

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**PROSPECÇÃO DE MOLÉCULAS COM POTENCIAL
INSETICIDA DERIVADAS DE GENÓTIPOS DE
MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)**

Diandro Ricardo Barilli
Engenheiro Agrônomo

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**PROSPECÇÃO DE MOLÉCULAS COM POTENCIAL
INSETICIDA DERIVADAS DE GENÓTIPOS DE
MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)**

Discente: Diandro Ricardo Barilli

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi

Coorientador: Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Junior

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias -
UNESP, Câmpus de Jaboticabal,
como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Entomologia Agrícola).

2019

B252p

Barilli, Diandro Ricardo

Prospecção de moléculas com potencial inseticida derivadas de genótipos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) / Diandro Ricardo Barilli. -- Jaboticabal, 2019 84 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Guilherme Duarte Rossi

Coorientador: Arlindo Leal Boiça Junior

1. Cromatografia gasosa. 2. Cromatografia líquida. 3. Defesa química. 4. Fitormônios. 5. Metabolômica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo
autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: PROSPECÇÃO DE MOLÉCULAS COM POTENCIAL INSETICIDA DERIVADAS DE GENÓTIPOS DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)

AUTOR: DIANDRO RICARDO BARILLI

ORIENTADOR: GUILHERME DUARTE ROSSI

COORDENADOR: ARLINDO LEAL BOIÇA JUNIOR

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. GUILHERME DUARTE ROSSI

Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Pesquisador Dr. RUDINEY RINGENBERG

EMBRAPA / Londrina/PR



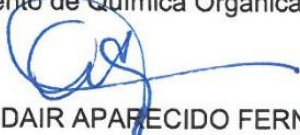
Prof. Dr. BRUNO HENRIQUE SARDINHA DE SOUZA

Departamento de Entomologia-UFLA / Lavras/SP



Profa. Dra. ANGELA REGINA ARAUJO

Departamento de Química Orgânica-IQ/UNESP / Araraquara/SP



Prof. Dr. ODAIR APARECIDO FERNANDES

Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 03 de maio de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

DIANDRO RICARDO BARILLI - nascido em 23 de outubro de 1990 na cidade de Toledo-PR, filho de Neli Barilli. Formado em 2012 no curso de Engenharia Agrônômica pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná, na cidade de Marechal Cândido Rondon-PR. Foi bolsista do Programa Especial de Treinamento (PET-Agronomia) nos anos de 2010 a 2012 e desenvolveu o projeto de conclusão de curso na linha de Biologia de Insetos sob orientação da Profa. Dra. Vanda Pietrowski. No ano de 2013, iniciou o curso de Mestrado em Fitossanidade, área de concentração Entomologia Agrícola, pelo Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade na Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Câmpus Capão do Leão-RS. Foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e desenvolveu o projeto de dissertação na linha de pesquisa de Biologia de Insetos e Resistência de Plantas a Insetos, sob orientação do Prof. Dr. Mauro Silveira Garcia, concluindo o projeto em Julho de 2015. Em Agosto de 2015, iniciou o Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", sob orientação do Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi com bolsa de estudos da CAPES. Desenvolveu o projeto de Tese na linha de pesquisa de Resistência de Plantas de Mandioca a Insetos e realizou intercâmbio no período de Agosto a Novembro de 2018 no "German Centre for Integrative Biodiversity Research (iDiv)", na cidade de Leipzig, Alemanha durante o qual parte das análises químicas de genótipos de mandioca descritas nesta Tese foram realizadas.

E-mail: diandro23@hotmail.com

“Retrovisor mostra meus olhos
com lembranças mal resolvidas
Mostra as ruas que escolhi... calçadas e avenidas
Deixa explícito que se vou pra frente
Coisas ficam para trás
A gente só nunca sabe... que coisas são essas”

Fernando Anitelli

*À minha mãe Neli Barilli e ao meu padrasto Jair
Demetrio, por todo amor, carinho e confiança
depositados em mim, à minha irmã Amanda, pelo
companheirismo e afeto e à minha família por todos
os momentos vividos, e pela grande união que os
tornam muito especiais.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, esse espírito superior que me ilumina e me auxilia nessa caminhada.

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, em especial ao Departamento de Fitossanidade e do **Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola)**, pela oportunidade de realizar o curso de doutorado.

Aos **docentes** do programa, pelo grande exemplo de profissionalismo e pelo conhecimento transmitido.

Ao **Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi**, pela orientação, ensinamentos, incentivos e conselhos dados durante todo o período de realização do doutorado e pelo grande exemplo de profissional que contribuiu para meu crescimento acadêmico científico e humano

Ao **Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Junior**, pela coorientação, ajuda e apoio na realização desse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)** - Código de Financiamento 001

Aos membros da banca examinadora, **Profa. Dra. Angela Regina Araujo, Prof. Dr. Bruno Henrique Sardinha de Souza, Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes e Dr. Rudiney Ringenberg** pelas valiosas contribuições.

Ao **Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes** e membros do Laboratório de Ecologia Aplicada (APECOLAB) dessa unidade, pela disponibilização das lagartas utilizadas nesse trabalho.

Aos membros do **Núcleo de Bioensaios Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE)** do Instituto de Química (UNESP - Araraquara), em especial à **Profa. Dra. Vanderlan da Silva Bolzani** e ao técnico de laboratório **João Luiz Bronzel Junior**, pela disponibilidade da estrutura necessária para realização das análises químicas e pelo suporte prestado.

À **Profa. Dra. Suely Vilela** e aos membros do **Laboratório de Toxinologia** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP/USP), pelo auxílio na realização das análises de atividade hemaglutinante.

Aos membros da **plataforma EcoMetEoR do "German Centre for Integrative Biodiversity Research (iDiv)"** Halle-Jena-Leipzig, em especial à **Dra. Nicole M. van Dam** e à **Dra. Henriette Uthe**, pela oportunidade de realizar diferentes análises químicas, por todo conhecimento repassado e por toda a ajuda e apoio prestados durante o período de intercâmbio.

À **Dra. Ilara Gabriela Frasson Budzinski** pela ajuda essencial nas análises dos dados.

À minha mãe **Neli Barilli**, que nunca mediu esforços para que fosse possível realizar meus sonhos, e pelo apoio em todas as minhas decisões.

Ao meu padrasto **Jair Demetrio**, pelo companheirismo e conselhos dados.

À minha irmã **Amanda Cristina Barilli Demetrio**, pelos momentos de distrações e brigas corriqueiras, e pelo forte companheirismo.

Aos meus **familiares**, agradeço pelos encontros, churrascos, os apoios e conselhos.

Aos companheiros do Laboratório de Bioquímica de Insetos da UNESP **Ana Letícia Zéro dos Santos, Cintia de Melo Gomes, Ciro Pedro Guidotti Pinto, Juliana Barroso Silva, Maria Laura Viola Augusto, Nicole de Paula Souza e Victor Igor Vieira** pela amizade, ajuda nos trabalhos e pela troca de experiências durante todo esse período.

Aos amigos do laboratório "Molecular Interaction Ecology" **Abigail Moreno-Pedraza, Alex Weinhold, Dimitra Papantoniou, Fredd Vergara, Henriette Uthe e Nurmi Pangesti** pela amizade, parceria e paciência em me ajudar durante toda a estadia em Leipzig.

A todos os **amigos e colegas** do programa, pela confiança depositada durante a representação discente, pela amizade, troca de conhecimento e pelos bons momentos de descontração.

Aos amigos **Calisto Nonato, Diego Felisbino Fraga, Jeruska Azevedo Moreira Brenha, Jordana de Araujo Flôres, Luan Alberto Odorizzi dos Santos, Mariane Rodrigues, Nicole de Paula Souza, Roberta Souto Santos,**

Suzana Targanski Sajovic, Tatiane Sanches Jeromini e Victor Igor Vieira que fiz durante minha estadia em Jaboticabal e que foram essenciais nesse período da minha vida.

Aos meus amigos de longa data, **Allan Marcelo de Oliveira, Ana Paula Gonçalves da Silva Wengrat, Bruno Roberto Cavalli, Day Moss, Lucas Guesser, Gian Vitorino, Lucas Rafael, Elisângela Neuhaus e Lidiane Colombari Fernandes** pois sempre estiveram ao meu lado, mesmo distantes.

Enfim, a todos que ajudaram direta ou indiretamente durante o período de doutorado, seja por contribuições ao trabalho, por conhecimentos repassados ou pelos momentos de descontração importantes para uma boa saúde mental, meus sinceros agradecimentos.

Muito Obrigado.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
CAPÍTULO 1 - Considerações gerais.....	1
1 Introdução.....	1
2 Revisão de Literatura.....	3
2.1 A cultura da mandioca.....	3
2.2 Insetos pragas da mandioca	6
2.3 Resistência de mandioca a pragas	7
2.4 Defesa química de plantas de mandioca a insetos	9
3 Referências.....	12
CAPÍTULO 2 - Composição química de genótipos de <i>Manihot esculenta</i> Crantz e suas possíveis influências sobre o desenvolvimento de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae).....	19
RESUMO	19
ABSTRACT.....	20
1 Introdução.....	21
2 Material e Métodos	22
2.1 Material vegetal	22
2.2 Avaliação do desenvolvimento de <i>Spodoptera frugiperda</i> em diferentes genótipos de mandioca	23
2.3 Preparo dos extratos de folhas de mandioca	25
2.4 Determinação de saponinas esteroidais	26
2.5 Determinação de fenóis totais.....	26
2.6 Análise por GC-MS	27
2.7 Análise estatística	28
3 Resultados.....	29
3.1 Índices nutricionais de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> alimentadas com folhas de genótipos de mandioca.....	29
3.2 Desenvolvimento de <i>Spodoptera frugiperda</i> em diferentes genótipos de mandioca.....	30

3.3 Determinação de saponinas e fenóis totais.....	33
3.4 Análise dos metabólitos por GC-MS	34
4 Discussão	38
5 Conclusões	42
6 Referências.....	42
 CAPÍTULO 3 - Alterações das concentrações de fitormônios e cianeto em genótipos de <i>Manihot esculenta</i> Crantz induzidas pela herbivoria de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae).....	
RESUMO	48
ABSTRACT.....	49
1 Introdução.....	50
2 Material e Métodos	51
2.1 Material vegetal	51
2.2 Exposição das plantas de mandioca a herbivoria por <i>Spodoptera frugiperda</i>	51
2.3 Quantificação de fitormônios.....	52
2.4 Quantificação de cianeto (CN)	53
2.5 Análise estatística	53
3 Resultados.....	54
4. Discussão	59
5 Conclusões	61
6 Referências.....	61
 CAPÍTULO 4 - Comparação da composição química de seis genótipos de <i>Manihot esculenta</i> Crantz com base em suas interações com insetos pragas.....	
RESUMO	64
ABSTRACT.....	65
1 Introdução.....	66
2 Material e Métodos	67
2.1 Material vegetal	67
2.2 Perfil metabólico.....	68
2.3 Atividade hemaglutinante	69

2.4 Análise estatística	71
3 Resultados.....	71
4 Discussão	74
5 Conclusão.....	77
6 Referências.....	77
CAPÍTULO 5 - Considerações finais	81

PROSPECÇÃO DE MOLÉCULAS COM POTENCIAL INSETICIDA DERIVADAS DE GENÓTIPOS DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)

RESUMO - As plantas apresentam diversos metabólitos secundários em seus mecanismos de defesa que podem ser produzidos de forma constitutiva ou induzida. Esses metabólitos apresentam propriedades antinutritivas, repelentes ou tóxicas a insetos herbívoros. Plantas de mandioca são conhecidas por sua rusticidade e produção de compostos de defesa contra herbívoros tais como os compostos cianogênicos. Mesmo assim, plantas de mandioca podem ser colonizadas e utilizadas por uma série de insetos específicos. Na busca de formas de reduzir o impacto negativo desses insetos sobre as plantas de mandioca, genótipos que resultam em interferências negativas sobre o desenvolvimento de insetos foram identificados. Porém, pouco se sabe a respeito da composição química das folhas de plantas de mandioca e, sobretudo, dos genótipos com maiores efeitos negativos no desenvolvimento dos insetos. Com isso, o presente trabalho foi realizado para conhecer diferenças químicas entre as folhas de mandioca de genótipos selecionados de forma a esclarecer como a composição química desses genótipos pode ser relacionada com as influências observadas no desenvolvimento de insetos pragas. Foi realizada avaliação do desenvolvimento do herbívoro-modelo *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentado com seis genótipos de mandioca (IAC-14, IAC-90, IAC-12, IAC-Caapora, Baianinha e MEcu 72). A análise da composição química desses genótipos foi realizada pela quantificação de fenóis totais e saponinas esteroidais. Análises por GC-MS foram realizadas para os genótipos IAC-Caapora, Baianinha e MEcu 72. Foi realizado estudo para avaliar se a infestação por *S. frugiperda* induz alterações na concentração dos fitormônios, ácido abscísico, ácido salicílico e ácido jasmônico, e de duas moléculas associadas à via do ácido jasmônico (ácido 12-oxofitodienoico - OPDA e jasmonil-isoleucina) bem como na concentração de cianeto (CN). Por fim, foram realizadas análises por LC-MS e quantificação da atividade hemaglutinante (AH) nos seis genótipos. O genótipo MEcu 72 resultou nos piores índices nutricionais e, juntamente com Baianinha, nos piores índices reprodutivos de *S. frugiperda*. As análises de GC-MS resultaram na detecção de 58 metabólitos e 21 desses metabólitos apresentaram diferença significativa entre os três genótipos avaliados. Os metabólitos *myo*-inositol-2-monofosfato, os ácidos *p*-cumárico, clorogênico e *p*-hidroxibenzoico, duas formas de ácido octadecadienoico e *n*-hexacosano foram detectados em maior abundância no genótipo MEcu 72 ou Baianinha em relação a IAC-Caapora. A quantificação de fitormônios indica que o genótipo MEcu 72 apresenta concentrações constitutivas de fitormônios maiores que os demais genótipos. Após herbivoria, mudanças na concentração dos fitormônios e de moléculas associadas às rotas de biossíntese dos fitormônios ocorreram, porém, sem um padrão específico, variando principalmente em função do genótipo testado. Após a herbivoria, nenhum dos genótipos avaliados alterou a concentração de CN, o que demonstra que as alterações nas concentrações de fitormônios induzidas por herbivoria não estão relacionadas com as rotas de biossíntese de CN. Por meio da análise do LC-MS, o genótipo MEcu 72,

considerado um padrão de resistência para os insetos sugadores, apresentou 10 metabólitos exclusivos e um metabólito com abundância de 2 a 5 vezes superior aos demais e maior atividade hemaglutinante. Os possíveis papéis dessas moléculas nas interferências negativas causadas sobre o desenvolvimento dos insetos pragas são discutidas.

Palavras-Chave: Cromatografia gasosa, cromatografia líquida, defesa química, fitormônios, metabolômica, produtos naturais, resistência induzida

PROSPECTION OF MOLECULES WITH INSECTICIDAL POTENTIAL DERIVED FROM CASSAVA GENOTYPES (*Manihot esculenta* CRATZ)

ABSTRACT - Plants have several secondary metabolites that may be associated with plant-herbivore interactions. Some of these metabolites are antinutrient, repellent or toxic to herbivores. Cassava plants are rustic and produce defense compounds against herbivores such as cyanogenic compounds. Nevertheless, cassava plants can be colonized and used by a number of specific herbivores. In search of ways to reduce the negative impact of these insects on cassava plants, genotypes that result in negative interferences on the development of insects were identified. However, there is a lack of information about the chemical composition of the cassava leaves, mainly, from genotypes with large negative effects on insect development. Thus, the present work was carried out to evaluate the chemical differences between cassava leaves of selected genotypes in order to clarify how the chemical composition of these genotypes can be related to the influences observed in the development of insect pests. The development of the model herbivore *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) was assessed by feeding larvae with leaves from six cassava genotypes (IAC-14, IAC-90, IAC-12, IAC-Caapora, Baianinha and MEcu 72). We performed the analysis of the chemical composition of these genotypes by quantification of total phenols and steroidal saponins. Analyzes by GC-MS were performed for the IAC-Caapora, Baianinha and MEcu 72 genotypes. A study was carried out to evaluate if *S. frugiperda* infestation induces changes in the concentration of the phytohormones, abscisic acid, salicylic acid and jasmonic acid, two molecules associated with the pathway of jasmonic acid (12-oxophitodienoic acid - OPDA and jasmonyl isoleucine) as well of cyanide (CN). Finally, analysis by LC-MS and quantification of hemagglutinating activity (AH) were performed in the six genotypes. The MEcu 72 genotype resulted in the worst nutritional indexes and, along with Baianinha, the worst reproductive indexes of *S. frugiperda*. The GC-MS analyzes resulted in the detection of 58 metabolites and 21 of these metabolites presented significant difference among the three evaluated genotypes. We detected myo-inositol-2-monophosphate, *p*-coumaric, chlorogenic and *p*-hydroxybenzoic acids, two forms of octadecadienoic acid and n-hexacosan in greater abundance in the MEcu 72 or Baianinha genotypes in relation to IAC-Caapora. MEcu 72 presents higher levels of constitutive phytohormones than the other genotypes. Herbivory caused changes in the levels of phytohormones and molecules associated with phytohormone pathways varying mainly according to the genotype tested, however, without a specific pattern. After herbivory, none of the evaluated genotypes altered the concentration of CN, which suggests that changes in herbivory-induced phytohormone concentrations are not related to CN biosynthesis pathway. By the LC-MS analyzes, the MEcu 72 genotype, a resistance standard for sap sucking insects, we found 10 exclusive metabolites and a metabolite with abundance 2 to 5 fold superior to the others and greater hemagglutinating activity. The possible roles of these molecules in the negative interferences caused on the development of insect pests are discussed.

Keywords: Chemical defense, gas chromatography, induced resistance, liquid chromatography, metabolomics, natural products, phytohormones

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1 Introdução

As plantas estão em constante processo evolutivo de defesa contra herbívoros, fitopatógenos e plantas competidoras para garantir sua sobrevivência e reprodução (Smith, 2005). A partir desses processos evolutivos, as plantas passaram a contar com rotas biossintéticas no metabolismo secundário que resultaram na formação de compostos químicos (metabólitos secundários) que podem atuar na proteção contra organismos danosos (Bourgaud et al., 2001).

Os metabólitos secundários são compostos orgânicos que não estão diretamente envolvidos no crescimento, desenvolvimento e reprodução das plantas, mas podem lhes conferir vantagens adaptativas (Macías et al., 2007). Como exemplo, os metabólitos secundários podem apresentar propriedades antibióticas, antifúngicas e antivirais de forma a proteger as plantas da ação de patógenos, propriedades anti-germinativas ou tóxicas a plantas competidoras ou propriedades antinutritivas ou tóxicas a herbívoros (Harborne, 1999; Ibanez et al., 2012).

Nos insetos herbívoros, os metabólitos secundários de plantas podem atuar na redução da palatabilidade, na repelência ou antibiose ou ainda como inseticida hormonal (Xu et al., 2009; Ibanez et al., 2012). Além desses, os metabólitos secundários com ação antinutritiva, denominados antinutrientes, diminuem a disponibilidade de nutrientes através da modificação e formação de complexos químicos com os nutrientes ou impedem a digestão, a absorção e a utilização dos nutrientes (Felton e Gatehouse, 1996).

Um grande potencial para extração de moléculas inseticidas é sugerido para plantas de mandioca (*Manihot* spp.). Diagnósticos prévios indicam a presença de moléculas com possível atividade inseticida em plantas de *Manihot* spp. como os ácidos gálico, clorogênico, ferúlico e cafeico e rutina (Calatayud et al., 1994; Calatayud, 2000; Santos et al., 2013; Pinto-Zevallos et al., 2016; Gazzola et al., 2018), bem como terpenoides como as saponinas e moléculas com atividade de inibição de proteases e lectinas (Wobeto et al., 2007; Silva et al., 2010).

Apesar da presença de moléculas com potencial inseticida nos tecidos de plantas de mandioca, a proteção dessas plantas pode ser superada por determinados herbívoros específicos em função de processos coevolutivos com as plantas. Além disso, variedades melhoradas em programas de melhoramento da mandioca podem ter sua resposta ao ataque de pragas reduzida visto que os genótipos são geralmente selecionados para o aumento da qualidade da raiz (Bellotti et al., 2012).

Dessa forma, uma variação quanto ao ataque de pragas dentre os genótipos de mandioca pode ser observada, sendo possível encontrar resistência de alguns genótipos a pragas (Calatayud e Le Ru, 2006; Carabalí et al., 2010; Bellotti et al., 2012; Boaventura, 2013; Rhenheimer, 2013; Oliveira et al., 2016; Barilli et al., 2019). Dentre esses, o genótipo MEcu 72 e espécies silvestres de mandioca apresentam resistência a determinadas pragas, mas são considerados agronomicamente inferiores e necessitam passar por melhoramento genético para associar resistência a pragas com produtividade e qualidade de raízes (Bellotti et al., 2005; Nassar et al., 2008; Carabalí et al., 2010).

O conhecimento a respeito dos compostos das plantas de mandioca com ação inseticida presentes em genótipos resistentes a pragas pode auxiliar no processo de melhoramento, visto que possibilita monitorar as características das progênes resultantes dos cruzamentos por meio de ensaios de detecção/quantificação dos compostos de interesse. Tal monitoramento reduziria a onerosa realização de avaliações *in vivo* dos efeitos das progênes obtidas sobre o desenvolvimento de insetos pragas da cultura (Maluf et al., 2010).

O conhecimento a respeito dos compostos químicos presentes em genótipos com resistência a insetos também pode direcionar o desenvolvimento de novas moléculas com atividade inseticida da mesma forma que a nicotina e a piretrina derivadas de plantas serviram como modelo para o desenvolvimento dos neonicotinoides e piretroides, respectivamente (Casida, 1980; Yamamoto, 1999).

O presente trabalho foi realizado para conhecer diferenças químicas entre as folhas de mandioca de genótipos selecionados de forma a esclarecer como a composição química desses genótipos pode ser relacionada com as influências observadas no desenvolvimento de insetos pragas.

2 Revisão de Literatura

2.1 A cultura da mandioca

A mandioca, *Manihot esculenta* Crantz, também conhecida no Brasil como aipim e macaxeira é agrupada na família Euphorbiaceae e o gênero *Manihot* agrupa aproximadamente 95 espécies (Nassar et al., 2008). O centro de origem provável de *M. esculenta* é nos trópicos do continente Americano e o centro de domesticação no Sudoeste da Amazônia, tendo *M. esculenta* subsp. *flabellifolia* como espécie ancestral (Crepaldi, 1992; Carvalho, 2005).

Manihot esculenta é uma planta perene, arbustiva com copa pouco ramificada e raiz tuberosa (Dallaqua e Coral, 2002). Por ser uma planta de ciclo longo e ter um sistema radicular bem desenvolvido, a mandioca apresenta grande rusticidade, com elevada capacidade de se adaptar às condições adversas de solo e de clima e uma boa capacidade de regeneração. Além disso, a mandioca apresenta ampla diversidade genética, o que resulta na disponibilidade de materiais com grande resistência a doenças e tolerância a pragas (Ceballos et al., 2004; EMBRAPA, 2005; Nassar et al., 2008).

A temperatura ideal para o seu cultivo é em torno de 20 a 27°C, com 12 horas de fotofase diária. É uma planta muito tolerante em termos de disponibilidade de água, desenvolvendo-se em regiões com precipitações que variam entre 500 a 4000 mm/ano (Souza, 2003). É uma cultura que suporta vários meses de seca por meio de regulações fisiológicas como o fechamento estomático, que reduz sua superfície de evaporação e melhora a eficiência na utilização da água e regulações bioquímicas como o aumento da concentração de sacarose, aminoácidos livres e de ácidos orgânicos que mantêm a pressão osmótica da célula durante períodos de déficit hídrico (Polania et al., 1999; Calatayud e Le Ru, 2006).

Suas raízes são a principal fonte de alimento para milhões de pessoas no mundo, principalmente em países em desenvolvimento (FAO, 2013). No Brasil, é cultivada em todas as regiões e desempenha importante papel na alimentação humana e animal e como matéria prima para diversos produtos industriais como a

farinha de mesa e a fécula ou amido, gerando cerca de um milhão de empregos diretos (Souza e Fialho, 2003; Takahashi e Gonçalo, 2005; Howeler, 2014).

Apesar da produção de mandioca ocorrer em todo o território brasileiro, há diferenças na forma e uso da produção em função da região (Groxko, 2018). Nas regiões Norte e Nordeste, que são as maiores produtoras nacionais desta raiz, o plantio é realizado principalmente por pequenos agricultores, na grande maioria de forma menos tecnificada, e a produção é destinada principalmente para o consumo humano (Coêlho, 2018). Na região Centro-Sul, destaca-se a produção agrícola industrial com cultivos tecnificados de alto investimento em insumos e realizada em grandes áreas. Grande parte da produção é destinada às modernas indústrias de fécula, componente utilizado para a fabricação dos mais diversos produtos (Coêlho, 2018; Groxko, 2018).

