

SÉRGIO TINÔCO VERÇOSA DE MAGALHÃES

FITOQUÍMICOS NA INTERAÇÃO DE BICHO-MINEIRO COM CAFEEIROS

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação
em Entomologia, para obtenção do Título
de “Doctor Scientiae.”

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

Aos meus queridos pais Albino e Hílman,
Aos meus queridos irmãos Ana Cristina e Ricardo,
A minha querida esposa e companheira Rosária,
Às minhas queridas filhas Amanda, Larissa e Beatriz,
Aos meus queridos cunhados e sobrinhos,

Dedico,

AGRADECIMENTOS

A Deus, Pai, Filho e Espírito Santo, que me concedeu o potencial e as condições para chegar ao fim deste trabalho, bem como a Maria Santíssima, por todas as intercessões para que tivesse êxito nesta etapa da minha vida.

Aos meus pais, por todo o incentivo, cuidado e amor que tiveram para comigo.

À Universidade Federal de Viçosa bem como, em especial, ao Departamento de Biologia Animal e de Química, pela oportunidade de realização do Curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro no início deste curso.

Ao Prof. Raul Narciso Carvalho Guedes, Prof. Antônio Jacinto Demuner e ao Prof. Eraldo Rodrigues de Lima pela atenção, orientação e amizade durante este treinamento.

Aos mestres Prof. Angelo Pallini Filho, Prof. Arne Janssen, Prof. Carlos Frankl Sperber, Prof. Eraldo R. Lima, José Henrique Schoereder, Prof. Hélio Garcia Leite, Prof. Marcelo Coutinho Picanço, Prof. Og Francisco Fonseca de Souza, Prof. Paulo Sérgio Fiúza Ferreira, Prof. Raul N. C. Guedes, Prof. Ronaldo Reis Júnior e Prof^a. Terezinha Maria Castro Della Lúcia meus sinceros agradecimentos por todo o empenho, dedicação, profissionalismo e entusiasmo nas disciplinas lecionadas.

Ao Pesquisador da Epamig (Viçosa), Antônio Alves Pereira pelo entusiasmo na busca de soluções para a cultura do café, e pelos cafeeiros cedidos para a experimentação.

Ao Dr. Omar Gilson de Moura Luz e ao Dr. José Carlos Marques, juízes de direito da Comarca de Viçosa, que muito possibilitaram a realização deste trabalho, concedendo a licença sem vencimentos durante a realização das disciplinas do curso.

Aos serventuários do Fórum Arthur Bernardes, em especial aos oficiais de justiça, que muito ajudaram para realização deste trabalho.

Aos amigos e companheiros de curso Alfredo, Aline, Anderson, André, Ângela, Adriano, Alexandre, Berguem, César, Carla, Conceição, Daniel, Eugênio, Frederico, João, José Milton, Lauri, Leandro, Marcelo, Marcy, Mônica, Núbia, Raimundo, Renato, Romero, Rosenilson, Sílvia, Tito, Walter, pela amizade, companheirismo e apoio.

Ao Sr. Antônio, Eduardo e José Luiz do LASA. Ao Sr. Manoel do insetário. A D. Paula, Francisco e José Evaristo da entomologia. A Micheline do CPD. A Delfim, Mauro, Sebastião Anastácio, Sebastião e Valtim do Viveiro de Café. E a Alessandra, Domingos, Édson e Pedro do Bioagro. Obrigado pela convivência e pelo inestimável apoio.

Aos bolsistas de iniciação científica Jamile A. Ladeira e Maycon Campos Oliveira pela ajuda prestada na condução deste trabalho.

À minha esposa e aos meus pais e irmãos, pelos incentivos, pela presença e pela ajuda nos momentos difíceis do curso.

Aos meus cunhados Airton, Braz, Geraldo e Ricardo pela ajuda incondicional prestada na condução deste trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

SÉRGIO TINÔCO VERÇOSA DE MAGALHÃES, filho de Albino Verçosa de Magalhães e Hilman Tinôco Verçosa de Magalhães, nasceu em Sobradinho, Distrito Federal, em 22 de outubro de 1969.

Estudou em Brasília até completar o 2^o grau e, em 1989, ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Durante sua graduação, participou como membro da Câmara Curricular de Agronomia e foi bolsista de iniciação científica do CNPq, no Departamento de Economia Rural da UFRV.

Em 01 de fevereiro de 1994, após ter passado em concurso público, foi chamado para assumir o cargo de oficial de justiça na Comarca de Viçosa onde exerce esse cargo até a data de hoje.

Em agosto de 1994, graduou-se Engenheiro-Agrônomo pela UFRV.

Em 09 de fevereiro de 1998, concluiu o Curso de Mestrado em Agroquímica na UFRV.

Em maio de 2001, iniciou o Curso de Doutorado em Entomologia na UFRV, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2005.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
BIBLIOGRAFIA	3
Capítulo 1. Atividade biológica de fitoquímicos de cafeeiro na postura de bicho-mineiro	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
INTRODUÇÃO	9
MATERIAL E MÉTODOS	10
RESULTADOS	13
DISCUSSÃO	15
REFERÊNCIAS	16
Capítulo 2. Resistência de cafeeiros ao bicho-mineiro e sua relação com ácido clorogênico, cafeína e derivados	27
RESUMO	28
ABSTRACT	29
INTRODUÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODOS	31
RESULTADOS	33
DISCUSSÃO	35

REFERÊNCIAS	36
Capítulo 3. Voláteis foliares de cafeeiros na interação com bicho-mineiro	45
RESUMO	46
ABSTRACT	47
INTRODUÇÃO	48
MATERIAL E MÉTODOS	49
RESULTADOS	53
DISCUSSÃO	55
REFERÊNCIAS	57
CONCLUSÃO GERAL	71

RESUMO

MAGALHÃES, Sérgio Tinôco Verçosa de, D.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2005. **Fitoquímicos na interação de bicho-mineiro com cafeeiros.** Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes. Conselheiros: Antônio Jacinto Demuner e Eraldo Rodrigues de Lima.

O presente trabalho objetivou explicar por que o bicho-mineiro prefere e se desenvolve melhor em genótipos suscetíveis de cafeeiros, testando as hipóteses: a) Ácido clorogênico, cafeína e derivados, presentes na folha de cafeeiros atuam como mediadores da interação entre este lepidóptero e cafeeiros, norteados a oviposição de *Leucoptera coffeella*; b) Estes compostos atuam como substâncias de defesa dos cafeeiros contra este minador de folhas, prejudicando o seu desenvolvimento; c) ou ainda, se existem fitoquímicos voláteis nas folhas desses genótipos de cafeeiros que atuam como mediadores da interação com este inseto, influenciando no comportamento de escolha para sua oviposição. Desta forma, ácido clorogênico, cafeína e derivados presentes em doze genótipos de cafeeiros, antes e depois da infestação por larvas deste inseto, foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência e correlacionados com testes de preferência para oviposição nestes genótipos bem como com o teste de desenvolvimento desta praga (de ovo até adulto) nestes genótipos. Verificou-se que a concentração da cafeína contribuiu mais para a divergência entre os genótipos, podendo ser um mediador desta interação. Em seguida, foi conduzido um ensaio de preferência para postura usando concentrações crescentes de cafeína pulverizadas nas folhas do genótipo de cafeeiro com menor teor de cafeína (i.e., Híbrido 3). Os resultados obtidos possibilitaram o estabelecimento de uma relação concentração-resposta significativa, confirmando a hipótese de que a cafeína atua

estimulando a postura do bicho-mineiro em folíolos de cafeeiro. Não foi verificada correlação significativa entre os teores dos fitoquímicos analisados com os parâmetros do desenvolvimento este minador de folhas. Assim, apesar da confirmação de resistência por antibiose em alguns genótipos de cafeeiro (*Coffea racemosa* e seus híbridos com *C. arabica*), os resultados obtidos não salientam a relevância de nenhum dos fitoquímicos analisados como mediador potencial desta interação. Entretanto, foi observado que infestação deste inseto acarreta declínio nos teores foliares de ácido clorogênico, que apesar de não exercer efeito nesta espécie-praga, pode favorecer a infestação por outras. Extratos dos compostos voláteis liberados por estes genótipos de cafeeiro foram coletados no campo e analisados em cromatografia gasosa acoplada com eletroantenograma (CG/EAD), bem como em cromatografia gasosa acoplada com espectrômetro de massas (CG/EM). A seguir, os dados foram estudados através da análise de variáveis canônicas e correlação canônica através das quais se verificou que *p*-cimeno correlacionava-se de modo significativo e proporcional com a oviposição do bicho-mineiro e que *trans*- β -ocimeno correlacionava de modo significativo e inversamente proporcional com a oviposição deste lepidóptero. Com o intuito de confirmar a atividade biológica do *p*-cimeno, testes de olfatômetro, em quatro vias, foram realizados com o bicho-mineiro, sendo verificada uma preferência significativa para as vias que possuíam este produto. Assim ficou confirmado o papel biológico do *p*-cimeno como mediador químico da interação entre bicho-mineiro e genótipos de cafeeiro, favorecendo a aproximação do bicho-mineiro com esta planta e o reconhecimento de hospedeiros suscetíveis.

ABSTRACT

MAGALHÃES, Sérgio Tinôco Verçosa de, D.S., Universidade Federal de Viçosa, February 2005. **Fitochemicals in the interaction of *Leucoptera coffeella* with coffee plants.** Advisor: Raul Narciso Carvalho Guedes. Committee Members: Antônio Jacinto Demuner and Eraldo Rodrigues de Lima.

The present work aimed to explain why the coffee leaf miner prefers and develops better in susceptible coffee genotypes testing the following hypothesis: a) chlorogenic acid, caffeine and derivatives present in coffee leaves act as mediators of the interaction between this Lepidoptera and coffee guiding the oviposition by *Leucoptera coffeella*; b) These compounds act as coffee defense substances against these leaf miner impairing its development; c) or yet there are leaf volatile fitochemicals in coffee genotypes mediating its interaction with this insect species influencing its egg laying behavior. Therefore, chlorogenic acid, caffeine and derivatives present in leaves from twelve coffee genotypes were quantified by high performance liquid chromatography before and after insect infestation and correlated with results from a free-choice test of egg laying preference and a non-choice test of insect development in these genotypes. Caffeine was the main contributor for the divergence among genotypes and is a potential mediator of this insect-plant interaction. Preference bioassays carried out to test the hypothesis spraying caffeine on leaves of the genotype with the lowest leaf caffeine content (i.e., Hybrid UFV 557-04). The results obtained allowed the recognition of a significant concentration-response relationship providing support for the hypothesis that caffeine stimulates oviposition by the coffee leaf miner in coffee genotypes. There was no significant correlation between the levels of the fitochemicals and the development parameters of this leaf miner. Therefore, despite the confirmation

of antibiosis type of resistance in coffee genotypes (*Coffea racemosa* and its hybrids with *C. arabica*), the results obtained do not provide any evidence for the relationship under consideration. Nonetheless, infestation by the leaf miner seems to lead to a drop on the levels of chlorogenic acid, which despite of not showing any activity on this species, may favor infestation by other arthropods. Extracts of volatile compounds from leaves of these coffee genotypes were field collected and analyzed by a gas chromatographer coupled with an electroantennograph (CG/AED) and also by a gas chromatographer coupled with a mass spectrometer (CG/MS). The data was subjected to canonical variate analysis allowing the recognition of the positive correlation between *p*-cymene and egg-laying by the coffee leaf miner and the negative correlation between trans- β -ocimene and the same trait. Olfatometer tests in a four-arms apparatus were carried out to assess the biological activity of *p*-cymene and a significant preference to the arms containing this compound were observed. Therefore the biological role of *p*-cymene as a chemical mediator in the interaction between the coffee leaf miner and coffee genotypes was recognized favoring the approach and host recognition by the insect.

INTRODUÇÃO GERAL

A produção de café está limitada por problemas fitossanitários, dentre os quais destaca-se o bicho-mineiro das folhas do cafeeiro, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae) (Reis e Souza, 1996; Guerreiro Filho et al., 1999). Essa praga alimenta-se do mesófilo foliar e provoca queda prematura das folhas, reduzindo a área fotossintética e a produção de frutos em até 50% (Reis e Souza, 1996, 1998; Guerreiro Filho et al., 1999). Portanto, esse inseto tem sido considerado praga-chave da cafeicultura na maioria das regiões produtoras em função dos sérios prejuízos econômicos causados por ele (Souza et al., 1998). Esse tipo de fitofagia, presente em muitos insetos holometábolos, constitui vantagens adaptativas em relação a outras pragas como redução dos riscos por dessecação e minimização das dificuldades de conexão à planta (Bernays e Chapman, 1994).

O controle químico tem sido o principal método empregado pelos cafeicultores para o controle do bicho-mineiro (Souza et al., 1998; Guerreiro Filho et al., 1999). O uso contínuo deste método tem provocado a perda da eficiência de inseticidas mediante seleção de populações de bicho-mineiro resistentes (Fragoso et al., 2002, 2003).

Entre as alternativas existentes para o controle dessa praga destaca-se o uso de cafeeiros resistentes, obtidos através de melhoramento genético. Alguns trabalhos de melhoramento salientam a importância de identificar germoplasmas portadores de genes de resistência e transferir para materiais comerciais. Diferentes níveis de resistência têm sido encontrados em várias espécies do gênero *Coffea*. Altos níveis de resistência têm sido encontrados em *C. stenophylla*, *C. brevipes*, *C. liberica* e *C. salvatrix*, e níveis moderados de resistência em *C. eugenoides*, *C. kapakata*, *C. racemosa* e *C. dewevrei*. Variedades resistentes têm sido desenvolvidas no Brasil, introduzindo genes de resistência de cafeeiros da espécie *C. racemosa* em genótipos da espécie cultivada *C. arabica*, em virtude desta espécie poder ser cruzada mais facilmente com *C. arabica*.

(Almeida et al., 2003; Guerreiro Filho et al., 1991; Guerreiro Filho et al., 1999; Matiello et al., 2000, 2001, 2002).

Apesar disso, pouco se conhece sobre as interações inseto/planta e mecanismos responsáveis pela resistência destes genótipos ao bicho-mineiro, o que poderia beneficiar muito os programas de melhoramento para a obtenção de plantas resistentes a esta praga (Kogan, 1986; Lara et al., 1986; Rahimi e Carter, 1993).

O comportamento de insetos é uma expressão de processos neurais modificados por fatores fisiológicos e ambientais, sendo imprescindível para o entendimento das interações entre organismos (Bernays, 2001). Nas últimas duas décadas, as interações inseto/planta têm sido focos dos estudos em ecologia e evolução (Bernays e Chapman, 1994).

O bicho-mineiro, como qualquer outra espécie de inseto, possui a capacidade de detectar estímulos mecânicos, químicos e sonoros produzidos pelo ambiente, os quais possibilitam sua resposta seletiva (Chapman, 1998). Em decorrência da importância da quimiorrecepção na comunicação de insetos (Cardé e Bell, 1995; Chapman, 1998), acredita-se que estímulos químicos produzidos pelos cafeeiros devam nortear, ao menos parcialmente, suas relações interespecíficas com esse inseto-praga.

Dentre as variedades cultivadas comercialmente do gênero *Coffea* no mundo, *C. arabica* e *C. canephora* são as mais cultivadas. Estas possuem diferenças quanto à composição química nos frutos, sendo que a concentração de carboidratos, lipídios e trigonelina são maiores em *C. arabica*, e ácido clorogênico e cafeína são maiores em *C. canephora* (Viani, 1986). Além destes, existem outros compostos como os precursores do ácido clorogênico (ácido cafeico, ácido ferúlico, *p*-cumárico, quínico) (Mann, 1987; Ky et al., 1999), e da cafeína (teobromina, 7-metilxantina) bem como os subprodutos desta (teobromina, teofilina, 3-metilxantina, 7-metilxantina e xantina) (Waller et al., 1982), que podem estar envolvidos na interação inseto/planta.

Desta forma, o presente trabalho tentou explicar por que o bicho-mineiro prefere e se desenvolve melhor em genótipos suscetíveis de cafeeiro, testando as seguintes hipóteses: a) Ácido clorogênico, cafeína e derivados presentes na folha de cafeeiros atuam como mediadores de interação, norteadando a oviposição de *Leucoptera coffeella*; b) Estes compostos atuam como substâncias de defesa dos cafeeiros contra o bicho-mineiro, prejudicando o seu desenvolvimento; c) ou ainda, se existem fatores fitoquímicos voláteis nas folhas desses genótipos de cafeeiros que atuam como mediadores da interação com o bicho-mineiro, influenciando no comportamento de escolha para a sua oviposição.

BIBLIOGRAFIA

- ALMEIDA, S. R., MATIELLO, J. B., SILVA, M. B., FERREIRA, R. A., and CARVALHO, C. H. S. 2003. Melhoramento de café arábica visando a obtenção de plantas com resistência ao bicho-mineiro e à ferrugem. p. 240, *in* III Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil e Workshop Internacional de Café & Saúde, Porto Seguro, EMBRAPA-Café.
- BERNAYS, E. A., and CHAPMAN, R. F. 1994. Host-plant selection by phytophagous insects. Chapman & Hall, New York.
- BERNAYS, E. A. 2001. Neural limitations in phytophagous insects: Implications for diet breadth and evolution of host affiliation. *Annu. Rev. Entomol.* 46:703-727.
- CARDÉ, R. T., and BELL, W. J. 1995. Chemical Ecology of Insects 2. Chapman & Hall, New York.
- CHAPMAN, R. F. 1998. Insects: Structure and Function, 4th ed. Cambridge University, Cambridge.
- FRAGOSO, D. B., GUEDES, R. N. C., PICANÇO, M. C., and ZAMBOLIM, L. 2002. Insecticide use and organophosphate resistance in the coffee leaf miner *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). *Bull. Entomol. Res.* 92:203-212.
- FRAGOSO, D. B., GUEDES, R. N. C. and LADEIRA, J. A. 2003. Seleção na evolução de resistência a organofosforados em *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville)(Lepidoptera: Lyonetiidae). *Neotrop. Entomol.* 32:329-334.
- GUERREIRO FILHO, O., MEDINA FILHO, H. P., and CARVALHO, A. 1991. Fontes de resistência ao bicho-mineiro, *Perileucoptera coffeella*, em *Coffea* spp. *Bragantia* 50: 45-55.
- GUERREIRO FILHO, O., SILVAROLLA, M. B., and ESKES, A. B. 1999. Expression and mode of inheritance of resistance in coffee to leaf miner *Perileucoptera*

- coffeella*. *Euphytica* 105:7-15.
- KOGAN, M. 1986. Natural chemicals in plants resistance to insects. *Iowa St. J. Res.* 60:501-527.
- LARA, F. M., BORTOLI, S. A. de, and BOIÇA, A. L. 1986. Resistência de plantas a insetos. *Inf. Agropec.* 12: 23-29.
- KY, C. L., LOUARN, J., GUYOT, B., CHARRIER, A., HAMON, S. and NOIROT, M. 1999. Relations between and inheritance of chlorogenic acid contents in an interspecific cross between *Coffea pseudozanguebariae* and *Coffea liberica* var 'dewevrei'. *Theor. Appl. Genet.* 98:628-637.
- MANN, J. 1987. Secondary metabolism. Clarendon Press, Oxford.
- MATIELLO, J. B., ALMEIDA, S. R., QUEIROZ, A. R., AMARAL, A. S., FILHO, S. L., and LOUBACK, A. 2002. Evolução na seleção de material com resistência ao bicho-mineiro (*L. coffeella*) do cafeeiro na Zona da Mata-MG. p. 13, in XXVIII Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Caxambú, MAPA/PROCAFÉ.
- MATIELLO, J. B., ALMEIDA, S. R., SILVA, M. B. da, MIGUEL, A. E., QUEIROZ, A., BARROS, U. V., and FREITAS, W. 2001. Evolução na seleção de material com resistência múltipla a bicho-mineiro e ferrugem do cafeeiro. pp. 52-54, in XXVII Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Uberaba, PROCAFÉ.
- MATIELLO, J. B., ALMEIDA, S. R., QUEIROZ, A. A., MIGUEL, A. E., SILVA, M. B. da, FERREIRA, R. A., BARROS, U. V., and BARBOSA, C. M. 2000. Siriema 842 material promissor, com resistência múltipla (ferrugem e bicho mineiro) e boa produtividade. pp. 51-52, in XXVI Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras e VI Encontro de Cafeicultores de Marília, Marília, PROCAFÉ.
- RAHIMI, F. R., and CARTER, C. D. 1993. Inheritance of zingiberene in *Lycopersicon*. *Theor. Appl. Genet.* 87: 593-597.
- REIS, P. R., and SOUZA, J. C. de. 1996. Manejo do bicho-mineiro *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae) e seu reflexo na produção de café. *An. Soc. Entomol. Brasil* 25:77-82.
- REIS, P. R., and SOUZA, J. C. de. 1998. Manejo integrado das pragas do cafeeiro em Minas Gerais. *Inf. Agropec.* 19:17-25.
- SOUZA, J. C., REIS, P. R., and RIGITANO, R. L. O. 1998. Bicho-mineiro-do-cafeeiro: biologia, danos e manejo integrado. EPAMIG, Belo Horizonte, (Boletim Técnico 54).
- VIANI, R. 1986. Coffee, A7, pp. 314-339, in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5th ed. VCH Publishers, New York.

WALLER, G. R., FRIEDMAN, J., CHOU, C-H., SUZUKI, T., and FRIEDMAN, N.
1982. Hazards, benefits, metabolism, and translocation of caffeine in *Coffea arabica*
L. plants and surrounding soil. pp. 239-260, *in* Proceedings Seminar
Allelochemicals Pheromones, Tapei, R.O.C.

