



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA APLICADA À AGROPECUÁRIA

KELLY RAISA DA CRUZ LISBÔA PEREIRA

**ANÁLISES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE *Cyathula prostrata* (L.) BLUME
ATACADA POR *Herpetogramma bipunctalis***

BELÉM-PA

2018

KELLY RAISA DA CRUZ LISBÔA PEREIRA

**ANÁLISES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE *Cyathula prostrata* (L.) BLUME
ATACADA POR *Herpetogramma bipunctalis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária. Área de concentração: Biotecnologia, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Alves Festucci Buselli

Co-orientador: Prof. Dr. Hugo Alves Pinheiro

BELÉM-PA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- P436a Pereira, Kelly Raisa da Cruz Lisbôa
 Análises Fisiológicas e Bioquímicas de *Cyathula prostrata* (L.) Blume Atacada por *Herpetogramma bipunctalis* / Kelly Raisa da Cruz Lisbôa Pereira. - 2018.
 54 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado) - Programa de PÓS-GRADUAÇÃO em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (PPGBAA), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da Amazônia, Belém, 2018.
 Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Alves Festucci Buselli
 Coorientador: Prof. Dr. Hugo Alves Pinheiro.
1. interação inseto-planta. 2. fluorescência. 3. trocas gasosas. 4. metabolismo. I. Buselli, Reginaldo Alves Festucci, *orient.* II. Título
-

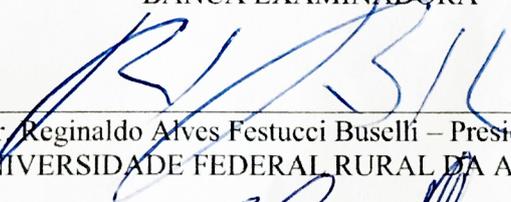
KELLY RAISA DA CRUZ LISBÔA PEREIRA

**ANÁLISES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE *Cyathula prostrata* (L.) BLUME
ATACADA POR *Herpetogramma bipunctalis***

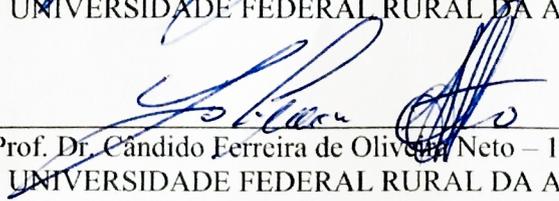
Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, como requisito para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: 27 de Fevereiro de 2018.

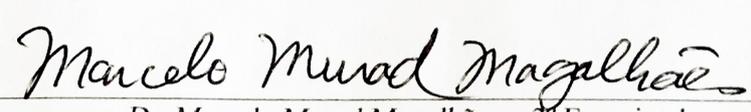
BANCA EXAMINADORA



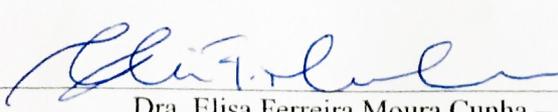
Prof. Dr. Reginaldo Alves Festucci Buselli – Presidente/Orientador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA



Prof. Dr. Cândido Ferreira de Oliveira Neto – 1º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA



Dr. Marcelo Murad Magalhães – 2º Examinador
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA/AMAZÔNIA ORIENTAL



Dra. Elisa Ferreira Moura Cunha – 3º Examinador
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA/AMAZÔNIA ORIENTAL

Aos meus pais queridos, Osmar e Graça, pelo amor e exemplo em minha vida.

Ao meu esposo Rodrigo, pela compreensão, apoio incondicional, companheirismo e amor...

E ao meu filho Renan, a razão de tudo o que sou!

Sem vocês seria difícil ter dado tantos passos importantes em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por sua infinita bondade em me conceder muito mais que mereço.

À nossa Senhora de Nazaré, pela sua intercessão nos momentos difíceis em minha vida.

Aos meus pais, Osmar Cruz e Graça Cruz, minha eterna gratidão por tudo que fizeram e fazem por mim. Amo vocês!

Às minhas irmãs, Karen Mayara, Kaity Brenda, Kamila Sindy e Karoline Petrine, pelo apoio e amor.

Ao meu esposo Rodrigo Lisbôa, por todo amor, paciência, compreensão, apoio moral e, principalmente, por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis. Amo você!

Ao meu filho Renan, a razão de tudo em minha vida. Amo-te incondicionalmente!

Aos meus sogros João e Célia e cunhada Meline, por todo apoio e incentivo durante essa trajetória.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária pela oportunidade para a realização deste curso e Fapespa pelo apoio financeiro.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, Prof. Reginaldo Alves Festucci Buselli, por seu total empenho e dedicação ao programa, e por contribuir incansavelmente para o seu fortalecimento e crescimento.

Ao meu orientador, Professor Dr. Reginaldo Alves Festucci Buselli pela oportunidade, ensinamentos, paciência, compreensão, amizade, conselhos, respeito e, competente orientação.

Ao meu Co-orientador professor Dr. Hugo Alves Pinheiro, por seus ensinamentos, pela sua disponibilidade, e ser um grande exemplo profissional.

Aos membros da banca examinadora Dra. Elisa Moura, Prof. Cândido Neto, Dr. Marcelo Murad e Dra. Simone Miranda pela valiosa contribuição na melhoria do trabalho.

As amigas da pós-graduação: Larissa Neves e Gleiciane dos Santos, por todo apoio, amizade, companhia e parceria nos experimentos. Obrigada por tudo!

A amiga Yngrid Rodrigues, por todo apoio, amizade e ensinamentos. Obrigada pela incansável ajuda nos momentos mais difíceis.

Aos amigos: Gabriela Tavares, Beatriz Figueiredo, Rodolfo Santos, Taise Carvalho, Gabriel Ito e Gledson Silva, pela amizade, companhia e, principalmente pela ajuda nos experimentos. Vocês foram essenciais. Muito obrigada!

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, sintam-se eternamente agradecido.

LISTA DE ABREVIATURAS

A – Taxa de assimilação líquida de CO_2

g_s – Condutância estomática

E – Transpiração

C_i – Concentração de CO_2 intercelular

F_m – Fluorescência máxima

F_v/F_m – Máxima eficiência quântica do PSII

Φ_{PSII} – Rendimento quântico real do transporte de elétrons do PSII

ETR – Taxa de transporte de elétrons

q_p – Coeficiente de dissipação fotoquímica

NPQ – Coeficiente de dissipação não-fotoquímico

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

MDA – Aldeído malônico

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** *Herpetogramma bipunctalis*: A) Fase larval; B) Fase de pupa; C) Fase adulta.....30
- Figura 2-** Aspecto morfológico de folhas de *C. prostrata* na ausência de herbivoria (Controle; A) e submetidas a herbivoria por *H. bipunctalis* (Estresse biótico; B a G). A imagem da planta Controle é representativa dos diferentes tempos de avaliação (12, 36 e 60 h). As imagens B, C e D referem-se às folhas das plantas estressadas submetidas ao ataque da lagarta por 12, 36 e 60 h, respectivamente. As imagens E, F e G referem-se às folhas das plantas estressadas opostas àquelas que receberam as lagartas e acessadas após 12, 36 e 60 h da infestação. As fotos são representativas de cinco repetições e as barras horizontais em cada imagem correspondem a 1 cm.34
- Figura 3-** Trocas gasosas. (A) Taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*); (B) Condutância estomática (*g_s*); (C) Transpiração (*E*) e (D) Concentração de CO₂ intercelular (*C_i*) em folhas de *Cyathula prostrata* atacadas pelo inseto *Herpetogramma bipunctalis*. Letras maiúsculas comparam as médias nas diferentes condições (controle, folha intacta e folha danificada) no mesmo tempo. Letras minúsculas comparam as médias entre os diferentes tempos (12h, 36h e 60h) dentro de cada condição (controle, folha intacta e folha danificada). As médias foram comparadas pelo teste SNK-Student-Newman-Keuls com $p < 0.05$. O Erro padrão é indicado por barras.37
- Figura 4-** Fluorescência da clorofila *a*. (A) Máxima fluorescência (*F_m*), (B) máxima eficiência quântica do PSII (*F_v/F_m*), (C) rendimento quântico real do transporte de elétrons do PSII (Φ_{PSII}), (D) taxa de transporte de elétrons (*ETR*), (E) coeficiente de dissipação fotoquímica (*q_p*), (F) coeficiente de dissipação não-fotoquímica (NPQ) , em folhas de *Cyathula prostrata* atacadas por *Herpetogramma bipunctalis*. Letras maiúsculas comparam as médias nas diferentes condições (controle, folha intacta e folha danificada) no mesmo tempo. Letras minúsculas comparam as médias entre os diferentes tempos (12h, 36h e 60h) dentro de cada condição (controle, folha intacta e folha danificada). As médias foram comparadas pelo teste SNK-Student-Newman-Keuls com $p < 0.05$. O Erro padrão é indicado por barras.38
- Figura 5-** Análise bioquímica. Concentração de aldeído malônico (MDA) em folhas de *Cyathula prostrata* atacadas pelo inseto *Herpetogramma bipunctalis*. Letras maiúsculas comparam as médias nas diferentes condições (controle, folha intacta e folha danificada) no mesmo tempo. Letras minúsculas comparam as médias entre os diferentes tempos (12h, 36h e 60h) dentro de cada condição (controle, folha intacta e folha danificada). As médias foram comparadas pelo teste SNK-Student-Newman-Keuls com $p < 0.05$. O Erro padrão é indicado por barras.42
- Figura 6-** Análise bioquímica. Concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em folhas de *Cyathula prostrata* atacadas pelo inseto *Herpetogramma bipunctalis*. Letras maiúsculas comparam as médias nas diferentes condições (controle, folha intacta e folha danificada) no mesmo tempo. Letras minúsculas comparam as médias entre os diferentes tempos (12h, 36h e 60h) dentro de cada condição (controle, folha intacta e folha danificada). As médias foram comparadas pelo teste SNK-Student-Newman-Keuls com $p < 0.05$. O Erro padrão é indicado por barras.43

RESUMO

O inseto *Herpetogramma bipunctalis* Fabricius (1974) (Crambidae) é uma praga que ocorre na América do Norte e na América do Sul, sendo encontrado no Brasil atacando culturas de interesse comercial. A espécie *Cyathula prostrata* (L) Blume (Amaratheceae) é uma planta nativa da África tropical e da Ásia, sendo também encontrada no Brasil. Esta planta apresenta propriedades farmacológicas e medicinais e tem sido utilizada na medicina popular. O inseto *H. bipunctalis* se alimenta das folhas de *C. prostrata*. Com o objetivo de se estudar a interação planta-inseto considerando aspectos bioquímicos e fisiológicos para se elaborar estratégias que visam o controle de insetos que danificam plantas de interesse comercial, neste trabalho foram realizadas análises fisiológicas (parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*) e bioquímicas (extresse oxidativo) de folhas de *C. prostrata* submetidas ao ataque de lagartas de *H. bipunctalis* em diferentes tempos de exposição ao inseto. Os parâmetros de trocas gasosas: taxa fotossintética (*A*), condutância estomática (*g_s*), concentração de carbono interno (*C_i*) e transpiração (*E*) e os parâmetros de fluorescência de clorofila *a*: máxima fluorescência (*F_m*), máxima eficiência quântica do PSII (*F_v/F_m*), rendimento quântico real do transporte de elétrons do PSII (Φ_{PSII}), taxa de transporte de elétrons (*ETR*), coeficiente de dissipação fotoquímica (*q_p*) e as enzimas do estresse oxidativo: peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e aldeído malônico (MDA) foram alterados em plantas de *C. prostrata* submetidas ao ataque de lagartas de *H. bipunctalis* nos tempos de 12, 36 e 60 horas. A herbivoria do inseto diminuiu a capacidade fotossintética de folhas não danificadas e danificadas de *C. prostrata* reduzindo os parâmetros de trocas gasosas (*A*, *g_s*, *E*) e promovendo aumento no (*C_i*). Observou-se reduções nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* (*F_m*, *F_v/F_m*, Φ_{PSII} , *ETR* e *q_p*). Observou-se também aumento significativo na concentração de (H₂O₂) em folhas danificadas nos tempos de 12h (4,8%), 36h (59,4%) e 60h (66,9%) e aumento significativo de (MDA) no tempo de 60h (69,2%) em folhas danificadas, sugerindo a ocorrência de estresse oxidativo. Coletivamente, os dados obtidos indicam que o estresse biótico interfere na fisiologia de *C. prostrata*. Os dados apresentados sugerem que o efeito da redução na área foliar causada pela herbivoria do inseto *H. bipunctalis*, reduziu o investimento na fotossíntese para que a planta investisse no metabolismo relacionado à defesa.

Palavras-chave: interação inseto-planta, fluorescência, trocas gasosas, metabolismo.

ABSTRACT

The insect *Herpetogramma bipunctalis* Fabricius (1974) (Crambidae) is a pest that occurs in North America and South America, being found in Brazil attacking crops of commercial interest. The species *Cyathula prostrata* (L) Blume (Amaratheceae) is a plant native to tropical Africa and Asia, and is also found in Brazil. This plant exhibits pharmacological and medicinal properties and has been used in folk medicine. The insect *H. bipunctalis* feeds on the leaves of *C. prostrata*. The objective of this study was to study plant-insect interaction, considering biochemical and physiological aspects to develop strategies to control insects that damage plants of commercial interest. In this work, it was performed physiological (gas exchange parameters and chlorophyll a fluorescence) and biochemical (oxidative stress) analyzes of leaves of *C. prostrata* submitted to the attack of *H. bipunctalis* caterpillars at different times of exposure to the insect. The gas exchange parameters were: photosynthetic rate (A), stomatal conductance (g_s), internal carbon concentration (C_i) and transpiration (E) and chlorophyll *a* fluorescence parameters: maximum fluorescence (F_m), maximum quantum efficiency of PSII (Φ_{PSII}), electron transport rate (ETR), photochemical dissipation coefficient (q_p), and oxidative stress enzymes were altered in plants of *C. prostrata* submitted to the attack of *H. bipunctalis* caterpillars at times of 12, 36 and 60 hours. The herbivory of the insect *H. bipunctalis* decreased the photosynthetic capacity of undamaged and damaged leaves of *C. prostrata* reducing the parameters of gas exchange (A , g_s , E) and promoting increase in (C_i). Reductions in the fluorescence parameters of chlorophyll *a* (F_m , F_v / F_m , Φ_{PSII} , ETR and q_p) were observed. There was also a significant increase in the concentration of hydrogen peroxide (H_2O_2) in damaged leaves at 12h (4,8%), 36h (59,4%) e 60h (66,9%) and a significant increase of malonic aldehyde (MDA) at 60h (69,2%) in damaged leaves, suggesting the occurrence of oxidative stress. Collectively, the obtained data indicate that biotic stress interferes with the physiology of *C. prostrata*. The presented data suggest that the effect of the reduction in the leaf area caused by the herbivory of the insect *H. bipunctalis*, reduced the investment in photosynthesis for the plant to invest in defense related metabolism.

Key words: insect-plant interaction, fluorescence, gas exchange, metabolism.

