

DÉBORA PINHEIRO DE OLIVEIRA

**A ação dos voláteis induzidos por herbivoria na comunicação  
entre plantas: *Croton floribundus* Spreng como espécie modelo**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica  
da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos  
requisitos exigidos para a obtenção do título de  
MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E  
MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de  
Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2017

DÉBORA PINHEIRO DE OLIVEIRA

**A ação dos voláteis induzidos por herbivoria na comunicação  
entre plantas: *Croton floribundus* Spreng como espécie modelo**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica  
da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos  
requisitos exigidos para a obtenção do título de  
MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E  
MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de  
Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. SILVIA RIBEIRO DE SOUZA

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Oliveira, Débora Pinheiro de  
O48a A ação dos voláteis induzidos por herbivoria na comunicação entre plantas: *Croton floribundus* Spreng como espécie modelo / Débora Pinheiro de Oliveira -- São Paulo, 2017.

89p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2017.

Bibliografia.

1. Comunicação química. 2. Plantas receptoras. 3. Herbivoria. I. Título

CDU: 547.913

À minha família, Vanda, Jeazi e Bruno, dedico.

“Sempre permaneça aventureiro.  
Por nenhum momento se esqueça de que  
a vida pertence aos que investigam.  
Ela não pertence ao estático;  
Ela pertence ao que flui.  
Nunca se torne um reservatório,  
sempre permaneça um rio.”

Osho

## Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente pela realização do presente estudo.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica de São Paulo Instituto de Botânica.

Agradeço minha orientadora Dra. Silvia Ribeiro de Souza por todos esses anos de dedicação, aprendizado e paciência. Sou muito grata pela confiança no meu trabalho, por sempre me apoiar nas minhas ideias e desvaneios.... Obrigada por me ensinar a fazer ciência!

Agradeço a Dra. Poliana Cardoso-Gustavson por todas as conversas, explicações e aulas que sempre foram muito ricas e inspiradoras.

Agradeço todas as pessoas do Núcleo de pesquisa em Ecologia pelo o apoio, pelos equipamentos e as gentilezas do dia-dia. Agradeço aos meus colegas da terrestre e aquática. Em especial agradeço à Dra. Márcia pelas aulas e saídas de campo e a Dra. Maria Tereza pelo empréstimo da lupa. Agradeço a Amariles pela ajuda, cafés e risadas! Um agradecimento especial a Dorinha e a Marli.

Meus sinceros agradecimentos a Dra. Marilia Gaspar que sempre foi muito gentil, atenciosa e paciente.

Aos meus queridos amigos do Botânico, que sempre foram muito presentes, prestativos e essenciais nesse processo, contribuindo de alguma maneira para a realização deste trabalho. Obrigada pelas conversas brilhantes e momentos maravilhosos. Agradeço a Josiane, Vítor, Julia, Diego, Francine, Ricardo, Jonathan, Laís Petri, Laís Silveira, Richard, Mayara, Matheus, Sol, Marcela e além de muitos outros amigos, que com certeza levarei para a vida.

Em especial agradeço as minhas amigas Vanessa, Giselle e Giovanna, que foram muito importantes e que me ajudaram muito durante todo o trabalho, com vocês tudo foi mais fácil e divertido, gratidão! Amo vocês.

Aos meus queridos professores Valentin, Patrícia e Ilka por incentivarem o amor a Biologia e a pesquisa científica.

À Dona Margarida por despertar o meu interesse na iniciação científica e por sempre me incentivar a continuar.

Agradeço imensamente a ajuda da Erika Silveira e Felipe Lemos, que mesmo distantes foram muito presentes e importantes nesse trabalho.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram, que sempre acreditaram em mim, até mesmo quando eu duvidava! Obrigada pela paciência e pela força nos momentos difíceis, minha sincera gratidão a Amanda, Monique e Thaís.

Ao Rafael, por sempre acreditar em mim e me ajudar durante o início de todo esse processo.

À minha linda família, por todo o amor incondicional, pela minha educação e pelos meus valores. Eu não teria conseguido nada sem vocês. Obrigada pelo apoio, por sempre torcerem e acreditarem em mim, amo vocês.

À todas as pessoas que contribuíram de alguma maneira para a realização e conclusão deste trabalho.

## RESUMO

A comunicação planta-planta refere-se ao processo de uma planta sadia “perceber” e aumentar suas defesas quando uma planta vizinha (intraespecífica ou interespecífica) está sob estresse biótico ou abiótico. Os compostos orgânicos voláteis possuem função relevante nesse processo, como sinalizadores e mediadores da comunicação, em que uma planta que está sob herbivoria pode “reconhecer” os COV e também induzir suas defesas, promovendo a comunicação planta-planta. Considerando a hipótese de que os voláteis de plantas infestadas por herbivoria são atuantes no mecanismo de comunicação entre plantas, promovendo mudanças na emissão do buquê de plantas saudias, temos como objetivo verificar se esse mecanismo é ativado pelos COV de folhas de indivíduos jovens de *Croton floribundus* infestadas com *Tetranychus urticae*. Os experimentos foram realizados em câmaras de teflon, com condições adequadas (com radiação de  $422 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ , umidade relativa de  $67,3 \pm 5,2$ , e temperatura  $27 \pm 2$  °C). Os tratamentos consistiram em: 1) caracterização dos voláteis emitidos por *C. floribundus* infestados por *T. urticae*; 2) Comunicação química, que foi dividido em duas etapas: a) plantas saudáveis em contato com voláteis sintéticos (receptoras VS) e b) plantas saudáveis em contato com voláteis induzidos por *T. urticae* (receptoras VI). Vinte e sete indivíduos foram utilizados, sendo 18 expostos ao *T. urticae* e nove foram mantidos sob ar filtrado sem contato com herbivoria. Os COV foram coletados ao longo de 27 dias de exposição. Para os experimentos de comunicação química, 24 indivíduos foram utilizados para cada tratamento e os voláteis foram coletados a partir do 4º dia até o 9º de exposição. Os voláteis amostrados foram dessorvidos em nitrogênio gasoso por sistema de dessorção térmica e analisados em cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-MS). *Croton floribundus* respondeu a injúria causada por *T. urticae* emitindo altas concentrações de 3-Careno ( $999 \text{ ng}\cdot\text{g}\cdot\text{MS}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ),  $\alpha$ -Farneseno ( $229 \text{ ng}\cdot\text{g}\cdot\text{MS}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) e Metil salicilato ( $649,04 \text{ ng}\cdot\text{g}\cdot\text{MS}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Os resultados desse experimento subsidiaram o preparo dos voláteis sintéticos que foram utilizados no tratamento de comunicação química. Tanto os voláteis sintéticos quanto os voláteis induzidos foram capazes de promover respostas em plantas saudáveis, receptoras VS e VI, produzindo novos voláteis bem como aumentando a taxa de emissão de voláteis constitutivos. As plantas receptoras de VS produziram mais  $\beta$  Farneseno; já, as plantas receptoras de VI, o  $\alpha$  Farneseno foi induzido. Alguns compostos foram inibidos pelas plantas VI, como o 3 Hexen-1-ol, e induzido pelas receptoras de VS. Ambas as receptoras induziram e emitiram TMTT no 5º dia de exposição ( $p < 0,05$ ). Esse composto é relatado na literatura como um mediador relevante no processo de comunicação entre plantas. Os resultados do presente trabalho indicam que indivíduos saudios de *C. floribundus* respondem a voláteis sintéticos e a voláteis induzidos por *T. urticae*, sugerindo que as plantas saudias, quando em contato com o buquê de voláteis específicos, ativam os sinais químicos de alerta contra ao ataque de possíveis predadores e dessa forma, é estabelecido o processo de comunicação entre indivíduos saudios e infestados.

Palavras-chave: Voláteis induzidos, Comunicação química, plantas receptoras, herbivoria, defesas.

## ABSTRACT

Plant-plant communication refers to the process where a healthy plant “realizes” that is necessary increase its defenses against to a biotic or abiotic stressed neighboring plant (intraspecific or interspecific). Volatile organic compounds (VOCs) have a relevant role in this process, as signaling and mediators of this communication, in which a plant under an herbivory relation can “recognizes” VOCs and also induce their defenses, promoting plant-plant communication. Considering the hypothesis that volatiles of infested plants by herbivory are active the ‘communication between plants, promoting changes in the emission VOC in healthy plants, we tested if this mechanism is activated by VOCs of leaves of young *Croton floribundus* individuals infested with *Tetranychus urticae*. The experiments were out in Teflon chambers, with adequate conditions (with radiation of  $422 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ , relative humidity of  $67.3 \pm 5.2$ , and temperature  $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ). The treatments were of: 1) characterization of the volatiles emitted *C. floribundus* infected by *T. urticae*; 2) Chemical communication, which was divided into two stages: a) healthy plants in contact with synthetic volatiles (SV receptors) and b) healthy plants in contact with volatiles induced by *T. urticae* (IV receptors). Twenty-seven individuals were used, of which 18 were exposed to *T. urticae* and nine were kept in the filtered air without contact with herbivory. VOCs were collected over 27 days of exposure. For the chemical communication experiments, 24 individuals were used for each treatment and the volatiles were collected from the 4th-9th days exposed. The volatiles sampled were desorbed in nitrogen gas by thermal desorption system and analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometer (CG-MS). *Croton floribundus* responded to *T. urticae* injury by emitting high concentrations of 3-Carene ( $999 \text{ ng}\cdot\text{g}\cdot\text{MS}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ),  $\alpha$ -Farnesene ( $229 \text{ ng}\cdot\text{g}\cdot\text{MS}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) and Methyl Salicylate ( $649.04 \text{ ng}\cdot\text{g}\cdot\text{MS}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ). These results subsided the preparation of synthetic volatiles that were used in the evaluation of chemical communication. Both synthetic and induced volatiles were able to promote responses in SV receptors and IV receptors, producing new volatiles as well as increasing the emission rate of constituent volatiles. SV receptor plants produced an increase of  $\beta$  Farnesene, whereas the IV plants receptors the  $\alpha$ -Farnesene was induced. Some compounds were inhibited by plants IV, such as 3-hexene- 1-ol, and induced by the SV receptors. Both recipients induced and delivered TMTT on the 5th day of exposure ( $p < 0.05$ ). This compound is reported in the literature as a relevant mediator in the process of communication between plants. The present study indicate that healthy individuals of *C. floribundus* respond to volatiles synthetic and volatiles induced by *T. urticae*, suggesting that healthy plants, when in contact with the bouquet of specific volatiles, activate the chemical signals of alertness against attack of possible predators and in this way, the process of communication between healthy and infested individuals is established.

Key words: Induced Volatiles, Chemical communication, Receptor Plants, Herbivory, Defenses.

