Os vírus pertencentes a esta família multiplicam-se no floema das plantas hospedeiras e são transmitidos por afídeos. A transmissão de SCYLV é do tipo persistente, circulativa, não propagativa, ou seja, o afídeo após a aquisição do vírus é capaz de transmitir o vírus por todo o seu ciclo de vida, incluído as ecdises, para várias plantas. Entretanto, não ocorre replicação no interior do inseto e não há a transmissão a sua prole (VEGA et al., 1997; MAIA et al., 2000; MOONAN et al., 2000; DOMIER, 2012). Costa (1998) descreveu que nesse tipo de transmissão, após adquirirem o vírus, os pulgões vetores são capazes de transmitir as partículas virais por semanas, as quais passam pela parede do intestino, indo em direção à hemolinfa e retornando para as glândulas salivares, e daí sendo transmitidos para uma nova planta. Devido à localização no floema, os vírus caracterizados como de transmissão persistente necessitam de um período de horas para serem adquiridos e transmitidos, demandando dos afídeos maior tempo de fixação na planta e um longo trabalho estiletar (NAULT, 1997).

Os membros da família *Luteoviridae* possuem como característica a forma isométrica das partículas virais e restrição ao floema. Além disso, outra característica dos luteovírus é a de elevar a concentração de açúcares em tecidos foliares, principalmente da nervura central onde é observado o

amarelecimento agudo em plantas sintomáticas (ORLOB; ARNY, 1961; BARROSO et al., 1995; COMSTOCK; MILLER, 2005).

O tempo necessário para expressão dos sintomas resultantes da infecção com o vírus tem sido apontado em plantas com no mínimo 200 dias de idade (LEHRER; KOMOR, 2008) e a inconstância desta sintomatologia, devido a outros fatores abióticos como estresse hídrico (LOCKART; CRONJÉ, 2000) são fatores que dificultam a seleção de cultivares resistentes ao SCYLV. Já existem relatos de transgênicos de cana-de-açúcar resistentes ao SCYLV, sendo a primeira transformação obtida pelo USDA (United State Department of Agriculture) no clone CP92-1666. No entanto, este clone tem sido utilizado como genitor em cruzamentos, pois, possui baixos rendimentos (GILBERT et al., 2009; GLYNN et al., 2010).

Um levantamento da incidência de SCYLV no germoplasma da estação de melhoramento do USDA-Canal Point revelou baixa incidência do SCYLV em acessos de *S. spontaneum* (7%), sendo esta espécie considerada a mais resistente e um bom genitor em cruzamentos visando a obtenção de genótipos resistentes ao SCLVY. *S. officinarum* apresentou 75% de incidência de SCYLV enquanto em *S. robustum*, *S. sinense* e *S. barberi* a incidência foi de 62.5%, 46.2% e 13.6%, respectivamente (COMSTOCK, 2001).

2.4 Transmissão do Vírus

A principal forma de disseminação do SCYLV é através do uso de toletes infectados. O vírus espalhou-se pelo mundo por meio de germoplasma infectado quando métodos de diagnóstico dessa doença não existiam (ABU AHMAD et al., 2007) e tornou-se uma doença endêmica nas principais regiões produtoras de cana-de-açúcar do mundo (GONÇALVES, 2008). A principal forma de transmissão do vírus para inúmeras cultivares de cana-de-açúcar ocorre por meio das espécies de afídeos *M. sacchari*, *Rophalosiphum maidis* (SCAGLIUSI E LOCKART, 2000; LOPES et al., 1997) e *Sypha flava* (LOPES et al., 1997). Segundo estudos de Gonçalves (2005), as três espécies de afídeos

são de comum ocorrência no Brasil, porém a maior eficiência de transmissão se dá com *M. sacchari* (SCHENCK; LEHRER, 2000).

M. sacchari (Zehntner), é considerada a principal espécie aholocíclica no mundo, que se reproduz por partenogênese (NIBOUCHE et al. 2014). Esse modo de reprodução reflete numa baixa variabilidade populacional favorecendo a colonização de uma ampla faixa territorial e de hospedeiros (VRIJENHOENK; PARKER, 2009). Estes insetos apresentam uma característica de grande plasticidade fenotípica de adaptação ao meio, e sua rápida reprodução assegura sua grande disseminação (LOXDALE, 2009). Nibouche et al. (2014) comprovaram por meio do estudo com microssatélites de populações de *M. sacchari* coletados em 42 localidades, de 15 países, que a taxa de diversidade genética para esta espécie de afídeo é muito baixa, e os polimorfismos encontrados são devidos a influência do meio e não da planta hospedeira.

A espécie *M. sacchari* apresenta uma coloração variável de acordo com a planta hospedeira e com as condições ambientais. No entanto, normalmente apresenta-se verde-amarelada, medindo de 1,5-2,0 mm de comprimento (BLACKMAN; EASTOP, 2000). Apresenta as formas ápteras e aladas, sendo que os pulgões alados normalmente são menores e tem asas hialinas. Reproduzem-se por partenogênese telítica, quando um pulgão adulto origina outras ninfas sem a participação de machos da mesma espécie.

Segundo relatos feitos (NARAYANA, 1975) em plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.)), que também é uma espécie hospedeira de *M. sacchari*, estes insetos formam colônias na face abaxial das folhas. Os alados possuem manchas escuras no dorso (SINGH et al., 2004). Apresentam quatro estádios ninfais, que podem se completar entre 4 a 12 dias (CHANG et al., 1982; MANTHE, 1992). Existem relatos que os adultos podem ter idade mínima de 10-16 dias (MEKSONGEE; CHAWANAPONG, 1985), 14–37 (CHANG et al., 1982), ou 28 dias (VAN RENSBURG, 1975), produzindo mais que 68 ninfas por fêmea, sendo a média 34 ninfas por adulto (MEKSONGEE; CHAWANAPONG, 1985).

Os pulgões não são considerados pragas primárias para a cultura da cana-de-açúcar (GALLO et al., 2002). No entanto, tendo em vista o ciclo reprodutivo alto em um curto período de tempo (KINDLANN et al., 2007) e por serem vetores da maioria dos vírus que infectam a cultura da cana-de-açúcar

como o mosaico (SCMV- Sugarcane Mosaic Virus), o SCSMV e o SrMV são insetos que apresentam danos econômicos indireto. De modo geral os afídeos são vetores de 28% das fitoviroses de todas as culturas (HOGENHOUT et al., 2008), são considerados importantes pragas.

Os pulgões pertencem à ordem Hemiptera e são classificados como hemípteros (possuidores de bainha estiletar) (KIMMINS, TJALLINGII, 1985; SALAS, 2004). O aparato bucal dos afídeos é classificado como picador-sugador é altamente específico e eficiente para a transmissão de vírus, sendo limitante para estes insetos a dependência de alimentos a partir do floema vegetal (DIXON, 1998). O aparelho bucal é formado por dois pares de estiletos (labium e labrum), sendo um longo e um curto, com funções sensorial e direcional, respectivamente (SALAS, 2004). O labium tem dois canais, o canal alimentar, por onde os fluidos seccionados passam e o canal salivar por onde a saliva contaminada é injetada (COSTA, 1998; PONSEN, 1977).

Segundo Paray (2011), *M. sacchari* adquire as partículas do SCYLTV em menos de 24 horas após a ingestão de seiva contaminada, embora trabalhos mais precisos em laboratório indicaram ser necessário um tempo mínimo de 4,5 horas (Msiri, 2008). Ao alimentarem-se de uma planta infectada e em seguida partir para alimentarem-se em outra planta sadia, inoculam o vírus, e que tem grande importância econômica para a lavoura canavieira (GALLO et al., 2002). Um grande número de gramíneas são hospedeiras deste afídeo, principalmente aveia (*Avena sativa*), capim andropogon (*Andropogon gayanus*), arroz (*Oryza sativa*), trigo (*Triticum sativum*), sorgo (*Sorghum bicolor*) e o milho (*Zea mays*) (DENMARK, 1988).

Na cultura do sorgo, quando o controle da população de *M. sacchari* com inseticidas não é feita, as perdas no rendimento podem chegar a 78% (MATEHEE, 1974; VAN RENSBURG; VAN HAMBURG, 1975). No entanto visando minimizar perdas, estudo da resistência à *M. sacchari* em algumas linhagens de sorgo demonstraram que estas influenciaram na redução da taxa de fecundidade e aumento de mortalidade (HAGIO, 1992), auxiliando no controle.

Em muitos países a espécie tornou-se uma praga limitante, sendo o seu controle uma necessidade, utilizando cultivares resistentes e por meio de

controle biológico. Na Louisiana, EUA, por exemplo, o coccinelídeo predador *Diomus terminatus* é utilizado no controle de *M. sacchari* (AKBAR et al., 2010).

2.5 Cultura de micromeristemas

A técnica de cultura de tecidos tem sido um alicerce para a produção de material propagativo vegetal livre de vírus. Tal método tem sido utilizado em regiões canavieiras do Brasil, Louisiana, Flórida e Colômbia (COMSTOCK, 2004). Experimentos feitos por Comstock e Miller (2005), comprovaram que plantas obtidas por cultura de meristema inicialmente mostravam-se negativas quanto à presença do SCYLV. No entanto, após dois anos de exposição dessas cultivares à doença em campo, a incidência do vírus aumentou significativamente de 20 a 86%. Segundo Gonçalves et al. (2005) inúmeras plantas no campo comercial podem apresentar-se assintomáticas, no entanto, mostraram-se positivas quando avaliadas por testes de diagnóstico em laboratório.

Na região meristemática há uma alta atividade metabólica, e pouco tecido vascular, o que compromete o desenvolvimento e replicação de microrganismos que se multiplicam no floema. Além disso, no tecido meristemático é encontrada uma alta taxa de toxinas que inibem a replicação dos vírus (GONÇALVES et al., 2012). A produção de plantas limpas de vírus por cultura de meristemas exige a indexação das mudas (PARMESSUR et al., 2002). Os métodos que podem ser utilizados para indexação variam desde sorológicos a moleculares os quais serão escolhidos diante dos recursos disponíveis e do objetivo, o qual é definido pela sensibilidade do teste (GONÇALVES et al., 2012).

Outra técnica bastante utilizada para controlar a disseminação do patógeno é o tratamento térmico, porém, diversos autores citam a técnica como pouco eficiente para eliminar o vírus presente nos colmos contaminados (SCHENCK, 1990).

Frente a estes desafios, a partir do ano de 2000, inúmeras foram as pesquisas para o desenvolvimento de métodos que identificassem de forma

sensível e eficaz o SCYLV nos materiais de propagação vegetativa de cana-de-açúcar.

Segundo Korimbocus et al. (2002), as principais formas de detecção do SCYLV em plantas infectadas têm sido o uso de anti-soros específicos para o vírus, especialmente via as técnicas de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) e de TBIA (*Tissue Blot Immunoassay*). No entanto, estes testes não são tão precisos quanto à sensibilidade e a especificidade de detecção do patógeno viral quando comparados aos testes baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), altamente sensíveis e específicos. Recentemente, técnicas de PCR em tempo real (real time RT-PCR) com o uso de sondas específicas, como o AmpliDet RNA e a TaqMan, tem sido utilizadas para diagnosticar o SCYLV (GONÇALVES et al., 2002; KORIMBOCUS et al., 2002). A RT-PCR é mais trabalhosa em relação às técnicas serológicas, demandando maior tempo para realizar todo o processo, no entanto, apresenta maior sensibilidade ao diagnóstico de SCYLV, o qual mesmo em baixas concentrações na planta pode apresentar bandas no gel de agarose, para a presença do vírus no tecido foliar (ZHU et al., 2010). Além disso, as técnicas da biologia molecular apresentam como vantagem a versatilidade, podendo diagnosticar várias amostras simultaneamente. No entanto, estas técnicas apresentam como desvantagem o alto custo dos reagentes (Gonçalves, 2005).

2.6 Resistência de plantas a Insetos

O estudo de resistência de plantas a insetos é muito antigo e o clássico exemplo é o de cultivares americanas e européias de uvas testadas para resistência a *Phylloxera*. Somente no início dos anos de 1790, que uvas francesas resistentes a esse patógeno foram desenvolvidas, permitindo um avanço da indústria vinícola francesa (LINDLEY, 1831).

A ciência de resistência de plantas a insetos pode ser dividida em decorrência da II Guerra Mundial. Durante a Segunda Guerra novos pesticidas foram identificados e sintetizados com bons resultados quando aplicados nas

populações alvos, e as pesquisas envolvendo biologia de insetos e resistência de plantas a insetos definiram um pouco nesse momento de guerra. Na década de 1960, deu-se um impulso para tentar desenvolver um sistema de manejo integrado de pragas, que foi condicionado pelo surgimento da resistência dos insetos às formulações dos inseticidas e devido à conscientização da poluição ambiental decorrente do uso desses agrotóxicos (ORTOMAN; PETERS, 1980).

Painter (1951) fez o levantamento das interações planta-inseto e as descreveu como mecanismos de resistência. Sobre seu ponto de vista, descreveu três tipos de resistência a insetos: antibiose, antixenose e tolerância. A antixenose, descrita também como não-preferência, caracteriza-se quando uma planta, em igualdade de condições com outra, é menos utilizada ou não utilizada por um inseto para alimentação e, oviposição, por provocar efeitos adversos sobre o mesmo. Em situações de uma única fonte de hospedeiro, pode-se observar o efeito de antibiose, que é descrito por Lara (1991) como os efeitos negativos da planta sobre o ciclo de vida do inseto. Em termos de desenvolvimento das espécies de insetos, tanto a antibiose, quanto a antixenose são parâmetros importantes, pois influenciam na redução do *rm*-capacidade inata da população do inseto em aumentar em número (BENATTO, 2014). A planta tolerância depende apenas da capacidade das plantas de superarem o dano causado pela alimentação dos insetos (Gullan; Cranston, 2007).

As interações entre plantas e insetos podem desencadear várias intensidades de resistência: existem plantas que são ótimas hospedeiras para alguns insetos ou inadequadas, ou seja, avaliação do resultado visual da quantidade de insetos presentes nas superfícies das plantas e os efeitos envolvidos gerados podem gerar informações conclusivas sobre o grau de resistência das plantas (ORTOMAN; PETERS, 1980).

Segundo Fartek et al. (2012), o estudo da interação inseto-planta e o uso do mapeamento genético são duas maneiras de selecionar materiais que apresentam resistência durável e eficiente ao amarelecimento foliar da cana-de-açúcar, além de ser um pré-requisito para estudos que agreguem aspectos epidemiológicos, danos econômicos e manejo do SCYLV em áreas comerciais. A caracterização de fontes de resistência a insetos que se alimentam de seiva,

especialmente para de afídeos, baseia-se no estudo da expressão fenotípica da interação planta-inseto (FARTEK et al., 2012).

Nos programas de melhoramento de cana-de-açúcar a resistência ao SCYLV é avaliada pela classificação visual dos genótipos ao longo das diversas fases de melhoramento (GONÇALVES et al., 2012). Adicionalmente, nos programas de melhoramento é levantada a incidência do vírus nos clones promissores. Esse levantamento é feito mediante o uso de testes moleculares supracitados (GONÇALVES et al. 2002; KORIMBOCUS et al., 2002).

Considerando o tipo de transmissão dos membros da família *Luteoviridae*, caracterizada pela necessidade de um longo período de tempo de prova para que o inseto vetor adquira e posteriormente possa inocular o vírus em outras plantas, a incidência e a disseminação do SCYLV pode ser reduzida utilizando cultivares resistentes aos afídeos vetores (VAN EMDEN, 2007; KATIS et al., 2007; FARTEK et al., 2012), impactando na redução da porcentagem de transmissão.

2.7 Electrical Penetration Graphs (EPG)

O estudo de resistência de plantas a vírus é extremamente importante quando conhecidos os mecanismos de aquisição e de inoculação existentes entre esses patógenos e seus hospedeiros, bem como as interações moleculares e fisiológicas existentes entre eles (BONANI et al., 2010). De acordo com Salas (2010), a habilidade de transmitir o vírus está intimamente relacionada com a atividade estiletar e o hábito alimentar do inseto vetor.

A técnica Electrical Penetration Graphs (EPG) foi desenvolvida para caracterizar eletricamente o comportamento alimentar de insetos sugadores, por meio do registro da penetração dos estiletes nas folhas e das atividades de ingestão de seiva do tecido foliar (MCLEAN & KINSEY, 1964).

O primeiro modelo desta técnica para monitoramento eletrônico da alimentação dos insetos foi conhecido como sistema EMF (Electronic Monitoring System), posteriormente denominado de AC (Alternative Current) (WALKER, 2000). Nos dois sistemas, o comportamento do inseto é avaliado

nas plantas em um sistema fechado com corrente alternada (MCLEAN; KINSEY, 1964), semelhante a um circuito elétrico de tomada de luz, por exemplo.

Tjallingii (1988) propôs melhorias ao modelo de AC transformando-o para DC (Direct Current). Neste sistema, pode-se fazer uma avaliação simultânea de quatro ou oito insetos, através da conexão de fios de ouro (2 cm de comprimento x 0.2 mm de diâmetro) que tem uma das extremidades coladas ao abdômen dos insetos através de uma pintura de prata (16034 PELCO Colloidal Silver®, Ted Pella Inc. Redding CA, EUA), e a outra colada a um pino cromado conectado a um amplificador (GIGA). O nome GIGA refere-se a corrente de 1 Giga-Ohm ($10^9 \Omega$). Segundo Tjallingii e Mayoral (1992), existem poucas diferenças no comportamento dos insetos fixados pelo fio de ouro e os testados livres. O que pode induzir erros nesta técnica é o comprimento do fio de ouro, pois quanto maior pode exigir maior força, e assim maiores distorções nas ondas.

