

Rothamsted Repository Download

G - Articles in popular magazines and other technical publications

Borges, M., Michereff, M. F. F., Moraes, M. C. B., Hassemer, M. J., Laumann, R. A. and Birkett, M. A. 2017. *Metodologias para o Estudo da Defesa de Memoria (Priming) em Plantas Frente a Estresse Biotico*. Empresa Brasil Pesq Agropec.

The publisher's version can be accessed at:

- <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/161172/1/circular-tecnica-911.pdf>

The output can be accessed at: <https://repository.rothamsted.ac.uk/item/84v17>.

© 25 January 2018, Rothamsted Research. Licensed under the Creative Commons CC BY.

Brasília, DF
Maio, 2017**Autores****Miguel Borges**Biólogo, Ph.D., pesquisador
da Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia**Mirian F. F. Michereff**Bióloga, doutora, bolsista
da Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia**Maria C. Blassioli Moraes**Química, doutora,
pesquisadora da Embrapa
Recursos Genéticos e
Biotecnologia**Diego Martins Magalhães**Biólogo, doutor, bolsista
da Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia**Marla Juliane Hassemer**Bióloga, mestra, bolsista
da Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia**Raúl Alberto Laumann**Biólogo, Ph.D., pesquisador
da Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia**Michael Birkett**Químico, Ph.D.,
Rothamsted Research,
Harpenden, Hertfordshire

Metodologias para o Estudo da Defesa de Memória (*Priming*) em Plantas Frente a Estresse Biótico

Introdução

Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram sofisticados sistemas de defesa para vencer os estresses bióticos (herbívoros e patógenos) e abióticos (déficit hídrico, temperaturas extremas, salinidade do solo, nutrientes, entre outros). O sistema defensivo das plantas pode ser dividido em constitutivo e induzido. O constitutivo, como o próprio nome sugere, é um mecanismo de defesa já existente nas plantas que não depende da presença de um agente agressor, como, por exemplo, a presença de tricomas e ceras na cutícula foliar. Já o induzido ocorre em resposta a algum tipo de estresse, seja biótico ou abiótico, e induz, por exemplo, o aumento da produção de compostos voláteis e não voláteis que agem na defesa da planta. Geralmente quando as plantas sofrem injúria pelos herbívoros e/ou patógenos aumentam a produção de metabólitos secundários. Esses metabólitos podem defender diretamente as plantas do ataque dos herbívoros, afetando, por exemplo, seu desenvolvimento ou sua reprodução; ou indiretamente por meio da atração de predadores e parasitoides. Os inimigos naturais utilizam os voláteis de planta induzidos por herbivoria mais eficientemente do que aqueles liberados pelo seu hospedeiro. Isso pode ser explicado pelo fato de os primeiros serem liberados em maior quantidade e, assim, serem mais facilmente detectados.

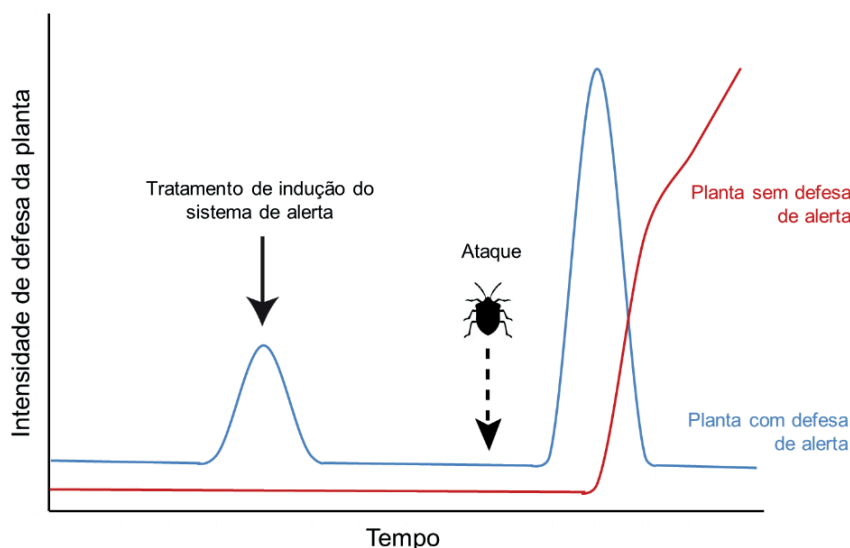


Figura 1. Desenho esquemático da relação temporal e intensidade de resposta de uma planta quando ela é submetida ao estado de alerta e ao estado de alerta combinado com a indução por herbivoria. Esquema modificado de Hilker et al. (2016). O tratamento de indução pode ser qualquer ação que tenha um efeito na defesa de memória da planta, como, por exemplo, a herbivoria de um inseto por um curto período ou com pouca intensidade, que não provoque a indução da defesa, a planta percebe que tem um inseto, ela começa a ativar os genes envolvidos na defesa, mas não produz nenhum composto que aja diretamente ou indiretamente sobre este herbívoro. Outro exemplo, a planta detecta voláteis de uma planta vizinha que foi atacada por herbivoria, esses voláteis são capazes de induzir o estado de alerta na planta intacta, os genes são ativados e ficam em estado de alerta, se houver um ataque do herbívoro eles já estão prontos para iniciarem a produção de compostos que protegem a planta contra o herbívoro.