## ABREVIATURAS

13HPOT	- ácido 13-hidroperoxi-linolênico
AS	- ácido salicílico
Ca <sup>2+</sup>	- Íon Cálcio
CON	- Controle
COV	- Compostos orgânicos voláteis
DMAPP	- pirofosfato de dimetilalilo
DMNT	- (E)-4,8 dimethyl-1,3,7 nonatrieno
ERO	- Espécies reativas de oxigênio
FDP	- Farnesil difosfato
Fe	- Fenilalanina
GDP	- Geranil difosfato
GGDP	- Geranil geranil difosfato
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- Peroxido de hidrogênio
IPP	- difosfato de isopentenilo
JA	- Ácido jasmônico
LABIAP	- Laboratório de Interação Atmosfera Planta
LOX	-Lipoxigenase
MAP quinase	- Proteína-quinases ativadas por mitógenos
MeJA	- Metil Jasmonato
MEP	- Metileritritol fosfato
MeSA	- Metil salicilato
MVA	- Ácido mevalônico
NO	- Óxido nítrico
O <sup>2-</sup>	- Ânion Superóxido
O <sub>3</sub>	-Ozônio
R	- Razão matemática
SA	-Ácido salicílico
SAR	- Resistência Sistêmica Adquirida
TMTT	- (E,E) 4-8-12 trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno

TPS	- Terpenos sintases
TUR	- Exposição ao <i>T. urticae</i>
VFV	- Voláteis de folhas verdes
VI	- Voláteis Induzidos
VS	-Voláteis Sintéticos

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Exemplos de compostos orgânicos voláteis encontrados em muitas famílias diferentes de plantas (Pichersky *et al.* 2006; Dudareva *et al.* 2006; Maffei 2010)..... 05
- Figura 2 - Esquema resumido da biossíntese de terpenóides, adaptado de Cheng (2007) e Maffei (2010). MPE, rota do metileritritol fosfato, MVA, rota do ácido mevalônico, IPP, isopentenil difosfato, DMAPP, dimetilalil difosfato, GPP, geranyl difosfato, GGPP, geranylgeranyl difosfato, FPP, farnesil difosfato, *cross-Talk*, termo em inglês utilizado para demonstrar que as rotas se comunicam.....06
- Figura 3. Esquema resumido da rota lipoxigenase a partir do Acetil CoA dando origem aos VFV e ácido jasmônico. Adaptado de Dudareva *et al.* 2006 e Maffei, 2010. 9 ou 13HPOT, ácido 13-hidroperoxi-linolênico.....08
- Figura 4. Esquema resumido da rota biossintética dos compostos fenilpropanóides a partir do ácido chiquimico, adaptado de Maffei, (2010). Fe- fenilalanina, SA- ácido salicílico, MeSA- metil salicilato.....09
- Figura 5. Funções ecológicas dos compostos orgânicos voláteis. Adaptado de Fineschi & Loreto (2012).....11
- Figura 6. Eventos de sinalização após o evento de herbivoria. Adaptado de Drong, (2016) e Fürstenberg-Häg & Bak, (2013).....14
- Figura 7. Fluxograma representando as etapas experimentais desenvolvidas.....21
- Figura 8. Localização do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga dentro da Região metropolitana de São Paulo.....22
- Figura 9. Esquema de Câmaras de fumigação, adaptado de Souza e Pagliuso, 2009.....23
- Figura 10. Esquema representativo do experimento de comunicação química. A- Representa as placas de petri contendo mistura de voláteis sintéticos impregnados em lanolina. B- Representa os indivíduos de *Croton floribundus* sadios em contato com os voláteis sintéticos. C- Representa os indivíduos de *Croton floribundus* infestado com *T. urticae*. D- Representa os indivíduos saudáveis receptores em contato com os voláteis provenientes das plantas infestadas.

Seta -Representa a tela de náilon que separa a câmara ao meio, necessária para evitar o contato de plantas infestadas com plantas receptoras saudáveis.....	24
Figura 11. Placa de petri contendo misturas de voláteis impregnadas em lanolina.....	25
Figura 12. Casa de vegetação em que as plântulas de <i>C. floribundus</i> foram cultivadas. a) visão externa; b) visão interna.....	27
Figura 13. <i>Tetranychus urticae</i> Koch.....	28
Figura 14. Cutivo de <i>T. urticae</i> em folha de <i>Canavalia ensiformis</i> sob espuma umedecida com água destilada e circundada com algodão para manter as condições de umidade e temperatura adequadas de cultivo.....	28
Figura 15. Figura esquemática da coleta de compostos orgânicos voláteis. Adaptado de Bison, (2015).....	31
Figura 16. Emissão diária de monoterpenos (ng g DW <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) em lâminas foliares de <i>C. floribundus</i> expostos a 200 indivíduos de <i>T. urticae</i> (ácaro) e seu respectivo controle (Con). Diferenças estatísticas estão representadas por *. <b>A.</b> 3-Careno, <b>B.</b> Linalol, <b>C.</b> α Pineno, <b>D.</b> Limoneno, <b>E.</b> Geranil Acetona e <b>F.</b> α Felandreno.....	38
Figura 17. Emissão diária de sesquiterpenos (ng g DW <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) em lâminas foliares de <i>C. floribundus</i> expostos a 200 indivíduos de <i>T. urticae</i> (ácaro) e seu respectivo controle (Con). Diferenças estatísticas estão representadas por *. <b>G.</b> α-Farneseno, <b>H.</b> Cariofileno, <b>I.</b> α Copaeno, <b>J.</b> γ Elemenno, <b>K.</b> β-Bourboreno <b>L.</b> α Cubebeno.....	43
Figura 18. Emissão diária de voláteis de folhas verdes (VFV) (ng g DW <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) em lâminas foliares de <i>C. floribundus</i> expostos a 200 indivíduos de <i>T. urticae</i> (ácaro) e seu respectivo controle (Con). Diferenças estatísticas estão representadas por *. <b>M.</b> 3-Hexanal, <b>N.</b> Ácido valérico <b>O.</b> 2- Hexenal, <b>P.</b> 3-Hexen-1-ol, <b>Q.</b> 3-Hexen-1-ol benzoato.....	45
Figura 19. Emissão diária de voláteis de outros voláteis (ng g DW <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) em lâminas foliares de <i>C. floribundus</i> expostos a 200 indivíduos de <i>T. urticae</i> (ácaro) e seu respectivo controle (Con). Diferenças estatísticas estão representadas por *. <b>R.</b> MeSA, <b>S.</b> MeJA, <b>T.</b> Nerolidil acetato, <b>U.</b> Nerolidol, <b>V.</b> Decanal, <b>X.</b> Nonanal.....	47

Figura 20. Razão da concentração dos monoterpênos emitidos por *C. floribundus* receptor de VS (A) e VI (B) pelos seus respectivos controles nos diferentes dias de indução (4 -9). A linha representa o limiar entre os compostos inibidos (abaixo de 1) e emitidos (acima de 1). \* Representam as diferenças estatísticas.....53

Figura 21. Sesquiterpenos emitidos por *C. floribundus* receptor de VS (A) e VI (B). O gráfico representa a razão entre os receptores e seus respectivos controles. A linha representa o limiar entre os compostos inibidos (abaixo de 1) e emitidos (acima de 1). \* Representam as diferenças estatísticas.....58

Figura 22. Voláteis das folhas verdes emitidos por *C. floribundus* receptor de VS (A) e VI (B). O gráfico representa a razão entre os receptores e seus respectivos controles. A linha representa o limiar entre os compostos inibidos (abaixo de 1) e emitidos (acima de 1). \* Representam as diferenças estatísticas.....59

Figura 23. Outros voláteis emitidos por *C. floribundus* receptor de VS (A) e VI (B). O gráfico representa a razão entre os receptores e seus respectivos controles. A linha representa o limiar entre os compostos inibidos (abaixo de 1) e emitidos (acima de 1). \* Representa as diferenças estatísticas.....66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Voláteis sintéticos utilizados no experimento de comunicação química e seus respectivos tempos de retenção.....	30
Tabela 2. Somatória dos valores médios diários dos voláteis expressos em $\text{ng.g.MS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ emitidos por <i>C. floribundus</i> no período de vinte sete dias. CON (controle); TUR (exposição à <i>T. urticae</i> ).....	35
Tabela 3. Dissimilaridade dos compostos emitidos por plantas do controle e tratamento. Resultados via SIMPER. Valores expressos em porcentagem.....	36
Tabela 4. Somatória dos valores médios diários dos voláteis emitidos por indivíduos de <i>C. floribundus</i> receptor de voláteis induzidos (VI), voláteis sintéticos (VS) e indivíduos controle.....	49

## SUMÁRIO

Resumo.....	I
Abstract.....	II
Lista de abreviaturas.....	III
Lista de figuras.....	VI
Lista de tabelas.....	VIII
<b>1. Introdução.....</b>	<b>01</b>
<b>2. Referencial Teórico.....</b>	<b>04</b>
2.1 Compostos orgânicos voláteis (COV).....	04
2.2 Importância Ecológica dos voláteis de plantas.....	10
2.3 Estratégias de defesa.....	12
2.4 Estudos dos voláteis em plantas nativas.....	16
2.5 <i>Croton floribundus</i> Spreng.....	17
2.6 <i>Tetranychus urticae</i> .....	18
<b>3. Justificativa e objetivos.....</b>	<b>20</b>
<b>4. Material e Métodos.....</b>	<b>21</b>
4.1 Delineamento Experimental.....	21
4.2 Caracterização dos COV em <i>C. floribundus</i> sob herbivoria de <i>T. urticae</i> .....	23
4.3 Comunicação química de <i>C. floribundus</i> .....	24
4.4 Cultivo de <i>C. floribundus</i> .....	26
4.5 Cultivo do <i>T. urticae</i> .....	28
4.6 Voláteis sintéticos.....	27
4.7 Coleta e análise de COV.....	31
4.8 Tratamento de dados.....	33
<b>5. Resultados e Discussão.....</b>	<b>34</b>
5.1 Caracterização dos voláteis.....	34
5.2 Comunicação química de <i>Croton floribundus</i> .....	49
<b>6. Considerações finais.....</b>	<b>64</b>
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>66</b>

## 1. Introdução

A comunicação planta-planta refere-se ao processo de uma planta sadia “perceber” e aumentar suas defesas quando uma planta vizinha (intraespecífica ou interespecífica) está sob estresse (Baluška & Vivanco 2009). Embora este fenômeno tenha sido observado pela primeira vez há mais de trinta anos, suas descrições limitam-se a menos de vinte espécies de clima temperado ou de interesse econômico (Heil & Karban 2009).

Certos voláteis emitidos por plantas infestadas são capazes de promover a comunicação entre plantas, induzindo a expressão de genes relacionados à defesa em plantas sadias (Heil & Ton 2008, Dicke *et al.* 2009, Pierik *et al.* 2014). Os voláteis de folhas verdes são reconhecidos como sinalizadores potentes nesse processo (Arimura *et al.* 2009). Por exemplo, quando indivíduos sadios de *Zea mays* (plantas receptoras) foram expostos a voláteis induzidos por herbivoria, à síntese de ácido jasmônico foi rapidamente induzida com subsequente aumento das defesas químicas (Engelberth *et al.* 2007). Outro exemplo são os estudos com plantas sadias de *Populus deltoides* que aumentaram suas defesas pela ação dos voláteis liberados por plantas danificadas (Blande *et al.* 2007).