A técnica de EPG tem sido utilizada na seleção de cultivares de batata resistentes a *Myzus persicae*, vetor do vírus Y da batata, *Potato vírus Y* (PVY) e vírus do enrolamento da folha da batata, *Potato leafroll virus* (PLRV), auxiliando na compreensão dos mecanismos de transmissão (POWELL et al., 1995; PRADO; TJALLINGII, 1994). Segundo Tjallingii (2010), a penetração do estilete dos insetos picadores-sugadores é altamente eficiente na transmissão de vírus com relação do tipo não-persistente. Dez segundos são suficientes para que o afídeo consiga perfurar uma célula, o que gera uma leitura de queda de potencial (pd) (TJALLINGII 1985; TJALLINGII; ESCH, 1993). Para caracterizar uma transmissão semipersistente ou persistente, o estilete do inseto-vetor tem que atingir os vasos do floema. No entanto, até atingir o floema, dependendo da espécie vegetal ou mesmo da cultivar, pode-se observar muito trabalho mecânico feito pelos afídeos. A partir desta observação, Tjallingii (1978; 1988) descreveu os padrões de onda do comportamento alimentar dos afídeos.

Para afídeos vetores de vírus com transmissão do tipo não-persistente é característica a existência de três subfases de pd (I, II e III), sendo exemplificadas pelo *Cucumber mosaic virus* (CMV) e pelo PVY (MARTIN et al. 1997; FERERES e COLLAR, 2001). De forma geral, inúmeras picadas de

prova, caracterizadas por ondas de *pd*, são realizadas até que o estilete do inseto atinja os elementos do floema da planta e estabeleça as fases de aquisição de seiva infectada e de inoculação do vírus (TJALLINGII et al., 2010).

O tempo de leitura para as observações de padrão alimentar de insetos varia de acordo com a planta estudada, com o inseto (afídeo) e com o objetivo (HELDEN et al., 1993). Van Helden & Tjallingii (1993) testaram 16 horas de monitoramento por EPG ininterruptamente e chegaram à conclusão que 8 horas são suficientes, já que após a oitava hora de aquisição, não observaram dados diferentes das oito primeiras horas, sendo este o tempo máximo utilizado para trabalhos de resistência. De acordo com Tjallingii (1978; 1988; 1990), os padrões de amplitude, frequência, picos e vales de ondas elétricas, inicialmente estabelecidos em um ciclo de EPG (em condições adequadas de calibração), com os insetos em jejum de 1 hora, se espera que todos os pulgões apresentem os mesmos padrões de onda *np* (não-prova) evento quando os insetos estão em fase inicial de tateamento sobre a folha, conhecendo a epiderme do hospedeiro. Nos momentos iniciais, os insetos estarão reconhecendo o novo hospedeiro, deslocando-se sobre o tecido foliar. Durante a fase de reconhecimento da planta hospedeira, os afídeos inserem inúmeras vezes os estiletos no mesófilo foliar, na tentativa de encontrar elementos de vasos, gerando assim leituras de *pd*, ou quedas de potencial. Após sucessivas tentativas e caminhamento intercelular (C), os afídeos conseguem atingir o floema e há o estabelecimento de potencial abaixo de zero (fase E1), na qual ocorre a injeção de saliva aquosa dentro do floema. Esta fase nem sempre é sucedida pela fase E2 (ingestão passiva da seiva do floema). O que pode diferenciar uma cultivar de outra, é o tempo que o inseto consegue atingir os vasos condutores da planta e a duração dessas fases. Devido a algumas dificuldades mecânicas, se observa o padrão de onda G, evento quando o inseto faz ingestão de seiva do xilema, hidratando-se. A fase E é observada quando existe alguma barreira mecânica que dificulta a penetração dos estiletos.

Após a captura dos sinais do comportamento dos afídeos nos tratamentos propostos, deve-se interpretar as ondas para poder identificá-las conforme as descrições acima. No entanto, esse processo de interpretação das ondas, a cada intervalo de tempo, ainda não é automatizado, e deve ser feito

visualmente, por meio de uma pessoa treinada. Estes padrões de onda são interpretado com os programas Stylet+a e Stylet+d (MacStylet, v.2.0, FEBVAY et al.1996), é possível estabelecer a resistência da planta ao inseto na epiderme, no mesófilo ou no floema foliar (CHEN et al., 1996).

As ondas quando interpretadas são classificadas em parâmetros sequenciais e não-sequenciais. Os parâmetros sequenciais são aqueles que compreendem em valores de tempo fixo a duração da primeira picada de prova, número de picadas de prova, número de fases E. Já os não-sequenciais compreendem em dados que oferecem uma ideia geral dos tratamentos, como duração total dos eventos (tempos variáveis).

Serikawa et al. (2011) utilizaram a técnica EPG para monitorar o comportamento da cigarrinha dos citros, transmissora do —Greening dos citros” hoje oficialmente denominada de Huanglongbling (HLB), frente aos tratamentos com inseticida.

A técnica de EPG também tem sido utilizada para avaliar a transmissão de fitovírus (FERERES et al., 1993; POWELL et al., 1995; MARTÍN et al., 1997; FERERES; COLLAR, 2001; SALAS et al., 2010), em estudos de metabólitos secundários (RAMAN et al., 1979) e na avaliação do efeito de moléculas inseticidas em insetos e plantas (GOUSSAIN, 2014).

2.8 Tricomas, metabólitos primários e secundários

Desde os anos 1970, o pesquisador Levin (1973) defendia que assim como nos tempos medievais, em que as cidades eram protegidas com muros para evitar a invasão, as plantas também possuem mecanismos de defesa próprios. Naquela época eram conhecidos os pêlos não-glandulares, e que a sua densidade e tamanho eram correlacionados positivamente com o controle de insetos.

De acordo com Stipanovic (1983), as plantas desenvolveram vários tipos de mecanismos contra o ataque de insetos. Dentre estes mecanismos de defesa, características estruturais tais como os tricomas glandulares e pêlos são os mais conhecidos.

Os tricomas são pêlos glandulares e protetores, extensões da epiderme, e que variam de micrometros a poucos centímetros (WAGNER et. al., 2004). Não necessariamente os tricomas estão presentes apenas nas folhas, mas também nas hastes, sementes, pecíolos e pétalas de flores. A sua classificação pode ser quanto ao número de células, unicelulares a multicelulares, ou em glandular ou não-glandulares (WERKER, 2000). Quando glandulares podem ser preenchidos com secreções como terpenos ou outros alcaloides (metabólitos secundários), as quais são de importância para defesa da planta (LUCAS et al., 2000) e podem ter importância comercial (AHARONI et al., 2006). O gossypol, por exemplo, é um composto metabólito de defesa produzido pelas plantas e estocado em glândulas secretoras do algodoeiro com propriedades antifúngicas comprovadas (MELLON et al., 2012). Quando essas estruturas encontradas na epiderme vegetal são enrijecidas devido a quantidade de paredes secundárias que possuem, provenientes do acúmulo de sílica e carbonato de cálcio, podendo adquirir formas pontiagudas de ganchos, com ações específicas de barreiras físicas, são descritos como pêlos.

Os tricomas emitem substâncias que aprisionam os insetos, impedindo a sua locomoção, ou que podem ser tóxicas, mas geralmente não os matam rapidamente, gerando um efeito mais prolongado, como por exemplo afetando o crescimento (GIBSON, 1971; LA POINTE; TINGEY, 1984). Os pêlos normalmente representam uma barreira física aos insetos.

Na epiderme também são encontradas outras estruturas de defesa como glândulas nectárias, presentes em estruturas florais; glândulas com óleos e resinas; outras glândulas com terpenóides.

As principais classes de metabólitos secundários produzidos por tricomas são: terpenóides, polifenóides, flavonóides e ácido jasmônico (GLAS et al., 2012).

Sabe-se que, durante a herbivoria muitos compostos secundários são produzidos. No passado, os produtos gerados pela rota secundária eram interpretados como sendo um “*end*” da rota primária. Os compostos secundários, diferentemente dos primários, os quais tem função direta no crescimento e desenvolvimento dos vegetais, tem como o nome prediz, funções secundárias. Estes, normalmente não apresentam papéis conhecidos na rota da fotossíntese, transporte de solutos, síntese de proteínas ou na

diferenciação celular de tecidos. São produtos de aminoácidos, específicos a alguns grupos do reino vegetal apenas (TAIZ; ZEIGER, 2013). Vários trabalhos foram realizados demonstrando que essa rota paralela tem grande importância na defesa das plantas frente ao ataque de patógenos (BENNET; WALLSGROVE, 1994). Dentre as funções ecológicas conhecidas destes metabólitos secundários podemos citar: proteção dos vegetais contra ataque de patógenos; atuar como atrativos (odor, cor ou sabor); atuar como agentes de competição e nas simbioses plantas-microrganismos. Os metabólitos secundários são divididos em três grupos principais, de acordo com a função química, em terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Os terpenos, ou terpenóides, possuem a maior rota metabólica. São sintetizados a partir da acetil CoA e do 3-fosfoglicerato. Muitas espécies de plantas apresentam terpenos voláteis, monoterpenos e sesquiterpenos, como por exemplo, os encontrados em folhas de limão e sálvia, que dão o odor característico. Estes terpenos são óleos voláteis encontrados em tricomas glandulares que se projetam na epiderme como uma advertência da toxicidade do vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Os compostos fenólicos são produzidos a partir dos ácidos chiquímico e malônico. Muitos compostos fenólicos são conhecidos pelos seus efeitos alelopáticos, quando interferem no desenvolvimento de plantas vizinhas pela liberação de compostos químicos no solo, aumentando sua aptidão evolutiva em decorrência de outra (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A lignina também é uma substância fenólica, encontrada nas paredes celulares de vários tipos de tecidos de sustentação e condução, especialmente traqueídes e elementos de vasos. É depositada no espessamento da parede secundária e na lamela média, em contato com a hemicelulose e celulose. Assim, apresenta como funções sustentação mecânica e proteção contra a herbivoria de insetos pragas, e podem também apresentar função de defesa na transmissão de fitovírus (YAMADA, 2004).

Dentre os compostos nitrogenados, destacam-se os alcaloides e glicosídeos cianogênicos, sintetizados a partir dos aminoácidos lisina, triptofano e tirosina. Os alcaloides são conhecidos pelas suas funções tóxicas aos animais, e por assim, são extraídos de vegetais e utilizados como substâncias

de defesas naturais. Dentre estes destacam-se os glusinalatos, conhecidos pelo óleo da mostarda e que atuam como repelente a herbívoros (BENNET; WALLSGROVE, 1994).

As plantas desenvolveram várias estratégias de defesa ao ataque de pragas e patógenos, divididas em defesas induzidas e constitutivas, as quais têm ação direta ou indireta sobre os insetos (KARBAN; BALDWIN, 1997). As defesas constitutivas estão relacionadas com os compostos secundários, produzidos e armazenados para reduzir a injúria da planta frente ao ataque do herbívoro. Esses compostos relacionados à defesa vegetal podem ser encontrados em uma ou mais partes da planta e, normalmente, suas concentrações e/ou quantidades variam com a idade da mesma (COLEY; BARONE, 1996; GOULD, 1998).

As induzidas, por sua vez, são decorrentes do ataque do patógeno, ou praga, que requer respostas rápidas, compreendendo qualquer mudança morfológica ou fisiológica resultante da ação de herbívoros sobre as plantas, resultando na não preferência de insetos por estas plantas, em um subsequente ataque, melhorando assim o desempenho da planta (COLEY; BARONE, 1996; KARBAN; BALDWIN, 1997; AGRAWAL, 1998). Entre as alterações fisiológicas, algumas podem estar relacionadas com a diminuição da qualidade nutritiva que as plantas apresentam para os herbívoros (NEUVONEN; HAUKIOJA 1984; TUOMI et al., 1984).

A saliva dos insetos contém substâncias chamadas de eliciadores, como os ácidos graxos conjugados e aminoácidos, que desencadeiam respostas nas plantas quando são regurgitados pelos insetos. A principal resposta das plantas, no que diz respeito à resistência induzida, é a produção de ácido jasmônico. O ácido jasmônico induz a produção de proteínas como alfa-amilase e lectinas, que interferem na absorção de alimento pelos insetos, pois se ligam ao trato digestivo dos mesmos (PEUMANS; DAMM, 1995).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivares utilizadas

As cultivares IACSP93 3046, IACSP95 5000, IACSP95 5094, IACSP96 3076 provenientes do Programa de Melhoramento de Cana-de-açúcar do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e a cultivar SP71 6163, reconhecidamente suscetível ao SCYLV e pertencente ao Programa de Melhoramento de Cana do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) foram utilizadas nos ensaios para a avaliação dos mecanismos de resistência (antibiose e antixenose) ao afídeo vetor *M. sacchari*, bem como para a avaliação do comportamento alimentar pela técnica de EPG.

As cultivares IACSP95 5000, IACSP96 3076, SP71 6163 foram utilizadas para o ensaio de avaliação da resistência ao SCYLV em casa de vegetação e no campo, visto que somente nestas variedades foi possível obter um número suficiente de plantas livres do vírus do amarelinho para a montagem do ensaio de resistência.

3.2 Criação dos pulgões

Os pulgões coletados na cultura de cana-de-açúcar, na Fazenda Experimental do Centro de Cana (IAC) sediado em Ribeirão Preto- SP foram enviados para identificação e confirmação da espécie para o Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Uberlândia-MG.

Após confirmação da espécie como sendo *M. sacchari*, vetora do SCYLV, colônias de pulgões foram formadas em folhas destacadas de plantas da cultivar SP71 6163 com sintomas de infecção por SCYLV. As folhas foram mantidas em copos plásticos, umedecidas na base por uma lâmina de água suficiente para mantê-las túrgidas. Estes copos plásticos foram colocados em

gaiolas plásticas, cobertas com tela antiafídica. As folhas foram trocadas semanalmente, para a manutenção das colônias de pulgões.

Visando a obtenção de uma maior quantidade de insetos para os ensaios de antibiose, antixenose, EPG, como também para o ensaio de avaliação da resistência ao vírus, ninfas e adultos de *M. sacchari* também foram transferidos para plantas de SP71 6163 infectadas, cultivadas em vasos e para folhas individualizadas em tubos de ensaio contendo solução de ágar a 1% (Figura 1). Os tubos de ensaio foram mantidos em câmara climatizada de B.O.D a 25 ± 2 °C com fotofase 12:12 h, conforme proposto por (Abu Ahmad, 2007).



Figura 1. Criação de *M. sacchari* em folhas de cana, da cultivar SP71 6163 em câmara climatizada.

3.3 Obtenção de plantas por cultura de meristemas

Os ensaios de antibiose, antixenose e EPG, assim como o da avaliação da resistência ao SCYLV foram conduzidos com plantas obtidas por cultura de micromeristemas, na Biofábrica do Centro de Cana - IAC.

Gemas de cada uma das cultivares foram submetidas a tratamento térmico a 52⁰ C, desinfetadas superficialmente em solução de hipoclorito de sódio (4 %) em fluxo laminar para a retirada dos micromeristemas, feita com o auxílio de um microscópio estereoscópico. O micromeristema foi colocado em meio de introdução e posteriormente de multiplicação (Murashige e Skoog, 1962) para obtenção das plântulas, as quais, aproximadamente, 3 meses após

a introdução foram colocadas em meio de enraizamento (Murashige e Skoog, 1962). Com as raízes bem formadas, as plântulas foram transplantadas para copos plásticos de 200 mL com substrato Bioplant plus (BIOPLANT ®) e transferidos para casa-de-vegetação sob dois turnos de rega (as 9:00 e as 15:30 hrs), recebendo adubação foliar (MAP e nitrato de cálcio) quinzenalmente. As plantas foram podadas com a finalidade de uniformizar o desenvolvimento entre cultivares.

As plântulas *in vitro* com resultado negativo para a presença do SCYLV via RT-PCR, foram separadas e utilizadas para o ensaio de avaliação da resistência ao amarelinho, mediante a inoculação do vírus com pulgões (item 3.10). Após três meses de aclimatação, estas foram transplantadas para vasos com volume de 700 mL e mantidas em casa-de-vegetação por seis meses, para observação inicial de eventuais sintomas de infecção pelo vírus, antes de serem levadas ao campo.

3.4 Avaliação da resistência ao afídeo *M. sacchari*

Os ensaios de antibiose, antixenose e de avaliação do comportamento alimentar (EPG) do afídeo vetor *M. sacchari* foram conduzidos no laboratório de Estudo Vetores (LEV) do Instituto Biológico, São Paulo. Em virtude da falta de protocolos de avaliação dos mecanismos de antibiose e antixenose, específicos para a cana-de-açúcar, o protocolo utilizado para a montagem do ensaio para antibiose foi adaptado segundo metodologia para avaliação de desenvolvimento de *M. sacchari* em genótipos franceses de cana-de-açúcar (Fartek et al., 2012). O ensaio de antixenose foi realizado com adaptações de protocolos desenvolvidos por Salas et al. (2010) com a cultura da batata. Foram avaliadas cinco cultivares de cana-de-açúcar: IACSP93 3046, IACSP95 5000, IACSP95 5094, IACSP96 3076 e SP71 6163.

3.5 Ensaio de Antibiose

Três plantas de cada cultivar foram utilizadas para a montagem do ensaio. Em cada repetição, constituída por uma planta protegida por uma câmpanula de vidro, coberta com tecido voil, foram colocados, com auxílio de um pincel, 10 adultos ápteros de *M. sacchari*. O ensaio foi conduzido em câmara climatizada ($25 \pm 1^{\circ} \text{C}$) e fotofase de 12 horas (Figura 2). O número de adultos e de ninfas presentes nas plantas foram contabilizados após 8 dias de infestação, considerando este o tempo médio para a formação de uma nova colônia de insetos.