Na região Centro-Sul do país, a mandioca é, em geral, cultivada em dois ciclos vegetativos, sendo o plantio realizado nos meses de Maio a Outubro e a colheita realizada entre 18 a 24 meses após o plantio (Valle et al., 2014). Ao final do primeiro ciclo (10 a 12 meses), devido ao frio intenso ou à seca, a planta passa por um período de repouso fisiológico, no qual ocorre paralisação do crescimento vegetativo e redução da atividade metabólica, levando à desfolha natural da planta (Conceição, 1983). Neste período, é realizada a poda das ramas, isto é, o caule da planta, deixando um segmento de aproximadamente 10 cm de rama a partir do solo. A poda das ramas é recomendada para a produção em regiões sujeitas a geadas e é feita para obtenção de material vegetativo, redução da infestação por pragas e doenças ou utilização das ramas na alimentação animal (Fukuda e Otsubo, 2003). Atenção para o procedimento da poda deve ser tomada em algumas regiões em função do aumento da infestação de algumas pragas nas brotações de segundo ciclo, como é o caso da cochonilha *Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero, 1977 (Hemiptera: Pseudococcidae) (Pietrowski et al., 2010).

A propagação comercial da cultura é feita pelo método vegetativo, através da utilização de segmentos do caule denominados manivas (Howeler, 2014). A propagação vegetativa facilita o plantio da cultura e ocorre uma intensa troca e comércio de material vegetativo entre agricultores, regiões e países (Ceballos et al., 2004; Mattos et al., 2006). Essa troca vem sendo realizada sem os devidos cuidados

fitossanitários, favorecendo a dispersão de insetos pragas e patógenos e, conseqüentemente, introduzindo-os em áreas onde esses não ocorriam (Oliveira et al., 2001; Bellotti et al., 2012).

As variedades de mandioca são divididas nos grupos mesa ou doce e amargas ou bravas. As mandiocas de mesa são geralmente utilizadas para alimentação humana após simples cozimento e as bravas são geralmente utilizadas na indústria (Fukuda e Otsubo, 2003). A classificação nesses grupos é dada pelo teor de ácido cianídrico (HCN) presente nas raízes dessas plantas, as plantas classificadas como mandioca de mesa são aquelas que apresentem menos de 100 mg de HCN por quilograma de raízes, e as bravas as que apresentem mais do que esse valor (Sediyima et al., 2007).

Em função da propagação vegetativa, um campo de uma variedade de mandioca é formado por clones, ou seja, um conjunto de indivíduos geneticamente idênticos (Santilli, 2012). Porém, muitas áreas de mandioca são formadas por um conjunto de indivíduos próximos, isto é, clones aparentados que apresentam variabilidade genética entre si. Isto ocorre, em função dos agricultores desconsiderarem pequenas variações morfológicas nas variedades (Peroni, 2007). Devido a essa variabilidade genética entre as variedades utilizadas pelos agricultores e a intensa troca de material de propagação, uma seleção empírica é realizada ao longo dos anos pelos agricultores (IAPAR, 2014). A variedade Baianinha é um caso do produto da seleção realizada por agricultores na região Oeste do Paraná (IAPAR, 2014).

As variedades comerciais são obtidas por meio de programas de melhoramento genético realizados por órgãos públicos de pesquisa como o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), o Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) e a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI). Muitos desses programas de melhoramento são direcionados para aliar características de rusticidade a fatores bióticos e abióticos disponíveis em variedades silvestres com características de produção e qualidade de produto disponíveis em variedades superiores (Bellotti et al., 2005; 2012; Carabalí et al., 2010a; 2010b).

2.2 Insetos pragas da mandioca

A mandioca pode ser afetada por aproximadamente 200 espécies de artrópodes (Bellotti et al., 1999), muitas das quais específicas e adaptadas aos fatores naturais de resistência da planta, como os compostos cianogênicos e laticíferos (Bellotti et al., 2012). Esses artrópodes, de modo geral, causam danos às hastes, folhas e raízes que resultam na redução da área foliar, da taxa fotossintética e do rendimento da cultura, bem como ao material vegetativo utilizado para o plantio, o que reduz as brotações de um próximo ciclo (Farias e Bellotti, 2006).

A mandioca apresentava poucos insetos pragas associados a danos econômicos à cultura no Brasil, sendo relatada principalmente a ocorrência do mandarová, *Erinnyis ello* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Sphingidae) (Pietrowski et al., 2010). Porém, com mudanças na forma de cultivo e pela utilização de inseticidas de amplo espectro de ação, ocorreu aumento da população de outros insetos como a cochonilha da parte aérea, *Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero, 1977 (Hemiptera: Pseudococcidae), moscas brancas, *Bemisia tuberculata* Bondar, 1923 e *Aleurothrixus aepim* (Goeldi, 1886) (Hemiptera: Aleyrodidae), e os percevejos de renda, *Vatiga manihotae* (Drake, 1922) e *V. illudens* (Drake, 1922) (Hemiptera: Tingidae) (Pietrowski et al., 2010; Bellotti et al., 2012).

Para o mandarová *E. ello*, o manejo é facilitado quando há o correto monitoramento da praga e adoção das medidas de controle recomendadas, como a aplicação de controle biológico (*Baculovirus erinnyis* (ErelGV), *Bacillus thuringiensis* Berliner, *Trichogramma* spp.) e/ou o controle químico (Pietrowski et al., 2010). Para os demais insetos pragas, ainda há certa dificuldade no manejo, pois, com exceção de *B. tabaci* para a qual existem dois produtos registrados à base de cetoenol e neonicotinoide e tripes e mosca do broto que há o registro de um produto à base de espinosinas, não há produtos químicos registrados no Brasil para utilização na cultura (AGROFIT, 2019). Além disso, há uma carência quanto a informações de monitoramento e níveis de danos (Pietrowski et al., 2010).

Na Colômbia, a utilização de variedades comerciais resistentes à mosca branca tem surtido bons resultados, mantendo baixos os níveis populacionais dessa praga (Bellotti et al., 2005; 2012). No Brasil, alguns trabalhos foram realizados na

busca de genótipos resistentes às principais pragas sugadoras, mas muitos desses genótipos são considerados agronomicamente inferiores e necessitam passar por melhoramento genético para associar resistência a pragas com produtividade e qualidade de raízes (Rheinheimer, 2013; Oliveira et al., 2016; Barilli et al., 2019).

2.3 Resistência de mandioca a pragas

Os mecanismos que atuam na resistência da mandioca são de caráter poligênico e do tipo horizontal (Bellotti e Kawano, 1980; Carabalí, 2009). Esse tipo de resistência é, por um lado, vantajoso pois resulta na resistência a um amplo espectro de biótipos de insetos, mas, por outro lado, é de difícil transferência de um genótipo para outro (Vendramin e Nishikawa, 2001).

Estudos têm demonstrado a presença de resistência do tipo antixenose e antibiose a insetos pragas em mandioca (Carabalí, 2009; Bellotti et al., 2012; Rheinheimer, 2013; Oliveira et al., 2016; Barilli et al., 2019). Tradicionalmente, os mecanismos de resistência propostos por R. H. Painter em 1951, são classificados em antibiose, antixenose e tolerância da planta (Smith, 2005). No tipo antibiose, a manifestação da resistência se dá por meio de efeitos negativos em parâmetros biológicos do inseto, aumentando a duração e mortalidade das fases jovens, diminuindo tamanho, peso e oviposição de adultos, assim como, podendo gerar adultos deformados. Na resistência por antixenose ou não preferência, a planta apresenta algum fator morfológico ou químico que afeta o comportamento do inseto, levando-o a procurar um hospedeiro alternativo. Essa característica é notada pela não preferência de oviposição ou de alimentação para determinada planta. Muitas vezes, a resistência por antibiose e antixenose ocorrem simultaneamente na mesma planta e são difíceis de serem mensuradas isoladamente (Lara, 1991).

Dentre os genótipos de *M. esculenta*, observam-se fontes de resistência nos germoplasmas do Equador (MEcu 72 e MEcu 64) e do Peru (MPer 334, MPer 335, MPer 415, MPer 273) (Bellotti et al., 2012). O genótipo MEcu 72 se destaca quanto ao número de trabalhos realizados que indicam maiores níveis de resistência a pragas sugadoras (Tabela 1).

Tabela 1. Interferência do genótipo MEcu 72 sobre parâmetros biológicos e/ou na preferência de insetos pragas sugadores da mandioca.

Espécie	Interferência	Referência
Mosca branca		
<i>B. tuberculata</i>	• 65% mortalidade de ninfas • Deformação de ninfas • Adultos menores • 50% redução de fecundidade	Barilli et al., 2019
<i>A. socialis</i>	• 70% mortalidade de ninfas • Deformação de ninfas • Pupas menores • Redução de fecundidade	Bellotti e Arias, 2001 Carabalí et al., 2010a
<i>A. aepim</i>	• 60% mortalidade de ninfas • Redução de fecundidade	Lima et al., 2018
Cochonilha		
<i>P. manihoti</i>	• Redução de fecundidade	Rheinheimer, 2013;
Percevejo de renda		
<i>V. illudens</i>	• Menor preferência para oviposição	Oliveira et al., 2016
<i>V. manihotae</i>	• Maior mortalidade • Redução de longevidade e fecundidade dos adultos	Wengrat et al, dados não publicados

O genótipo MEcu 72 apresenta tricomas que parecem exercer efeito negativos sobre o desenvolvimento de mosca branca, visto que ninfas de primeiro ínstar apresentam dificuldade de se fixarem na superfície de folhas, desidratam rapidamente e caem da superfície foliar (Bellotti e Arias, 2001; Barilli et al., 2019).

Comparativamente, o número de tricomas em MEcu 72 (33.048 tricomas por cm²) é muito superior em relação ao número observado em um genótipo suscetível CMC-40 (189 tricomas por cm²) (Bellotti et al., 2005). Porém, nem todos genótipos com alto número de tricomas são resistentes a mosca branca (Lima et al., 2018), o que sugere que, além dos tricomas, outros fatores de resistência devem estar presentes em MEcu 72.

2.4 Defesa química de plantas de mandioca a insetos

As plantas produzem uma grande quantidade de compostos químicos que não são diretamente associados a suas funções básicas de crescimento e desenvolvimento, mas podem lhes conferir vantagens adaptativas. Esses compostos são conhecidos como metabólitos secundários (Mácias et al., 2007). Estima-se que existem cerca de 200.000 compostos secundários de plantas descritos e que é feita uma adição anual de aproximadamente 1.000 compostos a essa lista (Hartmann, 1999; Liu et al., 2017). Os metabólitos secundários podem apresentar propriedades antibióticas, antifúngicas e antivirais para proteger as plantas da ação de patógenos, propriedades antigerminativas ou tóxicas a plantas competidoras ou propriedades antinutritivas ou tóxicas a herbívoros (Harborne, 1999; Ibanez et al., 2012).

As plantas de mandioca produzem diversos compostos secundários envolvidos na defesa da planta a insetos. Dentre esses, os glicosídeos cianogênicos são os mais estudados, provavelmente pela sua conhecida toxicidade a artrópodes e outros animais (Pinto-Zevallos et al., 2016). Nas folhas e raízes de mandioca estão presentes os glicosídeos cianogênicos linamarina (90-95%), derivada de L-valina, e lotaustralina (5-10%), derivada de L-isoleucina (Siritunga e Sayre, 2004). Apesar de estarem presentes em todos os tecidos, esses compostos são produzidos principalmente nas folhas e são translocados para as raízes, onde também podem ser produzidas em menor quantidade (McMahon et al., 1995). Nas plantas de mandioca, também é produzida a enzima linamarase, sintetizada nos laticíferos e concentrada no látex (Pancoro e Hughes, 1992; Santana et al., 2002). Quando ocorre a ruptura das células onde estão presentes a linamarina e a lotaustralina por algum dano mecânico ou por insetos, esses compostos são liberados do vacúolo e

entram em contato com a linamarase, resultando na formação de uma cianidrina instável (Pinto-Zevallos et al., 2016). Esse composto pode ser quebrado enzimaticamente pela α -hidroxinitrila liase (HNL), ou espontaneamente em pH maior que 4,0 e temperatura maior que 30°C, resultando na formação de cianeto de hidrogênio (HCN) e acetona (McMahon et al., 1995) (Figura 1).

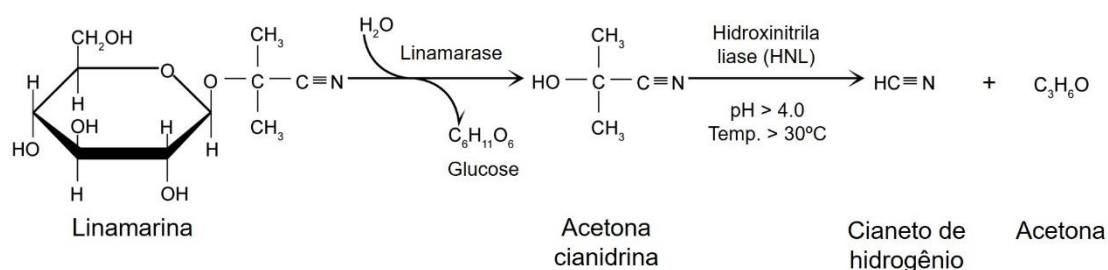


Figura 1. Cianogênese a partir da linamarina. Adaptado de Nzwalo e Cliff (2011).

Esses compostos cianogênicos (CN) parecem estar envolvidos na resistência de plantas a herbívoros generalistas (Ballhorn et al., 2010). Em mandioca, trabalhos demonstraram que os CN são prejudiciais para o desenvolvimento dos insetos generalistas *Zonocerus variegatus* L. (Orthoptera: Pyrgomorphidae) e *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae), principalmente para as fases jovens (Bernays et al., 1977; Bellotti e Riis, 1994). Já para artrópodes especialistas como *E. ello*, *P. manihoti* e *Mononychellus tanajoa* (Bondar) (Acari: Tetranychidae) não foram encontradas relação entre maiores níveis de CN em planta de mandioca e diferenças na incidência de ataque ou desenvolvimento dos insetos, servindo inclusive como fator fagoestimulante para alguns insetos (Calatayud, 2000; Wilson, 2003; Rheinheimer, 2013; Boaventura et al., 2015).

Nas plantas de mandioca, também são encontrados importantes compostos fenólicos como: ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, rutina e kaempferol-3-O-rutinosídeo (Calatayud et al., 1994; Santos et al. 2013; Pinto-Zevallos et al., 2016; Gazola et al., 2018). Muitos desses compostos podem ter efeito deterrente, repelente, tóxico e até mesmo atrativo para insetos (Simmonds, 2001). Em estudos sobre parâmetros biológicos de *P. manihoti*, foi observado que a adição de rutina em dieta causa redução de ganho de peso e aumento do período de desenvolvimento das ninfas (Calatayud, 2000).

Além disso, sabe-se que o ataque de *P. manihoti* pode induzir o aumento na produção de rutina nas plantas de mandioca, dependendo do genótipo estudado (Calatayud et al., 1994; Gazzola et al., 2018). Entretanto, compostos relacionados à defesa da planta a insetos como ácido cafeico, ferúlico e *p*-cumárico não apresentaram aumento significativo após o ataque de *P. manihoti* (Gazzola et al., 2018).

Outro importante grupo de compostos quando se trata de defesa de plantas a insetos herbívoros são os terpenoides (Gonzalez-Coloma et al., 2010). Os terpenoides são principalmente hidrocarbonetos insaturados cíclicos de caráter hidrofóbico e podem ser classificados em monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos (Harbone, 1999). Em mandioca, foram detectados diferentes níveis de saponinas esteroidais (Wobeto et al., 2007), moléculas que podem apresentar propriedades antinutritivas provavelmente por interferirem na absorção de colesterol pelos insetos ou propriedades antibióticas por causarem lise celular (Diab et al., 2012; de Geyter et al., 2012). Até o momento, não são conhecidos estudos que avaliem a toxicidade das saponinas presentes em mandioca a insetos.

As proteínas tóxicas como as lectinas e inibidores de proteases são outras moléculas presentes em mandioca que apresentam função de defesa contra insetos herbívoros (Wobeto et al., 2007; Silva et al., 2010; Dang e Van Damme, 2015). As lectinas são proteínas ligantes em carboidratos específicos e podem apresentar toxicidade não somente pela ligação com o epitélio do intestino do inseto, mas também por penetrarem na hemocela do inseto, alcançarem diversos tecidos e resultarem em um efeito sistêmico negativo (Peumans e Van Damme, 1995; Manning et al., 2017).

Os inibidores de proteases vegetais são proteínas que, quando ingeridos por insetos fitófagos, inibem proteinases associadas com a digestão de proteínas, resultando em retardos no desenvolvimento, redução de fertilidade dos adultos e aumento na mortalidade (Macedo et al., 2015). Assim como para saponinas, essas proteínas presentes em mandioca não foram testadas quanto a toxicidade a insetos (Wobeto et al., 2007; Silva et al., 2010).

Além da composição e concentração constitutiva de compostos de defesa presentes em plantas, a herbivoria em plantas de mandioca pode resultar no

aumento de concentração de determinados compostos de defesa (Gazzola et al., 2018). Esse processo é mediado por hormônios produzidos pela planta após estímulos realizados por meio da alimentação de insetos ou outros ferimentos (Bari e Jones, 2009). São exemplos de fitormônios relacionados a estresses o ácido jasmônico (AJ), ácido salicílico (AS), ácido abscísico (ABA) e o etileno (ET) (Erb e Glaucer, 2010).

Os compostos da via do AJ estão relacionados na sinalização de rotas metabólicas contra insetos mastigadores e outros ferimentos mecânicos causados à planta, enquanto que o AS é principalmente associado à resposta a insetos sugadores (Zarate et al., 2007; Pieterse et al., 2012). Já o ABA e o ET desempenham papéis de modulação, sendo que o ABA está associado com a regulação da via do AJ quando ocorre algum ferimento na planta ou ataque de insetos e o ET quando ocorre algum ataque por patógenos necrotróficos (Anderson et al., 2004; Lorenzo e Solano, 2005; Pieterse et al., 2012). Apesar de importantes compostos na interação inseto-planta, não foram encontrados trabalhos com mensuração desses fitormônios em plantas de mandioca.

3 Referências

AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (2019) **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 5 de maio 2019.

Anderson JP, Badruzaufari E, Schenk PM, Manners JM, Desmond OJ, Ehlert C, Maclean DJ, Ebert PR, Kazan K (2004) Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. **The Plant Cell** 16:3460-3479.

Ballhorn DJ, Heil M, Lieberei R (2006) Phenotypic plasticity of cyanogenesis in lima bean *Phaseolus lunatus* - activity and activation of β -glucosidase. **Journal of Chemical Ecology** 32(2):261-275.

Bari R, Jones JDG (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. **Plant Molecular Biology** 69(4):473-488.

Barilli DR, Wengrat APGS, Guimarães ATB, Pietrowski V, Ringenberg R, Garcia MS (2019) Resistance of cassava genotypes to *Bemisia tuberculata*. **Arthropod-Plant Interactions** 1-7.

Bellotti AC, Kawano K (1980) Breeding approaches in cassava. In: Maxwell FG, Jennings PR (Eds) **Breeding plants resistant to insects**. New York: John Wiley and Sons, p. 315-335.

Bellotti AC, Riis L (1994) Cassava cyanogenic potential and resistance to pests and diseases. **Acta Horticulturae** 375:141-151.

Bellotti AC, Arias B (2001) Host plant resistance to whiteflies with emphasis on cassava as a case study. **Crop Protection** 20:813-823.

Bellotti AC, Tohme J, Dunbier M, Timmerman G (2005) Sustainable integrated management of whiteflies through host plant resistance. In: Anderson PK, Morales FJ (Eds) **Whitefly and whitefly-borne virus in the tropics: building a knowledge base for global action**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 351 p.

Bellotti AC, Campo BVH, Hyman G (2012) Cassava production and pest management: present and potential threats in a changing environment. **Tropical Plant Biology** 5(1):539-72.

Bellotti AC, Smith L, Lapointe SL (1999) Recent advances in cassava pest management. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** 44:343-370.

Bernays EA, Chapman RF, Leather EM, McCaffery AR, Modder WWD (1977). The relationship of *Zonocerus variegatus* (L.) (Acridoidea: Pyrgomorphidae) with cassava (*Manihot esculenta*). **Bulletin of Entomological Research** 67:391-404.

Boaventura VJ, Ringenberg R, Ledo CAS (2015) Genetic dissimilarity for resistance to *Mononychellus tanajoa* (Bondar) (Acari, Tetranychidae) among domesticated and wild *Manihot* species. **Acta Scientiarum Agronomy** 37(4):441-446.

Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science** 161:839-851.

Calatayud PA (2000) Influence of linamarin and rutin on biological performances of *Phenacoccus herreni* in artificial diets. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 96(1):81-86.

Calatayud PA e Le Ru B (2006) **Cassava-Mealybug Interactions**. Paris: Editora Institut de Recherche Pour le Développement (IRD), 112p.

Calatayud PA, Rahbé Y, Delobel B, Khuong-Huu F, Tertuliano M, Le Ru B (1994) Influence of secondary compounds in the phloem sap of cassava on expression of antibiosis towards the mealybug *Phenacoccus manihoti*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 72:47-57.

Carabalí A (2009) *Manihot esculenta* subsp. *flabellifolia* Pohl fuente silvestre de resistencia a la mosca blanca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Hemiptera:Aleyrodidae) 104 f. Tese (Doutorado em Ciências - Biologia) - Universidad del Valle.

Carabalí A, Bellotti AC, Montoya-Lerma J, Fregene M (2010a) *Manihot flabellifolia* Pohl, wild source of resistance to the whitefly *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Hemiptera: Aleyrodidae). **Crop Protection** 29:34-38.

Carabalí A, Bellotti AC, Montoya-Lerma J, Fregene M (2010b) Resistance to the whitefly, *Aleurotrachelus socialis*, in wild populations of cassava, *Manihot tristis*. **Journal of Insect Science** 10(170):1-10.

Carvalho LJCB (2005) Biodiversidade e biotecnologia em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, **Resumos...** Campo Grande: Embrapa Agropecuária Oeste, Não paginado.

Casida JE (1980) Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. **Environmental Health Perspectives** 34:189-202.

Ceballos H, Iglesias CA, Pérez JC, Dixon AGO (2004) Cassava breeding: opportunities and challenges. **Plant Molecular Biology** 56:503-516.

Coêlho JD (2018) **Produção de mandioca - raiz, farinha e fécula**. Fortaleza: Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste - ETENE, 11 p.

Conceição AJ (1983) **A mandioca**. São Paulo: Nobel, 382p.

Crepaldi IC (1992) Origem, evolução e geografia da mandioca: uma revisão. **Sitientibus** 10:89-94.

Dallaqua MA, Coral DJ (2002) Morfo-anatomia. In Cereda M et al. (Eds.). **Agricultura: Tuberosas amiláceas latino americanas**. São Paulo: Fundação Cargill p.540.

De Geyter E, Swevers L, Soin T, Geelen D, Smagghe G (2012) Saponins do not affect the ecdysteroid receptor complex but cause membrane permeation in insect culture cell lines. **Journal of Insect Physiology** 58(1):18-23.

Diab Y, Ioannou E, Emam A, Vagias C, Roussis V (2012) Desmettianosides A and B, bisdesmosidic furostanol saponins with molluscicidal activity from *Yucca desmettiana*. **Steroids** 77(6):686-690.

Dang L, Van Damme EJM (2015) Toxic proteins in plants. **Phytochemistry** 117:51-64.

EMBRAPA (2005) **Mandioca, o pão do Brasil, Manioc, le pain du Brésil**. Brasília: Embrapa 279p.

Erb M, Glauser G (2010) Family business: multiple members of major phytohormone classes orchestrate plant stress responses. **Chemistry-A European Journal** 16:10280-10289.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2013) **Save and Grow Cassava**. Rome: FAO, 129p.

Farias ARN, Bellotti AC (2006) Pragas e seu controle. In: Souza LS, Farias ARN, Mattos PLP, Fukuda WMG (Eds) **Aspectos socioeconômicos e agronômicos da mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, p.433-454.

Felton GW, Gatehouse JA (1996) Antinutritive plant defence mechanisms. In: Lehane M, Billingsley P (Eds.) **Biology of the Insect Midgut**. Dordrecht: Springer, p. 373-416.

Fukuda C, Otsubo AA (2003) Cultivares. In: EMBRAPA (eds.) **Cultivo da mandioca na região centro-sul do Brasil**. Cruz das Almas: Embrapa: CNPMF (Embrapa-CNPMF. Sistemas de produção, 8).

Gazola D, Zucareli C, Ringenberg R, Oliveira MCN, Graça JP, Nunes EO, Hoffmann-Campo CB (2018) Secondary metabolite contents in different parts of cassava plants infested by *Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero (Hemiptera: Pseudococcidae). **Arthropod-Plant Interactions** 1:1-8.

Gonzalez-Coloma A, Reina M, Diaz CE, Fraga BM (2010) Natural product-based biopesticides for insect control. In: Liu H, Mander L (Eds) **Comprehensive natural products II**. Elsevier, Oxford pp 237-268

Groxko M (2018) **Prognóstico Mandioca 2018**. Curitiba: SEAB - Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento, 19 p.