Além das defesas induzidas e constitutivas clássicas, as plantas apresentam ainda outro sistema de defesa induzida, conhecido como defesa de “memória” ou estado de alerta (do inglês *priming*). Nesses casos, após um primeiro sinal de estresse, as plantas armazenam essa informação e quando ocorrem novos fatores de estresse são capazes de responder de forma mais rápida e eficiente (Figura 1). Esse mecanismo caracteriza o desenvolvimento de memória para os sinais de estresse, que pode se basear em mudanças epigenéticas ou no armazenamento de sinais químicos intracelulares, como proteínas ou fatores de transcrição (BRUCE et al., 2007) (BRUCE et al., 2007; HILKER et al., 2016). O estado de memória (alerta) e a indução podem ser desencadeados pelo mesmo agente ou por agentes de natureza diferente (HILKER et al., 2016). O custo energético do estado de alerta, em geral, é compensado pelo benefício que a planta obtém. O efeito de alerta ou memória pode durar de poucos segundos até meses (HILKER et al., 2016 e referências citadas).

Entender o processo de memória das plantas permitirá o desenvolvimento de novas ferramentas, tanto fenotípicas quanto genéticas, para o estabelecimento de cultivares capazes de se defenderem mais eficientemente e rapidamente contra o ataque de herbívoros e patógenos. Isso requer o desenho de experimentos especificamente orientados. A meta deste estudo foi avaliar se os voláteis de plantas induzidos por herbivoria (VPIH) emitidos por plantas atacadas pela lagarta-do-cartucho (plantas-sentinela) agem como indutores (sinais de estresse) de estado de alerta em plantas vizinhas e, conseqüentemente, se as plantas em estado de alerta têm suas defesas otimizadas (Figura 2).

Esta circular técnica descreve uma metodologia utilizada na condução de experimentos de estado de alerta (*priming*) utilizando-se como modelo o sistema formado por plantas de milho (*Zea mays*), a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e o inimigo natural, o parasitoide de ovos *Telenomus remus* (Hymenoptera: Platygastridae). Para avaliar o efeito do estado de alerta em plantas de milho, foi utilizado um protocolo modificado de Oluwafemi et al. (2013).

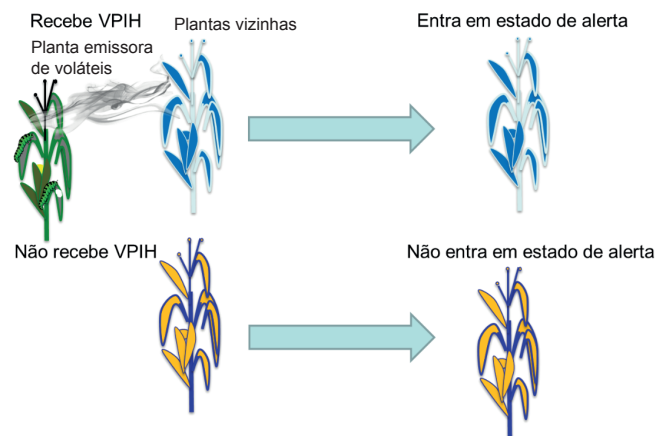


Figura 2. Esquema da ação de plantas emitindo os voláteis (a) sobre plantas vizinhas (b) induzindo o estado de alerta. VPIH = voláteis de plantas induzidos por herbivoria.

Material e métodos

Insetos

As lagartas-do-cartucho foram obtidas de uma colônia de laboratório mantida na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil (15° 46' 46" S e 47° 55' 46" W). As lagartas foram criadas em recipientes de plástico com uma dieta artificial à base de feijão (*Phaseolus vulgaris*) (SCHMIDT et al., 2001). Nos experimentos foram utilizadas lagartas do segundo instar que previamente foram mantidas por 24 horas sem alimento.