SUMÁRIO

1- CONTEXTUALIZAÇÃO.....	12
REFERÊNCIAS	14
2- REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Aspectos gerais de <i>Herpetogramma bipunctalis</i> (Lepidoptera: Crambidae).....	16
2.2 Aspectos gerais de <i>Cyathula prostrata</i> (L.) Blume.	17
2.3 Interação inseto-planta	18
2.4 Trocas gasosas	19
2.5 Fluorescência da clorofila <i>a</i>	20
2.6 Indução de estresse oxidativo mediada pela herbivoria	20
2.6.1 Peroxidação de lipídios e aldeído malônico	21
REFERÊNCIAS	22
3. TROCAS GASOSAS E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA <i>a</i> EM PLANTAS DE <i>Cyathula prostrata</i> SUBMETIDAS A HERBIVORIA CAUSADA POR <i>Herpetogramma bipunctalis</i>.	25
RESUMO.....	25
ABSTRACT	26
3.1 Introdução	27
3.2 Material e métodos	29
3.2.1 Material vegetal e preparação das mudas.....	29
3.2.2 Obtenção e criação das lagartas	29
3.2.3 Indução do estresse e delineamento experimental	30
3.2.4 Trocas gasosas.....	30
3.2.5 Fluorescência da clorofila <i>a</i>	31
3.2.6 Coleta de amostras e análise bioquímica.....	31
3.2.7 Peroxidação de lipídeos de membrana	32
3.2.8 Peróxido de hidrogênio	32
3.2.9 Análise estatística.....	33
3.3 Resultados	33
3.3.1 Avaliação qualitativa de folhas de <i>C. prostrata</i> atacadas por lagartas de <i>H. bipunctalis</i>	33
3.3.2 Trocas gasosas.....	34
3.3.3 Fluorescência da clorofila <i>a</i>	37
3.3.4 Análise Bioquímica	41

3.4 Discussão	44
3.4.1 Trocas gasosas.....	44
3.4.2 Fluorescência da clorofila <i>a</i>	46
3.4.3 Concentração de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	49
3.4.4 Peroxidação de lipídeos (MDA).....	49
3.5 Conclusões	50
REFERÊNCIAS	51

1- CONTEXTUALIZAÇÃO

Os seres vivos estão continuamente sujeitos a diversos tipos de estresse. As plantas que estão expostas ao ataque de insetos apresentam mecanismos de defesa característico de cada espécie vegetal. À medida em que os insetos introduzem secreções orais (SO) no tecido fotossintético da planta (GOLAN et al., 2013) é ativado uma rede complexa de sinalização que induz as defesas (WALLING, 2000) que traduzem essa percepção em uma resposta adequada e de forma adaptativa, conforme o grau de estresse naquele momento (WIT, 2007).

De acordo com o mecanismo de defesa da planta, algumas espécies acumulam altos níveis de compostos que funcionam como defensivos bioquímicos devido a sua toxicidade, enquanto outras procuram minimizar os danos causados por herbívoros por meio do rápido crescimento e desenvolvimento (JANDER et al., 2001). No entanto, seja qual for a estratégia que a planta utiliza para se defender, o efeito da herbivoria reduz a área foliar e ocasiona várias mudanças nos mecanismos fisiológicos, podendo afetar as trocas gasosas (ALDEA et al., 2005), e acarretar reduções na fotossíntese (NABITY, 2009; FLEXAS, 2012).

A fotossíntese pode ser afetada por vários fatores e condições de estresse, e algumas técnicas que estudam a fisiologia da planta estão disponíveis para um melhor entendimento desse processo (GOLAN et al., 2015). As técnicas de fluorescência da clorofila *a* tem permitido uma avaliação completa do estado funcional do aparato fotossintético, sendo um estudo adequado para a análise do estado fisiológico de plantas sob estresse biótico (STRASSER et al., 2004, 2005).

Os estresses bióticos modificam o metabolismo celular vegetal e conseqüentemente podem afetar a respiração celular e a fotossíntese, tendo como consequência a indução do estresse oxidativo, que consiste em um aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), principalmente ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HU et al., 2009). Entretanto, as plantas minimizam o impacto negativo da herbivoria por meio do aumento da atividade de enzimas antioxidantes, tais como: i) a dismutase do superóxido (SOD); ii) peroxidase do ascorbato (APX); iii) catalase (CAT); e, iv) redutase da glutathiona (GR), dentre outras (TAYEFI-NASRABADI et al., 2010). Vários estudos têm sido realizados para se analisar a interação planta-inseto do ponto de vista fisiológico e bioquímico, a fim de nortear a elaboração de estratégias que visam o controle de insetos que danificam plantas de interesse comercial. Por exemplo, a análise dos parâmetros

fotossintéticos por herbivoria de *Manduca sexta* em folhas de *N. attenuata* reduziu a eficiência operacional do fotossistema II (PSII) no tecido remanescente, indicando que o transporte de elétrons pode limitar a assimilação de CO₂ após o dano (HALITSCHKE et al., 2011). Em *Vitis spp.* sob herbivoria de *Empoasca fabae* foram observadas reduções nas taxas de assimilação líquida de CO₂ (*A*), condutância estomática (*g_s*) e transpiração (*E*). Esses resultados indicam que *Vitis* é um hospedeiro adequado e que *E. fabae* é capaz de afetar a sua fisiologia (LAMP et al., 2011). Em plantas de *Nephrolepis biserrata* e *Citrus limon* var. Ponderosa infestadas com *Coccus hesperidum* foi observada uma redução significativa na máxima eficiência quântica do PSII (F_v/F_m) em relação às plantas não infestadas, com aparente relação com a quantidade de insetos por planta (GOLAN et al., 2015).

As lagartas da espécie *Herpetogramma bipunctalis* (Lepidoptera: Crambidae) têm sido utilizadas em estudos relacionados à interação inseto-planta, pois é uma praga que ocorre dos Estados Unidos até a América do Sul (KING; SAUNDERS, 1984). No Brasil, este inseto foi encontrado em culturas de beterraba, acelga (SILVA et al., 1968) e em *Rubus spp* (DIÉZ-RODRÍGUEZ et al., 2013). Tavares (2015) observou que as lagartas de *H. bipunctalis* alimentadas com folhas de *Cyathula prostrata* concluíram seu ciclo biológico de maneira eficiente, gerando descendentes férteis. Esta espécie vegetal é uma planta nativa da África tropical e da Ásia (OLADIMEJI; USIFOH, 2012) e no Brasil é uma espécie não endêmica, com distribuição geográfica nas regiões Norte, Nordeste, Centro-oeste e Sudeste (SENNA, 2016); e, tem grande potencial biotecnológico em função das propriedades anti-inflamatórias e analgésicas (BURKILL, 1995).

Considerando-se que as lagartas de *H. bipunctalis* podem se alimentar de folhas de plantas de *C. prostrata* e completar seu ciclo biológico, gerando descendentes férteis e que a herbivoria pode promover alterações fisiológicas e bioquímicas, neste trabalho foi analisado a magnitude das alterações nos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* e a possível ocorrência de estresse oxidativo em plantas de *C. prostrata* submetidas ao ataque de *H. bipunctalis*.

REFERÊNCIAS

ALDEA, M.; HAMILTON, J. G.; RESTI, J. P.; ZANGERL, A. R.; BERENBAUM, M. R.; DE LUCIA, E. H. Indirect effects of insect herbivory on leaf gas exchange in soybean. **Plant, Cell and Environment**, v. 28, n. 3, p. 402-411, 2005.

BURKILL, H. M. The Useful Plants of West Tropical Africa, Volume 1. Royal **Botanical Gardens**, Kew, pp. 58–59, 1995.

DIEZ-RODRÍGUEZ, G. I.; HÜBNER, L. K.; ANTUNES, L. E. C.; NAVA, D. E. *Herpetogramma bipunctalis* (Lepidoptera: Crambidae) biology and techniques for rearing on leaves of the blackberry (*Rubus* spp., Rosaceae). **Brazilian Journal Biology**, v.73, p.179 - 184, 2013.

FLEXAS, J. Mesophyll diffusion conductance to CO₂: An unappreciated central player in photosynthesis. **Plant Science**, v. 193–194, p. 70–84, 2012.

GOLAN, K.; RUBINOWSKA, K.; GÓRSKA-DRABIK, E. Physiological and biochemical responses of fern *Nephrolepis biserrata* (SW.) Schott. to *Coccus hesperidum* L. infestation. **Acta Biologica Cracoviensia**, v. 55, p. 93-98, 2013.

GOLAN, K.; RUBINOWSKA, K.; KMIEĆ, K.; KOT, I.; GÓRSKA-DRABIK, E.; LAGOWSKA, B. MICHAŁEK. Impact of scale insect infestation on the content of photosynthetic pigments and chlorophyll fluorescence in two host plant species. **Arthropod Plant Interactions**, v. 9, n. 1, p. 55-65, 2015.

HALITSCHKE R.; HAMILTON, JG; KESSLER, A. Herbivore-specific elicitation of photosynthesis by mirid bug salivary secretions in the wild tobacco *Nicotiana glauca*. **New Phytologist**, v.191, p.5–8 - 535, 2011.

HU, Z.; SHEN, Y.; SHEN, F.; SU, X. Effects of feeding *Clostera anachoreta* on hydrogen peroxide accumulation and activities of peroxidase, catalase, and ascorbate peroxidase in *Populus simonii* x *P. pyramidalis* 'Opera 8277' leaves. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, p. 995-1002, 2009.

JANDER, G.; CUI, J.P; NHAN, B; PIERCE, N.E; AUSUBEL, F.M. The *TASTY* locus on chromosome 1 of *Arabidopsis* affects feeding of the insect herbivore *Trichoplusia ni*. **Plant Physiology**, v. 126, p. 890–898, 2001.

KING, A. B. S.; SAUNDERS, J. L. The invertebrate pests of annual food crops in Central America: a guide to their recognition and control. London: **Overseas Development Administration**, pp. 166, 1984.

LAMP, W.O.; MIRANDA, D.; CULLER, L.E.; ALEXANDER, L.C. Host suitability and gas exchange response of grapevines to potato leafhopper (Hemiptera: Cicadellidae). **Journal Economy. Entomology**, v. 104, p.1316-1322, 2011.

NABITY P. D, ZAVALA J. A, DELUCIA E. H. Indirect suppression of photosynthesis on individual leaves by arthropod herbivory. **Annals of Botany**, p.103, 6–5 - 663, 2009.

OLADIMEJI, O. H.; USIFOH, C.O. Two Oils from the Ethyl-acetate Fraction of *Cyathula prostrata* (L.) Blume. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, v. 1, p. 54-59. 2012.

SENNA, L. **Cyathula in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15416>>. Acesso em: 11 Jul. 2016.

STRASSER, R. J.; TSIMILLI- MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A. Analysis of the Fluorescence Transient. In: PAPAGEORGIU, G.; GOVINDJEE (eds.). **Chlorophyll fluorescence: a Signature of Photosynthesis**, Advances in Photosynthesis and Respiration Series. p. 321–362, 2004.

STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In: Papageorgiou, G.C.; Govindjee (eds.). **Chlorophyll Fluorescence: a Signature of Photosynthesis**. London: Kluwer Academic Publishers, p. 1–50, 2005.

SILVA, A. G. A.; GONÇALVES, C. R.; GALVÃO, D. M.; GONÇALVES, A. L.; GOMES, J., SILVA, M. N.; SIMONI, L. Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil: Senstarsdesdes e predadores, insetos hospedeiros e inimigos naturais. Rio de Janeiro: **Ministério da Agricultura**. Parte II, tomo v. 1, p. 622, 1968.

TAVARES, M. M. G. **Estabelecimento de um modelo para estudar a interação planta-inseto mediada por 20-Hidroxiecdisona (20E)**. dissertação (Mestrado) – Universidade federal Rural da Amazônia, 2015.

TAYEFI-NASRABADI, H.; DEGHAN, G.; DAEIHASSANI, B.; MOVAFEGI, A.; SAMADI, A. Some biochemical properties of guaiacol peroxidases as modified by salt stress in leaves of salt-tolerant and salt-sensitive safflower (*Carthamus tinctorius* L.cv) cultivars. **African Journal of Bioechnology**, v.10 (5), p. 751-763, 2010.

WALLING, L. L. The myriad plant responses to herbivores. **Journal of Plant Growth and Regulation**, v.19, p.195–216, 2000.

WIT, P. J. G. M. Visions & reflections (mini review) - How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Switzerland, v. 64, p. 2726-2732, 2007.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais de *Herpetogramma bipunctalis* (Lepidoptera: Crambidae)

O inseto *Herpetogramma bipunctalis* Fabricius (1794) é uma espécie que pertence à família Crambidae, ordem Lepidoptera e tem ocorrência desde os Estados Unidos até a América do Sul. Na região do Caribe é considerada praga agrícola, causa danos à cenoura (*Daucus carota* L.) (Apidaceae) e a beterraba (*Beta vulgaris* L.) (Amaranthaceae) (KING; SAUNDERS, 1984). No Brasil, este inseto foi encontrado em culturas de beterraba, acelga (SILVA et al., 1968) e em amora preta (*Rubus* spp) (DIÉZ-RODRÍGUEZ et al., 2013). A herbivoria dessa lagarta foi observada em variedades de outras espécies de plantas, tais como *Brassica* sp., *Capsicum* sp., *Solanum nigrum*, *Piper aduncum* e *Xanthosoma* spp. (ALLYSON, 1984; SOLIS, 2006).

Os adultos de *H. bipunctalis* são mariposas que possuem envergadura de aproximadamente 22 mm com duas manchas pretas características no segundo segmento abdominal e coloração cinza-amarelada com manchas e listras mais escuras nas asas anteriores (CLARKE-HARRIS et al., 1998). As fêmeas de *H. bipunctalis* ovipositam seus ovos na superfície abaxial e adaxial das folhas. Esses ovos apresentam uma coloração translúcida com formato oval (0,6 x 0,5 mm) (CLARKE-HARRIS et al., 1998).

Ao eclodirem, as larvas apresentam coloração amarela translúcida e ao decorrer de seu desenvolvimento ficam esverdeadas e com a cabeça escura, podendo atingir entre 20 e 23 mm de comprimento (KING; SAUNDERS, 1984). A lagarta apresenta característica de produzir filamentos de seda para unir as bordas das folhas e se proteger contra possíveis inimigos naturais, assim como para formar uma cobertura protetora em preparação a formação de pupa. As pupas são de cor marrom escuro com 10 mm de comprimento e geralmente encontradas dentro de folhas para proteção (KING; SAUNDERS, 1984; CLARKE-HARRIS et al., 1998).

O ciclo biológico do inseto *H. bipunctalis* alimentado com folhas de *C. prostrata* foi recentemente caracterizado, desde a oviposição até o final da fase adulta (TAVARES 2015). Foi demonstrado que, em média, a fase de ovo teve duração de quatro dias e a fase de lagarta 19 dias, esta última dividida em seis instares. O primeiro instar durou três dias, o segundo e o terceiro instares duraram dois dias cada, o quarto e o quinto instares duraram três dias cada e o sexto instar, seis dias. A fase de pupa teve duração média diferente para machos (sete dias) e fêmeas (seis dias) e a fase adulta foi mais prolongada nos machos (21 dias) que nas fêmeas

(18 dias). Assim, o ciclo biológico de *H. bipunctalis* alimentado com folhas de *C. prostrata* foi concluído com um período total médio de 51 dias para os machos e 47 dias para as fêmeas (TAVARES 2015). Estes resultados permitiram concluir que plantas de *C. prostrata* são hospedeiras de lagartas de *H. bipunctalis* (TAVARES, 2015).

2.2 Aspectos gerais de *Cyathula prostrata* (L.) Blume.

O gênero *Cyathula* é composto por duas espécies, a saber *Cyathula prostrata* (L.) Blume e *Cyathula achyranthoides* (Kunth) Moq., sendo que no Brasil, *C. prostrata* é uma planta não endêmica (SENNA, 2016). A espécie *C. prostrata* pertence à família Amaranthaceae, a qual é formada por 169 gêneros e cerca de 2.360 espécies. É nativa da África tropical (Nigéria, Moçambique, Uganda) e da Ásia (China, Índia e Vietnã), no entanto, é encontrada em crescimento em todo o mundo, incluindo América, Austrália, Ilhas do Pacífico (OLADIMEJI; USIFOH, 2012). No Brasil, são encontradas apenas 145 espécies dessa família, as quais são distribuídas em 19 gêneros (MARCHIORETTO et al., 2016). Sua ocorrência foi registrada nas regiões Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins), Nordeste (Bahia, Maranhão), Centro-Oeste (Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (Paraná) (SENNA et al., 2016).