Harborne JB (1999) Classes and functions of secondary products from plants. In: Walton NJ, Brown DE (Eds) **Chemicals from plants**. London: Imperial College Press and World Scientific Publishing, p.1-25.

Hartmann T (1999) Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. **Planta** 207:483-495.

Howeler R (2014) **Sustainable soil and crop management of cassava in Asia**. Tóquio: CIAT, 280p.

IAPAR, Instituto Agronômico do Paraná (2014) **Iapar registra cultivares de mandioca**. Disponível em <<http://www.iapar.br/modules/noticias/article.php?storyid=1569>>. Acesso em 25 jan 2019.

Ibanez S, Gallet C, Despres L (2012) Plant insecticidal toxins in ecological networks. **Toxins** 4:228-243.

Lara FM (1991) **Princípios de resistência de plantas a insetos**. São Paulo: Ícone, 336p.

Lima WH, Ringenberg R, Fancelli M, Ledo CAS (2018) Resistance of *Manihot esculenta* and its intraspecific hybrids to the whitefly *Aleurothrixus aepim* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 53(8):885-891.

Liu X, Klinkhamer PGL, Vrieling K (2017) The effect of structurally related metabolites on insect herbivores: a case study on pyrrolizidine alkaloids and western flower thrips. **Phytochemistry** 138:93-103.

Lorenzo O, Solano R (2005) Molecular players regulating the jasmonate signalling network. **Current Opinion in Plant Biology** 8:532-540.

Macedo MLR, Oliveira CFR, Oliveira CT (2015) Insecticidal activity of plant lectins and potential application in crop protection. **Molecules** 20(2):2014-2033.

Macías FA, Galindo JLG, Galindo JCG (2007) Evolution and current status of ecological phytochemistry. **Phytochemistry** 68:2917-2936.

Manning JC, Romero A, Habermann FA, Caballero GG, Kaltner H, Gabius H (2017) Lectins: a primer for histochemists and cell biologists. **Histochemistry and Cell Biology** 147(2):199-222.

Maluf WR, Maciel GM, Gomes LAA, Cardoso MG, Gonçalves LD, Silva EC, Knapp M (2010) Broad-spectrum arthropod resistance in hybrids between high- and low-acylsugar tomato lines. **Crop Science** 50:439-450

Mattos PLP, Souza AS, Ferreira Filho JR (2006) Propagação In: Souza LS, Farias ARN, Mattos PLP, Fukuda WMG (Eds) **Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, p.433-454.

McMahon JM, White WLB, Sayre RT (1995) Cyanogenesis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal of Experimental Botany** 46(288):731-741.

Nassar NMA, Hashimoto DY, Fernandes SDC (2008) Wild *Manihot* species: botanical aspects, geographic distribution and economic value. **Genetics and Molecular Research** 7(1):16-28.

Nzwalo H, Cliff J (2011) Kongo: From poverty, cassava, and cyanogen intake to toxico-nutritional neurological disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 5(6):e1051.

Oliveira MRV, Moretzshon MC, Queiroz PR, Lago WNM, Lima LHC (2001) **Levantamento de moscas-brancas na cultura da mandioca no Brasil**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 20p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e desenvolvimento).

Oliveira HN, Bellon PP, Loureiro ES, Mota TA (2016) Não-preferência para a oviposição de percevejo-de-renda *Vatiga illudens* (Hemiptera: Tingidae) por cultivares de mandioca. **Acta Biologica Colombiana** 21: 447-451.

Pancoro A, Hughes MA (1992) In-situ localization of cyanogenic beta-glucosidase (linamarase) gene expression in leaves of cassava (*Manihot esculenta* Cranz) using non-isotopic riboprobes. **Plant Journal** 2:821-827.

Peroni N (2007) Manejo e domesticação de mandioca por caiçaras da Mata Atlântica e ribeirinhos da Amazônia. In: Boef WS, Thijssen MH, Ogliari JB, Sthapit BR (Orgs) **Biodiversidade e agricultores: fortalecendo o manejo comunitário**. Porto Alegre: L&PM, 234-242.

Peumans WJ, Van Damme EJM (1995) Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology** 109:347-352.

Pieterse CM, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SC (2012) Hormonal modulation of plant immunity. **Annual Review of Cell and Developmental Biology** 28:489-521.

Pietrowski V, Ringenberg R, Rheinheimer AR, Bellon PP, Gazola D, Miranda AM (2010) **Insetos-praga da cultura da mandioca na região Centro-Sul do Brasil**. Marechal Cândido Rondon: Unioeste 40p.

Pinto-Zevallos DM, Pareja M, Ambrogi BG (2016) Current knowledge and future research perspectives on cassava (*Manihot esculenta* Crantz) chemical defenses: An agroecological view. **Phytochemistry** 130:10-21.

Polania MA, Calatayud PA, Bellotti AC (1999) Comportamiento alimenticio del piojo harinoso *Phenacoccus herreni* (Sternorrhyncha: Pseudococcidae) e influencia del déficit hídrico en plantas de yuca sobre su desarrollo. **Revista Colombiana de Entomología** 25:1-9.

Rheinheimer AR (2013) **Resistência de variedades de mandioca à cochonilha *Phenacoccus manihoti* (Matile-Ferrero) e sua influência sobre o parasitoide *Anagyrus lopezi* (De Santis)**. 112 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Unioeste, Marechal Cândido Rondon.

Santana MA, Vasquez V, Matehus J, Aldao RR (2002) Linamarase expression in cassava cultivars with roots of low- and high-cyanide content. **Plant Physiology** 129:1686-1694.

Santilli JA (2012) Lei de Sementes brasileira e os seus impactos sobre a agrobiodiversidade e os sistemas agrícolas locais e tradicionais. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas** 7(2):457-475.

Santos MAI, Corrêa AD, Alves APC, Simão AA, Alves DS, Oliveira RL, Saczk AA, Carvalho GA (2013) Extrato metanólico de folhas de mandioca como alternativa ao controle da largata-do-cartucho e de formigas cortadeiras. **Semina: Ciências Agrárias** 34(6):3501-3512

Sediyima T, Viana AES, Sediyima MAN (2007) Mandioca. In: Paula Junior TJ, Venzon M (Eds) **101 culturas: Manual de tecnologias agrícolas**. Belo Horizonte: EPAMIG, p. 483-490.

Silva MC, Corrêa AD, Santos, CD, Marcos FCA, Abreu CMP (2010) Extração de lectina da folha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e o efeito de cátions

divalentes na atividade hemaglutinante. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 30:103-107.

Simmonds MSJ (2001) Effects of isoflavonoids from Cicer on larvae of *Helicoverpa armigera*. **Journal of Chemical Ecology** 27:965-977.

Siritunga D, Sayre R (2004) Engineering cyanogen synthesis and turnover in cassava (*Manihot esculenta*). **Plant Molecular Biology** 56:661-669.

Smith CM (2005) **Plant resistance to arthropods molecular and conventional approaches**. Springer, p.423.

Souza LS (2003) Clima. In EMBRAPA (Eds.) **Cultivo da mandioca para a região do Cerrado**. Cruz das Almas: Embrapa: CNPMF (Embrapa-CNPMF. Sistemas de produção, 8).

Souza LS, Fialho JF (2003) Importância Econômica. In EMBRAPA (Eds.) **Cultivo da mandioca para a região do Cerrado**. Cruz das Almas: Embrapa: CNPMF (Embrapa-CNPMF. Sistemas de produção, 8).

Takahashi M, Gonçalves S (2005) **A cultura da mandioca**. Paranavaí: Olímpica, 116p.

Valle TL, Peressin VA, Feltran JC, Aguiar EB (2014) Mandioca industrial. In: Aguiar AT, Gonçalves C, Paterniani MEAGZ, Tucci MLS, Castro CEF **Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas**. São Paulo: Instituto Agrônomo, p.241-247.

Vendramim JD, Nishikawa MAN (2001) Melhoramento para resistência a insetos. In: Nass LL, Valois ACC, Melo IS, Valadares-Inglis MC (Eds) **Recursos genéticos e melhoramento**. Rondonópolis: Fundação MT, p.737-781.

Wilson WM (2003) Cassava (*Manihot esculenta* Crantz), cyanogenic potential, and predation in northwestern Amazonia: the Tukanoan perspective. **Human Ecology** 31:403-416.

Wobeto C, Corrêa AD, Abreu CMP, Santos CD, Pereira HV (2007) Antinutrients in the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaf powder at three ages of the plant. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 27(1):108-12.

Xu D, Huang Z, Cen YJ, Chen Y, Freed S Hu XG (2009) Antifeedant activities of secondary metabolites from *Ajuga nipponensis* against adult of striped flea beetles, *Phyllotreta striolata*. **Journal Of Pest Science** 82(2):195-202.

Yamamoto I (1999) Nicotine to nicotinoids: 1962 to 1997. In. Yamamoto I, Casida JE (Eds.) **Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor**. Tokyo: Springer, p.3-27.

Zarate SI, Kempema LA, Walling LL (2007) Silverleaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. **Plant Physiology** 143:866-875.

CAPÍTULO 2 - Composição química de genótipos de *Manihot esculenta* Crantz e suas possíveis influências sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)

RESUMO - As plantas apresentam diversos metabólitos secundários que podem estar associados a interações com herbívoros. Alguns desses metabólitos são antinutritivos, repelentes ou tóxicos a insetos herbívoros e podem ser explorados como inseticidas. Genótipos de mandioca apresentam uma grande variedade de metabólitos com potencial inseticida, mas pouco é conhecido sobre a identidade desses compostos. O presente trabalho foi conduzido para avaliar o desenvolvimento do herbívoro-modelo *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentado com seis genótipos de mandioca (IAC-14, IAC-90, IAC-12, IAC-Caapora, Baianinha e MEcu 72) e analisar a composição química constitutiva desses genótipos. Foram realizadas as quantificações de fenóis totais e saponinas esteroidais dos seis genótipos. Para a análise da composição e abundância relativa de metabólitos por GC-MS, os genótipos MEcu 72 e Baianinha foram selecionados por resultarem nos piores parâmetros sobre o desenvolvimento de *S. frugiperda* e IAC-Caapora por resultar nos melhores parâmetros. A alimentação da fase larval com MEcu 72 resultou nos piores índices nutricionais e, juntamente com Baianinha, nos piores índices reprodutivos de *S. frugiperda*. Uma quantidade 25% superior de fenóis totais foi observada nas folhas do genótipo MEcu 72 em relação aos demais genótipos. As análises de GC-MS resultaram na detecção de 58 metabólitos e 21 desses metabólitos apresentaram diferença significativa entre os genótipos avaliados. Os metabólitos *myo*-inositol-2-monofosfato, os ácidos *p*-cumárico, clorogênico e *p*-hidroxibenzoico, duas formas de ácido octadecadienoico e *n*-hexacosano foram detectados em maior abundância no genótipo MEcu 72 ou Baianinha em relação a IAC-Caapora. Os possíveis papéis dessas moléculas nas interferências negativas causadas sobre o desenvolvimento de *S. frugiperda* são discutidos.

Palavras-chave: Cromatografia gasosa, defesa química, metabolômica, produtos naturais, *Spodoptera frugiperda*

CHAPTER 2- Chemical identification analyses of *Manihot esculenta* Crantz genotypes and their possible influences on the development of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)

ABSTRACT - Plants have several secondary metabolites that may be associated with plant-herbivore interactions. Some of these metabolites are antinutritive, repellent or toxic to herbivorous and can be exploited as insecticides. Cassava genotypes present a wide variety of metabolites with insecticidal potential, but little is known about the identity of these compounds. The present work was conducted to evaluate the development of the generalist herbivore *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) fed with six cassava genotypes (IAC-14, IAC-90, IAC-12, IAC-Caapora, Baianinha and MEcu 72) and analyze the constitutive chemical composition of these genotypes. We analyzed the levels of phenolics compounds and steroidal saponins of the six genotypes. For the analysis of the composition and relative abundance of metabolites by GC-MS, MEcu 72 and Baianinha genotypes were selected because they resulted in the worst parameters on the development of *S. frugiperda* and IAC-Caapora because it resulted in the best parameters. Feeding larvae with MEcu 72 resulted in the worst nutritional indexes and along with Baianinha, in the worst reproductive indexes of *S. frugiperda*. The phenolic compounds levels were 25% higher in the leaves of the MEcu 72 genotype than other genotypes. GC-MS analysis resulted in the detection of 58 metabolites and 21 of these metabolites showed a significant difference between the evaluated genotypes. Myo-inositol-2-monophosphate, *p*-coumaric, chlorogenic and *p*-hydroxybenzoic acid, two forms of octadecadienoic acid and n-hexacosan were detected in greater abundance in the MEcu 72 or Baianinha genotypes than IAC-Caapora. The possible roles of these molecules in the negative interferences caused on the development of *S. frugiperda* are discussed.

KEYWORDS: Chemical defense, gas chromatography, metabolomics, natural products, *Spodoptera frugiperda*

1 Introdução

As plantas apresentam rotas biossintéticas no metabolismo secundário que resultam na formação de metabólitos que podem atuar na proteção contra organismos danosos (Bourgau et al., 2001). Os metabólitos secundários são compostos orgânicos que não estão diretamente envolvidos no crescimento, desenvolvimento e reprodução das plantas, mas podem lhes conferir vantagens adaptativas, como propriedades antinutritivas ou tóxicas a herbívoros (Harborne, 1999; Macías et al., 2007; Ibanez et al., 2012).

Esses metabólitos secundários com atividade inseticida podem ser extraídos das plantas e utilizados para o controle de insetos pragas. As piretrinas, nicotina, rotenona, sabadila, rianodina e azadiractina são alguns exemplos desses compostos naturais (Gonzalez-Coloma et al., 2010). Além da utilização direta desses compostos para o manejo de insetos pragas, o desenvolvimento de novas moléculas sintéticas com atividade inseticida pode ser direcionado. Como exemplos, citam-se a nicotina e a piretrina que serviram de modelo para o desenvolvimento dos neonicotinoides e piretroides, respectivamente (Casida, 1980; Yamamoto, 1999).

A metabolômica pode ser utilizada de maneira não direcionada e resultar na detecção de compostos químicos em amostras complexas como, por exemplo, as plantas (Fiehn, 2002). Este método tem sido utilizado para identificar compostos químicos candidatos que contribuem para a resistência constitutiva e/ou induzida de plantas a insetos através da comparação quali e quantitativa dos metabólitos presentes em genótipos resistentes e suscetíveis (Leiss et al., 2009; Jansen et al., 2009; Wang et al., 2017).

Um grande potencial de moléculas inseticidas é sugerido para plantas de mandioca (*Manihot* spp.), como o ácido gálico, catequina, rutina, saponinas e inibidores de proteases (Calatayud et al., 1994; Wobeto et al., 2007; Santos et al., 2013). Algumas dessas moléculas podem ser associadas à resistência de genótipos de mandioca a insetos pragas, como no genótipo MEcu 72 que resulta na mortalidade de aproximadamente 70% de ninfas de mosca branca, mas a composição química desse genótipo é desconhecida (Barilli et al., 2019).

Muitos genótipos que apresentam resistência ao desenvolvimento de insetos pragas são considerados agronomicamente inferiores e necessitam passar por melhoramento genético para associar resistência a pragas com produtividade e qualidade de raízes (Bellotti e Arias, 2001). O conhecimento das moléculas inseticidas presentes em genótipos resistentes a pragas pode auxiliar no processo de melhoramento, com a possibilidade de monitorar as características das progênes resultantes dos cruzamentos por meio de ensaios de detecção/quantificação dos compostos de interesse (Maluf et al., 2010).

O herbívoro *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), apesar de não ser considerado praga de mandioca, tem a capacidade de utilizar diferentes hospedeiros, entre eles folhas de mandioca, para completar seu ciclo imaturo de desenvolvimento (Silva et al., 2017). Essa capacidade se deve a alta plasticidade fenotípica da espécie que resulta, por exemplo, na detoxificação de compostos xenobióticos ou ativação da expressão de enzimas digestivas alternativas (Paulillo et al., 2000; Silva-Brandão et al., 2017). Desse modo, *S. frugiperda* figura como um interessante organismo para se avaliar os efeitos de possíveis metabólitos inseticidas presentes em plantas.

O presente trabalho foi conduzido para avaliar o desenvolvimento do herbívoro-modelo *S. frugiperda* alimentado com folhas de seis genótipos de mandioca e realizar análise metabolômica não-direcionada por GC-MS dos genótipos contrastantes para identificar moléculas potencialmente associadas com as alterações negativas observadas sobre o desenvolvimento de *S. frugiperda*.

2 Material e Métodos

2.1 Material vegetal

Os genótipos avaliados foram cedidos pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE). Foram avaliados cinco genótipos que apresentam diferentes níveis de resistência a mosca branca, *Bemisia tuberculata* Bondar, 1923 (Hemiptera: Aleyrodidae) e cochonilha,

Phenacoccus manihoti Matile-Ferrero, 1977 (Hemiptera: Pseudococcidae) (IAC-14, IAC-12, IAC-90, IAC-Caapora e MEcu 72) e um genótipo considerado suscetível (Baianinha) (Rheinheimer, 2013; Barilli et al., 2019). As plantas foram cultivadas em área experimental situada na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Jaboticabal-SP. As manivas foram dispostas em duas linhas por genótipo com 20 plantas por linha e espaçamento de 0,5 m entre plantas e 1 m entre linhas.

2.2 Avaliação do desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* em diferentes genótipos de mandioca

A espécie *S. frugiperda* foi eleita como espécie-modelo no presente estudo devido à capacidade de se desenvolver utilizando folhas de mandioca como alimento (Santos et al. 2013) e por não haver metodologia para a criação de lepidópteros pragas da cultura da mandioca. As lagartas utilizadas nos testes foram obtidas na criação do Laboratório de Ecologia Aplicada (APECOLAB).

Para a avaliação do desenvolvimento de *S. frugiperda* nos diferentes genótipos de mandioca, lagartas neonatas foram individualizadas em potes plásticos (7 cm de diâmetro x 3 cm de altura) com tampa. As folhas dos diferentes genótipos foram coletadas diariamente no campo experimental, mergulhadas por 30 segundos em solução de hipoclorito de sódio (0,075%) e três vezes em água destilada, secas em temperatura ambiente e fornecidas às lagartas. Foram avaliadas a duração e a viabilidade dos períodos larval e pupal, deformação e peso de pupa após 24 horas. Os experimentos foram iniciados com 50 lagartas por genótipo, dispostas em 5 repetições contendo 10 lagartas individualizadas por repetição.

Para a avaliação do consumo e utilização de alimento, as secções foliares foram fornecidas a 30 lagartas por tratamento individualizadas em potes plásticos idênticos aos descritos anteriormente. Após sete dias da implantação do experimento, iniciaram-se as pesagens diárias da massa fresca do alimento fornecido, da sobra de alimento, das fezes e das lagartas. Para se realizar a correção de perda de umidade do alimento fornecido, 10 secções foliares de cada

genótipo foram mantidas sem as lagartas nas mesmas condições dos tratamentos (Parra, 1991).

Com estas avaliações, foram determinados os seguintes parâmetros (Waldbauer, 1968; Scriber e Slansky Jr., 1981):

T: Duração do período de alimentação (dias);

AF: Peso do alimento fornecido ao inseto (g);

AR: Peso da sobra do alimento fornecido ao inseto (g);

F: Peso de fezes (g);

B: Ganho de peso pelas lagartas (g);

PM: Peso médio das lagartas (g);

I: Peso do alimento ingerido (g);

(I-F): Alimento assimilado (g);

[M = (I-F) - B]: Alimento metabolizado durante o período de alimentação (g).

Os índices nutricionais das lagartas alimentadas com cada genótipo de mandioca foram determinados através das seguintes fórmulas:

Taxa de consumo relativo (g/g/dia) - RCR = $I / (PM \times T)$;

Taxa de crescimento relativo (g/g/dia) - RGR = $B / (PM \times T)$;

Taxa metabólica relativa (g/g/dia) - RMR = $M / (PM \times T)$;

Digestibilidade aproximada (%) - AD = $(I - F) / I \times 100$;

Eficiência de conversão do alimento ingerido (%) - ECI = $B / I \times 100$;

Eficiência de conversão do alimento digerido (%) - ECD = $B / (I - F) \times 100$;

Custo metabólico (%) = $100 - ECD$.

Após a emergência dos adultos, 10 casais foram formados após alimentação nos diferentes genótipos de mandioca e mantidos em gaiolas de PVC (10 cm de diâmetro x 10 cm de altura) forradas com papel sulfite (1 casal/gaiola). Os casais foram alimentados diariamente com solução aquosa de mel a 10%. A cada dois dias, foi realizada a observação das posturas e da mortalidade dos adultos de forma a se obter os períodos de pré-oviposição, longevidade e fecundidade dos adultos. Duas gaiolas constituíram uma repetição.

A segunda postura de cada fêmea foi separada e acondicionada em placa de Petri (10 cm de diâmetro) para o acompanhamento da eclosão das lagartas e o registro da duração do período de incubação e a viabilidade (fertilidade) dos ovos.

A partir dos dados biológicos obtidos, determinaram-se a taxa líquida de reprodução (R_0), o tempo médio de uma geração (T), a taxa intrínseca de aumento (r_m) e tempo necessário para a população duplicar em número (DT), conforme Birch (1948), Silveira Neto et al. (1976) e Krebs (1994):

$$R_0 = \sum l_x m_x$$

$$T = (\sum l_x m_x x) / (\sum l_x m_x)$$

$$R_m = \log R_0 / T \cdot 0.4343$$

$$DT = \ln(2) / r_m$$

onde, x é a idade do indivíduo no tempo, l_x a sobrevivência específica e m_x a fertilidade específica.

2.3 Preparo dos extratos de folhas de mandioca

Durante o período em que foram realizadas as análises do desenvolvimento de *S. frugiperda*, foram coletadas aproximadamente 50 folhas de mandioca sem ocorrência de pragas ou doenças por genótipo. As folhas foram devidamente identificadas, lavadas em água corrente, secas e mantidas em freezer (-20°C) até sua utilização para o preparo dos extratos.

Os extratos brutos de folhas de mandioca foram preparados seguindo procedimento adaptado de Wobeto et al. (2007). Após pesadas, as folhas frescas (sem pecíolo) foram maceradas em almofariz e pistilo com a adição de nitrogênio líquido. O material particulado foi homogeneizado em etanol na proporção de 1:10 (p/V) (3 g de folhas frescas/30 mL de solvente) e mantido em repouso por 24 horas. Após o repouso, os extratos foram sonicados (3 sonicações de 15 minutos), filtrados em papel de filtro e armazenados. Esse procedimento foi repetido novamente com o material retido no filtro e obtiveram-se extratos com aproximadamente 60 mL. Para cada genótipo de mandioca, foram preparadas três repetições independentes.

2.4 Determinação de saponinas esteroidais

A concentração de saponinas nas folhas de mandioca dos diferentes genótipos foi determinada por método colorimétrico (Baccou et al.,1977). Os extratos brutos de folhas de mandioca foram diluídos em etanol (10x) e transferidos para tubos de ensaio nos volumes 100, 200 e 300 µL com posterior ajuste do volume final para 1 mL com etanol. O etanol das amostras foi evaporado em termobloco a 100°C e, em seguida, foi adicionado 1 mL de acetato de etila a cada amostra com homogeneização vigorosa em vortéx por 5 minutos. Após isso, foram adicionados 500 µL do reagente A (0,5 mL de *p*-anilsadeído + 99,5 mL de acetato de etila) e 500 µL do reagente B (50 mL H₂SO₄ + 50 mL de acetato de etila). As amostras foram homogeneizadas e posteriormente aquecidas em bloco seco a 60°C por 20 min. Após repouso em temperatura ambiente por 10 min, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro regulado no comprimento de onda de 430 nm.

As concentrações de saponinas esteroidais nas folhas dos genótipos de mandioca foram calculadas utilizando uma curva padrão de diosgenina (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) em clorofórmio (0-20 µg/mL; $y=0,0529x$; $R^2=0,9963$) preparada nas mesmas condições do ensaio. Os resultados foram expressos em mg de saponinas por grama de folhas frescas.

2.5 Determinação de fenóis totais

A concentração de fenóis totais presentes nas folhas de mandioca dos diferentes genótipos foi realizada por método colorimétrico (Ainsworth e Gillespie, 2007). Os extratos brutos foram diluídos em etanol (10x), transferidos para tubos de ensaio nos volumes de 10, 50 e 100 µL com posterior ajuste do volume final de cada amostra para 100 µL com etanol. A cada amostra, foram adicionados 200 µL do reagente Folin-Ciocalteu 10%, homogeneizados em vórtex e adicionados 800 µL de Na₂CO₃ 700mM. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 2 horas e análises de absorbância das amostras foram feitas em espectrofotômetro regulado no comprimento de onda de 765 nm.

As concentrações de fenóis totais nas folhas dos genótipos de mandioca foram calculadas utilizando uma curva padrão de ácido gálico (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) em etanol (0-10 µg/mL; $y=0,1008x$, $R^2=0,9984$) preparada nas mesmas condições do ensaio. Os resultados foram expressos em mg de fenóis totais por grama de folhas frescas.