Há evidências de que a emissão de certos voláteis é resultado da síntese *de novo*, que é um processo que induz emissão de voláteis por meio da liberação de compostos armazenados, ou o aumento da biossíntese de compostos já existentes como os constitutivos ou até mesmo a biossíntese de novos voláteis (Pare & Tumlinson 1997, Dudareva 2006). Ainda, todo esse processo envolve a indução da atividade de enzimas e aumento nos níveis de genes transcritos (Heil & Ton 2008, Pierik *et al.* 2014). Estima-se que 15-25% dos genes das plantas são dedicados às rotas do metabolismo secundário vegetal (Taiz & Zeiger 2010).

Dentre os metabólitos secundários produzidos pelas plantas, os compostos orgânicos voláteis, como terpenos, constituem o grupo mais diversificado. Esses compostos participam

de diversas funções de defesas químicas expressas constitutivamente<sup>1</sup> e que podem ser induzidas<sup>2</sup> por estresses (Kost & Heil 2006).

A liberação de compostos orgânicos voláteis pode sinalizar para própria planta que ela está sendo atacada, ativando mecanismos bioquímicos que a deixam preparada para se defender contra um possível ataque, o que constitui um interessante sistema de pré-indução de defesa denominada *priming defence* (Van Hulten *et al.* 2006). A indução da defesa começa com respostas locais ao dano que podem desencadear diversos processos metabólicos na planta, levando a liberação de voláteis induzíveis (Baldwin *et al.* 2006, Frost *et al.* 2007). Esses COV induzíveis se locomovem dentro da planta e desencadeiam um conjunto de defesas que geram uma resposta sistêmica, sinalizando às partes sadias das plantas a presença do agente agressor (Van Loon & Van Strien 1999, Durrant & Dong 2004) e promovendo assim a redução da severidade do dano ou até mesmo evitando o dano (Halliwell & Guteridge 1989, Heath 2008).

As plantas possuem a habilidade de notar mudanças bioquímicas que ocorrem quando estão sendo atacadas, e quanto mais cedo elas reconhecem, mais rápido será seu sucesso contra seu inimigo (Maffei *et al.* 2007). As respostas são desencadeadas por elicitores dos herbívoros, promovendo uma despolarização do potencial da membrana e um influxo de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) (Maffei *et al.* 2007).

---

<sup>1</sup> A defesa constitutiva define-se pela expressão contínua de resistência, independente da presença ou ação agentes bióticos ou abióticos de estresse (Price *et al.* 1980).

<sup>2</sup> A induzida é caracterizada pela expressão de resistência da planta somente após o estresse, atuando direta ou indiretamente sobre agente causador (Price *et al.* 1980).

Associado a este mecanismo, há produção de espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) além do óxido nítrico (NO), que possuem funções regulatórias de defesa (Halliwell & Guteridge 1989). O dano leva um acúmulo de transcrições de uma MAP quinase (proteína-quinases ativadas por mitógenos) a qual parece estar envolvida na produção do ácido jasmônico e produção de voláteis induzidos (Pinto-Zevallos *et al.* 2013).

Dentre os voláteis indutores de defesas, encontram-se o metil salicilato, ácido jasmônico, cis-3-acetato de hexenila, entre outros (Holopainen & Gerhenson 2010).

O metil salicilato tem se mostrado bastante importante nas defesas químicas de espécies vegetais, esse composto foi induzido em indivíduos jovens de *Croton floribundus* Spreng sob ação do ozônio (Cardoso-Gustavson *et al.* 2014). Foi observado também que esse composto, quando aplicado em plantas saudáveis aumenta as defesas químicas da planta ativando suas respostas sistêmicas (Cardoso-Gustavson *et al.* 2014), o que poderia indicar um potencial de ação do metil salicilato no processo de comunicação entre plantas.

Porém, não há relatos que esse composto, bem como outros, seja induzido por herbivoria em plantas de *C. floribundus* e nem que haja um mecanismo de comunicação planta-planta entre indivíduos dessa espécie vegetal. Assim, estudos que possam investigar a ação da herbivoria na indução dos voláteis em folhas de espécies vegetais nativas, como *C. floribundus*, bem como a ação desses voláteis no mecanismo de comunicação planta-planta são de grande interesse para área da ecologia de ecossistemas, pois permitem um melhor entendimento da complexidade intrínseca das interações e dos processos reguladores e estruturadores das comunidades naturais, assim como para sua preservação. Portanto, o presente estudo buscou avaliar se os voláteis induzidos de *C. floribundus* tem ação potencial no mecanismo de comunicação entre plantas.

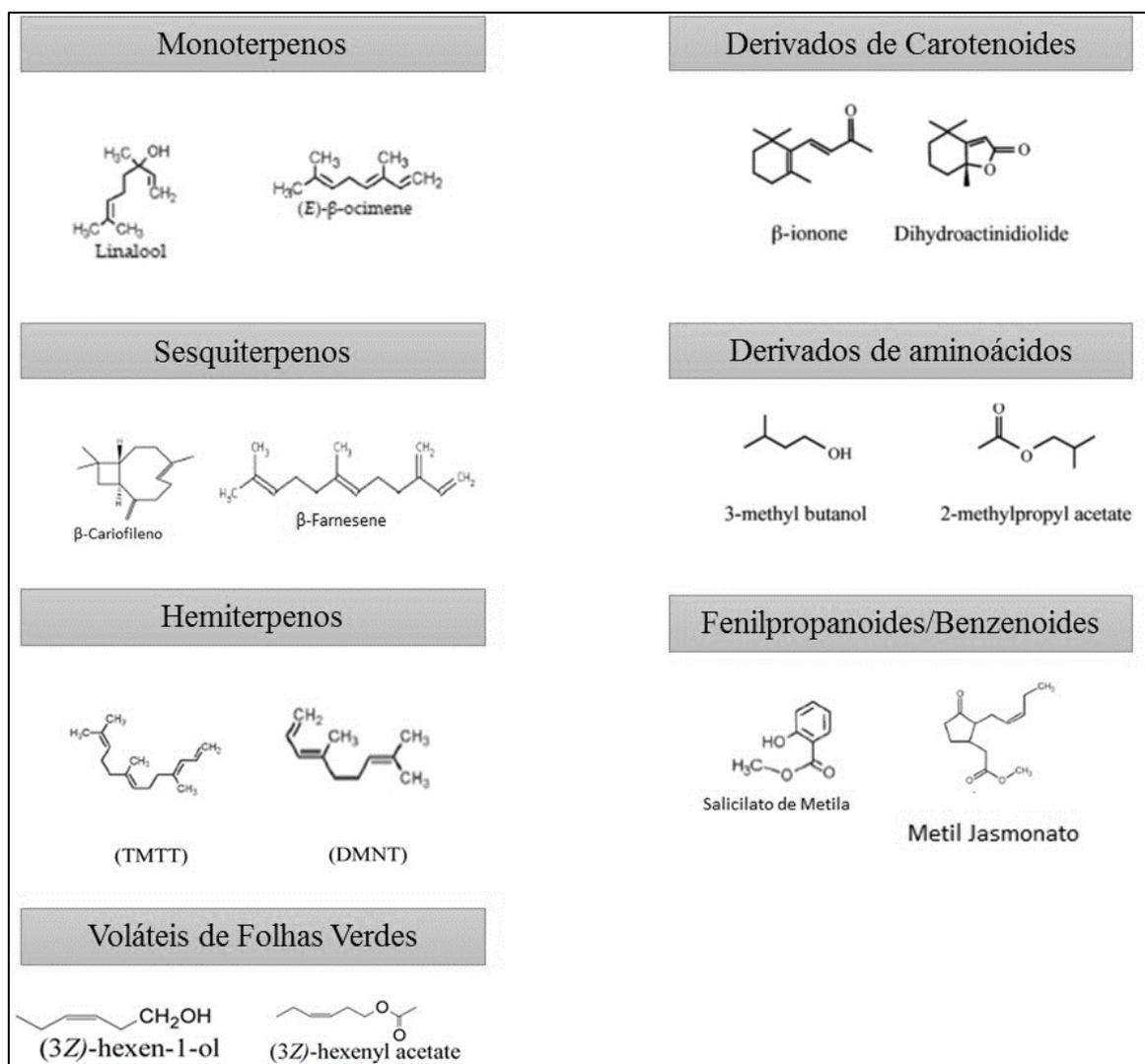
## 2. Referencial Teórico

### 2.1 Compostos orgânicos Voláteis

As plantas são muito importantes para a vida no planeta terra, pois são produtoras de oxigênio, são a base da cadeia alimentar, e matéria-prima de diversos produtos devido a sua habilidade de sintetizar substâncias químicas (Pichersky & Gang 2000, Figueiredo *et al.* 2008).

Essa habilidade de sintetizar metabolitos secundários foi uma herança evolutiva, acredita-se que devido as propriedades dessas substâncias as plantas coexistem com insetos há mais de 400 milhões de anos (Hartmann 2007, Fürstenberg-Hägg & Bak 2013). Durante esse período, essas interações se desenvolveram e influenciam os organismos em todos os níveis tróficos. Os metabolitos secundários são compostos que atuam diretamente nessas interações ecológicas e podem ser classificados entre voláteis e não voláteis (Wink 2003, Fürstenberg-Hägg & Bak. 2013).

Compostos orgânicos voláteis são lipofílicos e possuem baixo peso molecular, devido a essas características físico-químicas podem atravessar membranas e entrar em contato com a atmosfera, solo e com diversos organismos (Dudareva 2006). São principalmente representados por terpenóides (homoterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos), fenilpropanóides/benzenóides, derivados do ácido graxo, aminoácidos, aromáticos, alcanos, alcenos, álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas (Figura 1) (Dudareva *et al.* 2004, Pichersky *et al.* 2006, Maffei 2010).