Esta planta é popularmente conhecida como carrapicho, carrapicho-rabo-de-raposa, erva daninha do pasto e caruru. É uma erva ou arbusto anual, relativamente erecta e que pode atingir uma altura de aproximadamente 1 m (BURKILL, 1995). É uma espécie que apresenta caule ramificado, inflorescência do tipo cacho longo e frutos tipo núcula que se aderem ao corpo dos animais, sendo esta uma forma de dispersão e propagação da espécie (MOREIRA; BRAGANÇA, 2011). Segundo Tavares (2015), a germinação de sementes de *C. prostrata* iniciou 1 dia após a semeadura (DAS) e atingiu 94% de germinação aos 10 DAS.

A planta *C. prostrata* possui utilizações medicinais para inúmeras doenças na Ásia, onde é normalmente usada para o tratamento da febre reumática, da disenteria, de ferimentos na pele, de problemas nos olhos e para a cura de queimaduras (BURKILL, 1995), pois seu extrato metanólico possui propriedades anti-inflamatórias e analgésicas (IBRAHIM et al., 2012). Foram detectadas nesta espécie a presença de saponinas, taninos, flavonóides, alcalóides e esteróides como o 20 hidroxiecldsona (20E), tanto em extratos foliares quanto de caules e raízes (OGURA et al., 2012).

2.3 Interação inseto-planta

Na natureza as plantas são suscetíveis a serem atacadas por insetos herbívoros, que buscam nas mesmas, nutrientes necessários para o seu desenvolvimento (SCHOONHOVEN et al., 2005). No entanto, as plantas apresentam os mais complexos sistemas de defesa (BALLARE, 2011) e para resistir ao ataque dos insetos utilizam mecanismos de defesa. Esses mecanismos podem ser: constitutivos ou induzidos (CHEN, 2008). As defesas constitutivas abrangem barreiras físicas (espinhos ou tricomas pegajosos) e químicas presentes na planta antes do ataque do herbívoro. As defesas induzidas são ativadas após o ataque do inseto e podem ser classificadas como diretas, em que a planta produz compostos tóxicos que afeta imediatamente o inseto, ou indireta, em que a planta libera sinais químicos (voláteis) para recrutar inimigos naturais e assim controlar os herbívoros presentes naquele momento (CHEN, 2008).

Para diferenciar o ataque de herbívoros de outros agentes bióticos, possivelmente as plantas evoluíram a capacidade de perceber os padrões moleculares associados à herbivoria através de elicitores químicos, derivados de secreções orais (OS), fluidos de oviposição e ferimentos decorrente da herbivoria (FELTON; TURLINSON, 2008; MITHOFER; BOLAND, 2008). O ferimento decorrente da atividade da alimentação do inseto pode desencadear respostas específicas em algumas plantas, pois, cada inseto herbívoro apresenta diferentes padrões de alimentação como, por exemplo, a forma em que o tecido da folha é removido, a frequência e o período em que esse inseto se alimenta. Portanto, é possível que algumas plantas percebam esses padrões específicos de ferimento e usem tais informações para produzir respostas ao estresse causado pela herbivoria (MITHOFER et al., 2005).

A herbivoria de insetos em plantas, estimula o acúmulo de compostos defensivos nas folhas danificadas e nas folhas opostas não danificadas (GREEN; RYAN, 1972), no qual um sinal pode ser transmitido para essas folhas (STANKOVIC; DAVIES, 1997) onde serão convertidos em alterações bioquímicas e fisiológicas (LI et al., 2002).

No entanto, a interação inseto-planta também possui o lado positivo, sendo uma via de mão dupla, onde os insetos possuem atividades benéficas como a polinização, enquanto as plantas promovem abrigo, sítios de oviposição e alimentação para a proliferação dos insetos (PANDA; KHUSH, 1995).

2.4 Trocas gasosas

Através das trocas gasosas são mensurados os parâmetros de taxa de assimilação líquida de CO₂ (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E) e concentração subestomática de CO₂ (C_i) para assim obter respostas fisiológicas das plantas sob um determinado estresse.

Um estudo realizado em condições de casa de vegetação, utilizando-se três genótipos de uva (Cynthia, Chardonnay e Cabernet Sauvignon) sob a herbivoria de quatro cigarrinhas (*Empoasca fabae*) no período de três dias, acarretou em reduções nos parâmetros de transpiração (37,6%), taxa fotossintética (22,3%) e condutância estomática (45,4%) (Lamp et al., 2011). Essa pesquisa sugeriu que o dano por *E. fabae* pode interferir na fisiologia dos genótipos de uva levando à interrupção dos processos normais de trocas gasosas e a redução de folhas, brotos e crescimento radicular (LENZ et al., 2009; LAMP et al., 2011).

Já no estudo realizado por Dai (2009), o dano causado por *Thrips tabaci* em plantas de *Hypericum sampsonii* resultou em aumentos significativos nos valores de C_i , E e g_s e uma redução em A . Diante da comparação das secções transversais das folhas entre o controle e as plantas danificadas, mostrou que *T. tabaci* diminuiu a espessura da lâmina com folhas gravemente feridas, as mais finas. As folhas infestadas foram caracterizadas por tecido esponjoso desorganizado e encolhido.

Assim, as diferenças nos valores de E entre o controle e as folhas lesadas podem ser atribuídas a diferenças anatômicas da folha que alteraram a g_s e o CO₂ nas cavidades substomatas aos locais de carboxilação (SYVERTSEN et al., 1995). As taxas fotossintéticas gerais de folhas de *H. sampsonii* danificadas por *T. tabaci* foram significativamente diminuídas (HIGUCHIA et al., 1999).

2.5 Fluorescência da clorofila *a*

A análise da fluorescência da clorofila *a* detecta os efeitos de estresse no processo fotossintético causados por fatores bióticos. É uma técnica utilizada na fisiologia das plantas de suma importância, pois pode-se obter informações detalhadas sobre o estado do sistema fotossensível II (PSII) (BAKER; ROSENQVIST, 2004).

A herbivoria de ácaros em folhas de jacinto-de-água (*Eichhornia crassipes*) reduziu significativamente F_m com o aumento do dano, traduzindo em uma diminuição na eficiência máxima da fotoquímica PSII, indicando que houve uma diminuição na eficiência com que a luz absorvida pela PSII é convertida em energia química (MARLIN, 2013). Nesta mesma pesquisa, a herbivoria do ácaro teve um impacto direto sobre a eficiência do PSII, onde causou redução em F_v/F_m (BAKER, 2008). Uma diminuição em F_v/F_m é frequentemente explicada pela inativação dos centros de reação (RCs) no PSII, uma vez que as mudanças em F_v/F_m exibem as mesmas tendências que as mudanças na densidade de RCs (LU; VONSHAK, 1999).

Em folhas de *H. sampsonii*, os parâmetros de fluorescência (ETR, Φ_{PSII} , q_p e NPQ) foram significativamente diminuídos com o aumento do dano de *T. tabaci* (DAI, 2009). As diminuições nos parâmetros de fluorescência indicaram que o mecanismo primário para a redução da taxa fotossintética em folhas danificadas por *T. tabaci* é via interferência da eficiência fotoquímica no estágio inicial da fotossíntese (BURD et al., 1996; HAILE et al., 1999). A herbivoria de *T. tabaci* ocasionou fechamento dos centros de reação de PSII, resultando em uma menor ETR e Φ_{PSII} , através de danos na membrana do tilacoide. Os resultados também mostraram reduções significativas em q_p e NPQ, especialmente nas folhas gravemente infestadas. O q_p é uma indicação da proporção de centros de reação PSII que estão abertos (MAXWELL ; JOHNSON, 2000) e mensura a excitação dos centros PSII e a remoção de elétrons da PSII pela cadeia de transporte de elétrons (CAMPBELL et al., 1998).

O NPQ tem o papel proteger contra a inibição induzida pela luz da fotossíntese. No entanto, o declínio desta variável pode levar a um excesso de energia nas folhas (ARO et al., 1993).

2.6 Indução de estresse oxidativo mediada pela herbivoria

Estresses bióticos exercem efeitos adversos sobre o crescimento e o desenvolvimento da planta. Durante a evolução, as plantas desenvolveram mecanismos regulatórios complexos

para se adaptarem a vários estressores ambientais. Uma das conseqüências do estresse é um aumento na concentração celular de espécies reativas de oxigênio (EROS), tais como o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e radicais hidroxila (OH^-). Mesmo em condições normais, plantas produzem EROS durante os processos metabólicos, no entanto o excesso resulta em dano oxidativo ou morte apoptótica das células (QUAN et al., 2008). O H_2O_2 é uma das espécies reativas de oxigênio que apresentam relativamente uma longa meia-vida (1ms) e o excesso de H_2O_2 nas células das plantas desencadeia o estresse oxidativo. Em baixa concentração, agem como um sinalizador acionando a tolerância a vários estresses bióticos e abióticos. Já em alta concentração, ele lidera para a morte programada da célula (BHATTACHARJEE, 2012).

Para a proteção contra essas EROS as células das plantas e suas organelas, como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos empregam um sistema de mecanismo antioxidativos eficientes, enzimáticos e não enzimáticos (DAVAR et al., 2013). O mecanismo enzimático antioxidante envolve a superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, glutathione redutase, catalase entre outras, enquanto os componentes não enzimáticos são carotenoides, ácido ascórbico, vitamina E, flavonoides, prolina e glutathione (MITTLER, 2002).

2.6.1 Peroxidação de lipídios e aldeído malônico

A peroxidação de lipídios acontece por meio da ação das EROs sobre os lipídios insaturados das membranas celulares, gerando radical alquila (L), alcoxila (LO) e peroxila (LOO) (CHANGE et al., 1979). Uma das formas para avaliar a peroxidação de lipídios é fazendo o teste de aldeído malônico (MDA) onde o mesmo é um dialdeído formado como produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados por cisão *beta* dos AGPIs peroxidados, principalmente o ácido araquidônico (LIMA, 2001). O MDA é considerado como um marcador bioquímico de estresse oxidativo (SHULAEV; OLIVER, 2006).

REFERÊNCIAS

ALLYSON, S. Description of last-instar larvae of species of North American Spilomelini (Lepidoptera: Pyralidae: Pyraustinae) with a key to species. **Canadian Entomologist**, v.116, p.1301–1334, 1984.

BALLARE, C. L. Jasmonate-induced defenses: A tale of intelligence, collaborators and rascals. **Trends Plant Science**, v. 16, pp. 249–257, 2011.

BURKILL, H. M. The Useful Plants of West Tropical Africa. Royal **Botanical Gardens**, Kew, v. 1, pp. 58–59, 1995.

CHANGE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev**, v. 59, n. 3, p. 527-605, 1979.

CHEN, M. S. Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. **Insect Science**, v. 15, n. 2, p. 101-114, 2008.

CLARKE-HARRIS, D.; FLEISCHER, S. J.; FENDER, A. **Identification guide** – Major pests of Callaloo, Pennsylvania State University. University Park, PA. 1998.

DAVAR, R.; DARVISHZADEH, R.; MAJD, A. Changes in antioxidant systems in sunflower partial resistant and susceptible lines as affected by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biologia**, v.68, p. 821-829, 2013.

DIEZ-RODRÍGUEZ, G. I.; HÜBNER, L. K.; ANTUNES, L. E. C.; NAVA, D. E. *Herpetogramma bipunctalis* (Lepidoptera: Crambidae) biology and techniques for rearing on leaves of the blackberry (*Rubus* spp., Rosaceae). **Brazilian Journal of Biology**, v.73, p.179-184. 2013.

FELTON, G.W.; TUMLINSON J.H. Plant–insect dialogs: complex interactions at the plant–insect interface. **Current Opinion in Plant Biology**, v.11, p. 457–463, 2008.

GREEN, T.R.; RYAN, C.A. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves – possible defense mechanism against insects. **Science**, v.175, p. 776–777, 1972.

IBRAHIM, B.; SOWEMINO, A.; VAN-ROOYEN, A.; VAN-DE-VENTER, M. Anti-inflammatory, analgesic and antioxidant activities of *Cyathula prostrata* (Linn) Blume (Amaranthaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 282-289. 2012.

KING, A. B. S.; SAUNDERS, J. L. The invertebrate pests of annual foods crops in Central America: a guide to their recognition and control. London: **Overseas Development Administration**, p. 166, 1984.

LI, L.; LI, C.; LEE, G.I.; HOWE, G.A. Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 6416–6421, 2002.

LIMA, É.S.; ABDALLA, D.S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

MARCHIORETTO, M.S.; SENNA, L.; SIQUEIRA, J.C. Amaranthaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB42>>. Acesso em: 03 Nov. 2016.

MITHOFER, A.; BOLAND, W. Recognition of herbivory-associated molecular patterns. **Plant Physiology**, v.146, p.825–831, 2008.

MITHOFER, A.; WANNER, G.; BOLAND, W. Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. II. Continuous mechanical wounding resembling insect feeding is sufficient to elicit herbivory-related volatile emission. **Plant Physiology**, v.137, p. 1160–1168, 2005.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant in Science**, v. 9, p. 405-410, 2002.

MOREIRA, H. J. C.; BRAGANÇA, H. B. N. **Manual de Identificação de Plantas Infestantes: Hortifrúti**. FMC Agricultural Products, 2011.

OGU, G. I.; TANIMOWO, W. O.; NWACHUKWU, P. U.; IGERE, B. E.; Antimicrobial and Phytochemical Evaluation of the Leaf, Stem Bark and Root Extracts of *Cyathula prostrata* (L) Blume against some Human Pathogens. **Journal of Intercult. Ethnopharmacology**, v.1, p.35-43. 2012.

OLADIMEJI, O. H.; USIFOH, C.O. Two Oils from the Ethyl-acetate Fraction of *Cyathula prostrata* (L.) Blume. **Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences**, v. 1, p. 54-59, p. 909-930, 2012.

PANDA, N.; KHUSH, G.S. Host plant resistance to insects. **Wallingford: CAB International**, 1995.

SCHOONHOVEN, L.M.; LOON, J.A.; DICKE, M. **Insect-plant biology**. Oxford University press- New York, p.421, 2005.

SENNA, L. **Cyathula in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15416>>. Acesso em: 11 Jul. 2016.

SHULAEV, V.; OLIVER, D.J. Metabolic and proteomic markers for oxidative stress. New tools for reactive oxygen species research. **Plant Physiol**, v. 141, p. 367-372. 2006.

SOLIS, M. A. Key to selected Pyraloidea (Lepidoptera) larvae intercepted at U.S. ports of entry: revision of Pyraloidea. In: WEISMAN. **“keys to some frequently intercepted lepidopterous larvae”**. University of Nebraska, Lincoln, NE, USA. 2006.

STANKOVIC, B.; DAVIES, E. Intercellular communication in plants: electrical stimulation of proteinase inhibitor gene expression in tomato. **Plant**, v.202, p. 402–406, 1997.

TAVARES, M. M. G. Estabelecimento de um modelo para estudar a interação planta-inseto mediada por 20-Hidroxicdisona (20E). dissertação (Mestrado) – Universidade federal Rural da Amazônia, 2015.

3. TROCAS GASOSAS E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a* EM PLANTAS DE *Cyathula prostrata* SUBMETIDAS A HERBIVORIA CAUSADA POR *Herpetogramma bipunctalis*.