2.6 Análise por GC-MS

Com base nos resultados das análises biológicas e nutricionais dos insetos e determinação de fenóis totais e saponinas, foram selecionados os genótipos Baianinha, IAC-Caapora e MEcu 72 para as análises de GC-MS.

Para análise dos metabólitos por GC-MS, o etanol do extrato bruto foi evaporado em rotaevaporador (45°C; 175 Mbar) até aproximadamente 1 mL. O extrato concentrado foi transferido para tubo Eppendorf e seco em concentrador a vácuo (SpeedVac-Eppendorf). A derivatização das amostras (5 mg) foi realizada pela adição de 80 µL de metoxiamina (20 mg/mL de piridina) e as amostras foram incubadas a 30°C por 90 minutos. A silição foi realizada pela adição de 200 µL de MSTFA (N-metil-trimetilsilil-trifluoroacetamida), homogeneização e incubação (37°C; 30 min) seguida de repouso por 24 horas a 5°C.

Em seguida, as amostras foram filtradas com microfiltro de nylon (0,22 µm) e transferidas para *vial* de 2 mL com *insert* de 350 µL. As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Foi utilizada amostra controle (branco) e uma série de alcanos (C₁₃-C₄₀) foi utilizada como referência para o cálculo dos índices de retenção.

As amostras derivatizadas foram automaticamente injetadas (1 µL) no modo *split* em cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (Shimadzu QP-2010). A coluna utilizada foi uma Restek Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm). A temperatura de injeção foi de 270°C, com fluxo de 1 mL/min, iniciado após 240 s do início da aquisição dos dados. A temperatura inicial foi de 140°C, mantida por 3 min e aumentada 3°C/min até atingir 320°C mantidos por 10 min. O efluente da coluna foi introduzido na fonte de íons do equipamento GC x GC-MS. A espectrometria de massas foi conduzida com os seguintes parâmetros: temperatura

da fonte de íons igual a 270°C, corrente de ionização de 2 mA e 20 espectros/s e a voltagem do detector igual a 1500 V. Foram registrados valores de m/z na faixa de 35-700.

2.7 Análise estatística

Os dados de desenvolvimento de *S. frugiperda*, de consumo e utilização de alimento e quantificação de saponina e fenóis totais foram testados quanto à normalidade e homogeneidade da variância dos erros. As variáveis foram submetidas à ANOVA seguido do teste de comparação de médias de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro ($P \leq 0,05$) utilizando o programa SISVAR (Ferreira, 2011).

Os parâmetros da tabela de vida de fertilidade foram estimados por meio do método de Jackknife e as médias comparadas usando PROC GLM (SAS Institute, 2002), conforme descrito por Maia et al. (2000).

O processamento dos dados de GC-MS foi realizado em duas etapas. Inicialmente foram realizadas as etapas de deconvolução, obtenção do índice de retenção (RI), correção do tempo de retenção (RT) e alinhamento de picos e identificação dos metabólitos com o auxílio do pacote TargetSearch (Cuadros-Inostroza, 2009) no ambiente R. Para identificação dos metabólitos, foi utilizada a biblioteca GMD (The Golm Metabolome Database). Como parâmetro para identificação dos metabólitos foi utilizado o desvio de RI de ± 2 segundos. Foram considerados metabólitos válidos apenas aqueles com três ou mais massas características no espectro de fragmentação e score igual ou maior a 600.

Para normalização dos dados, a intensidade de cada metabólito foi dividida pela contagem iônica total (TIC) de cada amostra. Os metabólitos que apresentaram valor de intensidade zero em mais de 50% das amostras de cada grupo foram removidos. A matriz de dados resultantes foi analisada estatisticamente utilizando o programa MetaboAnalyst (Xia e Wishart, 2016), no qual os valores foram filtrados por “intervalo interquantil”, normalizados pela mediana, transformados em log e escalonados por Pareto. Os dados gerados foram analisados pela Análise de Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) que é utilizada para

determinar quais são as variáveis responsáveis por predizerem as classes e explicarem a variabilidade entre os dados. A análise de variância (ANOVA) foi realizada para identificar os metabólitos diferencialmente abundantes entre os grupos, seguida do teste de Tukey ($P < 0,05$).

3 Resultados

3.1 Índices nutricionais de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de genótipos de mandioca

O consumo e utilização do alimento pelas lagartas de *S. frugiperda* foram influenciados pelos genótipos de mandioca. O genótipo Baianinha foi aparentemente o de mais fácil utilização pela fase larval de *S. frugiperda*, visto que valores inferiores aos obtidos com os demais genótipos foram observados para a taxa de consumo relativa (RCR), taxa metabólica relativa (RMR) e custo metabólico (CM) e um valor superior foi observado para eficiência de conversão do alimento digerido (ECD). Após consumirem folhas dos genótipos MEcu 72, IAC-Caapora e IAC-12, as lagartas apresentaram menores valores para eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) e valores superiores para CM (Figuras 1A e 1B).

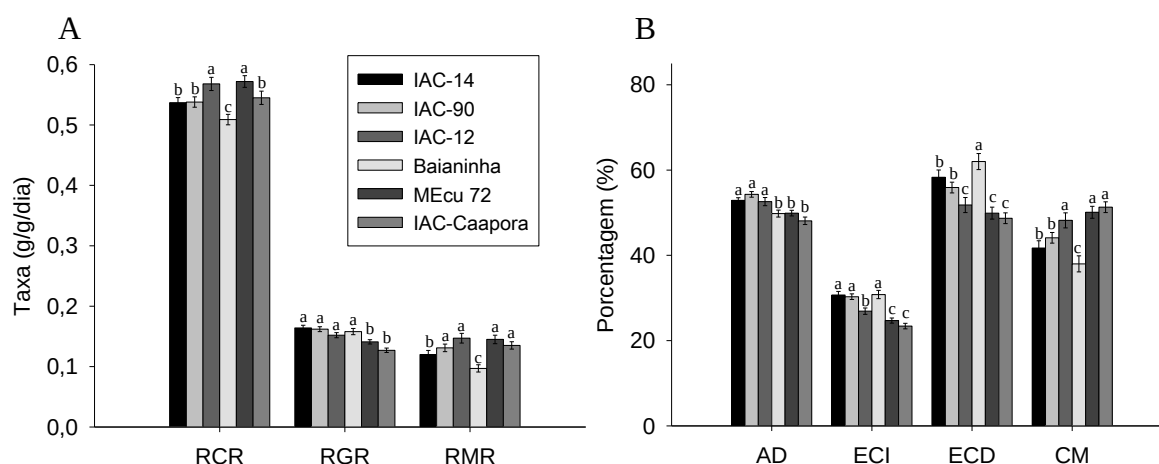


Figura 1 - Índices nutricionais de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de genótipos de mandioca (T: $25 \pm 2^\circ\text{C}$; Fotofase diária: 12 horas). RCR: Taxa de consumo relativo ($F_{5,12}=7,108$; $P=0,003$); RGR: Taxa de crescimento relativo ($F_{5,12}=9,461$; $P<0,001$); RMR: Taxa metabólica relativa ($F_{5,12}=13,241$; $P<0,001$) (A); AD: Digestibilidade aproximada ($F_{5,12}=5,057$; $P=0,010$); ECI: Eficiência de conversão do alimento ingerido ($F_{5,12}=16,212$; $P<0,001$); ECD: Eficiência de conversão do alimento digerido ($F_{5,12}=24,072$; $P<0,001$); CM: Custo metabólico ($F_{5,12}=24,072$; $P<0,001$) (B). Médias $\pm$ erro padrão seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P>0,05$).

3.2 Desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* em diferentes genótipos de mandioca

A duração ($F_{5,24}=8,102$; $P<0,001$) e viabilidade ($F_{5,24}=2,918$; $P=0,0338$) do período larval de *S. frugiperda* diferiram de acordo com o genótipo oferecido aos insetos. Lagartas alimentadas com os genótipos IAC-12 e IAC-Caapora tiveram cerca de dois dias a menos de período larval em relação a lagartas alimentadas com os demais genótipos. A viabilidade do período larval foi cerca de 10% inferior para as lagartas alimentadas com os genótipos Baianinha, IAC-Caapora e MEcu 72 em relação a viabilidade larval observada para lagartas alimentadas com os demais genótipos (Tabela 1).

Tabela 1. Duração (dias) e viabilidade (%) (média $\pm$ erro padrão) do período larval de *Spodoptera frugiperda* alimentado com diferentes genótipos de mandioca (T: $25 \pm 2^\circ\text{C}$; Fotofase diária: 12 horas).

Genótipos	Período larval	Viabilidade larval
IAC-14	$21,2 \pm 0,43$ a	$88,0 \pm 2,0$ a ¹
IAC-90	$20,9 \pm 0,07$ a	$88,0 \pm 2,0$ a
IAC-12	$19,5 \pm 0,31$ b	$84,0 \pm 4,0$ a
Baianinha	$21,3 \pm 0,47$ a	$78,0 \pm 2,0$ b
MEcu-72	$21,4 \pm 0,24$ a	$76,0 \pm 4,0$ b
IAC-Caapora	$19,2 \pm 0,36$ b	$80,0 \pm 3,2$ b
C.V. (%)	3,7	8,1

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($P > 0,05$).

O período de pupas fêmeas ($F_{5,24}=3,190$; $P=0,024$), os pesos de pupas de machos ($F_{5,24}=4,981$; $P=0,003$) e de fêmeas ($F_{5,24}=3,747$; $P=0,012$) também diferiram significativamente entre os genótipos utilizados. Os insetos alimentados com folhas dos genótipos Baianinha e MEcu-72 apresentaram os menores pesos das pupas (Tabela 2).

Tabela 2. Período (dias) e peso (mg) (média $\pm$ erro padrão) de pupas macho e fêmea de *Spodoptera frugiperda* cuja fase imatura foi alimentada com diferentes genótipos de mandioca (T: $25 \pm 2^\circ\text{C}$; Fotofase diária: 12 horas).

Genótipos	Período de pupa		Peso pupa	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
IAC-14	$12,7 \pm 0,11$ ns	$11,3 \pm 0,09$ a	$266,0 \pm 6,0$ a	$261,0 \pm 7,0$ a
IAC-90	$12,6 \pm 0,09$	$11,1 \pm 0,09$ b	$264,0 \pm 6,0$ a	$248,0 \pm 4,0$ a
IAC-12	$12,6 \pm 0,10$	$11,0 \pm 0,00$ b	$258,0 \pm 8,0$ a	$247,0 \pm 6,0$ a
Baianinha	$12,7 \pm 0,11$	$11,3 \pm 0,11$ a	$235,0 \pm 6,0$ b	$234,0 \pm 6,0$ b
MEcu-72	$12,4 \pm 0,11$	$10,9 \pm 0,09$ b	$237,0 \pm 5,0$ b	$232,0 \pm 5,0$ b
IAC-Caapora	$12,6 \pm 0,11$	$10,9 \pm 0,10$ b	$257,0 \pm 9,0$ a	$252,0 \pm 6,0$ a
C.V. (%)	2,0	2,1	5,4	5,1

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($P > 0,05$). ns = não significativo pela ANOVA.

A alimentação da fase larval de *S. frugiperda* com os genótipos de mandioca não influenciaram parâmetros do estágio adulto como período de pré-oviposição ($F_{5,24}=2,063$; $P=0,106$), longevidade de macho ($F_{5,36}=0,637$; $P=0,673$) e de fêmea ($F_{5,36}=0,698$; $P=0,628$) e fecundidade ($F_{5,24}=1,197$; $P=0,340$). O período de pré-oviposição de *S. frugiperda* variou de 3,6 a 4,9 dias, a longevidade de machos de 8,8 a 10,7 dias, a longevidade de fêmeas de 14,9 a 19,4 dias e a fecundidade de 2122,1 a 2645,5 ovos. Porém, um maior número de adultos deformados foi observado em insetos que se alimentaram do genótipo MEcu 72 (25%), seguido dos genótipos IAC-14, IAC-12 e IAC-Caapora (aproximadamente 10%) e dos genótipos IAC-90 e Baianinha (2,5%).

Os genótipos de mandioca utilizados durante a alimentação larval influenciaram o desempenho reprodutivo de *S. frugiperda*. De maneira geral, observou-se que a alimentação da fase larval de *S. frugiperda* com os genótipos IAC-12 e IAC-Caapora resultou em uma taxa líquida de reprodução (R_0) 25% superior em relação à R_0 observada em insetos alimentados com o genótipo Baianinha, no qual foi observado o menor valor de R_0 . A alimentação com os genótipos IAC-12 e IAC-Caapora também resultou em menores intervalos médios entre gerações (T), maior taxa intrínseca de crescimento (r_m) e menor tempo necessário para a população duplicar em número (DT) em relação aos demais genótipos de mandioca. Entre os genótipos IAC-12 e IAC-Caapora, cuja alimentação resultou em melhores parâmetros de desempenho reprodutivo, destaca-se o genótipo IAC-Caapora em função da alimentação com esse genótipo ter resultado em melhores resultados para T , r_m e DT em relação ao observado com a alimentação com folhas do genótipo IAC-12 (Tabela 3).

Tabela 3. Taxa líquida de reprodução (R_0), intervalo médio entre gerações (T), taxa intrínseca de crescimento (r_m) e tempo necessário para a população duplicar em número (DT) de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com genótipos de mandioca durante a fase larval (T: $25 \pm 2^\circ\text{C}$; Fotofase diária: 12 horas).

Genótipos	R_0 (♀/♀)	T (dias)	r_m (♀/♀/dia)	DT(dias)
IAC-14	874,2 ab	35,3 a	0,192 c	3,6 a
IAC-90	816,1 ab	35,9 a	0,187 c	3,7 a
IAC-12	1018,5 a	33,7 b	0,205 b	3,4 b
Baianinha	772,4 b	35,4 a	0,188 c	3,7 a
MEcu 72	877,1 ab	35,5 a	0,191 c	3,6 a
IAC-Caapora	1014,3 a	32,2 c	0,215 a	3,2 c

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo método de Jackknife ($P>0,05$).

3.3 Determinação de saponinas e fenóis totais

Concentrações inferiores de saponinas foram observadas nos genótipos IAC-14 e MEcu 72 em relação aos demais genótipos de mandioca (Figura 2A). Com relação à concentração de fenóis totais nas folhas, o genótipo MEcu 72 apresentou cerca de 25% (3,0 mg/g) a mais de compostos fenólicos totais do que os demais genótipos (Figura 2B).

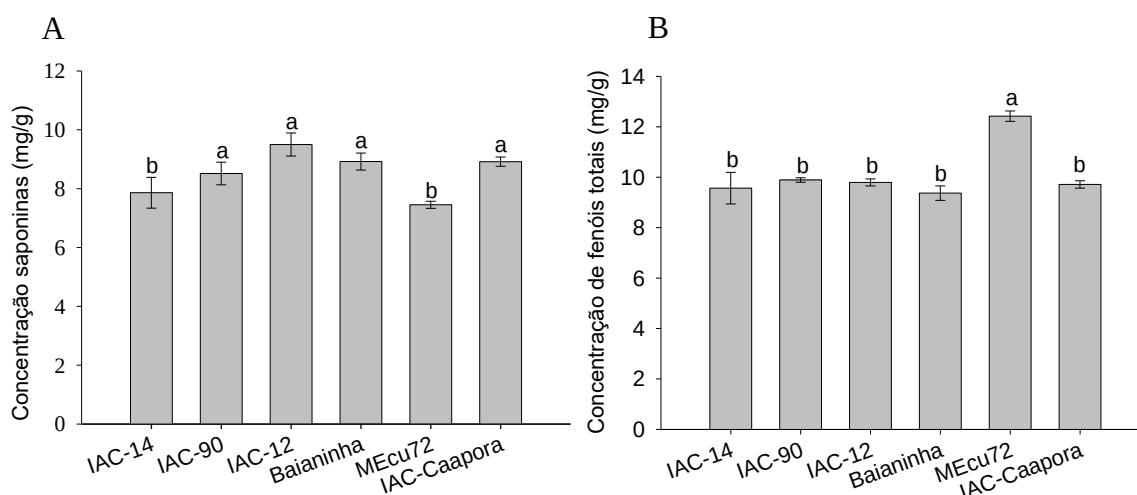


Figura 2 - Concentração de saponinas (mg/g) ($F_{5,12}=4,544$; $P=0,014$) (A) e de fenóis totais (mg/g) ($F_{5,12}=13,659$; $P<0,001$) (B) presentes em extratos de folhas de genótipos de mandioca. Médias $\pm$ erro padrão seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P>0,05$).

3.4 Análise dos metabólitos por GC-MS

A análise de PLS-DA confirmou a separação dos genótipos Baianinha, MEcu 72 (causadores dos efeitos negativos nos adultos) e IAC-Caapora (genótipo cujo consumo resultou em melhores desempenhos dos adultos) em termos de metabólitos. A soma dos dois primeiros componentes principais da PLS-DA explica 60,6% da variância observada entre os genótipos e apresentaram valores de $R^2 = 0,9837$ e $Q^2 = 0,7773$ que indicam boa variação descrita pelo modelo e precisão ou habilidade preditiva do modelo para os componentes analisados (Szymanska et al., 2012). No primeiro componente principal (33,9%), pode-se observar a separação de Baianinha (esquerda) dos genótipos IAC-Caapora e MEcu 72 (direita) e, no segundo componente (26,7%), o genótipo IAC-Caapora (abaixo) fica separado dos genótipos Baianinha e MEcu 72 (acima) (Figura 3).

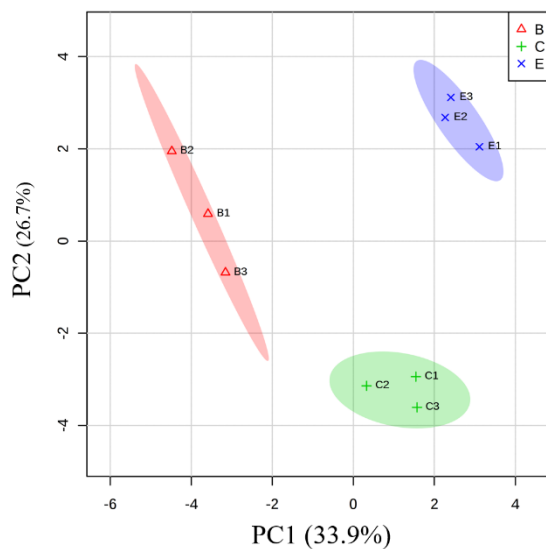


Figura 3 - PLS-DA *Scores Plot* da comparação dos genótipos Baianinha (B; vermelho) *versus* IAC-Caapora (C; verde) *versus* MEcu72 (E; azul). PC1 e PC2 representam o primeiro e segundo componente principal, respectivamente.

Foram detectados 58 metabólitos e, entre esses, 33 foram identificados e 21 metabólitos apresentaram concentrações relativas diferentes entre pelo menos 2 genótipos de mandioca avaliados (Figura 4).

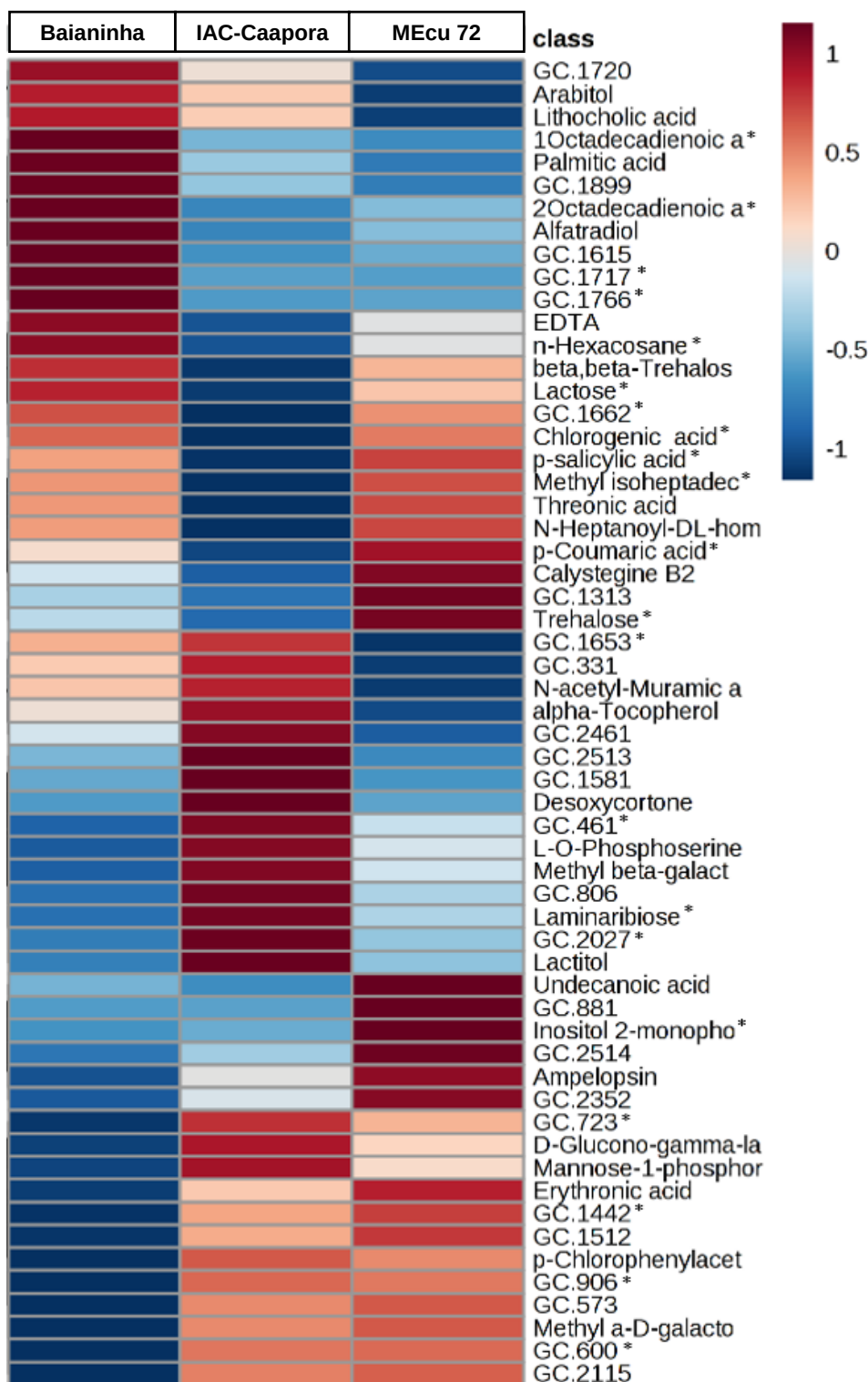


Figura 4 - *Heatmap* dos metabólitos detectados em extratos etanólicos de folhas de genótipos de mandioca. As colunas representam o agrupamento das três repetições biológicas dos genótipos, enquanto que as linhas representam os metabólitos. O aumento na intensidade de vermelho e azul indicam abundância elevada ou diminuta, respectivamente, de um metabólito em relação a abundância mediana do metabólito. *Diferença significativa entre os genótipos pela ANOVA ($P \leq 0,05$).

A análise para verificar quais genótipos possuíam diferentes abundâncias relativas de metabólitos resultou na geração de nove padrões de cores. Em dois padrões (1 e 2) os metabólitos *myo*-inositol-2-monofosfato (I2P), trealose e ácido *p*-cumárico apresentam maior abundância relativa no genótipo MEcu 72. Nos padrões 6 e 9, foram indicadas maiores abundâncias relativas dos metabólitos lactose, n-hexacosano, duas formas de ácido octadecadienoico e de dois metabólitos não identificados no genótipo Baianinha. O padrão 3 indica maiores abundâncias relativas de quatro metabólitos não identificados nos genótipos MEcu 72 e IAC-Caapora. O padrão 4 indica maiores abundâncias relativas dos metabólitos metil isoheptadecanoato, ácido clorogênico, ácido *p*-hidroxibenzoico (PHBA) e um metabólito não identificado nos genótipos Baianinha e MEcu 72. Os padrões 5 e 8 indicam maiores abundâncias relativas de laminaribiose e de dois metabólitos não identificados no genótipo IAC-Caapora. O padrão 7 indica maior abundância relativa de um metabólito não identificado nos genótipos Baianinha e IAC-Caapora (Figura 5).

Padrão	GMD_ID	Metabólito	Classe	B	C	E
Padrão 1	1798	Myo-inositol-2-monofosfato	Fosfato			
	2011	Trealose	Açúcar			
Padrão 2	1245	Ácido <i>p</i> -cumárico	Ácido fenólico			
Padrão 3	1442	NA				
	600	NA				
	723	NA				
	906	NA				
Padrão 4	1316	Metil isoheptadecanoato	Ácido graxo (éster)			
	1662	NA				
	2368	Ácido Clorogênico	Ácido fenólico			
	661	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	Ácido fenólico			
Padrão 5	2032	Laminaribiose	Açúcar			
Padrão 6	2049	Lactose	Açúcar			
	1894	n-Hecaxosano	Alcano			
Padrão 7	1653	NA				
Padrão 8	2027	NA				
	461	NA				
Padrão 9	1610	Ácido octadecadienoico	Ácido graxo (éster)			
	1611	Ácido octadecadienoico	Ácido graxo (éster)			
	1717	NA				
	1766	NA				

Figura 5 - Metabólitos presentes em extratos etanólicos de folhas de mandioca que apresentaram diferença quantitativa entre os genótipos. Genótipos Baianinha (B), IAC-Caapora (C) e MEcu 72 (E). Vermelho indica maior abundância do metabólito, azul indica menor abundância do metabólito, amarelo indica abundância intermediária do metabólito e preto indica a ausência do metabólito. Quando comparados os três grupos, as médias foram analisadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). GMD_ID = identificação do metabólito na biblioteca GMD, NA = Não identificado.