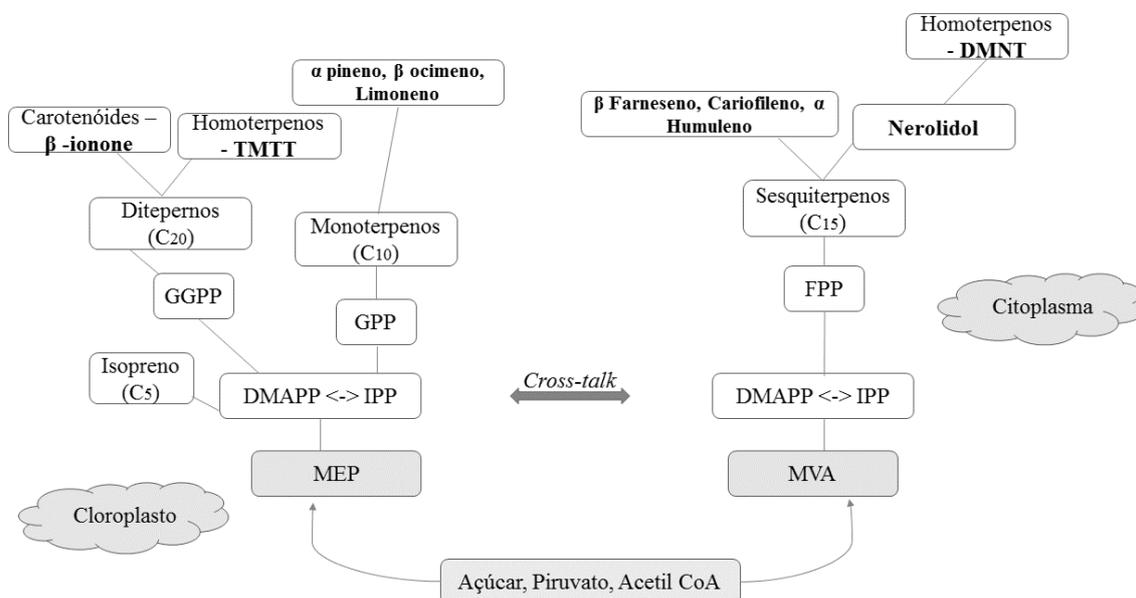
**Figura 1.** Exemplos de compostos orgânicos voláteis encontrados em muitas famílias diferentes de plantas (Pichersky *et al.* 2006; Dudareva *et al.* 2006; Maffei 2010).

Os compostos orgânicos voláteis constituem cerca de 1% dos metabólitos secundários vegetais conhecidos (Dudareva *et al.* 2004) e são sintetizados por rotas bioquímicas que utilizam moléculas provenientes do metabolismo primário, como Acetil-CoA e piruvato (Maffei 2010), que por meio de diversas modificações enzimáticas, como hidroxilações, acetilações e metilações, dão origem à alta diversidade de voláteis orgânicos (Dudareva 2005, Dudareva 2006).

A classe dos terpenóides é a maior, mais diversa e sintetizada (Cheng *et al.* 2007) pelos precursores DMAPP (pirofosfato de dimetilalilo) e IPP (difosfato de isopentenilo). Esses precursores são provenientes de duas rotas biossintéticas: MEP (Metileritritol fosfato) no

cloroplasto e MVA (ácido mevalônico) no citoplasma (Figura 2) (Maffei 2010). E essas rotas são formada por três moléculas de Acetil-CoA, que culmina na formação do ácido mevalônico e dos seus precursores (Dudareva 2006, Cheng *et al.* 2007). Os terpenos sintases (TPS) favorecem a síntese de monoterpenos a partir do geranyl difosfato (GDP), sesquiterpenos do farnesil difosfato (FDP) e diterpenos do geranyl geranyl difosfato (GGDP) (Pinto-zevallos, *et al.* 2013). Existe uma comunicação entre essas rotas bioquímicas, denominadas *cross-talk* e, os precursores formam os terpenóides em ambas as vias, como por exemplo, os homoterpenos que são sintetizados tanto na rota MEP quanto na MVA (Cheng *et al.* 2007).

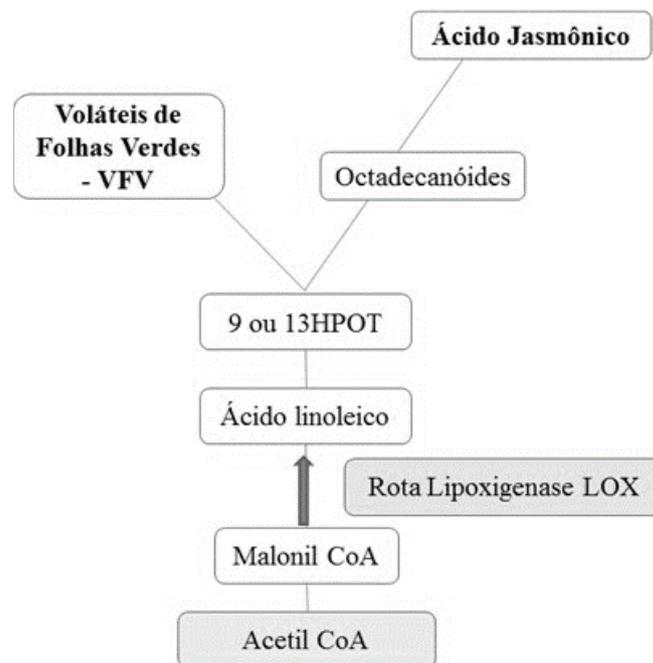
As rotas (MVA e MEP) dão origem a unidades de 5 carbonos denominadas isopreno e, por meio da união dessas unidades, ocorre a formação dos terpenos. Duas unidades darão origem aos monoterpenos, três unidades aos sesquiterpenos e assim sucessivamente (Dudareva 2006, Maffei 2010, Pinto-Zevallos *et al.* 2013, Theis 2003 e Dudareva *et al.* 2004).



**Figura 2.** Esquema resumido da biossíntese de terpenóides, adaptado de Cheng (2007) e Maffei (2010). MPE (rota do metileritritol fosfato), MVA (rota do ácido mevalônico), IPP (ipopentenil difosfato), DMAPP (dimetilalil difosfato), GPP (geranyl difosfato), GGPP (geranylgeranyl difosfato), FPP (farnesil difosfato), *cross-Talk* (termo em inglês utilizado para demonstrar que as rotas se comunicam).

Os homoterpenos têm representantes fundamentais como os TMTT e DMNT que são induzidos pela herbivoria (Pinto-zevallos, *et al.* 2013). O sesquiterpeno como  $\beta$ -Farneseno é percebido por afídeos como um feromônio de alerta. Monoterpenos, como o Limoneno, pode evitar a oviposição de muitos insetos.

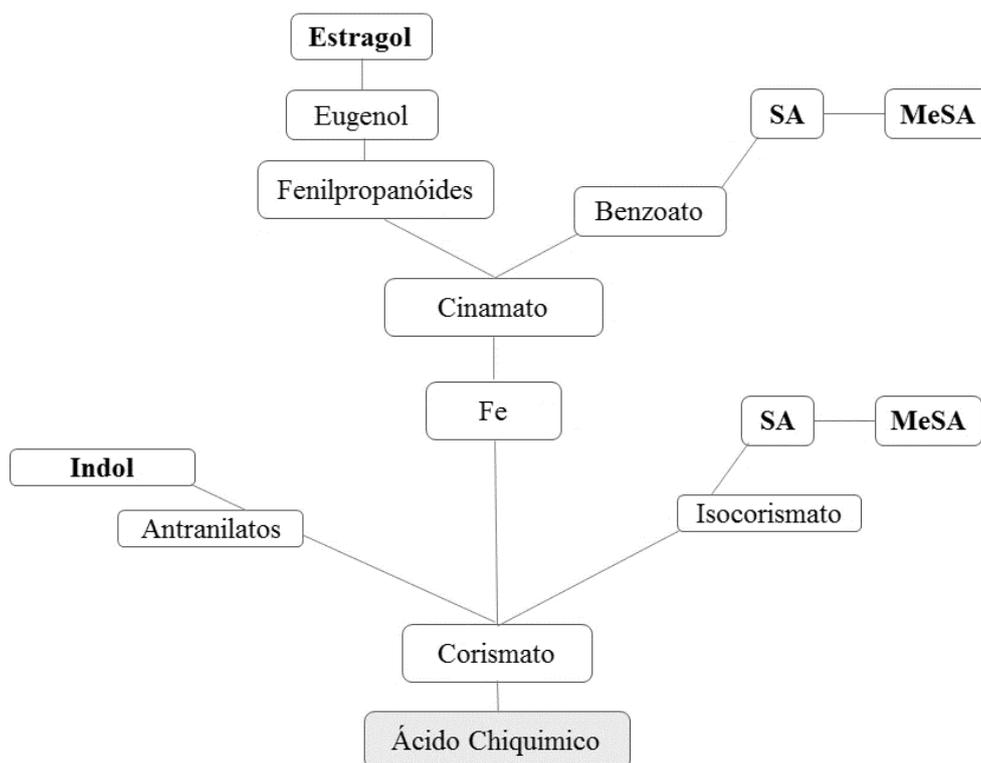
Os chamados voláteis de folhas verdes (VFV) formados principalmente por aldeídos e por álcoois contendo seis carbonos (C6), são sintetizados pela rota lipoxigenase (LOX), tendo também o Acetil-CoA como precursor (Figura 3) (Dudareva 2006, Pinto-Zevallos *et al.* 2013). O Ácido linoleico é oxidado, resultando na formação do ácido 13-hidroperoxi-linolênico (13HPOT), esse composto dá início a cascata de reações químicas que formam os voláteis de folhas verdes. Os voláteis de folhas verdes podem constituir até 50% da emissão das partes danificadas de uma planta e são rapidamente formados quando ocorre um dano em um tecido foliar, por exemplo. Por isso, também podem atuar como cicatrizantes dos tecidos (Pinto-zevallos *et al.* 2013). Dentre os VFV, o 2-Hexenal e o 3-Hexen,1-ol além de serem muito importantes nas relações ecológicas entre plantas e insetos, atuam na atração de predadores naturais (Dudareva *et al.* 2013, Dong *et al.* 2016).



**Figura 3.** Esquema resumido da rota lipoxigenase a partir do Acetil-CoA dando origem aos VFV e Ácido jasmônico. Adaptado de Dudareva *et al.* 2006 e Maffei 2010. 9 ou 13HPOT, ácido 13-hidroperoxi-linolênico.

O composto 13HPOT também é precursor da rota dos octadecanóides que sintetiza o Ácido jasmônico (JA). Esse fitohormônio é muito importante para as plantas, pois, atua estimulando a transcrição de genes de defesa, regulam as respostas e estimulam a formação de novos voláteis, o que resulta no aumento da resistência das plantas contra insetos e patógenos (Holopainen 2004, Pinto-Zevallos *et al.* 2013).

Os fenilpropanóides e benzopropanóides pertencem ao segundo maior grupo de voláteis de plantas e são derivados do aminoácido aromático fenilalanina (Fe) (Figura 4) que é sintetizado no plastídio pela rota do ácido chiquímico (Dudareva *et al.* 2013).



**Figura 4.** Esquema resumido da rota biossintética dos compostos fenilpropanóides a partir do ácido chiquímico, adaptado de Maffei (2010). Fe- Fenilalanina, SA- Ácido salicílico, MeSA- Metil salicilato.

O ácido chiquímico dá origem ao corismato que é um precursor do composto Indol, esse composto é muito relevante ecologicamente e é emitido em respostas a danos causados por herbívoros (Maffei 2010). Essa rota biossintética produz o Metil salicilato (MeSA), um dos compostos mais importantes para as plantas. Sua biossíntese advém da metilação do ácido salicílico que é sintetizado por duas vias, uma derivada do benzoato, via cinamato, e a outra por isocorismato (Maffei 2010, Dudareva *et al.* 2013, Buchanan *et al.* 2015).