Figura 2. Ensaio de antibiose feito em câmpanulas de vidro.

3.6 Ensaio de Antixenose ou Preferência

Oito arenas circulares foram construídas em uma placa de isopor, sendo cada arena constituída de folíolos de cada uma das cinco cultivares avaliadas. Os ramos foram inseridos em microtubos de 1,5mL cheios com água e inseridos na placa de isopor (Figura 3). Cada cultivar foi distribuído

equidistantemente do centro de cada arena, onde foram liberados 10 adultos ápteros de *M. sacchari*, previamente submetidos à 1h de jejum. Para evitar a fuga dos insetos para outras arenas, estas foram separadas por gaiolas de metacrilato. A contagem do número de insetos sobre os ramos das plantas foi feita após 15, 30 minutos e 1, 2, 4 e 6 horas da liberação dos insetos no centro da placa, em cada repetição. Foram feitas dezesseis repetições, sendo cada arena uma repetição.



Figura 3. Ensaio de antixenose para *M.sacchari* feito em arenas circulares para as cinco cultivares de cana-de-açúcar.

3.7 Obtenção dos registros de EPG

A avaliação do comportamento alimentar de *M. sacchari* por EPG foi feita pelo monitoramento de 10 adultos ápteros em plantas alternadas das variedades IACSP93 3046, IACSP95 5000, IACSP95 5094, IACSP96 3076 e SP71 6163. Os insetos foram coletados das colônias de criação, 1 h antes do início dos registros, e deixados em jejum para procurar padronizar as leituras. Os afídeos foram conectados ao monitor do Giga, através de um eletrodo de cobre (3 cm de comprimento x 1 mm de diâmetro) unido a um fio de ouro (1,5 a 3 cm de comprimento X 20 μ m de diâmetro), colado no abdome do pulgão com cola de prata (16034 Pelco Collodial Silver, Ted Pella Inc. Redding CA, EUA). Os insetos foram posicionados para se alimentarem na face abaxial da folha, a qual é a mais preferida por *M. saccharii* (Zehntner, 1893). Para fechar o circuito elétrico, um segundo eletrodo de cobre (fio-terra) com 10 cm de comprimento e 0,2 cm de diâmetro foi colocado no substrato de cada planta envasada. Todo o sistema de EPG compreendendo um Monitor DC (4 saídas), com ajuste de

100x de força amplitude foi mantido no interior de uma Gaiola de *Faraday* (Figura 4). Antes de iniciar os registros, foram feitas calibrações do amplificador nos canais, e diminuindo os ruídos. Registros de ondas de 6 horas de duração foram obtidos para cada inseto, sendo armazenados em um Desktop através do programa *Stylet+d* (*MacStylet*, v.2.0, Febvay et al., 1996) (Figura 5). Os registros foram analisados utilizando o programa *EPG analysed- Stylet+a*, o qual permitiu a visualização, em diferentes escalas, das ondas e das suas marcações. Foram observadas sete frequências distintas: a) np (não-prova); b) onda C (Início de atividade estiletar no mesófilo); c) pd (picadas de provas); d) E1 (salivação no floema); e) E2 (ingestão no floema); f) G (ingestão de água no xilema); g) F (atividade floemática).

Além desses parâmetros foram levantados o tempo total de cada evento (np; C; pd; fase floemática $E=E1+E2$; E1;E2; tempo da primeira picada de prova até a ingestão floemática contínua, entre outros) de cada indivíduo nas diferentes cultivares.

Os dados foram dispostos em planilhas pelo programa *Workbook* para parâmetros automáticos de EPG (Ferreres et al., 2009).



Figura 4. Equipamento EPG com quatro canais para conexão de insetos e plantas, e amplificador ao lado direito.

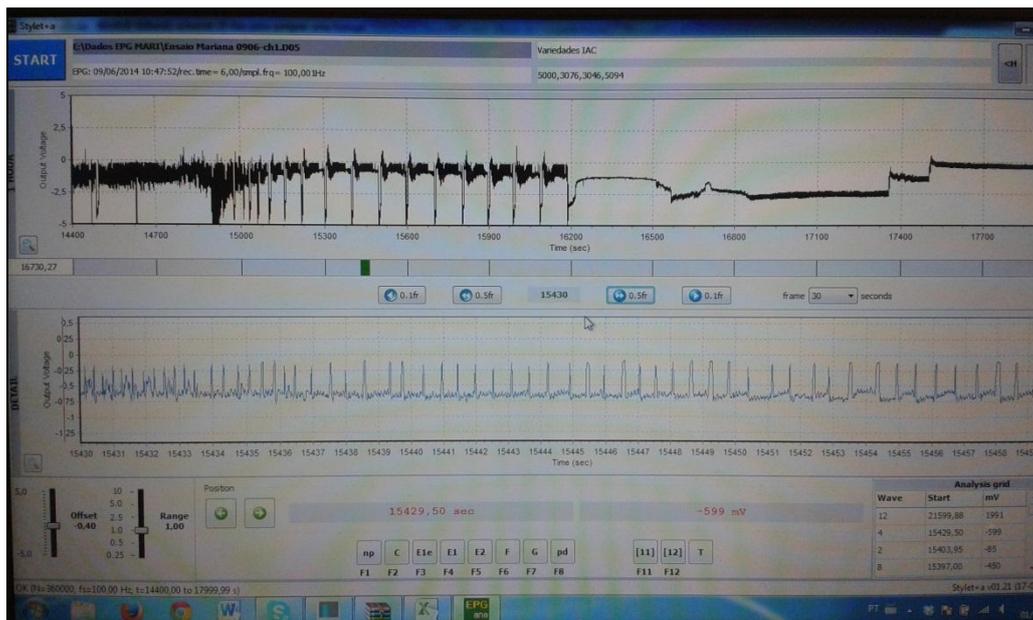


Figura 5. Software Stylet+d arquivando as ondas E1 de EPG

3.8 Análise Estatística para Ensaio Resistência ao Inseto

No ensaio de preferência de *M. sacchari* trabalhou-se com as cinco cultivares, adotando-se o delineamento de blocos casualizados com oito repetições. Na avaliação de desenvolvimento dos insetos, o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com três repetições por cultivar. Os dados de antibiose, antixenose e EPG foram transformados em $\log x+5$ e submetidos à análise de variância no programa SAS PROC GLM com médias comparadas pelo teste de FISHER (LSD), a 5% de probabilidade. Os dados de EPG foram processados no programa WORKBOOK for EPG (Ferreles et al., 2009), analisados pelo software SAS software (release 8.2; SAS Institute Inc., Cary, NC) e as médias comparadas pelo teste FISHER a 5%.

3.9 Contagem de Tricomas

A epiderme nas faces adaxial e abaxial das folhas das cultivares de cana-de-açúcar IACSP93 3046, IACSP95 5000, IACSP95 5094, IACSP96 3076 e SP71 6163 foram avaliadas através de cortes paradérmicos e de impressões da epiderme em lâmina com uma gota de adesivo Super Bonder, adaptando a metodologia de Segatto et al. (2004). Utilizada para o estudo da anatomia foliar de batata, por ser rápida e de baixo custo. Folhas foram coletadas ao acaso de cada touceira, e no total, foram montadas dez lâminas por cultivar. Para cada lâmina, fez-se a contagem dos tricomas glandulares nas faces abaxial e adaxial, além de tomar as medidas de largura e comprimento de dois tricomas por lâmina e por face. Estas medições foram feitas em microscópio óptico com objetiva de 400x, e ocular micrométrica de 1 cm² campo (Figura 6). Os dados referentes às lâminas foliares foram analisados com o software SAS (release 8.2; SAS Institute Inc., Cary, NC) e as médias comparadas pelo teste de Fisher a 5%.

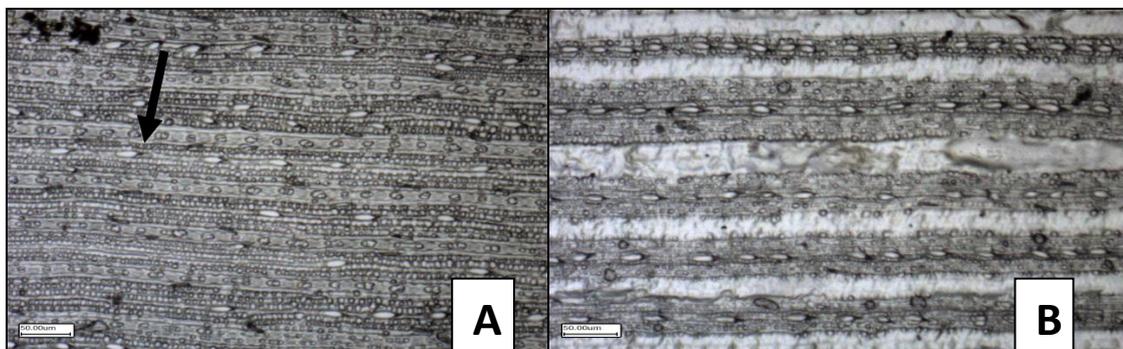


Figura 6. Tricomas glandulares nas cultivares estudadas. (A) Face abaxial cv. IACSP93 3046; (B) Face adaxial cv. IACSP96 3046.

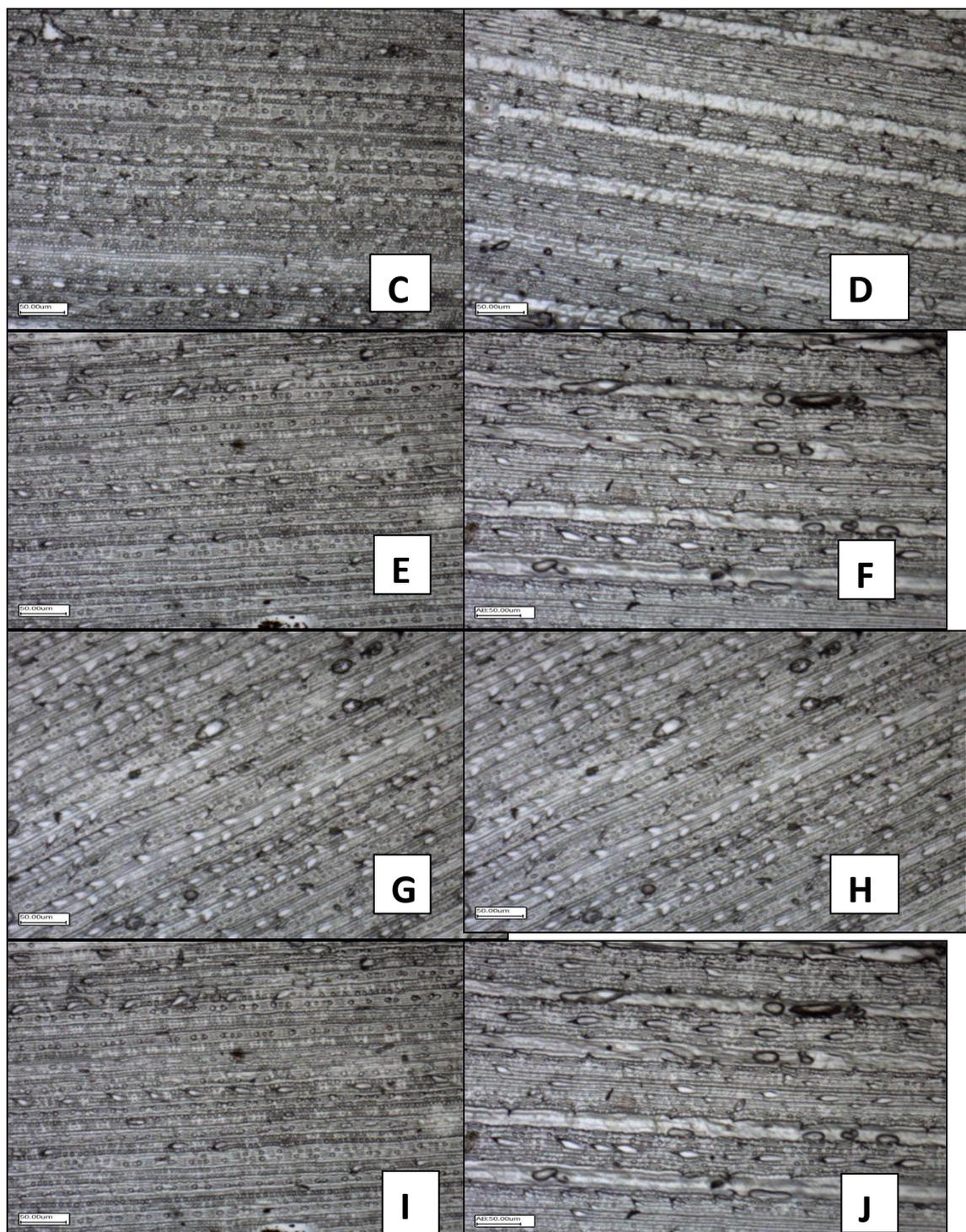


Figura 6. Tricomas glandulares nas cultivares estudadas. (C) Face abaxial cv. IACSP95 5000; (D) Face adaxial cv IACSP95 5000; (E) Face abaxial IACSP95 5094; (F) Face adaxial IACSP95 5094; (G) Face abaxial IACSP96 3076; (H) Face adaxial IACSP96 3076; (I) Face abaxial SP71 6163; (J) Face adaxial SP71 6163.

3.10 Inoculações e avaliação da resistência das cultivares ao SCYLV

Plântulas oriundas da cultura *in vitro*, testadas e negativas para a presença do SCYLV via o diagnóstico por RT-PCR foram utilizadas no ensaio de avaliação da resistência ao amarelinho pelo acompanhamento da expressão de sintomas, inicialmente em casa-de-vegetação e posteriormente no campo. Após três meses de aclimação das plântulas em casa de vegetação, as plantas foram inoculadas com o SCYLV através de afídeos -vetores (*M. sacchari*), mantidos, por no mínimo quarenta e oito horas em plantas da variedade SP71 6163 sintomáticas e comprovadamente infectadas com o vírus por diagnóstico via RT-PCR. Foram inoculadas vinte e quatro plantas por cultivar, utilizando sete insetos com no mínimo três dias de vida (Figura 7). O período acesso de inoculação foi de 48 horas, após o qual os pulgões foram eliminados via pulverização com inseticida FASTAC 100SC (1 mL / L).

Vinte dias após as inoculações do SCYLV via *M. sacchari*, foi realizado o diagnóstico molecular das plantas via RT-PCR segundo metodologia descrita por Gonçalves et al. (2002). Para garantir uma inoculação bem sucedida, repetiu-se o processo de inoculação com o vetor, 50 dias após a primeira inoculação, seguindo-se o mesmo protocolo descrito.

Um mês após a inoculação, as plantas foram transplantadas para vasos com volume de 700 mL e mantidas em casa-de-vegetação por seis meses, para observação inicial de eventuais sintomas característicos da infecção pelo SCYLV, antes de serem levadas ao campo.



Figura 7. Plantas com os insetos em período de inoculação

3.11 Extração de RNA total das plantas e diagnóstico por RT-PCR

O RNA total foi extraído a partir de 100 mg de tecido foliar com o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, USA) tanto para a indexação das plântulas provenientes de biofábrica, quanto para a confirmação da presença do vírus após a inoculação pelo afídeo. O RNA foi extraído do terço médio de uma folha de cada planta inoculada, utilizando o equipamento Tissue Lizer II (Qiagen ©). Por este mesmo procedimento, oito afídeos inteiros foram macerados para confirmação da aquisição do SCYLV nos vetores.

Para a confirmação da ausência e presença do SCVLV nas cultivares limpas por cultura de micromeristemas e inoculadas, respectivamente, foi utilizado o protocolo descrito por Gonçalves et al. (2002). O primer antisense P2r (GAA.GGG.GGC.CGG.GAA.GAC.T) desenhado com base na região codificante da proteína capsidial do SCYLV foi utilizado para sintetizar o cDNA viral a partir do RNA total extraído de tecido foliar. A transcrição reversa foi conduzida com 1 µl do primer antisense e 3 µl de um pré-mix contendo (4 µl de tampão 5X, 1 µl de RNA, 2 µl de 0.1M DTT, 2 µl 10mM dNTP mix e 200 U da enzima SuperScript II Reverse Transcriptase® (Invitrogen™). O mix para reação de PCR foi composto de 0,5 µl do primer sendo a 10µM, 0,5 µl do primer reverso a 10 µM, 2 µl do Tampão 10X da Taq polimerase, 1,2 µl de MgCl₂ a 25mM, 0,2µl de dNTPs a 10mM, 0.5 U da enzima Taq PCRx DNA Polymerase ® (Invitrogen™), 4 µl das amostras de cDNA e 12 µl de água mili-Q autoclavada.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2%, preparado em tampão TAE, pH 8,0, corado com brometo de etídeo e observado sob luz UV. Aplicou-se 15 µl de amostras e 8 µl de ladder (100 pb) por poço no gel de agarose .

3.12 Ensaio de campo para avaliação da resistência ao SCYLV

O ensaio de avaliação da resistência ao SCYLV, por meio da avaliação periódica dos sintomas, foi estabelecido no delineamento experimental de blocos ao acaso, em esquema de parcelas subdivididas (4x2) com seis repetições. Os tratamentos foram constituídos em cada repetição em linhas de cada cultivar, sendo que cada repetição foi formada de quatro plantas inoculadas e duas não inoculadas por parcela e bloco, não havendo mistura de genótipos de plantas trabalhadas nas parcelas.

