

ÁCIDO JASMÔNICO E ÁCIDO SALICÍLICO NA INDUÇÃO DE DEFESA DE PLANTAS DE ARROZ AO PERCEVEJO-DO-COLMO *Tibraca limbativentris* (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)

Thais Fernanda Stella de Freitas¹ Josué Sant'Ana² Maria Carolina Blassioli Moraes³ Miguel Borges⁴ Raul A. Laumann¹

Palavras chave: Fitormônio, quimiotaxia, *Telenomus podisi*

INTRODUÇÃO

Plantas possuem mecanismos de defesa para conter o ataque dos herbívoros categorizados como defesas constitutivas ou induzidas. As constitutivas são barreiras presentes mesmo sem exposição à herbivoria, enquanto as induzidas são ativadas após o ataque de insetos. Estas últimas são de ação mais específica e podem atuar de forma direta sobre herbívoro, afetando negativamente sua fisiologia e/ou comportamento, ou indireta, recrutando inimigos naturais. Um dos mecanismos de defesa de plantas é a produção de compostos orgânicos voláteis (COV) derivados do metabolismo secundário (Dicke & Baldwin, 2010).

Machado *et al.* (2014) constataram que plantas de arroz submetidas ao dano do percevejo-do-colmo apresentaram mudança na emissão de COV, o que refletiu negativamente na atração de fêmeas coespecíficas e positivamente na atração de seu inimigo natural, *Telenomus podisi* (Hym: Scellionidae). A emissão destes compostos é desencadeada pela ativação de rotas metabólicas como a octadecanoide e do ácido mevalônico, coordenadas principalmente pelos hormônios ácido jasmônico (AJ) e ácido salicílico (AS) (Peñaflor & Bento, 2013). O uso destes fitormônios na indução de defesas tem sido estudado em diversas espécies de importância agrícola. Em arroz, a ativação de defesas com a utilização de AJ foi constatada nas interações com *Spodoptera frugiperda* (Lep: Noctuidae) (Stout *et al.*, 2009) e *Lissorhoptus oryzophilus* (Col: Curculionidae) (Hamm *et al.*, 2010), nas quais os autores observaram menores índices de sobrevivência e desenvolvimento destes insetos.

Tibraca limbativentris é um inseto de difícil controle; seus danos estão relacionados à necrose parcial ou total da parte central dos colmos, em decorrência da injeção de saliva tóxica, podendo acarretar no retardamento do crescimento da planta. O microhimenóptero *T. podisi* é um importante agente de controle biológico natural de *T. limbativentris*, com altos índices de parasitismo. Este trabalho objetivou avaliar o perfil químico de plantas que sofreram herbivoria pelo percevejo do colmo ou receberam aplicações exógenas de ácido jasmônico ou salicílico, em diferentes concentrações, bem como, observar as respostas quimiotáxicas de *T. limbativentris* e *T. podisi* frente a plantas de arroz submetidas a estes tratamentos.

MATERIAL E MÉTODOS

O efeito do tratamento com fitormônios foi avaliado em bioensaios de quimiotaxia e de extração de voláteis da planta. Nos dois ensaios foram utilizadas plantas da cultivar BR-IRGA 409 cultivadas em vasos plásticos de 300 mL em casa de vegetação até a realização dos ensaios, quando estavam no estágio V4. Os tratamentos foram: 1) controle; 2) AJ 2mM; 3) AJ 5mM; 4) AS 8mM; 5) AS 16mM; 6) herbivoria. A aplicação das soluções de fitormônios e controle foi feita com um borrifador manual em volume suficiente até que escorresse por

¹ Eng. Agr., Dra, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 7712, CEP 91540-000 – Porto Alegre, RS, thaisfs@gmail.com

² Biólogo, Dr., professor do Departamento de Fitossanidade da UFRGS

³ Química, Dra., pesquisadora da EMBRAPA Recursos genéticos e Biotecnologia

⁴ Biólogo, Dr., pesquisador da EMBRAPA Recursos genéticos e Biotecnologia

toda planta (aprox. 10 mL por planta), e o tratamento herbivoria foi feito pelo confinamento de cinco fêmeas virgens de *T. limbativentris* por planta.