RESUMO

O estresse biótico pode promover uma série de alterações no metabolismo da planta, resultando em alterações fisiológicas e bioquímicas. Este trabalho objetivou avaliar os parâmetros de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e o estresse oxidativo em plantas de *Cyathula prostrata* (L) Blume, pertencente à família Amaranthaceae, em resposta a herbivoria da lagarta da espécie *Herpetogramma bipunctalis*, pertencente a família Crambidae, em três períodos: 12, 36 e 60 horas. Após cada período de ataque foram avaliados os parâmetros de trocas gasosas [taxa fotossintética (*A*), condutância estomática (g_s), concentração de carbono interno (C_i) e transpiração (*E*)] e fluorescência de clorofila *a* [máxima fluorescência (F_m), máxima eficiência quântica do PSII (F_v/F_m), rendimento quântico real do transporte de elétrons do PSII (Φ_{PSII}), taxa de transporte de elétrons (*ETR*), coeficiente de dissipação fotoquímica (q_p)]. Feitas as leituras dessas variáveis, realizou-se as análises bioquímicas para a possível ocorrência de estresse oxidativo como o peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) e aldeído malônico (MDA). Os resultados obtidos revelam que os parâmetros de trocas gasosas em *A*, g_s e *E* reduziram em folhas não danificadas quanto em folhas que foram danificadas nos três períodos avaliados, enquanto que C_i aumentou em folhas danificadas. Os parâmetros de fluorescência em F_m teve uma redução significativa apenas em folhas danificadas nos períodos 36 e 60h, F_v/F_m reduziu significativamente em folhas danificadas no tempo de 60h e em Φ_{PSII} , *ETR* e q_p reduziram tanto em folhas danificadas quanto em folhas que não foram danificadas nos três períodos, no entanto, o coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ) não foi alterado. Observou-se também aumento significativo na concentração de H_2O_2 nos tempos de 12, 36 e 60h e aumento significativo de MDA no tempo de 60h em folhas danificadas, sugerindo a ocorrência de estresse oxidativo. O estresse causado por *H. bipunctalis* reduziu o desempenho fotossintético em folhas danificadas e folhas não danificadas de *C. prostrata*. Análise dos dados apresentados sugerem que o estresse provocado por *H. bipunctalis* em folhas de *C. prostrata* promovem alterações nas trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*, sugerindo a ocorrência de estresse oxidativo.

Palavras-chave: Interação inseto-planta, trocas gasosas, fluorescência, fotossíntese.

3. TROCAS GASOSAS E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a* EM PLANTAS DE *Cyathula prostrata* SUBMETIDAS A HERBIVORIA CAUSADA POR *Herpetogramma bipunctalis*

ABSTRACT

Biotic stress can promote a number of changes in plant metabolism, resulting in physiological and biochemical changes. The objective of this work was to evaluate the parameters of gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence and oxidative stress in plants of *Cyathula prostrata* (L) Blume, belonging to the family Amaranthaceae, in response to herbivory of the caterpillar of the species *Herpetogramma bipunctalis*, belonging to the family Crambidae, in three periods: 12, 36 and 60 hours. After each attack period, it was evaluated gas exchange parameters [(photosynthetic rate (*A*), stomatal conductance (g_s), internal carbon concentration (C_i) and transpiration (*E*)] and chlorophyll *a* fluorescence at [maximum fluorescence (F_m), maximum quantum efficiency of PSII (F_v / F_m), real quantum yield of PSII electron transport (Φ_{PSII}), electron transport rate (*ETR*), photochemical dissipation coefficient (q_p)]. After reading these variables, a biochemical analysis was performed for the possible occurrence of oxidative stress such as hydrogen peroxide (H_2O_2) and malonic aldehyde (MDA). The results showed that the gas exchange parameters in *A*, g_s and *E* reduced in undamaged leaves as well as in leaves that were damaged in the three evaluated periods, while C_i increased in damaged leaves. The F_m fluorescence parameters had a significant reduction only in damaged leaves in periods 36 and 60h, F_v / F_m significantly reduced in leaves damaged in 60h time and in Φ_{PSII} , *ETR* and q_p reduced both in damaged leaves and leaves that were not damaged in the three periods, however NPQ was not changed. There was also a significant increase in H_2O_2 concentration at 12, 36 and 60h times and a significant increase of MDA in the time of 60 h in damaged leaves, suggesting the occurrence of oxidative stress. Stress caused by *H. bipunctalis* reduced the photosynthetic performance on damaged leaves and undamaged leaves of *C. prostrata*. Analysis of the presented data suggests that the stress caused by *H. bipunctalis* on leaves of *C. prostrata* promotes changes in gas exchange and fluorescence of chlorophyll *a*, suggesting the occurrence of oxidative stress.

Key words: Insect-plant interaction, gas exchange, fluorescence, photosynthesis.

3.1 Introdução

A herbivoria de insetos induz uma reconfiguração no metabolismo das plantas, incluindo a produção alterada de metabólitos defensivos e proteínas, e gera uma reatribuição de recursos para atender as demandas metabólicas (KESSLER; BALDWIN, 2002).

No entanto, como forma de defesa, elas utilizam vários mecanismos fisiológicos e bioquímicos para se proteger contra os estresses (RASMANN; AGRAWAL, 2009, USHA; JYOTHSNA, 2010). Esses mecanismos são: constitutivos, ou seja, estão sempre presentes na planta, independente do ataque herbívoro, ou indutíveis, os quais são ativados somente quando a planta é atacada (FRANCESCHI et al., 2005; KESSLER; BALDWIN, 2002).

Mesmo apresentando estratégias de defesa, o estresse por herbívoros promove em plantas respostas moleculares, fisiológicas e bioquímicas, levando à redução da fotossíntese (ZANGERL et al., 2002), que pode ser limitada por vários fatores e condições de estresse (GOLAN et al., 2015).

Para avaliar a resposta da fotossíntese em relação a herbivoria em plantas, além dos parâmetros de trocas gasosas que compreendem a eficiência na regulação da abertura estomática, que influencia, diretamente, na assimilação do CO₂ para a conservação da taxa fotossintética (NASCENTE et al., 2016), uma das técnicas disponíveis para um melhor entendimento desse processo, é a análise da fluorescência da clorofila *a*.

Esta análise é utilizada para avaliar a eficiência da aplicação da luz nos processos fotoquímicos da fotossíntese (MAXWELL; JOHNSON 2000), sendo, especificamente, no fotossistema II (PSII) e I (PSI) (NABITY et al., 2009). Esses parâmetros são, portanto, considerados indicadores úteis do comportamento da atividade do aparato fotossintético em plantas, sob condições de estresse (BERGER et al., 2007). Os estresses bióticos modificam o metabolismo celular vegetal, afetando a fotossíntese e, conseqüentemente, alterando a taxa de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (NAVROT et al., 2006; TAYEFI-NASTABADI et al., 2010). As EROs, ao serem alteradas diante do estresse, se manifestam de forma diferente, podendo agir de maneira prejudicial, protetora ou sinalizadora, dependendo do equilíbrio, entre a produção e a eliminação, pela planta (BOGUSZEWSKA; ZAGDAŃSKA, 2012).

Vários estudos são realizados em relação a análise dos parâmetros fotossintéticos em plantas, submetidas ao estresse biótico. As lagartas da espécie *H. bipunctalis* têm sido utilizadas em estudos relacionados à interação inseto-planta (TAVARES, 2015), tendo em vista a compreensão dos mecanismos de defesa da planta contra o ataque de insetos e, assim,

encontrar estratégias que visam o controle de insetos que atacam espécies de planta de interesse comercial. A espécie *H. bipunctalis* é encontrada na América do Norte, América Central e América do Sul (SOLIS, 2006), e são consideradas uma praga, pois atacam espécies de plantas da família Chenopodiaceae, Amaranthaceae, Apidaceae, entre outras, tornando-as hospedeiras para proteção e reprodução (PEREZ et al., 2011).

A planta *C. prostrata* é uma hospedeira do inseto *H. bipunctalis*, popularmente conhecida no Brasil como carrapicho, carrapicho-rabo-de-raposa, fia-bana e mato-bana (MOREIRA; BRAGANÇA, 2011), considerada uma erva daninha de terras cultivadas e de áreas florestais. Na África, Ásia e Austrália, é utilizada como erva medicinal para o tratamento de doenças como febre reumática, feridas, problemas do olho e disenteria (BURKILL, 1995).

No estudo realizado sobre a fisiologia do inseto *H. bipunctalis* alimentados com folhas de *C. prostrata*, foi possível observar a interação inseto-planta, conforme os descendentes viáveis de *H. bipunctalis* (TAVARES, 2015). No entanto, essa interação, pode causar alterações no metabolismo da planta por meio do estresse do inseto, podendo, ainda, resultar em alterações fisiológicas.

O estudo da fisiologia tem auxiliado, ainda, a compreensão da flexibilidade das respostas fotossintéticas das plantas às diversas condições de estresse, como por exemplo, a herbivoria de insetos-pragas. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho visa avaliar a magnitude das alterações nos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* e a possível ocorrência de estresse oxidativo em plantas de *C. prostrata* submetidas ao ataque de *H. bipunctalis* no período de 12, 36 e 60 horas, após o contato do inseto com a planta.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Material vegetal e preparação das mudas

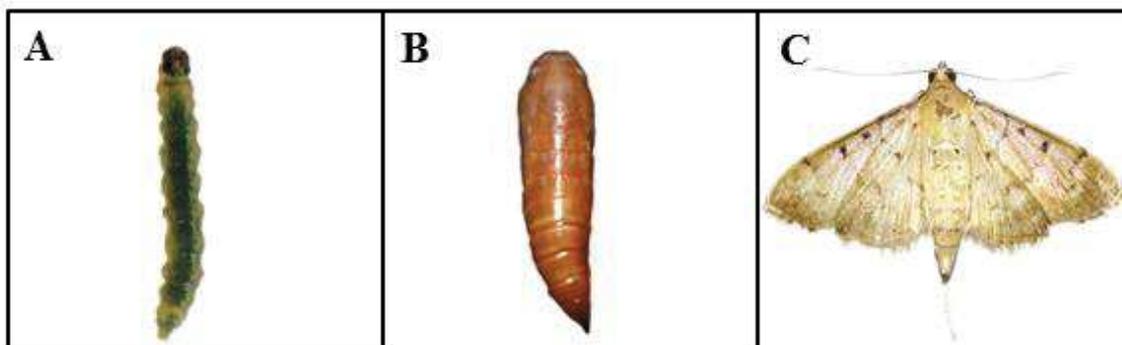
Mudas clonais de *Cyathula prostrata* (L.) Blume foram obtidas por meio de estacas coletadas de plantas matrizes no Campus da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Belém, PA, Brasil (01°27'19 "S, 48°26'20" W). As estacas de, aproximadamente, 20 cm de comprimento contendo três nós foram dispostas verticalmente em sacos de polietileno (15 por 25 centímetros), preenchidos com 1,6 L de substrato constituído de uma mistura de terriço (obtido de um Latossolo Amarelo textura média), areia e cama de aviário (4:1:1, v/v/v). Em cada saco foi adicionado 6,28 g de NPK (10-10-10) quatro dias antes do plantio das estacas. Os sacos foram irrigados diariamente, aplicando-se 250 mL de água, uma vez ao dia, às 9 h. Após 45 dias do plantio das estacas as mudas apresentaram número de folhas suficientes para a instalação do experimento definitivo. As mudas foram preparadas em casa de vegetação do Instituto de Ciências Agrárias da UFRA, Campus Belém.

3.2.2 Obtenção e criação das lagartas

As lagartas de *H. bipunctalis* (Fabricius) foram coletadas na UFRA; Campus Belém, PA, Brasil (01°27'19 "S, 48°26'20" W) e criadas no Laboratório de Fisiologia e Biologia Molecular de Plantas (UFRA, Campus Belém). As lagartas foram alocadas em caixas de acrílico tipo gerbox (11,5 x 11,5 x 3,5 cm; largura x comprimento x altura), na proporção de dez lagartas por caixa, e mantidas sob temperatura e umidade relativa média do ar respectivamente de 24 ± 2 °C $75 \pm 10\%$; e fotoperíodo natural de 12 h para fotofase e 12 h para escotofase. As lagartas foram alimentadas com folhas de *C. prostrata*, diariamente.

A fase de pupa ocorreu, em média, 12 dias depois; e o estágio de mariposa, sete dias após a pupa. As mariposas foram coletadas e transferidas para gaiolas de madeira (37 x 37 x 49 cm; largura x comprimento x altura) teladas com filó branco e alimentadas com uma dieta constituída de xarope de glicose e água (20:80, v/v). A oviposição ocorreu, em média, três dias após. Este ciclo de criação foi repetido diversas vezes até que o número de lagartas fosse suficiente para a execução do experimento definitivo. Foram utilizadas lagartas entre terceiro e quarto ínstar para a indução do estresse em plantas de *C. prostrata*.

Figura 1- *Herpetogramma bipunctalis*: A) Fase larval; B) Fase de pupa; C) Fase adulta.



Fonte: Autora.

3.2.3 Indução do estresse e delineamento experimental

Para condução do experimento foram utilizadas 30 plantas, divididas em três tratamentos, com cinco repetições e com cinco controles. No primeiro, as plantas sofreram ataques por lagartas durante 12 h. No segundo, sofreram ataque durante 36 h. E, por fim, no terceiro tratamento, as plantas sofreram ataque por lagartas durante 60 h.

Foram dispostas três lagartas de *H. bipunctalis* (entre 3º e 4º ínstaes) por planta, na superfície adaxial de três folhas distintas, do segundo par de folhas, contadas a partir do ápice. Os tratamentos foram avaliados após 12, 36 e 60 h da infestação das plantas, sendo as variáveis fisiológicas e bioquímicas de interesse determinadas em folhas intactas (ou seja, não danificadas) e folhas danificadas pelo ataque da lagarta.

3.2.4 Trocas gasosas

A assimilação líquida de CO₂ (*A*), a condutância estomática ao vapor de água (*g_s*), a concentração subestomática de CO₂ (*C_i*) e a taxa de transpiração (*E*) foram determinadas no segundo par de folhas opostas (contadas a partir do ápice), utilizando-se um analisador portátil de gases a infravermelho (LI- 6400XT, LI-COR, Lincoln, NE) sob uma concentração de CO₂ de 400 μmol mol⁻¹ e radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de 1000 μmol de fótons m⁻² s⁻¹. Este intervalo de medição (9:00 - 11:00 h) foi ajustado de acordo com os resultados obtidos com curva diurna de trocas gasosas para a espécie. Foram realizadas duas leituras por planta, sendo uma na folha danificada pelo inseto e a outra na folha oposta não danificada.

3.2.5 Fluorescência da clorofila *a*

A fluorescência da clorofila *a* foi avaliada nas mesmas folhas utilizadas para as trocas gasosas, utilizando um aparato de fluorescência (IG 6400-40; LI-COR Inc.) acoplado à câmara do analisador portátil de gases a infravermelho. As variáveis de fluorescência da clorofila *a* foram: fluorescência máxima (F_m), máximo rendimento quântico do FSII (F_v/F_m), rendimento quântico real do transporte de elétrons do FSII (Φ_{PSII}), coeficiente de extinção fotoquímica (q_p), coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ) e taxa de transporte de elétrons (ETR).

As folhas foram adaptadas ao escuro por 30 min (Figura 4) e, posteriormente, iluminadas com um pulso de luz fraca e modulada ($0,03 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para obter a fluorescência inicial (F_0). Um pulso de luz branca saturante de $6.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi aplicado durante 0,8 s para garantir a máxima emissão de fluorescência (F_m). Posteriormente, as folhas amostradas foram iluminadas durante 300 s com uma luz actínia ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para obter o rendimento da fluorescência no estado estacionário (F_s). Em seguida, pulsos de luz branca saturantes foram aplicados para a obtenção da fluorescência máxima (F'_m). A luz actínia foi então desligada e uma iluminação vermelho-distante ($2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foi aplicada para estimar a fluorescência inicial adaptada na luz (F'_0). A partir dessas medições foram calculados os seguintes parâmetros: eficiência fotoquímica máxima do PSII [$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$] (Oxborough and Baker 1997), coeficientes de dissipação fotoquímica [$q_p = (F'_m - F_s) / (F'_m - F'_0)$] e não-fotoquímica [$NPQ = (F_m/F'_m) - 1$], rendimento quântico do transporte de elétrons no PSII [$\Phi_{PSII} = (F'_m - F_s) / F'_m$] e a taxa de transferência de elétrons [$ETR = \Phi_{PSII} \times \text{PPFD} \times f \times \alpha$] (MAXWELL; JOHNSON, 2000).