Após permanecerem por sete meses em casa-de-vegetação as plantas foram transplantadas no campo, com a finalidade de avaliar os sintomas da infecção pelo amarelinho, esperando ser observado o amarelecimento progressivo da nervura central das folhas na face abaxial, seguido pelo amarelecimento do limbo foliar (GONÇALVES et al., 2012). Nas variedades mais suscetíveis, as plantas afetadas apresentam amarelecimento da nervura central das folhas na face abaxial, e em seguida no limbo foliar. As folhas mais velhas, a sexta ou a sétima a partir do ápice, eventualmente apresentam uma coloração vermelha na face adaxial da nervura central e, posteriormente, amarelecimento ou perda de pigmentação distribui-se pelo limbo foliar, progredindo do ápice para a base, seguido pela necrose do tecido. As plantas foram inspecionadas quinzenalmente, contando um mês após o transplante. O nível de amarelecimento visível nas folhas de cada planta foi avaliado e registrado segundo a escala adaptada de Lehrer e Komor (2008). A classificação dos sintomas indicou a severidade da doença no tempo avaliado. Com base nesta escala foram estabelecidas notas de 0 a 4, de acordo com os seguintes parâmetros: (0) plantas sem sintomas de amarelecimento; (1) manchas amareladas fracas na nervura central; (2) amarelecimento suave e generalizado da nervura central, no entanto o limbo foliar permanece verde; (3) amarelecimento mais intenso da nervura central, estendendo-se gradualmente para o limbo foliar; (4) amarelecimento da nervura central intenso e estendido para a lâmina foliar, com início de seca e necrose das folhas (Figura 8). Duas análises estatísticas foram feitas com os dados obtidos. A primeira organizou-se com a média das notas registradas por cultivar para cada período de

avaliação. A segunda avaliação foi gerada com o somatório de todas as médias de cada cultivar e observado a distinção de sintomas entre os genótipos trabalhados. Esses dados foram processados com o programa SAS software (release 8.2; SAS Institute Inc., Cary, NC) e as médias comparadas pelo teste de Fisher a 5%.

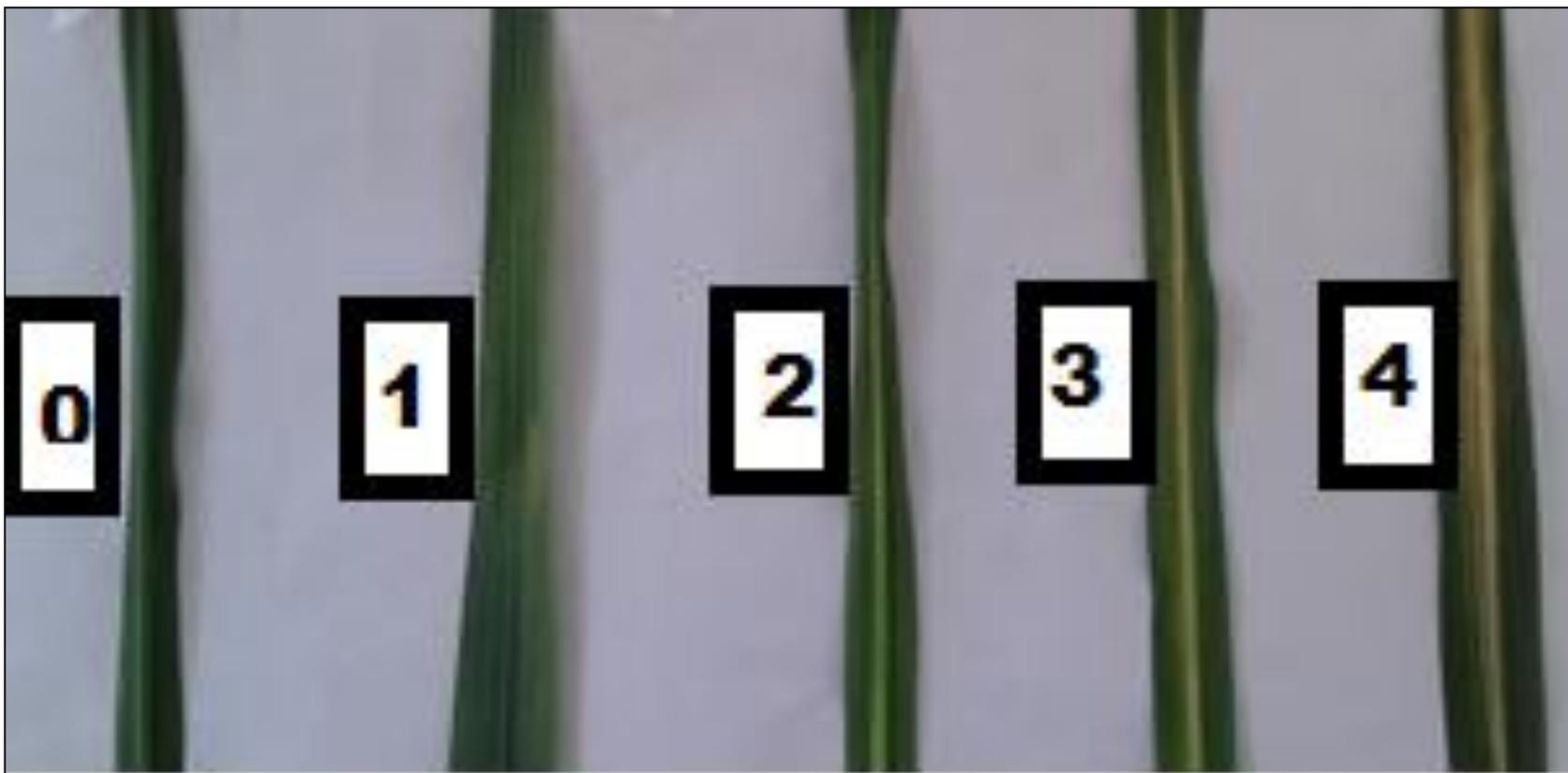


Figura 8. Escala de notas de infecção pelo SCYLV, adaptada de Lehrer e Komor (2008) para avaliar as cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com o vírus.

4 RESULTADOS

4.1 Antibiose

A cultivar IACSP95 5000 mostrou-se como sendo a mais suscetível dentre todas as cultivares trabalhadas, apresentando as melhores condições para o desenvolvimento da população de *Melanaphis sacchari* com a maior quantidade de ninfas e adultos e diferindo significativamente das demais. A cultivar IACSP96 3076 apresentou a menor quantidade de ninfas após oito dias de infestação quando comparada as cultivares IACSP95 5000 e IACSP93 3046. Entretanto, esta cultivar não diferiu significativamente quanto ao número de ninfas das cultivares SP71 6163 e IACSP95 5094. A cultivar SP71 6163, conhecida pela suscetibilidade ao vírus do amarelecimento foliar mostrou-se como um hospedeiro intermediário ao desenvolvimento de *M. sacchari*, não apresentando diferença significativa quanto ao número de ninfas desenvolvidas em suas plantas, após oito dias, entre as cultivares IACSP93 3046 e IACSP95 5094. No entanto, quando analisados o número de adultos, não foi constatada diferença significativa entre as cultivares SP71 6163, IACSP93 3046, IACSP95 5094 e IACSP96 3076, apresentando todas estas cultivares, valores menores de insetos adultos após oito dias de desenvolvimento da prole, quando comparada a IACSP955000 (Figura 9).

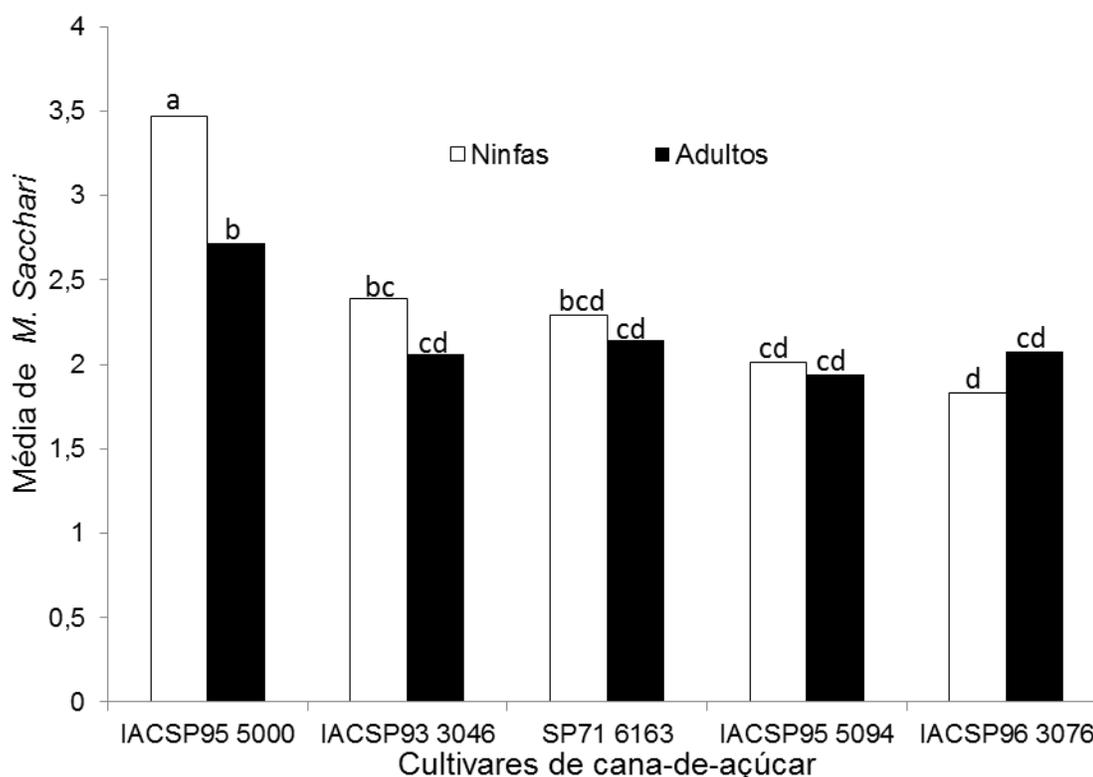


Figura 9. Desenvolvimento de *Melanaphis sacchari* em cultivares de cana-de-açúcar após 8 dias. Média seguida de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Fisher LSD ($P < 0,05$).

4.2 Antixenose

Considerando um mesmo tempo de avaliação foi observado que, no intervalo de 15 a 60 minutos, a cultivar IACSP96 3076, notadamente, foi a mais preferida pelos pulgões diferindo significativamente ($P < 0,05$) em relação ao número de pulgões vivos, em relação as demais cultivares (Tabela 1, Figura 10). Entretanto, aos 120 minutos, as cultivares IACSP93 3046 e IACSP95 5000 não diferiram significativamente da IACSP96 3076, sugerindo igualdade de preferência pelo inseto. Neste mesmo tempo (120 minutos), apenas a cultivar IACSP95 5094 apresentou um número significativamente menor de insetos em relação ao observado na cultivar IACSP96 3076 sendo, portanto,

menos preferida. Aos 240 minutos, os afídeos ainda mantiveram a preferência pela cultivar IACSP96 3076 em comparação com as cultivares IACSP95 5000, SP71 6163 e IACSP95 5094. Aos 360 minutos, apenas a cultivar IACSP95 5094 manteve a diferença quanto a menor preferência em relação a cultivar IACSP96 3076, sendo que as demais cultivares praticamente apresentaram o mesmo nível de antixenose.

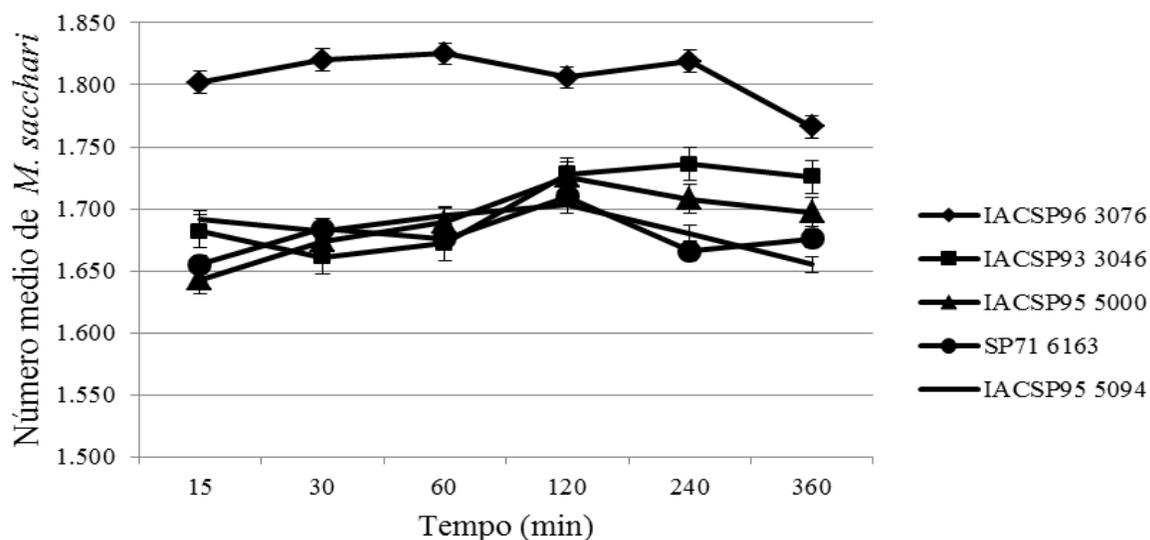


Figura 10. Distribuição temporal de *M. sacchari* em ramos foliares de cultivares de cana-de-açúcar, em teste de livre escolha.

Tabela 1: Distribuição média e temporal do número de insetos vivos de *Melanaphis sacchari* nas cinco cultivares de cana-de-açúcar.

| Cultivar | 15 minutos | 30 min | 60min | 120min | 240min | 360min |
|--------------------|----------------|---------------|---------------|------------------|------------------|------------------|
| IACSP963076 | 1,802±0,205ABC | 1,820±0,216A | 1,825±0,187A | 1,806±0,185AB | 1,819±0,166A | 1,766±0,174ABCD |
| IACSP933046 | 1,682±0,144DE | 1,661±0,127E | 1,672±0,130DE | 1,728±0,143ABCDE | 1,736±0,159ABCDE | 1,726±0,208ABCDE |
| IACSP955000 | 1,643±0,073E | 1,674±0,122DE | 1,689±0,093DE | 1,726±0,155ABCDE | 1,708±0,125BCDE | 1,697±0,125DE |
| SP71 6163 | 1,655±0,081E | 1,684±0,132DE | 1,676±0,108DE | 1,710±0,110BCDE | 1,666±0,087DE | 1,676±0,108DE |
| IACSP955094 | 1,692±0,157DE | 1,682±0,144DE | 1,695±0,133DE | 1,703±0,157CDE | 1,680±0,156DE | 1,655±0,081E |

Comparação das médias de *M. sacchari* pelo teste Fisher 5% entre cultivares no teste de antixenose. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

4.3 EPG

Com base nos registros da atividade alimentar de *M. sacchari*, diferenças significativas foram observadas entre as cultivares, principalmente, quanto às médias dos eventos (Tabela 2). Entretanto, entre as cultivares analisadas, não foi observada diferença significativa quanto ao np eventos, tanto para a média para a duração total dos eventos, o que demonstrou que o tempo médio e os eventos realizados são comuns não diferindo entre as cultivares, comprovando o bom manuseio dos insetos sem estresse (Tabela 2).

Nota-se que há maior atividade realizada pelos afídeos na epiderme das cultivares IACSP95 5094 e SP71 6163 diferindo significativamente do observado para cultivar IACSP95 5000, a qual mostrou menor resistência em nível de onda —C comparado aos das cultivares anteriormente mencionadas. As cultivares IACSP93 3046 e IACSP96 3076 não apresentaram diferenças significativas das demais quanto aos valores de onda C.

A média dos eventos das atividades floemáticas (E1 e E2) mostraram que a cultivar SP71 6163 permitiu uma maior facilidade ao afídeo vetor *M. sacchari* para alimentação, após vencer as barreiras iniciais, chegar ao floema adquirir e transmitir o vírus com maior facilidade E1(4,237) e E2(3,589). Todas as demais cultivares (IACSP93 3046, IACSP95 5094, IACSP95 5000 e IACSP96 3076) apresentaram menor média de eventos E1 e, conseqüentemente, menor atividade floemáticas (ondas F) não diferindo estatisticamente entre si.

Para as atividades de ingestão floemática (E2) observa que foi menor o acesso dos insetos e tempo dispensado dos mesmos nas cultivares IACSP96 3076, IACSP95 5000 e IACSP93 3046 diferindo significativamente da cultivar suscetível SP71 6163.

Em termos da duração total dos eventos (tempo total dos insetos) nas fases de aquisição de seiva (E2), as cultivares SP71 6163 e IACSP95 5094 diferiram significativamente das demais, o que prediz maior tempo para adquirir o vírus, e conseqüentemente de poder transmiti-lo para outras áreas e plantas hospedeiras.

As cultivares IACSP96 3076, e SP71 6163, apresentaram maior quantidade de ondas G, as quais exprimem dificuldades de alimentação, e assim ingestão de água pelos insetos para se hidratarem, quando avaliadas em termos da duração total dos eventos. No entanto, permaneceram maior tempo ingerindo água do xilema na cultivar IACSP96 3076.