Metil salicilato é um sinalizador muito importante, atrai uma gama de inimigos naturais, atua nas repostas contra patógenos e são fundamentais na resistência sistêmica adquirida que prepara a planta para futuros ataques, melhorando a resposta ao próprio ataque, ou até mesmo, evitando-o (Van Loon & Van Strien 1999; Durrant & Dong 2004).

## 2.2 Importância Ecológica dos Voláteis de plantas

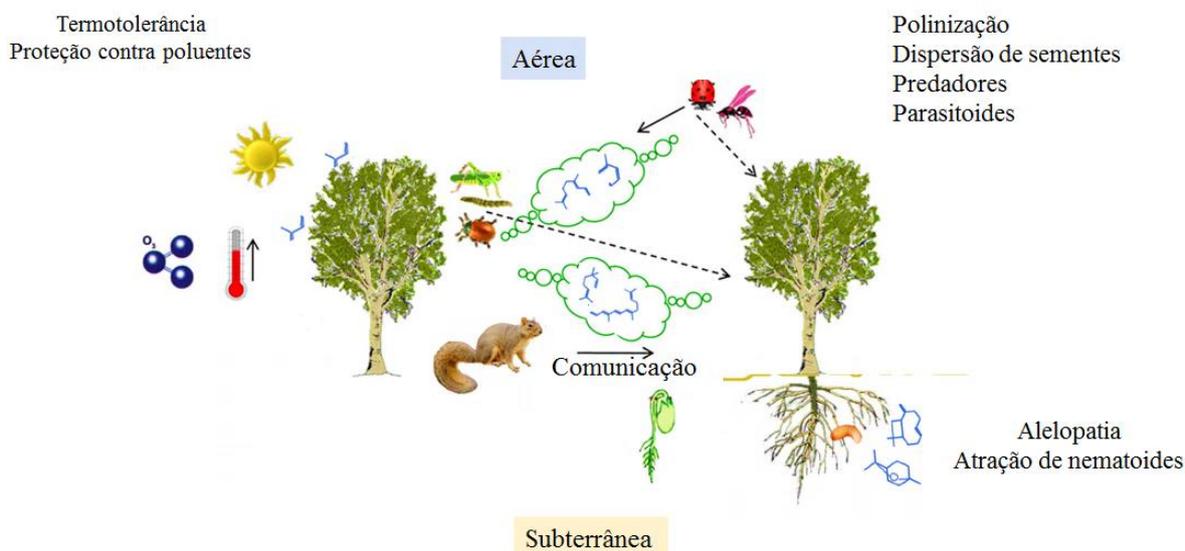
Os voláteis participam de várias interações ecológicas, tanto na parte aérea quanto na subterrânea (Figura 5). São essenciais para a reprodução das plantas, pois atraem polinizadores e dispersores de sementes, garantindo sucesso reprodutivo e evolutivo (Knudsen *et al.* 1993).

As espécies vegetais também liberam misturas distintas de voláteis a partir de órgãos como flores e frutos. Nas flores, eles são percebidos por uma vasta gama de insetos que são atraídos e orientados para os recursos alimentares dentro do órgão. Esses voláteis florais são essenciais para permitir que os insetos possam discriminar entre espécies de plantas e até mesmo entre flores individuais de uma única espécie (Knudsen & Gershenzon 2006). Além disso o buquê do nectário extrafloral atrai formigas que irão patrulhar a planta e defendê-la de possíveis herbívoros (Kost & Heil 2008, Maffei 2010). São também muito relevantes na proteção das plantas contra estresse biótico e abiótico.

Os voláteis induzidos pela herbivoria funcionam como mensageiros químicos, sendo percebidos pelos organismos ao redor, podendo atrair predadores e parasitóides que acarretarão na predação do herbívoro que está consumindo a planta (Pinto-Zevallos 2013). Por exemplo, *Tetranychus urticae*, quando se alimentam do tecido foliar, estimulam respostas nas plantas e essas emitem monoterpenos e homoterpenos que irão repelir a herbivoria e atrair os seus predadores, como o predador *Phytoseiulus persimilis* (Arimura 2004). *Pieris rapae* é espécie de lagarta, que ao consumir certas plantas, induz a formação de monoterpenos, sesquiterpenos e homoterpenos. As emissões destes voláteis são atraentes para vespas parasitóides como a *Cotesia rubecula*, que irão ovipositar nessas lagartas (Truong *et al.* 2014). Ainda, alguns voláteis emitidos pelas raízes podem atrair espécies de nematóides entomopatogênicos, e algumas interações com bactérias nas raízes podem promover a biossíntese de precursores de sesquiterpenos aumentando mais a concentração e diversidade de voláteis (Maffei 2010).

Além de serem percebidos pelos herbívoros, os voláteis mediam as interações entre plantas. O Metil salicilato, Metil jasmonato e Voláteis de folhas verdes induzem a formação de

novos voláteis em plantas que não sofreram nenhum tipo de dano por herbivoria (Das *et al.* 2012, Pinto-Zevallos *et al.* 2013). Essa comunicação entre plantas mediada por voláteis, é uma estratégia que proporciona o aumento das respostas de defesa contra a herbivoria, pois a planta está preparada para o ataque, antes mesmo que ele ocorra (Das *et al.* 2012).



**Figura 5.** Funções ecológicas dos compostos orgânicos voláteis. Adaptado de Fineschi & Loreto (2012).

Os voláteis atuam também contra o estresse abiótico, como o isopreno, protege as folhas contra o estresse fotooxidativo, por exemplo (Karnosky *et al.* 2003; Pinto-Zevallos *et al.* 2013, Buchanan *et al.* 2015). As plantas que vivem próximas à grandes focos de poluição como grandes avenidas e indústrias, estão suscetíveis a exposição à poluentes, como o ozônio ( $O_3$ ) troposférico. Esse gás poluente é um poderoso oxidante que ao penetrar nas folhas pelos os estômatos, interage com as células das plantas, interferindo em processos metabólicos, fisiológicos e celulares (Tamogami *et al.* 2008). Como é um poderoso oxidante, o ozônio eleva a produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) altamente agressivas, induzem ao dano celular por meio da degradação de proteínas, inativação de enzimas, alterações nos genes e nas rotas biosintéticas de metabólitos importantes (Tonial 2011), alterando o equilíbrio pro/antioxidante (Scandalios 1993) podendo causar a morte celular programada (Shriner & Karnosky 2003, Holopainen & Gerherzon 2010, Fineschi & Loreto 2012).

Além do seu efeito oxidante, as ERO são também sinalizadoras de rotas do metabolismo secundário, ativando a produção de compostos orgânicos que, muitas vezes, combatem o excesso de radicais no meio celular (Tamogami *et al.* 2008). Esses compostos, por serem voláteis, podem reagir com o ozônio antes que o mesmo entre no meio celular, reduzindo seu contato com o apoplasto e por consequência, minimizar a produção de ERO e seus efeitos oxidativos (Loreto & Schnitzler 2010).

Os compostos orgânicos voláteis também podem interagir nos processos químicos da atmosfera, por exemplo reagindo com o ozônio, e formando ozonidas, que sofrem rápida decomposição e geram radicais orgânicos que mediam à produção de outras espécies reativas na atmosfera, incluindo nitrato de peroxiacetila, aldeídos e ácidos orgânicos (Atkinson & Arey 2003, Carter *et al.* 2005). Eles ainda atuam como precursores do próprio ozônio e também atuam na formação de aerossol secundário (Holopainen 2004, Calfapietra *et al.* 2013). Nesse contexto, a alta reatividade dos COV pode contribuir com mudanças na composição da atmosfera podendo gerar distúrbios nas interações químicas e biológicas mediadas pelos voláteis de planta (Holopainen 2004, Yuan *et al.* 2009).

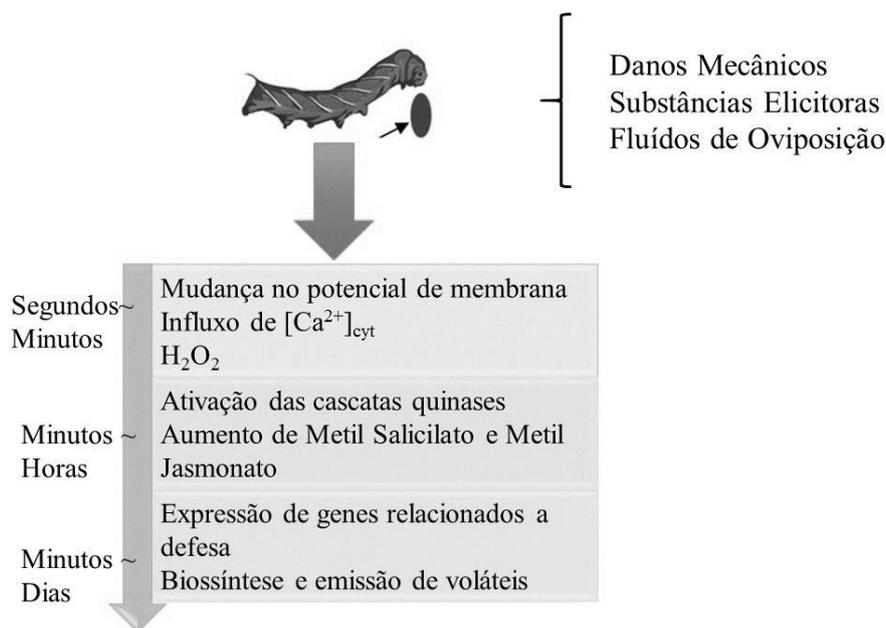
### **2.3 Estratégias de defesa**

Como já mencionado nos itens anteriores, quando se trata das interações tróficas, há substanciais evidências de que plantas atacadas por pragas induzem a formação de novos COV não produzidos por plantas saudas (Choh & Takabayashi 2006, Kost & Heill 2006). Esses voláteis, denominados voláteis induzíveis, são também sentidos pelas pragas e inimigos naturais, atuando como repelentes naturais. Os COV induzíveis são móveis dentro da planta e desencadeiam um conjunto de defesas que geram uma resposta sistêmica, sinalizando às partes saudas das plantas a presença do agente agressor (Van Loon & Van Strien 1999, Durrant & Dong 2004) promovendo assim a redução da severidade do dano (Halliwell & Guteridge 1989, Heath 2008, Bolwell & Dauli 2009, Iriti & Faoro 2009).

As plantas se “defendem” por vários mecanismos que podem ser físicos (por exemplo, espinhos e tricomas) ou químicos (compostos do metabolismo secundário). Algumas destas defesas estão sempre presentes na planta e são chamadas de constitutivas. Já outras são produzidas somente após a ativação de processos metabólicos decorrentes do estresse biótico e/ou abiótico e são chamadas de defesas químicas induzidas (Karban & Baldwin 2007).