O parasitoide de ovos *T. remus* foi obtido da Embrapa Milho e Sorgo, localizada em Sete Lagoas, MG, e mantido em ovos de *S. frugiperda* na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. As vespas foram mantidas em gaiolas de acrílico (75 cm² frascos de cultura de tecidos; ICN Biomedicals, Irvine, CA, EUA) e alimentadas duas vezes por semana com gotas de mel. Após a emergência, os adultos foram mantidos em gaiolas de acrílico por 24 h, para acasalamento e oviposição, antes de serem utilizados nos experimentos. Os insetos foram mantidos em ambientes separados a 27 ± 1 °C, 65 ± 10% de umidade relativa e fotoperíodo de 14L:10D.

Plantas

As sementes de milho foram obtidas da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG (19° 27' 57" S e 44° 14' 48" W), e foram germinadas em papel germinativo úmido. Após 4 dias, foram transplantadas para vasos com uma mistura de solo e substrato orgâni-

co, numa proporção de 1:1 p/p, e mantidas em estufa com fotoperíodo de 14L:10D. As plantas utilizadas nos experimentos tinham três folhas totalmente expandidas, estágio atingido aproximadamente duas semanas após a germinação.

Experimento de estado de alerta

Para avaliar a influência dos voláteis induzidos por herbivoria sobre as plantas vizinhas, primeiramente foi feita a prospecção e seleção de cultivares que produzissem maiores quantidades de voláteis, tanto constitutivamente quanto induzidos por herbivoria (VPIH) (MICHHEREFF et al., 2017). Para avaliar o efeito do estado de alerta em plantas de milho, foi utilizado o protocolo descrito por Oluwafemi et al. (2013), com modificações (Figura 3). Esse protocolo consiste em três fases:

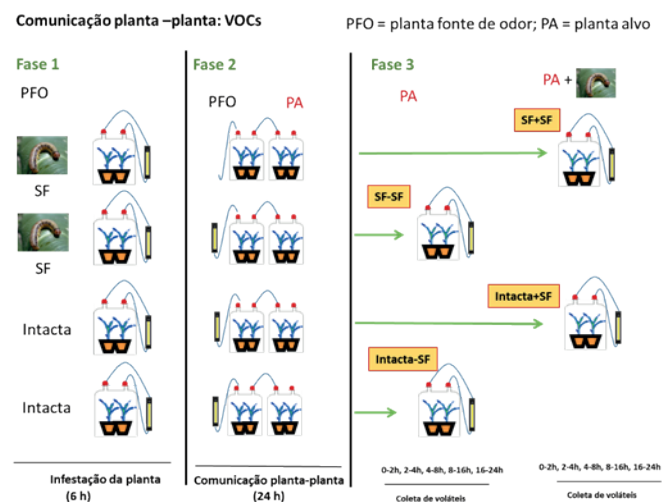


Figura 3. Esquema para avaliação da comunicação planta-planta mediada por compostos orgânicos voláteis (COVs) por meio do estado de alerta. As plantas da fase 3 foram denominadas **SF+SF** (*Spodoptera frugiperda*-*Spodoptera frugiperda*) = plantas que receberam os voláteis de planta induzidos pela herbivoria de SF (VPIH) na fase 2 e receberam a lagarta *Spodoptera frugiperda* na fase 3. **SF-SF** = plantas que receberam os VPIH na fase 2 e não receberam a lagarta *S. frugiperda* na fase 3. **Intacta+SF** = plantas que não receberam os VPIH na fase 2 e receberam a lagarta *S. frugiperda* na fase três. **Intacta-SF** = plantas que não receberam os VPIH na fase 2 e não receberam a lagarta *S. frugiperda* na fase 3.

Fase 1. Produção das plantas fonte de odor: plantas de milho com duas semanas após a germinação foram inseridas em câmaras de vidro de 10 l ($n = 6$ para cada tratamento). As plantas foram submetidas a dois tratamentos: 1) para gerar os VPIH, as plantas receberam cinco lagartas de *S. frugiperda* no 2º ins-

tar; 2) as plantas nas mesmas condições fenológicas não receberam lagarta (são as plantas liberando os voláteis constitutivos). As plantas desses dois tratamentos foram mantidas nessa condição por 6 h, período necessário para observar aumento da produção de VPIH em plantas de milho injuriadas pela alimentação de lagartas de *S. frugiperda* no segundo instar, determinado em observações prévias. O período de indução pode variar, dependendo do tipo de herbívoro, do cultivar, da espécie e do estado fenológico da planta, entre outros fatores. Assim, sempre é necessário realizar estudos prévios para avaliar o melhor período de indução (MICHHEREFF et al., 2017).