ATIVIDADE BIOLÓGICA DE FITOQUÍMICOS DE CAFEEIRO NA POSTURA DE
BICHO-MINEIRO

RESUMO

Dada a importância da quimiorrecepção no comportamento de insetos, o presente trabalho testou a hipótese de que derivados do ácido clorogênico e da cafeína presentes na folha de cafeeiros atuem como mediadores de interação, norteando a oviposição de *Leucoptera coffeella*. Desta forma, estes fitoquímicos foram quantificados em folhas de doze genótipos de cafeeiro, com variados níveis de resistência, e a preferência para oviposição nestes genótipos foi avaliada. Através de análises de variáveis canônicas e de correlação canônica parcial verificou-se que a concentração da cafeína foi a que mais contribuiu para a divergência entre os genótipos, sendo um mediador potencial desta interação. Em seguida, foi conduzido um ensaio de preferência para postura usando concentrações crescentes de cafeína pulverizadas nas folhas de um dos genótipos com menor teor deste fitoquímico (i.e., Híbrido UFV 557-04, gerado do cruzamento entre *Coffea racemosa* e *C. arabica*). Os resultados obtidos possibilitaram o estabelecimento de uma relação concentração-resposta significativa, confirmando a hipótese de que a cafeína atua estimulando a postura do bicho-mineiro em folhas de cafeeiro.

ABSTRACT

The recognized importance of chemioreception in insect behavior led to the present investigation aiming to test the hypothesis that the chlorogenic acid and caffeine present in coffee leaves play a role as interaction mediators modulating egg laying by *Leucoptera coffeella*. These fitochemicals, as well as some caffeine derivatives, were therefore quantified in leaves from 12 coffee genotypes and their preference for egg laying was assessed. Canonical variate analysis and partial canonical correlation provided evidence that caffeine has a potential role mediating the interaction between coffee and the coffee leaf miner. An egg laying preference bioassay was therefore carried out to specifically test this hypothesis using increasing caffeine concentrations sprayed on leaves of one of the coffee genotypes with the lowest level of this compound (i.e., Hybrid UFV 557-04 generated from a cross between *Coffea racemosa* and *C. arabica*). The results obtained allowed the recognition of a significant concentration-response relationship providing support for the hypothesis that caffeine stimulates egg laying by the coffee leaf miner in coffee leaves.

INTRODUÇÃO

Comportamento é a expressão de processos neurais modificados por fatores fisiológicos e ambientais, sendo central para o entendimento das interações entre organismos (Bernays, 2001). Nas últimas duas décadas, as interações inseto/planta têm sido focos dos estudos em ecologia e evolução (Bernays e Chapman, 1994). Este conhecimento tem possibilitado a determinação dos mecanismos de resistência de plantas a insetos, sendo muito útil para aqueles que trabalham com o melhoramento de plantas cultivadas e com o manejo de pragas.

O bicho-mineiro, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) constitui um importante problema fitossanitário da cafeicultura brasileira, devido aos danos e prejuízos causados (Parra 1985; Reis e Souza, 1996; Reis e Souza, 1998). Durante sua fase larval, ele se alimenta estritamente do mesófilo foliar do cafeeiro, sendo considerada uma praga monófaga (Pereira, 2002). Esse tipo de especialização, presente em muitos insetos holometábolos, bem como sua monofagia, podem ser determinados pela presença de fatores químicos, físicos e morfológicos presentes na folha do cafeeiro, favorecendo assim uma resposta comportamental positiva em relação ao hospedeiro (Bernays e Chapman, 1994).

Programas de melhoramento genético têm sido conduzidos visando à obtenção de genótipos de cafeeiros resistentes a este lepidóptero, obtido de cruzamento entre *Coffea racemosa* e *C. arabica* (Almeida et al., 2003; Guerreiro Filho et al., 1991; Guerreiro Filho et al., 1999; Matiello et al., 2000, 2001, 2002). Apesar disso, pouco se conhece sobre as interações inseto/planta e mecanismos responsáveis pela resistência destes genótipos ao bicho-mineiro, o que poderia beneficiar muito os programas de melhoramento para a obtenção de cafeeiros resistentes a esta espécie-praga (Kogan, 1986).

Dentre as variedades cultivadas comercialmente do gênero *Coffea* no mundo, *C. arabica* e *C. canephora* são as mais cultivadas. Estas possuem diferenças quanto à composição química nos frutos, sendo que a concentração de carboidratos, lipídios e trigonelina são maiores em *C. arabica*, e ácidos clorogênicos e cafeína são maiores em *C. canephora* (Viani, 1986). Compostos fenólicos como ácidos clorogênicos e cafeína e derivados são relatados como mediadores de interações inseto-planta (Bernays e Chapman, 1994). Estes compostos estão presentes em cafeeiros podendo estar envolvidos em interações entre este inseto e o cafeeiro. As principais classes de ácidos clorogênicos encontradas em frutos de cafeeiros são divididas em ácidos cafeoilquínico,

ácidos dicafeoilquínico e feruloilquínico e estes também variam conforme a espécie analisada (Ky et al., 1999). Além destes, existem outros compostos como os precursores do ácido clorogênico (ácido cafeico, ácido ferúlico, *p*-cumárico e quínico) (Mann, 1999; Ky et al., 1999), da cafeína (teobromina, 7-metilxantina) bem como os subprodutos desta (teobromina, teofilina, 3-metilxantina, 7-metilxantina e xantina) (Waller et al., 1982), que também variam conforme o genótipo de cafeeiro.

O bicho-mineiro, como qualquer outra espécie de inseto, possui a capacidade de detectar estímulos mecânicos, químicos e sonoros produzidos pelo ambiente, os quais possibilitam uma resposta seletiva ao ambiente (Chapman, 1998). Dada a importância da quimiorrecepção na comunicação de insetos (Cardé and Bell, 1995; Chapman, 1998), acredita-se que estímulos químicos produzidos pelos cafeeiros devam nortear, ao menos parcialmente, suas relações interespecíficas com o bicho-mineiro. Desta forma, o presente trabalho testa a hipótese de que ácido clorogênico, cafeína e seus derivados presentes nas folhas de cafeeiros atuam como mediadores de interação, norteadando a oviposição do bicho-mineiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Material genético e padrões de aleloquímicos

As folhas dos genótipos de cafeeiro com diversos níveis de resistência ao bicho-mineiro foram obtidas do Viveiro de Café do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, durante o verão de 2002. Todos estes genótipos estavam em fase de produção, com mais de 7 anos de idade. Os genótipos utilizados foram: *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho IAC 99 (UFV 2147 c 48 EL7), *C. arabica* cv. Mundo Novo IAC 376-4-32 (UFV 2150 c 40 EL8), *C. arabica* cv. Topázio (MG 1190 c 133), *C. arabica* cv. Borbom Amarelo (UFV 2952 C-146 c 17), *C. arabica* cv. Oeiras MG 6851 (UFV 2983 c 303), *C. canephora* cv. Robusta (UFV T3580 (1-2) c 171), *C. arabica* cv. Híbrido de Timor CIFC 2570 (UFV 447-49 CAS), *C. racemosa* (UFV 545 c 28), e quatro híbridos triplóides resultantes do cruzamento natural entre *C. racemosa* (UFV 544) e *C. arabica*: Híbrido UFV 557-04, Híbrido UFV 557-02, Híbrido UFV 557-03 e Híbrido UFV 557-06.

Os padrões aleloquímicos utilizados no trabalho foram: ácido clorogênico (ácido 5-*O*-cafeoilquínico), ácido cafeico, cafeína (1,3,7-trimetilxantina), teofilina (1,3-dimetilaxantina), xantina (2,6-diidroxi-7-metilpurina), 3-metilxantina (2,6-diidroxi-3-metilpurina), 7-metilxantina (2,6-diidroxi-7-metilpurina), teobromina (3,7-

dimetilxantina) e teofilina (1,3-dimetilxantina) (Sigma-Aldrich Química Brasil).

Criação do bicho-mineiro

Folhas minadas contendo larvas de *L. coffeella* foram coletadas semanalmente em plantações de *C. arabica* cv. Mundo Novo, Catuaí Vermelho e Catuaí Amarelo. Estas foram colocadas em placas do tipo 'gerbox' contendo uma solução aquosa com 10^{-6} M de benziladenina (Reis et al., 2000). Assim que as larvas passaram para o estágio de pupa, foram transferidas para tubos fechados, onde ficaram até a emergência dos adultos.

Avaliação da preferência para a oviposição do bicho-mineiro

O pecíolo das folhas dos genótipos de cafeeiro foi imerso em um pequeno tubo de 8,0 cm de altura por 3,0 cm de diâmetro, contendo solução aquosa com benziladenina, e fechado com tampa que permitia a passagem do pecíolo. Em seguida, foram colocados dentro de gaiolas teladas com organza (40 x 40 x 40 cm), contendo adultos (20 machos e 20 fêmeas) recém-emergidos. Após 24 horas de exposição, o número de ovos foi contado, com a ajuda de lupa estereoscópica (aumento de 15 a 20 vezes). Este procedimento foi realizado dezesseis vezes.

Extração de fitoquímicos presentes em folhas de cafeeiro

Três conjuntos de folhas, com aproximadamente 15 g cada, foram secos em estufa a 40°C, por duas semanas. Ao final deste tempo, as folhas haviam perdido em média 70% de umidade e foram então moídas. Em seguida, 1 g de cada amostra foi pesada em erlenmeyers, sendo adicionados 30 ml de metanol para a extração dos fitoquímicos. Os erlenmeyers foram colocados em um recipiente contendo água a 60°C por 4 horas. O extrato foi filtrado em papel de filtro, concentrado em evaporador rotativo, re-diluído com metanol para um volume de 3 ml, e novamente filtrado a vácuo em um extrator em fase sólida C₁₈.

Identificação e quantificação de fitoquímicos

As amostras filtradas no extrator de sólidos foram diluídas com metanol até completarem o volume de 10 ml. Uma alíquota de 0,5 ml foi retirada e diluída em metanol : água (1:1) para um volume de 10 ml. Dois ml desta solução foram retirados e diluídos, ajustando novamente para 10 ml com solução metanol:água (1:1). Esta solução foi filtrada em uma unidade filtrante com membrana PTFE (0,45 µm de malha e 13 mm

de diâmetro). Uma alíquota de vinte µl desta solução foram injetados no cromatógrafo líquido de alto desempenho.

O cromatógrafo utilizado era composto de duas bombas Shimadzu modelo LC-10AD, detector Shimadzu modelo SPD-10AV Dual, ajustado para detectar no canal 1 em $\lambda=272$ nm (cafeína e seus derivados), e no canal 2 em $\lambda=320$ nm (ácido clorogênico e ácido cafeico) bem como um módulo de comunicação Shimadzu modelo CBM-10A. Foi utilizada uma coluna de Lichrosorb de fase reversa modelo RP-18 (250 mm x 4.6 mm x 5 µm). A fase móvel foi formada por uma solução metanol: água com 1,0 mM de HCl em gradiente: 0,1 a 7,0 minutos (17 : 83 %), 7,1 a 37,0 minutos (23: 77 %) e 37,1 a 40,0 minutos (100: 0 %). O fluxo da fase móvel foi de 1,0 ml/minuto, conforme Daglia et al. (1994).

Padrões dos compostos analisados (xantina, 3-metilxantina, 7-metilxantina, teobromina, teofilina, ácido clorogênico, ácido cafeico e cafeína) foram injetados separadamente e em conjunto para se determinar o tempo de retenção. Em seguida, concentrações crescentes (1, 5, 10, 20, 100 e 200 µg/ml) destes compostos foram analisadas para estabelecer curvas de calibração para cada um deles e possibilitar sua quantificação. Em seguida, por meio de comparações entre os cromatogramas da amostra com os dos padrões, procedeu-se à identificação e quantificação destes compostos pelo método do padrão externo.

Teste de preferência para a oviposição com cafeína

O Híbrido UFV 557-04 foi o genótipo de cafeeiro escolhido para confirmar a ação mediadora da cafeína por apresentar pequena quantidade deste composto em suas folhas. Assim, folhas destes genótipos foram coletadas e atomizadas com soluções aquosas de cafeína (2,0 ml), nas concentrações 0,0; 0,01; 0,1; 1,0 e 5,0 mg/ml, utilizando-se torre de Potter ajustada para uma pressão de 5 lb/pol² (= 0,34 bar ou 3,44 x 10⁴ KPa). Em seguida, o pecíolo das folhas foram imersos numa solução aquosa com benziladenina na concentração de 10⁻⁶ M (Reis et al., 2000), contida em um tubo 8,0 cm de altura por 3,0 cm de diâmetro. Esses tubos foram fechados com uma tampa que permitia a passagem do pecíolo e colocados em gaiolas teladas com organza (40 x 40 x 40 cm), contendo adultos (20 machos e 20 fêmeas) recém emergidos. Após 24 horas de exposição, o número de ovos foi contado em lupa estereoscópica. Este procedimento foi repetido seis vezes para cada concentração de cafeína.

Análises estatísticas

Os dados das determinações fitoquímicas foram submetidos à análise de variáveis canônicas (CVA), utilizando-se o procedimento PROC CANDISC do SAS (SAS Institute, 1997), para determinar os coeficientes de ponderação das variáveis e para verificar possíveis agrupamentos lineares das variáveis analisadas com os genótipos de cafeeiro, com base na significância das distâncias de Mahalanobis (D^2) entre médias. Estes dados foram ainda submetidos à correlação canônica, utilizando o procedimento PROC CANCORR (SAS Institute, 1997), para determinar os coeficientes e correlações canônicas entre as determinações fitoquímicas e a postura por bicho-mineiro. Finalmente, dados de postura em relação às concentrações crescentes de cafeína foram submetidos à análise de regressão utilizando o procedimento PROC REG (SAS Institute, 1997).

RESULTADOS

Fitoquímicos e similaridade de genótipos

O sistema cromatográfico utilizado possibilitou uma boa separação e detecção dos picos dos padrões dos compostos em estudo nos canais utilizados e apresentaram os seguintes tempos de retenção: xantina (4,237 min.), 7-metilxantina (6,169 min.), 3-metilxantina (6,788), teobromina (10,858 min.), ácido clorogênico (13,788 min.), teofilina (14,448 min.), ácido cafeico (18,641 min.) e cafeína (32,147 min.), conforme as Figuras 1 e 2 e Daglia et al. (1994). Estes compostos foram identificados e quantificados nas amostras das folhas dos genótipos de cafeeiros. No entanto, 3-metilxantina, teofilina e ácido cafeico foram identificados somente em alguns genótipos e em baixas concentrações, sendo desconsiderados nas análises subsequentes (Tabela 1).

Análise de variância multivariada, para os diferentes genótipos, baseada na composição fitoquímica destes indicou diferenças estatísticas significativas (Wilks' lambda = 0,028; F = 3,23; graus de liberdade (Nun. / Den.) = 55 / 151,71; $p = <0,001$). Subseqüente análise de variância univariada mostrou que a concentração de ácido clorogênico não apresentou diferenças significativas em relação aos genótipos analisados, ao contrário dos demais compostos (Tabela 1).

Análise de variáveis canônicas conduzidas em complementação à análise de variância multivariada resultou em cinco eixos canônicos, dos quais apenas o primeiro se mostrou significativo ($p < 0,05$; Tabela 2), respondendo por 81,70% da variância

total explicada dos dados. O fitoquímico com o maior coeficiente canônico absoluto (agrupados na estrutura canônica) e, portanto, que mais contribuiu para a divergência entre os genótipos, foi a cafeína (Tabela 2).

O diagrama de ordenação derivado da análise de variáveis canônicas foi feito para apenas os dois primeiros eixos canônicos, que explicaram 92,32% da variância total observada. Quatro grupos de genótipos foram gerados mediante este procedimento. O grupo formado por *C. racemosa* e seus híbridos (com *C. arabica*) separou-se do grupo formado pelos cultivares de *C. arabica*, com a exceção do Topázio (Figura 3). As concentrações de cafeína nas folhas dos Híbridos, *C. racemosa* e Híbrido de Timor foram significativamente mais baixas em suas folhas que nos demais genótipos.

Preferência para postura

Os dados resultantes do teste de preferência para a postura do bicho-mineiro nos diferentes genótipos de cafeeiro estão apresentados na Tabela 1. Verificou-se que houve uma maior postura nos cultivares Borbom Amarelo, Catuaí Vermelho, Mundo Novo, Oeiras, Topázio, e Robusta diferenciando significativamente dos demais: *C. racemosa*, Híbrido UFV 557-04, Híbrido UFV 557-02, Híbrido UFV 557-03 e Híbrido UFV 557-06. Híbrido de Timor apresentou resultados intermediários aos destes dois grupos de genótipos.

Relação entre fitoquímicos e postura pelo bicho-mineiro

A quantidade dos fitoquímicos foi correlacionada com a postura do bicho-mineiro através da análise de correlação canônica (parcial) que identificou qual dos fitoquímicos estaria mostrando maior relevância (potencial) como mediador da interação entre cafeeiros com o bicho-mineiro. Os resultados obtidos salientaram o potencial da cafeína como mediador potencial desta interação, pois este fitoquímico apresentou alto coeficiente (e correlação) no par canônico gerado (Tabela 3). A análise de correlação entre teor de cafeína e postura de bicho-mineiro nos genótipos foi elevada e positiva ($r = 0,85$; $p = 0,0005$).

Teste de efeito da cafeína mediando postura por bicho-mineiro

Em face da indicação da relevância da cafeína estimulando postura do bicho-mineiro, foi conduzido um ensaio de preferência para postura usando concentrações crescentes de cafeína pulverizadas nas folhas de um dos genótipos com menor teor deste fitoquímico (i.e., Híbrido UFV 557-04). Os resultados obtidos possibilitaram o

estabelecimento de uma relação concentração-resposta significativa ($r^2 = 0,57$; $p = 0,03$), onde a elevação da concentração de cafeína aplicada às folhas levou a um incremento na postura do bicho-mineiro nestas (Figura 4).

DISCUSSÃO

No presente trabalho, explicou-se por que os genótipos de cafeeiro possuem resistência variada ao bicho-mineiro testando a hipótese da existência de fitoquímicos presentes na folha de cafeeiro que sejam responsáveis pela preferência para oviposição desta espécie, tornando-os mais ou menos preferidos. Verificou-se que dentre os compostos quantificados nas folhas dos genótipos de cafeeiro (ácido clorogênico, cafeína, xantina, 7-metilxantina, teobromina), a cafeína foi o composto que mais pronunciadamente contribuiu para explicar as diferenças na resistência entre os genótipos de cafeeiro analisados. A partir destes resultados evidenciou-se correlação entre o número de ovos e a concentração da cafeína e pôde-se estabelecer uma regressão não linear significativa entre o número de ovos do bicho-mineiro e a concentração de cafeína, confirmando a hipótese de que este composto atua estimulando a postura do bicho-mineiro em folhas de cafeeiro.

Alguns compostos secundários presentes no cafeeiro têm sido muito estudados. Entre estes se destaca a cafeína presente na planta e nos frutos do cafeeiro em 0,25 – 2,0 % do peso seco, apresentando evidências de efeitos alopatícos e autotóxicos (Waller et al., 1982). Sua toxicidade a algumas espécies de insetos fitófagos como *Calosobruchus chinensis*, *Manduca sexta* e *Xyleborus fornicatus* já foram reportadas (Rizvi et al., 1980; Nathason, 1984; Frischknecht et al., 1986; Hewavitharanage et al., 1999).

Guerreiro Filho (1994) e Mazzafera et al. (1996) sugeriram que a cafeína poderia estar envolvida de alguma forma na resistência do cafeeiro ao bicho-mineiro. No entanto, em investigações posteriores, Guerreiro Filho e Mazzafera (2000) verificaram que a cafeína não protegia o cafeeiro contra o bicho-mineiro, estando esta praga supostamente bem adaptada ao cafeeiro através de algum mecanismo que a possibilita tolerar os potentes efeitos tóxicos deste composto.

Ao que parece, deve ter ocorrido uma especialização deste inseto com o cafeeiro permitindo que suporte os efeitos tóxicos da cafeína e a utilize em prol da sua sobrevivência, favorecendo na escolha de cafeeiros suscetíveis. Portanto, fêmeas desse lepidóptero devem possuir quimiorreceptores específicos para detectar a cafeína em região próxima ao oviporo. Ao encostar a região inferior do abdômen na folhas de

cafeeiro, um potencial receptor será gerado proporcional à quantidade de cafeína presente na folha do cafeeiro. A seguir, vários potenciais de ação de uma mesma amplitude serão desencadeados na proporção da intensidade do potencial receptor (Chapman, 1998). Com isso o bicho-mineiro conseguirá determinar qual desses possui maior concentração de cafeína reconhecendo o seu hospedeiro mais favorável para a oviposição e posterior substrato para a alimentação das larvas, conforme acontece em ação herbívora freqüente de insetos especialistas (Bernays, 2001; Karban e Agrawal, 2002).

Outros fatores químicos devem estar determinando essa preferência do bicho-mineiro por cafeeiros suscetíveis, haja vista que o genótipo Híbrido Timor apresentou uma baixa concentração de cafeína nas suas folhas e teve uma preferência intermediária para postura deste lepidóptero. Além dos fatores químicos, fatores físicos como comprimento de onda emitido pelas folhas, e morfológicos como textura das folhas, provavelmente, estão também envolvidos na localização e reconhecimento de hospedeiros suscetíveis para esse inseto-praga.

Sob o aspecto mais aplicado, este trabalho pode contribuir para o programa de melhoramento do cafeeiro, na medida em que, fornece informações para a seleção de cafeeiros menos preferidos pelo bicho-mineiro. A redução do teor de cafeína em cafeeiros pode despertar grande interesse dos produtores pois a demanda por cafés com baixo teor deste composto vem crescendo. Além disso, com o menor ataque desta praga o custo de produção do café pode ser reduzido, possibilitando melhores rendimentos aos agricultores e menores resíduos de inseticidas no café.