Coleta e identificação de voláteis - Este bioensaio foi realizado no laboratório de análises de semioquímicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília, DF. Os tratamentos com fitormônios ocorreram duas horas antes do início das coletas de voláteis, enquanto a herbivoria ocorreu 48 horas antes do início das mesmas. Cada vaso de planta foi alocado individualmente em uma câmara de aeração volume interno de 10 L, onde o ar purificado era impulsionado num fluxo de 1,2 L/min. Ao final de cada câmara, uma bomba de vácuo forçava o ar a passar por um tubo de vidro contendo 100 mg do polímero adsorvente Tenax[®] GR. As plantas foram aeradas por 24 horas; a eluição foi realizada com 500 µL de hexano e os extratos foram armazenados sob refrigeração a -20°C. Para a cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chamas (CG-DIC) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), uma alíquota de 20 µL de cada extrato foi separada e nesta adicionou-se 1 µL do padrão interno Tetracosano (1 mg/mL) (C₂₄H₅₀) para posterior identificação dos compostos. Em seguida, as soluções foram concentradas a 100 µL por fluxo suave de N₂. Os extratos (1µL) foram injetados em CG com detector de ionização por chama (DIC). A quantificação dos compostos foi feita por comparação das áreas em relação a do padrão interno, e a identificação por comparação do padrão de fragmentação da amostra com o de dados catalogados em bibliotecas espectrais (NIST 2008), além pelo cálculo do índice de retenção. As identificações foram confirmadas por comparação dos tempos de retenção e espectros de massas com padrões autênticos e cálculo dos índices de Kovats. Foram realizadas 10 repetições de cada tratamento. A quantidade de compostos emitida pelas plantas foi analisada pelo teste de Kruskal-Wallis e contraste de Dunn, com 95% de confiabilidade, utilizando software Bioestat[®] 5.0.

Quimiotaxia de insetos - Adultos de *T. limbativentris* foram coletados em lavouras de arroz do Rio Grande do Sul e criados em sala climatizada no Laboratório de Etologia e Ecologia Química (LEEQI) da UFRGS, adaptando a metodologia proposta por Silva *et al.* (2004). A criação de *T. podisi* ocorreu em ovos do percevejo-marrom-da soja *Euschistus heros* (HEM: PENTATOMIDAE) também nas dependências do LEEQI-UFRGS. A aplicação das soluções controle e de fitormônios e controle foi feita 24 horas antes dos bioensaios e o tratamento herbivoria (infestação de uma planta com cinco fêmeas virgens de *T. limbativentris*), 48 horas antes dos bioensaios.

O comportamento quimiotático de *T. limbativentris* foi avaliado com fêmeas virgens, em olfatometro em “Y” (diâmetro 6,5 cm; arena inicial 22 cm bifurcada em braços de 8 cm). O comportamento quimiotático de *T. podisi* foi avaliado em fêmeas pareadas, de até 5 dias de idade, também em olfatometro “Y” (diâmetro 2 cm; arena inicial 11 cm bifurcada em braços de 8 cm). Ao final de cada braço do olfatometro foi acoplada uma câmara de vidro que continha uma planta, representando um dos tratamentos, por onde passava um fluxo de ar previamente filtrado a uma taxa de 0,8 L/min. Uma fêmea foi colocada na extremidade inicial do olfatometro e a resposta foi considerada positiva quando esta percorreu, pelo menos, 4 cm dentro dos braços e permaneceu por, no mínimo, um minuto. Foram considerados não responsivos os que não se movimentaram nos primeiros 5 minutos ou quando não percorreram pelo menos 4 cm em nenhum dos dois braços do olfatometro, em 10 minutos. Foram realizadas 40 repetições por tratamento. Os resultados da primeira escolha foram comparados pelo teste de Qui-quadrado ($P < 0,05$) utilizando o software BioEstat[®] 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Salicilato de metila ($H = 25,33$; $gl = 6$; $P = 0,04$) e aldeídos ($H = 19,35$; $gl = 6$; $P = 0,03$) foram emitidos em maior quantidade pelas plantas dos tratamentos herbivoria e aspergidas com AS 16 mM. A emissão de sesquiterpenos ($H = 15,00$; $gl = 6$; $P = 0,02$) foi maior pelas plantas que sofreram herbivoria, enquanto que a de monoterpenos e álcoois não variou entre tratamentos (Figura 1, Tabela 1).