3.2.6 Coleta de amostras e análise bioquímica

Após a leitura das variáveis de trocas gasosas e da fluorescência da clorofila *a*, o segundo par de folhas (folha intacta e folha danificada) foi coletado e imediatamente inseridos em envelopes de papel alumínio, identificados e colocados em isopor contendo nitrogênio líquido para conservar as amostras, paralisando a atividade metabólica. Em seguida, as amostras foram armazenadas em ultra freezer com temperatura de -80°C , para posterior análise bioquímica.

3.2.7 Peroxidação de lipídeos de membrana

Foi estimada através da quantificação de aldeído malônico (MDA) segundo Cakmak e Host, (1991). Amostras foliares (100 mg PF) foram maceradas em 2 mL de ácido tricloacético (TCA; 0,1% p/v) utilizando um almofariz e pistilo congelados sobre um isopor com gelo. O homogenato foi transferido de forma quantitativa para um tubo de centrífuga sob gelo para mantê-los em baixa temperatura. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 13.000 x g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a uma alíquota de 500 µL do mesmo foi adicionado 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA; 0,5% p/v preparado em TCA 20%), seguindo-se de agitação em vortex. Como branco foi utilizado uma mistura de 500 µL de TCA 0,1% (p/v) e 1,5 mL de TBA 0,5% (conforme descrito acima). As amostras e o branco foram incubados por 20 min a 90°C em banho-maria e a reação foi parada em banho de gelo por 5 minutos. As amostras foram transferidas para microtubos de 2,0 mL e centrifugados a 13.000 x g por 15 minutos a 4 °C para clarificação. A absorbância da mistura da reação foi determinada a 532 e a 600 nm em espectrofotômetro. Utilizou-se, para os cálculos, o coeficiente de absorvidade molar de 155 mM cm⁻¹ e os resultados foram expressos em nmol g⁻¹ PF.

3.2.8 Peróxido de hidrogênio

A concentração foliar de H₂O₂ foi determinada segundo KUO e KAO (2003). As amostras (150 mg PF) foram maceradas em 1,5 mL de TCA 0,1% (p/v) e o homogenato centrifugado a 10.000 x g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e uma alíquota de 210 µL deste foi misturada a 1 mL de um meio de reação constituído de 250 µL de tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,0), 500 µL de iodeto de potássio 1 M e 40 µL de H₂O destilada. Cada amostra foi avaliada em triplicata pela determinação da absorbância a 390 nm em espectrofotômetro. As concentrações de H₂O₂ foram estimadas com base em curva padrão preparada com soluções de H₂O₂ de concentrações conhecidas Os resultados foram expressos em mmol de H₂O₂ g⁻¹ PF (GAY e GEBICKI, 2000).

3.2.9 Análise estatística

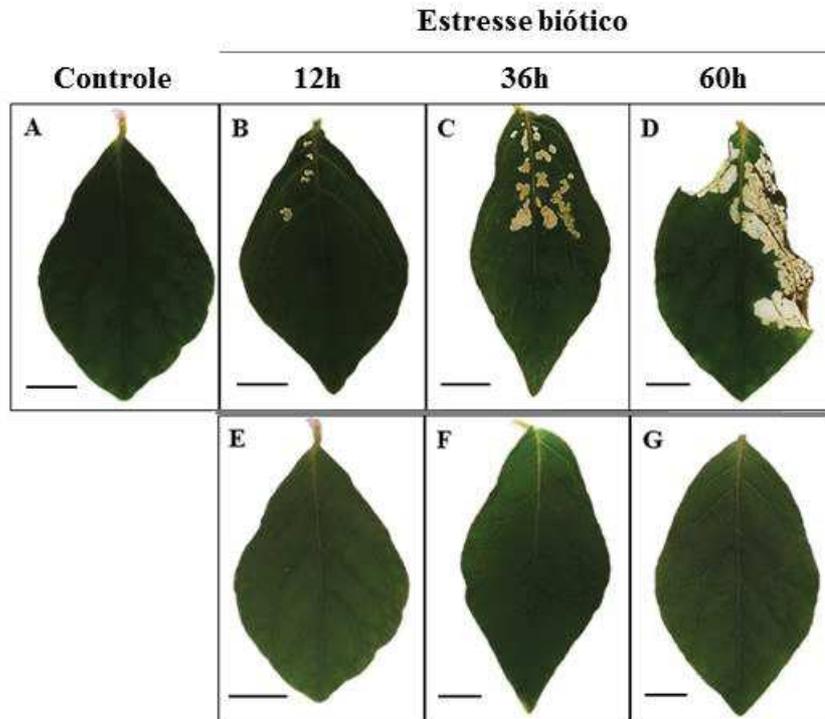
O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos, contendo cinco repetições e cinco controles para cada tratamento. Os dados dos tratamentos obtidos foram comparados pelo teste t ($P \leq 0,05$). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste SNK-Student-Newman-Keuls com ($P \leq 0.05$), usando o software R versão 3.1.

3.3 Resultados

3.3.1 Avaliação qualitativa de folhas de *C. prostrata* atacadas por lagartas de *H. bipunctalis*

Com o objetivo de realizar uma avaliação qualitativa, as folhas de *Cyathula prostrata* foram submetidas ao estresse biótico nos períodos de 12, 36 e 60 horas. Em folha controle (Fig. 2A), como esperado, não houve nenhuma lesão por não conter inseto; (Fig. 2B) folha danificada sob estresse biótico de 12 horas, apresenta pouca lesão pelo inseto; (Fig. 2C) folha danificada sob estresse biótico de 36 horas, houve um aumento da área foliar lesionada pelo inseto; (Fig. 2D) folha danificada sob estresse biótico de 60 horas, o dano foi superior nesse período, onde praticamente 50% da área foliar foram consumidos pelo inseto. No entanto, conclui-se que o dano foi progressivo ao longo das diferentes horas. Além disso, foi observado que as folhas opostas àquelas que receberam as lagartas não apresentaram qualquer sintoma de dano aparente independentemente do tempo de herbivoria (Fig. 2E-G).

Figura 2- Aspecto morfológico de folhas de *C. prostrata* na ausência de herbivoria (Controle; A) e submetidas a herbivoria por *H. bipunctalis* (Estresse biótico; B a G). A imagem da planta Controle é representativa dos diferentes tempos de avaliação (12, 36 e 60 h). As imagens B, C e D referem-se às folhas das plantas estressadas submetidas ao ataque da lagarta por 12, 36 e 60 h, respectivamente. As imagens E, F e G referem-se às folhas das plantas estressadas opostas àquelas que receberam as lagartas e acessadas após 12, 36 e 60 h da infestação. As fotos são representativas de cinco repetições e as barras horizontais em cada imagem correspondem a 1 cm.



Fonte: Autora

3.3.2 Trocas gasosas

Com o objetivo de avaliar o efeito do estresse provocado pelo inseto *H. bipunctalis* ao atacar a planta *C. prostrata* durante os diferentes períodos de 12, 36 e 60 horas, foram avaliados os parâmetros de trocas gasosas: Taxa de assimilação de CO₂ (*A*) (Fig. 3A); Condutância estomática (*g_s*) (Fig. 3B); Transpiração (*E*) (Fig. 3C); e Concentração de CO₂ intercelular (*C_i*) (Fig. 3D).

A média da *A* nas plantas controle avaliadas no tempo de 12 h foi de 20,8 μmol m⁻² s⁻¹ (±01,4), reduzindo para 14,1 μmol m⁻² s⁻¹ (±1,3) e 10,9 μmol m⁻² s⁻¹ (±1,3) nas folhas intactas e danificadas das plantas estressadas respectivamente (Fig. 3A). Portanto, essas reduções foram, da ordem de 32,3% e 47,6 % para folhas intactas e danificadas das plantas estressadas em relação às plantas controle (Fig. 3A).

Com 36 horas, a média de CO_2 (A) no controle foi de $20,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($\pm 0,5$), em folhas intactas foi de $15,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($\pm 1,5$) e em folhas danificadas foi de $8,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($\pm 0,2$). Ocorreu uma redução de 25,8 % em folhas intactas e 60 % em folhas danificadas (Fig. 3A).

Com 60 horas, a média no controle foi de $20,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($\pm 0,466$), folhas intactas $12,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($\pm 0,217$) e folhas danificadas de $3,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($\pm 0,530$) da taxa de assimilação de CO_2 (A). Ocorreu uma redução de 37,9 % em folhas intactas e 84,1 % em folhas danificadas (Fig. 3A).

Analisando os dados, em comparação ao controle, pode-se observar que houve uma diferença significativa de assimilação líquida de CO_2 (A), para todos os tempos, tanto nas folhas intactas quanto nas folhas danificadas. Houve diferença significativa nos diferentes tempos (12, 36 e 60 horas) na condição (folha danificada) (Fig. 3A).

A média da condutância estomática (g_s) durante o estresse biótico de 12 horas, no controle foi de $0,24$ ($\pm 0,031$) $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$, nas folhas intactas foi de $0,14$ ($\pm 0,034$) $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e nas folhas danificadas foi de $0,10$ ($\pm 0,011$) $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Houve uma redução de 41,7% nas folhas intactas e uma redução de 58,4% nas folhas danificadas, quando comparadas ao controle (Fig. 3B).

Com 36 horas de estresse, a média de (g_s) do controle foi de $0,21$ ($\pm 0,020$) $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em folhas intactas foi de $0,14$ ($\pm 0,026$) $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e nas folhas danificadas foi de $0,10$ ($\pm 0,009$) $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Houve uma redução de 33,4% nas folhas intactas e 52,4% nas folhas danificadas, quando comparadas também ao controle (Fig. 3B).

No tempo de 60 horas, a média da condutância estomática da planta controle foi de $0,21$ $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($\pm 0,024$), nas folhas intactas $0,14$ $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($\pm 0,005$) e nas folhas danificadas $0,08$ $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($\pm 0,007$) nas folhas danificadas. Em folhas intactas houve redução do g_s em 33,4%, e nas folhas danificadas a redução foi de 61,9% (Fig. 3B).

Deste modo, também em relação ao controle, conclui-se que para todos os tempos de herbivoria do inseto, houve uma diferença significativa, tanto na folhas intactas quanto na folhas danificadas. Além disso, não houve diferença significativa nos diferentes tempos dentro de cada condição (controle, folha intacta e folha danificada) (Fig. 3B).

A média de transpiração (E) no período de 12 horas foi de $5,6$ $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($\pm 0,521$), $3,3$ $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($\pm 0,694$) e $2,8$ $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($\pm 0,236$) nas folhas controle, folhas intactas e folhas danificadas, respectivamente. Ocorreu uma redução de 41,1% nas folhas intactas e redução de 50% nas folhas danificadas (Fig. 3C).

No tempo de 36 horas a média de transpiração foi de $4,7 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($\pm 0,456$) nas folhas controles, $2,9 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($\pm 0,586$) nas folhas intactas e $2,6 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($\pm 0,341$) nas folhas danificadas. Ocorreu uma redução de 38,3% em folhas intactas e 44,7% nas folhas danificadas (Fig. 3C).

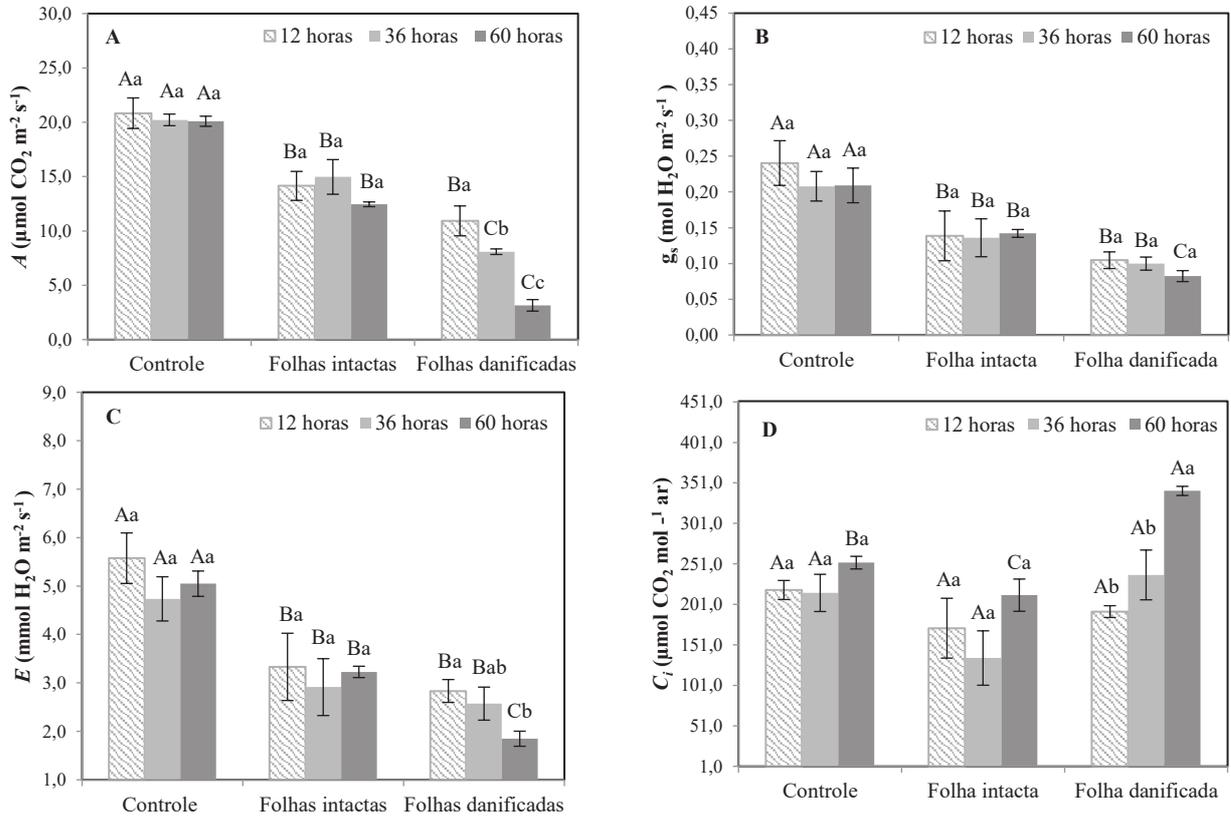
Já com 60 horas, o valor da média do controle foi de $5,0 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($\pm 0,260$), $3,2 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($\pm 0,116$) para as folhas intactas, e $1,8 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($\pm 0,155$) para as folhas danificadas. A redução dos valores de E nas folhas intactas foi de 36% e nas folhas danificadas foi de 64% (Fig. 3C). Portanto, conclui-se, considerando o controle, que houve uma diferença significativa da transpiração em folhas intactas e em folhas danificadas, para todos os tempos de indução do inseto. Houve também uma diferença significativa nos diferentes tempos, na condição (folha danificada) (Fig. 3C).

A média dos valores da concentração intercelular de CO_2 (C_i) no período de 12 horas foi de $218,7 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($\pm 11,781$) para o controle, $171,6 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($\pm 36,963$) para folhas intactas e $192,1 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($\pm 7,295$) para folhas danificadas. Houve uma redução de (C_i) nas folhas intactas de 21,6%, e nas folhas danificadas houve uma redução de 12,2% (Fig. 3D).

Para período de 36 horas, a media foi de $215,2 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($\pm 22,978$) para o controle, $134,7 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($\pm 33,580$) para folhas intactas e $237,3 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($\pm 30,730$) para folhas danificadas. O valor nas folhas intactas reduziu 37,5 %, e nas folhas danificadas ocorreu um aumento de 10,2% (Fig. 3D).

Para 60 horas, o valor médio de C_i no controle foi de $252,5 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($\pm 7,832$), folhas intactas foi de $212,4 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($\pm 19,866$) e folhas danificadas $341,1 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($\pm 5,568$). Ocorreu uma redução de 15,9% nas folhas intactas e houve um aumento de 35% nas folhas danificadas (Fig. 3D). Portanto, conclui-se, considerando o controle, que, houve uma diferença significativa nas folhas intactas e folhas danificadas, somente com 60 horas de estresse biótico. Houve também uma diferença significativa nos diferentes tempos, na condição (folha danificada) (Fig. 3D).