Completando estes dados com os dados não-paramétricos (Tabela 3), os insetos permaneceram menor porcentagem do tempo sugando e inoculando seiva (%E2) na cultivar IACSP96 3076 (1,675%) quando comparado com a cultivar mais suscetível ao vírus do amarelecimento foliar SP71 6163 (2,599%). Nota-se uma tendência das fases de inoculação de seiva que ocorrem na cultivar IACSP95 5094 não diferirem estatisticamente da SP71 6163, sendo transmissões longas (6,073 e 5,767 segundos, respectivamente), enquanto as E2 que ocorrem na cultivar IACSP 96 3076 são os mais curtas (3,038 segundos) quando comparadas a estas duas cultivares.

Tabela 2: Médias (\pm erro padrão) dos parâmetros sequenciais de EPG para o comportamento alimentar de *Melanaphis sacchari* realizado para genótipos de cana-de-açúcar por 6 horas de monitoramento.

| | Pd | Np | C | E1 | E2 | G | F |
|---------------------|---|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| Cultivares | Média dos Eventos | | | | | | |
| IACSP93 3046 | 3,764 \pm 0,752A | 2,182 \pm 0,358A | 2,56 \pm 0,476AB | 3,238 \pm 1,081B | 2,333 \pm 0,945BC | 1,834 \pm 0,328B | 1,720 \pm 0,202B |
| IACSP95 5000 | 4,055 \pm 0,892A | 1,975 \pm 0,337A | 2,268 \pm 0,395B | 3,105 \pm 0,821B | 2,174 \pm 0,889BC | 2,023 \pm 0,347B | 1,741 \pm 0,184B |
| IACSP95 5094 | 3,57 \pm 0,428A | 2,172 \pm 0,351A | 2,825 \pm 0,842A | 2,788 \pm 0,827B | 2,817 \pm 0,855B | 2,028 \pm 0,333B | 1,679 \pm 0,120B |
| IACSP96 3076 | 3,758 \pm 0,900A | 2,112 \pm 0,337A | 2,519 \pm 0,584AB | 3,053 \pm 0,388B | 1,716 \pm 0,121C | 2,470 \pm 0,704A | 1,763 \pm 0,160B |
| SP71 6163 | 3,868 \pm 0,577A | 2,189 \pm 0,298A | 2,807 \pm 0,528A | 4,237 \pm 0,667A | 3,589 \pm 0,713A | 2,096 \pm 0,578AB | 2,185 \pm 0,387A |
| | Duração total dos Eventos (Segundos) | | | | | | |
| Cultivares | Pd | Np | C | E1 | E2 | G | F |
| IACSP93 3046 | 6,812 \pm 2,019A | 6,253 \pm 3,266A | 10,009 \pm 1,225A | 8,616 \pm 1,152AB | 4,799 \pm 2,822B | 4,026 \pm 3,292C | 2,663 \pm 2,037C |
| IACSP95 5000 | 7,068 \pm 1,110A | 5,390 \pm 2,798A | 9,981 \pm 0,874A | 7,615 \pm 2,284B | 4,188 \pm 3,063B | 6,159 \pm 3,200ABC | 4,089 \pm 3,24ABC |
| IACSP95 5094 | 7,331 \pm 0,865A | 6,362 \pm 1,857A | 9,931 \pm 0,754A | 8,716 \pm 0,770AB | 6,961 \pm 2,294A | 6,603 \pm 3,712AB | 3,15 \pm 2,550BC |
| IACSP96 3076 | 7,042 \pm 2,181A | 6,601 \pm 2,044A | 9,623 \pm 0,809A | 8,162 \pm 0,527AB | 3,049 \pm 1,787B | 8,013 \pm 1,837A | 5,13 \pm 3,144AB |
| SP71 6163 | 6,591 \pm 1,112A | 6,362 \pm 2,631A | 10,081 \pm 0,496A | 8,911 \pm 0,653A | 7,207 \pm 1,082A | 5,386 \pm 2,957BC | 5,812 \pm 2,231A |

Média \pm Erro padrão (n=10) seguidos por letras iguais não diferem estaticamente pelo teste de Fisher ($P < 0,05$).

pd:Penetração intracelular (picada de prova); np: caminharmento sobre a folha (não-prova); C: Caminharmento estiletar; E1: Salivação no floema; E2: Ingestão de seiva; F: Atividade floemática.

Tabela 3: Médias (\pm erro padrão) dos parâmetros não-sequenciais de EPG para o comportamento alimentar de *Melanaphis sacchari* realizado para genótipos de cana-de-açúcar por 6 horas de monitoramento.

| Cultivar | Tempo 1AE | Maior E2 | Time % C | %E1 | %E2 |
|---------------------|--------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | Média dos eventos | | | | |
| IACSP93 3046 | 3,940 \pm 3,214 A | 4,204 \pm 2,612ABC | 4,889 \pm 1,019 A | 3,665 \pm 0,856AB | 2,138 \pm 0,762AB |
| IACSP95 5000 | 3,140 \pm 2,479 A | 3,741 \pm 2,702 BC | 4,754 \pm 0,835 A | 3,390 \pm 0,712AB | 2,077 \pm 0,738AB |
| IACSP95 5094 | 3,907 \pm 2,397 A | 6,073 \pm 2,327 A | 4,678 \pm 0,690 A | 3,596 \pm 0,599AB | 1,825 \pm 0,457 B |
| IACSP96 3076 | 4,088 \pm 2,480 A | 3,038 \pm 1,773 C | 4,451 \pm 0,720 A | 3,152 \pm 0,367 B | 1,675 \pm 0,100 B |
| SP71 6163 | 3,903 \pm 2,631 A | 5,767 \pm 1,734 AB | 4,860 \pm 0,519 A | 3,788 \pm 0,546 A | 2,599 \pm 0,595 A |

Média \pm Erro padrão (n=10) seguidos por letras iguais não diferem estaticamente pelo teste de Fisher ($P < 0,05$).

4.4 Tricomas

De acordo com a Tabela (4), com exceção do comprimento dos tricomas avaliados na face adaxial, diferenças significativas entre as demais variáveis mensuradas foram detectadas quando em comparação entre as cultivares.

A maior quantidade de tricomas na face abaxial foi notadamente observada nas cultivares IACSP95 5094, IACSP93 3046 e IACSP96 3076, as quais não diferiram significativamente entre si, embora não foi detectada diferença significativa entre o número de tricomas na face adaxial entre as estas cultivares.

As cultivares SP71 6163 e IACSP95 5000 não diferiram significativamente quanto ao número de tricomas na face abaxial, o qual foi menor comparado com as demais cultivares. Entretanto, diferença significativa com relação ao número de tricomas na face adaxial pôde ser detectada entre estas duas cultivares.

A largura dos tricomas diferiu para as medições feitas considerando dois tricomas por face de cada lâmina avaliada. Observou-se que a cultivar IACSP95 5094 apresenta tricomas com a menor largura na face abaxial ao passo que a cultivar IACSP96 3076 não difere estatisticamente desta e nem das demais que apresentaram maiores valores desta medida. Na face adaxial as medidas de larguras aferidas foram maiores apenas para a cultivar SP71 6163, sendo as demais cultivares numericamente iguais. Em termos de comprimento dos tricomas as maiores medidas na face abaxial foram apresentadas pelas cultivares SP71 6163 e IACSP95 5000, e as menores foram para a cultivar IACSP95 5094.

Tabela 4: Valores médios em μm do número, largura e comprimento de tricomas presentes na epiderme de cultivares de cana-de-açúcar avaliados por meio da técnica de impressão.

| Cultivares | Tricomas | | | | | |
|---------------------|----------|---------|---------------------------|---------|------------------------------|---------|
| | Número | | largura (μm) | | comprimento(μm) | |
| | AB | AD | AB | AD | AB | AD |
| IACSP93 3046 | 7,74 a | 5,77 ab | 23,27 a | 22,50 b | 47,29 b | 46,38 a |
| IACSP95 5000 | 6,34 bc | 6,53 a | 23,01 a | 22,87 b | 48,98ab | 46,53 a |
| IACSP95 5094 | 8,19 a | 5,84 ab | 19,17 b | 20,31 b | 40,62 c | 44,98 a |
| IACSP96 3076 | 7,23 ab | 5,96 ab | 21,59 ab | 23,51 b | 48,46 b | 46,18 a |
| SP71 6163 | 5,23 c | 5,27 b | 24,56 a | 32,39 a | 53,47 a | 52,56 a |
| F(5%) | 8,04 | 2,12 | 3,73 | 4,51 | 6,3 | 1,16 |
| P | 0,0001 | 0,0941 | 0,0105 | 0,0038 | 0,0004 | 0,3379 |
| Erro-padrão | 1,26 | 0,97 | 1,06 | 2,2 | 1,85 | 2,72 |
| CV (%) | 18,11 | 16,58 | 15,96 | 28,62 | 12,21 | 18,15 |
| D.M.S | 1,14 | 0,87 | 3,02 | 6,27 | 5,25 | 7,75 |

Médias seguidos por letras iguais na coluna, não diferem estaticamente pelo teste de FISHER ($P < 0,05$).Legenda: AB: Face Abaxial da folha; Ad Face adaxial.

4.5 Obtenção das Plantas por cultura de micromeristema

As plântulas das cultivares produzidas por micromeristemas e indexadas para o SCYLV mostraram-se negativas para a presença deste vírus (Figura 11). Conforme ilustrado, há dúvida sobre a presença de uma banda fraca correspondente ao fragmento amplificado da proteína capsidial do vírus na coluna correspondente à cultivar SP71 6163. No entanto, esta banda fraca provavelmente deve-se a uma possível contaminação dos reagentes, pois o controle branco (água) também deixa a dúvida sobre a presença da mesma banda, com intensidade semelhante.

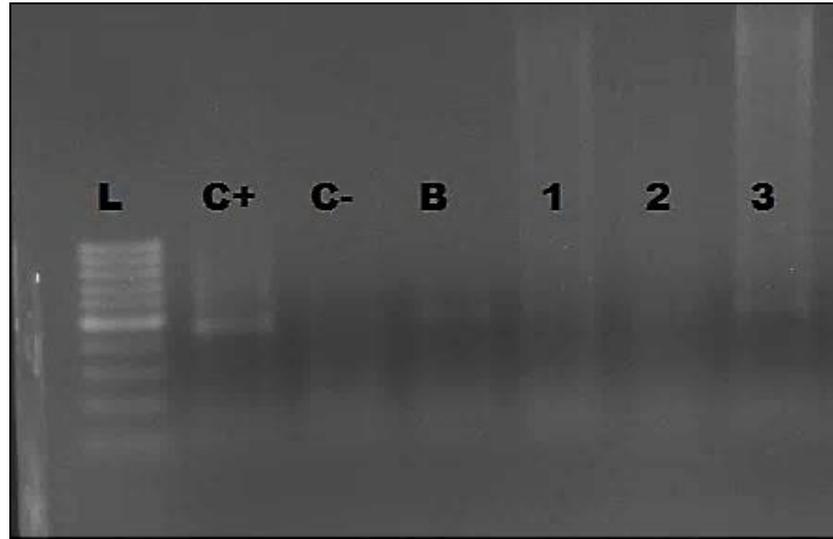


Figura 11. RT-PCR das plântulas de cana-de-açúcar *in-vitro* utilizadas para o ensaio de resistência a SCYLV. L: Ladder; c+ (Controle positivo); C- (Controle negativo); B (Branco); 1(IACSP95 5000); 2 (IACSP96 3076); 3(SP71 6163).

4.6 Resistência ao SCYLV

O diagnóstico molecular para detecção do SCYLV nas plantas submetidas à infecção do SCYLV com o vetor *M. sacchari* (teste de transmissão) revelou que 92% das plantas da cultivar SP71 6163 foram positivas para o SCYLV. Para as cultivares IACSP96 3076 e IACSP95 5000, a porcentagem de plantas positivas correspondeu, respectivamente, a 79% e 71%, sinalizando uma transmissão bem eficiente, não diferindo estatisticamente, pelo teste de Fisher 5% (Tabela 5).

Tabela 5: Porcentagem de plantas com SCYLV diagnosticadas por RT-PCR.

| Cultivar | SCYLV | SCYLV (%) |
|--------------|-------|-----------|
| IACSP95 5000 | 17/24 | 71a |
| IACSP96 3076 | 19/24 | 79a |
| SP71 6163 | 22/24 | 92a |

Valores seguidos pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Fisher ($p=0,05$).

Além disso, a presença do SCYLV foi detectada tanto nos afídeos utilizados como vetores como nas plantas utilizadas como fontes de inóculo, na qual os afídeos foram mantidos (Figura 12).

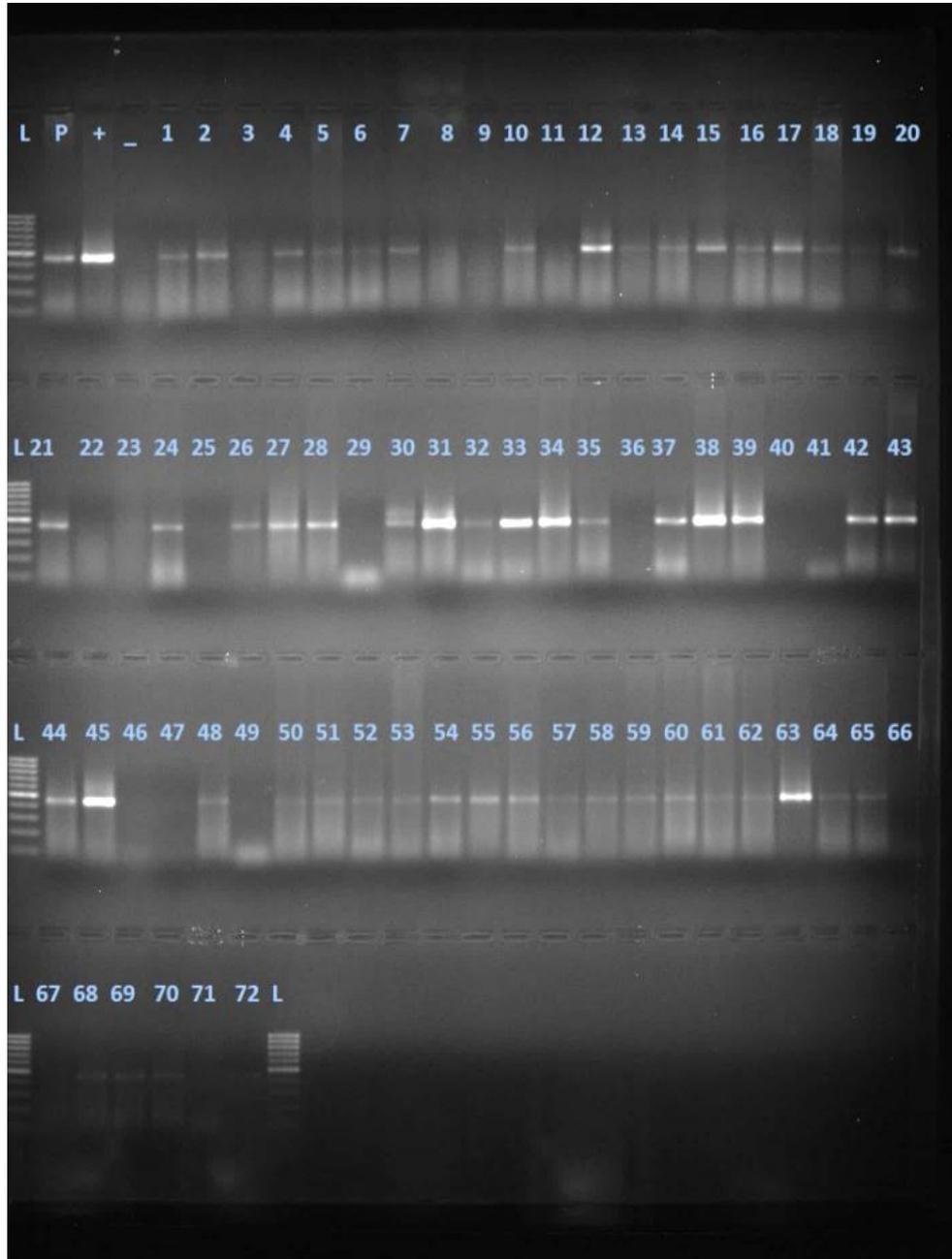


Figura 12. RT-PCR das plantas inoculadas com SCYLV por *M. sacchari*, visualizados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo. L: padrão de peso molecular de 100pb; P: cDNA de 8 pulgões inteiros, coletados de plantas com SCYLV; + (Controle positivo); - (Controle negativo); Cultivar SP71 6163 (1- 24); IACSP95 5000 (25-48); IACSP96 3076 (49-72).

Não houve infestação de *M. sacchari* ou de outros afídeos, como por exemplo, *Sipha flava*, no campo após o transplântio das mudas e no período em que foram feitos os levantamentos visuais quanto à presença de sintomas do amarelinho. Com as notas de severidade foi possível verificar que o vírus do amarelecimento foliar (SCYLV) se expressou diferencialmente com maior severidade na cultivar SP71 6163 (Tabela 6), apresentando as maiores médias de sintomas visuais ao final da terceira avaliação feita em campo, que ocorreu aproximadamente dois meses após o transplântio das plantas. As menores médias de severidade de sintomas no tempo total observado foram para a cultivar IACSP96 3076 (Figura 13).

Tabela 6: Severidade de sintomas do SCYLV em cultivares de cana-de-açúcar, calculados com a média do somatório de todas as notas visuais verificadas para cada cultivar, ao final de dois meses de avaliações em campo.

| Cultivar | Sintomas |
|---------------------|-----------------|
| IACSP95 5000 | 0,4583b |
| IACSP96 3076 | 0,4450b |
| SP71 6163 | 1,5967a |
| F(5%) | 2,57 |
| P | 0,085 |
| Erro-padrão | 0,59 |
| CV(%) | 70,89 |
| DMS | 0,76 |

Valores seguidos pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Fisher ($p=0,05$).