Agradecimentos - Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais e ao Consórcio Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento do Café pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, S. R., MATIELLO, J. B., SILVA, M. B., FERREIRA, R. A., and CARVALHO, C. H. S. 2003. Melhoramento de café arábica visando a obtenção de plantas com resistência ao bicho-mineiro e à ferrugem. p. 240, *in* III Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil e Workshop Internacional de Café & Saúde, Porto Seguro, EMBRAPA-Café.

- BERNAYS, E. A., and CHAPMAN, R. F. 1994. Host-Plant Selection by Phytophagous Insects. Chapman & Hall, New York.
- BERNAYS, E. A. 2001. Neural limitations in phytophagous insects: Implications for diet breadth and evolution of host affiliation. *Annu. Rev. Entomol.* 46:703-727.
- CARDÉ, R. T., and BELL, W. J. 1995. Chemical Ecology of Insects 2. Chapman & Hall, New York.
- CHAPMAN, R. F. 1998. Insects: Structure and Function, 4th ed. Cambridge University, Cambridge.
- DAGLIA, M., CUZZONI, M. T., and DACARRO, C. 1994. Antibacterial activity of coffee: Relationship between biological activity and chemical markers. *J. Agric. Food Chem.* 42:2273-2277.
- FRISCHKNECHT, P. M., ULMER-DUFEK, J., and BAUMANN, T. W. 1986. Purine alkaloid formation in buds and developing leaflets of *Coffea arabica*: expression of an optimal defence strategy? *Phytochemistry* 25:613-616.
- GUERREIRO FILHO, O., SILVAROLLA, M. B., and ESKES, A. B. 1999. Expression and mode of inheritance of resistance in coffee to leaf miner *Perileucoptera coffeella*. *Euphytica* 105:7-15.
- GUERREIRO FILHO, O., and MAZZAFERA, P. 2000. Caffeine does not protect against the leaf miner *Perileucoptera coffeella*. *J. Chem. Ecol.* 26:1447-1464.
- HEWAVITHARANAGE, P., KARUNARATNE, S., and KUMAR, N. S. 1999. Effect of caffeine on shot hole borer beetle (*Xyleborus fornicatus*) of tea (*Camellia sinensis*). *Phytochemistry* 51:35-41.
- KOGAN, M. 1986. Natural chemicals in plants resistance to insects. *Iowa St. J. Res.* 60:501-527.
- KARBAN, R., and AGRAWAL, A. A. 2002. Herbivore offense. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 33:641-664.
- KY, C. L., LOUARN, J., GUYOT, B., CHARRIER, A., HAMON, S., and NOIROT, M. 1999. Relations between and inheritance of chlorogenic acid contents in an interspecific cross between *Coffea pseudozanguebariae* and *Coffea liberica* var 'dewevrei'. *Theor. Appl. Genet.* 98:628-637.
- MATIELLO, J. B., ALMEIDA, S. R., QUEIROZ, A. R., AMARAL, A. S., FILHO, S. L., and LOUBACK, A. 2002. Evolução na seleção de material com resistência ao bicho-mineiro (*L. coffeella*) do cafeeiro na Zona da Mata – MG. p. 13, in XXVIII Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Caxambú, MAPA/PROCAFÉ.
- MATIELLO, J. B., ALMEIDA, S. R., SILVA, M. B. da, MIGUEL, A. E., QUEIROZ,

- A., BARROS, U. V., and FREITAS, W. 2001. Evolução na seleção de material com resistência múltipla a bicho-mineiro e ferrugem do cafeeiro. pp. 52-54, *in* XXVII Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Uberaba, PROCAFÉ.
- MATIELLO, J. B., ALMEIDA, S. R., QUEIROZ, A. A., MIGUEL, A. E., SILVA, M. B. da, FERREIRA, R. A., BARROS, U. V., and BARBOSA, C. M. 2000. Siriema 842 material promissor, com resistência múltipla (ferrugem e bicho mineiro) e boa produtividade. pp. 51-52, *in* XXVI Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras e VI Encontro de Cafeicultores de Marília, Marília, PROCAFÉ.
- NATHANSON, J. A. 1984. Caffeine and related methylxanthines: possible naturally occurring pesticides. *Science* 226:184-187.
- MANN, J. 1987. Secondary metabolism. 2nd ed. Clarendon Press, Oxford.
- MAZZAFERA, P., YAMAOKA-YANO, D. M., and VITÓRIA, A. P. 1996. Para que serve a cafeína em plantas? *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 8:67-74.
- PARRA, J. R. P. 1985. Biologia comparada de *Leucoptera coffeella* (Guérin-Méneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) visando ao seu zoneamento ecológico no Estado de São Paulo. *Rev. Bras. Entomol.* 29:45-76.
- PEREIRA, E. J. G. 2002. Variação Sazonal dos Fatores de Mortalidade Natural de *Leucoptera coffeella* em *Coffea arabica*. – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. Dissertação (Mestrado).
- REIS, P. R., and SOUZA, J. C. 1996. Manejo do bicho-mineiro *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Méneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae), e seu reflexo na produção de café. *An. Soc. Entomol. Brasil* 25:77-82.
- REIS, P. R., and SOUZA, J. C. 1998. Manejo integrado das pragas do cafeeiro em Minas Gerais. *Inf. Agropec.* 19:17-25.
- REIS, R., LIMA, E. R., VILELA, E. F., and BARROS, R. S. 2000. Method for maintenance of coffee leaves *in vitro* for mass rearing of *Leucoptera coffeellum* (Guérin-Méneville)(Lepidoptera: Lyonetiidae). *An. Soc. Entomol. Brasil* 29:849-854.
- RIZVI, S. J. H., PANDEY, S. K., MUKERJI, D., and MATHUR, S. N. 1, 3, 7-Trimethylxanthine, a new chemosterilant for stored grain pest - *Callosobruchus chinensis*. *Z. Angew. Entomol.* 90:777-778.
- SAS INSTITUTE. 1997. User's Guide. Version 6.12. Cary, NC.
- VIANI, R. 1986. Coffee, A7, pp. 314-339, *in* Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5th ed. VCH Publishers, New York.
- WALLER, G. R., FRIEDMAN, J., CHOU, C-H., SUZUKI, T., and FRIEDMAN, N.

1982. Hazards, benefits, metabolism, and translocation of caffeine in *Coffea arabica* L. plants and surrounding soil. pp. 239-260, *in* Proceedings Seminar Allelochemicals Pheromones, Tapei, R.O.C.

Tabela 1. Médias (\pm erro padrão da média) da postura do bicho-mineiro e das massas dos fitoquímicos encontrados em folhas secas de genótipos de cafeeiros.

Genótipos	Número de ovos (postura)	Ác. clorogênico ($\mu\text{g/g}$)	Cafeína ($\mu\text{g/g}$)	7-metilxantina ($\mu\text{g/g}$)	Xantina ($\mu\text{g/g}$)	Teobromina ($\mu\text{g/g}$)
'Bourbon Amarelo'	8,25 \pm 1,37 ^a	914,92 \pm 266,32 ^a	920,7 \pm 218,44 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c	3,02 \pm 1,30 ^{a,b}	126,46 \pm 63,66 ^{a,b}
'Catuaí Vermelho'	13,00 \pm 2,34 ^a	1214,24 \pm 347,1 ^a	1309,86 \pm 96,2 ^{a,b}	7,96 \pm 7,96 ^{a,b,c}	3,28 \pm 2,18 ^{a,b}	12,40 \pm 9,54 ^{b,c}
'Mundo Novo'	8,94 \pm 2,19 ^a	768,98 \pm 220,70 ^a	968,88 \pm 241,02 ^{b,c}	0,00 \pm 0,00 ^c	4,08 \pm 1,60 ^{a,b}	14,24 \pm 8,46 ^{b,c}
'Oeiras'	10,75 \pm 2,46 ^a	920,12 \pm 250,58 ^a	1174,92 \pm 25,08 ^{a,b,c}	6,62 \pm 3,18 ^{a,b,c}	4,61 \pm 0,22 ^{a,b}	15,92 \pm 6,54 ^{b,c}
'Topázio'	9,31 \pm 2,71 ^a	1205,36 \pm 207,4 ^a	836,06 \pm 292,1 ^c	5,96 \pm 5,96 ^{b,c}	5,22 \pm 0,66 ^{a,b}	7,82 \pm 4,90 ^{b,c}
'Robusta'	15,00 \pm 3,97 ^a	692,38 \pm 194,08 ^a	1417,32 \pm 83,74 ^a	0,00 \pm 0,00 ^c	2,32 \pm 0,22 ^b	107,00 \pm 86,86 ^b
<i>Coffea racemosa</i>	1,13 \pm 0,47 ^c	914,56 \pm 284,12 ^a	31,76 \pm 11,68 ^d	7,98 \pm 7,98 ^{a,b,c}	3,54 \pm 1,78 ^{a,b}	0,00 \pm 0,00 ^c
Híbrido UFV 557-04	3,13 \pm 1,00 ^c	1054,7 \pm 322,04 ^a	12,68 \pm 6,10 ^d	0,00 \pm 0,00 ^c	2,98 \pm 1,00 ^{a,b}	142,22 \pm 135,06 ^{b,c}
Híbrido UFV 557-02	2,69 \pm 0,95 ^c	717,98 \pm 173,98 ^a	13,92 \pm 11,46 ^d	16,82 \pm 5,12 ^a	4,56 \pm 0,64 ^{a,b}	5,72 \pm 5,72 ^{b,c}
Híbrido UFV 557-03	2,50 \pm 0,75 ^c	1025,36 \pm 321,0 ^a	98,72 \pm 41,84 ^d	7,56 \pm 7,56 ^{a,b,c}	4,12 \pm 1,62 ^{a,b}	51,02 \pm 51,02 ^{b,c}
Híbrido UFV 557-06	3,88 \pm 1,21 ^{b,c}	483,32 \pm 211,42 ^a	336,94 \pm 51,84 ^d	5,86 \pm 5,86 ^{b,c}	4,70 \pm 0,34 ^{a,b}	49,32 \pm 49,32 ^{b,c}
Híbrido de Timor	8,50 \pm 2,12 ^{a,b}	1163,42 \pm 226,5 ^a	3,86 \pm 3,86 ^d	22,52 \pm 8,72 ^a	6,26 \pm 1,72 ^a	543,00 \pm 64,88 ^a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não foram significativa pelo teste das diferenças mínimas significativas (LSD) de Fisher ($P < 0,05$).

Tabela 2. Eixos canônicos e coeficientes de ponderação (agrupados na estrutura canônica) dos parâmetros fitoquímicos analisados em doze genótipos de cafeeiro.

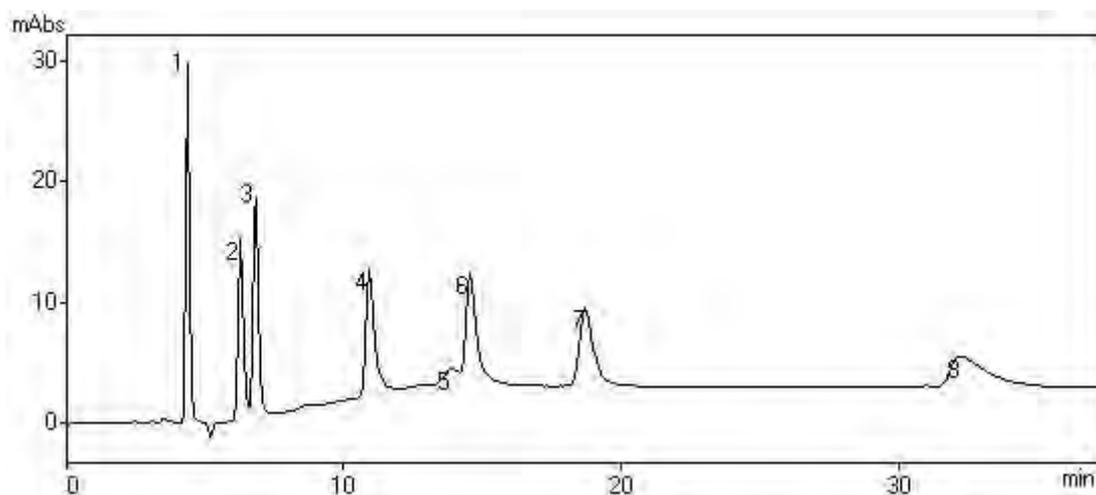
Variáveis	Eixos Canônicos			
	1	2	3	4
Ácido clorogênico	-0,05	-0,19	0,42	0,97
Cafeína	1,12	0,13	0,14	-0,04
7-Metilxantina	-0,31	0,51	0,83	-0,13
Xantina	-0,45	-0,11	-0,07	-0,25
Teobromina	-0,24	0,10	-0,39	0,02
F	3,23	1,39	0,94	0,73
Graus de liberdade(num./den.)	55 / 151,71	40 / 126,99	27 / 99,94	16 / 70
<i>P</i>	< 0,0001	0,0848	0,5530	0,7520
Correlação canônica ao quadrado	0,89	0,51	0,30	0,18

Tabela 3. Correlação canônica (parcial) e par canônico entre as massas dos fitoquímicos ($\mu\text{g/g}$) em folhas secas de doze genótipos de cafeeiro e o número de ovos por folhas.

Variáveis	Primeiro par canônico	
	Coefficiente	Correlação
Ácido clorogênico	0,11	0,19
Cafeína	1,01	0,87
7-metilxantina	0,01	-0,27
Xantina	0,30	-0,037
Teobromina	0,37	0,337
Número de ovos por folha	1,00	1,007
r		0,98
F aproximado		29,63*
Graus de liberdade (núm.; den.)		5; 6

*Significativo com $\alpha < 0,05$.

(A)



(B)

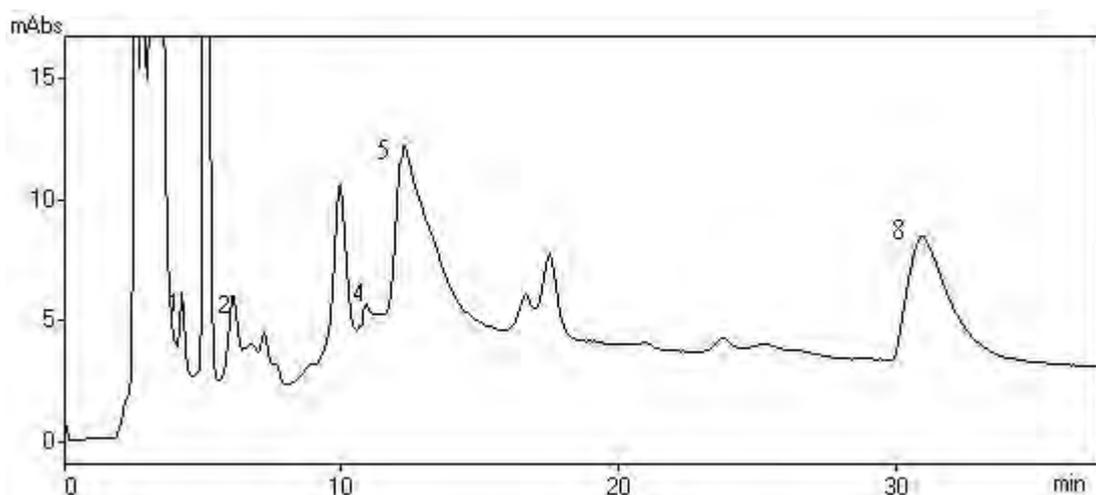
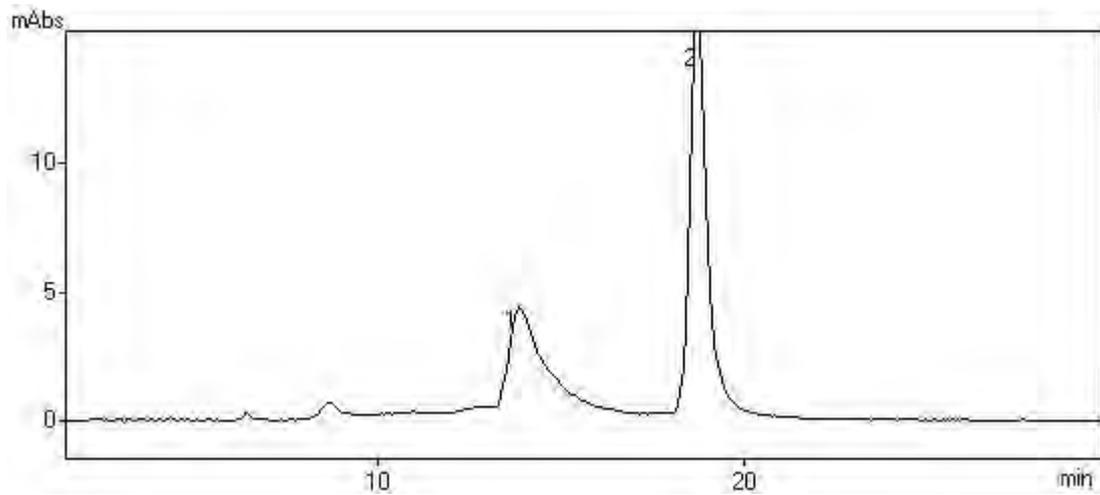


Figura 1. Cromatograma típico dos fitoquímicos detectados no canal 1 (272 nm), indicando os picos relativos: 1) xantina (4,237 min.), 2) 7-metilxantina (6,169 min.), 3) 3-metilxantina (6,788 min.), 4) teobromina (10,858 min.), 5) ácido clorogênico (13,788 min.), 6) teofilina (14,448 min.), 7) ácido cafeico (18,641 min.) e 8) cafeína (32,147 min.), de uma mistura de padrões (A) e de uma amostra de extrato foliar do genótipo *C. arabica* cv. Borbom Amarelo (B).

(A)



(B)

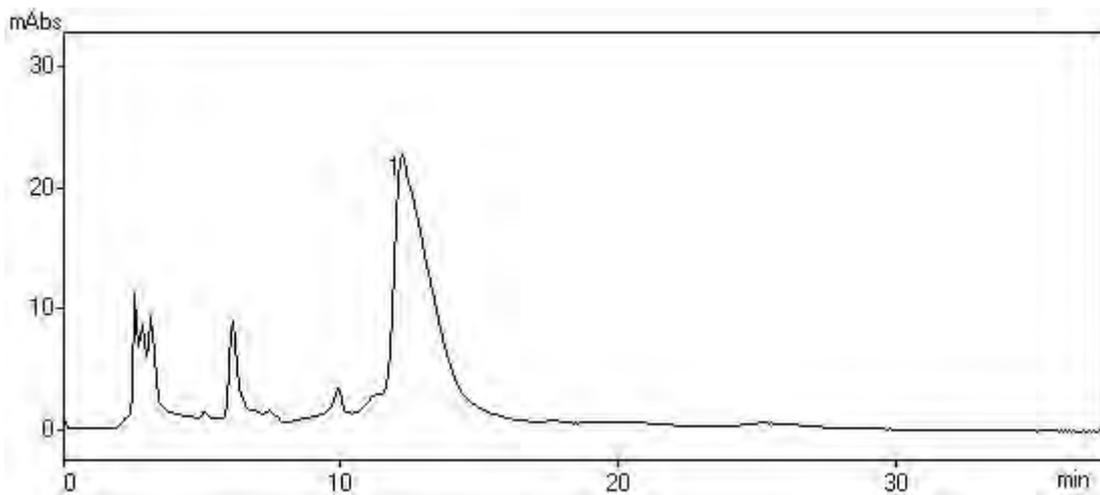


Figura 2. Cromatograma dos fitoquímicos detectados no canal 2: (320 nm), indicando os picos relativos: 1) ácido clorogênico (13,781 min.) e 2) ácido cafeico (18,570 min.), na mistura de padrões (A) e de uma amostra de extrato foliar do genótipo *C. arabica* cv. Borbom Amarelo (B).

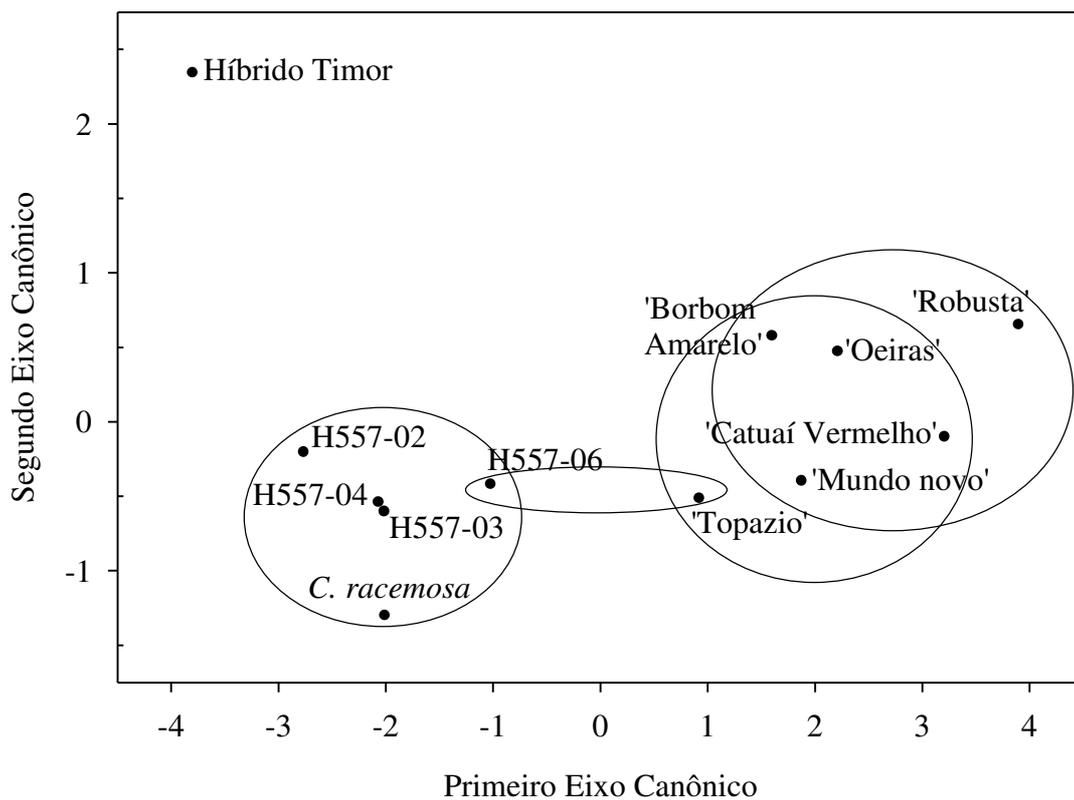


Figura 3. Diagrama de ordenação mostrando a discriminação entre genótipos de cafeeiros quanto às diferenças nos fitoquímicos analisados. Os símbolos são centróides de tratamentos e representam a média das classes de variáveis canônicas. Círculos largos indicam grupos de tratamentos sem diferença significativa entre eles (teste de F aproximado, $P < 0,05$) baseado na distância de Mahalanobis (D^2) entre médias.