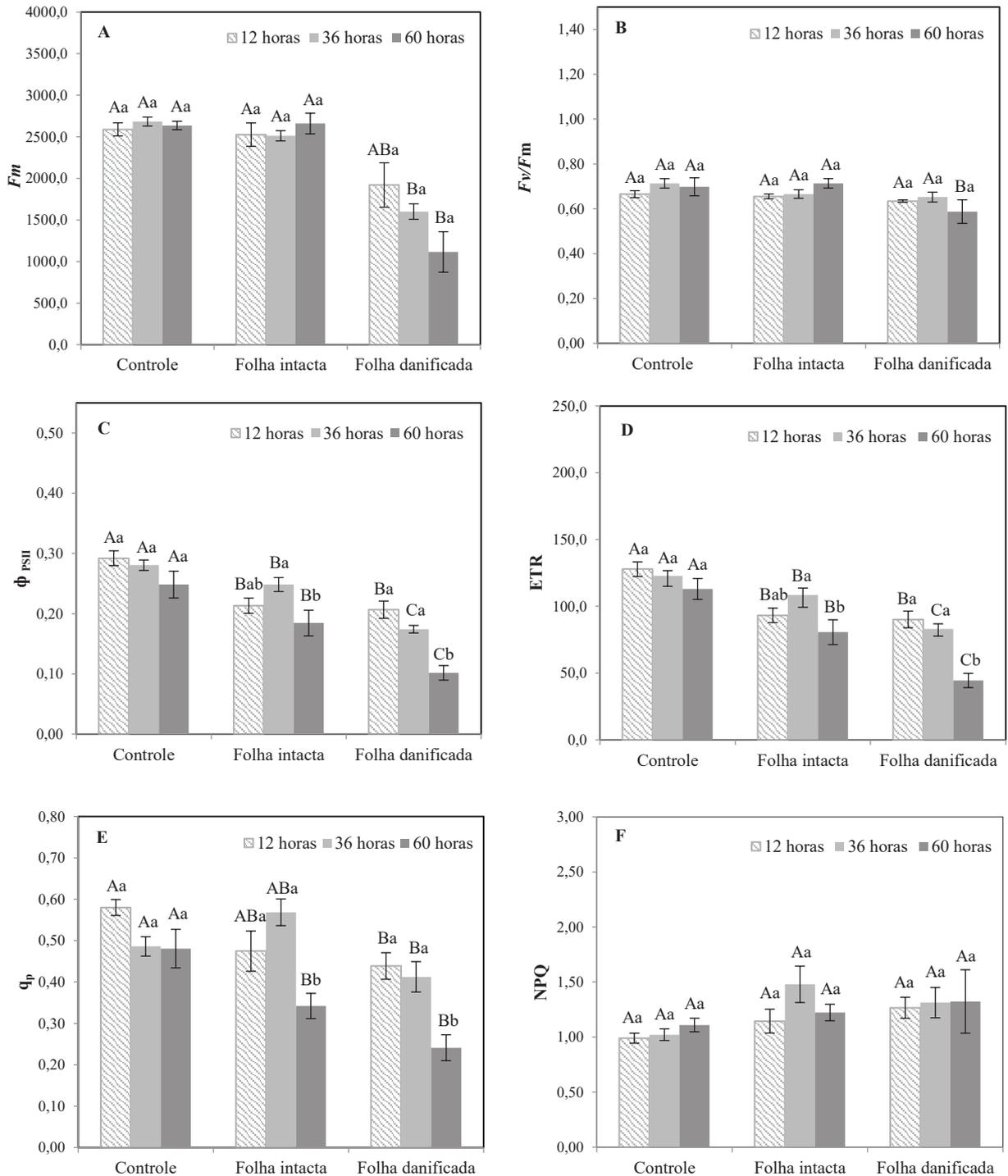
Figura 3- Trocas gasosas. **(A)** Taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*); **(B)** Condutância estomática (*g_s*); **(C)** Transpiração (*E*) e **(D)** Concentração de CO₂ intercelular (*C_i*) em folhas de *Cyathula prostrata* atacadas pelo inseto *Herpetogramma bipunctalis*. Letras maiúsculas comparam as médias nas diferentes condições (controle, folha intacta e folha danificada) no mesmo tempo. Letras minúsculas comparam as médias entre os diferentes tempos (12h, 36h e 60h) dentro de cada condição (controle, folha intacta e folha danificada). As médias foram comparadas pelo teste SNK-Student-Newman-Keuls com *p* < 0.05. O Erro padrão é indicado por barras.



3.3.3 Fluorescência da clorofila *a*

Com o objetivo de se avaliar o efeito do estresse provocado pelo inseto *H. bipunctalis* ao atacar a planta *C. prostrata* para os períodos de 12, 36 e 60 horas, avaliaram-se os parâmetros de fluorescência da clorofila *a*: Fluorescência máxima (F_m) (Figura 4A); Máxima eficiência quântica do PSII (F_v/F_m) (Figura 4B); Rendimento quântico real do transporte de elétrons do PSII (Φ_{PSII}) (Figura 4C); Taxa de transporte de elétrons (ETR) (Figura 4D); Coeficiente de dissipação fotoquímica (q_P) (Figura 4E); Coeficiente de dissipação não-fotoquímico (NPQ) (Figura 4F).

Figura 4- Fluorescência da clorofila *a*. **(A)** Máxima fluorescência (F_m), **(B)** máxima eficiência quântica do PSII (F_v/F_m), **(C)** rendimento quântico real do transporte de elétrons do PSII (Φ_{PSII}), **(D)** taxa de transporte de elétrons (ETR), **(E)** coeficiente de dissipação fotoquímica (q_p), **(F)** coeficiente de dissipação não-fotoquímico (NPQ), em folhas de *Cyathula prostrata* atacadas por *Herpetogramma bipunctalis*. Letras maiúsculas comparam as médias nas diferentes condições (controle, folha intacta e folha danificada) no mesmo tempo. Letras minúsculas comparam as médias entre os diferentes tempos (12h, 36h e 60h) dentro de cada condição (controle, folha intacta e folha danificada). As médias foram comparadas pelo teste SNK-Student-Newman-Keuls com $p < 0.05$. O Erro padrão é indicado por barras.



O valor médio da fluorescência máxima (F_m), no período de 12 horas de estresse biótico no controle, foi de 2589,4 ($\pm 78,682$). Para as folhas intactas foi de 2526,1 ($\pm 140,703$) e para as folhas danificadas foi de 1920,6 ($\pm 266,758$). Pode-se observar que ocorreu uma redução de 2,5 % nas folhas intactas e de 25,9% nas folhas danificadas (Fig. 4A).

Em 36 horas de estresse biótico, o valor médio de F_m no controle foi de 2683,2 ($\pm 54,261$). Para as folhas intactas foi de 2512,2 ($\pm 61,437$) e para as folhas danificadas foi de 1600,9 ($\pm 93,116$). Pode-se observar, também, que ocorreu uma redução de 6,4% nas folhas intactas e 40,4% nas folhas danificadas (Fig. 4A).

Com 60 horas, os valores médios de F_m foram 2635,8 ($\pm 50,840$), 2659,4 ($\pm 124,099$) e 1115,0 ($\pm 243,279$) para controle, folhas intactas e danificadas, respectivamente. Houve um aumento de 0,8% nas folhas intactas e uma redução de 57,7% nas folhas danificadas (Fig. 4A). É possível concluir que nos tempos de 36 e 60 horas de estresse biótico, houve diferença significativa somente nas folhas danificadas, em relação ao controle. E, ainda, não houve diferença significativa em nenhum tempo, dentro de cada condição (controle, folha intacta e folha danificada) (Fig. 4A).

A média da máxima eficiência quântica (F_v/F_m) com 12 horas em plantas controle, folhas intactas e folhas danificadas, foi de 0,67 ($\pm 0,015$), 0,66 ($\pm 0,021$) e 0,63 ($\pm 0,040$), respectivamente. Observa-se que houve a redução de 1,5% nas folhas intactas e uma redução de 6% nas folhas danificadas (Fig. 4B).

Com 36 horas de estresse, a média de F_v/F_m em plantas controle, folhas intactas e folhas danificadas, foi de 0,71 ($\pm 0,010$), 0,67 ($\pm 0,018$) e 0,65 ($\pm 0,021$), respectivamente. Houve, portanto, uma redução de 5,7% nas folhas intactas e de 8,5% nas folhas danificadas (Fig. 4B).

Em 60 horas de ataque, o valor médio de F_v/F_m no controle foi de 0,70 ($\pm 0,005$), folhas intactas 0,71 ($\pm 0,022$) e folhas danificadas 0,59 ($\pm 0,052$). Nas folhas intactas, houve um aumento de 1,4% de F_v/F_m e, nas folhas danificadas, uma redução de 15,8% (Fig. 4B). Deste modo, é possível concluir que no tempo de 60 horas, houve diferença significativa em relação ao controle, somente nas folhas danificadas. Não houve diferença significativa nos diferentes tempos dentro de cada condição (controle, folha intacta e folha danificada) (Fig. 4B).

A média do valor quântico real do transporte de elétrons do fotossistema II (Φ_{PSII}), durante 12 horas de estresse, foi de 0,29% ($\pm 0,012$), 0,21% ($\pm 0,012$), 0,21% ($\pm 0,014$) para

controle, folhas intactas e folhas danificadas, respectivamente. Houve, portanto, uma redução de 27,6% nas folhas intactas e 27,6% nas folhas danificadas (Fig. 4C).

A média do ϕ PSII com 36 horas de estresse foi de 0,28% ($\pm 0,008$), 0,25% ($\pm 0,0116$), 0,17% ($\pm 0,006$) para controle, folhas intactas e folhas danificadas, respectivamente. Houve, também, uma redução de 10,8% nas folhas intactas e 39,3% nas folhas danificadas (Fig. 4C).

Com 60 horas, o valor médio do ϕ_{PSII} foi de 0,25% ($\pm 0,022$) para o controle, 0,18% ($\pm 0,021$) para folhas intactas e 0,10% ($\pm 0,012$) para folhas danificadas. Logo, houve uma redução de 28% nas folhas intactas e 60% nas folhas danificadas (Fig. 4C). Desta forma, conclui-se que o ϕ_{PSII} de estresse biótico, para todos os tempos, teve uma diferença significativa nas folhas intactas e nas folhas danificadas. Houve, além disso, uma diferença significativa na condição (folha intacta e folha danificada), para os diversos tempos (Fig. 4C).

A média dos valores relacionados à taxa de transporte de elétrons (ETR), no período de 12 horas, foi de 127,8% ($\pm 5,478$), 93,2% ($\pm 5,426$) e 90,2% ($\pm 6,252$) para controle, folhas intactas e folhas danificadas, respectivamente. Houve uma redução de 27,1% nas folhas intactas e 29,5% nas folhas danificadas (Fig. 4D).

A média de ETR no período de 36 horas foi de 122,8% ($\pm 3,914$), 108,6% ($\pm 5,108$) e 83,0% ($\pm 3,911$) para controle, folhas intactas e folhas danificadas, respectivamente. Houve uma redução de 11,6% nas folhas intactas e 35,5% nas folhas danificadas (Fig. 4D).

No tempo de 60 horas o valor médio do controle foi 113,0% ($\pm 7,839$), 80,6% ($\pm 9,311$) nas folhas intactas e 44,5% ($\pm 5,300$) nas folhas danificadas. Houve uma redução de 28,7% nas folhas intactas e uma redução de 60,7% nas folhas danificadas (Fig. 4D). Conclui-se, então, que para todos os tempos do estresse biótico, houve diferença significativa de ETR em relação ao controle em folhas intactas e danificadas. Houve, ainda, uma diferença significativa para os diferentes tempos, dentro de cada condição (folha intacta e folha danificada) (Fig. 4D).

A média dos valores do coeficiente de dissipação fotoquímica (q_p) no tempo de 12 horas foi de 0,50% ($\pm 0,019$) para controle, 0,47% ($\pm 0,048$) para folhas intactas e 0,44% ($\pm 0,032$) nas folhas danificadas. O q_p reduziu 6% nas folhas intactas e 12% em folhas danificadas nas relação ao controle (Fig. 4E).

Os valores de q_p no tempo de 36 horas foram de 0,49% ($\pm 0,023$) para controle, 0,48% ($\pm 0,032$) para folhas intactas e 0,41 ($\pm 0,036$) nas folhas danificadas. O q_p reduziu 2,05% nas folhas intactas e reduziu 16,4% nas folhas danificadas (Fig. 4E).

Já para o tempo de 60 horas, o valor de q_p foi 0,48% ($\pm 0,046$) para o controle, 0,34% ($\pm 0,030$) para folhas intactas e 0,24% ($\pm 0,031$) para folhas danificadas. Observa-se, que ocorreu uma redução de 29,2% nas folhas intactas e de 50% nas folhas danificadas (Fig. 4E).

No entanto, para os tempos de 12, 36 e 60 horas de estresse biótico, conclui-se que houve uma diferença significativa nas folhas intactas e nas folhas danificadas, em relação ao controle. Houve, ainda, uma significativa diferença para os tempos na condição (folha intacta e folha danificada) (Fig. 4E).

O valor médio do coeficiente de dissipação não fotoquímica (NPQ) em 12 horas foi de 0,99% ($\pm 0,045$) no controle, 1,14% ($\pm 0,108$) nas folhas intactas e 1,27% ($\pm 0,095$) nas folhas danificadas. O NPQ aumentou 15,1% nas folhas intactas e 28,4% nas folhas danificadas (Fig. 4F).

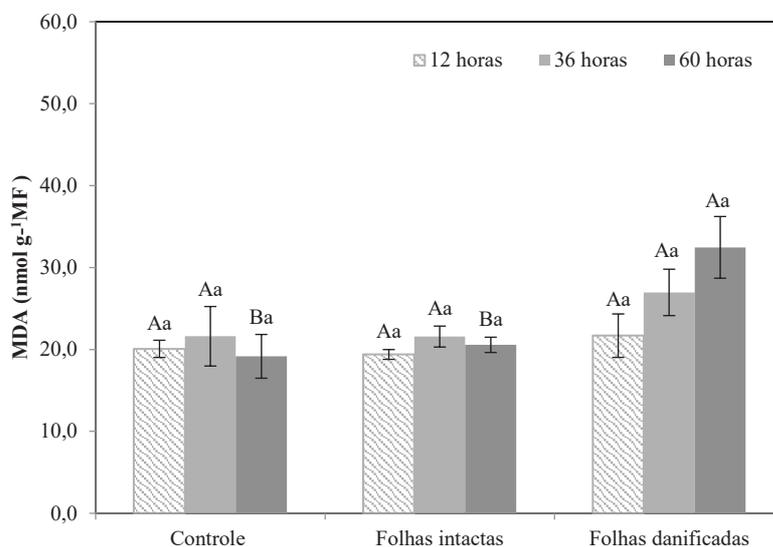
A média de NPQ em 36 horas foi de 1,02% ($\pm 0,052$) no controle, 1,48% ($\pm 0,165$) em folhas intactas e 1,31% ($\pm 0,137$) nas folhas danificadas. O NPQ aumentou 45% em folhas intactas e 28,4% em folhas danificadas (Fig. 4F).

Por fim, para 60 horas, o valor médio do controle foi de 1,11% ($\pm 0,061$), 1,22% ($\pm 0,075$) nas folhas intactas e 1,32% ($\pm 0,288$) nas folhas danificadas. Em 60 horas, o NPQ aumentou 9,9% em folhas intactas e 18,9% em folhas danificadas. Desta forma, pode-se concluir que não houve diferença significativa do NPQ nas diferentes condições (controle, folha intacta e folha danificada) no mesmo tempo de indução. Assim, como também não ocorreu uma diferença significativa nos diferentes tempos (12, 36 e 60 horas) dentro de cada condição (controle, folha intacta e folha danificada) (Fig. 4F).