A expressão dos sintomas de infecção pelo SCYLV na cultivar SP716163 foi significativa durante a terceira avaliação visual dos sintomas, correspondendo a idade de 220 dias das plantas aproximadamente (Tabela 7), sendo observadas maiores notas (2,5) para esta cultivar neste período de avaliação (Figura 13).

As cultivares IACSP95 5000 e IACSP96 3076 não diferiram estatisticamente quanto a expressão de sintomas (Tabelas 6 e 7). Para a terceira avaliação, quando houve diferenças estatísticas dos sintomas entre as cultivares analisadas, as notas foram de 1,0 para a IACSP95 5000 e de 0,7 para a IACSP96 3076.

Tabela 7: Severidade de sintomas do SCYLV nas três cultivares de cana-de-açúcar em cada avaliação feita a campo. Dados analisados a partir da média das notas visuais tomadas em todas parcelas e bloco de cada cultivar.

| Cultivar | 12/01 | 23/01 | 02/02 |
|--------------------|--------------|--------------|--------------|
| IACSP95 5000 | 1,3750A | 1,5417A | 0,4167A |
| IACSP96 3076 | 0,7083A | 1,0833A | 0,4167A |
| SP71 6163 | 1,7917A | 2,000A | 1,4167B |
| F(5%) | 0,81 | 0,44 | 2,12 |
| P | 0,5992 | 0,8579 | 0,1358 |
| Erro-padrão | 0,894 | 0,998 | 0,6224 |
| CV(%) | 69,24 | 64,79 | 82,99 |
| DMS | 1,15 | 1,28 | 0,800 |

Valores seguidos pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Fisher ($p=0,05$).

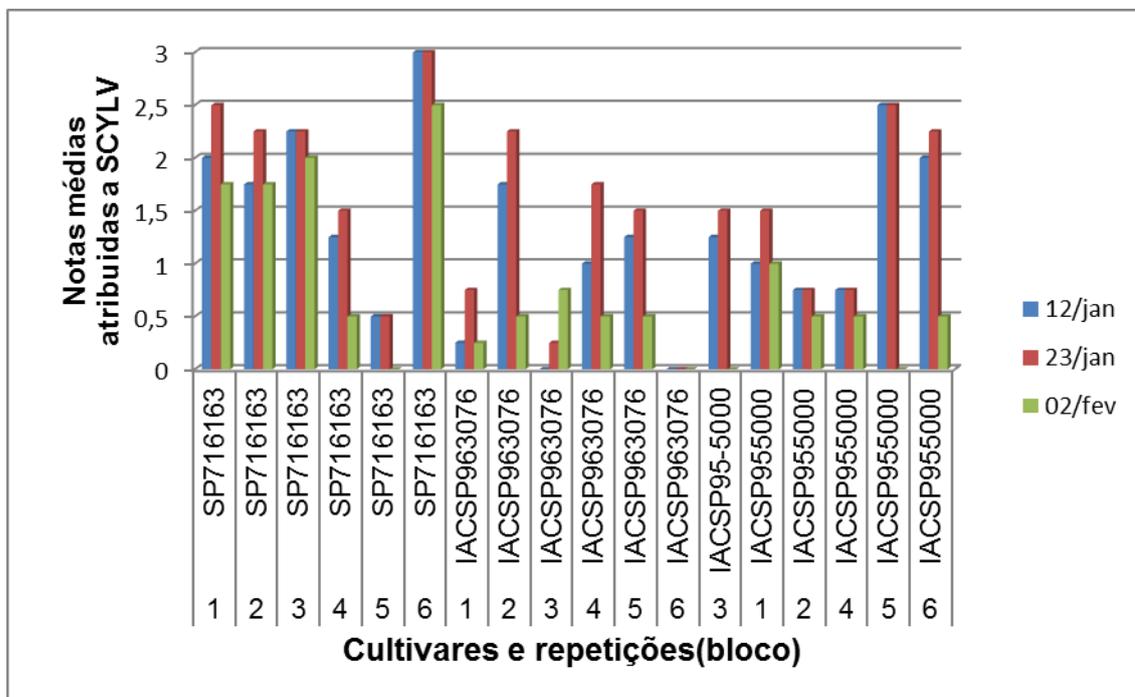


Figura 13. Severidade de sintomas do SCYLV nas três variedades de cana-de-açúcar em três avaliações no campo, após seis meses das inoculações.

5 DISCUSSÃO

Antibiose e antixenose são ensaios experimentais que permitem avaliar a influência da interação das plantas com o desenvolvimento de insetos (LARA, 1991). Palacios et al. (2002) e Alvarez et al. (2007) enfatizaram que os mecanismos de resistência podem interferir nos movimentos dos afídeos de planta para planta, assim como nos processos de aquisição e transmissão de vírus. Enquanto a cultivar IACSP95 5000 ofereceu as melhores condições para o estabelecimento da prole de *M. sacchari*, ou seja, menor efeito de antibiose, no ensaio de antixenose, a cultivar IACSP96 3076 foi a mais preferida, em grande parte dos tempos avaliados. Por sua vez, as cultivares IACSP95 5000 e IACSP95 5094 tiveram menor assentamento de insetos por ramos foliares.

Esses resultados são importantes para esclarecer o fato de que apesar da colônia de insetos ter sido mantida em folhas da cultivar SP71 6163, suscetível ao vírus, não foi observado o fenômeno de condicionamento pré-imaginal, que ocorre quando os adultos preferem se alimentar, ou ovipositar na cultivar que se alimentaram anteriormente (LARA, 1991).

As diferenças encontradas na quantidade de insetos distribuídos pelo teste de livre escolha refletem o comportamento do inseto frente às opções de hospedeiros oferecidos. Segundo a definição de Kogan e Ortman (1978), a antixenose deve exprimir o comportamento do inseto frente a um efeito adverso da planta.

Hodkinson e Huges (1982) descreveram que a seleção de uma planta hospedeira pelo inseto esta condicionada a sucessivos eventos, dentre os quais pode-se citar os estímulos olfatórios e visuais, a presença de fagoestimulantes, que desencadeiam processos como a oviposição e alimentação contínua. Estas observações podem ser comparadas aos resultados obtidos neste trabalho quando a cultivar IACSP96 3076 foi a mais preferida grande parte do tempo avaliado, ou seja, os insetos podem ter sido atraídos pela cor das folhas desta cultivar por exemplo. No entanto apresentou-se como a pior cultivar para o desenvolvimento da espécie *M. sacchari*. Enquanto a cultivar IACSP95 5000 deve ter algum fagoestimulante, que não atrai os insetos de imediato, no entanto, apresenta ótimas condições para o desenvolvimento dos insetos.

Outros fatores que podem colaborar para maior preferência ou rejeição de uma cultivar de cana-de-açúcar citam-se os estímulos fornecidos pelas plantas, como os estímulos químicos. Os compostos fenólicos encontrados em gramíneas de um modo geral como cana-de-açúcar (GODSHALL; LEGENDRE, 1988; BALCEREK et al., 2009), são conhecidos por afetar o crescimento, desenvolvimento e fecundidade dos pulgões (LESZCZYNSKI et al., 1995; KESSLER; BALDWIN, 2002; URBANSKA et al., 2002; SINGH et al., 2004). Esses compostos são encontrados em tricomas, os quais na cultura da cana-de-açúcar já tinham sido estudados com a finalidade de conhecer a sua função como barreira protetora na ação de herbicidas (FERREIRA et al., 2007). O fenômeno de livre escolha dos insetos, também pode ser influenciado pelo número de tricomas na superfície foliar atuando como barreiras físicas ou químicas, (Edwards e Wratten, 1981). Este corrobora ao que foi observado para a cultivar IACSP95 5094, unindo os dados de antixenose e EPG, notou-se que esta cultivar apresentou resistência mecânica inicial (ondas C), provavelmente devido a maior quantidade de tricomas na superfície abaxial da folha (parte preferida dos insetos), e que pelos testes de preferência e de desenvolvimento é uma das cultivares que oferece menores condições para o desenvolvimento da prole de *M. sacchari*. Ferreira et al. (2007) levantaram a hipótese de que na ação de proteção das plantas, além dos tricomas, existem as células com sílica e os estômatos, que indiretamente também funcionam como defesas vegetais (FERREIRA et al., 2007). Esta observação é compatível com os dados observados para a cultivar SP71 6163 pois apresenta a menor quantidade de tricomas por superfícies da folha comparados entre todas as cultivares analisadas, no entanto são tricomas com maiores dimensões, exercendo maiores barreiras químicas e físicas inicialmente as atividades de penetração dos insetos, com a hipótese de outras células de defesa na epiderme desta cultivar, configurando os maiores valores de onda C observados.

Gibson (1971), La Pointe e Tingey (1984) observaram que tricomas induzem a resistência física a afídeos, pois quando há a ruptura das paredes de tricomas, há a liberação de um exudado que impede o contato dos afídeos com a superfície foliar. Este fato corrobora com o que foi observado neste trabalho, em que a cultivar IACSP96 3076, apesar de ser a mais preferida entre as cultivares avaliadas, não foi a que ofereceu as melhores condições para o desenvolvimento do inseto.

Provavelmente, isso pode ser atribuído ao fato desta cultivar, juntamente a IACSP93 3046 e a IACSP95 5094 estarem entre as que apresentam um maior número de tricomas por área foliar na face abaxial, os quais podem ser rompidos durante as tentativas de alcance do floema pelos insetos. A menor quantidade de tricomas foliares na IACSP95 5000 é um dos fatores que favorece o desenvolvimento da população de *M. sacchari*, conforme observado na presente pesquisa, em que esta cultivar foi a que apresentou o maior número de adultos e ninfas após oito dias de avaliação de desenvolvimento.

Assim, considerando que o vírus do amarelecimento foliar é propagado pelos insetos-vetores (pulgões), dentre eles *M. sacchari*, cujo tipo de transmissão é caracterizada como persistente, circulativo e não-propagativo (VEGA et al., 1997; MAIA et al., 2000; MOONAN et al., 2000; DOMIER, 2012), pode-se supor que a cultivar IACSP95 5000 se constitua em uma boa fonte mantenedora dos insetos e, conseqüentemente, fonte de inóculo de SCYLV. As infestações de canaviais com pulgões alados iniciam sob condições ambientais favoráveis e normalmente quando as copas das plantas começam a sobrepor, entre 12 e 16 semanas após a plantação, quando a movimentação dos insetos planta-a-planta primeiramente nas linhas favorece a dispersão da espécie do pulgão e potencialmente do SCYLV (VAILLANT et al., 2011).

Diferenças no tempo total de cada fase de alimentação dos insetos, ou a duração destas fases entre cada cultivar avaliadas pela técnica de EPG, pode ser um indício de resistência apresentada pelas plantas aos insetos (LEI et al., 2001).

Pelo fato dos insetos não conseguirem sucção de seiva na cultivar IACSP96 3076, tão eficiente quanto na suscetível ao SCYLV (SP71 6163), levanta-se a hipótese de barreiras químicas ou físicas de defesa vegetal associadas ao comportamento alimentar de *M. sacchari*, conforme indicado pelos menores números de eventos —E¹e —E²quando comparado ao da SP71 6163, reduzindo a alimentação do afídeo vetor e, conseqüentemente, prejudicando o desenvolvimento da prole deste inseto, observando um menor número de insetos nesta cultivar. A menor quantidade de eventos observados na região floemática da cultivar IACSP96 3076 pode ser associada a fatores de resistência do tipo antixenose, uma vez que indica menor chance para adquirir a seiva e somado o efeito de —E²mais longas

(TJALLINGII, 2006). Resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho, foram observados também por Fartek et al. (2012), quando em ensaios de antibiose no campo e em laboratório, detectaram redução significativa de *M. sacchari* na cultivar R365, explicado devido a fatores de resistência floemática pois os insetos não conseguiam alcançar o floema e se alimentar na fase —E2 tão eficientemente como em outras cultivares estudadas. Jiang et al. (2001) e Le Roux (2008) observaram um atraso na alimentação de *Myzus persicae* em batata devido a fatores de resistência existente no floema.

As cultivares IACSP93 3046, IACSP95 5000, e principalmente na IACSP95 5094, podem ser consideradas intermediárias quanto à resistência floemática.

A cultivar SP71 6163, conhecida pelo amarelecimento intenso nas suas folhas, característico da infecção pelo vírus, comprovadamente apresentou as maiores médias de eventos para E (E1 e E2), além de provar a suscetibilidade física por apresentar um baixo número de tricomas na epiderme. Interessantemente, esta cultivar apresentou índices altos de ondas —C indicando resistência física inicial, provenientes de outras estruturas desconhecidas, sendo uma das menos preferidas nos teste de antixenose. Entretanto, uma vez que o inseto tem esta cultivar como única opção de alimento (conforme observado pelo comportamento alimentar de *M. sacchari* pelo teste de EPG) alimenta-se com facilidade da seiva floemática. No ensaio de severidade de SCYLV feito com as três cultivares (IACSP96 3076, IACSP95 5000, e SP71 6163), a cultivar SP71 6163 apresentou maior porcentagem de expressão dos sintomas da doença. De fato, a cultivar suscetível SP716163 apresentou os maiores valores na média dos eventos E1 e E2 comparada com as demais cultivares estudadas, sendo indicativos de suscetibilidade ao SCYLV.

A cultivar IACSP95 5094 é conhecida nos canaviais, por apresentar intenso amarelecimento, principalmente durante o período seco. Por falta de diagnóstico rápido no campo, ou por precisão em se determinar se o amarelecimento é de causa biótica ou abiótica, são colhidas e mantidas as touceiras em campo sem a confirmação do SCYLV. No presente trabalho, podemos afirmar que o inseto vetor apresenta certa dificuldade inicial de penetrar seu estilete na epiderme foliar da IACSP95 5094, provavelmente pelo fato desta cultivar estar entre as que apresenta maior número de tricomas na parte abaxial das folhas, parte esta preferida pelos

pulgões, conforme constatado pelos resultados deste trabalho que existe resistência mecânica inicial para os insetos quando alimentados nesta cultivar e na SP71 6163. No entanto, em termos de resistência em nível de mesófilo, xilema e floema, pode-se dizer que esta foi menor para esta cultivar e para a SP71 6163, quando comparada às demais, devido à maior duração do tempo que os insetos conseguem se alimentar propriamente no floema (E2). Dessa forma, com base nos resultados provenientes do acompanhamento alimentar de *M. sacchari* na cultivar IACSP95 5094, deve-se fazer o monitoramento constante das áreas com esta cultivar, pois os indícios são de que esteja sendo confundido com causas abióticas, sintomas que de fato caracterizam a infecção pelo SCYLV.

Akbar et al. (2014) comprovaram que os diferentes tempos de *M. sacchari* alimentando-se em elementos de vasos entre cultivares de cana-de-açúcar resistente (HoCP 91-555) e suscetível (LCP 85-384) ao afídeo-vetor é devido as diferenças de metabólitos secundários (aminoácidos) encontrados na saliva e no líquido açucarado eliminado pelo afídeo, sendo que alguns metabólitos essenciais, não são encontrados nos excretos dos afídeos alimentados na cultivar resistente, devido a incapacidade dos endosimbiontes (*Buchnera* sp) de digerir esses aminoácidos e supondo uma inibição da rota metabólica, influenciando na preferência do mesmo e na redução da população nesta cultivar.

Atualmente existem vários diagnósticos para detecção do vírus do amarelecimento foliar. A técnica empregada de RT-PCR apresenta alta sensibilidade e especificidade ao SCYLV (GONÇALVES, 2005), sendo altamente importante na utilização da caracterização das cultivares como resistentes ou suscetíveis, uma vez que a concentração do SCYLV é muito baixa nos tecidos foliares, e assim dependendo da técnica para confirmação da transmissão escolhida, não pode ser detectado (ABU AHMAD et al., 2007). Apesar de não haver diferenças no teste de transmissão entre as cultivares avaliadas, não podemos afirmar que não haja resistência genotípica, ou física envolvida. O método empregado para realizar a inoculação ofereceu apenas uma cultivar como opção de fonte de alimento para o inseto, mesmo não sendo a cultivar de preferência, os insetos tiveram 70 horas para se alimentarem. De fato, não houve diferença significativa pelo teste de Fisher a 5%, quanto à proporção de cultivares inoculadas e infectadas.

Além disso, o mecanismo de resistência ao vírus não é dependente apenas de mecanismos de resistência ao inseto, já que baixa correlação de resistência de afídeos e incidência de SCYLV foi constatado por Fartek et al. (2014), sendo este mecanismo de resistência remetido também a existência de genes de resistência.

Sckenck e Lehrer (2000) desenvolveram uma escala diagramática para classificação de cultivares de cana-de-açúcar, quanto à resistência ao SCYLV. Segundo esta escala, criada no Havaí a cultivar de cana-de-açúcar H 65-7052 é tão suscetível quanto a SP71 6163. Por meio de teste sorológico, estes autores verificaram que quando todas as plantas de uma cultivar estiverem contaminadas com o SCYLV, esta cultivar deve ser classificada como suscetível; ao passo que, quando outras plantas e cultivares apresentarem ausência, mesmo com a condição de plantas infectadas deste vírus nas proximidades, são ditos como resistentes. Plantas intermediárias seriam aquelas que 30% fossem positivas para o teste de ELISA.