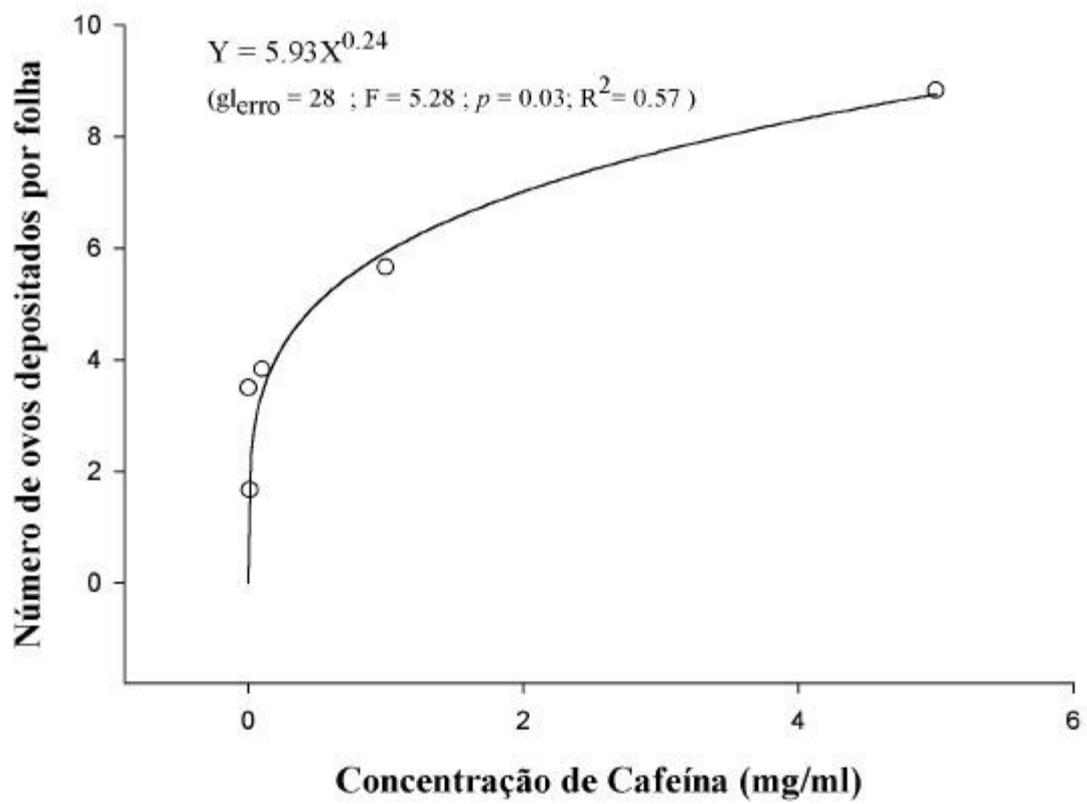


Figura 4. Relação entre concentração de cafeína pulverizada em folhas de café (Híbrido UFV 557-04) e a postura por bicho-mineiro.

RESISTÊNCIA DE CAFEIROS AO BICHO-MINEIRO E SUA RELAÇÃO COM
ÁCIDO CLOROGÊNICO, CAFEÍNA E DERIVADOS

RESUMO

Neste trabalho foi testada a hipótese de que fitoquímicos presentes nas folhas de cafeeiro constituem substâncias de defesa contra o ataque do bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*), prejudicando o seu desenvolvimento. Desta forma, o desenvolvimento do bicho-mineiro, desde ovo até adulto, foi acompanhado em folhas de genótipos de cafeeiro com variados níveis de resistência. Em seguida, os níveis de ácido clorogênico, ácido cafeico bem como de cafeína e derivados foram quantificados nos extrato das folhas, antes e sete dias após infestação por bicho-mineiro. Através de análises de variáveis canônicas dos dados de desenvolvimento de bicho-mineiro, os diferentes genótipos foram agrupados de acordo com a resistência deles a esta praga. Apenas os níveis de ácido clorogênico mostraram diferenças significativas, apresentando acentuado declínio com a infestação. Dados dos demais fitoquímicos foram então combinados nas análises subsequentes. O desenvolvimento de bicho-mineiro nos diferentes genótipos foi correlacionado com a composição fitoquímica de ácido clorogênico, cafeína e derivados (antes e após infestação) mediante correlação canônica, mas não houve correlação significativa entre os dados. Assim, apesar da confirmação de resistência por antibiose em alguns genótipos de cafeeiro (*Coffea racemosa* e seus híbridos com *C. arabica*), os resultados obtidos não salientam a relevância de nenhum dos fitoquímicos analisados como mediador potencial desta interação. Curiosamente, foi observado que infestação por bicho-mineiro acarreta declínio nos teores foliares de ácido clorogênico, que apesar de não exercer efeito nesta espécie-praga.

ABSTRACT

This work was carried out to test the hypothesis that phytochemicals present in coffee leaves constitute a defense mechanism against the coffee leaf miner (*Leucoptera coffeella*), impairing its development. The species development was therefore followed from egg to adult in leaves of different coffee genotypes with alleged varied levels of resistance. The levels of chlorogenic and caffeic acid, caffeine and derivatives were quantified in leaf extracts of these genotypes before and seven days after their infestation by the coffee leaf miner. The results of the insect development on the different coffee genotypes were subjected to canonical variate analysis and this genotypes were grouped based on their resistance to the coffee leaf miner. Leaf levels of chlorogenic acid, caffeine and some of its derivatives (7-methyl xanthine, xanthine and theobromine) were detectable in the studied genotypes and their quantification before and after the insect infestation was carried out and contrasted. The leaf miner infestation affected only the levels of chlorogenic acid leading to its significant decrease. The data of the other quantified phytochemicals were combined in subsequent analysis. The data of the leaf miner development of the coffee genotypes was correlated with their phytochemical composition encompassing chlorogenic ac. (before and after infestation), caffeine and derivatives through canonical correlation analysis, but there was no significant correlation. Therefore, despite the confirmation of antibiosis resistance to the coffee leaf miner in some coffee genotypes (*Coffea racemosa* and their hybrids with *C. arabica*), the results obtained do not provide any evidence of the involvement of the assessed phytochemicals obtained from leaf extracts mediating such interaction. Curiously though, infestation by the coffee leaf miner leads to a decline in the leaf levels of chlorogenic acid, which does not affect this pest-species.

INTRODUÇÃO

A cafeicultura brasileira possui grande destaque econômico e social, sendo o Brasil o maior produtor mundial. Entretanto, a produção cafeeira está limitada por problemas fitossanitários, dentre os quais destaca-se o bicho-mineiro, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae) (Guerreiro Filho et al., 1999). Esta praga destrói o mesófilo foliar, reduz a área fotossintética, provoca queda prematura das folhas, causando prejuízos na produção de frutos superiores a 50 %. (Reis e Souza, 1996, 1998; Fragoso, 2000). Este inseto tem sido considerado praga-chave da cafeicultura na maioria das regiões produtoras (Souza et al., 1998). Durante sua fase larval, este se alimenta estritamente do mesófilo foliar do cafeeiro, sendo considerada uma praga monófoga (Pereira, 2002). Esse tipo de fitofagia, presente em muitos insetos holometábolos, constitui vantagens adaptativas em relação a outras pragas reduzindo riscos por dessecação e minimizando as dificuldades de conexão à planta (Bernays e Chapman, 1994).

Guerreiro Filho (1991) classificou algumas espécies de cafeeiro quanto à resistência ao bicho-mineiro. As espécies *Coffea stenophylla*, *C. brevipes*, *C. liberica* e *C. salvatrix* foram consideradas altamente resistentes. *C. racemosa*, *C. kapakata*, *C. dewevrei* e *C. eugenioide* foram consideradas moderadamente resistentes. E *C. congensis*, *C. canephora* e *C. arábica* foram consideradas suscetíveis. Estes cafeeiros devem possuir fitoquímicos mediadores desta interação, conforme argumentado por Bernays e Chapman (1994) e Bernays (2001). No cafeeiro são conhecidos alguns compostos secundários que podem estar envolvidos nos mecanismos de defesa contra suas pragas. O ácido clorogênico, cafeína e derivados são exemplos de compostos secundários encontrados no café, que variam com a espécie e parecem prover proteção contra a herbivoria (Waller et al. 1982; Bernays e Chapman, 1994; Mann, 1999; Ky, et al. 1999).

Trabalhos de melhoramento genético têm buscado genótipos de cafeeiros com níveis de resistência mais elevada ao bicho-mineiro (Almeida et al., 2003; Guerreiro Filho et al., 1999; Guerreiro Filho, Mazzafera, 2000; Matiello et al., 2000, 2001 e 2002). Apesar disso, pouco se conhece sobre as interações inseto/planta e mecanismos responsáveis pela resistência destes genótipos ao bicho-mineiro, o que poderia beneficiar os programas de melhoramento que visam a obtenção de cafeeiros resistentes ao bicho-mineiro (Kogan, 1986).

Acredita-se que estímulos químicos produzidos pelos cafeeiros possam estar

influenciando as relações interespecíficas com essa praga. Portanto, no presente trabalho pretende-se tentar explicar porque certos genótipos possuem resistência variada ao bicho-mineiro, testando a hipótese de que fitoquímicos presentes nas folhas constituem um mecanismo de defesa contra esta espécie-praga, prejudicando o seu desenvolvimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Material genético e padrões de fitoquímicos

As folhas dos genótipos de cafeeiro com diversos níveis de resistência ao bicho-mineiro foram obtidas do Viveiro de Café do Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, durante o período do verão de 2002. Todos os genótipos estavam em fase de produção, com mais de 7 anos de idade. Os genótipos utilizados foram: *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho IAC 99 (UFV 2147 c 48 EL7), *C. arabica* cv. Mundo Novo IAC 376-4-32 (UFV 2150 c 40 EL8), *C. arabica* cv. Topázio (MG 1190 c 133), *C. arabica* cv. Borbom Amarelo (UFV 2952 C-146 c 17), *C. arabica* cv. Oeiras MG 6851 (UFV 2983 c 303), *C. canephora* cv. Robusta (UFV T3580 (1-2) c 171), *C. arabica* cv. Híbrido de Timor CIFC 2570 (UFV 447-49 CAS), *C. racemosa* (UFV 545 c 28), e quatro híbridos triplóides resultantes do cruzamento natural entre *C. racemosa* (UFV 544) e *C. arabica*: Híbrido UFV 557-04, Híbrido UFV 557-02, Híbrido UFV 557-03 e Híbrido UFV 557-06.

Os padrões dos aleloquímicos utilizados foram ácido clorogênico (ácido 5-*O*-cafeoilquínico), ácido cafeico, cafeína (1,3,7-trimetilxantina), teofilina (1,3-dimetilxantina), xantina (2,6-diidroxipurina), 3-metilxantina (2,6-diidroxí-3-metilpurina), 7-metilxantina (2,6-diidroxí-7-metilpurina), teobromina (3,7-dimetilxantina), *Sigma Chemical Co.*

Criação do bicho-mineiro

Folhas minadas contendo larvas de *L. coffeella* foram coletadas semanalmente em plantações *C. arabica* cv. Mundo Novo, Catuaí Vermelho e Catuaí Amarelo e colocadas em placas do tipo 'gerbox' contendo solução aquosa com benziladenina, na concentração de 10^{-6} M (Reis et al., 2000). Assim que as larvas passavam para o estágio de pupa, foram transferidas para tubos fechados, onde ficaram até a emergência dos adultos.

Avaliação do desenvolvimento do bicho-mineiro em folhas de genótipos de cafeeiro

Para esta avaliação, as folhas de cafeeiros dos genótipos analisados foram coletadas, tendo cada uma o seu pecíolo imerso em um tubo de 8,0 cm de altura por 3,0 cm de diâmetro, contendo solução aquosa com benziladenina. Em seguida, estes foram tampados permitindo apenas a passagem do pecíolo das plantas e colocados em gaiolas teladas com organza (40 x 40 x 40 cm), contendo adultos (20 machos e 20 fêmeas) recém emergidos. Após 24 horas de exposição, as folhas foram retiradas das gaiolas e, com o auxílio de lupa estereoscópica (aumento de 15 a 20 vezes), contou-se o número de ovos, dando-se início a avaliação do desenvolvimento do bicho-mineiro. Estas folhas infestadas foram observadas diariamente, contando-se o número de ovos, larvas e pupas, durante todo o desenvolvimento do inseto até a sua passagem para a fase adulta ou a sua morte, quando esta ocorria primeiro. Este procedimento foi feito no mínimo 6 vezes, constituindo as repetições para cada genótipo. De posse destes dados calculou-se o tempo médio de eclosão, tempo de sobrevivência larval, eclosão de larvas e mortalidade de larva a pupa.

Extração de fitoquímicos presentes na folha dos genótipos de cafeeiro

Folhas de cafeeiro foram coletadas antes da infestação pelo bicho-mineiro e sete dias após a infestação. Essas folhas dos diversos genótipos, contendo aproximadamente 15 g, com quatro repetições amostradas antes da infestação e uma repetição amostrada após infestação, foram secas em estufa a 40°C, por duas semanas, e moídas. Em seguida, 1 g de cada um destes materiais foi pesado em erlenmeyer, sendo adicionados 30 ml de metanol para a extração dos fitoquímicos. Estes erlenmeyers foram colocados em um recipiente contendo água a 60°C por 4 horas. O extrato foi subsequentemente filtrado em papel de filtro, concentrado em evaporador rotativo, rediluído com metanol para um volume de 3 ml e novamente filtrado à vácuo em um extrator em fase sólida C₁₈ para retirar o excesso de clorofila nas amostras.

Identificação e quantificação de fitoquímicos

As amostras filtradas no extrator de sólidos foram diluídas com metanol até completarem o volume de 10 ml. Uma alíquota de 0,5 ml foi retirada e diluída em metanol:água (1:1) para um volume de 10 ml. Dois ml desta solução foram retirados e diluídos, ajustando novamente para 10 ml com solução metanol:água (1:1). Esta solução foi filtrada em uma unidade filtrante com membrana PTFE (0,45 µm de malha e 13 mm de diâmetro). Uma alíquota de vinte µl desta solução foi injetado no cromatógrafo

líquido de alto desempenho.

Foi utilizado um cromatógrafo composto de duas bombas Shimadzu modelo LC-10AD e com o detector Shimadzu modelo SPD-10AV Dual, ajustado para detectar no canal 1 em $\lambda=272$ nm (cafeína e seus derivados), e no canal 2 em $\lambda=320$ nm (ácido clorogênico e ácido cafeico). Foi utilizada uma coluna de Lichrosorb de fase reversa RP-18 (25cm x 4,6 mm x 5 μ m). A fase móvel foi formada por solução de metanol:água com 1,0 mM de HCl, em gradiente: 0,1 a 7,0 minutos (17:83 %), 7,1 a 37,0 minutos (23:77 %) e 37,1 a 40,0 minutos (100:0 %). O fluxo da fase móvel foi de 1,0 ml/minuto, conforme Daglia et al. (1994).

Padrões dos compostos analisados foram injetados separadamente e em conjunto para determinar o tempo de retenção. Em seguida, concentrações crescentes (1, 5, 10, 20, 100 e 200 μ g/ml) destes compostos foram analisadas para estabelecer curvas de calibração para cada um destes e possibilitar a quantificação deles. Em seguida, por meio de comparações entre os cromatogramas da amostra com os dos padrões, procedeu-se à identificação e quantificação destes compostos pelo método do padrão externo.

Análises estatísticas

Os dados de desenvolvimento de bicho-mineiro nos diferentes genótipos de cafeeiro foram submetidos à análise de variáveis canônicas (CVA), utilizando-se o procedimento PROC CANDISC do SAS (SAS Institute, 1997), para determinar os coeficientes de ponderação das variáveis e para verificar possíveis agrupamentos lineares das variáveis analisadas, com base na significância das distâncias de Mahalanobis (D^2) entre médias. Os dados de quantificação de fitoquímicos antes e após infestação por bicho-mineiro foram contrastados pelo teste de t ($p = 0,05$) e posteriormente submetidos à correlação canônica com os dados de desenvolvimento de bicho-mineiro para cada genótipo avaliado, utilizando o procedimento PROC CANCORR do SAS (SAS Institute, 1997). Diferenças entre genótipos para características individuais foram evidenciadas por análise de variância e subsequente teste de média (diferença mínima significativa; LSD a $p = 0,05$), quando apropriado.

RESULTADOS

Similaridade de genótipos de cafeeiro quanto à resistência ao bicho-mineiro

A análise de variância multivariada para os diferentes genótipos baseada no

desenvolvimento do bicho-mineiro em suas folhas indicou diferenças estatísticas significativas (Wilks' Lambda = 0,014; F = 6,06; graus de liberdade (Nun. / Den.) = 44 / 128,20; $p < 0,0001$) (Tabela 1). Análise de variáveis canônicas (CVA), conduzida em complementação à análise de variância multivariada, resultou em quatro eixos canônicos, dos quais apenas o primeiro se mostrou significativo ($p < 0,05$; Tabela 2), respondendo por 95,95% da variância total explicada pelos dados. A mortalidade de larva a adulto foi o parâmetro do desenvolvimento com o maior coeficiente canônico absoluto (agrupados na estrutura canônica) e, portanto, que mais contribuiu para a divergência entre os genótipos (Tabela 2).

O diagrama de ordenação derivado da CVA foi feito para apenas os dois primeiros eixos canônicos, que explicaram 98,98% da variância total observada. Quatro grupos de genótipos foram gerados mediante este procedimento (Figura 1). As mortalidades de larva a adulto do bicho-mineiro, particularmente nos genótipos de *C. racemosa*, seus híbridos com *C. arabica*, e em 'Robusta', foram significativamente mais altas em relação aos demais genótipos (Tabela 1). O tempo médio de sobrevivência larval também apresentou resultado semelhante ao de mortalidade de larva a adulto; já a porcentagem de eclosão foi significativamente inferior no Híbrido 1 em relação aos demais genótipos de cafeeiro. O tempo médio para eclosão de ovos não diferiu entre os genótipos (Tabela 1).

Identificação e quantificação de fitoquímicos em folhas de genótipos de cafeeiro

O sistema cromatográfico utilizado possibilitou uma boa separação e detecção dos picos dos padrões dos compostos em estudo nos canais utilizados e apresentaram os seguintes tempos de retenção: xantina (4,237 min.), 7-metilxantina (6,169 min.), 3-metilxantina (6,788), teobromina (10,858 min.), ácido clorogênico (13,788 min.), teofilina (14,448 min.), ácido cafeico (18,641 min.) e cafeína (32,147 min.), conforme as Figuras 1 e 2 e Daglia et al. (1994). Estes compostos foram identificados e quantificados nas amostras das folhas dos genótipos de cafeeiros. No entanto, 3-metilxantina, teofilina e ácido cafeico foram identificados somente em alguns genótipos e em baixas concentrações, sendo desconsiderados nas análises subsequentes.

Relação entre parâmetros do desenvolvimento do bicho-mineiro e fitoquímicos de cafeeiro

O teor de ác. clorogênico, cafeína e os seus derivados (7-metilxantina, xantina e teobromina) resultado dos dados combinados de antes da infestação por bicho-mineiro

diferiram significativamente entre os genótipos avaliados (Tabela 3). Os níveis foliares dos diferentes fitoquímicos obtidos antes e após infestação pelo bicho-mineiro foram confrontados mediante teste t ($p < 0,05$), mas apenas os níveis de ácido clorogênico apresentaram diferença significativa, tendo um decréscimo de 3,8x (Figura 2).

Os níveis foliares destes fitoquímicos antes da infestação foram correlacionados aos dados de desenvolvimento de bicho-mineiro nos diferentes genótipos, mediante análise de correlação canônica. O objetivo da correlação foi evidenciar qual fitoquímico estaria mostrando maior relevância (potencial), como mediador da interação, entre bicho-mineiro e cafeeiro. Os resultados obtidos não mostraram a relevância de nenhum dos fitoquímicos analisados como mediador potencial desta interação, pois as variáveis canônicas não foram significativas (Wilks' Lambda = 0,011; F = 0,89; graus de liberdade (Nun. / Den.) = 24 / 8,18; $p = 0,62$).

DISCUSSÃO

O cafeeiro possui alguns fitoquímicos nocivos a insetos, como a cafeína, (Rizvi et al., 1980; Nathanson, 1984; Frischknecht et al., 1986; Hewavitharanage et al., 1999). Os níveis dos fitoquímicos estudados não apresentaram aumento nos níveis foliares mediante infestação pelo bicho-mineiro. Entretanto, os níveis de ácido clorogênico decresceram com a infestação pelo bicho-mineiro. Isto não mostrou relevância para esta espécie-praga, mas pode favorecer a incidência de outras espécies de artrópodes-praga, pois este composto participa de mecanismos de defesa contra fitopatógenos (Ky et al., 1999).