3.3.4 Análise Bioquímica

Com o objetivo de avaliar o efeito do estresse provocado pelo inseto *H. bipunctalis* ao atacar a planta *C. prostrata*, durante 12, 36 e 60 horas, realizaram-se as análises bioquímicas: teste de aldeído malônico (MDA) (Fig. 5) e concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Fig. 6).

Figura 5- Análise bioquímica. Concentração de aldeído malônico (MDA) em folhas de *Cyathula prostrata* atacadas pelo inseto *Herpetogramma bipunctalis*. Letras maiúsculas comparam as médias nas diferentes condições (controle, folha intacta e folha danificada) no mesmo tempo. Letras minúsculas comparam as médias entre os diferentes tempos (12h, 36h e 60h) dentro de cada condição (controle, folha intacta e folha danificada). As médias foram comparadas pelo teste SNK-Student-Newman-Keuls com $p < 0.05$. O Erro padrão é indicado por barras.

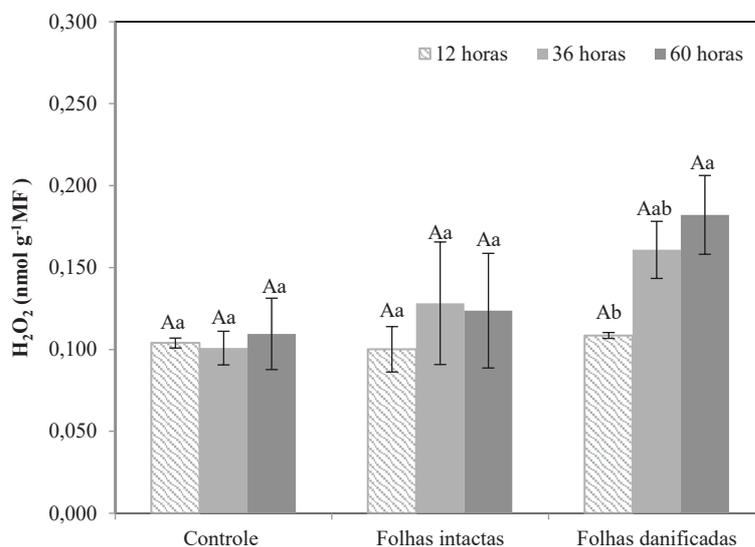


A média na concentração de MDA com 12 horas de estresse biótico nas folhas controle foi de 20,1 nmol g⁻¹MF (±0,857), nas folhas intactas foi de 19,4 nmol g⁻¹MF (±0,489) e nas folhas danificadas foi de 21,7 nmol g⁻¹MF (±2,655). Ocorreu uma redução de 4,5 % nas folhas intactas e um aumento de 7,9 % nas folhas danificadas em relação ao controle (Fig. 5A).

Com 36 horas, a média de MDA nas folhas controle foi de 21,5 nmol g⁻¹MF (±2,996), nas folhas intactas foi de 21,6 nmol g⁻¹MF (±1,279) e nas folhas danificadas foi de 27,0 nmol g⁻¹MF (±2,830). Ocorreu um aumento de 0,4 % nas folhas intactas e um aumento de 25 % nas folhas danificadas (Fig. 5A).

Com 60 horas, a média em folhas controle foi de 19,2 nmol g⁻¹MF (±2,181), nas folhas intactas 20,6 nmol g⁻¹MF (±0,762) e nas folhas danificadas de 32,5 nmol g⁻¹MF (±3,073). Ocorreu um aumento de 7,2 % nas folhas intactas e 69,2 % nas folhas danificadas (Fig. 5A). Após analisar os dados, é possível observar que houve diferença significativa de MDA somente no tempo de 60 horas nas folhas danificadas, comparadas ao controle. Também observa-se que não houve uma diferença significativa em nenhum dos tempos, dentro de cada condição (controle, folha intacta e folha danificada) (Fig. 5A).

Figura 6- Análise bioquímica. Concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em folhas de *Cyathula prostrata* atacadas pelo inseto *Herpetogramma bipunctalis*. Letras maiúsculas comparam as médias nas diferentes condições (controle, folha intacta e folha danificada) no mesmo tempo. Letras minúsculas comparam as médias entre os diferentes tempos (12h, 36h e 60h) dentro de cada condição (controle, folha intacta e folha danificada). As médias foram comparadas pelo teste SNK-Student-Newman-Keuls com $p < 0.05$. O Erro padrão é indicado por barras.



A média na concentração de H_2O_2 com 12 horas de estresse biótico nas folhas controle foi de $0,104 \text{ nmol g}^{-1}\text{MF}$ ($\pm 0,003$), nas folhas intactas foi de $0,100 \text{ nmol g}^{-1}\text{MF}$ ($\pm 0,013$) e nas folhas danificadas foi de $0,109 \text{ nmol g}^{-1}\text{MF}$ ($\pm 0,001$). Observa-se que há uma redução de 3,8% nas folhas intactas e um aumento de 4,8% nas folhas danificadas em relação ao controle (Fig. 6).

Com 36 horas, a média de H_2O_2 nas folhas controle foi de $0,101 \text{ nmol g}^{-1}\text{MF}$ ($\pm 0,010$), nas folhas intactas foi de $0,128 \text{ nmol g}^{-1}\text{MF}$ ($\pm 0,037$) e nas folhas danificadas foi de $0,161 \text{ nmol g}^{-1}\text{MF}$ ($\pm 0,017$). Nota-se um aumento de 26,7% nas folhas intactas e um aumento de 59,4% em folhas danificadas (Fig. 6).

Com 60 horas, a média em folhas controle foi de $0,109 \text{ nmol g}^{-1}\text{MF}$ ($\pm 0,021$), folhas intactas $0,124 \text{ nmol g}^{-1}\text{MF}$ ($\pm 0,034$) e nas folhas danificadas de $0,182 \text{ nmol g}^{-1}\text{MF}$ ($\pm 0,024$). Ocorreu um aumento de 13,7 % nas folhas intactas e 66,9 % nas folhas danificadas. Portanto, analisando os dados, observa-se, ainda, que houve diferença significativa de H_2O_2 nas folhas danificadas para todos os tempos (Fig. 6).

3.4 Discussão

O presente estudo relata alterações nos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* em plantas de *Cyathula prostrata* submetidas ao estresse da lagarta *Herpetogramma bipunctalis*.

Os parâmetros de trocas gasosas: taxa fotossintética (A), condutância estomática (g_s), concentração de carbono interno (C_i) e transpiração (E) e os parâmetros de fluorescência de clorofila *a*: máxima fluorescência (F_m), máxima eficiência quântica do PSII (F_v/F_m), rendimento quântico real do transporte de elétrons do PSII (Φ_{PSII}), taxa de transporte de elétrons (ETR), coeficiente de dissipação fotoquímica (q_p) foram todos alterados, quando submetidos ao ataque de lagartas de *H. bipunctalis*, em plantas de *C. prostrata*, ao longo dos tempos de 12, 36 e 60 horas.

3.4.1 Trocas gasosas

Durante o estudo, a herbivoria da lagarta *H. bipunctalis* na folhas de *C. prostrata* ocasionou um aumento do C_i e a redução dos parâmetros A , g_s , e E . O declínio desses parâmetros, principalmente a taxa de assimilação líquida de CO_2 e a condutância estomática, estão relacionados, diretamente, ao estresse causado pelo inseto, onde a planta diminui a fotossíntese e desvia recursos para a autodefesa (WELTER, 1989; NYKANEN; KORICHEVA, 2004).

Os parâmetros de trocas gasosas A (Fig. 3A), g_s (Fig. 3B), e E (Fig. 3C) reduziram nos tempos de 12, 36 e 60 horas de estresse, tanto em folhas opostas que não foram danificadas quanto nas folhas que foram danificadas. Além disso, os menores valores de condutância estomática, indicam a interferência do inseto na fisiologia da planta. Portanto, a função estomática prejudicada pode ser um resultado, direto, do dano no aparato fotossintético por herbívoros ou pelo efeito das secreções salivares do inseto na planta, o que ocasiona o fechamento dos estômatos por vias de sinalização que regulam o g_s (MEZACANALES et al, 2017).

Todavia, o menor valor de A está relacionado a g_s , uma vez que o menor grau de abertura dos estômatos limita a entrada de CO_2 para a câmara subestomática, reduzindo a quantidade de substrato, para que a Rubisco atue como carboxilase, favorecendo a redução da fotossíntese. Em Lamp et al. (2011) é apresentado quatro genótipos de uva sob herbivoria de quatro cigarrinhas *Empoasca fabae* (Hemiptera: Cicadellidae). Após três dias, observou-se,

também, a rápida alteração da fotossíntese, ocasionando uma redução significativa nos parâmetros A (22,3%) e g_s (45,4%).

A limitação da abertura estomática também ocasionou reduções na transpiração evitando, assim, a perda de H_2O , que é um elemento necessário para a manutenção da planta e está relacionado a diversos processos bioquímicos (NABITY, et al., 2013).

Para VELIKOVA et al. (2010), o dano causado por *Murgantia histrionica*, em folhas de *Brassica oleracea*, ocasionou reduções na transpiração através da menor condutância estomática.

A concentração interna de CO_2 (C_i), no presente estudo, aumentou no período de 60 horas, nas folhas danificadas, quando comparadas aos seus controles (Fig. 3D). O aumento da concentração interna de CO_2 , sob um determinado estresse pode estar relacionado à queda na atividade de enzimas envolvidas no processo de fixação de CO_2 (MACHADO et al., 1999, 2005).

Os elicitores nas secreções orais (OS) de herbívoros diminui a transcrição de RuBP-carboxilase/oxigenase (Rubisco) e Rubisco activase, podendo afetar a assimilação de carbono pela menor taxa de carboxilação (GILARDONI et al., 2010, BILGIN et al., 2010, MEZACANALES et al., 2017). Segundo Giri et al. (2006), através de eletroforese bidimensional, foi observado que a herbivoria de *Manduca sexta* reduziu a abundância de RuBPCase-activase (RCA) em *N. attenuata*. A RCA é uma proteína fotossintética abundante e fortemente regulada após o ataque de herbívoros.

Dai (2009) mostra, através dos seus resultados, que as folhas de *Hypericum sampsonii* infestada ligeiramente, parcialmente e severamente pelo inseto *Thrips tabaci*, tiveram um aumento da concentração interna de CO_2 , indicando uma menor eficiência de carboxilação pelo aparato fotossintético. Para Marlin (2013), nas folhas de *water hyacinth* (*Eichhornia crassipes*) expostas a diferentes níveis de herbivoria de *Orthogalumna terebrantis*, houve um aumento do C_i e da quantidade de tecido foliar danificado através da alimentação do ácaro.

Nas folhas opostas não danificadas pelo inseto, houve redução nos parâmetros de A , g_s , E e C_i nos tempos de 12, 36 e 60 horas, em relação ao controle. Muitos tipos de danos causados por insetos, afetam a fotossíntese em tecidos não danificados e, esses efeitos, ocorridos indiretamente na fotossíntese, podem ser consideravelmente maiores do que a remoção direta da área foliar (WELTER, 1989; ZANGERL et al., 2002) pois danos à vasculatura que fornece esse tecido podem alterar os processos fotossintéticos nos tecidos

remanescentes (NABITY et al., 2009). Outra possível causa da redução em folhas não atacadas, é a indução de uma gama de respostas relacionadas à defesa (KESSLER; BALDWIN, 2002) como o estímulo por meio da transdução de sinais que sinalizam para as folhas não danificadas modularem seu metabolismo em resposta a herbivoria (ARIMURA et al., 2011).

O ataque do inseto promoveu uma redução nos parâmetros de taxa fotossintética (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E) e um aumento na concentração de carbono interno (C_i) no metabolismo da planta. Isso sugere que o efeito da redução na área foliar causada pela herbivoria do inseto *H. bipunctalis*, reduziu o investimento na fotossíntese para que a planta investisse no metabolismo relacionado à defesa.

3.4.2 Fluorescência da clorofila *a*

Nesse trabalho, demonstrou-se que a herbivoria da Lagarta *H. bipunctalis* em plantas de *C. prostrata* foi responsável pela redução nos parâmetros da fluorescência da clorofila *a*: F_m ; F_v/F_m ; Φ_{PSII} ; ETR e q_P .

Quando as plantas sofrem um estresse biótico, alterações nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos provocam mudanças nas características dos sinais de fluorescência, os quais podem ser mensurados nas folhas (RIBEIRO et al., 2003; BAKER; ROSENQVST, 2004). Neste estudo, as folhas danificadas nos períodos 36 e 60 horas apresentaram reduções nos valores de fluorescência máxima comparada com os seus controles (Fig. 4A). O dano causado no aparato fotossintético pode ocasionar perdas no teor de clorofila *a*, reduzindo a eficiência máxima do fotossistema PSII nas folhas danificadas.

Resultados semelhantes foram apresentados em Marlin et al. (2013), onde houve uma redução significativa em F_m com o aumento da herbivoria de ácaros em plantas de water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). O resultado mostra que a herbivoria afetou a eficiência com que a luz absorvida pelo PSII é convertida em energia química.

No presente estudo, nas folhas danificadas no período de 60 horas, a variável F_v/F_m apresentou redução comparada com o controle (Fig. 4B). Essa redução é devido a inativação dos centros de reação no PSII, uma vez que F_v/F_m reflete as mesmas tendências (LU; VONSHAK, 1999). Essa inativação dos centros de reação do PSII, é devido ao dano causado pelo inseto *H. bipunctalis* no aparato fotossintético da planta, sendo que os valores padrões para uma planta sem dano são, aproximadamente, 0,65 e 0,85 de F_v/F_m , e quando as

plantas apresentam valores abaixo de 0,65 indica-se inibição da atividade fotoquímica (KLUGHAMMER; SCHREIBER 2008).

Em Velikova et al. (2010), houve o estudo com plantas de *Brassica oleracea*, em que se demonstrou que os danos causados nas folhas por *Murgantia histrionica* ocasionam a redução de F_v/F_m . Nele, o F_v/F_m de 0,73 foi registrado em folhas controle, sendo que nas folhas danificadas dentro de 48 horas, após a alimentação, a relação F_v/F_m foi inferior a 0,50, sendo definidas como "dano severo".

Segundo Li et al. (2013), a redução de F_v/F_m em folhas de *Nicotiana tabacum* infestada por *Bemisia tabaci* (entre 2º e 3º instar) indica uma eficiência reduzida do PSII. Assim, reduções em F_v/F_m são um claro indicador de danos ao aparelho fotosintético, podendo ser irreversível quando o F_v/F_m cai para valores muito baixos (MAXWELL; JOHNSON, 2000).

Sob uma determinada quantidade de luz absorvida, Φ_{PSII} representa o fluxo de elétrons através do centro de reação do PSII (GENTY et al., 1989; BAKER; OXBOROUGH, 2005). Neste estudo o rendimento quântico real do transporte de elétrons do PSII (Φ_{PSII}) teve redução em folhas danificadas nos períodos de 12, 36 e 60 horas em relação aos seus controles. Portanto, com o aumento do dano de *H. bipunctalis* os centros de reação de PSII foram gradualmente fechados, resultando em um declínio no Φ_{PSII} e ETR provavelmente por danos à integridade da membrana do tilacoide (MAXWELL ; JOHNSON, 2000).

A herbivoria de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) (4º instar) em folhas de *Arabidopsis thaliana* reduziu, também, diretamente o Φ_{PSII} em áreas danificadas (TANG et al., 2006).

A taxa de transporte de elétrons (ETR) corresponde ao número relativo de elétrons que percorrem o PSII durante a fotossíntese (Genty et al., 1989). Neste estudo, a ETR teve uma redução dos tempos de 12, 36 e 60 horas, nas folhas danificadas. A redução desse parâmetro indica que a herbivoria de *H. bipunctalis* provocou danos à integridade da membrana do tilacoide reduzindo a eficiência do aparato fotossintético (Li et al. 2013), isto é, para que aconteça a fotossíntese, a cadeia transportadora de elétrons deve estar funcionando perfeitamente e, caso ocorra alguma interrupção ou dano no transporte de elétrons, a produção de ATP e NADPH será prejudicada, comprometendo a fotossíntese (KALAJI; GUO 2008).