Fase 2. Comunicação planta-planta (estado de alerta): as plantas fonte de odor (PFO) da fase 1 foram colocadas dentro de câmaras de vidro limpas de 10 l, onde liberam os voláteis. Estas câmaras foram conectadas a outras câmaras contendo as plantas-alvo (PA), de forma que os voláteis liberados da PFO fossem transferidos para as PA (Figura 2). Após 24 h das PA recebendo os voláteis das PFO, as câmaras foram desconectadas. Aguardou-se um período de uma hora antes do início da fase três para eliminar os resíduos dos voláteis das PFO.

Fase 3. Indução por herbivoria: as PA da fase 2 foram colocadas em câmaras de vidro limpas de 10 l e submetidas a dois tratamentos: receberam ou não lagartas de *S. frugiperda*. Essa fase durou 24 h, e os voláteis liberados pelas plantas foram coletados utilizando-se adsorvente polimérico Porapak Q (100 mg, 60/80 mesh, Sigma Aldrich) nos intervalos de 0-2 h, 2-4 h, 4-8 h, 8-16 h e 16-24 h. Os voláteis adsorvidos no polímero foram eluídos com n-hexano (500 μ L) em frascos de vidro de borossilicato de 1,5 mL, concentrados sobre um fluxo de nitrogênio a 50 μ L e armazenados a -20°C até o uso nas análises químicas e nos bioensaios comportamentais.

Análise química dos extratos de aeração

Os extratos de aeração obtidos das plantas na fase 3 foram analisados em um cromatógrafo gasoso (Agilent 7890A) com uma coluna apolar DB-5MS (30 m x 0,25 mm e 0,25 μ m, J&W Scientific, Folsom, CA, EUA). As análises foram conduzidas utilizando-se um programa com temperatura inicial do forno de 50°C por 2 min, seguido por uma rampa de temperatura de $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 180°C , e depois por uma rampa a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até atingir 250°C , mantendo-se nesta

temperatura por 20 min. O efluente da coluna foi analisado com um detector de ionização de chamas (DIC) a 270°C, e como gás de arraste utilizou-se o hélio. Um microlitro de cada amostra foi injetado no modo *splitless*. Para quantificar os voláteis liberados pelas plantas a 0-2 h, 2-4 h, 4-8 h, 8-16 h e 16-24 h, após iniciada a fase 3, empregou-se o método do padrão interno (PI), utilizando-se como PI o composto 16-hexadecanolactona com uma concentração final de 9,8 µg/mL. Os dados foram analisados com o *software* EZChrom Elite (Agilent, Califórnia, EUA).

Para a análise qualitativa, extratos selecionados foram analisados utilizando-se um CG-EM (Agilent 5975-MSD) equipado com um analisador quadrupolar acoplado a uma coluna DB-5MS apolar (30 m x 0,25 mm ID e 0,25 µm, J&W Scientific, Folsom, CA, EUA). Com injeção no modo *splitless* e o gás hélio como gás de arraste. A ionização foi realizada por impacto de elétrons (70 eV e temperatura da fonte a 200°C). O mesmo programa de temperatura utilizado nas análises quantitativas foi utilizado nas análises por CG-EM. Os dados foram analisados com o *software* e CG-EM ChemStation 2.1 (Agilent, Califórnia, EUA). Os compostos foram identificados por comparação do padrão de fragmentação dos espectros de massas com os espectros das bases de dados de bibliotecas (NIST, 2008) ou de espectros publicados. As identificações dos compostos foram confirmadas utilizando-se padrões autênticos.

Estudos comportamentais

O efeito de estado de alerta (*priming*) também pode ser avaliado por meio de estudos comportamentais, como bioensaios em olfatométrie ou túnel de vento, avaliando-se a influência dos voláteis produzidos por plantas em estado de alerta e indução sobre os inimigos naturais ou herbívoros. Utilizou-se o olfatômetro em “Y” descrito por Moraes et al. (2005) (Figura 4). O ar filtrado com carvão ativado e umidificado foi empurrado por meio do sistema a 0,6 l min⁻¹ e retirado a 0,2 l min⁻¹ por um sistema *push-pull*. Uma única fêmea de *T. remus* foi introduzida na base do tubo em “Y” e observada durante 600 s. Foi avaliada a primeira escolha, definida como o braço do olfatômetro no qual a vespa entrou inicialmente e permaneceu por pelo menos 30 s. A cada cinco repetições, as plantas foram substituídas e as posições dos braços do olfatômetro foram alteradas para evitar viés nas respostas dos parasitoides.