As concentrações de 7-metilxantina, xantina e teobromina apresentaram pequenas diferenças significativas entre genótipos, não demonstrando nenhuma relação com a resistência destes ao bicho-mineiro. Já a concentração de cafeína apresentou maiores concentrações nos cultivares Borbom Amarelo, Catuaí Vermelho, Mundo Novo, Oeiras, Topázio e Robusta diferindo estatisticamente dos demais genótipos. Este fitoquímico também não mostrou relação significativa com resistência ao bicho-mineiro por antibiose. Resultado semelhante foi reportado por Guerreiro Filho e Mazzafera (2000), que não evidenciaram efeito protetor de cafeína contra injúria por bicho-mineiro. No entanto, em estudo prévio (Capítulo 1) foi possível observar que a cafeína estimula postura desta praga em cafeeiros, sendo mediador importante na interação entre inseto-praga e o cafeeiro, possibilitando resistência por antixenose nesta espécie vegetal.

Dentre os genótipos testados verificou-se que *C. canephora* cv. Robusta, *C.*

racemosa e os híbridos entre *C. racemosa* com *C. arabica*, mostram resistência ao bicho-mineiro por antibiose. Isto acontece porque o desenvolvimento de larvas de bicho-mineiro (avaliados aqui como tempo de sobrevivência larval e mortalidade de larva a adulto) nestes genótipos é drasticamente comprometido.

Outros fatores podem estar contribuindo para a resistência tipo antibiose verificada nos cafeeiros testados ao bicho-mineiro. Propriedades físicas e estruturais e outros constituintes internos das folhas não testados aqui, como nutrientes essenciais para o desenvolvimento do inseto-praga, podem estar envolvidos no fenômeno. Existem várias classes de ácido clorogênico presente nos cafeeiros que não foram testadas e poderiam estar envolvidas nos mecanismos de defesa do cafeeiro contra o bicho-mineiro como os derivados dos ácidos dicafeoilquínico, feruloilquínico, p-coumaoilquínico, feruloilcafeoilquínico e cafeoilferuloilquínico (Ky et al., 1999).

Agradecimentos: - Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais e ao Consórcio Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento do Café pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S. R., MATIELLO, J. B., SILVA, M. B., FERREIRA, R. A., and CARVALHO, C. H. S. 2003. Melhoramento de café arábica visando a obtenção de plantas com resistência ao bicho-mineiro e à ferrugem. p. 240, *in* III Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil e Workshop Internacional de Café & Saúde, Porto Seguro, EMBRAPA-Café.
- BERNAYS, E. A., and CHAPMAN, R. F. 1994. Host-plant selection by phytophagous insects. Chapman & Hall, New York.
- BERNAYS, E. A. 2001. Neural limitations in phytophagous insects: Implications for diet breadth and evolution of host affiliation. *Annu. Rev. Entomol.* 46:703-727.
- DAGLIA, M., CUZZONI, M. T., and DACARRO, C. 1994. Antibacterial activity of coffee: Relationship between biological activity and chemical markers. *J. Agric. Food Chem.* 42:2273-2277.
- FRAGOSO, D. B., GUEDES, R. N. C., and LADEIRA, J. A. 2003. Seleção na evolução de resistência a organofosforados em *Leucoptera coffeella* (Guérin-

- Mèneville)(Lepidoptera: Lyonetiidae). *Neotrop. Entomol.* 32:329-334.
- FRISCHKNECHT, P. M., ULMER-DUFEK, J., and BAUMANN, T. W. 1986. Purine alkaloid formation in buds and developing leaflets of *Coffea arabica*: expression of an optimal defence strategy? *Phytochem.* 25:613-616.
- GUERREIRO FILHO, O. 1991. Fontes de resistência ao bicho-mineiro, *Perileucoptera coffeella*, em *Coffea* SPP. *Bragantia* 50: 45-55.
- GUERREIRO FILHO, O., SILVAROLLA, M. B., and ESKES, A. B. 1999. Expression and mode of inheritance of resistance in coffee to leaf miner *Perileucoptera coffeella*. *Euphytica* 105:7-15.
- GUERREIRO FILHO, O., and MAZZAFERA, P. 2000. Caffeine does not protect against the leaf miner *Perileucoptera coffeella*. *J. Chem. Ecol.* 26:1447-1464.
- HEWAVITHARANAGE, P., KARUNARATNE, S., and KUMAR, N. S. 1999. Effect of caffeine on shot hole borer beetle (*Xyleborus fornicatus*) of tea (*Camellia sinensis*). *Phytochemistry* 51:35-41.
- HORMAN, I., and VIANI, R. 1972. The nature and conformation of the caffeine-chlorogenate complex of coffee. *J. Food Sci.* 37:925-927.
- KOGAN, M. 1986. Natural chemicals in plants resistance to insects. *Iowa St. J. Res.* 60:501-527.
- KARBAN, R., and AGRAWAL, A. A. 2002. Herbivore offense. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 33:641-664.
- KY, C. L., LOUARN, J., GUYOT, B., CHARRIER, A., HAMON, S., and NOIROT, M. 1999. Relations between and inheritance of chlorogenic acid contents in an interspecific cross between *Coffea pseudozanguebariae* and *Coffea liberica* var dewevrei. *Theor. Appl. Genet.* 98:628-637.
- NATHANSON, J. A. 1984. Caffeine and related methylxanthines: possible naturally occurring pesticides. *Science* 226:184-187.
- MANN, J. 1987. Secondary metabolism. 2nd ed. Clarendon Press, Oxford.
- MARTIN, R., LILLEY, T. H., FALSHAW, C. P., HASLAM, E., BEGLEY, M. J., and MAGNOLATO, D. 1987. The caffeine-potassium chlorogenate molecular complex. *Phytochemistry* 26:273-279.
- MATIELLO, J. B., ALMEIDA, S. R., QUEIROZ, A. R., AMARAL, A. S., FILHO, S. L., and LOUBACK, A. 2002. Evolução na seleção de material com resistência ao bicho-mineiro (*L. coffeella*) do cafeeiro na Zona da Mata – MG. p. 13, in XXVIII Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Caxambú, MAPA/PROCAFÉ.
- MATIELLO, J. B., ALMEIDA, S. R., SILVA, M. B. da, MIGUEL, A. E., QUEIROZ,

- A., BARROS, U. V., and FREITAS, W. 2001. Evolução na seleção de material com resistência múltipla a bicho-mineiro e ferrugem do cafeeiro. pp. 52-54, *in* XXVII Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Uberaba, PROCAFÉ.
- MATIELLO, J. B., ALMEIDA, S. R., QUEIROZ, A. A., MIGUEL, A. E., SILVA, M. B. da, FERREIRA, R. A., BARROS, U. V., and BARBOSA, C. M. 2000. Siriema 842 material promissor, com resistência múltipla (ferrugem e bicho mineiro) e boa produtividade. pp. 51-52, *in* XXVI Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras e VI Encontro de Cafeicultores de Marília, Marília, PROCAFÉ.
- MAZZAFERA, P., YAMAOKA-YANO, D. M., and VITÓRIA, A. P. 1996. Para que serve a cafeína em plantas? *R. Bras. Fisiol. Veg.* 8:67-74.
- PARRA, J. R. P. 1985. Biologia comparada de *Leucoptera coffeella* (Guérin-Méneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) visando ao seu zoneamento ecológico no Estado de São Paulo. *Rev. Bras. Entomol.* 29:45-76.
- PEREIRA, E. J. G. 2002. Variação sazonal dos fatores de mortalidade natural de *Leucoptera coffeella* em *Coffea arabica*. Msc thesis. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil.
- REIS, P.R., and SOUZA, J.C. de. 1996. Manejo do bicho-mineiro *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Méneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae), e seu reflexo na produção de café. *An. Soc. Entomol. Brasil* 25:77-82.
- REIS, P. R., and SOUZA, J. C. de. 1998. Manejo integrado das pragas do cafeeiro em Minas Gerais. *Inf. Agropec.* 19:17-25.
- REIS JUNIOR., R., LIMA, E. R., VILELA, E. F., and BARROS, R. S. 2000. Method for maintenance of coffee leaves *in vitro* for mass rearing of *Leucoptera coffeellum* (Guérin-Méneville)(Lepidoptera: Lyonetiidae). *An. Soc. Entomol. Brasil* 29:849-854.
- RIZVI, S. J. H., PANDEY, S. K., MUKERJI, D., and MATHUR, S. N. 1980. 1, 3, 7-Trimethylxanthine, a new chemosterilant for stored grain pest - *Callosobruchus chinensis*. *Z. Angew. Entomol.* 90:777-778.
- SOUZA, J. C., REIS, P. R., and RIGITANO, R. L. O. 1998. Bicho-mineiro-do-cafeeiro: biologia, danos e manejo integrado. EPAMIG, Belo Horizonte, (Boletim Técnico 54).
- SAS Institute. 1997. User's guide. Version 6.12. Cary, pp. 1128.
- VIANI, R. 1986. Coffee, A7, pp. 314-339, *in* Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5th ed. VCH Publishers, New York.
- WALLER, G. R., FRIEDMAN, J., CHOU, C-H., SUZUKI, T., and FRIEDMAN, N. 1982. Hazards, benefits, metabolism, and translocation of caffeine in *Coffea arabica*

L. plants and surrounding soil. pp. 239-260, *in* Proceedings Seminar
Allelochemicals Pheromones, Tapei, R.O.C.

Tabela 1. Valores médios (\pm erro padrão da média) das variáveis de desenvolvimento do bicho-mineiro em doze genótipos de cafeeiro.

Genótipos	Tempo médio para eclosão de ovos (dias)	Eclosão de ovos (%)	Tempo de sobrevivência larval (dias)	Mortalidade de larva a adulto (%)
‘Borbom Amarelo’	5,00 \pm 0,00 ^a	100,00 \pm 0,00 ^a	10,53 \pm 0,91 ^a	21,82 \pm 5,07 ^e
‘Catuaí Vermelho’	4,81 \pm 0,20 ^a	92,50 \pm 7,50 ^a	8,90 \pm 0,41 ^a	47,20 \pm 4,31 ^{c, d}
‘Mundo Novo’	5,00 \pm 0,00 ^a	97,50 \pm 2,50 ^a	10,50 \pm 0,95 ^a	31,29 \pm 8,46 ^{d, e}
‘Oeiras’	4,94 \pm 0,06 ^a	92,50 \pm 4,79 ^a	9,50 \pm 1,31 ^a	51,39 \pm 9,45 ^c
‘Topázio’	5,00 \pm 0,00 ^a	94,44 \pm 5,56 ^a	10,60 \pm 0,94 ^a	31,07 \pm 8,38 ^{d, e}
‘Robusta’	4,74 \pm 0,19 ^a	90,45 \pm 5,52 ^a	3,08 \pm 0,17 ^{b, c}	100,00 \pm 0,00 ^a
<i>C. racemosa</i>	5,03 \pm 0,03 ^a	97,50 \pm 2,50 ^a	2,03 \pm 0,06 ^c	100,00 \pm 0,00 ^a
Híbrido 1	4,75 \pm 0,25 ^a	75,91 \pm 8,17 ^b	1,58 \pm 0,25 ^c	100,00 \pm 0,00 ^a
Híbrido 2	4,89 \pm 0,11 ^a	92,50 \pm 4,79 ^a	4,78 \pm 0,92 ^b	94,38 \pm 3,29 ^b
Híbrido 3	5,08 \pm 0,08 ^a	95,00 \pm 2,89 ^a	1,45 \pm 0,18 ^c	100,00 \pm 0,00 ^a
Híbrido 4	5,03 \pm 0,03 ^a	100,00 \pm 0,00 ^a	1,48 \pm 0,28 ^c	100,00 \pm 0,00 ^a
Híbrido Timor	4,75 \pm 0,25 ^a	100,00 \pm 0,00 ^a	10,98 \pm 1,05 ^a	26,59 \pm 4,02 ^e

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não foram significativas pelo teste das diferenças mínimas significativas (LSD) de Fisher ($P < 0,05$).

Tabela 2. Eixos canônicos e coeficientes (agrupados na estrutura canônica) das variáveis de desenvolvimento do bicho-mineiro analisados em relação aos genótipos de cafeeiro.

Variáveis	Eixos Canônicos			
	1	2	3	4
Tempo de médio de eclosão	0,11	0,7	-0,28	0,73
Duração larval	0,37	0,04	0,88	0,44
Eclosão de ovos	0,08	0,95	0,26	-0,36
Mortalidade de larva a adulto	-0,84	0,09	0,56	0,25
F	6,06	1,23	0,58	0,39
Graus de liberdade(num./den.)	44 / 128,20	30 / 100,47	18 / 70	8 / 36
<i>P</i>	< 0,0001	0,22	0,9	0,92
Corr. Canônica ao quadrado	0,97	0,47	0,18	0,08

Tabela 3. Valores médios (\pm erro padrão da média) das determinações foliares de cafeína e derivados em doze genótipos de cafeeiro ($\mu\text{g/g}$ de peso seco).

Genótipos	Acido Clorogênico	Cafeína	7-metilxantina	Xantina	Teobromina
‘Borbom Amarelo’	914,92 \pm 266,32 ^a	767,38 \pm 228,28 ^d	4,12 \pm 4,12 ^c	4,00 \pm 1,40 ^{a,b}	101,16 \pm 55,42 ^b
‘Catuaí Vermelho’	1214,24 \pm 347,1 ^a	1252,62 \pm 93,96 ^{a,b}	6,36 \pm 6,36 ^{a,b}	4,38 \pm 2,00 ^{a,b}	9,92 \pm 7,80 ^b
‘Mundo Novo’	768,98 \pm 220,70 ^a	900,40 \pm 198,86 ^{c,d}	0,00 \pm 0,00 ^b	3,96 \pm 1,24 ^{a,b}	25,64 \pm 13,14 ^b
‘Oeiras’	920,12 \pm 250,58 ^a	1115,36 \pm 62,66 ^{b,c}	5,30 \pm 2,80 ^b	4,74 \pm 0,20 ^{a,b}	12,74 \pm 5,98 ^b
‘Topázio’	1205,36 \pm 207,4 ^a	1068,56 \pm 98,96 ^{c,d}	16,52 \pm 9,08 ^{a,b}	5,26 \pm 0,54 ^{a,b}	7,80 \pm 4,38 ^b
‘Robusta’	692,38 \pm 194,08 ^a	1486,04 \pm 94,50 ^a	1,80 \pm 1,80 ^b	2,42 \pm 0,22 ^b	85,60 \pm 70,60 ^b
<i>C. racemosa</i>	914,56 \pm 284,12 ^a	25,40 \pm 11,06 ^c	6,68 \pm 6,38 ^b	3,58 \pm 1,38 ^{a,b}	1,00 \pm 1,00 ^b
Híbrido 1	1054,7 \pm 322,04 ^a	22,26 \pm 11,08 ^c	0,00 \pm 0,00 ^b	3,06 \pm 0,78 ^{a,b}	113,78 \pm 108,42 ^b
Híbrido 2	717,98 \pm 173,98 ^a	68,38 \pm 55,20 ^e	13,44 \pm 5,20 ^{a,b}	5,48 \pm 0,72 ^{a,b}	4,58 \pm 4,58 ^b
Híbrido 3	1025,36 \pm 321,0 ^a	104,90 \pm 32,98 ^e	6,04 \pm 6,04 ^b	4,28 \pm 1,28 ^{a,b}	46,10 \pm 39,48 ^b
Híbrido 4	483,32 \pm 211,42 ^a	338,80 \pm 40,02 ^e	4,70 \pm 4,70 ^b	4,68 \pm 0,26 ^{a,b}	39,46 \pm 19,86 ^b
Híbrido Timor	1163,42 \pm 226,5 ^a	3,08 \pm 3,08 ^e	25,60 \pm 7,44 ^a	6,16 \pm 1,34 ^a	503,88 \pm 63,68 ^a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não foram significativas pelo teste das diferenças mínimas significativas (LSD) de Fisher ($P < 0,05$).

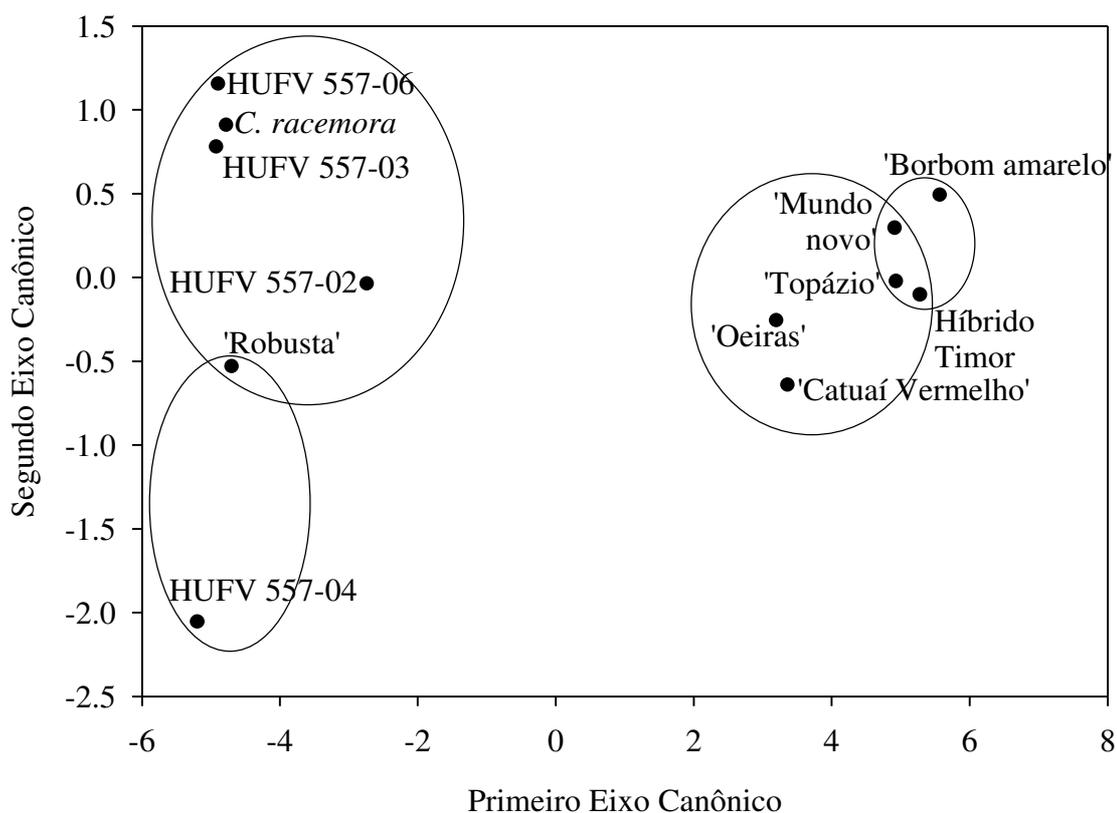


Figura 1. Diagrama de ordenação mostrando a discriminação entre genótipos de cafeeiros quanto às diferenças nos parâmetros de desenvolvimento biológico do bicho-mineiro analisados. Os símbolos são centróides de tratamentos e representam a média das classes de variáveis canônicas. Círculos largos indicam grupos de tratamentos sem diferença significativa entre eles (teste de F aproximado, $P < 0,05$) baseado na distância de Mahalanobis (D^2) entre médias.

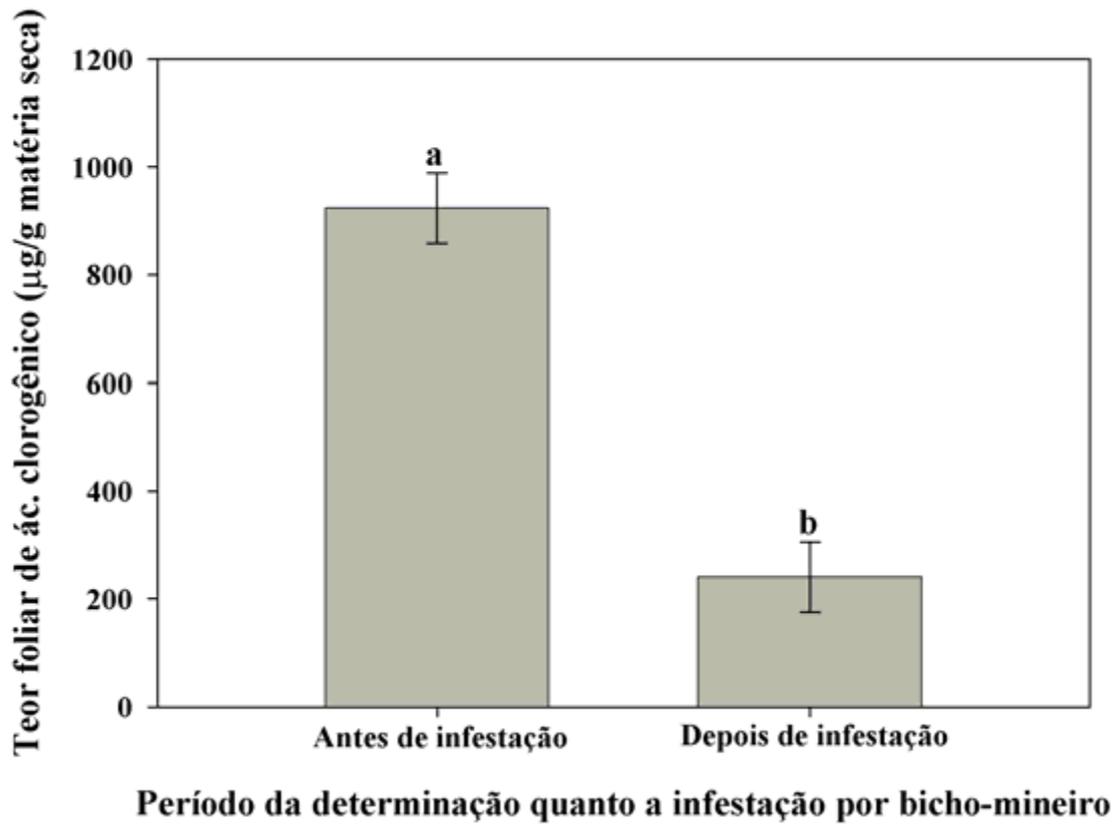


Figura 2. Teores foliares de ácido clorogênico (\pm erro padrão da média) em genótipos de cafeeiro antes e sete dias após infestação por bicho-mineiro. Barras com mesma letra minúscula não se diferem significativamente pelo teste de t ($gl = 22$; $t = 7,39$; $p < 0,05$).