Provada a infecção das plantas pelo vírus do amarelecimento foliar por meio de diagnósticos moleculares ou sorológicos, o aparecimento dos sintomas é muito variável (DÍAZ et al., 2013). Para a avaliação preliminar realizada até agora contabilizamos notas visuais para SCYLV na escala de 0 a 4. No entanto, segundo Aljanabi et al. (2001) não contabilizaram os registros de nota 1 como sendo devido a suscetibilidade a SCYLV, devido ao fato de que esses sintomas iniciais podem ser provocados e confundidos com outros fatores não patogênicos tais como danos provocados por ventos, ou por outras pragas como ácaros em campo, levando a resultados falsos. Além disso, Lehrer e Komor (2008), observaram que as plantas testemunhas não inoculadas não excediam a escala visual 1, durante o período de avaliação visual das plantas inoculadas.

Lehrer e Komor (2008) monitorando a severidade dos sintomas visuais de SCYLV em cultivares de cana-de-açúcar, chegaram à conclusão de que não existe correlação entre concentração SCYLV e sintomas de amarelecimento foliar, pois a expressão dos sintomas está condicionada a idade das plantas, e aos fatores que condicionam a supressão dos sintomas, como por exemplo, fatores ambientais de temperatura. De fato, o aparecimento dos sintomas visuais na cultivar suscetível expressou com maior intensidade e como indício de uma severidade inicial da

doença, aos 220 dias de idade das plantas, corroborando os dados obtidos com Lehrer e Komor (2008), quando obtiveram notas com maiores escalas visuais para as cultivares suscetíveis ao SCYLV, e os sintomas do vírus iniciaram aos 200 dias, sendo notando por estes autores, o reaparecimento dos sintomas típicos de amarelecimento foliar e progressivo aos 350, 500 e 650 dias de idade das plantas. Em nosso trabalho, a expressão dos sintomas ocorreu em janeiro/fevereiro, quando na região de Ribeirão Preto, em dezembro as médias de temperatura foram de 31 ° C. Em janeiro a média foi 31°C, mas com dias cuja a máxima diária chegou a 35°C (data de 19 de Janeiro) (INMET, 2015). Após a terceira avaliação, as plantas retomaram o crescimento com a folhagem verde, e sem a expressão de sintomas de SCYLV, mesmo na cultivar suscetível ao vírus SP71 6163. Para plantas com diagnóstico positivo, a sintomatologia no campo é mais evidente nas condições de inverno mais rigoroso, ou que passaram por outros estresses como o hídrico (ABU AHMAD et al., 2007). A progressão da infecção e sintomas de SCYLV, é constatado como redução na eficiência fotossintética do fotossistema II e das trocas gasosas, além de acúmulo de açúcares nas folhas de cana-de-açúcar (GONÇALVES et al., 2004) e redução do significativa do peso seco da raiz (VASCONCELOS et al., 2009).

De fato, apesar de uma avaliação preliminar ter sido conduzida com o intuito de sinalizar uma possível resistência ou suscetibilidade das cultivares, outras avaliações em época favorável para o desenvolvimento da doença (meses de maio, junho e julho) deverão ser conduzidas para uma caracterização mais confiável das cultivares quanto à resposta ao SCYLV. Tais observações comprovam a necessidade de se realizar avaliações ao longo das fases de desenvolvimento da cana-de-açúcar, incluindo a cana soca.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados aqui apresentados conclui-se:

A cultivar SP71 6163 apresenta resistência mecânica ao afídeo *M. sacchari* e comprovamos a suscetibilidade desta cultivar ao *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV).

IACSP95 5094 apresenta resistência ao afídeo-vetor *M. sacchari* dos tipos antixenose e antibiose, no entanto é uma cultivar com suscetibilidade ao SCYLV.

A cultivar IACSP96 3076 apresenta resistência do tipo antibiose ao *M. sacchari* além de resistências químicas ou físicas em nível de floema que dificultam a atividade alimentar dos afídeos e a transmissão de SCYLV (resistente).

IACSP93 3046 apresenta resistência dos tipos antibiose e antixenose à *M. sacchari* e apresenta-se como resistente em nível de atividade floemática e transmissão de SCYLV.

IACSP95 5000 é altamente suscetível ao desenvolvimento de *M. sacchari*, no entanto apresenta resistência quanto à infecção pelo SCYLV.

7 REFERÊNCIAS

ABU AHMAD, Y.; COSTET, L.; DAUGOIS, J. H.; NIBOUCHE, S.; LETOURMY, P.; GIRARD, J.C.; ROTT, P. Variation in infection capacity and in virulence exists between genotypes of *Sugarcane yellow leaf virus*. **Plant Disease**, v.91, p. 253-259, 2007.

AGRAWAL, A. A. Induced responses to herbivory and increased plant performance. **Science**, v. 279, p. 1201-1202, 1998.

ALJANABI, S.M.; Parmessur, Y; Moutia, Y; Saumtally, S; Dookun, A. Further evidence of the association of a phytoplasma and a virus with yellow leaf syndrome in sugarcane. **Plant Pathology**, v. 50, 628 – 36, 2001.

ALVAREZ, A. E; GARZO, E; VERBEEK, M; VOLMAN, B; DICKE, M; TJALLINGII, W. I. Infection of potato plants with *Potato leafroll virus* changes attraction and feeding behaviour of *Myzus persicae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.12, p.135–144, 2007. Disponível em: < doi:10.1111/j.1570-7458.2007.00607>.

AHARONI, A; JONGSMA, M. A.; KIM, T. Y.; RI, M. B.; GIRI, A. P.; VERSTAPPEN, F. W. A.; SCHEAB, W.; BOUWMEESTER, W. A. Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. **Phytochemistry Reviews**, v.5, p. 49-58, 2006.

AKBAR, W; SHOWLER, A. T.; REAGAN, T. E.; WHITE, W. H. Categorizing sugarcane cultivar resistance to the sugarcane aphid and yellow sugarcane aphid (Hemiptera: Aphididae). **Journal of Economic Entomology**, v.103, p.1431-1437, 2010.

AKBAR, W; SHOWLER, A. T.; REAGAN, T. E.; DAVIS, J. A.; BEUZELIN, J. M. Feeding by sugarcane aphid, *Melanaphis sacchari*, on sugarcane cultivars with differential susceptibility and potential mechanism of resistance. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 250, p-32-44, 2014.

BALCEREK, M; RAK, I; MAJTKOWSKA, G; MAJKOWSKI, W. Antioxidant activity and total phenolic compounds in extracts of selected grasses. **Herba Polonica**, 55, p.214–221, 2009.

BARROSO, P. A. V.; NOGUEIRA, N. L.; CHINEA, A. M. Aumento no teor de sólidos solúveis em folhas de cana-de-açúcar portadoras de sintomas da síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 20, p. 360, 1995.

BATISTA, F. Variedades de cana da Ridesa lideram canaviais no Brasil. Novacana.com, 30 de maio de 2014. Disponível em:<<http://www.novacana.com/n/cana/variedades/variedades-cana-ridesa-lideram-canaviais-brasil-300514/>>. Acesso em: 18 de agosto de 2014.

BENATTO, A. **Dinâmica populacional de afídeos do morangueiro: parâmetros de crescimento e estudo de comportamento alimentar *Chaetosiphon fragaefolii* por EPG (Electrical Penetration Graphs)**. 2014.89F. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

BENNETT, R. N; WALLSGROVE, R. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. **New Phytologist**, v. 127, p. 617-633, 1994.

BLACKMAN, R. L.; EASTOP, V. F. **The aphids**, pp. 297-298, 339-340. In R. L. Blackman and V. F. Eastop [eds.], *Aphids on the worlds crops-an identification and information guide*, 2nd ed. Wiley, West Sussex, England, 2000.

BONANI, J. P.; FERERES, A; GARZO, E; MIRANDA, M. P.; ARREZZATO-DA GLORIA; LOPES, J. R. S. Characterization of electrical penetration graphs of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri kuwayama* in sweet orange seedlings. **Entomologia Experimentalis et Applicata** n.134, v.1, p.35-49, 2010.

BORRÁS-HIDALGO, O; THOMMA, B. P. H. J.; CARMONA, E; BORROTO, C. J.; PUJOL M.; ARENCIBIA A; LOPEZ J. Identification of sugarcane genes induced in disease-resistant somaclones upon inoculation with *Ustilago scitaminea* or *Bipolaris sacchari*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 43, p. 1115–1121, 2005.

CASAGRANDE, M; Centro de Tecnologia Canavieira (CTC). Dados não publicados in: SILVA, E. G; BEDENDO, I P; CASAGRANDE, M.V. Ocorrência de fitoplasma associado à síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar em três regiões do Estado de São Paulo. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, p. 543-456, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762008000600009>>.

CHANG C. P.; FANG, M. N.; TSENG, H.Y. Studies on the life history and varietal resistance in grain sorghum aphid, *Melanaphis sacchari* Zehntner in central Taiwan. **Chinese Journal of Entomology**, v.2, p. 70–81, 1982.

CHATENET, M; DELAGE, C; RIPOLLES, M. Detection of *Sugarcane yellow leaf virus* in Quarantine and Production of Virus-free Sugarcane by Apical Meristem Culture. **Plant Disease**, v. 85, p. 1177-1180, 2001.

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

COSTA, C.L. Vetores de vírus de plantas – I. Insetos. In: LUZ, W.C. (Eds). **Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP)**. Passo Fundo – RS, p.103-171, 1998.

COMSTOCK, J. C.; MILLER, J. D.; SHNELL, R. J. Incidence of Sugarcane Yellow Leaf Virus in sugarcane clones maintained in the world collection of sugarcane and related grasses at United States national repository in Miami, Florida. **Sugar Technology**, v.11, p. 368-372, 2001.

COMSTOCK, J. C.; MILLER, J.D. Yield Comparisons: Disease-Free Tissue-Culture Versus Bud-Propagated Sugarcane Plants and Healthy Versus Yellow Leaf Infected Plants. **Journal American Society Sugar Cane Technologists**, v. 24, p. 31-40, 2004.

COMSTOCK, J.C.; MILLER, J.D. Sugarcane yellow leaf virus spread in Florida. **Phytopathology**, v. 95 (Suppl. 6), 2005.

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO) 2014: Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. v1,n2, Agosto/2014.

CRONJÉ, C.P.R; BAILEY, R. A; MC FARLANE, K. Update on the occurrence of yellow leaf syndrome in the South African sugar industry and evidence for the causal agent. **Proceedings of South African Sugar Technology Association**, v.72, p. 81-84, 1998.

DARCY, C; DOMIER, L. Virus taxonomy. VIII Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, In: FAUQUET,C; MAYO, M; MANILOFF,J; DESSELBERGER, U; BALL,L. **Luteoviridae**, p.891-900, Elsevier Academic Press, New York. 2005.

D'HONT, A.; ISON, D; ALIX, K. et al. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. **Genome**, v.41, p. 221-225, 1998.

DENMARK, H. A.; Sugarcane aphids in Florida. Florida Department of Agriculture & Consumer services, Division of Plant Industry. Entomology Circular n.302,1988.

DÍAZ, O. C. A de la.; HECHAVARRÍA, M. L. de la.; NAVARRO, M. A. Z. de los.; LEMA, E. R.; LÓPEZ, J. M. M.; IZAGUIRRE, Y.P.; MUJICA, F. R. D. Resistencia al virus de la hoja amarilla, en la base genética de la caña de azúcar Resistance to yellow leaf virus, in the genetic base of the sugarcane. **Centro Agrícola**, v.40, p. 57-62, 2013.

DIXON, A. F. G. **Aphid Ecology**. London: Chapman & Hall, 1998. 300 p.

DOUGLAS, A. E. Nutritional interactions in insect-microbial symbiosis: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. **Annual Review of Entomology**, v.43, p. 17-37,1998.

Domier, L.L. Luteoviridae. **Virus taxonomy**. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. (ed. by King AMQ, Adams MJ, Carstens EB & Lefkowitz EJ. Elsevier Academic Press, New York, pp. 1045-1053, 2012.

EDWARDS, P. J; WRATTEN, S. D. **Ecologia das interações entre insetos e plantas**. São Paulo: E.P.U. EDUSP, 1981. 71p.

FARTEK, B; NIBOUCHE, S; TURPIN, P; COSTET, L; REYNAUD, B. Resistance to *Melanaphis sacchari* in the sugarcane cultivar R 365. **Entomologia Experimentalis et Applicata** v.144, p.270- 278.2012. doi:10.1111/j.1570-7458.2012.01286.x.

FARTEK, B; NIBOUCHE, S; ATIAMA-NURBEL, T; REYNAUD, B; COSTET, L. Genotypic variability of sugarcane resistance to the aphid *Melanaphis sachhari* vector of the *Sugarcane Yellow Leaf virus*. **Plant Breeding**. Disponível em: <Doi:10.1111/pbr12204>2014.

FEBVAY, G; RAHBÉ, Y; VAN HELDEN, M. MacStylet, a Macintosh software to analyse EPG (Electrical Penetration Graph) data.**Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.80, p. 105-108, 1996.

FERERES, A; PEREZ, P; GAMENO, C; PONZ, F. Transmission of Spanish pepper-PVY isolates by aphid vectors: epidemiological implications. **Environmental Entomology**, n. 22 p. 1260-1265, 1993.

FERERES, A; COLLAR, J. L. Analysis of circulative transmission by electrical penetration graphs. In: Harris K F, Smith O P, Duffus J E. Academic Press, (eds) **Virus-insect-plant interactions**. San Diego, 2001, p.87-109 .

FERERES, A; GARZO, E; MIGUEL, C; SARRIA, E; Workbook for automatic parameter calculation of EPG data. **Computers and Electronics in Agriculture**, v.67, p. 35-42, 2009.

FERREIRA, E. A.; VENTRELLA, M. C.; SANTOS, J. B.; BARBOSA, M. H. P.; SILVA, A. A.; PROCÓPIO, S.O.; SILVA, E. A. M. Leaf blade quantitative anatomy of sugarcane cultivars and clones. **Planta Daninha**, Viçosa-MG. V.25, n.1, p. 25-34, 2007.

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

GIBSON, R. W. Glandular hairs providing resistance to aphids in certain wild potato species. **Annals of Applied Biology**, v. 68, n. 2, p.113 –119, 1971.

GILDOW, F. E. Luteovirus transmission and mechanisms regulating vector specificity. In: The Luteoviridae. Edited by H. G. Smith & H. Barker. Oxon: CAB International. 1999. pp.88-113.

GILBERT, R. A.; GLYNN, N. C.; COMSTOCK, J. C.; DAVIS, M. J. Agronomic performance and genetic characterization of sugarcane transformed for resistance to sugarcane yellow leaf virus. **Field Crops Research**, n. 111, p. 36-46, 2009.

GODSHALL, M.A.; LEGENDRE, B.L. Phenolic content of maturing sugar cane. **International Sugar Journal**, v. 90, p. 16–19, 1988.

GONÇALVES, M.C.; KLERKS. M.M.; VERBEEK, M.; VEGA, J.; VAN DEN HEUVEL, J.F.J.M. The use of molecular beacons combined with NASBA for the sensitive detection of *Sugarcane yellow leaf virus*. **European Journal of Plant Pathology**, n. 108, p.401–407, 2002.

GONÇALVES, M.C. VIROSES DA CANA-DE-AÇUCAR: POTENCIALIDADE DE NOVAS EPIDEMIAS. **Biológico**, São Paulo, v.67, n.1/2, p.19-21, jan./dez., 2005.

GONÇALVES, M.C.; VEGA, J; OLIVEIRA, J.G.; GOMES, M. M. A. Sugarcane yellow leaf virus infection leads to alterations in photosynthetic efficiency and carbohydrate accumulation in sugarcane leaves. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p.10-16, 2005.

GONÇALVES, M.C; Doenças causadas por vírus. In: DINARDO-MIRANDA-, L.L; VASCONCELOS, A.C.M; LANDELL, M.G.A. (Eds) **Cana-de-Açúcar**. Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, Brazil, v.1. 2008, p 150-165.

GONÇALVES, M.C.; PINTO, L.R.; SOUZA, S.C.; LANDELL, M.G.A. Virus Disease of Sugarcane. A constant challenge to Sugarcane Breeding in Brazil. **Functional Plant Science and Biotechnology**, n.6, v.2, p.108-116, 2012.

GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: Integrating pest genetics and ecology. **Annual Review of Entomology**, v. 43, p. 701-726, 1998.

GOUSSAIN, M. M. **Interação trigo-silício-inseticida na biologia e no comportamento de prova do pulgão-verde Schizaphis graminum (Rondani) (Hemiptera: Aphididae) monitorado pela técnica 'Electrical Penetration Graphs' (EPG)**. 2006. 59 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Entomologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

GULLAN, P.J.; CRANSTON, P.S. **Os insetos**: um resumo de entomologia. 3 ed. São Paulo: Roca, 2007. 440p.

GLAS, J.J.; SCHIMMEL, B.C.J.; ALBA, J.M.; ESCOBAR-BRAVO, R.; SCHURINK, R.C.; KANT, M.R. Plant Glandular Trichomes as Targets for Breeding or Engineering of Resistance to Herbivores. **International Journal of Molecular Science**, v.13, p. 17077-17013, 2012. Disponível em : <doi:10.3390/ijms131217077>

GLYNN, N. C.; Gilbert, R. A.; COMSTOCK, J. C.; DAVIS, M.J. Transmission of a Sugarcane Yellow Leaf Virus resistance transgene to sexual progeny and screening by kanamycin inoculation. **Field Crop Research**, v.119, p. 308-313, 2010.

GRISHAM, M; EGGLESTON, G; HOY, J. W.; VIATOR, R.P. The effect of Sugar cane yellow leaf virus infection on yield of sugarcane in Louisiana. **Sugar Cane International**, v.27, p. 91-94, 2009.

GRISHAM, M. P.; Y-B. Pan; LEGENDRE, B. L.; GODSHALL, M. A.; EGGLESTON, G. Effect of sugarcane yellow leaf virus on sugarcane yield and juice quality. **Proceedings of International Society of Sugar Cane Technology**, v. 24, p.434-438, 2002.