A indução da defesa começa com respostas locais ao dano que podem desencadear diversos processos metabólicos na planta, levando a liberação dos compostos orgânicos voláteis induzíveis (Baldwin *et al.* 2006; Frost *et al.* 2007). Quando a membrana plasmática da folha tem contato com substâncias provenientes de eventos de herbivoria, fluídos de oviposição ou injúria mecânica em cerca de segundos ocorre uma mudança no potencial elétrico (Figura 6), imediatamente seguidos por alterações na concentração citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  e formação de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  nas interações planta-inseto ainda não é claro (Truong *et al.* 2014). O acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  induz diversos eventos tardios (minutos ou horas) como a ativação de cascatas quinases e sinalização para a síntese dos fitohormônios ácido jasmônico (JA) e ácido salicílico (SA).

As cascatas quinases regulam respostas e sinalizam as interações entre plantas e insetos (Fürstenberg-Häg & Bak 2013) e são dependentes de cálcio. Estão frequentemente envolvidas na transdução do sinal de uma variedade de estresses bióticos e abióticos (Drong *et al.* 2016).



**Figura 6.** Eventos de sinalização após o evento de herbivoria. Adaptado de Drong, (2016) e Fürstenberg-Häg & Bak (2013).

Também estão envolvidas na transcrição de genes de biossíntese de ácido jasmônico (JA), ácido salicílico (SA) e etileno. Esses genes também podem ser ativados por esses fitohormônios, principalmente o JA, que pode aumentar a emissão de voláteis induzidos por herbívoros. Todos esses eventos culminam em uma resposta de defesa denominada resposta sistêmica adquirida (Van Loon & Van Strien 1999, Durrant & Dong 2004) concomitantemente ao SAR, há produção de antioxidantes, derivado do ciclo ascorbato-glutationa, capazes de neutralizar o excesso de espécies ativas de oxigênio causadoras do estresse oxidativo (Conklin 2001, Kocsy *et al.* 2001, Bolweel & Dauli 2009). O peróxido de hidrogênio, etileno e óxido nítrico são também ativados como respostas defensivas da planta (Klessing *et al.* 2000; Neilli *et al.* 2001, Pinto & Tommasi 2002; Verhage *et al.* 2010).

A comunicação entre plantas, é uma das estratégias mais importantes e notáveis (Heil & Bueno 2007) pois, o fato de uma planta sadia perceber os voláteis induzidos emitidos pela sua vizinha é uma vantagem muito grande, pois essa planta saudável irá aumentar suas próprias

defesas, irá recrutar os predadores naturais e isso vai prepará-la para um futuro evento de estresse (Frost *et al.* 2008).

Por exemplo, as defesas químicas de plantas saudáveis de *Populus deltoides* sinalizadas pelo conteúdo total de fenólicos é aumentada pela ação dos voláteis metil jasmonato e o metil salicilato liberados por plantas danificadas (You *et al.* 2006). Esses voláteis podem alcançar plantas à longa distância da fonte emissora e agir nas respostas sistêmicas adquiridas dessas plantas, ativando as rotas de defesas químicas (Heil & Ton 2008). A comunicação entre plantas também pode interagir na transcrição de genes de defesa, por exemplo, plantas de *Arabidopsis* saudáveis quando têm contato com voláteis de folhas verdes induzidos, iniciam a transcrição de genes envolvidos nas respostas de defesa (Pinto-Zevallos, *et al.* 2013). Baldwin, *et al.* (2006) verificou que *Artemisia Tridentata* sofreu menor dano por herbivoria quando estava ao lado de *Nicotiana attenuata* sob herbivoria.

Ainda, a comunicação entre plantas pode influenciar o comportamento dos herbívoros, como reportado por Bruin *et al.* (1992), em que plantas de algodão saudáveis próximas de plantas de algodão infestadas por *T. urticae* liberaram compostos de defesa que atraíram os predadores deste herbívoro, o que culminou em redução na taxa de oviposição desses herbívoros em plantas de algodão expostas a voláteis a partir de mudas infestadas.

Resumindo, um número crescente de estudos em laboratório sobre diferentes espécies de plantas sugerem fortemente que as plantas percebem os sinais voláteis. Além disso, os estudos relatados pela literatura revelaram que a exposição a compostos orgânicos voláteis (COV) induzidos por herbívoros resulta em mudanças na abundância de fitohormônios (MeJA e MeSA), bem como no aumento da produção de outros metabólitos tais como inibidores de proteinase, terpenóides ou compostos fenólicos (Baldwin *et al.* 2006).

## 2.4 Estudo dos Voláteis em plantas nativas

Os estudos de compostos voláteis no Brasil estão em expansão e são uma importante perspectiva para o futuro da agricultura e proteção do meio ambiente, na tentativa de desvendar as relações entre plantas e insetos mediadas pelos voláteis, podendo permitir um futuro com menos agrotóxicos, mais sustentável e menos agressivo para os ecossistemas. O principal interesse tem sido em voláteis como mediadores da localização de plantas por herbívoros, sobretudo visando o manejo de pragas agrícolas (Moraes *et al.* 2008, Penãflor *et al.* 2011).

Porém estudos de voláteis com plantas brasileiras são escassos (Souza *et al.* 2002). Bracho-Nunez e colaboradores (2013) realizaram um estudo na Amazônia e verificaram que espécies tropicais emitem uma diversidade grande de voláteis. Como a espécie *Hevea guianensis* que emite o composto  $\alpha$  Pineno, *Hevea brasiliensis* que emite uma alta gama de monoterpenos, como Limoneno, Sabineno,  $\beta$ -Pineno, Camfeno, p-Cimeno, Mirceno,  $\alpha$ -Pineno e  $\alpha$ -Felandreno. O autor não encontrou sesquiterpenos para essas espécies, e relatou o isopreno como o composto de maior contribuição para o buquê emitido pela floresta, seguido de monoterpenos e metanol.

Outros estudos com plantas nativas mostraram que *Croton lundianus* e *Croton glandulosus* emitem grandes quantidades de monoterpenos como Linalol e Bourboreno, e sesquiterpenos como (E)-Nerolidol, Cariofileno e Humuleno (Neto *et al.* 1994) De Araújo-Neves & Da Camara (2012), verificaram que os sesquiterpenos Humuleno e Aromadendreno são os mais abundantes na composição de óleos do gênero *Croton*.

No Brasil, a diversidade de espécies vegetais é muito alta e isso favorece a exploração dos metabolitos secundários de plantas com efeitos derretentes e tóxicos contra insetos e ácaros, como as espécies *Eremanthus goyazensis* (Asteraceae) e *Protium bahianum* (Burseraceae), que são estudadas e demonstram ter o potencial de controlar a proliferação de ácaros em pesquisas feitas no país (Pinto-Zevallos & Zarbin 2013).

## 2.5 *Croton floribundus* Spreng

A família Euphorbiaceae possui cerca de 300 gêneros e 7.500-9.000 espécies (Webster 1993, Berry 2005) sendo um dos grupos taxonômicos mais complexos e morfologicamente diversos entre as eudicotiledôneas (Neto 2011). De distribuição em ambientes tropicais e subtropicais no Brasil, existem cerca de 70 gêneros e 1.100 espécies (Souza & Lorenzini 2005).

O gênero *Croton* L é um dos maiores da família Euphorbiaceae com cerca de 1.300 espécies e divididas em 40 seções (Webster 1993). O Brasil é o país que abriga o maior número de espécies do gênero, cerca de 350 espécies (Berry *et al.* 2005). Ocorrem comumente em fragmentos florestais impactados (Moura 2013) e são encontrados em área pantrópica, ou seja, distribuída nos continentes americano, africano e asiático.

*Croton floribundus* Spreng é uma planta nativa e pioneira, crescendo na fase jovem da mata (Lorenzi 1992). Muitas espécies de *Croton* crescem, predominantemente, em locais perturbados tais como beira de estradas, margem de rios e clareiras de matas (Cardoso-Gustavson *et al.* 2014). Essas e outras características ecológicas, como a produção massiva de flores e frutos, fazem dos membros do gênero candidatos ideais para a restauração de florestas degradadas (Carrenho *et al.* 1997, Lopes *et al.* 2012).

Neto (2000) verificou que as alterações antrópicas nas florestas geram clareiras e que os representantes da família Euphorbiaceae apresentaram o maior número de espécies arbustivo-arbóreas que irão regenerar essas áreas degradadas, dentre essas espécies, o *C. floribundus* se destacou apresentando maior aptidão para regeneração natural total da área.

Segundo Domingos *et al.* (2015), as características anatômicas e morfológicas da folha, lhe conferem capacidade de resistir mais ao ataque dos herbívoros. Muitos tricomas unisseriados e tricomas não-secretores estrelados são distribuídos pela parte adaxial e abaxial respectivamente e já foram descritos pela literatura como fatores que dificultam os eventos de herbivoria (Voigt, Gorb e Gorb 2007).

Ainda, Euphorbiaceae é um grupo com grande potencial de novas moléculas, principalmente de óleos essenciais (Matos 1989 *aphud* Neto 2011). Tais informações ainda são escassas principalmente para o gênero *Croton* (Neto 2011).

## **2.6 *Tetranychus urticae***

*Tetranychus urticae* Koch, é conhecido popularmente por ácaro rajado, o qual é considerado praga para inúmeras culturas economicamente importantes em todo o mundo, é descrito como praga de mais de 150 culturas de importância econômica, dentre 1.200 espécies de plantas em 70 gêneros (Zhang 2003).

As culturas mais prejudicadas pela predação desse ácaro são principalmente, algodão, feijão, mamão, soja, tomate e morango (Sato 2002).

Esta espécie ataca principalmente a face abaxial das folhas, essas folhas demonstram manchas branco-prateadas na face inferior e certa quantidade de teia (Sato, 2002). Já pela face superior aparecem áreas inicialmente cloróticas, que se escurescem, em seguida, as folhas secam e caem, com conseqüente prejuízo do aparato fotossintético (Moraes & Flechtmann 2008). Além das folhas, o *T. urticae* causa danos as flores, prejudicando a comercialização de plantas ornamentais, por exemplo.

O controle populacional do *T. urticae* é prioritariamente baseado em uso de inseticidas, acaricidas e defensores químicos, cujo impacto ambiental pode ser bastante significativo (Van Leeuwen *et al.* 2010). No entanto, devido ao seu curto ciclo de vida e taxas altas de reprodução, ele é capaz de desenvolver resistência a estes compostos muito rapidamente. Mesmo quando aplicações regulares de defensores químicos são realizadas, muitas vezes existem casos em que o controle de ácaros mostra-se ineficiente. Pressupõe-se que essa ineficiência está associada ao desenvolvimento da resistência dos ácaros aos defensores químicos (Sato *et al.* 2009). Ainda, devido ao uso dessas substâncias químicas, tende a ocorrer problemas de ressurgência das pragas, devido à eliminação dos inimigos naturais (Van de Vrie *et al.* 1972 *aphud* Sato *et al.* 2009). Devido a essas características dessa praga, faz-se necessário o uso de medidas

alternativas de controle populacional, como o uso de controle biológico, armadilhas químicas (feromonios, voláteis naturais e sintéticos).