VOLÁTEIS FOLIÁRES DE CAFEEIROS NA INTERAÇÃO COM BICHO-MINEIRO

RESUMO

O presente trabalho investiga a existência de fitoquímicos voláteis nas folhas de genótipos de cafeeiros que atuam como mediadores da interação com o bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*), influenciando no comportamento de escolha para a oviposição desta espécie-praga. Testes de oviposição em laboratório com o bicho-mineiro foram realizados com doze genótipos de cafeeiro com variados níveis de resistência. Extratos dos compostos voláteis liberados por estes genótipos de cafeeiro foram coletados no campo e analisados por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas e ao eletroantenógrafo. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variáveis canônicas para ordenação e agrupamento de genótipo baseado na constituição de voláteis liberados por eles que acarretavam estímulo nos quimiorreceptores antenais do bicho-mineiro. Esses voláteis foram também correlacionados, através de correlação canônica (parcial), com a postura do bicho-mineiro nos diferentes genótipos de cafeeiro sujeitos a teste de livre escolha. Observou-se que *p-cimeno* correlacionava positiva e significativamente com a oviposição pelo bicho-mineiro e que *trans-β-ocimeno* correlacionava negativa e significativamente com esta mesma variável. A atividade biológica do *p-cimeno* foi confirmada em testes de olfatômetro em quatro vias com o bicho-mineiro, sendo verificada uma preferência significativa para as vias que possuíam este produto, caracterizando-o como mediador químico da interação entre bicho-mineiro e genótipos de cafeeiro.

ABSTRACT

The present work investigates the existence of volatile fitochemicals in leaves of coffee genotypes that act as mediators of their interaction with the coffee leaf miner (*Leucoptera coffeella*) influencing its egg laying behavior. Oviposition free-choice tests were carried out in laboratory using twelve coffee genotypes. Extracts of volatile compounds released by these coffee genotypes were field collected and analyzed by chromatography (and mass spectre) and electroantennography. The data obtained were subjected to canonical variate analysis for coffee genotype ordination and grouping based on their released volatiles with activity on antennal chemoreceptors of the coffee leaf miner. These volatiles were also correlated, through (partial) canonical correlation, to oviposition by the coffee leaf miner in free-choice tests. The compound *p*-cymene was positively and significantly correlated with leaf miner oviposition and trans- β -ocimene was negatively and significantly correlated with the same variable. The biological activity of *p*-cymene was confirmed in tests with a four-arms olfactometer where the coffee leaf miner showed significant preference to the arms containing this compound, providing evidence of its role as chemical mediator of the interaction between coffee genotypes and the coffee leaf miner.

INTRODUÇÃO

Insetos herbívoros freqüentemente interagem com plantas por semioquímicos voláteis, particularmente na localização de hospedeiros apropriados para a alimentação ou oviposição. Essas interações são mediadas por células olfatórias altamente específicas que detectam componentes inequívocos de plantas hospedeiras e não hospedeiras (Barata, 2000). Além destes sinais químicos que mediam esta interação, existem sinais físicos e morfológicos que atuam significativamente (Lara, 1986; Bernays e Chapman, 1991). A intensidade da cor verde das folhas de plantas hospedeiras parece influenciar na preferência de oviposição em insetos (Cardenas, 1981). Portanto, o comportamento de seleção de hospedeiros é uma expressão neural de processos modificados por fatores fisiológicos e ambientais (Bernays, 2001).

O bicho-mineiro, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae), é um dos principais problemas fitossanitários na produção de café (Guerreiro Filho et al., 1999). Este inseto, durante a sua fase larval, alimenta-se do mesófilo foliar e provoca uma redução da área fotossintética e queda prematura das folhas, causando prejuízo na produção de café superior a 50 % (Reis e Souza, 1996, 1998; Fragoso, 2000). Assim o bicho-mineiro tem sido considerado praga-chave da cafeicultura na maioria das regiões produtoras, devido a sérios prejuízos econômicos causados (Souza et al., 1998). Esse tipo de fitofagia, presente em muitos insetos holometábolos, constitui vantagens adaptativas em relação a outras pragas como redução dos riscos por dessecação e minimização das dificuldades de conexão à planta (Bernays e Chapman, 1994).

Existem alguns trabalhos de melhoramento genético que evidenciam a busca de genótipos de cafeeiros com níveis de resistência mais elevados ao bicho-mineiro, utilizando genes de *Coffea racemosa* e outras espécies de cafeeiros que são resistentes a esta praga (Almeida et al., 2003; Guerreiro Filho et al., 1999; Guerreiro Filho e Mazzafera, 2000; Matiello et al., 2000, 2001 e 2002). Apesar disso, pouco se conhece sobre as interações inseto/planta e mecanismos responsáveis pela resistência destes genótipos de cafeeiro ao bicho-mineiro. Esta informação poderia beneficiar muito os programas de melhoramento que visam a obtenção de cafeeiros resistentes ao bicho-mineiro (Kogan, 1986).

Existem genótipos de cafeeiro que são mais preferidos pelo bicho-mineiro para a oviposição em detrimento de outros. Folhas mais escuras de espécies e híbridos de *Coffea* spp. são mais utilizadas para a oviposição do bicho-mineiro do que folhas mais

claras (Cardenas, 1981). Portanto, o bicho-mineiro deve possuir mecanismo fisiológico de detecção de sinais que codificam estes cafeeiros como sendo os melhores para o seu desenvolvimento.

Neste trabalho, pretende-se explicar por que o bicho-mineiro tem preferência para ovipositar em genótipos suscetíveis de cafeeiro, testando a hipótese de que existem fitoquímicos voláteis nas folhas desses genótipos que atuam como mediadores da interação entre o bicho-mineiro e o cafeeiro, influenciando o seu comportamento de escolha para a oviposição.

MATERIAL E MÉTODOS

Material genético e reagentes

As folhas dos genótipos de cafeeiro com diferentes níveis de resistência ao bicho-mineiro foram obtidas do viveiro de café do Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. Essas folhas foram coletadas de genótipos em fase de produção com mais de 7 anos de idade, durante o período do verão de 2002. Os genótipos utilizados foram: *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho IAC 99 (UFV 2147 c 48 EL7), *C. arabica* cv. Mundo Novo IAC 376-4-32 (UFV 2150 c 40 EL8), *C. arabica* cv. Topázio (MG 1190 c 133), *C. arabica* cv. Borbom Amarelo (UFV 2952 C-146 c 17), *C. arabica* cv. Oeiras MG 6851 (UFV 2983 c 303), *C. canephora* cv. Robusta (UFV T3580 (1-2) c 171), *C. arabica* cv. Híbrido de Timor CIFC 2570 (UFV 447-49 CAS), *C. racemosa* (UFV 545 c 28), e quatro híbridos triplóides resultantes do cruzamento natural entre *C. racemosa* (UFV 544) e *C. arabica*: Híbrido UFV 557-04, Híbrido UFV 557-02, Híbrido UFV 557-03 e Híbrido UFV 557-06.

O padrão aleloquímico utilizado foi o *p*-cimeno (1-metil-4-isopropil-benzeno), 99%, da Aldrich (C121452-25 ml).

Criação do bicho-mineiro

Folhas minadas contendo larvas de *L. coffeella* foram coletadas semanalmente em plantações *C. arabica* cv. Mundo Novo e Catuaí Vermelho e Catuaí Amarelo, e foram colocadas em placas do tipo 'gerbox' contendo uma solução aquosa com benziladenina, na concentração de 10^{-6} M (Reis Júnior et al., 2000). Quando as larvas passaram para o estágio de pupa, estas foram transferidas para tubos fechados, onde ficaram até a emergência dos adultos, os quais foram utilizados nos experimentos.

Preparo do adsorvente para coleta de voláteis de folhas de cafeeiro

O adsorvente utilizado para a coleta de substâncias voláteis de folhas de cafeeiro foi o Tenax[®]-TA 60/80, um polímero poroso formado por óxido de 2,6-difenilfenileno (Alltech). Este foi pesado na quantidade aproximada de 5 mg e acondicionado entre duas pequenas quantidades de lã de vidro, na região de constrição da pipeta de Pasteur. Em seguida, dois ml da solução de pentano/eter dietílico (4:1) foi passada dentro dessas pipetas para extração das substâncias já retidas neste adsorvente. As pipetas foram então submetidas a tratamento térmico a 200°C, por uma hora, sobre uma chapa aquecedora com a passagem de gás nitrogênio. Após este tempo, essas pipetas com o adsorvente foram lacradas com fita de teflon para serem utilizadas posteriormente (Kant et al., 2004).

Coleta e extração de voláteis dos genótipos de cafeeiro

Dois a quatro ramos de cada genótipos de cafeeiro foram acondicionados dentro de três frascos de vidro de 15 cm de diâmetro por 40 cm de comprimento, contendo no centro da base um orifício do diâmetro da pipeta de Pasteur. Os frascos foram pendurados em tripés de bambu e ocluídos com uma placa de vidro redonda com dois a quatro reentrâncias na sua margem, por onde passavam os ramos do cafeeiro e que também continham um orifício no centro do mesmo diâmetro do anterior. Estes frascos com as placas foram lacrados com fita de teflon, conforme figura 1.

Para a coleta das substâncias voláteis, pipetas Pasteur contendo Tenax foram introduzidas nos orifícios das tampas e nas bases dos frascos de vidro e foram vedadas com fita de teflon. Mangueiras de plástico foram conectadas às pipetas situadas na base dos vidros e unidas por pequeno tubo de vidro em forma de forquilha (com três entradas e uma saída). Na saída do tubo de vidro foi conectada uma bomba de vácuo, através de uma mangueira de plástico. Desta forma, o ar ao redor dos ramos do cafeeiro foi purificado ao passar pela primeira pipeta e conduziu as substâncias voláteis para a segunda pipeta Pasteur onde estas foram adsorvidas, durante o período de 24 horas (figura 1). Para determinar os possíveis contaminantes deste sistema foi utilizado outro frasco tampado, lacrado e conectado da mesma forma descrita acima, porém sem os ramos dos cafeeiro, constituindo o controle para o sistema. Foram feitas quatro coletas de substâncias voláteis para o controle.

Após as 24 horas de extração, as pipetas foram retiradas e vedadas com fita de teflon. As substâncias voláteis dos genótipos de cafeeiro foram extraídas do adsorvente pela passagem de aproximadamente 100 µL de solução de pentano/eter dietílico (4:1)

dentro das pipetas. O extrato foi armazenado no freezer (-10°C) para análises posteriores.

Identificação de voláteis de genótipos de cafeeiro

O extrato coletado foi injetado em cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG/EM) da Shimadzu, modelo GCMS-QP5050A, que continha um coluna DB-1 da J&W Scientific de 30m de comprimento por 0,25mm de diâmetro interno por 0,25 µm de espessura do filme da fase estacionária. As condições cromatográficas de análise foram: o modo de injeção *splitless*, pressão na cabeça da coluna de 100 KPa, gás carreador hélio, fluxo do gás carreador inicial de 0,8 ml/min., temperatura inicial de 40°C, por 2,0 min, com uma rampa de 3,0°C/min. até 240°C permanecendo nesta temperatura por 1,33 minutos. A temperatura do injetor foi ajustada para 220°C e a da interface para 240°C. As condições do espectrômetro de massa foram: corte do solvente durante 2,0 min., modo de aquisição varredura das massas de 40-350 unidades.

Os espectros de massas obtidos pelo CG/SM foram comparados com os espectros de massas da biblioteca deste aparelho (Wiley 229.000), sendo determinados os compostos com maior índice de similaridade. Com os tempos de retenção destes compostos, bem como dos padrões de hidrocarbonetos (C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22 e C24), foram calculados os Índices de Kowat's (I), conforme fórmula abaixo. A partir destas informações identificou-se o composto com maior índice de similaridade e que possuía índice de Kowat's mais próximo dos índices de Kowat's tabelados por Adams (1995) e Davies (1990).

$$I = 100 * z + 100 * ((\log t'_{Rx} - \log t'_{Rz}) / (\log t'_{R(z+1)} - \log t'_{Rz}))$$

onde:

I = número hipotético, que é igual ao número de átomos de carbono de um alcano saturado de cadeia normal, que tem o mesmo tempo de retenção ajustado (t'_R) que o composto cujo índice está sendo determinado;

z = número de carbonos de um alcano saturado normal;

t'_{Rx} = tempo de retenção ajustado do composto x;

t'_{Rz} e $t'_{R(z+1)}$ = tempos de retenção ajustados de alcanos de cadeia normal, sendo que t'_{Rx} é intermediário a t'_{Rz} e $t'_{R(z+1)}$ (Bonato, 1997);

Identificação dos compostos voláteis de cafeeiro com atividade biológica

O extrato coletado foi injetado em cromatógrafo a gás da Shimadzu modelo GC-17A com detector de ionização de chama. Utilizou-se uma coluna DB1 de J&W

Scientific de 30m de comprimento por 0,25mm de diâmetro interno por 0,25 µm de espessura do filme da fase estacionária. As condições cromatográficas de análise foram: o modo de injeção 'splitless', pressão na cabeça da coluna 115 KPa, gás carreador nitrogênio, fluxo do gás de arraste inicial 0,8 ml/min., temperatura inicial 40°C, ficando por 2,0 min, com uma rampa de 3,0°C/min. até 240°C permanecendo nesta temperatura por 1,33 min. A temperatura do injetor foi ajustada para 220°C e a do detector para 240°C.

Esse cromatógrafo estava acoplado a um eletroanténógrafo com um micromanipulador da Syntech tipo MP-12, onde a antena do bicho-mineiro conectava os eletrodos por meio de microcapilares contendo uma solução de 1,0 N de KOH. A cada duas injeções de amostras era substituída a antena. A temperatura da interface estava ajustada para 240°C e o fluxo de ar conduzindo os voláteis até a antena era de 425 ml/min. Desta forma foi possível determinar os picos de substâncias voláteis contidas nas amostras dos genótipos de cafeeiros que apresentavam resposta biológica através da coincidência destes nos cromatogramas do CG/EAG. Por fim, através de comparações entre os cromatogramas do CG/EAG e as correntes totais de íons fornecidos pelo CG/EM, procedeu-se à identificação química desses picos que apresentavam atividade biológica.

Avaliação da preferência para a oviposição do bicho-mineiro

O pecíolo das folhas dos genótipos de cafeeiro foi imerso em um pequeno tubo de 8,0 cm de altura por 3,0 cm de diâmetro, contendo solução aquosa com benziladenina, e fechados com tampa que permitia a passagem do pecíolo. Em seguida, foram colocados dentro de gaiolas teladas com organza (40 x 40 x 40 cm), contendo adultos (20 machos e 20 fêmeas) recém-emergidos. Após 24 horas de exposição, o número de ovos foi contado, com a ajuda de lupa estereoscópica (aumento de 15 a 20 vezes). Este procedimento foi realizado dezesseis vezes.

Bioensaios de olfatômetro

A atividade biológica do *p*-cimeno foi testada em fêmeas virgens, fêmeas acasaladas e em machos virgens, utilizando olfatômetro de acrílico com quatro vias de entrada e uma via central telada de saída do fluxo de ar. As vias de entrada foram conectadas a erlenmeyers. Duas vias continham somente algumas gotas de água e nas outras duas os erlenmeyers continham 20 µl de uma solução de *p*-cimeno diluído em pentano:eter dietílico (4:1) na concentração de 10 µl/ml. Esses erlenmeyers foram

conectados de modo alternado. Desta forma, os insetos foram colocados dentro dessa câmara, sobre a via central telada, e tiveram oportunidade de escolha para vias com o *p*-cimeno e para vias do controle (i.e., sem *p*-cimeno). Testes em branco foram realizados para testar a imparcialidade dessa câmara.

Análise estatística

As áreas dos picos das substâncias voláteis com atividade biológica foram submetidas à análise de variáveis canônicas (CVA), utilizando-se o procedimento PROC CANDISC (SAS, 1997), para determinar os coeficientes de ponderação das variáveis e para verificar possíveis agrupamentos lineares das variáveis analisadas com os genótipos de cafeeiro, com base na significância das distâncias de Mahalanobis (D^2) entre médias. Em seguida, esses dados foram submetidos à correlação canônica, utilizando-se o procedimento PROC CANCORR (SAS, 1997), para determinar os coeficientes e correlações canônicas entre o grupo de variáveis compostas pelos fitoquímicos (voláteis e biologicamente ativos) com a variável número de ovos depositados por genótipo no teste sem chance de escolha. Finalmente, testou-se a significância da preferência do bicho-mineiro em relação ao *p*-cimeno, utilizando o teste-G para dados obtidos no experimento com o olfatômetro (Sokal & Rohlf, 2003).

RESULTADOS

Identificação de voláteis e similaridade de genótipos

A partir do resultado das injeções no CG/EAG, e no CG/EM, seis picos foram selecionados por desencadarem resposta biológica (pico 1, pico 5, pico 7, pico 21, pico 22 e pico 29) e identificados, respectivamente como sendo: decanal, (*E*)-3,7-dimetil-1,3,6-octatrieno (β -Ocimeno), (*E,E*)-3,7,11-trimetil-1,3,6,10-dodecatetraeno ((*E,E*)- α -farneseno), 1-metil-4-isopropilbenzeno (*p*-cimeno), dodecano, 2-metilnonano, conforme as FIG. 1, 2 e 3. A análise de variância multivariada para os diferentes genótipos, baseada nas áreas dos picos identificados no CG/EM que apresentaram atividade biológica, indicou diferenças estatísticas significativas (Wilks' lambda = $8,514 \times 10^{-11}$; $F = 115,95$; graus de liberdade (Nun. / Den.) = 66 / 101,77; $p < 0,0001$). Subseqüente análise de variância univariada mostrou que a área dos fitoquímicos voláteis apresentou diferenças significativas em relação aos genótipos analisados (Tabela 1).

Análise de variáveis canônicas conduzidas em complementação à análise de variância multivariada resultou em seis eixos canônicos, sendo todos significativos ($p <$

0,05; Tabela 2), com a exceção do sexto eixo. O primeiro eixo canônico respondeu por 95,11% da variância total explicada. A área do fitoquímico volátil com o maior coeficiente canônico absoluto (agrupados na estrutura canônica) e, portanto, que mais colaborou para a divergência entre os genótipos foi o 2-metilnonano (primeiro eixo), seguido por *p*-cimeno e dodecano (eixos 2 e 3) e trans- β -ocimeno (eixos 4 e 5) (Tabela 2).

O diagrama de ordenação derivada da análise de variáveis canônicas foi feito para o primeiro e o segundo eixos, bem como para o primeiro e o terceiro eixo canônico, que explicaram mais de 98% da variância total dos dados. Dois grupos de genótipos foram gerados mediante este procedimento. A maioria dos genótipos mostrou diferenças significativas entre si no que se refere aos voláteis considerados. As exceções foram os genótipos Oeiras e Catuaí Vermelho, que não se diferiram, e Híbrido 1 com Borbom Amarelo e Topázio, que também não diferiram entre si (figura 5).

Preferência para postura

Os resultados do teste de preferência para a postura do bicho-mineiro nos genótipos de cafeeiro estão apresentados na Tabela 1. Verificou-se que houve uma maior postura nos genótipos Borbom Amarelo, Catuaí Vermelho, Mundo Novo, Oeiras, Topázio, Robusta, que diferenciaram significativamente de *C. racemosa*, Híbrido 1, Híbrido 2, Híbrido 3. O Híbrido 4 e o Híbrido de Timor mostraram resultados intermediários aos destes dois grupos.

Relação entre voláteis do cafeeiro e postura do bicho-mineiro

As áreas dos picos dos diferentes fitoquímicos que apresentaram resposta biológica na antena do bicho-mineiro foram correlacionados com os dados de postura do inseto usando análise de correlação canônica (parcial). O objetivo foi identificar o fitoquímico com maior potencial mediador da interação entre bicho-mineiro (através de sua postura) e cafeeiro (através de determinações em diferentes genótipos com variados níveis de resistência a esta espécie). Os resultados obtidos salientam a relevância do *p*-cimeno como mediador potencial, pois este fitoquímico apresentou alto coeficiente (e correlação) no par canônico gerado (Tabela 3). A análise de correlação entre a área do *p*-cimeno e postura de bicho-mineiro nos genótipos foi elevada e positiva ($r = 0,58$; $p = 0,04$). Por outro lado, o trans- β -ocimeno parece atuar como mediador potencial desta interação, pois este fitoquímico também apresentou alto coeficiente (e correlação) no par canônico gerado (Tabela 3). A análise de correlação entre a área do trans- β -ocimeno

e a postura do bicho-mineiro nos genótipos foi elevada e negativa ($r = -0,68$; $p = 0,01$).

Efeito do p-cimeno na aproximação do bicho-mineiro

A partir da possível relevância do *p*-cimeno como mediador potencial da postura do bicho-mineiro baseado na análise de correlação canônica (parcial), foi conduzido bioensaio com o *p*-cimeno no olfatômetro utilizando fêmeas virgens, fêmeas acasaladas e machos do bicho-mineiro. Apenas fêmeas virgens do bicho-mineiro apresentaram preferência significativa ($p < 0,05$) em relação ao *p*-cimeno, baseado no Teste G (figura 6). Os resultados obtidos possibilitaram a confirmação da relevância do *p*-cimeno como mediador de aproximação, favorecendo a postura do bicho-mineiro.