4 Discussão

A alimentação de *S. frugiperda* com o genótipo MEcu 72 resultou em um desempenho larval muito próximo ao observado para lagartas alimentadas com o genótipo IAC-Caapora, mas o peso de pupas e o desempenho reprodutivo obtidos ao utilizar MEcu 72 como alimento foram inferiores aos obtidos com a utilização desse genótipo. Além disso, a alimentação com o genótipo MEcu 72 foi a que resultou em um maior número de adultos deformados. De maneira similar ao observado, quando utilizado como recurso alimentar, o genótipo MEcu 72 também exerce influência negativa sobre três espécies de mosca branca e uma espécie de

cochonilha, causando mortalidade e redução da fecundidade dos insetos (Bellotti e Arias 2001, Carabalí et al. 2010, Omongo et al. 2012; Rheinheimer, 2013; Barilli et al., 2019).

O genótipo Baianinha é classificado como suscetível a insetos pragas, principalmente sugadores (Rheinheimer, 2013; Barilli et al., 2019). Porém, no presente trabalho, verificaram-se importantes interferências negativas sobre o peso de pupas e taxa líquida de reprodução de *S. frugiperda* após alimentação da fase larval com folhas do genótipo Baianinha em relação aos mesmos parâmetros observados após alimentação com folhas do genótipo IAC-Caapora. Em lepidópteros, a alimentação da fase larval é muito importante para o desempenho reprodutivo e os efeitos de determinados genótipos sobre o desenvolvimento de insetos pragas pode ser aparente apenas após a fase larval (Awmack e Leather, 2002). Isso se dá principalmente pelo fato de que grande parte dos ovos de lepidópteros serem formados pelas reservas energéticas captadas durante a fase larval (Honek, 1993). A melhor utilização do alimento observado pelas lagartas em folhas de Baianinha não resultaram em melhores parâmetros de desenvolvimento e reprodução, possivelmente pela menor reserva energênica no período larval.

Genótipos de uma mesma espécie podem resultar em diferentes interações com insetos herbívoros, sendo os metabólitos secundários um dos principais componentes envolvidos na defesa da planta a insetos (Mithöfer e Boland, 2012). Por isso, iniciou-se a investigação da influência de metabólitos secundários sobre o desenvolvimento de *S. frugiperda* pela quantificação total de saponinas e fenóis totais nas folhas dos genótipos de mandioca selecionados. Sabe-se da existência de saponinas nas folhas de mandioca (Wobeto et al., 2007) e que o consumo desse tipo de molécula pode resultar no aumento da mortalidade de insetos herbívoros (De Geyter et al., 2007). No presente trabalho, não foi possível correlacionar a variação da concentração total de saponinas nas folhas de mandioca analisadas com alterações nos parâmetros biológicos de *S. frugiperda*. Aparentemente, as concentrações de saponinas nas folhas dos genótipos de mandioca selecionados não são suficientes para resultar em alterações no desenvolvimento de *S. frugiperda* ou as saponinas presentes nas folhas dos genótipos apresentam baixa ou nenhuma atividade inseticida (Adel et al., 2000).

Em função de suas influências negativas sobre o desenvolvimento de *S. frugiperda*, os genótipos MEcu 72 e Baianinha foram selecionados para identificação de metabólitos por GC-MS, assim como, IAC-Caapora por ser o genótipo que resultou nas maiores influências positivas.

Após análise em GC-MS, observaram-se metabólitos como fosfato *myo*-inositol-2-monofosfato (I2P) e o açúcar trealose em maior abundância no genótipo MEcu 72. Estudos indicam que a ingestão de *myo*-inositol não resulta em efeitos negativos sobre a fase larval de *Hyphantria cunea* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Arctiidae) (Wang et al., 2017). Porém, estudos com *Coptotermes formosanus* Shiraki, 1909 (Isoptera: Rhinotermitidae) indicam que a ingestão de I2P causa deterioração dos segmentos antenais desses insetos (Grimball et al., 2017). Dessa forma, acredita-se que esse metabólito possa estar envolvido com o maior número de adultos de *S. frugiperda* deformados após ingestão do genótipo MEcu 72. O açúcar trealose, por ser formado por duas unidades de glicose e ser hidrolisado por trealases digestivas presentes em *S. frugiperda* (Silva et al., 2009), não parece ser uma molécula candidata a explicar os efeitos negativos observados. Trealose é um açúcar melhor correlacionado à sinalização de respostas de plantas a estresses bióticos e abióticos (Lunn et al., 2014) e maiores concentrações de trealose no genótipo MEcu 72 podem resultar na produção de maiores quantidades de outras moléculas associadas aos efeitos negativos observados, tais como moléculas fenólicas (Ali et al., 2012).

Sabe-se que diversas moléculas fenólicas são associadas com efeitos negativos sobre o desenvolvimento de insetos (Rattan, 2010). Dessa forma, parte dos efeitos adversos observados em lagartas que se alimentaram com o genótipo MEcu 72 pode ser associada com a maior concentração de fenóis totais observada no mesmo pelo método colorimétrico. De forma mais específica, por GC-MS, observaram-se maiores abundâncias relativas dos ácidos fenólicos *p*-cumárico, clorogênico e *p*-hidroxibenzoico (PHBA) nos genótipos MEcu 72 e Baianinha, nos quais *S. frugiperda* obteve menor peso de pupas e menor desempenho reprodutivo. Esses compostos são fenilpropanoides derivados da via chiquimato-fenilpropanoide que podem ser classificados em quatro categorias: hidroxicinamatos e seus

derivados, glicosídeos fenólicos derivados de salicilatos, flavonoides e taninos condensados (Chen et al., 2009).

O ácido *p*-cumárico é um hidroxicinamato que pode ser oxidado em espécies moleculares reativas, como quinonas e quinonas metóxidos, que se ligam a proteínas da dieta do herbívoro, diminuem o valor nutritivo do alimento e podem resultar em efeitos negativos no desenvolvimento de insetos (Lattanzio, 2013). O ácido clorogênico também é um hidroxicinamato que pode ser oxidado em clorogenoquinona e se ligar a aminoácidos livres e proteínas, o que leva a uma menor disponibilidade de aminoácidos e menor digestibilidade de proteínas (Felton et al., 1989; 1991). Ambos os compostos desempenham função de defesa química contra herbívoros e apresentam efeitos negativos sobre o desenvolvimento, sobrevivência e fecundidade de insetos mastigadores e sugadores (Leiss et al., 2009; Chrzanowski et al., 2012; Torp et al., 2013). O PHBA é um glicosídeo fenólico derivado de salicilatos também denominado como ácido 4-hidroxibenzoico. Muitos metabólitos benzenoides derivados do ácido salicílico, como o ácido benzoico, foram relacionados à resistência constitutiva de plantas a insetos pragas (Wang et al., 2017).

O ácido octadecadienoico está presente em maior abundância relativa no genótipo Baianinha, no qual os insetos tiveram maior eficiência na utilização do alimento, mas com menor peso de pupas e menor taxa de reprodução. Este composto é um ácido linoleico conjugado (CLA), termo usado para descrever um grupo de ácidos octadecadienoicos que contêm duas ligações duplas conjugadas (Yurawecz et al., 1995). CLAs podem ser antioxidantes (Park et al., 1997) e, no presente estudo, os ácidos octadecadienoicos podem ter reduzido a oxidação dos ácidos fenólicos *p*-cumárico, clorogênico e PHBA com potencial toxicidade a insetos como mencionado acima e, conseqüentemente, facilitado a utilização do alimento e reduzido o custo metabólico das lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas do genótipo Baianinha. Por outro lado, ácidos octadecadienoicos também podem reduzir a deposição de gordura e aumentar a lipólise nos adipócitos de ratos (Park et al., 1997). Com uma possível redução do acúmulo de lipídeos durante a fase larval, apesar das folhas de Baianinha parecerem mais adequadas para a alimentação das lagartas, essas resultaram em desempenhos reprodutivos inferiores por *S.*

frugiperda. Isso se dá pela necessidade do acúmulo adequado de lipídeos na fase larval de lepidópteros para melhores taxas reprodutivas (Honek, 1993).

O metabólito n-hexacosano com abundâncias relativas maiores em Baianinha, intermediárias em MEcu 72 e baixas em IAC-Caapora também pode estar relacionado com as reduções do potencial reprodutivo de *S. frugiperda* observadas quando as lagartas foram alimentada com Baianinha e MEcu 72. Concentrações subletais de um extrato fracionado de flores de *Couroupita guianensis* L. que continham n-hexacosano resultaram na diminuição do peso de pupas e do potencial reprodutivo de *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775) (Lepidoptera: Noctuidae) (Ponsankar et al., 2016).

O entendimento das concentrações relativas dos compostos secundários e suas possíveis relações com o desenvolvimento de insetos herbívoros auxilia na compreensão das relações entre plantas e herbívoros. A partir desses conhecimentos, tecnologias aplicadas podem auxiliar o melhoramento de plantas de interesse comercial ou desenvolver moléculas com atividade inseticida.

5 Conclusões

O genótipo MEcu 72 foi o menos adequado para a alimentação e desenvolvimento de *S. frugiperda*.

As folhas do genótipo MEcu 72 apresentam concentração de fenóis totais 25% superior em relação aos demais genótipos.

Os metabólitos *myo*-inositol-2-monofosfato (I2P), ácidos *p*-cumárico, clorogênico e *p*-hidroxibenzoico, duas formas de ácido octadecadienoico e n-hexacosano são fortes candidatos a explicar a interferência dos genótipos de mandioca no desenvolvimento de *S. frugiperda*.

6 Referências

Ainsworth EA, Gillespie KM (2007) Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. **Nature Protocol** 2(4):875-877.

Ali Q, Ashraf M, Anwar F, Al-Qurainy F (2012) Trehalose-induced changes in seed oil composition and antioxidant potential of maize grown under drought stress. **Journal of the American Oil Chemists' Society** 89:1485-1493.

Awmack CS, Leather SR (2002) Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. **Annual Review of Entomology** 47:817-844.

Baccou JC, Lambert F, Sauvaire Y (1977) Spectrometric method for the determination of total steroidal sapogenin. **Analyst** 102(5):458-465.

Barilli DR, Wengrat APGS, Guimarães ATB, Pietrowski V, Ringenberg R, Garcia MS (2019) Resistance of cassava genotypes to *Bemisia tuberculata*. **Arthropod-Plant Interactions** 1-7.

Bellotti AC, Arias B (2001) Host plant resistance to whiteflies with emphasis on cassava as a case study. **Crop Protection** 20:813-823.

Birch LC (1948) The intrinsic rate of natural increase of an insect population. **Journal of Animal Ecology** 17:15-26.

Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science** 161:839-851.

Calatayud PA, Rahbé Y, Delobel B, Khuong-Huu F, Tertuliano M, Le Rü B (1994) Influence of secondary compounds in the phloem sap of cassava on expression of antibiosis towards the mealybug *Phenacoccus manihoti*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 72:47-57.

Carabalí A, Bellotti AC, Montoya-Lerma J, Fregene M (2010) Resistance to the whitefly, *Aleurotrachelus socialis*, in wild populations of cassava, *Manihot tristis*. **Journal of Insect Science** 10:1-10.

Casida JE (1980) Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. **Environmental Health Perspectives** 34:189-202.

Chen F, Liu CJ, Tschaplinski TJ, Zhao N (2009) Genomics of secondary metabolism in *Populus*: interactions with biotic and abiotic environments. **Critical Reviews in Plant Sciences** 28:375-392.

Chrzanowski G, Leszczynski B, Czerniewicz P, Sytykiewicz H, Matok H, Krzyzanowski R (2012) Effect of phenolic acids from black currant, sour cherry and walnut on grain aphid (*Sitobion avenae* F.) development. **Crop Protection** 35:71-77.

Cuadros-Inostroza A, Caldana C, Redestig H, Kusano M, Lisec J, Peña-Cortés H, Willmitzer L, Hannah MA (2009) TargetSearch - a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. **BMC Bioinformatics** 10(1):428.

De Geyter E, Gellen D, Smagghe G (2007) First result on the insecticidal action of saponins. **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences** 72(3):645-648.

Felton GW, Donato K, Del Vecchio RJ, Duffey SS (1989) Activation of plant foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. **Journal of Chemical Ecology** 15:2667-2694.

Felton GW, Donato KK, Broadway RM, Duffey SS (1991) Impact of oxidized plant phenolics on the nutritional quality of dietary protein to a noctuid herbivore, *Spodoptera exigua*. **Journal of Insect Physiology** 38:277-285.

Ferreira D (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** 35(6):1039-1042.

Fiehn O (2002) Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology** 48:155-171.

Gonzalez-Coloma A, Reina M, Diaz CE, Fraga BM (2010) Natural product-based biopesticides for insect control. In: Liu H, Mander L (Eds) **Comprehensive natural products II**. Elsevier, Oxford pp 237-268.

Grimball B, Veillon L, Calhoun T, Fronczek FR, Arceneaux E, Laine RA (2017) Cyclohexylamine inexplicably induces antennae loss in formosan subterranean termites (*Coptotermes formosanus* Shiraki): cyclohexylamine hydrogen phosphate salts are novel termiticides. **Pest Management Science** 73(10):2039-2047.

Harborne JB (1999) Classes and functions of secondary products from plants. In: Walton NJ, Brown DE (Eds.) **Chemicals from plants**. London: Imperial College Press and World Scientific Publishing, p.1-25.

Honek A (1993) Intraspecific variation in body size and fecundity in insects: a general relationship. **Oikos** 66:483-492.

Ibanez S, Gallet C, Despres L (2012) Plant insecticidal toxins in ecological networks. **Toxins** 4:228-243.

Jansen JJ, Allwood W, Marsden-Edwards E, van der Putten WH, Goodacre R, van Dam NM (2009) Metabolomic analysis of the interaction between plants and herbivores. **Metabolomics** 5:150-161.

Krebs CJ (1994) **Ecology: the experimental analysis of distribution and abundance**. New York: Harper & Row, p.801.

Lattanzio V (2013) Phenolic Compounds: Introduction. In: Lattanzio V (Eds.) **Natural Products**. Berlin: Springer press, p. 1543-1580.

Leiss KA, Maltese F, Choi YH, Verpoorte R, Klinkhamer PG (2009) Identification of chlorogenic acid as a resistance factor for thrips in chrysanthemum. **Plant Physiology** 150:1567-1575.

Lunn JE, Delorge I, Figueroa CM, Dijck PV, Stitt M (2014) Trehalose metabolism in plants. **The Plant Journal** 79:544-567.

Macías FA, Galindo JLG, Galindo JCG (2007) Evolution and current status of ecological phytochemistry. **Phytochemistry** 68:2917-2936.

Maia AHN, Luiz AJB, Campanhola C (2000) Statistical inference on associated fertility life table parameters using Jackknife technique: computational aspects. **Journal of Economic Entomology** 93:511-518.

Maluf WR, Maciel GM, Gomes LAA, Cardoso MG, Gonçalves LD, Silva EC, Knapp M (2010) Broad-spectrum arthropod resistance in hybrids between high- and low-acylsugar tomato lines. **Crop Science** 50:439-450.

Mithöfer A, Boland W (2012) Plant defense against herbivores: chemical aspects. **Annual Review of Plant Biology** 63:431-450.

Omongo CA, Kawuki R, Bellotti AC, Alicai T, Baguma Y, Maruthim MN, Bua A, Colvin J (2012) African cassava whitefly, *Bemisia tabaci*, resistance in African and South American cassava genotypes. **Journal of Integrative Agriculture** 11:327-336.

Park Y, Albright KJ, Liu W, Storkson JM, Cook ME, Pariza MW (1997) Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. **Lipids** 32(8):853-858.

Parra JRP (1991) Consumo e utilização de alimento por insetos. In: Panizzi AR, Parra JRP (Eds) **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole, p. 9-65.

Paulillo LCMS, Lopes AR, Cristofolletti PT, Parra JRP, Terra WR, Silva Filho MC (2000) Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. **Journal of Economic Entomology** 93(3):892-896.

Ponsankar A, Vasantha-Srinivasan P, Senthil-Nathan S, Thanigaivel A, SamEdwin E, Selin-Rani S, Kalaivani K, Hunter WB, Alessandro RT, Abdel-Megeed A, Paik C, Duraipandiyan V, Al-Dhabig NA (2016) Target and non-target toxicity of botanical insecticide derived from *Couroupita guianensis* L. flower against generalist herbivore, *Spodoptera litura* Fab. and an earthworm, *Eisenia foetida* Savigny. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 133:260-270.

Rattan RS (2010) Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. **Crop Protection** 29:913-920.

Rheinheimer AR (2013) **Resistência de variedades de mandioca à cochonilha *Phenacoccus manihoti* (Matile-Ferrero) e sua influência sobre o parasitoide *Anagyrus lopezi* (De Santis)**. 112 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Unioeste, Marechal Cândido Rondon.

Santos MAI, Corrêa AD, Alves APC, Simão AA, Alves DS, Oliveira RL, Saczk AA, Carvalho GA (2013) Extrato metanólico de folhas de mandioca como alternativa ao

controle da largata-do-cartucho e de formigas cortadeiras. **Semina: Ciências Agrárias** 34(6):3501-3512.

Scriber JM, Slansky Jr F (1981) The nutritional ecology of immature insects. **Annual Review of Entomology** 26:183-211.

Silva DM, Bueno AF, Andrade K, Stecca CS, Oliveira PM, Neves J, Oliveira MCN (2017) Biology and nutrition of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) fed on different food sources. **Scientia Agricola** 74(1):18-31.

Silva MC, Ribeiro AF, Terra WR, Ferreira C (2009) Sequencing of *Spodoptera frugiperda* midgut trehalases and demonstration of secretion of soluble trehalase by midgut columnar cells. **Insect Molecular Biology** 18(6):769-784.

Silva-Brandão KL, Horikoshi RJ, Bernardi D, Omoto C, Figueira A, Brandão MM (2017) Transcript expression plasticity as a response to alternative larval host plants in the speciation process of corn and rice strains of *Spodoptera frugiperda*. **BMC Genomics** 18:792.

Silvera Neto S, Nakano O, Barbin D, Villa Nova NA (1976) **Manual de ecologia dos insetos**. São Paulo: Agronômica Ceres, p 419.

Szymanska E, Paszliwicz M, Golebiowski M, Stepnowski P (2012) Gas chromatographic analysis of plant and insect surface compounds: cuticular waxes and terpenoids. In: Salih B, Çelikbiçak O (Eds) **Gas chromatography in plant science, wine technology, toxicology and some specific applications**. Rijeka: InTech, p.39-72.

Torp M, Lehrman A, Stenberg JA, Julkunen-Tiitto R, Björkman C (2013) Performance of an herbivorous leaf beetle (*Phratora vulgatissima*) on *Salix* F2 hybrids: the importance of phenolics. **Journal of Chemical Ecology** 39:516-524.

Waldbauer GP (1968) Consumption and utilization of food. In: Beament JWL, Treherne JE, Wigglesworth VB (Eds) **Advances in insect physiology**. New York: Academic Press, p.229-288.

Wobeto C, Corrêa AD, Abreu CMP, Santos CD, Pereira HV (2007) Antinutrients in the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaf powder at three ages of the plant. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 27(1):108-12.

Wang L, Qu L, Hu J, Zhang L, Tang F, Lu M (2017) Metabolomics reveals constitutive metabolites that contribute resistance to fall webworm (*Hyphantria cunea*) in *Populus deltoides*. **Environmental and Experimental Botany** 136:31-40.

Xia J, Wishart DS (2016) Using MetaboAnalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. **Current Protocols in Bioinformatics** 55(1):14.10.1-14.10.91.

Yamamoto I (1999) Nicotine to nicotinoids: 1962 to 1997. In: Yamamoto I, Casida JE (Eds) **Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor**. Tokyo: Springer, p.3-27.

Yurawecz MP, Hood JK, Mossoba MM, Roach JAG, Ku Y (1995) Furan fatty acids determined as oxidation products of conjugated octadecadienoic acid. **Lipids** 30(7):595-598.

CAPÍTULO 3 - Alterações das concentrações de fitormônios e cianeto em genótipos de *Manihot esculenta* Crantz induzidas pela herbivoria de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)

RESUMO - As plantas podem modular a produção de compostos de defesa após o ataque de insetos. Essa resposta das plantas à herbivoria é conhecida como defesa induzida. Geralmente, o início dessa resposta é dado pela produção de diferentes fitormônios, moléculas sinalizadoras de eventos celulares que resultam na produção de moléculas de defesa na planta atacada. Como exemplo de moléculas de defesa presente em plantas de mandioca, sabe-se da existência de glicosídeos cianogênicos. Esses compostos, ao serem hidrolisados, resultam na produção de cianeto de hidrogênio tóxico a herbívoros generalistas. O presente trabalho foi conduzido para avaliar se a infestação por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), um herbívoro-modelo não específico, induz alterações na concentração dos fitormônios ácido abscísico, ácido salicílico e ácido jasmônico, e de duas moléculas associadas a via do ácido jasmônico (ácido 12-oxofitodienoico - OPDA jasmonil-isoleucina) bem como na concentração de cianeto (CN) nas folhas de sete genótipos de mandioca (IAC-14, IAC-90, IAC-12, IAC-Caapora, Baianinha, MEcu 72 e BRS-CS01). Os experimentos biológicos foram conduzidos em casa de vegetação e a herbivoria foi realizada por duas lagartas de *S. frugiperda* (4^o ínstar) mantidas por dois dias em gaiolas instaladas na terceira folha completamente desenvolvida. Foram analisadas cinco plantas de cada genótipo de mandioca pela coleta de duas folhas acima e duas folhas abaixo da folha infestada. As concentrações dos fitormônios foram analisadas por LC-MS e as concentrações de CN foram estimadas pela técnica de eletrodos de íons seletivos para cianeto. As análises realizadas indicam que o genótipo MEcu 72 classificado como menos adequados para o desenvolvimento larval de *S. frugiperda* apresenta concentrações constitutivas de fitormônios maiores que genótipos classificados como mais adequados. Após herbivoria, mudanças na concentração dos fitormônios ocorreram, porém, sem um padrão específico, variando principalmente em função do genótipo testado. Com relação aos CN, o genótipo IAC-Caapora foi que apresentou maiores concentrações constitutivamente. Após a herbivoria, nenhum dos genótipos avaliados alterou a concentração de CN, o que demonstra que as alterações nas concentrações de fitormônios induzidas por herbivoria não estão relacionadas com as rotas de biossíntese de CN. Os resultados das quantificações realizadas são apresentados e correlacionados com informações da literatura sobre o desenvolvimento de insetos nos genótipos estudados.

Palavras-chave: Ácido jasmônico, ácido salicílico, cianeto, defesa química, resistência induzida.

CHAPTER 3 - Changes in phytohormones and cyanide levels in *Manihot esculenta* Crantz genotypes induced by herbivory of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)

ABSTRACT - Plants can modulate the production of defense compounds after insect attack. This response of plants to herbivory is known as induced defense. Generally, this response occurs by production of different phytohormones, i.e. signaling molecules of cellular events that result in the production of defense molecules in damaged plants. Cyanogenic glycosides are among defense molecules present in cassava plants. These compounds, when hydrolyzed, result in the production of toxic hydrogen cyanide to generalist herbivores. The present work was conducted to evaluate if infestation by *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), a nonspecific herbivore, induces changes of the phytohormones, abscisic acid, salicylic acid and jasmonic acid, and of two molecules of the signalling pathways of jasmonic acid (12-oxophytodienoic acid - OPDA and jasmonyl isoleucine) as well of cyanide (CN) levels in leaves of seven cassava genotypes (IAC-14, IAC-90, IAC-12, IAC-Caapora, Baianinha, MEcu 72, and BRS-CS01). Biological experiments were conducted in greenhouse and the herbivory was performed by two *S. frugiperda* caterpillars (4th instar) maintained for two days in cages installed on the third fully developed leaf. Five plants of each cassava genotype were analyzed by collecting two leaves above and two leaves below the infested leaf. Phytohormones levels were analyzed by LC-MS and the CN were estimated by the cyanide ion selective electrode technique. The MEcu 72 genotype, the less suitable to larval development of *S. frugiperda*, presents constitutive concentrations of phytohormones greater than genotypes that are more adequate. The herbivory caused changes in the phytohormones levels mainly as a function of the genotype tested, however, without a specific pattern. In relation to CN, the genotype IAC-Caapora presented higher concentrations constitutively. After herbivory, none of the evaluated genotypes altered the concentration of CN, which suggests that changes in herbivory-induced phytohormone levels are not related with the CN biosynthesis pathways. The results of the quantifications are presented and correlated with information from the literature on the development of insects in the studied genotypes.