Grupo São Martinho. O mercado sucroalcooleiro. Disponível em: <<http://www.usinasaomartinho.ind.br/>> Acesso em: 20/08/2014.

HAGIO, T. Host Plant resistance and its inheritance in sorghum to sugarcane aphid (*Meplanaphis sacchari* Zehntner). **Bulletin of the Chugoku National Agricultural Experiment Station**, v.10, p. 17-26, 1992.

HOGENHOUT, S.A.; AMMAR, E. D.; WHITFIELD, A. E.; REDINGBAUGH, M. G. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 46 p. 327–359, 2008.

HOFFMAN H. Disponível em: <<http://www.etanol.ufscar.br/trabalhos-mta/sertaozinho-i/a-importancia-do-melhoramento-das-variedades-de-cana-de-decucar-2014>> Acesso 10 de janeiro 2015.

HODKINSON, I.D.; HUDGHES, M.K. **Insect herbivory**. Chapman & Hall, London. 1982.

INMET (Instituto Nacional de Meteorologia), **Dados meteorológicos de Ribeirão Preto**, 2015. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/>> Acesso: 8 de Abril de 2015.

IZAGUIRRE-MAYORAL, M. L.; CARBALLO, O; ALESTE, C; ROMANO, M; NASS, H. A. Physiological performance of asymptomatic and yellow leaf syndrome-affected Sugarcane in Venezuela. **Journal of Phytopathology** v.150, p.13-19, 2002.

JIANG, Y.X.; NOMBELA. G; MUÑIZ, M. Probing and feeding behavior of two distinct biotypes of *Bemisia tabaci*(Homoptera: Aleyrodidae) on tomato plants. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.92, p.357-366, 2001.

JORNAL DA CANA 2014: **Mercado da cana**. Disponível em: <<http://www.jornalcana.com.br/revista/jornalcana/>> Acesso em: 20/08/2014

KARBAN, R; BALDWIN, I.T. **Induce responses to herbivory**. Chicago, University of Chicago Press, 317p.1997.

KATIS, N.; TSITSIPSIS, J; STEVENS, M; POWELL, G. Transmission of plant viruses, In: H. van Emden and R. Harrington, (eds.) **Aphids as crop pests**, International, Wallingford, UK, 2007, 353- 390.

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

KIMMINS, F.M. & TJALLINGII, W.F. Ultrastructure of sieve element penetration by aphid stylets during electrical recording. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 39, p. 135 - 141, 1985.

KINDLANN, P; JAROSŮK, V; DIXON, A. F.G. Population dynamics. Aphids as Crop Pests (ed. by H van Emden & R Harrington), CABI, Wallingford,UK. p. 311–329, 2007.

KOGAM, M; ORTMAN, E. E. Antixenosis a new term proposed to replace Painter's —no-preference"modality of resistance. **Bulletin of Entomological Society America**, v.24, p.175-176, 1978.

KORIMBOCUS, J; COATES, D; BARKER, I; BOONHAM, N. Improved detection of Sugarcane yellow leaf virus using a real-time fluorescent (TaqMan) RTPCR assay. **Journal of Virological Methods**, v.103, p.109-120, 2002.

KOMOR, E. Susceptibility of sugarcane, plantation weeds and grain cereals to infection by Sugarcane yellow leaf virus and selection by sugarcane breeding in Hawaii. **European Journal of Plant Pathology** v.129,p. 379-388,2011.

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

LA POINTE, S.L; TINGEY, W.M. Feeding response of the greenpeach aphid (Homoptera:Aphididae) to potato glandular trichomes. **Journal of Economic Entomology**, v. 77, p. 386-389, 1984.

LEHER, A.T; KOMOR, E. Symptom expression of yellow sugarcane leaf disease in sugarcane cultivars with different degrees of infections by *Sugarcane yellow leaf virus*. **Plant Pathology**, 57, p.178-189, 2008.

LEVIN, D.A. The role of trichomes plant defence. **The quarterly review of biology**. Department of botany, University of Texas, v.48, p. 3-15, 1978.

LEI, H; VAN LENTEREN, J.C; XU, R.M. Effects of plant tissue factors on the acceptance of four greenhouse vegetable host plants by the greenhouse whitefly: an Electrical Penetration Graphs (EPG) study. **European Journal of Entomology**, v.98, p.31-36, 2001.

LE ROUX, V; DUGRAVOT, S; CAMPAN, E; FRANÇOISE, D; VICENTE, C; GIORDANENGO, P. Type of aphid resistance in wild *Solanum*. **Journal of Economic Entomology**, v.101, p.584-591, 2008.

LINDLEY, J. **Transactions of the Horticultural Society of London**, 1831. Series 2, 1, 153-161.

LOXDALE, H.D. What's in a clone: the rapid evolution of aphid asexual lineages in relation to geography, host plant adaptation and resistance to pesticides. In Sch n I, Martens K, van Dijk P, editors. **Lost sex: The evolutionary biology of parthenogenesis**. Springer Netherlands, 2009, p.535–557.

LOCKART, B. E.; CRONJÉ, C. P. R. Yellow leaf syndrome. In: **A guide to sugarcane diseases**. CIRAD/ISSCT, Montpellier, France, 2000, p. 291-295.

LOPES, J. R. S.; GONCALVES, M. C.; VEGA, J.; KRÜGNER, R.; NAVAS, S. M. Aphid transmission of a virus associated with sugarcane yellow leaf. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.335-335, 1997.

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

MAIA, I.G.; GONÇALVES, M. C.; ARRUDA, P; VEJA, J. Molecular evidence that Sugarcane Yellow leaf virus (ScYLV) is a member of Luteoviridae family. **Archives of virology**. 145, p. 1009-1019, 2000.

MARTIN, B; COLLAR, J. L.; TJALLINGII, W. F.; FERERES, A. Intracellular salivation and ingestion by aphids may cause inoculation and acquisition of nonpersistently transmitted plant viruses. **Journal of General Virology** n. 78, p. 2701–2705, 1997.

MANTEHEE, J. J. Pests of graminaceous crops in South Africa. **Entomology Memoir**. Department of Agricultural Technical Services, Pretoria, South Africa, v.40, p. 1-23, 1974.

MANTHE, C. S. **Sorghum resistance to sugarcane aphid (Homoptera:Aphididae)**. Ph.D. Thesis, Texas A&M University, College Station, Texas, USA, 116p, 1992.

MAURICIO, R; RAUSHER, M.D. Experimental manipulation of putative selective agent provides evidence for the role of natural enemies in the evolution of plant defense. **Evolution**, v.51, n.5, p.1435–1444, 1997.

MEKSONGSEE, B; CHAWANAPONG, M. **Sorghum insect pests in South East Asia**. In: Proceedings of the International Sorghum Entomology Workshop, July 15–24, 1984, Texas A&M University, College Station, Texas, USA. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), Patancheru, Andhra Pradesh 502 324, India, pp. 57–64, 1985.

MOONAN, F; MOLINA, J; MIRKOV, T.E. Sugarcane Yellow leaf virus: An emerging virus that evolved by recombination between Lutroviral and Poleroviral ancestors. **Virology**. 269, p. 156-171, 2000.

MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

MCLEAN, D. L.; KINSEY, M. G. A technique for electronically recording aphid feeding and salivation. **Nature**, n. 202, p.1358–1359, 1964.

MSIRI Diseases. Yellow leaf. Annual Report of Mauritius Sugar Industry Research Institute 2007, p. 32, 2008.

NAULT, L. R. Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. **Annual Entomology Society American**, n.90,p. 1-21,1997.

NARAYANA, D. Screening for aphids and sooty molds in sorghum. **Sorghum Newsletter**, v. 18, p. 21–22, 1975.

NEUVONEN, S; HAUKIOJA, E. Low nutritive quality as defence against herbivores: induced responses in birch. **Oecologia**, v. 63, p. 71-74, 1984.

NIBOUCHE, S; FARTEK, B; MISSISSIPI, S; DELATTE, H; REYNAUD, B; COSTET, L. Low Genetic Diversity in *Melanaphis sacchari* Aphid Populations at the Worldwide Scale. **PLOS ONE**, v.9, n.8, p. 1-10, 2014.

ORLOB, G.B.; ARNY, D.C. Some changes accompanying infection by barley yellow dwarf virus. **Phytopathology**, Saint Paul, v.51, p. 768 -775, 1961.

ORTMAN, E. E.; PETERS, D. C. Introduction to breeding plants resistant to insects. In.: MAXWELL, F. G.; JENNINGS, P. R. (eds.). **Breeding plants resistant to insects**. John Wiley Inc., p.3-14, 1980.

PARMESSUR, Y; ALJANABI, S; SAUMTALLY, S. DOOKUN-SAUMTALLY* A. Sugarcane Yellow Leaf Virus and sugarcane yellows phytoplasma: eliminations by tissue culture. **Plant Pathology**. v.51, p.561-566, 2002.

PANJE, R.R.; BABU, C. Studies in *Saccharum spontaneum*. Distribution and geographical association of chromosome numbers. **Cytologia**, Tokyo, v.25, p.152-172, 1960.

PARAY, M.B.; KHOODOO, M.H.R.; SAUMTALLY, A.S; et al. Vector-virus relationship for *Melanaphis sacchari* (Zehnt.) (Hemiptera: Aphididae) transmitting Sugarcane yellow leaf luteovirus in Mauritius, *Sugar Technology*, v.13, p. 77-80, 2011.

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

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v.109, p.347–352, 1995.

PONSEN, M. B. Anatomy of an aphid vector: *Myzus persicae*. In: Harris, K. F; MARAMOSCH, K. (ed). **Aphids as virus vectors**. New York. Academic Press, 1977. p. 6-79.

POWELL, G; PIRONE, T; HARDIE, J. Aphid stylet activities during potyvirus acquisition from plants and an in vitro system that correlate with subsequent transmission. **European Journal of Plant Pathology** v.101, p. 411-420, 1995.

PRADO, E; TJALLINGII, W. F. Aphid activities during sieve element punctures. **Entomology Experimentalis et Applicata**, n.72,p. 157-165,1994.

PRICE, S. Cytogenetics of modern sugar canes. **Economic botany**, v.17, p.97-105, 1963.

RICAUD, C. Yellow wilt of sugarcane in eastern Africa. **ISSCT Sugarcane Pathologist.s Newsletter** v.1p.25-26, 1968.

RAMAN, K. V.; TINGEY, W. M.; Gregory, P. Potato glycoalkaloids: effect on survival and feeding behavior of the potato leaf hopper. **Journal of Economic Entomology**, n. 72 p. 337-341,1979.

ROCHOW, W.F. Biological properties of four isolates of Barley yellow dwarf virus. **Phytopathology**, v. 59, p. 1580-1589, 1969.

SALAS, F. J. S.; Lopes, J. R. S.; Fereres, A. Resistência de variedades comerciais de batata à transmissão do *Potato Y virus* pelo vetor *Myzus persicae*. **Arquivos Instituto Biológico**, n. 71, p. 166-173,2004.

SALAS, F. J. S.; LOPES, J. R. S.; FERERES, A. Resistência de Cultivares de Batata a *Myzus persicae* (Sulz.) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**,v.39, n. 8, 2010.

SANTOS, F. R. C. dos. **Identificação de marcadores moleculares associados a resistência de ferrugem marrom (*Puccinia melanocephala*) em cana-de-açúcar**. 2013.101 fls.Tese (Doutorado em Agricultura tropical e subtropical)- Instituto Agrônômico, Campinas-SP, 2013.

SEGATTO, F. B.; BISOGNIN, D. A.; BENEDETTI, M; COSTA, L. C. da; RAMPELOTTO, M. V.; NICOLOSO, F. T. Técnica para o estudo da anatomia da epiderme foliar de batata. **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1597-1601, 2004.

SERIKAWA, R H. **Electrical penetration graph investigations of Asian citrus psyllid (*Diaphorina Citri* Kuwayama) feeding behavior: effects of insecticides on the potential transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus***. PhD thesis, University of Florida, 2011.

SILVA, E. G.; BEDENDO, I. P.; CASAGRANDE, M. V. Ocorrência de fitoplasma associado à síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar em três regiões do Estado de São Paulo. **Tropical Plant Pathology**,v.33, n.6, p.453-456,2008.

SINGH, B. U.; PADMAJA, U; SEETHARAMA, N. Biology and management of the sugarcane aphid. *Melanaphis sacchari* (Zehntner) (Homoptera: Aphididae). in sorghum: a review. **Crop Protection**, v.23, p. 739-755, 2004. Dponível em: doi:10.1016/j.cropro.2004.01.004.

SCAGLIUSI, S. M.; LOCKHART, B. E. L. Transmission, characterization and serology of leterovirus associated with yellow leaf syndrome of sugarcane. **Phytophatology**, v.90, p. 120-124, 2000.

SCHENCK, S. Yellow leaf syndrome—a new sugarcane disease. Hawaii Sugar Planters' Association. **Annual Report of the Hawaiian Sugar Planters Association Experimental Station**. Aiea, HI, No. 38, 1990.

SCHENCK, S; LEHRER, A.T. Factors affecting the transmission and spread of sugarcane yellow leaf virus. **Plant Disease** n.84, p.1085-1088, 2000.

STOPAMOVIC, R. D. Function and chemistry of plant trichomes in insect resistance.- In: Hedin, P. A. (ed.), **Mechanisms of plant resistance to insects** (American Chemical Society Symposium Series 208). American Chemical Society, Washington, pp. 69-100, 1983.

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

TJALLINGII, W.F. Electronic recording of penetration behaviour by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.24, 721–730, 1978.

TJALLINGII, W.F. Electrical nature of recorded signals during stylet penetration by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 38, p. 177-186, 1985.

TJALLINGII, W.F. Eletrical recording of stylet penetration activities. **Aphis, their Biology, Natural Enemies and Control**. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. v.2, p. 95-108, 1988.

TJALLINGII, W.F.; MAYORAL, A. Criteria for host-plant selection by aphids. **8th symposium of Insect Plant relanshiop**. Kluwer Academic Plublications, Dordrecht, p.280-282, 1992.

TJALLINGII, W. F.; HOGEN E. T. Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. **Physiological Entomology**, v.18, p. 317-328, 1993.

TJALLINGII, W.F.; GARZO, E; FERERES, A. New structure in cell puncture activities by aphid stylets: a dual-mode EPG study. **Entomologia Experimentalis et Applicata** v. 135, p. 193-207,2010. doi:<10.1111/j.1570-7458.2010.00983.x>.

TUOMI, J; NIEMELÄ, P; HAUKIOJA, E; SIRÉN, S; NEUVONEN, S. Nutrient stress: an explanation for plant anti-herbivore responses to defoliation. **O Ecologia**, v. 61, p. 208-210, 1984.

URBANSKA, A; LESZCZYNSKI, B; TJALLINGII, W. F; MATOK, H. Probing behaviour and enzymatic defense of the grain aphid against cereal phenolics. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, v. 5, p.2, 2002.

VEGA, J; SCAGLIUSI, S. M. M.; ULIAN, E. C. Sugarcane yellow leaf disease in Brazil:Evidence of association with a luteovirus. **Plant Disease**, v. 81, p.21-26, 1997.

VAILLANT, J; PUGGIONI, G; WALLER, L. A.; DAGROIS, J. A spatio-temporal analysis of the spread of sugarcane yellow leaf virus. **Journal of Series Times Analysis**, v. 32, p. 396- 406, 2011.

VAN EMDEN, H. Host-plant resistance. In: H. van Emden, and R.Harrington (eds). **Aphids as Crop Pests**, CAB International, Wallingford, 2007, p. 447—468.

VAN RENSBURG, N. J.; VAN HAMBURG, H. Grain sorghum pests: an integrated control approach. **Proceeding of 1st Congress of Entomology Society South Africa**, p. 151-162, 1975.

VASCONCELOS, A. C.; GONÇALVES, M. C.; PINTO, L. R.; PERECIN, D; LANDELL, M. Effects of Sugarcane yellow leaf virus on sugarcane yield and root system development. **Functional Plant Science and Biotechnology**, v.3, p.31-35, 2009.

VRIJENHOEK, R. R.; PARKER, E. D. Jr. Geographical parthenogenesis: general purpose genotypes and frozen niche variation. In Sch n I, Martens K, van DijkP, ed. Lost sex. **The evolutionary biology of parthenogenesis**: Springer Netherlands, p. 99–131, 2009.

WALKER, G. P. A. Beginner's guide to electronic monitoring of Homopteran probing behavior. **Principles and Applications of Electronic Monitoring and Other Techniques in the Study of Homopteran Feeding Behavior** (ed. by GPWalker &

EA Backus), pp. Entomological Society of America, Lanham, M D, USA,p.14-40, 2000.

WAGNER, G. J.; WANG, E; SHEPHERD, R. W. New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. **Annals of Botany**, v.93 p.3-11, 2004.

WERKER, E. Trichome diversity and development. **Advances in Botanical Research**, v.31, p.1-35, 2000.

YAMADA, T. Resistência de plantas a pragas e doenças: pode ser afetada com o manejo da cultura? **Potafos, informações agronômicas**, n. 108, p.1-7, 2004.

ZHU, Y. J; LIM, S. T. S; SCKENCK, S; ARCINAS, S; KOMOR, E. RT-PCR and quantitative real-time RT-PCR detection of Sugarcane Yellow Leaf Virus (SCYLV) in symptomatic and asymptomatic plants of Hawaiian sugarcane cultivars and the correlation of SCYLV titre to yield. **European Journal of Plant Pathology**, v. 127, n.2, p. 262-273, 2010.