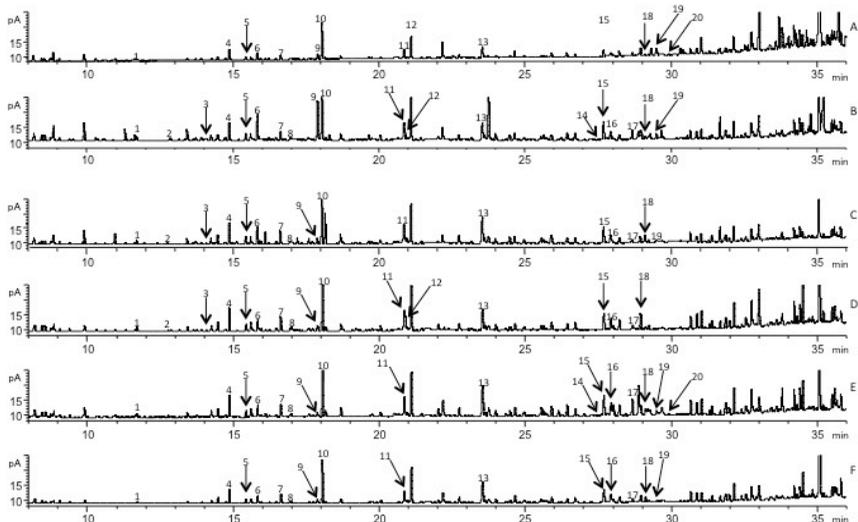


Figura 1. Cromatogramas dos extratos de aeração de plantas. Tratamentos: ácido jasmônico nas concentrações 2 mM (A) e 5 mM (B); ácido salicílico nas concentrações 8 mM (C) e 16 mM (D); Herbivoria: plantas submetidas à herbivoria de *Tibraca limbativentris* (E); Controle: 1 mL etanol + 200 mL água destilada (F). Os números indicam os compostos: 1) heptanal; 2) α -pineno; 3) 1-octen-3-ol; 4) octanal; 5) 1-hexanol-2-etil; 6) limoneno; 7) γ -terpineno; 8) Octanol; 9) Linalol; 10) Nonanal; 11) salicilato de metila; 12) α -terpineol; 13) indol; 14) α -bergamoteno; 15) geranyl acetona; 16) β -farneseno; 17) α -curcumeno; 18) β -bisaboleno; 19) β -sesquifelandreno; 20) α -zingibereno

Tabela 1. Quantidade média (μg) \pm EP dos compostos liberados por plantas de arroz. Tratamentos AJ: ácido jasmônico nas concentrações 2 mM e 5 mM; AS: ácido salicílico nas concentrações 8 mM e 16 mM; Controle 1 mL etanol + 200 mL água destilada; Herbivoria: plantas previamente submetidas à herbivoria de cinco fêmeas de *Tibraca limbativentris* (n = 10). Médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem pelo teste de Dunn ao nível de significância de 5%; ns = não significativo

| Composto | AJ 2 mM | AJ 5 mM | AS 8 mM | AS 16 mM | Herbivoria | Controle |
|----------------------|-------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Monoterpenos | 98,8 \pm 22,0 ^{ns} | 68,8 \pm 10,2 | 108,6 \pm 28,2 | 215,4 \pm 51,7 | 184,1 \pm 46,6 | 180,0 \pm 21,7 |
| Sesquiterpenos | 151,6 \pm 37,9 ab | 122,3 \pm 29,1 ab | 100,5 \pm 21,0 b | 255,4 \pm 73,5 ab | 360,2 \pm 72,4 a | 193,1 \pm 39,6 ab |
| Aldeídos | 251,6 \pm 92,2 ab | 139,4 \pm 22,0 b | 210,8 \pm 31,1 ab | 733,4 \pm 225,7 a | 690,4 \pm 195,4 a | 446,4 \pm 94,2 ab |
| Alcoóis | 52,1 \pm 18,0 ^{ns} | 28,2 \pm 7,0 | 45,2 \pm 15,0 | 104,7 \pm 36,5 | 110,7 \pm 30,8 | 82,8 \pm 24,2 |
| Salicilato de metila | 52,2 \pm 13,0 b | 26,7 \pm 7,1 b | 39,0 \pm 10,0 b | 137,1 \pm 51,6 a | 103,2 \pm 33,8 a | 82,7 \pm 21,5 ab |