Cada fêmea foi utilizada apenas uma vez, e foram realizadas 40 repetições para a seguinte combinação de tratamento: (1) voláteis de plantas de milho sem injúria (Intacta-SF) contrastados com os voláteis de planta de milho com 8 h de injúria na fase 3 e que recebeu os VPIH na fase 2 (SF + SF 8 h); (2) voláteis de plantas de milho com 8 h de injúria contrastados com os voláteis de SF + SF 8 h; (3) voláteis de Intacta-SF contrastados com voláteis de planta de milho com 16 h de injúria na fase 3 e que recebeu VPIH na fase 2 (SF + SF 16 h); (4) voláteis de plantas de milho com 16 h de injúria contrastados com voláteis de SF + SF 16 h; (5) voláteis de planta de milho sem injúria (voláteis constitutivos) contrastados com voláteis de planta de milho com 8 h de herbivoria; e (6) voláteis de planta de milho sem injúria (voláteis constitutivos) contrastados com voláteis de planta de milho com 16 h de herbivoria. As plantas submetidas aos diferentes tratamentos foram mantidas em diferentes salas sob a mesma temperatura, umidade e condições de iluminação (26 ± 1°C e 65 ± 10% UR sob fotoperíodo de 14L:10D) até serem utilizadas nos experimentos para evitar a sinalização química entre elas.

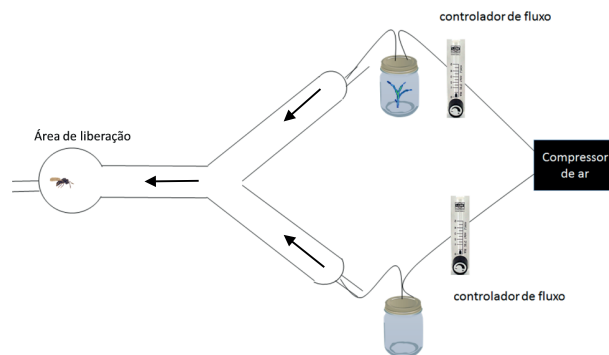


Figura 4. Desenho esquemático do olfatômetro em “Y” utilizado para testar a resposta do parasitoide de ovos *Telenomus remus* aos voláteis das plantas de milho. As setas indicam o sentido do fluxo de ar.

Análises estatísticas

Os dados da resposta de primeira escolha do parasitoide de ovos para cada tratamento nos bioensaios do olfatômetro em “Y” foram analisados com a utilização de regressão logística para estimar a probabilidade de cada escolha. O modelo ajustou a escolha do parasitoide (esquerda ou direita) em que o odor teste foi apresentado como a variável independente. A hipótese de não preferência (isto é, a proporção de escolher cada odor = 0,5) foi testada pelo teste de

Chi-quadrado Wald.

A variação no perfil químico das plantas de milho com e sem injúria de herbivoria de *S. frugiperda* ao longo do tempo foi avaliada por meio da análise de Curvas de Resposta Principais (CRP), do inglês *Principal Response Curves* (PRC) (MAGALHÃES et al., 2012; MICHEREFF et al., 2011). Essa técnica multivariada permite a avaliação de medidas repetidas ao longo do tempo, com foco na proporção de variância explicada pelos tratamentos e o tempo em relação ao controle. Ao comparar as plantas não injuriadas e injuriadas, as plantas que não receberam os voláteis e nem foram injuriadas foram utilizadas como controle. Em cada conjunto de análise, a significância foi determinada por um teste de permutação de Monte Carlo. A variação no conjunto, considerando todos os tratamentos em relação ao controle ao longo do tempo, em cada intervalo analisado, também foi calculada. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico R 3.3.2 (R Development Core Team, 2009).

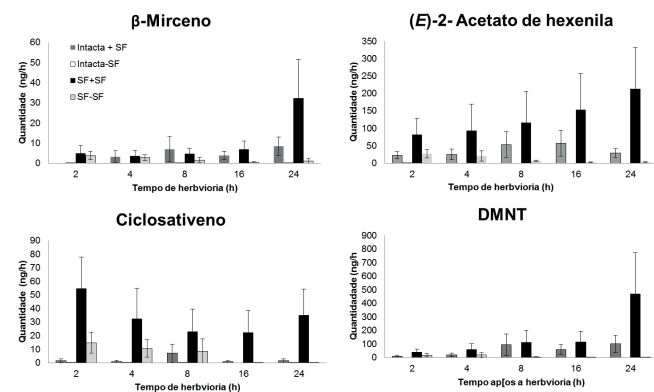


Figura 5. Produção (ng.h⁻¹) de quatro compostos orgânicos voláteis produzidos por plantas de milho submetidas a diferentes tratamentos. Tratamentos: Intacta + SF (plantas sem exposição aos voláteis de planta induzidos pela herbivoria (VPIH) e que receberam a lagarta na fase 3); Intacta-SF (plantas que não foram expostas aos VPIH e nem à lagarta *Spodoptera frugiperda*); SF + SF (plantas expostas aos VPIH e que receberam lagarta *S. frugiperda* na fase 3); e SF-SF (plantas expostas aos VPIH, mas que não receberam a lagarta *S. frugiperda*).