DISCUSSÃO

A partir da constatação estatística de que o bicho-mineiro oviposita mais nos genótipos suscetíveis de cafeeiro ('Borbom Amarelo', 'Catuaí Vermelho', 'Mundo Novo', 'Oeiras', 'Topázio', 'Robusta' e Híbrido Timor) em relação aos genótipos resistentes (*C. racemosa*, Híbrido UFV 557-04, Híbrido UFV 557-02, Híbrido UFV 557-03 e Híbrido UFV 557-06), testou-se a hipótese explicativa de que devem existir fitoquímicos voláteis nas folhas desses genótipos de cafeeiros que atuam como mediadores da interação entre o bicho-mineiro e o cafeeiro, influenciando o seu comportamento de escolha para a oviposição.

Os extratos dos compostos voláteis dos cafeeiros foram analisados no CG/EAD e no CG/EM, usando as mesmas condições de análises com a exceção da pressão do gás de arraste no injetor do aparelho. Na análise do CG/EAD foi ajustado em 115 KPa e na análise do CG/EM foi ajustado em 100 KPa, para que o fluxo do gás de arraste na temperatura inicial dos dois aparelhos fosse igual a 0,8 ml/min. Caso fosse ajustada a mesma pressão do gás de arraste no injetor do aparelho, o fluxo de gás de arraste inicial seria de 1,3 ml/min no CG/EAD e 0,8 no CG/EM, levando a diferenças nos tempos de retenção das análises. Entretanto, não foi possível obter o mesmo tempo de retenção dos picos das amostras nas análises acima mencionadas. Para determinar quais os picos na corrente total de íons das amostras analisadas no CG/EM que apresentaram resposta biológica no CG/EAG (FIG. 2, 3 e 4) foram feitas comparações entre os resultados dessas análises tomando como base picos de referência dos cromatogramas. Desta forma, foram identificados picos dos compostos que apresentaram resposta biológica na

antena do bicho-mineiro.

A relevância do *p*-cimeno e do trans- β -ocimeno como possíveis mediadores desta interação foi evidenciada após as análises estatísticas dos dados. As razões de preferência de fêmeas virgens do bicho-mineiro em relação ao branco e ao *p*-cimeno (figura 6) confirmam a relevância deste composto como mediador de aproximação, favorecendo a escolha de hospedeiros para o bicho-mineiro.

Um conjunto de sinais determina a escolha do substrato de oviposição. Estes sinais são detectados a distâncias razoáveis por estes insetos herbívoros através de compostos voláteis e atributos visuais (forma, tamanho e cor) da folha do hospedeiro, bem como através de atributos da superfície da folha (físicos e químicos) (Bernays e Chapman, 1994).

Fitoquímicos voláteis e não voláteis parecem ser de grande importância para a rápida identificação de hospedeiros de insetos herbívoros especialistas, evitando os riscos ambientais, principalmente inimigos naturais (Bernays, 2001). Assim, o bicho-mineiro utiliza fitoquímicos característicos para a identificação de cafeeiros adequados, provavelmente para maximizar o desenvolvimento da sua progênie. Dentre estes fitoquímicos, destaca-se o *p*-cimeno, encontrado em cafeeiros susceptíveis e que atua como mediador desta interação, favorecendo a atração e a identificação de hospedeiros adequados ao seu desenvolvimento.

Existem relatos de que o *p*-cimeno é um bom atraente para machos e fêmeas de *Ceratitidis capitata* (Hernandez et al., 2001; Casana et al., 2001). Entretanto, é tóxico para fêmeas (adultos e larvas) de *Frankliniella occidentalis* (Janmaat et al., 2002) e adultos de *Callosobruchus maculatus* (Veena et al., 2001).

No conjunto de fitoquímicos característicos para a identificação de cafeeiros adequados estão compostos que atuam como deterrentes de oviposição (Bernays e Chapman, 1994). Dentre estes fitoquímicos se destaca o trans- β -ocimeno, encontrado em alguns genótipos de cafeeiros resistentes e que pode ter algum papel biológico como repelente ou deterrente de oviposição. Este terpeno foi identificado em *Pinus pinaster* (Pinaceae), como possível sinal químico para o broqueador de madeira *Phoracantha semipunctata* rejeitar esta espécie de planta como hospedeira (Barata et al., 2000).

Fatores diversos parecem estar envolvidos na mediação das interações entre o cafeeiro e o bicho-mineiro. Dentre estes fatores, o *p*-cimeno e o trans- β -ocimeno, parecem ser importantes. Este conhecimento deve ser aprofundado tendo em vista sua repercussão em programas de melhoramento para a obtenção de cafeeiros resistentes ao bicho-mineiro.

Agradecimentos: - Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais e ao Consórcio Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento do Café pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA, 1995, 469p.
- ALMEIDA, S. R., MATIELLO, J. B., SILVA, M. B., FERREIRA, R. A., and CARVALHO, C. H. S. 2003. Melhoramento de café arábica visando a obtenção de plantas com resistência ao bicho-mineiro e à ferrugem. p. 240, *in* III Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil e Workshop Internacional de Café & Saúde, Porto Seguro, EMBRAPA-Café.
- BARATA, E. N., PICKETT, J. A., WADHAMS, L. J., WOODCOCK, C. M., and MUSTAPARTA, H. 2000. Identification of host and nonhost semiochemicals of eucalyptus woodborer *Phoracantha semipunctata* by gas chromatography-electroantennography. *J. Chem. Ecol.* 2618: 1877-1895.
- BERNAYS, E. A., and CHAPMAN, R. F. 1994. Host-plant selection by phytophagous insects. Chapman & Hall, New York.
- BERNAYS, E. A. 2001. Neural limitations in phytophagous insects: Implications for diet breadth and evolution of host affiliation. *Annu. Rev. Entomol.* 46: 703-727.
- BONATO, P. S. 1997. Cromatografia gasosa, pp. 143-183, *in* C. H. Collins, G. L. BRAGA and P. S. BONATO (eds.). Introdução a métodos cromatográficos, 7th ed. Unicamp, Campinas.
- CASANA, G. V., GANDIA, B. A., HERNANDEZ, A. M.M., MENGOD, P. C., GARRIDO, V. A., PRIMO, M. J., and PRIMO, Y. E. 2001. Attractiveness of 79 compounds and mixtures to wild *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in field trials. *J. Econ. Entomol.* 94: 898-904.
- CARDENAS, R. M. 1981. Caracterización hito-morfológica de daño del minador de la hoja, *Leucoptera coffeella* em espécies e híbridos de *Coffea spp.* y observaciones sobre resistencia. MSc dissertation. U.N.C. Bogotá, Colômbia.
- DAVIES, N. W. 1990. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes on

- methyl silicone and carbowax 20M phases. *J. Chrom.* 503:1-24.
- FRAGOSO, D. B., GUEDES, R. N. C., and LADEIRA, J. A. 2003. Seleção na evolução de resistência a organofosforados em *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville)(Lepidoptera: Lyonetiidae). *Neotrop. Entomol.* 32:329-334.
- GUERREIRO FILHO, O., SILVAROLLA, M. B., and ESKES, A. B. 1999. Expression and mode of inheritance of resistance in coffee to leaf miner *Perileucoptera coffeella*. *Euphytica* 105:7-15.
- HERNANDEZ, S. G., SANZ, B. I., CASANA, G. V., and PRIMO. Y. E. 2001. Attractiveness for *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Dipt., Tephritidae) of mango (*Mangifera indica*, cv. Tommy Atkins) airborne terpenes. *J. Appl. Entomol.* 125: 189-192.
- JANMAAT, A. F., KOGEL, W. J., WOLTERING, E. J., and KOGEL, W. J. 2002. Enhanced fumigant toxicity of *p*-cymene against *Frankliniella occidentalis* by simultaneous application of elevated levels of carbon dioxide. *Pest Management Sci.*58:167-173.
- KANT, M. R., AMENT, K., SABELIS, M. W., HARING, M. A., and Schuurink, R. C. 2004. Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants. *Plant Physiol.* 135:483-495.
- MATIELLO, J. B., ALMEIDA, S. R., QUEIROZ, A. R., AMARAL, A. S., FILHO, S. L., and LOUBACK, A. 2002. Evolução na seleção de material com resistência ao bicho-mineiro (*L. coffeella*) do cafeeiro na Zona da Mata – MG. p. 13, in XXVIII Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Caxambú, MAPA/PROCAFÉ.
- MATIELLO, J. B., ALMEIDA, S. R., SILVA, M. B. da, MIGUEL, A. E., QUEIROZ, A., BARROS, U. V., and FREITAS, W. 2001. Evolução na seleção de material com resistência múltipla a bicho-mineiro e ferrugem do cafeeiro. pp. 52-54, in XXVII Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Uberaba, PROCAFÉ.
- MATIELLO, J. B., ALMEIDA, S. R., QUEIROZ, A. A., MIGUEL, A. E., SILVA, M. B. da, FERREIRA, R. A., BARROS, U. V., and BARBOSA, C. M. 2000. Siriema 842 material promissor, com resistência múltipla (ferrugem e bicho mineiro) e boa produtividade. pp. 51-52, in XXVI Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras e VI Encontro de Cafeicultores de Marília, Marília, PROCAFÉ.
- REIS, P. R., and SOUZA, J. C. de. 1996. Manejo do bicho-mineiro *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae), e seu reflexo na produção de café. *An. Soc. Entomol. Brasil* 25:77-82.
- REIS, P. R., and SOUZA, J. C. de. 1998. Manejo integrado das pragas do cafeeiro em

Minas Gerais. *Inf. Agropec.* 19:17-25.

SOKAL, R. R., and ROHLF, F. J. Biometry: The principles and practice of statistics in biological research. 3a. Ed. W.H. Freeman and Company, New York, p. 887, 2003.

SOUZA, J. C., REIS, P. R., and RIGITANO, R. L. O. 1998. Bicho-mineiro-do-cafeeiro: biologia, danos e manejo integrado. EPAMIG, Belo Horizonte, (Boletim Técnico 54).

SAS Institute. 1997. User's Guide. Version 6.12. Cary, pp. 1128.

VEENA, P., TRIPATHI, A. K., AGGARWAL, K. K., KHANUJA, S. P. S., SUSHIL, K., PRAJAPATI, V., and KUMAR, S. 2001. Screening of some synthetic aroma chemicals for toxicity on the stored grain pest, *Callosobruchus maculatus*. *J. Med. Arom. Plant Sci.* 23:624-629.

Tabela 1. Médias e erro padrão da média da postura do bicho-mineiro e das áreas ($\times 10^3$) dos picos de fitoquímicos identificados que tiveram resposta biológica pela antena do inseto-praga no CG/EAG.

Genótipos	Número de ovos (postura)	Decanal (1)	Trans- β -ocimeno (5)	(<i>E,E</i>)- α -farneseno (7)	<i>p</i> -Cimeno (21)	Dodecano (22)	2-metilnonano (29)
‘Borbom Amarelo’	8,25 \pm 1,37 ^a	5115,23 \pm 2953,28 ^{c, d}	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c
‘Catuaí Vermelho’	13,00 \pm 2,34 ^a	0,00 \pm 0,00 ^e	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c	196,47 \pm 113,43 ^b	488,98 \pm 282,31 ^b	0,00 \pm 0,00 ^c
‘Mundo Novo’	8,94 \pm 2,19 ^a	19954,92 \pm 11520,98 ^{a, b}	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c	695,62 \pm 401,61 ^a	1760,65 \pm 1016,51 ^a	0,00 \pm 0,00 ^c
‘Oeiras’	10,75 \pm 2,46 ^a	0,00 \pm 0,00 ^e	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c
‘Topázio’	9,31 \pm 2,71 ^a	3269,29 \pm 1887,53 ^{c, d}	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c
‘Robusta’	15,00 \pm 3,97 ^a	6290,61 \pm 3631,89 ^{b, c}	0,00 \pm 0,00 ^c	205,39 \pm 118,58 ^a	640,96 \pm 370,06 ^a	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c
<i>C. racemosa</i>	1,13 \pm 0,47 ^c	0,00 \pm 0,00 ^e	772,37 \pm 445,93 ^a	18,74 \pm 10,82 ^{a, b}	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c
Híbrido 1	3,13 \pm 1,00 ^c	38045,47 \pm 21965,56 ^{a, b}	0,00 \pm 0,00 ^c	380,30 \pm 219,56 ^a	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c
Híbrido 2	2,69 \pm 0,95 ^c	0,00 \pm 0,00 ^e	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c	235,04 \pm 35,70 ^b	81,77 \pm 47,21 ^b
Híbrido 3	2,50 \pm 0,75 ^c	1496,60 \pm 864,06 ^{c, d}	342,13 \pm 197,53 ^b	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c
Híbrido 4	3,88 \pm 1,21 ^{b, c}	787,14 \pm 454,46 ^d	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c	107,11 \pm 61,84 ^a
Híbrido Timor	8,50 \pm 2,12 ^{a, b}	0,00 \pm 0,00 ^e	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c	83,54 \pm 48,23 ^b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Fisher’s LSD ($P < 0,05$).

Tabela 2. Eixos canônicos e coeficientes (agrupados na estrutura canônica) dos parâmetros área dos picos referente aos fitoquímicos analisados em doze genótipos de cafeeiro no CG/EM.

Variáveis	Eixos Canônicos				
	1	2	3	4	5
Decanal (pico 1)	-0,09	0,71	1,19	-0,033	0,059
Trans- β -ocimeno (pico5)	-0,01	-0,062	-0,12	-0,56	0,82
(<i>E,E</i>)- α -Farneseno (pico7)	0,10	-0,76	-0,53	0,020	-0,065
<i>p</i> -Cimeno (pico21)	-0,56	4,14	-3,70	0,35	0,30
Dodecano (pico22)	0,56	-4,17	3,61	0,49	0,26
2-Metilnonano (pico29)	0,99	0,093	-0,021	-0,004	0,009
F	115,94	39,54	21,10	7,26	4,56
Graus de liberdade(num./den.)	66 / 101,77	50 / 90,02	36 / 76,69	24 / 61,51	14 / 44
<i>P</i>	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Corr. canônica ao quadrado	0,999	0,995	0,994	0,878	0,767

Tabela 3. Correlação canônica (parcial) e par canônico entre as áreas dos picos dos fitoquímicos analisados nos genótipos de cafeeiro e o número de ovos por folhas.

Variáveis	Primeiro par canônico	
	Coefficiente	Correlação
Decanal (pico 1)	-0,27	0,10
Trans- β -ocimeno (pico 5)	-0,68	-0,69
(<i>E,E</i>)- α -farneseno (pico 7)	-0,48	-0,22
<i>p</i> -Cimeno (pico 21)	0,82	0,59
Dodecano (pico 22)	-0,69	0,15
2-Metilnonano (pico 29)	-0,32	-0,21
Número de ovos por folha	1,00	1,00
r		0,99
F aproximado		35,75 *
Graus de liberdade (núm.; den.)		6; 5

* Significativo a $P < 0,05$.

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1. Esquema para a coleta e adsorção dos compostos voláteis de folhas de genótipos de cafeeiro.

Figura 2. Correntes totais de íons do CG/EM dos extratos de: (A) *C. racemosa* contendo o trans- β -ocimeno, (B) *C. canephora* cv. Robusta contendo o *p*-cimeno, (C) *C. arabica* cv. Mundo Novo contendo decanal e dodecano, (D) Híbrido Timor contendo 2-metilnonano, e (E) Híbrido UFV 557-04 contendo o α -farneseno;

Figura 3. Espectros de massas médios das correntes totais de íons do CG/EM dos extratos de: (A) *C. racemosa* referente ao pico 5 (13,679 min.) identificado como (*E*)-3,7-dimetil-1,3,6-octatrieno (trans- β -ocimeno), (B) *C. canephora* cv. Robusta referente ao pico 21 (14,943 min.) identificado como 4-isopropil-1-metil-benzeno (*p*-cimeno), (C) *C. arabica* cv. Mundo Novo referente ao pico 1 (20,602 min.) identificado como decanal, (D) *C. arabica* cv. Mundo Novo referente ao pico 22 (21,443 min), identificado como dodecano, (E) Híbrido Timor referente ao pico 29 (22,246 min.) identificado como 2-metilnonano, e (F) Híbrido 1 referente ao pico 7 (34,517 min.) identificado como (*E,E*)-3,7,11-trimetil-1,3,6,10-dodecatetraeno ((*E,E*)- α -farneseno).

Figura 4. Parte do cromatograma obtido no CG/EAD com resposta biológica na antena do bicho-mineiro referente ao extrato do genótipo: (A) *C. racemosa* no tempo 11,65 min. identificado como trans- β -ocimeno no CG/EM, (B) *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho no tempo 13,16 min. identificado como *p*-cimeno no CG/EM.

Figura 5. Diagrama de ordenação mostrando a discriminação entre genótipos de cafeeiros quanto às diferenças nas áreas dos fitoquímicos analisados em relação ao: (A) primeiro e o segundo eixo canônico (B) primeiro e terceiro eixo canônico. Os símbolos são centróides de tratamentos e representam a média das classes de variáveis canônicas. Círculos largos indicam grupos de tratamentos sem diferença significativa entre eles (teste de F aproximado, $p < 0,05$), baseado na distância de Mahalanobis (D^2) entre médias.

Figura 6. Resposta de fêmeas virgens de *Leucoptera coffeella* no olfatômetro em relação

ao odor do fitoquímicos *p*-cimeno e do branco. Estão apresentados os resultados de 12 repetições independentes bem como o total dessas. As barras que se estendem para a esquerda mostram a porcentagem de fêmeas virgens do bicho-mineiro que escolheu o odor do branco. As barras que se estendem para a direita mostram a porcentagem de fêmeas virgens do bicho-mineiro que escolheu o odor do fitoquímico *p*-cimeno. Os números dentro das barras representam o número de fêmeas utilizado por repetição e os asteriscos, *: $p < 0,05$, indicam a significância do resultado segundo teste Qui-quadrado.

Figura 1.

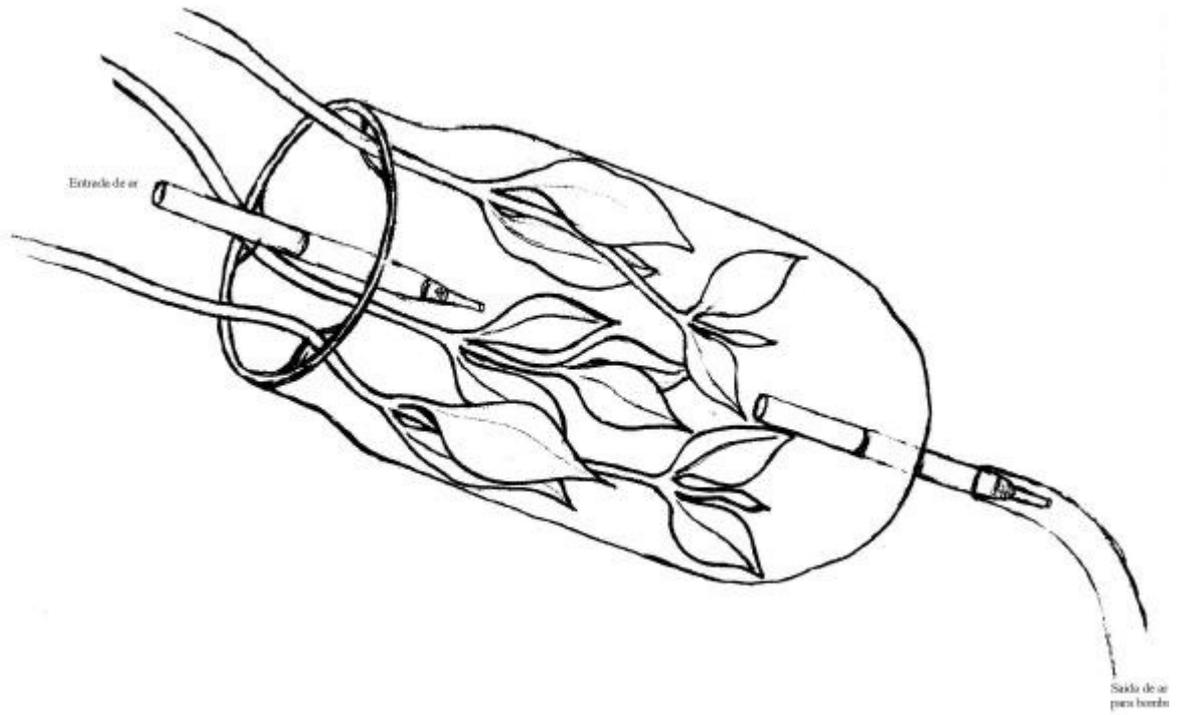
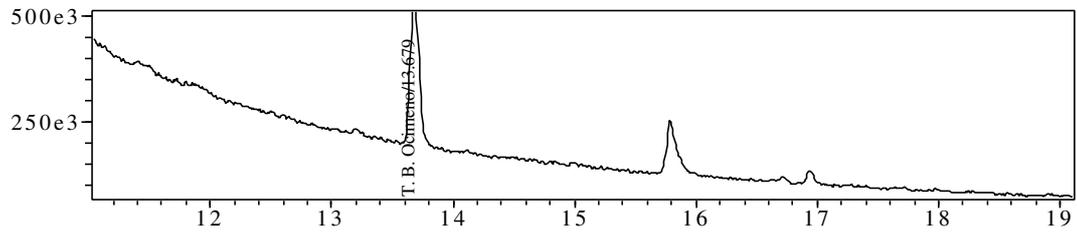
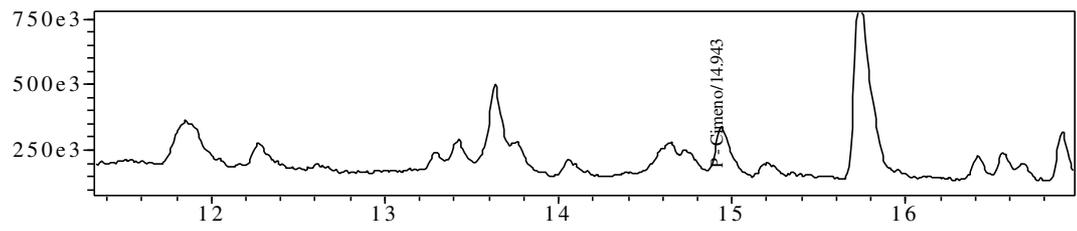


Figura 2.