A primeira escolha de fêmeas de *T. limbativentris* foi significativamente maior para o controle quando este foi contrastado com o AS 16 mM ($\chi^2 = 6,4$; gl = 1; P = 0,0114). Não houve diferença nas respostas quimiotáticas do percevejo para os demais contrastes de fitormônios ou herbivoria com o controle (Figura 2 A). As fêmeas de *T. podisi*, quando submetidas à opção entre plantas tratadas com os fitormônios e plantas controle, escolheram com mais frequência que receberam o tratamento AS 16mM ($\chi^2 = 10$; gl = 1; P = 0,0016) (Figura 2 B), demonstrando maior atração por este composto.

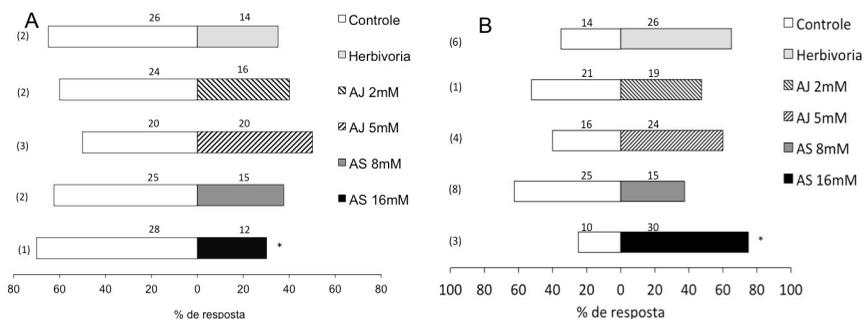


Figura 2. Primeira escolha (%) de fêmeas de *Tibraca limbativentris* (A) e de fêmeas de *Telenomus podisi* (B) em olfatómetro em Y a plantas de arroz previamente infestadas por fêmeas de *T. limbativentris* (herbivoria) ou tratadas com ácido jasmônico (AJ), ácido salicílico (AS), em diferentes concentrações e controle. Valores sobre as barras indicam o número de insetos responsivos e, entre parênteses, de não responsivos. Asterisco indica diferença significativa pelo teste de Qui-quadrado ($P < 0,05$).

CONCLUSÕES

A aplicação de AS 16mM em plantas de arroz eleva a emissão de salicilato de metila de forma semelhante à herbivoria e resulta em menor preferência por fêmeas de *T. limbativentris* e maior por fêmeas de *T. podisi*, evidenciando a indução de defesas da planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DICKE, M.; BALDWIN, I. T. The evolutionary context for herbivory-induced plant volatiles: beyond the 'cry for help'. **Trends in Plant Science**, New York, v.15, n.3, p.167-175, 2010.

HAMM, J. C.; STOUT, M. J.; RIGGIO, R. M. Herbivore- and Elicitor-Induced Resistance in Rice to the Rice Water Weevil (*Lissorhoptus oryzaophilus* Kuschel) in the laboratory and field. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.36, n.2, p.192-199, 2010.

MACHADO, R. de C. de M. *et al.* Herbivory-induced plant volatiles from *Oryza sativa* and their influence on chemotaxis behaviour of *Tibraca limbativentris* stal. (Hemiptera: Pentatomidae) and egg parasitoids. **Bulletin of Entomological Research**, Cambridge, v.104, n.3, p. 347-356, 2014.

PEÑAFLORES, M.F.G.V.; BENTO, J.M.S. Herbivore-Induced Plant volatiles to Enhance Biological Control in Agriculture. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 42, n. 4, p. 332-343, 2013.

SILVA, C.C.A. *et al.* **Ciclo de vida e metodologia de criação de *Tibraca limbativentris* Stål, 1860 (Heteroptera: Pentatomidae) para estudos de ecologia química**. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento). 2004. 16p.

STOUT, M. J.; RIGGIO, M. R.; YANG, Y. Direct induced resistance in *Oryza sativa* to *Spodoptera frugiperda*. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 38, n.4, p.1174-1181, 2009.