Resultados e discussão

A análise química dos compostos voláteis das plantas obtidos na fase 3 do protocolo mostrou que as plantas previamente expostas aos voláteis induzidos por herbivoria (SF + SF) produziram maior quantidade e iniciaram essa produção mais cedo do que as plantas que não receberam os voláteis induzidos

por herbivoria (Intacta + SF). Isso é evidenciado pela análise individual de alguns compostos, como o comportamento do éster (E)-2-acetato de hexenila, o monoterpeno β-mirceno, o sesquiterpeno ciclosativeno e o homoterpeno (3E)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene (DMNT) que nas plantas SF + SF, já nas primeiras horas após receber a lagarta, mostram uma produção significativamente maior do que nas plantas Intacta + SF (Figura 5).

Como existe uma dependência na produção dos voláteis nas plantas, uma vez que provém de rotas biossintéticas interdependentes, a análise estatística aplicada para avaliar o comportamento de produção destes compostos não pode ser uma análise univariada, como a ANOVA, pois este tipo de análise prevê a independência dos dados. Assim sendo, para avaliar a influência dos tratamentos na produção dos compostos voláteis pelas plantas de milho, foi aplicada uma análise multivariada: a curva de respostas principais (CRP) (Figura 6).

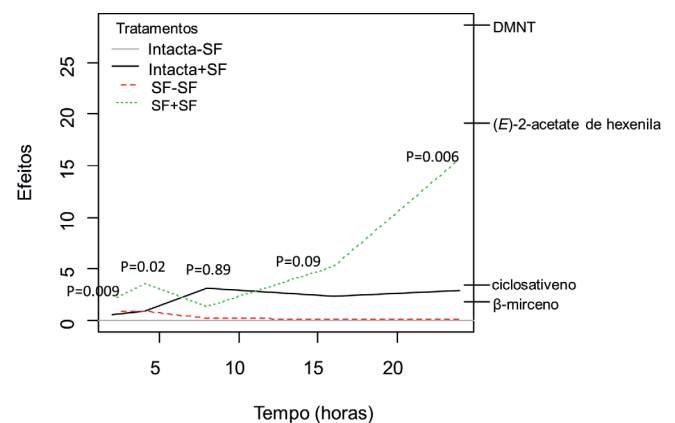


Figura 6. Curvas de Respostas Principais (CRP) da mistura de voláteis produzidos por plantas de milho. As linhas representam o padrão de resposta da produção dos compostos voláteis emitidos pelas plantas de milho submetidas a diferentes tratamentos: Intacta + SF (plantas sem exposição aos voláteis de planta induzidos pela herbivoria – VPIH – e que receberam a lagarta *Spodoptera frugiperda* na fase 3); Intacta-SF (plantas que não foram expostas aos VPIH e nem à lagarta *S. frugiperda*); SF + SF (plantas expostas aos VPIH e que receberam lagarta *S. frugiperda* na fase 3); e SF-SF (plantas expostas aos VPIH mas não receberam lagarta *S. frugiperda*).

A análise de CRP mostrou que as plantas que passaram pelo estado de alerta e foram induzidas pela herbivoria de *S. frugiperda* (traço verde) (SF + SF) responderam mais rápido e mais intensamente do que as plantas que não passaram pelo estado de alerta, mas foram induzidas pela herbivoria na fase 3 (Intacta + SF) (traço preto) (Figura 6). As plantas

que passaram pelo estado de alerta, mas não receberam a lagarta na fase 3 (SF-SF) (traço vermelho), não diferenciam das plantas controle (Intacta –SF) (traço cinza). A primeira variável canônica da análise de CRP explicou 97% da variabilidade dos dados, sendo que 32% da variabilidade foi explicada pelos tratamentos e 6% pelo tempo. O teste de permutação de Monte Carlo foi significativo, indicando que as curvas obtidas foram representativas dos dados ($P < 0.001$) e em todos os tempos avaliados, com exceção do período 4–8 h, existem diferenças significativas entre os tratamentos. Os quatro compostos apresentam alto valor do *score*, indicando que todos têm influência na separação dos tratamentos (β -mirceno = 1,768; (E)-2-acetato de hexenila = 19,190; DMNT = 28,611; ciclosativeno = 3,450). A análise considera que as variáveis com valores acima de 1,0 influenciam significativamente as curvas obtidas. As curvas também mostraram que as principais diferenças ocorreram no tempo amostral de 2 h e 24 h após o início da injúria (Figura 6).