### 3. Justificativa e Objetivos

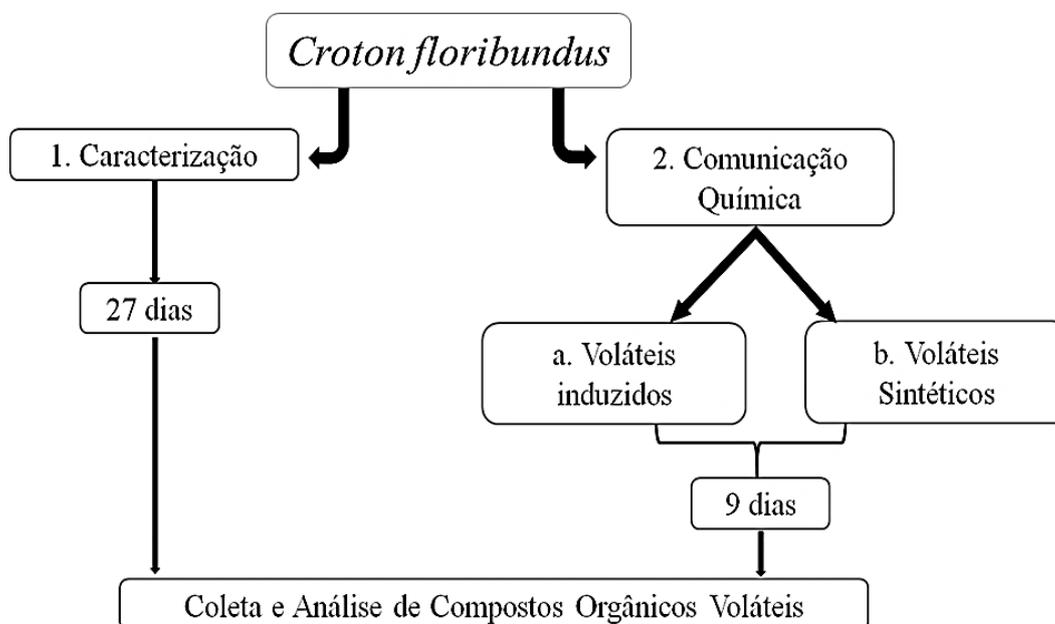
Considerando que os voláteis de plantas infestadas por herbivoria são atuantes no mecanismo de comunicação entre plantas, por permitirem que as plantas sadias se coloquem em um estado de alerta, preparando suas defesas químicas contra um futuro ataque, buscou-se no presente estudo **verificar se os voláteis emitidos por *Croton floribundus* infestado por *Tetranychus urticae* são capazes de ativar respostas de defesas, ao nível de voláteis, em indivíduos de *C. floribundus* saudáveis**. Para tanto, os seguintes objetivos foram traçados:

- ✓ Caracterizar os compostos orgânicos voláteis emitidos pelo limbo foliar de *Croton floribundus* exposto à *T. urticae*;
- ✓ Avaliar se os voláteis induzidos (VI) por *Croton floribundus* exposto à *T. urticae* apresentam respostas de defesas química em indivíduos saudáveis de *C. floribundus*, indicando um processo de comunicação;
- ✓ Verificar se o mesmo processo de comunicação química ocorre quando plantas saudáveis estão em contato com voláteis sintéticos (VS) que mimetizam o *buquê* de voláteis induzidos (VI) por *T. urticae*;

## 4. Material e Métodos

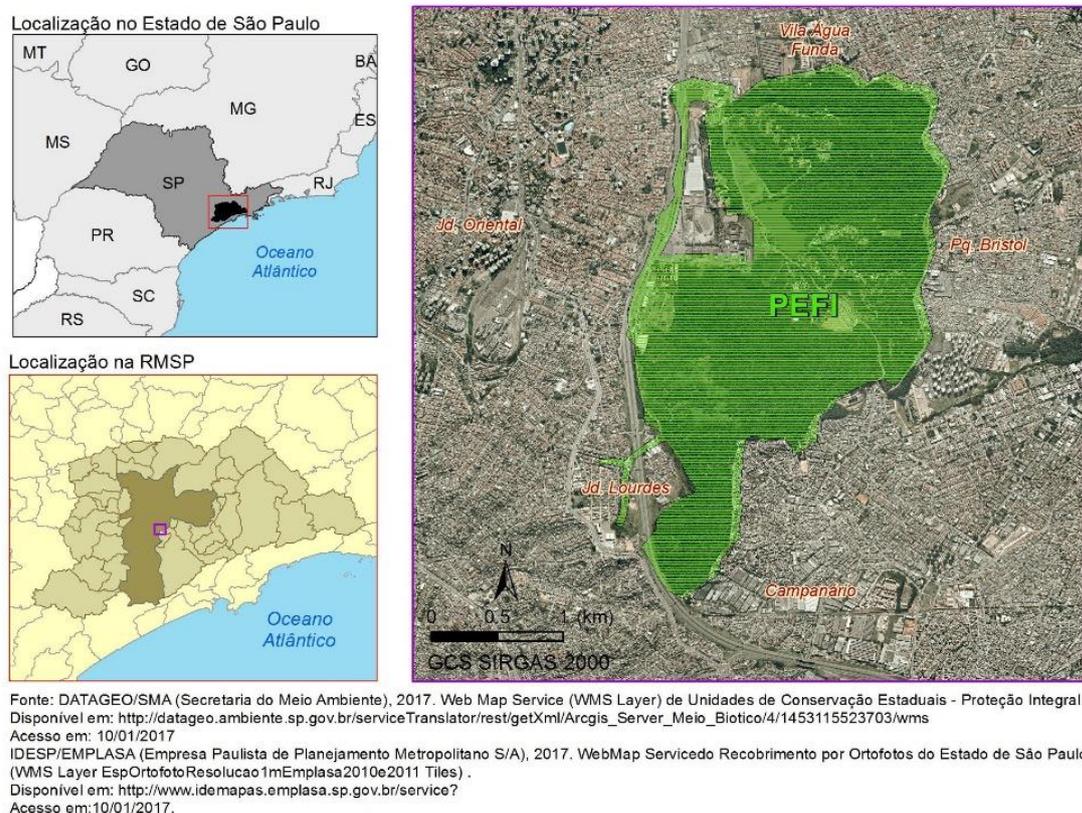
### 4.1 Delineamento Experimental

Esse trabalho foi dividido em duas etapas experimentais que estão ilustradas na Figura 7. A primeira etapa, designada caracterização dos Compostos orgânicos voláteis (COV), visou identificação e quantificação dos voláteis emitidos por *Croton floribundus* Spreng sob ação de *Tetranychus urticae* Koch. A segunda etapa foi o estudo de comunicação entre plantas que consistiu em plantas saudáveis receptoras em contato com voláteis de induzidos pela infestação de ácaros (VI) e voláteis sintéticos (VS).



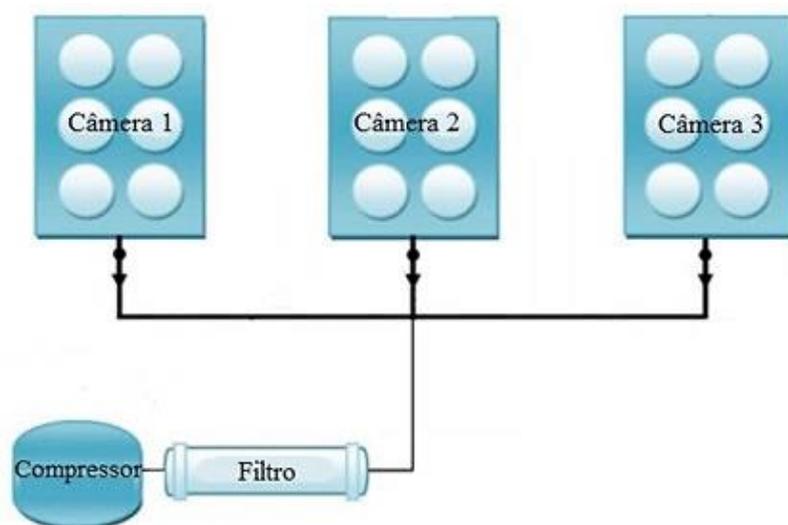
**Figura 7.** Fluxograma representando as etapas experimentais desenvolvidas.

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Interação Atmosfera-Planta (LABIAP) do Núcleo de Pesquisa em Ecologia, Instituto de Botânica de São Paulo localizado no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga – PEFI (Figura 8).



**Figura 8.** Localização do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga dentro da Região metropolitana de São Paulo.

O cultivo das plantas de *C. floribundus* e dos *T. urticae* foi realizado rotineiramente ao longo do desenvolvimento do projeto. Os experimentos foram todos realizados no LABIAP, em um sistema de Câmaras de fumigação, conectado a tubos teflon, compressor e sistema de filtro de ar (Figura 9) (Souza & Pagliuso 2009). As câmaras são revestidas por Teflon e aço inoxidável e possuem volume de 1m<sup>3</sup>, estas são conectadas a um filtro que remove material particulado (Whatman 40), seguido de sílica em gel (150 g, Merck) que diminui a umidade do ar, carvão ativado (250 g, Merck) que remove compostos orgânicos e poluentes atmosféricos e carvão ativado impregnado com pergamanato de potássio (500 g, Purafil Select). O filtro é interligado a um compressor que promove um influxo de 20 L/min de ar filtrado.



**Figura 9.** Esquema de Câmaras de fumigação, adaptado de Souza e Pagliuso (2009).

Para todos os experimentos o fotoperíodo foi de 8 horas de luz diária e foi mantido por lâmpadas que possuem um espectro de radiação o mais próximo da luz solar, com radiação fotossinteticamente ativa de  $422 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ , umidade relativa de  $67,3 \pm 5,2$ , e temperatura  $27 \pm 2$  °C.