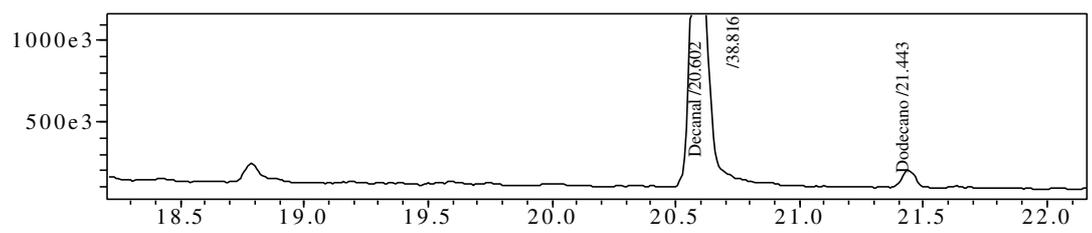
(A)



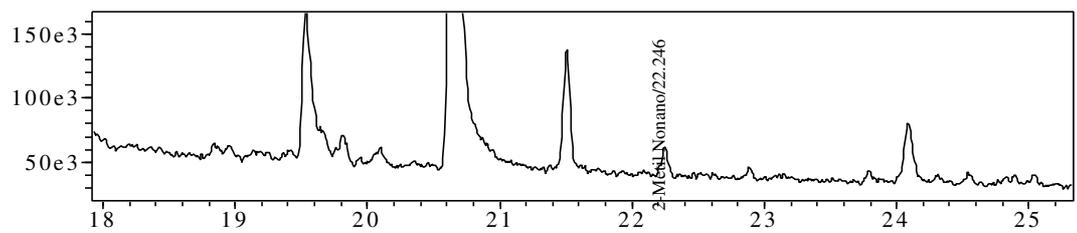
(B)



(C)



(D)



(E)

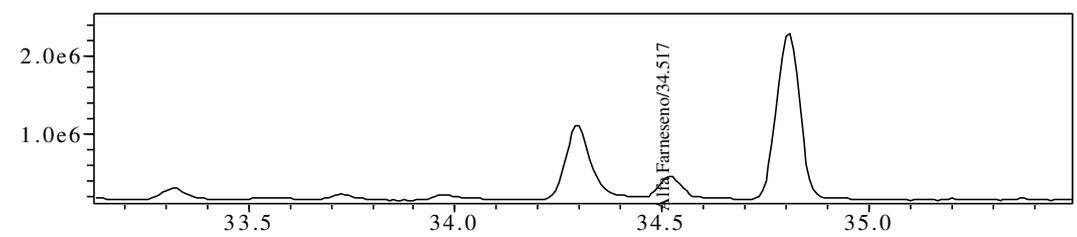
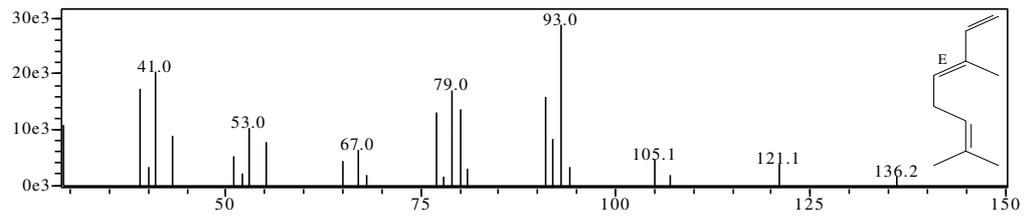
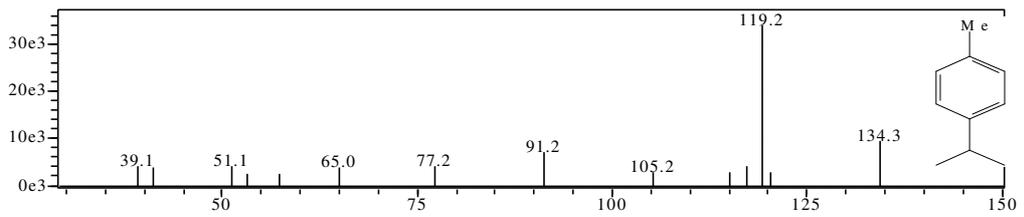


Figura 3.

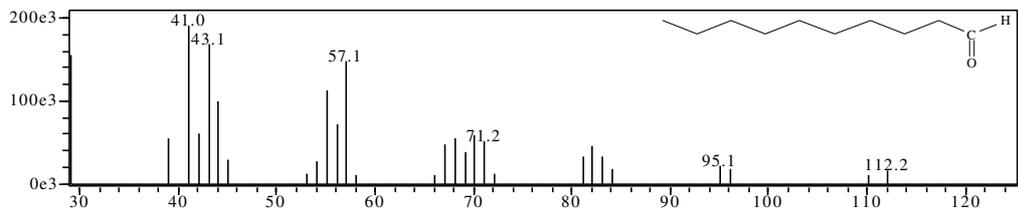
(A)



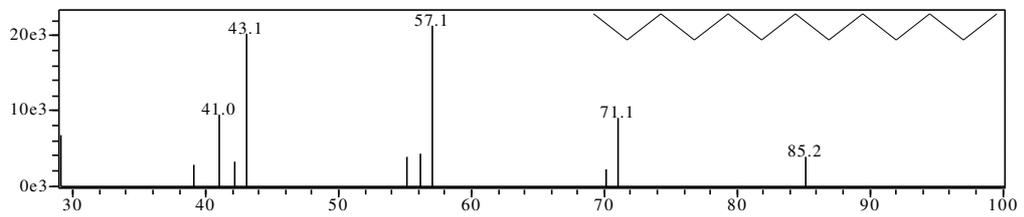
(B)



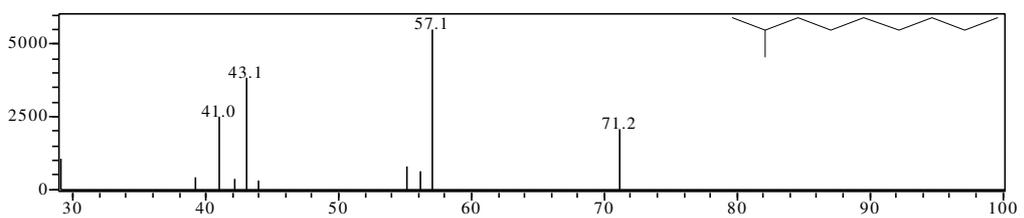
(C)



(D)



(E)



(F)

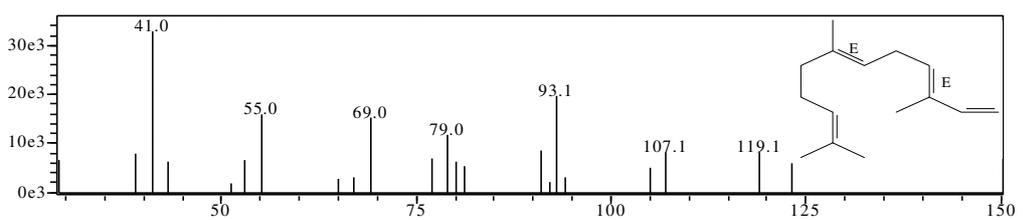
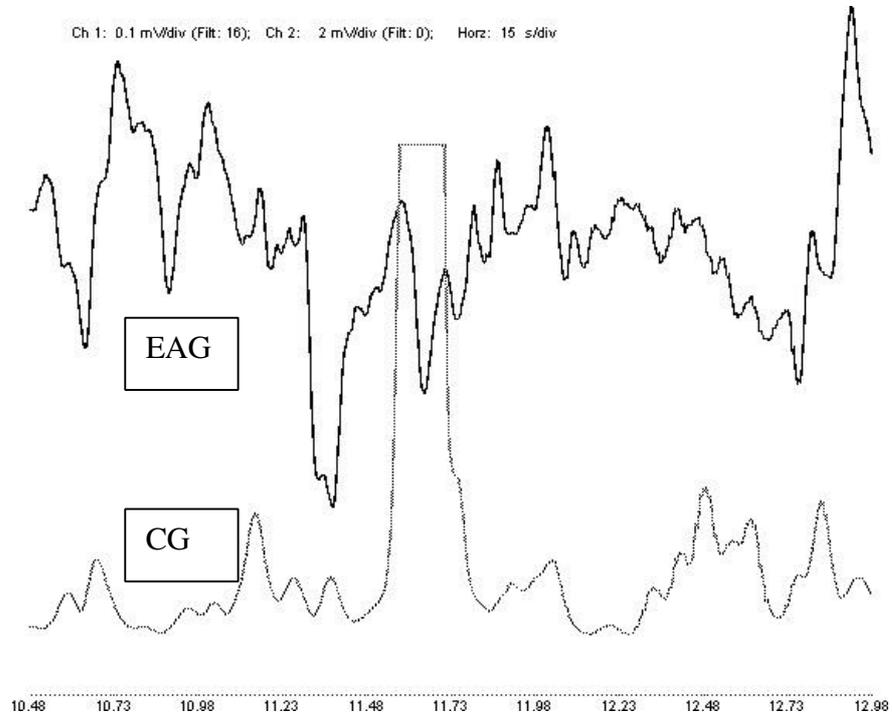


Figura 4.

(A)



(B)

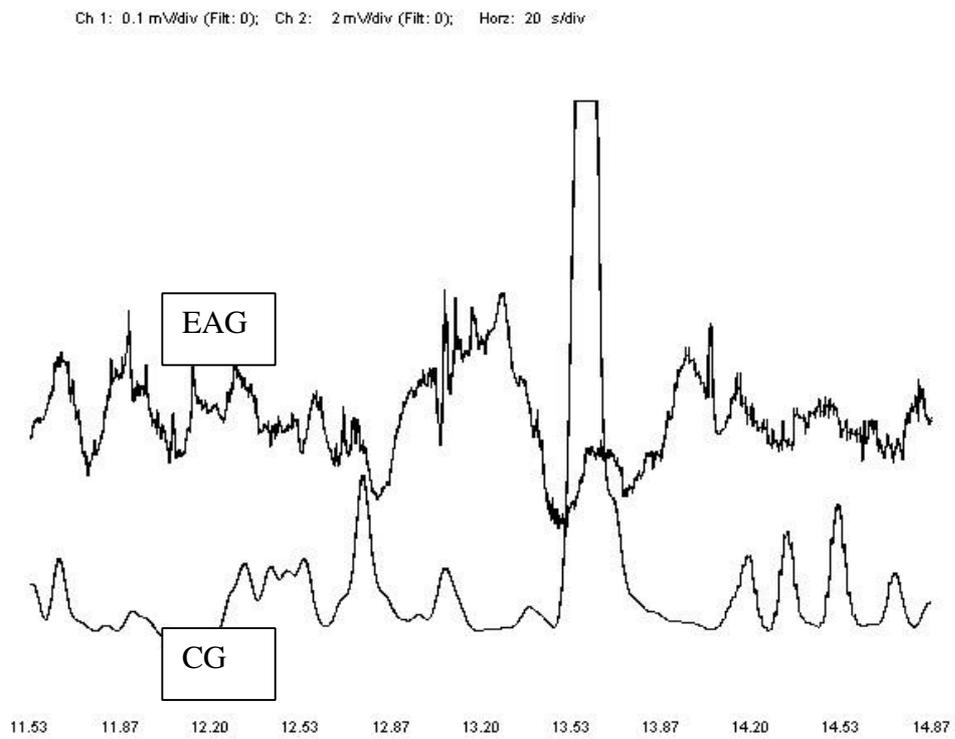
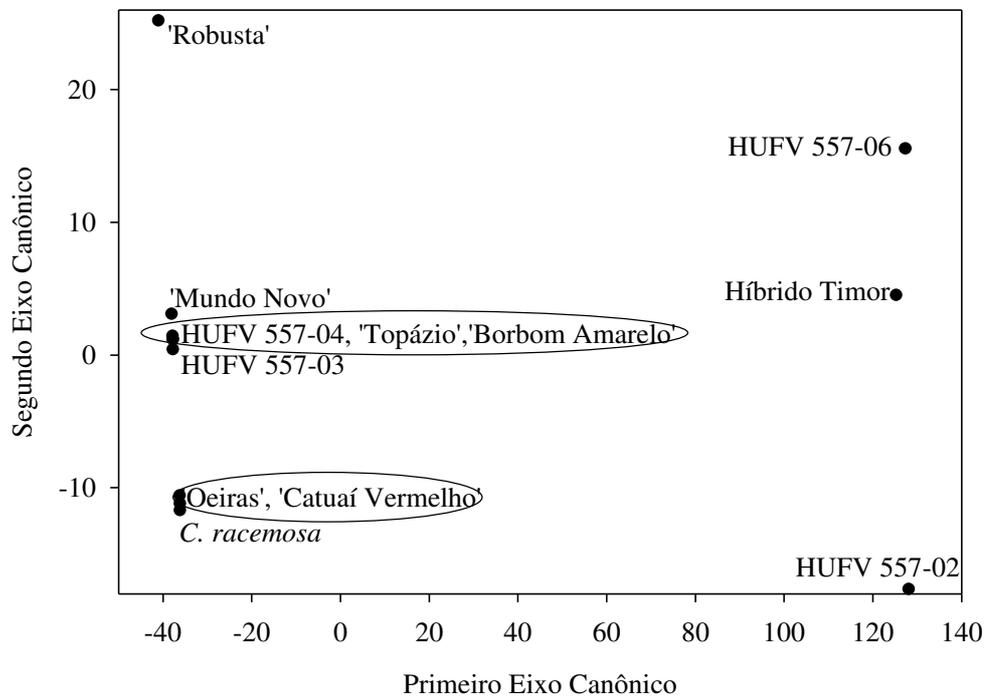


Figura 5.

(A)



(B)

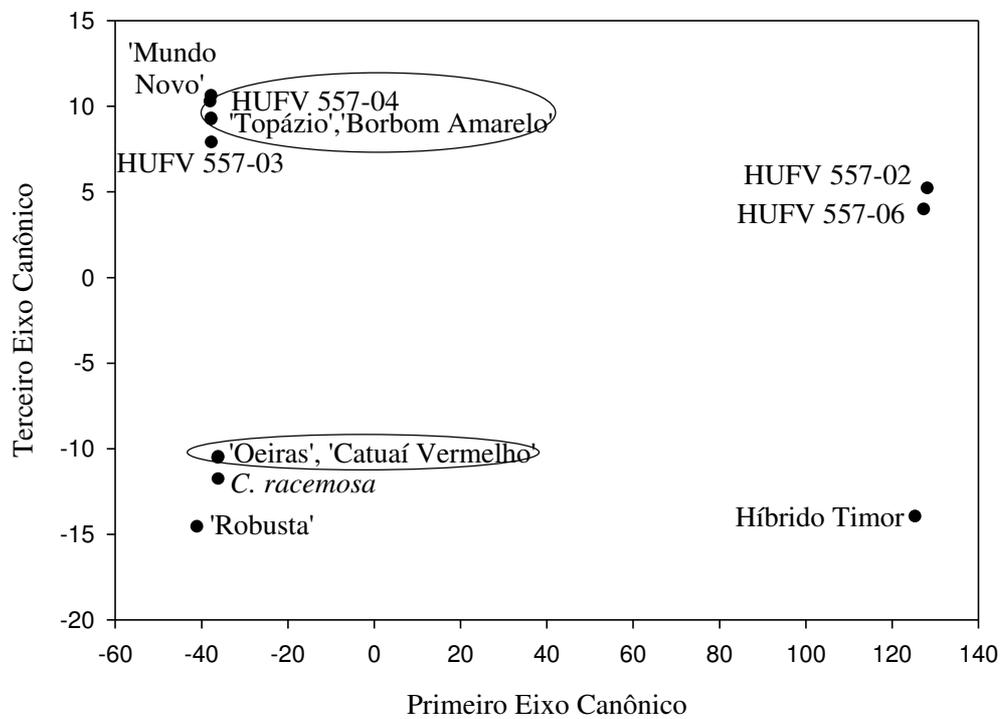
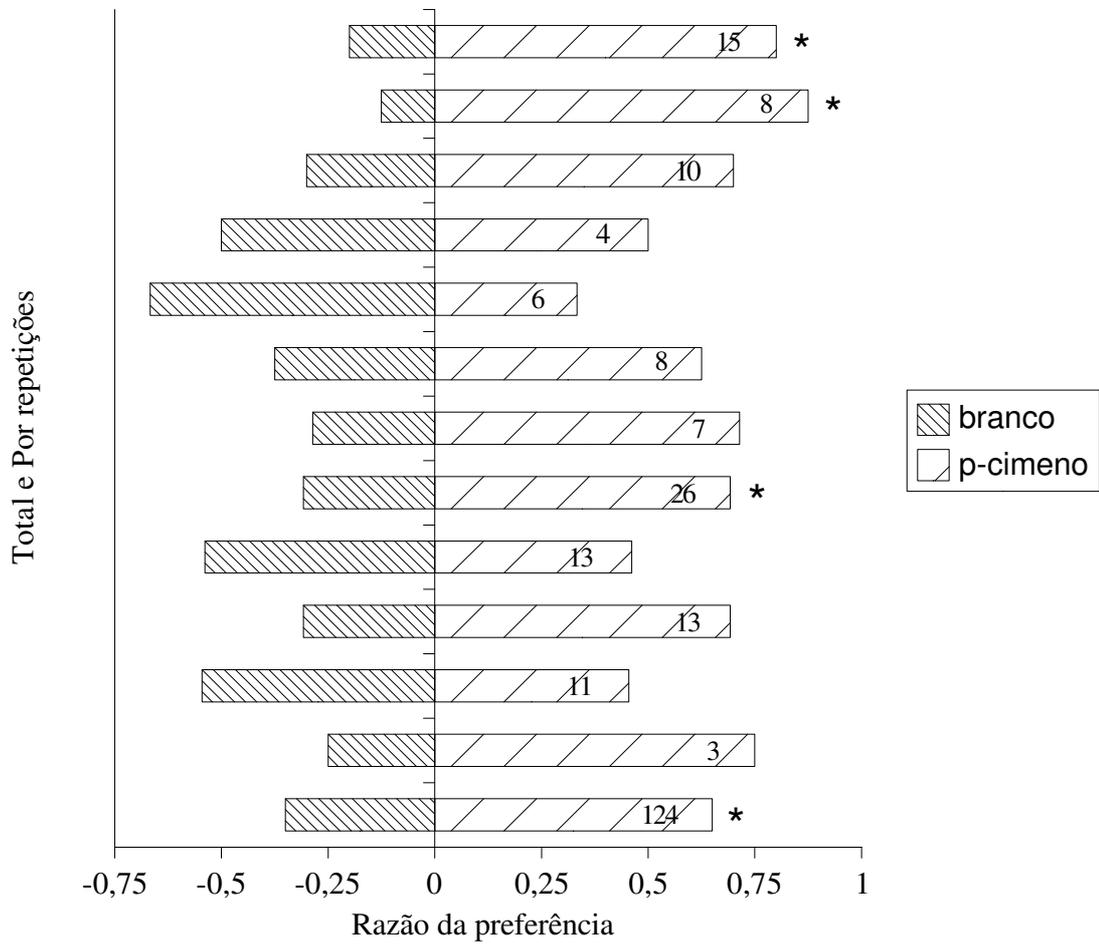


Figura 6.



CONCLUSÕES GERAIS

Os testes realizados no presente trabalho sugerem que um dos fatores envolvidos na preferência do bicho-mineiro por cafeeiros suscetíveis está relacionado com os altos teores de cafeína presente nas folhas. O teor de cafeína foi o parâmetro analisado que mais se correlacionava positivamente com a oviposição do bicho-mineiro nos genótipos estudados. Além disso, testes de preferência para oviposição com o genótipo contendo menor concentração de cafeína (i.e. Híbrido UFV 557-04), adicionado na sua superfície concentrações crescentes deste composto, confirmaram uma preferência significativa pelas folhas deste genótipo que apresentavam maiores concentrações. Portanto, a cafeína possui um papel biológico nas relações interespecíficas com o bicho-mineiro.

Por outro lado, ácido clorogênico, cafeína e derivados não apresentam efeito protetor contra o bicho-mineiro em virtude dos teores destes compostos nos genótipos estudados, antes e depois da infestação, não apresentarem correlação significativa com os parâmetros de desenvolvimento do inseto. Entretanto, foi observado que a infestação acarreta declínio nos teores foliares de ácido clorogênico, que apesar de não exercer efeito nesta espécie-praga, pode favorecer a infestação por outras.

Os resultados obtidos indicam, ainda, que o bicho-mineiro prefere ovipositar em cafeeiros suscetíveis porque alguns destes cafeeiros possuem o *p*-cimeno que atua como mediador químico da interação bicho-mineiro/cafeeiro, favorecendo a aproximação e a identificação de cafeeiros como hospedeiros favoráveis ao desenvolvimento do inseto. No presente trabalho observa-se que este fitoquímico apresentou maior correlação positiva com a oviposição deste lepidóptero. Além disso, testes com o olfatômetro resultaram em uma preferência significativa para as vias que possuíam este composto. Assim, o *p*-cimeno, presente em cafeeiros susceptíveis, possui um papel biológico nas relações interespecíficas com o bicho-mineiro. E também, verificou-se que o trans- β -

ocimeno apresentou uma alta correlação negativa com a oviposição do bicho-mineiro, podendo ter algum papel biológico como repelente ou deterrente de oviposição.