Uma outra forma de analisar os resultados para avaliar se as plantas entraram em estado de alerta é por meio da condução de bioensaios comportamentais. Estudos prévios mostraram que o parasitoide de ovos *T. remus* responde aos VPIH com 24 h após o início da herbivoria, não reconhecendo os odores de plantas que sofreram herbivoria por períodos mais curtos do que 24 h. Assim, se o estado de alerta induzir a resposta de defesa indireta da planta mais cedo ou de maneira mais intensa, a resposta comportamental do inseto poder ser alterada. Os bioensaios conduzidos no olfatômetro em “Y”, utilizando-se fêmeas de *T. remus* com plantas das fases 1 e 3, mostraram que o parasitoide não respondeu seletivamente aos voláteis de plantas SF + SF com 8 e 16 h de injúria, quando contrastadas com os voláteis das plantas induzidas por herbivoria, mas preferiram áreas do olfatômetro tratadas com os voláteis das plantas SF + SF, após 8 e 16 h de herbivoria na fase 3, quando contrastadas com as plantas intactas-SF (voláteis constitutivos) (Figura 7). Corroborando os resultados observados na produção de voláteis, a resposta mais cedo e com maior intensidade das plantas SF + SF à injúria provocada pela lagarta *S. frugiperda* resulta numa atração seletiva do inimigo natural da mariposa, o que não aconteceu com as plantas que sofreram herbivoria (VPIHs) após 8 e 16 h, quando comparadas com plantas sadias (Figura 7).

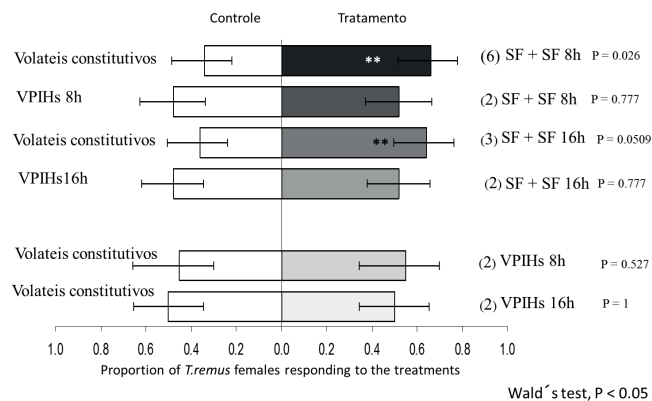


Figura 7. Resposta das fêmeas de *Telenomus remus* nos bioensaios em olfatometria em “Y” aos voláteis emitidos por plantas de milho com e sem injúria de herbivoria, submetida aos diferentes tratamentos nas fases 1 e 3. SF + SF (plantas expostas aos voláteis de planta induzidos pela herbivoria (VPIH) e receberam lagarta *Spodoptera frugiperda* na fase 3) e VPIH = plantas que sofreram herbivoria da lagarta *S. frugiperda* com 8 ou 16 h de injúria. Tempo de injúria: 8 e 16 horas. Asteriscos indicam diferenças significativas entre tratamentos utilizando-se o teste de Wald teste, com distribuição χ^2 , probabilidade de 0,05%.

Conclusões e perspectivas

As respostas moleculares, bioquímicas e fisiológicas associadas com as defesas fenotípicas de plantas que passam pelo estado de alerta são mais rápidas e mais intensas quando comparadas às respostas de plantas que não passaram por este processo. Neste trabalho, foi mostrado o efeito de alerta por meio da produção de compostos defensivos voláteis. Tal efeito pode ainda ocorrer com compostos não voláteis, como as fitoalexinas, os compostos fenólicos, os ácidos hidroxâmicos, e outras características ligadas à defesa, tais como a produção de hormônios, enzimas e alterações na cromatina. Além das plantas, o efeito de estado de alerta pode ocorrer frente a patógenos como bactérias e fungos. Neste trabalho, mostrou-se como realizar experimentos comparando as diferenças fenotípicas (emissão de voláteis) entre plantas de milho que não sofreram o estado de alerta e plantas que foram submetidas a indutores do estado de alerta. Também é possível avaliar o estado de alerta na fase 2, avaliando as induções da memória que ocorre antes da expressão das defesas. Neste caso, estudos de transcriptoma para a identificação de genes poderiam ser conduzidos.