Segundo Dai et al. (2009), o dano de *T. tabaci* em folhas de *H. sampsonii* gravemente feridas, resultou em reduções da taxa de transporte de elétrons. Com o aumento

do dano de *T. tabaci*, os centros de reação de PSII foram gradualmente fechados, reduzindo a ETR e o Φ_{PSII} , devido os danos à integridade da membrana do tilacoide.

A variável q_p indica a proporção de centros de reação PSII que estão abertos (MAXWELL; JOHNSON, 2000) sendo desta maneira, o equilíbrio entre a excitação dos centros PSII e a remoção de elétrons da PSII pela cadeia de transporte de elétrons (CAMPBELL et al., 1998). Neste estudo, o coeficiente de dissipação não fotoquímica (q_p) teve uma redução em folhas intactas e danificadas nos tempos de 12, 36 e 60 horas. Essa redução em q_p , através da alimentação de *H. bipunctalis*, pode influenciar o ciclo da xantofila. Esse ciclo está envolvido na proteção do PSII sob condições excessiva de luz durante estresses bióticos, dissipando o excesso de excitação na forma de calor (YAMAMOTO; BASSI, 1996).

Caso a dissipação dessa energia luminosa seja na forma de calor pelo ciclo das xantofilas, o parâmetro de Y(NPQ) irá aumentar. Isso aconteceu no presente trabalho, pois o NPQ aumentou devido ao aumento do estresse. Entretanto, não houve diferença significativa na variável NPQ.

Segundo o estudo realizado por Dai et al. (2009), a espécie *H. sampsonii* sob estresse de *T. tabaci* levou à reduções significativas em q_p especialmente nas folhas gravemente infestadas. No estudo de Golan et al. (2015), as folhas de *Citrus limon* infestadas por *Coccus hesperidum*, houve redução do coeficiente de extinção fotoquímica (q_p) em relação às plantas controle.

Folhas opostas que não foram danificadas pelo inseto, também podem exibir fotosíntese reduzida, contribuindo ainda mais para reduções na produtividade (ALDEA et al ., 2006; NABITY et al , 2009 , 2012). Os parâmetros de fluorescência da clorofila como, Φ_{PSII} e ETR e q_p , também reduziram em folhas que não foram danificadas. Segundo Nabity et al. 2009, alterações na fotossíntese e na transpiração são transmitidas para folhas que não sofreram dano após a herbivoria, mostrando a planta responde ao estresse induzido pelo inseto.

3.4.3 Concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

As EROs podem agir como um elemento prejudicial para a planta ou como um fator protetor e sinalizador, dependendo do equilíbrio entre a produção e sua eliminação (BOGUSZEWSKA; ZAGDAŃSKA, 2012). Houve um aumento significativo na concentração de H₂O₂ nos diferentes tempos (12, 36 e 60h) dentro da condição folha danificada. Este aumento induzido em folhas de *C. prostrata* pela alimentação de *H. bipunctalis* pode estar associado a uma “explosão oxidativa” ou à transdução de sinal como mecanismo de defesa da planta.

A “explosão oxidativa”, que constitui na produção de EROs, principalmente ânion superóxido (O₂⁻) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) acontece de maneira rápida em resposta a herbivoria em plantas (HU et al., 2009), sendo que o H₂O₂ é a principal espécie reativa de oxigênio que aciona moléculas para a indução de genes de defesa, além de estimular a produção de enzimas antioxidativas (ŁUKASIK et al., 2012).

3.4.4 Peroxidação de lipídeos (MDA)

As altas concentrações de aldeído malônico (MDA) produzidos durante a peroxidação de lipídeos, é um forte indicador para refletir danos causados às membranas celulares (LIANG et al., 2003). Neste estudo, houve um aumento significativo dos níveis de MDA em folhas danificadas no tempo de 60 horas, em comparação ao controle. Essas altas concentrações de MDA evidenciaram, claramente, que as plantas de *C. prostrata* sofreram danos oxidativos nos lipídios da membrana, podendo causar danos irreversíveis, afetando severamente sua funcionalidade e integridade.

De acordo com Huang (2007), os conteúdos de MDA nas folhas de variedades de alfafa sob a infestação do pulgão (*Aphis medicaginis*) mostraram que as variedades suscetíveis sempre apresentaram maior teor de MDA do que variedades resistentes, e os teores de MDA tendem a aumentar nas variedades sensíveis e resistentes no período de 48 e 192 horas.

3.5 Conclusões

A herbivoria do inseto *H. bipunctalis* diminuiu a capacidade fotossintética de folhas não danificadas e danificadas de *Cyathula prostrata* reduzindo os parâmetros de trocas gasosas (A , g_s , E) e promovendo aumento no (C_i).

Observou-se reduções nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* (F_m , F_v/F_m , Φ_{PSII} , ETR e q_p). Houve um aumento significativo na concentração de H_2O_2 e aumento significativo MDA em folhas danificadas, sugerindo a ocorrência de estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

- ALDEA, M.; HAMILTON, J. G.; RESTI, J. P.; ZANGERI, A. R.; BEREMBAUM, M. R.; DELUCIA, E. H. Indirect effects of insect herbivory on leaf gas Exchange in soybean. **Plant and cell Environment**, v. 28, p. 402 - 411, 2006.
- ARIMURA, G.; OZAWA, R.; MAFFEI, M. E. Recent Advances in Plant Early Signaling in Response to Herbivory. **International Journal Molecular Science**, v.12, p. 3723 - 3739, 2011.
- BAKER, N. R, OXBOROUGH, K. Chlorophyll fluorescence as a probe of photosynthetic productivity. In: Papageorgiou GC, Govindjee, eds. Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis. **Advances in Photosynthesis and Respiration**, The Netherlands: Springer, v.19, p. 65–82, 2005.
- BAKER, N.R.; ROSENQVST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.55, p.1607-1621, 2004.
- BERGER, S.; SINHA, A.K.; ROITSCH, T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. **Journal of Experimental Botany**, v.58, p.4019-4026, 2007.
- BILGIN D.D.; ZAVALA J.A.; ZHU J.; CLOUGH S. J.; ORT D. R. DeLucia E. H. Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. **Plant Cell Environ**, v.33, p.1597-1613, 2010.
- BOGUSZEWSKA, D. & ZAGDAŃSKA. ROS as Signaling Molecules and Enzymes of Plant Response to Unfavorable Environmental Conditions. *In: Oxidative Stress – Molecular Mechanisms and Biological Effects.* (Ed) Lushchak, V. & Semchyschyn, H. Intech. p.341-362, 2012.
- BURKILL, H. M. The Useful Plants of West Tropical Africa. **Royal Botanical Gardens**, Kew, v. 1, pp. 58–59, 1995.
- CAMPBELL, D., HURRY, V., CLARKE, A.K., GUSTAFSSON, P., O' QUIST, G. Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. **Microbiol. Mol. Biol**, v. 62, p. 667–683, 1998.
- DAI, Y.; CHAO, M.; HANNAWAY, D.; WANG, L.; LIANG, J.; HU, L.; LU, H. Effects of *Thrips tabaci* on anatomical features, photosynthetic characteristics and chlorophyll fluorescence of *Hypericum sampsonii* leaves. **Crop protection**, v. 28, p. 327 - 332, 2009.
- GENTY, B.; BRIANTAIS, J.M.; BAKER, N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica**, Acta, 990, p 87–92, 1989.
- GILARDONI, P.; SCHUCK S.; JÜNGLING, R.; ROTTER, B.; BALDWIN, I.T. & BONAVENTURE, G. SuperSAGE analysis of the *Nicotiana attenuata* transcriptome after

fatty acid-amino acid elicitation (FAC): identification of early mediators of insect responses. **BMC Plant Biology**, v.10, p.66, 2010.

GIRI, A.P.; WUNSCH, H.; MITRA, S.; ZAVALA, J.A.; MUCK, A.; SVATOS, A. & BALDWIN, I.T. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. VII. Changes in the plant's proteome. **Plant Physiology**, v.142, p.1621–1641, 2006.

GOLAN, K.; RUBINOWSKA, K.; KMIEC, K.; KOT, I.; GO'RSKA-DRABIK, E.; LAGOWSKA, B.; MICHAŁEK, W. Impact of scale insect infestation on the content of photosynthetic pigments and chlorophyll fluorescence in two host plant species, **Arthropod-Plant Interactions**, v.9, p.55 - 65, 2015.

HU, Z.; SHEN, Y.; SHEN, F.; SU, X. Effects of feeding *Clostera anachoreta* on hydrogen peroxide accumulation and activities of peroxidase, catalase, and ascorbate peroxidase in *Populus simonii* x *P. pyramidalis* 'Opera 8277' leaves. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, p. 995-1002, 2009.

HUANG, W.; ZHIKUAN, J.; QINGFANG, H. Effects of herbivore stress by *Aphis medicaginis* Koch on the Malondialdehyde contents and the activities of protective enzymes in different alfalfa varieties. **Acta Ecologica Sinica**, v. 27, p. 2177–2183, 2007.

KALAJI, M.H.; GUO, P. Chlorophyll fluorescence: a useful tool in barley plant breeding programs. In: Sanchez A, Gutierrez SJ (eds) **Photochemistry research progress**. Nova Publishers, p. 439–463, 2008.

KESSLER A, BALDWIN IT. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. **Annu Rev Plant Biol**, v. 53, p. 299-328, 2002.

KLUGHAMMER, C.; SCHREIBER, U. Saturation pulse method for assessment of energy conversion in PS I. **PAM Application Notes**, v. 1, p. 11-14, 2008.

KRAUSE GH, JAHNS P. Non-photochemical fluorescence quenching. In: Papageorgiou GC, Govindjee, eds. Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis. **Advances in Photosynthesis and Respiration**, The Netherlands: Springer, v.19, p. 463–495, 2004.

LAMP, W.O.; MIRANDA, D.; CULLER, L.E.; ALEXANDER, L.C. Host suitability and gas exchange response of grapevines to potato leafhopper (Hemiptera: Cicadellidae). **Journal Economy. Entomology**, v. 104, p. 1316-1322, 2011.

LIANG, Y.C.; CHEN, Q.; LIU, Q.; ZHANG, W.H.; DING, R.X. Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Plant Physiology**, v.160, p.1157-1164, 2003.

LI, Q.; TAN, W.; XUE, M.; ZHAO, H.; WANG, C. Dynamic changes in photosynthesis and chlorophyll fluorescence in *Nicotiana tabacum* infested by *Bemisia tabaci* (Middle East–Asia Minor 1) nymphs. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 7, p. 431-443, 2013.

- LU, C.; VONSHAK, A. Photoinhibition of outdoor *Spirulina platensis* cultures assessed by polyphasic chlorophyll fluorescence transients. **Journal of Applied Phycology**, v.11, p. 355–359, 1999.
- LUKASIK, I.; GOLAWSKA, S.; WÓJCICKA, A. Effect of cereal aphid infestation on ascorbate content and ascorbate peroxidase activity in triticale. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 21, p. 1937-1941, 2012.
- MACHADO, E. C.; MEDINA, C. L. Teor de água no substrato de crescimento e fotossíntese em laranja Valência. **Bragantia**, v. 58, n. 2, p. 217-226, 1999.
- MACHADO, E. C.; SCHMIDT, P. T.; MEDINA, C. L.; RIBEIRO R. V. Respostas da fotossíntese de três espécies de citros a fatores ambientais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 12, p. 1161-1170, 2005.
- MARLIN, D., HILL, M.P., RIPLEY, B.S., STRAUSS, A.J, BYRNE, M.J. The effect of herbivory by the mite *Orthogalumna terebrantis* on the growth and photosynthetic performance of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). **Aquatic Botany**, v.104, p. 60 69, 2013.
- MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence *a* practical guide. **Journal Experimental Botany**, v. 51, p. 659 - 668, 2000.
- MEZA-CANALES, I.D, MELDAU, S., ZAVALA, J.A; BALDWIN, I.T. Herbivore perception decreases photosynthetic carbon assimilation and reduces stomatal conductance by engaging 12-oxo-phytodienoic acid, mitogen-activated protein kinase 4 and cytokinin perception. **Plant Cell and Environment**, v. 40, p. 1039–1056, 2017.
- MOREIRA, H. J. C.; BRAGANÇA, H. B. N. **Manual de Identificação de Plantas Infestantes: Hortifrúti**, FMC Agricultural Products, 2011.
- NABITY P. D.; ZAVALA J. A.; DELUCIA E. H. Indirect suppression of photosynthesis on individual leaves by arthropod herbivory. **Annual Botany**, v.103, p.655 - 663, 2009.
- NABITY, P. D.; ZAVALA, J. A.; DELUCIA, E. H. Herbivore induction of jasmonic acid and chemical defences reduce photosynthesis in *Nicotiana attenuate*. **Journal of Experimental Botany**, v.64, p. 685 - 694, 2013.
- NABITY, P. D.; HILLSTROM, M.L, LINDROTH, R.L, DELUCIA, E.H. Elevated CO₂ interacts with herbivory to alter chlorophyll fluorescence and leaf temperature in *Betula papyrifera* and *Populus tremuloides*. **Oecologia**, v.169, p. 905–913, 2012.
- NYKANEN, H. & KORICHEVA, J. Damage-induced changes in woody plants and their effects on insect herbivore performance, a meta-analysis. **Oikos**, v.104, p. 247–268, 2004.
- PÉREZ, T. B. C.; A. G. ARAGÓN; R. A. PÉREZ; L. R. HERNÁNDEZ; J. F. O. LÓPEZ. Estudio entomofaunístico del cultivo de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) em Puebla, México. **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**, v. 2, p.359-371, 2011.

RASMANN, S.; AGRAWAL, A. A. Plant defense against herbivory: progress in identifying synergism, redundancy, and antagonism between resistance traits. *Curr Opin Plant Biol*, v.12, p. 473-8, 2009.

RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E. C.; OLIVEIRA, R.F. Early photosynthetic responses of sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v.62, p.167-173, 2003.

SACK L., COWAN P. D. & HOLBROOK M. The major veins of mesomorphic leaves revisited, tests for conductive overload in *Acer saccharum* (Aceraceae) and *Quercus rubra* (Fagaceae). *American Journal of Botany*, v. 90, p 32–39, 2003.

SOLIS, M. A. Key to selected Pyraloidea (Lepidoptera) larvae intercepted at U.S. ports of entry: revision of Pyraloidea. In: WEISMAN. “**keys to some frequently intercepted lepidopterous larvae**”. University of Nebraska, Lincoln, NE, USA. 2006.

TANG, J.Y; ZIELINSKI RE, ZANGERL AR, CROFTS AR, BERENBAUM MR, DELUCIA EH. The differential effects of herbivory by first and fourth instars of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) on photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, v 57, p. 527–536, 2006.

TAVARES, M. G. **Ciclo biológico e biomeria de uma espécie de lepidóptera alimentada com planta produtora de 20-hidroxicdisona**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária) – Universidade Federal Rural da Amazônia, p. 87, 2015.

USHA, R. P; JYOTHSNA Y. Biochemical and enzymatic changes in rice as a mechanism of defense. *Acta Physiol Plant*, v.32, p. 695-701, 2010.

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

WELTER, S.C. Arthropod impact on plant gas exchange. **In Insect–Plant Interactions** (ed. E.A.Bernays), CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p. 35–151, 1989.

YAMAMOTO, H.Y.; BASSI, R. Carotenoids: localisation and function. In: Ort DR, Yocum CF (eds) **Oxygenic photosynthesis: the light reactions: advances in photosynthesis**. v.4, p. 539 - 563, 1996.

ZANGERL, A.R, HAMILTON, J.G, MILLER, T. J; CROFTS, A.R, OXBOROUGH, K., BERENBAUM, M.R. Impact of folivory on photosynthesis is greater than the sum of its holes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v.99, p.1088 - 1091, 2002.