KEYWORDS: Chemical defense, cyanide, induced resistance, jasmonic acid, salicylic acid

1 Introdução

As plantas apresentam rotas biossintéticas para a produção de metabólitos secundários que podem auxiliá-las na defesa contra herbívoros (Bourgau et al., 2001). Essa produção de compostos de defesa pode ser realizada de forma constitutiva ou induzida. Quando produzidos de forma induzida, a concentração desses compostos aumenta após o ataque dos herbívoros no local, em tecidos próximos ou distantes do sítio de herbivoria (Vallad e Goodman, 2004).

Entre as moléculas produzidas após indução pela herbivoria, observam-se os fitormônios e seus precursores. Os fitormônios são moléculas produzidas pelo sistema de defesa das plantas de forma a ativar rotas biossintéticas para a produção de moléculas de defesa e outros compostos (Bari e Jones, 2009). Ácido salicílico (AS), ácido abscísico (ABA), etileno (ET), ácido jasmônico (AJ) são exemplos de fitormônios relacionados com a ativações de rotas biossintéticas para defesa da planta (Erb e Glaucier, 2010).

As vias metabólicas sinalizadas por AJ e AS são o cerne do sistema de defesa da planta. O AJ e sua forma ativa AJ-Ile são conhecidos por estarem relacionados com a regulação de defesa da planta contra insetos mastigadores e outros ferimentos mecânicos. O AS é principalmente associado com resposta à herbivoria por insetos sugadores (Zarate et al., 2007; Pieterse et al., 2012). Por outro lado, o ABA e o ET desempenham um papel de modulação. Por exemplo, o ABA está associado com a regulação da via do AJ quando ocorre algum ferimento na planta ou ataque de insetos e o ET quando ocorre algum ataque por patógenos necrotróficos (Anderson et al., 2004; Lorenzo e Solano, 2005; Pieterse et al., 2012). O OPDA é precursor de AJ, porém, é também uma molécula biologicamente ativa e relacionada diretamente na indução de genes de resposta de defesa independentes do fitormônio AJ (Taki et al., 2005).

Do ponto de vista de compostos produzidos para ação direta sobre os herbívoros, as folhas e raízes de mandioca apresentam glicosídeos cianogênicos como linamarina (95%) e lotaustralina (5%), em níveis que variam, de 200 a 1300 mg CN equivalente.kg⁻¹ nas folhas e de 10-500 mg CN equivalente.kg⁻¹ nas raízes dependendo do genótipo (Siritunga e Sayre, 2004). Quando os tecidos das plantas

de mandioca são injuriadas, ocorre o processo de cianogênese, que é a produção do cianeto de hidrogênio (HCN) por meio da ação de uma enzima endógena chamada linamarase (McMahon et al., 1995). A cianogênese é relacionada com a defesa das plantas à herbívoros generalistas (Bellotti e Riis, 1994; Ballhorn et al., 2006).

O herbívoro *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) não é considerado praga de mandioca, mas apresenta a capacidade de completar o seu ciclo utilizando folhas desse hospedeiro (Silva et al., 2017). Além disso, sabe-se que lagartas de *S. frugiperda* apresentam mudanças em seu desenvolvimento de acordo com a composição química do genótipo de mandioca ofertado para sua alimentação (Capítulo 2 da presente tese).

O presente trabalho foi conduzido para conhecer as concentrações de fitormônios e de CN e avaliar se a infestação por *S. frugiperda* altera a concentração dos mesmos em diferentes genótipos de mandioca.

2 Material e Métodos

2.1 Material vegetal

Os genótipos IAC-14, IAC-90, IAC-12 e IAC-Caapora foram cedidos pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), os genótipos Baianinha e MEcu-72 pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) e o genótipo BRS CS01 pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). As manivas foram plantadas na posição vertical em vasos de 4 L contendo solo e composto orgânico (10%). As plantas foram mantidas em casa de vegetação em temperatura ambiente, situada na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Jaboticabal-SP.

2.2 Exposição das plantas de mandioca a herbivoria por *Spodoptera frugiperda*

Cinco plantas de cada genótipo em avaliação com três meses após o plantio foram infestadas com duas lagartas de quarto ínstar de *S. frugiperda* por planta. As

lagartas foram obtidas na criação do Laboratório de Ecologia Aplicada (APECOLAB). Antes de serem colocadas nas plantas, as lagartas utilizadas foram alimentadas por dois dias com folhas de mandioca de genótipo de mesa. As duas lagartas colocadas em cada planta foram depositadas na terceira folha completamente desenvolvida e mantidas em uma gaiola do tipo “voil”. Dois dias após a infestação, duas folhas acima e duas folhas abaixo da folha infestada foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer a -20°C até as etapas seguintes. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção dos materiais vegetais sem indução por herbivoria, porém sem a utilização das lagartas.

Após coletadas, as folhas foram maceradas em almofariz e pistilo com a adição de nitrogênio líquido, acondicionadas em tubo Falcon e liofilizadas por 72 horas a -80°C. Os extratos e as análises químicas foram realizadas no laboratório de Interação de Ecologia Molecular no Centro Alemão de Pesquisa Integrativa de Biodiversidade (iDiv) em Leipzig na Alemanha. Todo o material coletado e transportado estava em conformidade com as leis vigentes pelo SISGEN (Cadastro de acesso: ACF6CB7; Cadastro de remessa: RD03829).

2.3 Quantificação de fitormônios

A extração e purificação dos fitormônios foram realizadas segundo Machado et al. (2013) com modificações. Para a extração das amostras foliares liofilizadas, 20 mg de material vegetal foi solubilizado em 800 µL de solução metanol:água (70:30) contendo 40 ng de cada um dos seguintes padrões internos: D6-ABA, D6-AS (OIChemIm Ltd, Olomouc, República Tcheca), D6-AJ-Ile e D6-AJ (HPC Standards GmbH, Borsdorf, Alemanha). As amostras foram agitadas em vórtex por 10 minutos e centrifugadas por 2 min (14000 rpm, 4°C). O sobrenadante foi transferido para novo tubo Eppendorf e evaporado em Speed-Vac (Labconco, USA) em temperatura ambiente. O pellet foi ressuspenso em 200 µL de solução metanol:água (70:30) por 15 minutos em sonicador (Fisher Scientific, UK).

Os fitormônios foram analisados utilizando cromatografia líquida (Bruker Advance UHPLC, Bremen, Alemanha) acoplado a espectrometria de massas (Bruker Elite EvoQ Triple quad, Bremen, Alemanha) (LC-MS), segundo Schäfer et al. (2016).

A coluna utilizada foi Zorbax Eclipse XDB-C 18 (50 x 4,6 mm, 1,8 mm, Agilent Technologies, Boeblingen, Alemanha) com 0,05% de ácido fórmico em água e 0,05% de ácido fórmico em acetonitrila como fases móveis. As amostras foram analisadas em sequência aleatória incluindo uma amostra controle (metanol:água, 70:30) analisada a cada 10 leituras. O processamento dos dados foi realizado no programa "MS data Review" (Bruker MS Workstation, version 8.2). A concentração dos fitormônios foi calculado de forma relativa aos padrões internos e à quantidade de material utilizado (ng/mg).

2.4 Quantificação de cianeto (CN)

A quantificação de cianeto (CN) foi realizada pela técnica de eletrodos de íons seletivos para cianeto (Tuhtar, 1983). Foram pesados 20 mg de amostra liofilizada e acondicionados em tubos Eppendorf no quais foram adicionados 1 mL de KH_2PO_4 (0,2 M, pH 7.0) por tubo. As amostras foram homogeneizadas em moinho de esferas (Retsche mixer mill MM 400) por 1 minuto a 30 Hz, incubadas por 30 minutos a 37°C em banho maria e centrifugadas por 3 minutos a 15.000 g. O sobrenadante foi transferido para um Becker onde foram adicionados 0,2 mL de NaOH (10M) e o volume final foi ajustado para 20 mL com ddH₂O. A solução foi mantida sob constante agitação e a leitura foi realizada em eletrodos de íons seletivos para cianeto.

As concentrações de CN foram calculadas utilizando curva de calibração com padrão de cianeto (CN^-) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Alemanha) (1, 10, 50, 100, 500, 1000 μM , $y = -26,3 \ln(x) - 25,955$; $R^2 = 0,9968$) preparada nas mesmas condições do ensaio. Os resultados foram expressos em $\mu\text{M}/\text{mg}$.

2.5 Análise estatística

Os dados de concentrações dos diferentes fitormônios e de CN foram testados quanto à normalidade e homogeneidade da variância dos erros. As variáveis foram submetidas à ANOVA seguido do teste de comparação de médias

de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro ($P \leq 0,05$) utilizando o programa SISVAR (Ferreira, 2011).

3 Resultados

A herbivoria por *S. frugiperda* induziu alterações significativas da concentração de todos os fitormônios avaliados em função do genótipo testado (Figuras 1-5). Na ausência da herbivoria, os genótipos IAC-14 e IAC-90 apresentaram menores teores de ABA (~8 ng/mg) em relação aos demais (9-11 ng/mg). Após herbivoria, a concentração de ABA foi aumentada no genótipo IAC-90 e reduzida no genótipo IAC-Caapora o que resultou na separação dos genótipos IAC-14 e IAC-Caapora com concentrações inferiores de ABA (7-8 ng/mg) em relação aos demais genótipos (~10 ng/mg) (Figura 1).

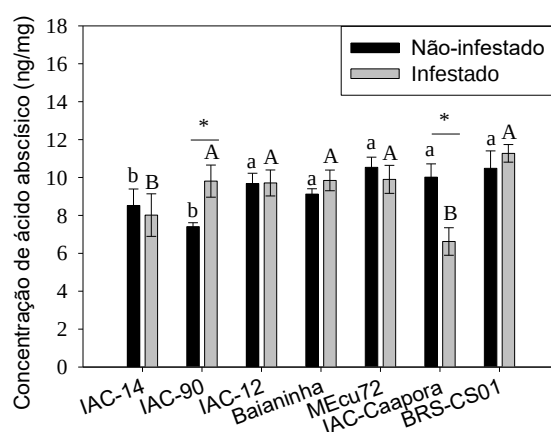


Figura 1. Concentração (ng/mg) de ácido abscísico (ABA) em sete genótipos de *Manihot esculenta*, não infestados (preta) e infestados (cinza) por lagartas de *Spodoptera frugiperda*. Médias $\pm$ erro padrão seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si para os genótipos não infestados (Scott-Knott, $P \geq 0,05$). Médias $\pm$ erro padrão de mesma letra maiúscula não diferem entre si para os genótipos infestados (Scott-Knott, $P > 0,05$). *diferença no genótipo após infestação (teste t, $P > 0,05$)

A concentração constitutiva de AS foi superior no genótipo MEcu 72 (31,5 ng/mg), seguida por BRS-CS01 (24,7 ng/mg), Baianinha e IAC14 (~15 ng/mg) e, finalmente, por IAC-90, IAC-12 e IAC-Caapora (10 ng/mg). Após herbivoria, a concentração de AS foi reduzida nos genótipos Baianinha e MEcu 72 e aumentada

nos genótipos IAC-Caapora e BRS-CS01. A herbivoria resultou em maiores concentrações de AS no genótipo BRS-CS01 (33,1 ng/mg), seguido por IAC-Caapora (25,6 ng/mg) e um grupo com os demais genótipos com aproximadamente 10-15 ng/mg (Figura 2).

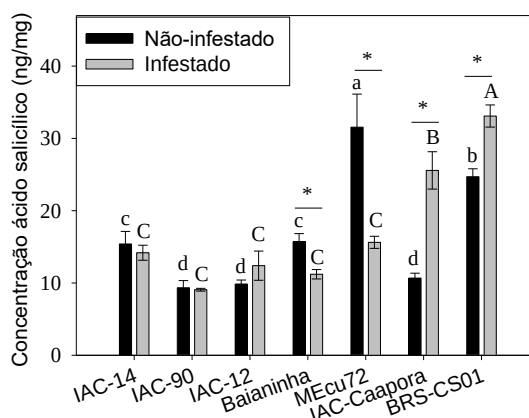


Figura 2. Concentração (ng/mg) de ácido salicílico (AS) em sete genótipos de *Manihot esculenta*, não infestados (preta) e infestados (cinza) por lagartas de *Spodoptera frugiperda*. Médias $\pm$ erro padrão seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si para os genótipos não infestados (Scott-Knott, $P \geq 0,05$). Médias $\pm$ erro padrão de mesma letra maiúscula não diferem entre si para os genótipos infestados (Scott-Knott, $P > 0,05$). *diferença no genótipo após infestação (teste t, $P > 0,05$)

A concentração constitutiva de OPDA, uma molécula sinalizadora, bem como precursora do AJ, foi superior nos genótipos IAC-Caapora e BRS-CS01 (~65 ng/mg) seguida por MEcu 72 (25,6 ng/mg), pelos genótipos Baianinha e IAC-12 (~15 ng/mg) e, finalmente pelos genótipos IAC-90 e IAC-14 (~5 ng/mg). A herbivoria induziu o aumento da concentração de OPDA nos genótipos IAC-90 e BRS-CS01, com a concentração do último genótipo aumentada 127% em relação à não infestada (83,0 ng/mg). Após herbivoria, o genótipo BRS-CS01 foi o de maior concentração de OPDA (148,0 ng/mg), seguido pelo genótipo IAC-Caapora (53,1 ng/mg), um agrupamento dos genótipos MEcu 72, Baianinha, IAC-12 e IAC-90 (18-25 ng/mg) e, finalmente, pelo genótipo IAC-14 (7,3 ng/mg) (Figura 3).

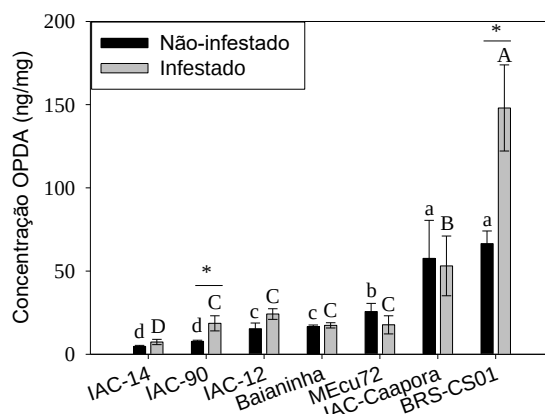


Figura 3. Concentração (ng/mg) de OPDA em sete genótipos de *Manihot esculenta*, não infestados (preta) e infestados (cinza) por lagartas de *Spodoptera frugiperda*. Médias $\pm$ erro padrão seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si para os genótipos não infestados (Scott-Knott, $P \geq 0,05$). Médias $\pm$ erro padrão de mesma letra maiúscula não diferem entre si para os genótipos infestados (Scott-Knott, $P > 0,05$). *diferença no genótipo após infestação (teste t, $P > 0,05$)

A concentração constitutiva de AJ foi superior nos genótipo IAC-12 (13,7 ng/mg), intermediária no genótipo MEcu 72 (9,7 ng/mg), inferior nos genótipos Baianinha, BRS-CS01 e IAC-14 (2-4 ng/mg) e não detectáveis nos genótipos IAC-Caapora e IAC-90. A herbivoria resultou no aumento das concentrações de AJ nos genótipos IAC-90, Baianinha e IAC-Caapora e redução nas concentrações de AJ nos genótipos IAC-12 e MEcu 72. Após herbivoria, os genótipos IAC-90, IAC-12, Baianinha e BRS-CS01 foram agrupados por apresentarem concentração de AJ aproximada de 6,0 ng/mg, os genótipos IAC-Caapora e MEcu 72 com concentração aproximada de 2,5 ng/mg e o genótipo IAC-14 não apresentou níveis detectáveis de AJ após herbivoria (Figura 4).

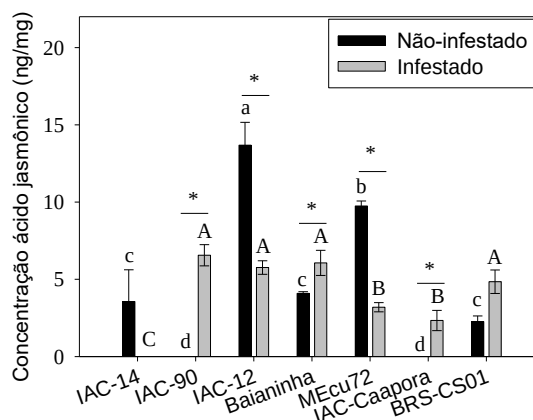


Figura 4. Concentração (ng/mg) de ácido jasmônico (AJ) em sete genótipos de *Manihot esculenta*, não infestados (preta) e infestados (cinza) por lagartas de *Spodoptera frugiperda*. Médias $\pm$ erro padrão seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si para os genótipos não infestados (Scott-Knott, $P \geq 0,05$). Médias $\pm$ erro padrão de mesma letra maiúscula não diferem entre si para os genótipos infestados (Scott-Knott, $P > 0,05$). *diferença no genótipo após infestação (teste t, $P > 0,05$)

A concentração constitutiva de AJ-Ile, a forma ativa de AJ e sinalizadora de respostas de defesa, foi superior nos genótipos IAC-12 e MEcu 72 (~ 3 ng/mg), intermediária nos genótipos Baianinha e IAC-14 ($\sim 0,5$ ng/mg) e inferior nos genótipos IAC-90, IAC-Caapora e BRS-CS01 ($> 0,1$ ng/mg). Após herbivoria, a concentração de AJ-Ile foi aumentada no genótipo IAC-90 e reduzida nos genótipos IAC-14, IAC-12 e MEcu 72. Três grupos distintos foram formados após herbivoria: um primeiro grupo formado pelos genótipos IAC-90, IAC-12 e Baianinha ($\sim 0,5$ ng/mg), outro formado pelos genótipos MEcu 72 e BRS-CS01 ($\sim 0,2$ ng/mg) e outro grupo com os genótipos IAC-14 e IAC-Caapora ($> 0,1$ ng/mg) (Figura 5).

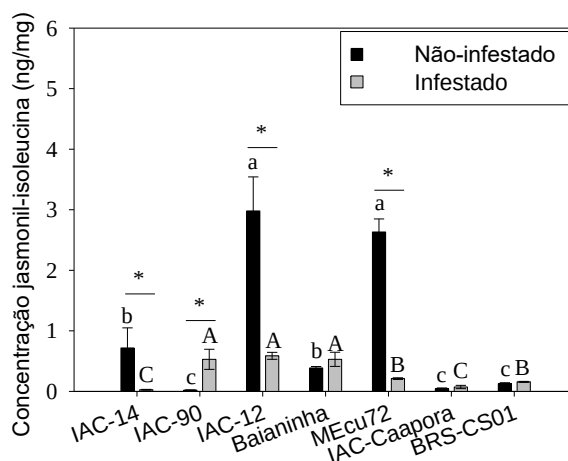


Figura 5. Concentração (ng/mg) de jasmonil-isoleucina (AJ-Ile) em sete genótipos de *Manihot esculenta*, não infestados (preta) e infestados (cinza) por lagartas de *Spodoptera frugiperda*. Médias $\pm$ erro padrão seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si para os genótipos não infestados (Scott-Knott, $P \geq 0,05$). Médias $\pm$ erro padrão de mesma letra maiúscula não diferem entre si para os genótipos infestados (Scott-Knott, $P > 0,05$). *diferença no genótipo após infestação (teste t, $P > 0,05$)

A concentração constitutiva de CN foi maior no genótipo IAC-Caapora (0,84 $\mu\text{M}/\text{mg}$) em relação aos demais genótipos ($\sim 0,6 \mu\text{M}/\text{mg}$). Após herbivoria, a concentração de CN não diferiu entre os genótipos (Figura 6).

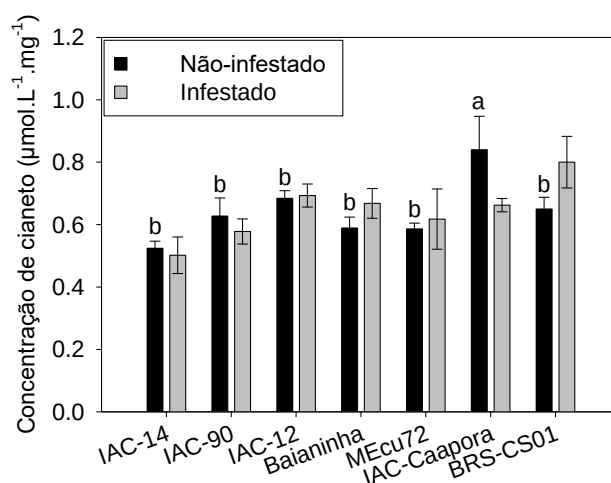


Figura 6. Concentração de cianeto (CN) ($\mu\text{M}/\text{mg}$) em sete genótipos de *Manihot esculenta*, não infestados (preta) e infestados (cinza) por lagartas de *Spodoptera frugiperda*. Médias $\pm$ erro padrão seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si para os genótipos não infestados (Scott-Knott, $P > 0,05$).

4. Discussão

A concentração constitutiva de fitormônios em uma planta sugere sua atividade de resposta pré-formada a um determinado herbívoro ou grupo de herbívoros. Por exemplo, o genótipo MEcu 72, que figura entre os genótipos menos adequados para o desenvolvimento larval de *S. frugiperda* e de insetos sugadores (capítulo 2 da presente tese, Bellotti e Arias 2001, Carabalí et al. 2010, Omongo et al. 2012; Barilli et al., 2019), apresenta constitutivamente as concentrações dos fitormônios ABA, AS, AJ e AJ-Ile elevadas em relação aos genótipos IAC-90 e IAC-14 cujas folhas, de maneira geral, foram consideradas mais adequadas para o desenvolvimento larval de *S. frugiperda*.

Com a concentração constitutiva superior de fitormônios associados a respostas de defesa em plantas, espera-se que rotas biossintéticas para a produção de compostos de defesa estejam ativas e, conseqüentemente, que os compostos de defesa estejam em maiores concentrações. Em maiores concentrações, efeitos mais evidentes das moléculas de defesa sobre os herbívoros são esperados. Como possibilidade de moléculas antiherbívoros produzidas pela maior concentração de fitormônios presentes no genótipo MEcu 72, observam-se os compostos fenólicos. Em MEcu 72, os compostos fenólicos totais são mais abundantes em relação aos genótipos IAC-90 e IAC-14 (capítulo 2 da presente tese). Os fitormônios ABA, etileno, AJ e AS regulam a produção de compostos fenólicos com potencial atividade antiherbivoria em plantas (Kendal e Bjostad, 1990; Jiang e Joyce, 2003; Ali et al., 2007) e podem explicar a maior concentração constitutiva de compostos fenólicos em MEcu 72 e sua inadequação ao desenvolvimento de herbívoros.

Outra situação avaliada foi a alteração da concentração de fitormônios após alimentação da planta pelo inseto, a chamada resistência induzida por herbivoria. Após a herbivoria por pragas mastigadoras, as plantas geralmente apresentam um aumento na produção do fitormônio modulador ABA e, conseqüentemente, na produção de AJ e dos compostos das vias reguladas pelo mesmo (Lorenzo e Solano, 2005). Diferente do que foi observado em plantas não expostas a herbívoros, a regulação fitormonal após herbivoria não demonstrou um padrão claro de aumento ou redução nos materiais avaliados.

A herbivoria por *S. frugiperda* ativou uma expressiva síntese de OPDA no genótipo BRS CS01. O OPDA é um composto precursor do AJ, porém, não foram observados aumentos significativos na concentração de AJ e/ou AJ-Ile para o genótipo em questão. Por ser, além de precursora, uma molécula biologicamente ativa independente do fitormônio AJ, o aumento da síntese de OPDA, pode levar a uma maior produção de compostos secundários relacionadas à defesa da planta tanto contra insetos quanto contra patógenos (Stintzi et al., 2001; Taki et al., 2005). O genótipo BRS-CS01 apresenta a característica de alta produtividade aliada à resistência a doenças, aparentemente explicada pelo aumento do OPDA.

Para alguns genótipos foi observada redução na concentração de alguns fitormônios após a herbivoria, como exemplo, no genótipo MEcu 72 a redução nos níveis de todos os fitormônios. Essa redução pode ser explicada pela produção de compostos voláteis liberados pela planta para a comunicação planta-planta e/ou outras interações tróficas. Os compostos salicilato de metila (MeSA) e jasmonato de metila (MeJA) são exemplos de voláteis derivados do AS e AJ, que estão relacionados nessa comunicação (Erb e Glaucer, 2010).

De maneira geral, observou-se que, apesar de serem todos da mesma espécie, os genótipos apresentaram formas distintas de resposta à herbivoria. Alguns genótipos tiveram as concentrações de fitormônios reduzidas e outros aumentadas de forma que, com poucas exceções, os genótipos apresentaram concentrações semelhantes de fitormônios após herbivoria.

Além das correlações diretas (aumento na concentração de um hormônio resultando em um fenótipo), interconexões entre as vias hormonais conhecidas como "*crosstalk*" devem ser consideradas. Essa rede complexa de informações permite as plantas ajustarem suas defesas contra diferentes estímulos (Pieterse et al. 2012; Vos et al., 2015).