O entendimento do sistema de alerta das plantas e a identificação dos genes envolvidos na defesa das plantas, seja da defesa direta ou indireta, podem

trazer novos modos de induzir a resistência das plantas no campo, gerando conhecimento para o desenvolvimento de novos cultivares, visando à defesa natural das plantas na atração de inimigos naturais. O estudo também mostrou a importância da ecologia química para a seleção de cultivares que possam agir como plantas-sentinela ou que apresentem maior resistência ao ataque dos herbívoros mediante a defesa indireta natural. O uso de plantas-sentinela junto a plantas com capacidade de desenvolver o estado de alerta pode ser de grande utilidade para estabelecer sistemas de cultivo alternativos mais sustentáveis, com plantas mais resistentes naturalmente e que atraiam os inimigos naturais mais eficientemente, minimizando assim o uso de agrotóxicos. Essas tecnologias são de grande importância, principalmente para os pequenos e médios agricultores.

Referências

- BRUCE, T. J. A.; MATTHES, M. C.; NAPIER, J. A.; PICKETT, J. A. Stressfull “memories” of plants: evidence and possible mechanisms. **Plant Science**, v. 173, p. 603-608, 2007.
- HILKER, M.; SCHWACHTJE, J.; BAIER, M.; BALAZADEH, S.; AURLE, I. B.; GEISELHARDT, S.; HINCHA, D. K.; KUNZE, R.; ROEBER, R.; RILLIG, M. C.; ROLFF, J.; ROMEIS, T.; SCHMULLING, T.; STEPPUHN, A.; VAN DONGEN, L.; WHITCOMB, S. J.; WURST, S.; ZUTHER, E.; KOPKA, J. Priming and memory of stress responses in organisms lacking a nervous system. **Biological Reviews**, v. 91, p. 1118-1133, 2016.
- MAGALHÃES, D. M.; BORGES, M.; LAUMANN, R. A.; SUJII, E. R.; MAYON, P.; CAULFIELD, J. C.; MIDEGA, C. A. O.; KHAN, Z. R.; PICKETT, P. J. A.; BIRKETT, M. A.; MORAES, M. C. B. Semiochemicals from herbivory induced cotton plants enhance the foraging behavior of the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, p. 1528-1538, 2012.
- MICHEREFF, F. F. M.; MAGALHÃES, D. M.; HASSEMER, M.; LAUMANN, R. A.; BLASSIOLI-MORAES, M. C.; BORGES, M.; BIRKETT, M. A. Impact of volatiles from different maize cultivars on foraging behaviour of *Telenomus remus* and oviposition of *Spodoptera frugiperda*. **Plos One**, 2017. (No prelo).
- MICHEREFF, M. F. F.; LAUMANN, R. A.; BORGES, M.; MICHEREFF FILHO, M.; DINIZ, I. R.; FARIAS NETO, A. L.; MORAES, M. C. B. Volatiles mediating plant-herbivory-natural enemy interaction in resistant and susceptible soybean cultivars. **Journal of Chemical Ecology**, v. 37, p. 273-285, 2011.
- MORAES, M. C. B.; LAUMANN, R. A.; PIRES, C. S. S.; SUJII, E. R.; BORGES, M. Induced volatiles in soybean and pigeon pea plants artificially infested with the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, and their effect on the egg parasitoid, *Telenomus podisi*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 115, p. 227-237, 2005.
- OLUWAFEMI, S.; DEWHIRST, S. Y.; VEYRAT, N.; POWERS, S.; BRUCE, T. J. A.; CAULFIELD, J. C.; PICKETT, J. A.; BIRKETT, M. A. Priming of production in maize of volatile organic defense compounds by the natural plant activator cis-Jasmone. **Plos One**, 2013.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria. **R Foundation for Statistical Computing**. ISBN 3-900051-07-0, 2009. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso: fev. 2017.
- SCHMIDT, F. G. V.; MONNERAT, R. G.; BORGES, M.; CARVALHO, R. da S. **Metodologia de criação de insetos para avaliação de agentes entomopatogênicos**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 20 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 11).

**Circular
Técnica, 91**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Endereço: Parque Estação Biológica (PqEB) - Avenida W5
Norte - Caixa Postal 02372 - Brasília, DF, Brasil

CEP: 70770-900

Fone: (61) 3448-4700

Fax: (61) 3340-3624

E-mail: sac@cenargen.embrapa.br

1ª edição

Publicação *online* (2017)

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



**Comitê
Local de
Publicações**

Presidente: Maria Isabela Lourenço Barbirato

Secretária-Executiva: Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes

Membros: Daniela Aguiar de Souza Kols, Lígia Sardinha
Fortes, Lucas Machado de Souza, Márcio Martinelli Sanches,
Rosameres Rocha Galvão

Membros suplentes: Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes e
João Batista Tavares da Silva

Expediente

Revisão de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães

Normalização bibliográfica: Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Tratamento das imagens: José Cesamildo Cruz Magalhães

Editoração eletrônica: José Cesamildo Cruz Magalhães