Em nenhum genótipo foi verificada a indução da expressão de CN após herbivoria. Aparentemente, as vias biossintéticas de CN nos genótipos de mandioca avaliados não são reguladas pelos fitormônios quantificados. Diferente do observado no presente trabalho, a herbivoria de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) e *Epilachna varivestis* Mulsant, 1850 (Coleoptera: Coccinellidae) resultou no aumento de CN em *Phaseolus lunatus* L. (Ballhorn et al., 2006). O

incremento de CN ocorreu apenas no folíolo atacado e não foi verificado na folha inteira, o que sugere que a indução da produção de CN varia de acordo com a espécie/genótipo e o herbívoro associado. Dessa forma, o incremento de CN nos genótipos de mandioca pode ter ocorrido apenas na folha atacada por *S. frugiperda* e não nas folhas analisadas neste trabalho.

O herbívoro-modelo *S. frugiperda*, um inseto não especialista em herbivoria sobre mandioca, causou injúria inferior ao observado pela alimentação de, por exemplo, lagartas de *Erinnyis ello* L., 1758 (Lepidoptera: Sphingidae), uma praga específica da mandioca (Pratissoli et al., 2002). Porém, mesmo com essa menor injúria, verificamos a ocorrência de alterações nos níveis dos fitormônios avaliados. O ataque de herbívoros especialista podem levar a diferentes alterações na modulação desses compostos, seja pelo menor consumo, pela diferente composição química da saliva dos insetos, que servirão de elicitores para a produção dos fitormônios, ou pela coevolução entre a planta e o inseto utilizado (Ali e Agrawal, 2012).

5 Conclusões

O genótipo MEcu 72 apresenta as maiores concentrações constitutivas dos fitormônios avaliados.

Apesar de todos os genótipos serem da mesma espécie, houve distintas formas de resposta à herbivoria por *S. frugiperda*.

As vias biossintéticas de CN nos genótipos de mandioca não foram reguladas pelos fitormônios avaliados.

6 Referências

Ali JG, Agrawal AA (2012) Specialist versus generalist insect herbivores and plant defense. **Trends in Plant Science** 17(5):293-302.

Ali MB, Hahn EJ, Paek KY (2007) Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures. **Molecules** 12(3):607-621.

Anderson JP, Badruzsaufari E, Schenk PM, Manners JM, Desmond OJ, Ehlert C, Maclean DJ, Ebert PR, Kazan K (2004) Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. **The Plant Cell** 16:3460-3479.

Ballhorn DJ, Heil M, Lieberei R (2006) Phenotypic plasticity of cyanogenesis in lima bean *Phaseolus lunatus* - activity and activation of β -glucosidase. **Journal of Chemical Ecology** 32(2):261-275.

Bari R, Jones JDG (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. **Plant Molecular Biology** 69(4):473-488.

Bellotti AC, Riis L (1994) Cassava cyanogenic potential and resistance to pests and diseases. **Acta Horticulturae** 375:141-151.

Bellotti AC, Arias B (2001) Host plant resistance to whiteflies with emphasis on cassava as a case study. **Crop Protection** 20:813-823.

Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science** 161:839-851.

Carabalí A, Bellotti AC, Montoya-Lerma J, Fregene M (2010) Resistance to the whitefly, *Aleurotrachelus socialis*, in wild populations of cassava, *Manihot tristis*. **Journal of Insect Science** 10:1-10.

Silva DM, Bueno AF, Andrade K, Stecca CS, Oliveira PM, Neves J, Oliveira MCN (2017) Biology and nutrition of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) fed on different food sources. **Scientia Agricola** 74(1):18-31.

Erb M, Glauser G (2010) Family business: multiple members of major phytohormone classes orchestrate plant stress responses. **Chemistry-A European Journal** 16:10280-10289.

Ferreira D (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** 35(6):1039-1042.

Jiang Y, Joyce, DC (2003) ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. **Plant Growth Regulation** 39(2):171-174.

Kendall DM, Bjostad LB (1990) Phytohormone ecology. **Journal of chemical ecology** 16(3):981-991.

Lorenzo O, Solano R (2005) Molecular players regulating the jasmonate signalling network. **Current Opinion in Plant Biology** 8:532-540.

Machado RA, Ferrieri AP, Robert CA, Glauser G, Kallenbach M, Baldwin IT, Erb M (2013) Leaf-herbivore attack reduces carbon reserves and regrowth from the roots via jasmonate and auxin signaling. **New Phytologist** 200:1234-1246.

- McMahon JM, White WLB, Sayre RT (1995) Cyanogenesis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal of Experimental Botany** 46(288):731-741.
- Omongo CA, Kawuki R, Bellotti AC, Alicai T, Baguma Y, Maruthim MN, Bua A, Colvin J (2012) African cassava whitefly, *Bemisia tabaci*, resistance in African and South American cassava genotypes. **Journal of Integrative Agriculture** 11:327-336.
- Pieterse CM, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SC (2012) Hormonal modulation of plant immunity. **Annual Review of Cell and Developmental Biology** 28:489-521.
- Pratissoli D, Zanúncio JC, Barros R, Oliveira HN (2002) Leaf consumption and duration of instars of the cassava defoliator *Erinnyis ello* (L., 1758) (Lepidoptera, Sphingidae). **Revista Brasileira de Entomologia** 46(3):251-254.
- Silva DM, Bueno AF, Andrade K, Stecca CS, Oliveira PM, Neves J, Oliveira MCN (2017) Biology and nutrition of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) fed on different food sources. **Scientia Agricola** 74(1):18-31.
- Siritunga D, Sayre R (2004) Engineering cyanogen synthesis and turnover in cassava (*Manihot esculenta*). **Plant Molecular Biology** 56:661-669.
- Schäfer M, Brütting C, Baldwin IT, Kallenbach M (2016) High-throughput quantification of more than 100 primary-and secondary-metabolites, and phytohormones by a single solid-phase extraction based sample preparation with analysis by UHPLC–HESI–MS/MS. **Plant Methods** 12:1.
- Stintzi A, Weber H, Reymond P, Browse J, Farmer EE (2001) Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones. **PNAS** 98(22):12837-12842.
- Taki N, Sasaki-Sekimoto Y, Obayashi T, Kikuta A, Kobayashi K, Ainai T, Yagi K, Sakurai N, Suzuki H, Masuda T, Takamiya K, Shibata D, Kobayashi Y, Ohta H (2005) 12-Oxo-Phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in Arabidopsis. **Plant Physiology** 139:1268-1283.
- Tuhtar D (1983) Selectivity coefficients of a cyanide ion electrode. **Analytical Chemistry** 55(13):2205-2208.
- Vallad GE, Goodman RM (2004) Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. **Crop Science** 44:1920-1934.
- Vos IA, Moritz L, Pieterse CM, Van Wees SC (2015) Impact of hormonal crosstalk on plant resistance and fitness under multi-attacker conditions. **Frontiers of Plant Science** 6:639.
- Zarate SI, Kempema LA, Walling LL (2007) Silverleaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. **Plant Physiology** 143:866-875.

CAPÍTULO 4 - Comparação da composição química de seis genótipos de *Manihot esculenta* Crantz com base em suas interações com insetos pragas

RESUMO - Plantas de mandioca são conhecidas por sua rusticidade e produção de compostos de defesa contra herbívoros tais como os compostos cianogênicos. Mesmo assim, plantas de mandioca podem ser colonizadas e utilizadas por uma série de insetos específicos, entre eles os sugadores. Na busca de formas de reduzir o impacto negativo desses insetos sobre as plantas de mandioca, genótipos que resultam em interferências negativas sobre o desenvolvimento de insetos sugadores foram identificados. Porém, pouco se sabe a respeito da composição química das folhas de plantas de mandioca e, sobretudo, dos genótipos com maiores efeitos negativos no desenvolvimento dos insetos. Com isso, o presente trabalho foi conduzido para avaliar parâmetros químicos de seis genótipos de mandioca selecionados em função de suas relações com insetos sugadores (IAC-14, IAC-12, IAC-90, IAC-Caapora, MEcu 72 e Baianinha). Análises metabolômicas não direcionadas (LC-MS) e a quantificação da atividade hemaglutinante (AH) foram realizadas nos seis genótipos. O genótipo MEcu 72, considerado um padrão de resistência para os insetos sugadores, apresentou 10 metabólitos exclusivos e um metabólito com abundância de 2 a 5 vezes superior aos demais além de maior atividade hemaglutinante. As possíveis relações desses compostos presentes exclusivamente ou em maiores concentrações em MEcu 72 com as interferências negativas que esse genótipo causa em insetos sugadores são discutidas.

Palavras-chave: Cromatografia líquida, defesa química, metabolômica, lectinas

CHAPTER 4 - Comparative chemical composition of six genotypes of *Manihot esculenta* Crantz based on their interactions with insect pests

ABSTRACT - Cassava plants are rustic and produce defense compounds against herbivores such as cyanogenic compounds. Nevertheless, cassava plants can be colonized and used by a number of specific herbivores, among those sucking insects. In search of ways to reduce the negative impact of these insects on cassava plants, genotypes that result in negative interferences on the development of sap sucking insects were identified. However, there is a lack of information about the chemical composition of the cassava leaves, mainly from genotypes with the greatest negative effects against insect development. Thus, the present work was carried out to evaluate the chemical parameters of six cassava genotypes (IAC-14, IAC-12, IAC-90, IAC-Caapora, MEcu 72 and Baianinha). Non-targeted metabolomic analysis (LC-MS) and quantification of haemagglutinating activity (HA) were performed in the six genotypes. In the MEcu 72 genotype, a resistance standard for sap sucking insects, we found 10 exclusive metabolites and a metabolite with abundance 2 to 5 times superior to the others and greater hemagglutinating activity. The possible relationships of these compounds present exclusively or in higher concentrations in MEcu 72 genotype with the negative interferences in sap sucking insects are discussed.

KEYWORDS: Chemical defense, lectins, liquid chromatography, metabolomics

1 Introdução

As plantas de *Manihot esculenta* Crantz apresentam a característica de produção de glicosídeos cianogênicos, tanto pelas folhas como pelas raízes (Siritunga e Sayre, 2004). Esses compostos cianogênicos são relacionados à defesa das plantas à herbívoros, principalmente os generalistas (Bellotti e Riis, 1994). Apesar da produção desses compostos, são reportadas cerca de 200 espécies de pragas associadas à cultura, adaptadas em vários graus à essa defesa química da planta bem como aos compostos laticíferos (Bellotti et al., 2012). Dentre essas pragas, destacam-se os insetos sugadores, como as cochonilhas, *Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero (Hemiptera: Pseudococcidae) e *P. herreni* Cox & Williams (Hemiptera: Pseudococcidae), as moscas brancas, *Bemisa tabaci* (Genn.) biótipo B, *Aleurotrachelus socialis* Bondar, *Bemisia tuberculata* (Bondar) e *Aleurothrixus aepim* (Goeldi) (Hemiptera: Aleyrodidae) e os percevejos de renda *Vatiga manihotae* (Drake) e *V. illudens* (Drake) (Hemiptera: Tingidae) (Bellotti et al., 2012; Pietrowski et al., 2014; Vásquez-Ordóñez et al., 2015).

Em estudos realizados avaliando-se o desenvolvimento de pragas em diversos genótipos de mandioca, foram observados diferentes graus e formas de interferência no desenvolvimento de pragas de acordo com o genótipo avaliado (Tertuliano et al, 1993; Bellotti e Arias, 2001; Calatayud e Le Ru, 2006; Carabalí et al., 2010; Bellotti et al., 2012; Rheinheimer, 2013; Oliveira et al., 2016; Barilli et al., 2019). Por exemplo, o genótipo MEcu 72 resultou na deformação e mortalidade de aproximadamente 70% de ninfas de mosca branca e redução na fecundidade de adultos de mosca branca, cochonilha e percevejo de renda (Carabalí et al. 2010; Rheinheimer, 2013; Oliveira et al., 2016; Barilli et al., 2019).

Entre as formas de defesa das plantas a insetos pragas, observa-se a produção de metabólitos secundários que apresentam propriedades antinutritivas ou tóxicas a herbívoros (Bourgau et al. 2001, Ibanez et al. 2012). Algumas moléculas com potencial inseticida são descritas em plantas de mandioca, como o ácido gálico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, rutina, saponinas, inibidores de proteases e lectinas (Calatayud et al. 1994; Wobeto et al. 2007; Silva et al., 2010; Santos et al. 2013; Pinto-Zevallos et al., 2016; Gazola et al., 2018). Porém, um

grande potencial de moléculas inseticidas ainda é sugerido e poucas são as análises para detecção e identificação de moléculas inseticidas em genótipos de mandioca com maior resistência.

No presente trabalho, foram analisados parâmetros químicos de seis genótipos de mandioca selecionados em função de suas relações com insetos sugadores (IAC-14, IAC-12, IAC-90, IAC-Caapora, MEcu 72 e Baianinha) por meio de análises metabolômicas não direcionadas (LC-MS) e a quantificação da atividade hemaglutinante (AH). Os resultados obtidos foram correlacionados com trabalhos prévios que descrevem as interferências dos genótipos analisados sobre o desenvolvimento de insetos sugadores.

2 Material e Métodos

2.1 Material vegetal

Foram avaliados cinco genótipos que apresentam diferentes níveis de resistência (IAC-14, IAC-12, IAC-90, IAC-Caapora e MEcu 72) e um genótipo considerado suscetível (Baianinha) a insetos sugadores (Rheinheimer, 2013; Barilli et al., 2019; Wengrat et al., dados não publicados). Todo o material vegetal foi cultivado em áreas experimentais situadas na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Jaboticabal-SP.

Para a quantificação da atividade hemaglutinante (AH), as plantas de mandioca foram cultivadas a campo, dispostas em duas linhas por genótipo com 20 plantas por linha e espaçamento de 0,5 m entre plantas e 1 m entre linhas. Após quatro meses do plantio foram coletadas aproximadamente 50 folhas de mandioca sem ocorrência de pragas ou doenças por genótipo. As folhas foram devidamente identificadas, lavadas em água corrente, secas e mantidas em freezer (-20°C) até sua utilização para o preparo dos extratos.

Para a análise por LC-MS, foram cultivados cinco vasos por genótipo. As manivas foram plantadas na posição vertical em vasos de 4L contendo solo e 10% de composto orgânico e mantidas em casa de vegetação com temperatura ambiente

e irrigadas diariamente. Após três meses do plantio, foram coletadas quatro folhas por planta e imediatamente acondicionadas em nitrogênio líquido. Após coletadas, as folhas foram maceradas em almofariz e pistilo com a adição de nitrogênio líquido, acondicionadas em tubo Falcon e liofilizadas por 72 horas a -80°C.

2.2 Perfil metabólico

Foi realizado estudo de metabolômica não direcionada para observação do perfil metabólico dos seis genótipos estudados. As análises de LC-MS foram realizadas no laboratório de Interação de Ecologia Molecular no Centro Alemão de Pesquisa Integrativa de Biodiversidade (iDiv) em Leipzig na Alemanha. Todo o material coletado e transportado estava em conformidade com as leis vigentes pelo SISGEN (Cadastro de acesso: ACF6CB7; Cadastro de remessa: RD03829).

A extração foi realizada seguindo metodologia adaptada de Vos et al. (2012). As amostras foliares liofilizadas (± 20 mg) foram duplamente extraídas com 1 mL de MeOH:tampão de acetato (50 mM, pH 4,8) (75:25, v:v) em tubo Eppendorf de 2 mL com duas esferas (5 mm Ø) e agitado em moinho de esfera (Retsche mixer mill MM 400) por 5 min a 30 Hz. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (15 min a 15.000 g) e os sobrenadantes foram combinados e armazenados a -80°C em freezer.

O extrato bruto foi diluído (1:5) em MeOH:tampão de acetato (pH 4,8) (50:50, v:v) e 10 μ L foram injetados e analisados em Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Pressão UltiMate™ 3000 (Thermo Scientific Dionex, Sunnyvale, USA) equipado com coluna Acclaim RSLC 120 (C₁₈, 150 x 2,1 mm, tamanho de partícula 2,2 μ m, ThermoFisher Scientific). A temperatura da coluna utilizada foi de 40°C, usando o seguinte gradiente a uma taxa de fluxo de 0,4 mL/min: 0-2 min isocrático 95% A (água/ácido fórmico 0,05%), 5% de B (acetonitrila/ácido fórmico 0,05%); 2-12 min, linear de 5 a 50% B; 12 a 13 min, lineares de 50 a 95% de B; 13 a 15 min, isocrático 95% B; 15 a 16 min, linear de 95 a 5% de B; 16-20 min, isocrático 5% B.

Os compostos foram detectados com um espectrômetro de massa quadrupolo/tempo de voo (qToF-MS, Bruker maXis impact HD; Bruker, Billerica, USA) aplicando as seguintes condições em modo positivo: faixa de varredura 50-1500 *m/z*

taxa de aquisição de 3 Hz; tensão capilar 4500 V; pressão do nebulizador 2,5 bar, gás seco 11 L/min, temperatura seca 220°C. A calibração em massa foi realizada usando aglomerados de formiato de sódio [solução 10 mM de NaOH em água e isopropanol 50/50 (v/v) contendo 0,2% de ácido fórmico].

Os espectros de massa do conjunto de dados obtidos a partir da análise das amostras diluídas 1:5 foram processados nos pacotes XCMS e CAMERA em R (Smith et al. 2006; Kuhl et al. 2012). O alinhamento dos picos foi feito dentro de um tempo de retenção entre 40 e 1300 segundos, relação sinal/ruído (s/n) ≥ 100 , desvio máximo de 5 ppm, intervalo de tempo de retenção (Ret) de 3 segundos, intervalo de m/z de 0,01 e ocorrência mínima em três de quatro amostras em pelo menos um grupo de tratamento. Os *features* resultantes foram agrupados para pertencer ao mesmo composto após a correção simétrica do tempo de retenção, dentro de um intervalo de Ret de no máximo 5 seg e correlação mútua mínima de 0,6. As intensidades dos *features* foram normalizadas pelo peso do material foliar usado para extração. Os grupos de *features*, potencialmente representando compostos individuais, foram reduzidos a um *feature* para representar o respectivo composto em análise posterior. Isso foi feito aplicando a abordagem heurística máxima interna, que seleciona o recurso com a intensidade mais alta na maioria das amostras.

2.3 Atividade hemaglutinante

Para determinação da atividade hemaglutinante, foi preparado extrato de folhas de mandioca seguindo procedimento adaptado de Silva (2010). Após pesadas, as folhas frescas (sem pecíolo) foram maceradas em almofariz e pistilo com a adição de nitrogênio líquido. O material particulado obtido após a maceração foi transferido para tubo Falcon (50 mL), adicionado 5% de PVPP e homogeneizado em água deionizada na proporção de 1:5 (m/V). A mistura foi colocada sob agitação mecânica por inversão à 4°C por 15 min. Após esse período, a amostra foi filtrada em tecido tipo “voil”, centrifugada (12.000xg, 15 min, 4°C) e mantidas em freezer (-20°C).

Foi realizado um procedimento de precipitação das proteínas nos extratos brutos para eliminação de moléculas de baixo peso molecular presentes nos

extratos de folhas. Uma alíquota de 3 mL de extrato bruto foi acondicionado em tubo Falcon (15 mL) e adicionado 12 mL de acetona (-20°C), resultado em uma solução de 80% de acetona para precipitação das proteínas. Após repouso overnight em freezer (-20°C), as amostras foram centrifugadas (12.000xg, 15 min, 4°C), o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco em temperatura ambiente para eliminação da acetona. O precipitado foi ressuscitado em 1 mL de água deionizada e as amostras foram mantidas em freezer (-20°C).

A atividade hemaglutinante (AH) foi realizada seguindo metodologia adaptada de Wang et al. (1995). Primeiramente, uma suspensão de hemácias a 2% foi preparada. A suspensão de eritrócitos foi preparada com 5 mL de sangue humano tipo A Rh positivo coletado em tubo de citrato. A solução foi lavada com solução PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ anidro 10 mM e KH₂PO₄ 2 mM) e centrifugada (2000rpm, 10 min, temperatura ambiente) por três vezes até obtenção de uma massa de eritrócitos íntegra, livre de soro e material hemolisado. O sobrenadante obtido foi descartado e o precipitado submetido à diluição em PBS para obtenção da solução a 2% (v/v).

Os extratos das folhas de mandioca preparados anteriormente foram submetidos a uma série de diluições na base 2 (2⁰, 2¹, 2², 2³, 2⁴, 2⁵) e transferidos 50 µL de cada diluição para poços de placas de microtitulação de fundo redondo. Todas as diluições foram misturadas com 50 µL da solução de hemácias (2%). Após 90 minutos, foi realizada leitura visual da aglutinação das hemácias, por meio da observação da não formação de sedimento de hemácias ao fundo do poço. Os resultados foram expressos em número de unidades hemaglutinantes (UH), que é calculado a partir do inverso do título da maior diluição que ainda apresentou aglutinação visível por grama de folha fresca.

Como controle negativo, os extratos foliares foram incubados por 20 minutos à 100°C em banho maria e a AH foi realizada conforme descrito anteriormente.

2.4 Análise estatística

A matriz de dados resultantes do perfil metabólico foi analisada estatisticamente utilizando o programa MetaboAnalyst (Xia e Wishart, 2016), no qual os valores foram transformados em log. A análise de variância (ANOVA) foi realizada para identificar os *features* diferencialmente abundantes entre os grupos, seguida do teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Os *features* diferencialmente abundantes foram utilizados para a construção de *heatmap* e observação dos *features* presentes em maior quantidade no genótipo MEcu 72.

Os dados de AH foram testados quanto à normalidade e homogeneidade da variância dos erros. As variáveis foram submetidas à ANOVA seguido do teste de comparação de médias de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro ($P \leq 0,05$) utilizando o programa SISVAR (Ferreira, 2011).

3 Resultados

No total, a análise de LS-MS resultou na detecção de 606 *features* nos genótipos estudados. Entre esses, 62 *features* apresentaram abundância diferente em pelo um genótipo (Figura 1).

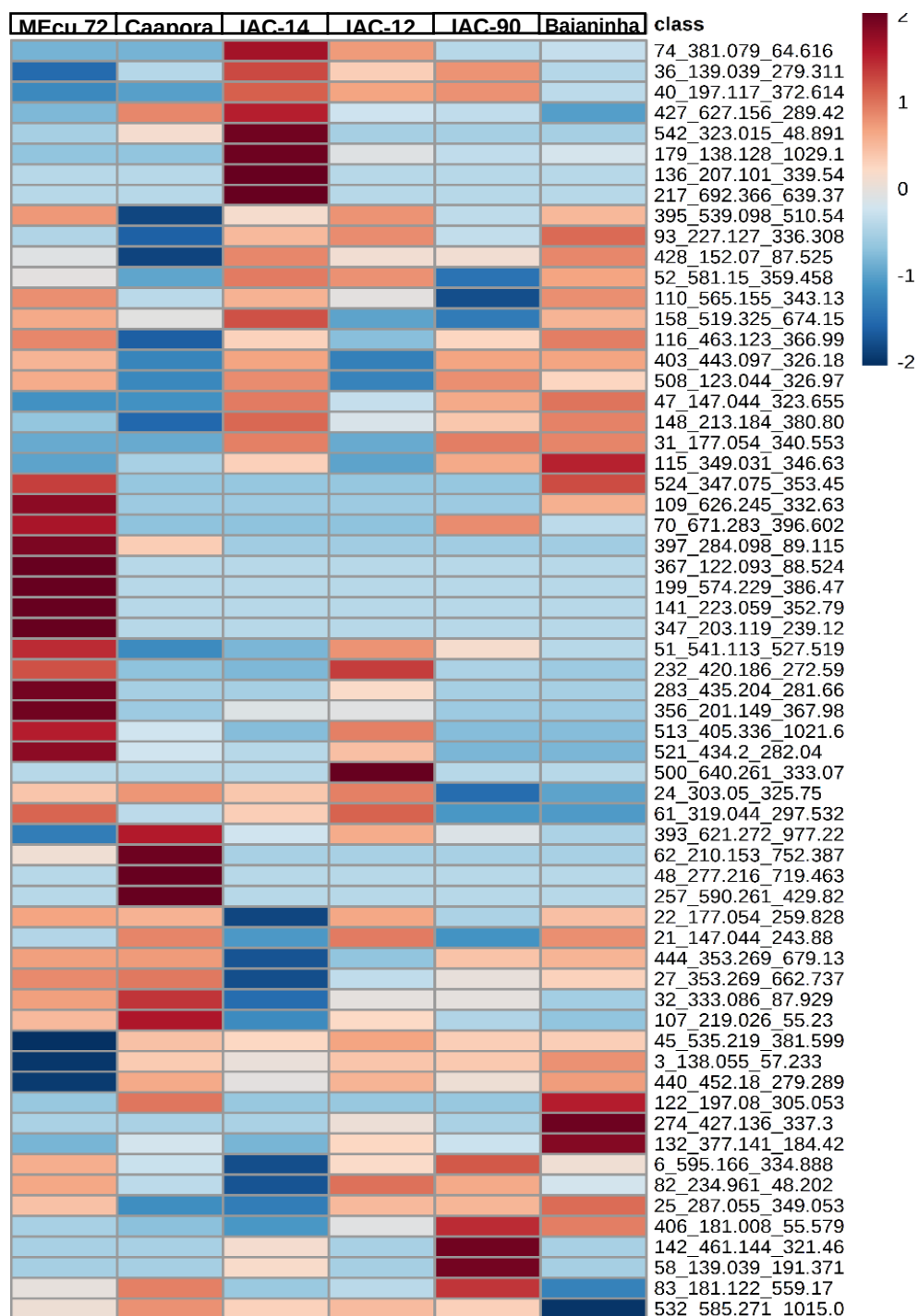


Figura 1. *Heatmap* dos *features* que apresentam diferença significativa entre os extratos de folhas de genótipos de mandioca (ANOVA, $P \leq 0,05$). As colunas representam o agrupamento das repetições biológicas dos genótipos, enquanto que as linhas representam os metabólitos. O aumento na intensidade de vermelho e azul indicam abundância elevada ou diminuta, respectivamente, de um metabólito em relação a abundância mediana do metabólito.

No *heatmap* elaborado é possível observar 14 *features* presentes predominantemente no genótipo MEcu 72. Os *features* no mesmo intervalo de Ret (mínimo e máximo) foram considerados um metabólito e, de acordo com esse parâmetro, foram enumerados 11 metabólitos (Figura 2). Cinco metabólitos (1-5) foram encontrados apenas em MEcu 72, sendo o metabólito 4 encontrado em baixíssima abundância. Dois metabólitos (6 e 7) foram detectados em MEcu 72 e em baixa abundância relativa em IAC-12. Três metabólitos (8, 9 e 11) em MEcu 72 e em abundâncias relativas inferiores em Baianinha. Um metabólito (10) detectado em MEcu 72 e também em IAC-90 em abundância relativa inferior. O metabólito 11 foi o único observado em todos os genótipos, com abundância relativa de 2 a 5 vezes superior em MEcu 72 em relação aos demais genótipos (Figura 2).

Metabólito	<i>m/z</i>	Ret (min)	1	2	3	4	5	6
1	122.0933	1.475397						
	284.0982	1.485252						
2	203.1186	3.985418						
3	223.0593	5.879864						
4	201.1487	6.133126						
5	574.2292	6.441244						
6	420.186	4.543186						
	435.2044	4.694401						
	434.2003	4.700667						
7	405.3362	17.02691						
8	626.2453	5.543982						
9	347.0753	5.890914						
10	671.2828	6.610026						
11	541.1128	8.791988						

Figura 2.- Metabólitos (*m/z* e Ret) que apresentaram maior abundância relativa em folhas do genótipo MEcu 72. Genótipos IAC-14 (1), IAC-90 (2), IAC-12 (3), Baianinha (4), IAC-Caapora (5) e MEcu 72 (6). Vermelho indica maior abundância do metabólito, azul indica menor abundância do metabólito, amarelo indica abundância intermediária do metabólito e preto indica a ausência do metabólito. As médias foram analisadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Uma análise no banco de dados do Núcleo de Bioensaios, Biosíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NUBBE) (<https://nubbe.iq.unesp.br/portal/nubbe-search.html>) indicou que o valor de m/z do metabólito 11 pode ser relacionado com 6-acetoxypedunin ou toonacilin, ambos compostos triterpenoides da classe dos limonoides.

A maior AH observada foi para o genótipo MEcu 72 que apresentou aglutinação com o extrato quatro vezes diluído (2^3) diferindo significativamente dos demais genótipos ($F_{5,18}=11,600$; $P>0,001$), enquanto IAC-14 e IAC-90 apenas apresentaram aglutinação com o extrato não diluído. Os genótipos IAC-12, Baianinha e IAC-Caapora e todos os extratos fervidos não apresentaram aglutinação (Figura 3).

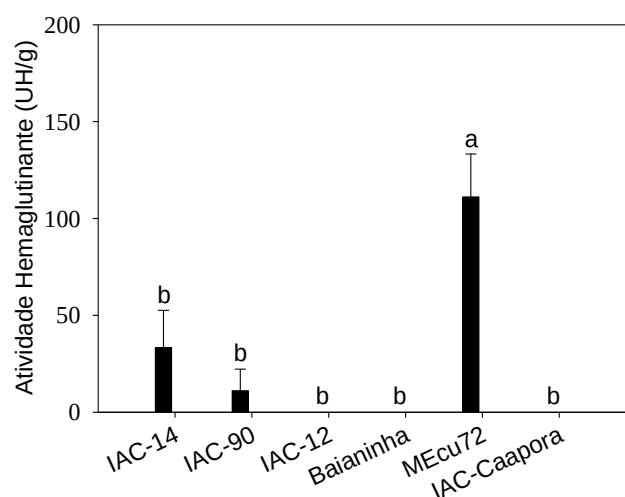


Figura 3. Atividade hemaglutinante (UH/g de folha) em extratos de folhas de genótipos de mandioca. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P\geq 0,05$).

4 Discussão

Os compostos cianogênicos (CN) estão entre os compostos mais estudados em mandioca (Pinto-Zevallos et al., 2016). Porém, os CN parecem não estar diretamente envolvidos na defesa da plantas a insetos especialistas (Bernays et al., 1977; Bellotti e Riis, 1994). De maneira similar, observou-se que o genótipo IAC-Caapora foi o que apresentou maior concentração constitutiva de CN (Capítulo 3 da

presente tese), e esse genótipo apresentou influência negativa apenas sobre o desenvolvimento de *P. manihoti* (Rheinheimer, 2013).

Observa-se ainda que a relação de CN com insetos sugadores pode ter um papel importante para a herbivoria. Por exemplo, o glicosídeo cianogênico linamarina serve como fagoestimulante para *P. manihoti* quando adicionado em dieta artificial (Calatayud, 2000). Além disso, os insetos sugadores causam menores danos aos tecidos das folhas em relação a herbívoros mastigadores, o que reduz o contato dos compostos cianogênicos com a linamarase e, conseqüentemente, reduz a produção de ácido cianídrico (HCN) tóxico aos herbívoros (McMahon et al., 1995; Siritunga e Sayre, 2004; Ballhorn et al., 2006; Pinto-Zevallos et al., 2016).

Desse modo, verifica-se que o papel de outros compostos das folhas de mandioca devem ser investigados na relação entre planta e herbívoro. Os compostos fenólicos também são importantes substâncias do metabolismo secundário das plantas que estão envolvidos na defesa contra insetos (Berbehenn e Martin, 1994; Calatayud, 2000; Delvas et al., 2011; Santos et al., 2013). Os fenóis totais foram observados em maior quantidade no genótipo MEcu 72 (Capítulo 3 da presente tese). Na busca da identidade dos compostos fenólicos nos genótipos avaliados, foi detectada a rutina. No presente trabalho, verificou-se que a concentração constitutiva de rutina não variou entre os genótipos analisados. Porém, a concentração desse composto aumenta significativamente em genótipos após o ataque de *P. manihoti* (Gazola et al., 2018), e uma correlação significativa foi observada entre a concentração de rutina induzida pela herbivoria e a menor taxa intrínseca de aumento da população dos insetos (Calatayud et al., 1994). Quando adicionada em dieta artificial, a rutina desempenha papel antinutritivo e fagodeterrente à *P. manihoti*, o que resulta em menor ganho de peso e maior tempo de desenvolvimento (Calatayud, 2000).

Outros metabólitos detectados exclusivamente ou em maior abundância relativa no genótipo MEcu 72 em relação aos demais são sugeridos como possíveis metabólitos com função inseticida. A identificação desses metabólitos pela análise de Auto MS e comparação em bancos de dados permitirá a correlação desse metabólito com seus possíveis efeitos sobre o desenvolvimento de insetos sugadores.

Por exemplo, a possível identificação realizada pela comparação do valor de m/z obtido com o banco de dados do NUBBE indicou que o metabólito 11 é um composto da classe dos limonoides. Os limonoides são compostos comuns em plantas da ordem Rutales com atividade inseticida conhecida, como *Azadirachta indica* A. Juss. e *Melia azedarach* L. (Champagne et al., 1992), e também já foram detectados em plantas da família Euphorbiaceae, mesma família da mandioca (Nihei et al., 2006). Os limonoides apresentam grande atividade biológica contra insetos, como efeitos inseticidas, antinutricionais e de regulação de crescimento (Champagne et al., 1992; Gonzalez-Coloma et al., 2010).

Maior atividade hemaglutinante foi verificada no genótipo MEcu 72, indicando maior quantidade de lectinas nesse genótipo. As lectinas são proteínas ligantes em carboidratos específicos e apresentam atividade hemaglutinante por ligarem-se aos eritrócitos. Nos insetos, as lectinas apresentam diferentes interações com glicoproteínas ou estruturas de glicano que podem interferir em uma série de processos fisiológicos (Dang e Van Damme, 2015). Como existe uma grande variedade de estruturas de glicano no corpo dos insetos e as lectinas possuem pelo menos um domínio ligante de carboidrato, é difícil prever o modo exato de ação de cada lectina e sua toxicidade nos insetos (Macedo et al., 2015). Os efeitos mais comumente observados nos insetos após a ingestão de lectinas são efeitos antinutricionais que afetam parâmetros biológicos como peso larval, fecundidade, pupação, sobrevivência e prolongamento do período de desenvolvimento (Powell et al., 1998; Oliveira et al., 2011; Vandenborre et al., 2011; Dang e Van Damme, 2015). No genótipo MEcu 72 em que foram encontradas maiores quantidades dessa proteína, são observados prolongamento do desenvolvimento, menor sobrevivência, menor fecundidade e maiores taxas de ocorrência de ninfas de mosca branca deformadas (Barilli et al., 2019).

No presente trabalho, contribuiu-se para o entendimento das moléculas envolvidas na interação entre diferentes genótipos de mandioca e insetos sugadores. As diferenças na composição química constitutiva encontrada entre os genótipos e as diferentes influências sobre o desenvolvimento das pragas indicam que a defesa da planta é relacionada com grupos de moléculas e possíveis efeitos combinados entre elas, e não apenas a uma molécula chave.

5 Conclusão

Onze metabólitos foram detectados em maior abundância relativa no genótipo MEcu 72.

No genótipo MEcu 72, o metabólito 11, identificado nas classe dos limonoides, tem abundância de 2 a 5 vezes superior que nos demais genótipos.

Maior atividade hemaglutinante foi observada para o genótipo MEcu 72.

6 Referências

Ballhorn DJ, Heil M, Lieberei R (2006) Phenotypic plasticity of cyanogenesis in lima bean *Phaseolus lunatus* - activity and activation of β -glucosidase. **Journal of Chemical Ecology** 32(2):261-275.

Barilli DR, Wengrat APGS, Guimarães ATB, Pietrowski V, Ringenberg R, Garcia MS (2019) Resistance of cassava genotypes to *Bemisia tuberculata*. **Arthropod-Plant Interactions** 1-7.

Bellotti AC, Riis L (1994) Cassava cyanogenic potential and resistance to pests and diseases. **Acta Horticulturae** 375:141-151.

Bellotti AC, Arias B (2001) Host plant resistance to whiteflies with emphasis on cassava as a case study. **Crop Protection** 20:813-823.

Bellotti AC, Campo BVH, Hyman G (2012) Cassava production and pest management: present and potential threats in a changing environment. **Tropical Plant Biology** 5(1):539-72.

Berbehenn RV, Martin MM (1994) Tannin sensitivity in larvae of *Malacosoma disstria* (Lepidoptera): roles of the peritrophic envelope and midgut oxidation. **Journal of Chemical Ecology** 20(8):1985-2001.

Bernays EA, Chapman RF, Leather EM, McCaffery AR, Modder WWD (1977). The relationship of *Zonocerus variegatus* (L.) (Acridoidea: Pyrgomorphidae) with cassava (*Manihot esculenta*). **Bulletin of Entomological Research** 67:391-404.

Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science** 161:839-851

Calatayud PA (2000) Influence of linamarin and rutin on biological performances of *Phenacoccus herreni* in artificial diets. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 96(1):81-86.

Calatayud PA, Le Ru B (2006) **Cassava-Mealybug Interactions**. Paris: Institut de Recherche Pour le Développement (IRD) p. 112

Calatayud PA, Rahbé Y, Delobel B, Khuong-Huu F, Tertuliano M, Le Ru B (1994) Influence of secondary compounds in the phloem sap of cassava on expression of antibiosis towards the mealybug *Phenacoccus manihoti*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 72:47-57.

Carabalí A, Bellotti AC, Montoya-Lerma J, Fregene M (2010) *Manihot flabellifolia* Pohl, wild source of resistance to the whitefly *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Hemiptera: Aleyrodidae). **Crop Protection** 29:34-38.

Champagne DE, Koul O, Isman MB, Scudder GGE, Towers GRN (1992) Biological activity of limonoids from the Rutales. **Phytochemistry** 31(2):377-394.

Dang L, Van Damme EJM (2015) Toxic proteins in plants. **Phytochemistry** 117:51-64.

Delvas N, Bause E, Labbé C, Ollevier T, Bélanger R (2011) Phenolic compounds that confer resistance to spruce budworm. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 141:35-44.

Ferreira D (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** 35(6):1039-1042

Gazola D, Zucareli C, Ringenberg R, Oliveira MCN, Graça JP, Nunes EO, Hoffmann-Campo CB (2018) Secondary metabolite contents in different parts of cassava plants infested by *Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero (Hemiptera: Pseudococcidae). **Arthropod-Plant Interactions** 1:1-8.

Gonzalez-Coloma A, Reina M, Diaz CE, Fraga BM (2010) Natural product-based biopesticides for insect control. In: Liu H, Mander L (Eds) **Comprehensive natural products II**. Oxford: Elsevier, p.237-268.

Ibanez S, Gallet C, Despres L (2012) Plant insecticidal toxins in ecological networks. **Toxins** 4:228-243.

Kuhl C, Tautenhahn R, Bottcher C, Larson TR, Neumann S (2012) CAMERA: an integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid chromatography/mass spectrometry data sets. **Analytical Chemistry** 84:283-289.

Macedo MLR, Oliveira CFR, Oliveira CT (2015) Insecticidal activity of plant lectins and potential application in crop protection. **Molecules** 20(2):2014-2033.

McMahon JM, White WLB, Sayre RT (1995) Cyanogenesis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal of Experimental Botany** 46(288):731-741.

Nihei K, Asaka Y, Mine Y, Yamada Y, Iigo M, Yanagisawa T, Kubo I (2006) Musidunin and Musiduol, Insect antifeedants from *Croton jatrophioides*. **Journal of Natural Products** 69:975-977.

Oliveira CFR, Luz LA, Paiva PMG, Coelho LCBB, Marangoni S, Macedo MLR (2011) Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochemistry** 46:498-504.

Oliveira HN, Bellon PP, Loureiro ES, Mota TA (2016) Não-preferência para a oviposição de percevejo-de-renda *Vatiga illudens* (Hemiptera: Tingidae) por cultivares de mandioca. **Acta Biologica Colombiana** 21: 447-451.

Pieterse CM, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SC (2012) Hormonal modulation of plant immunity. **Annual Review of Cell and Developmental Biology** 28:489-521.

Pietrowski V, Rheinheimer AR, Miranda AM, Wengrat APGS, Barilli DR (2014) Ocorrência de *Aleurothrixus aepim* (Goeldi, 1886) em mandioca na região Oeste do Paraná. **Arquivos Instituto Biológico** 81:186-188.

Pinto-Zevallos DM, Pareja M, Ambrogi BG (2016) Current knowledge and future research perspectives on cassava (*Manihot esculenta* Crantz) chemical defenses: An agroecological view. **Phytochemistry** 130:10-21.

Powell KS, Spence J, Bharathi M, Gatehouse JA, Gatehouse AMR (1998) Immunohistochemical and developmental studies to elucidate the mechanism of action of the snowdrop lectin on the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal). **Journal of Insect Physiology** 44:529-539.

Rheinheimer AR (2013) **Resistência de variedades de mandioca à cochonilha *Phenacoccus manihoti* (Matile-Ferrero) e sua influência sobre o parasitoide *Anagyrus lopezi* (De Santis)**. 112 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Unioeste, Marechal Cândido Rondon.

Santos MAI, Corrêa AD, Alves APC, Simão AA, Alves DS, Oliveira RL, Saczk AA, Carvalho GA (2013) Extrato metanólico de folhas de mandioca como alternativa ao controle da largata-do-cartucho e de formigas cortadeiras. **Semina: Ciências Agrárias** 34(6):3501-3512

Silva MC, Corrêa AD, Santos, CD, Marcos FCA, Abreu CMP (2010) Extração de lectina da folha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e o efeito de cátions divalentes na atividade hemaglutinante. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 30:103-107.

Siritunga D, Sayre R (2004) Engineering cyanogen synthesis and turnover in cassava (*Manihot esculenta*). **Plant Molecular Biology** 56:661-669.

Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G (2006) XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. **Analytical Chemistry** 78:779-787.

Tertuliano M, Dossou-Gbete S, Le Ru B (1993) Antixenotic and antibiotic componentes of resistance to the cassava mealybug, *Phenacoccus manihoti* (Hom.,

Pseudococcidae), in various host-plants. **Insect Science and Its Application** 5:657-665.

Vásquez-Ordóñez AA, Hazzi NA, Escobar-Prieto D, Paz-Jojoa D, Parsa S (2015) A geographic distribution database of the Neotropical cassava whitefly complex (Hemiptera, Aleyrodidae) and their associated parasitoids and hyperparasitoids (Hymenoptera). **Zookeys** 545:75-87.

Vandenborre G, Smagghe G, van Damme EJM (2011) Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry** 72:1538-1550.

Vos IA, Pieterse CMJ, van Wees SCM (2013) Costs and benefits of hormone-regulated plant defences. **Plant Pathology** 62:43-55.

Wang HX, Ng TB, Liu WK, Ooi VEC, Chang ST (1995) Isolation and characterization of the distinct lectins with antiproliferative activity from the cultures mycelium of the edible mushroom *Tricholoma mongolicum*. **International Journal of Peptide and Protein Research** 46:508-513.

Wobeto C, Corrêa AD, de Abreu CMP, dos Santos CD, Pereira HV (2007) Antinutrients in the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaf powder at three ages of the plant. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 27(1):108-12

Xia J, Wishart DS (2016) Using MetaboAnalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. **Current Protocols in Bioinformatics** 55(1):14.10.1-14.10.91.

Zarate SI, Kempema LA, Walling LL (2007) Silverleaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. **Plant Physiology** 143:866-875.

CAPÍTULO 5 - Considerações finais

Historicamente, apenas o mandarová, *Erinnyis ello* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Sphingidae), era relatado como causador de prejuízos econômicos nas lavouras de mandioca no Brasil. Em função da produção de mandioca ocorrer em todo o território brasileiro, diferenças na forma e uso da produção ocorrem em função das regiões do País. Por exemplo, na região Centro-Sul, a produção de mandioca é baseada na utilização de variedades bravas cujo produto é destinado às modernas indústrias de fécula e os cultivos são realizados em grandes áreas de monocultivo altamente tecnificadas com alto investimento em insumos e utilização de inseticidas de amplo espectro de ação. Esses aspectos produtivos resultaram em mudanças na dinâmica populacional de insetos pragas na cultura.

Nesse cenário, aumentos das populações de outros insetos pragas têm sido observados, como a cochonilha da parte aérea, *Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero, 1977 (Hemiptera: Pseudococcidae), moscas brancas, *Bemisia tuberculata* Bondar, 1923 e *Aleurothrixus aepim* (Goeldi, 1886) (Hemiptera: Aleyrodidae) e os percevejos de renda, *Vatiga manihotae* (Drake, 1922) e *V. illudens* (Drake, 1922) (Hemiptera: Tingidae). Muitos desses insetos pragas não possuem estratégias de manejo devidamente estabelecidas.

Entre possíveis soluções para o manejo dos insetos pragas da mandioca, observa-se a resistência de plantas a insetos como uma possibilidade. O consumo de genótipos silvestres de mandioca por insetos pragas muitas vezes resulta em alta interferência negativa sobre o desenvolvimento desses. Entre esses genótipos, muitos têm sido utilizados em programas de melhoramento genético visando alta produtividade aliada a resistência a insetos. A avaliação da resistência a insetos das progênies de mandioca obtidas nos programas de melhoramento é realizada por estudos de desenvolvimento dos insetos utilizando essas progênies como alimento. Esse procedimento demanda muito tempo para a detecção de resistência e grande quantidade de plantas para os ensaios.

De forma a auxiliar o desenvolvimento de genótipos com resistência a insetos pragas, é desejável conhecer os compostos químicos presentes nas plantas de mandioca com ação inseticida. Até o momento, poucos trabalhos apresentam a

identificação de compostos químicos presentes nas plantas de mandioca e é ainda menor o número de trabalhos que relacionam tais compostos com interferências no desenvolvimento dos insetos pragas. Como citado acima, além de auxiliar no monitoramento das progênies, o conhecimento dos compostos químicos presentes nos genótipos com resistência a insetos também pode direcionar o desenvolvimento de novas moléculas com atividade inseticida da mesma forma que a nicotina e a piretrina derivadas de plantas serviram como modelos para o desenvolvimento dos neonicotinoides e piretroides, respectivamente.

O presente trabalho foi realizado para conhecer diferenças químicas entre as folhas de mandioca de genótipos selecionados de forma a esclarecer como a composição química desses genótipos pode ser relacionada com as influências observadas no desenvolvimento de insetos pragas.

Com os resultados obtidos, foi possível observar que o genótipo MEcu 72, além de apresentar alta interferência no desenvolvimento dos insetos sugadores como mosca branca, cochonilha e percevejo de renda, também apresentou interferências no desenvolvimento do herbívoro modelo *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Esses resultados demonstram que o genótipo MEcu 72 apresenta compostos químicos com potencial inseticida para as diferentes espécies de pragas.

Alguns desses compostos foram detectados e identificados utilizando GC-MS. Os metabólitos promissores observados em maior quantidade neste genótipo foram *myo*-inositol-2-monofosfato e os ácidos *p*-cumárico, clorogênico e *p*-hidroxibenzoico. Todos esses compostos são relatados na literatura com potencial inseticida por causarem interferências no desenvolvimento dos insetos semelhantes às observadas em insetos alimentados com o genótipo MEcu 72. Esses compostos podem ser utilizados para o monitoramento das progênies em programas de melhoramento genético visando resistência a insetos pragas.

O genótipo Baianinha, considerado suscetível para o desenvolvimento de diferentes insetos sugadores, não resultou em alterações no consumo e utilização do alimento pelas lagartas de *S. frugiperda*, mas a alimentação desse genótipo pela fase larval resultou em interferências no desenvolvimento e reprodução do herbívoro modelo *S. frugiperda*. Tais interferências foram correlacionadas com uma maior

abundância de ácido octadecadienoico neste genótipo. Esse composto é um antioxidante que pode ter reduzido a oxidação dos ácidos fenólicos com potencial toxicidade a insetos, facilitado a utilização do alimento e reduzido o custo metabólico das lagartas. Por outro lado, ácidos octadecadienoicos também podem reduzir a deposição de gordura e aumentar a lipólise nos adipócitos, que pode ter levado ao menor desempenho reprodutivo observado.

Foi observado também que as concentrações constitutivas dos fitormônios ácido salicílico e ácido jasmônico e de duas moléculas associadas a via do ácido jasmônico (ácido 12-oxofitodienoico - OPDA - e jasmonil-isoleucina) são maiores no genótipo MEcu 72 em relação aos demais genótipos avaliados. Esses fitormônios são responsáveis pela ativação das rotas de biossíntese dos metabólitos secundários utilizados para a defesa da planta a insetos. A maior produção constitutiva desses compostos ajuda a explicar a maior abundância de alguns compostos no genótipo MEcu 72 observadas nesse trabalho.

A herbivoria por *S. frugiperda* não levou a alterações bem definidas na produção dos fitormônios avaliados, observando-se maior variação em relação aos genótipos testados. O maior aumento observado foi para a produção do precursor de AJ, o OPDA, no genótipo BRS-CS01. O aumento da síntese de OPDA, pode levar a uma maior produção de compostos secundários relacionados à defesa da planta, tanto contra insetos como contra patógenos. Esse aumento pode explicar a maior resistência observada nesse genótipo contra doenças.

Como observado na literatura, o cianeto não apresentou relação na resistência dos genótipos a pragas, assim como não teve sua produção induzida após herbivoria por *S. frugiperda*.

Por meio da detecção de metabólitos utilizando LC-MS, foi possível observar 10 metabólitos presentes exclusivamente no genótipo MEcu 72, e outro metabólito presente com abundância de 2 a 5 vezes superior nesse genótipo em relação aos demais. Esses metabólitos são candidatos para se realizar a identificação de suas estruturas químicas para posterior correlação com a resistência desse genótipo a pragas.

Por fim, foi detectado maior atividade hemaglutinante em extratos de folhas do genótipo MEcu 72. Essa maior atividade indica maior quantidade de lectinas,

proteínas comumente associada com atividade inseticida. Por ser uma proteína com método de detecção relativamente simples, esta seria uma das moléculas mais interessantes a ser monitorada em progênies de programas de melhoramento genético. Ainda, após ser identificada e caracterizada, essa proteína pode ser introduzida por meio de transgenia em genótipos altamente produtivos para conferir-lhes resistência a insetos.