#### 4.2 Caracterização dos compostos orgânicos voláteis em *C. floribundus* sob herbivoria de *T. urticae*

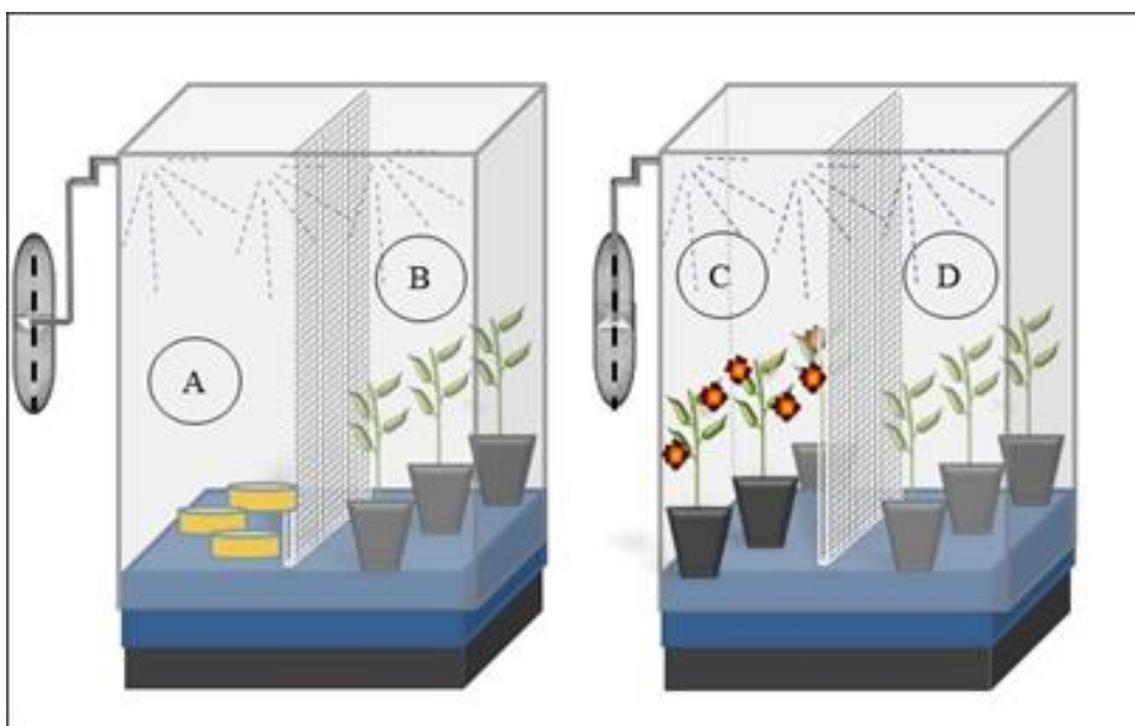
Plântulas de *Croton floribundus* foram aclimatadas no laboratório LABIAP por dois dias antes do início da exposição ao *T. urticae*. Após esse período, 200 indivíduos de *T. urticae*, considerando macho e fêmea, foram dispostos de maneira aleatória nos limbos foliares de *C. floribundus*.

Os indivíduos foram selecionados por lupa Zeiss Stereo Discovery.V8 e transportados das folhas de *Phaseolus vulgaris* para *C. floribundus* com auxílio de um pincel (tamanho 0). 14 plantas foram infestadas e colocadas em duas câmaras, outras cinco plantas foram controle e ficaram em uma câmara sem contato com herbivoria, todas as câmaras ficaram sob fluxo de ar constante proveniente do compressor.

Após 4 dias de contato com os ácaros, as plantas foram submetidas a coleta de compostos orgânicos voláteis (COV). As plantas foram escolhidas de maneira randômica e seus voláteis foram coletados ao longo de 27 dias.

#### 4.3 Comunicação Química de *C. floribundus*

Para o estudo de comunicação química de *Croton floribundus* foram realizados dois experimentos distintos: a) voláteis sintéticos impregnados em lanolina e b) voláteis induzidos de *Croton floribundus* por *T. urticae* (Figura 10). Todas as plantas foram aclimatadas por dois dias no LABIAP antes de serem submetidas aos tratamentos.

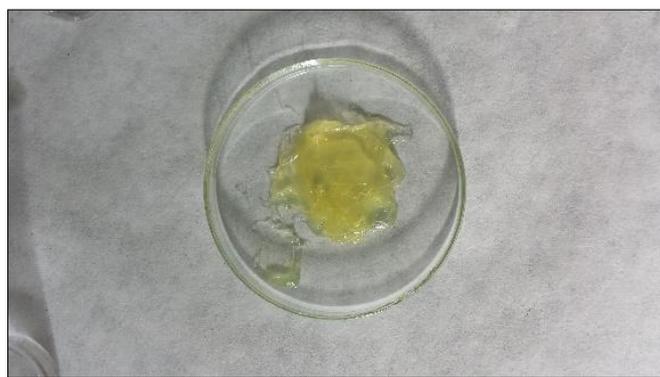


**Figura 10.** Esquema representativo do experimento de comunicação química. A- Representa as placas de petri contendo mistura de voláteis sintéticos impregnados em lanolina. B- Representa os indivíduos de *Croton floribundus* sadios em contato com os voláteis sintéticos. C- Representa os indivíduos de *Croton floribundus* infestado com *T. urticae*. D- Representa os indivíduos saudáveis receptores em contato com os voláteis provenientes das plantas infestadas. Seta- Representa a tela de náilon que separa a câmara ao meio, necessária para evitar o contato de plantas infestadas com plantas receptoras saudáveis.

a) *Voláteis sintéticos*

O experimento de comunicação química mediado por voláteis sintéticos foi realizado com padrões de voláteis. A seleção dos compostos sintéticos foi realizada com base nos voláteis induzidos caracterizados e identificados na etapa 1.

As concentrações e os compostos presentes nas misturas estão apresentadas na tabela 1. 5  $\mu$ l de cada mistura foi injetado em 1 grama de lanolina pura (Sigma-aldrich, USA) acondicionada em placa de petri (Figura 11), obtendo-se uma mistura de voláteis contendo 1 mg de cada composto. Três placas de petri foram preparadas e introduzidas nas câmaras, conforme apresentado na figura 9.



**Figura 11.** Placa de petri contendo misturas de voláteis impregnadas em lanolina.

As placas foram colocadas do lado esquerdo da câmara e três plantas do lado direito, separadas pela tela de náilon (Figura 10). As placas de lanolina foram preparadas diariamente. O experimento foi conduzido intermitentemente por um período de 10 dias.

Os voláteis provenientes do limbo foliar das plântulas de *C. floribundus* utilizadas no experimento foram coletados antes do início da exposição aos voláteis sintéticos e diariamente durante todo o tratamento. Todos os dias as plantas foram submetidas à coleta de compostos orgânicos voláteis. Três repetições foram realizadas.

#### b) *Voláteis induzidos por T. urticae*

Para comunicação química mediada por voláteis induzidos por herbivoria, três plântulas de *Croton floribundus* foram infestados com 200 indivíduos fêmeas de *T. urticae* e colocados do lado esquerdo da câmara, e três plântulas sadias de *C. floribundus* foram adicionadas no lado direito da mesma câmara. Os lados foram separados por tela de náilon para evitar o contato de *C. floribundus* receptoras com infestadas (Figura 10), impedindo assim a passagem de *T. urticae* para indivíduos sadios.

Apenas fêmeas adultas foram utilizadas nesse experimento, pelo fato delas consumirem maior quantidade de tecido foliar (Silveira 2013) e, portanto, induzirem maiores respostas de defesa. A exposição foi realizada com indivíduos de *C. floribundus* sadios, denominados receptores, e infestados com *T. urticae*, denominados emissores. Voláteis provenientes do limbo foliar dos indivíduos de *C. floribundus* utilizados no experimento foram coletados antes do início da exposição e, em seguida a coleta dos voláteis ocorreu diariamente em todos os indivíduos de *C. floribundus* por um período de 10 dias. Três repetições foram realizadas.

#### 4.4 Cultivo de *C. floribundus*

Indivíduos jovens de *Croton floribundus* Spreng foram adquiridas em viveiro (Bioflora, São Paulo). Estes foram transplantadas para vasos plásticos contendo o substrato tipo Eucatex Plantmax misturado com vermiculita na proporção de 3:1. Em seguida as mudas foram acomodadas em casa de vegetação ar filtrado e temperatura média de 27°C controlada por meio de ar condicionado (Figura 12), quinzenalmente as mudas recebiam 100 ml de solução nutritiva do tipo *Hoagland*. Após seis semanas de crescimento e desenvolvimento em casa de vegetação com ar filtrado as plantas foram selecionadas e uniformizadas por altura da parte aérea e expostas aos diferentes tratamentos.



**Figura 12.** Casa de vegetação em que as plântulas de *C. floribundus* foram cultivadas. a) visão externa; b) visão interna.

#### 4.5 Cultivo do *T. urticae*

O *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) (Figura 13) foi selecionado por ser um herbívoro sugador generalista e que, em testes preliminares realizados na Universidade Federal de Lavras, no laboratório do prof. Dr. Martin Pareja, mostrou excelente adaptação em plantas de *C. floribundus*, alimentando-se de suas folhas sem nenhuma restrição. Esse herbívoro perfura células do mesófilo, danificam as clorofilas e geram cloroses e necroses nos limbos foliares, causando perda de tecido foliar, diminuição da fotossíntese e do *fitness* da planta (Grbić *et al.* 2011, Bensoussan *et al.* 2016).



**Figura 13.** *Tetranychus urticae* Koch.

Para o cultivo do herbívoro plantas de *Phaseolus vulgaris* e *Canavalia ensiformis* foram utilizadas, os ácaros foram cultivados em folhas individuais em placas de petri (Figura 14) e dispersos nas plantas como um todo.



**Figura 14.** Cultivo de *T. urticae* em folha de *Canavalia ensiformis* sob espuma umedecida com água destilada e circundada com algodão para manter as condições de umidade e temperatura adequadas de cultivo.

Os ácaros ficaram confinados no centro da folha de *C. ensiformis* sobre uma esponja de 1 cm de espessura que estava no fundo de uma placa de petri de 20 cm de diâmetro, que foi mantida aberta e diariamente umedecida com água. As margens das folhas foram cobertas por uma camada de algodão, que também foram umedecidas. Esse sistema é importante para manter a turgescência das folhas e evitar que os ácaros escapem (Silveira 2013). As folhas foram trocadas semanalmente.

Para aumentar a população de ácaros rapidamente, eles também foram cultivados diretamente na planta de *Phaseolus vulgaris* sem confinamento, podendo se dispersar por meio de suas teias para outros indivíduos, estes indivíduos permaneceram dentro de gaiolas de náilon.

Três vezes por semana a população de ácaros foram observadas na Zeiss Stereo Discovery.V8 para acompanhar a reprodução e desenvolvimento dos indivíduos. Além disso, o controle na lupa permitiu eliminar predadores que eventualmente foram encontrados ao longo do cultivo dos ácaros.

#### **4.6 Voláteis sintéticos**

Os resultados da etapa 1 (Caracterização dos voláteis) subsidiaram o preparo dos voláteis sintéticos, em que os cálculos das concentrações foram baseados nas respostas do *Croton floribundus* infestado.

Os voláteis sintéticos foram adquiridos pela Sigma-aldrich, Alemanha e todos apresentaram pureza superior 99% (Tabela 1). Para obtenção da mistura final a ser aplicada no estudo, foram realizadas diluições a partir de uma solução estoque de concentração de 2mg/ml, e a partir dessa solução, foi preparado uma solução metanólica de 200 ng/μl que foi utilizada nos experimentos da etapa 2. Para evitar a perda dos compostos por volatilidade, optou-se a preparar quatro misturas (Mix) de voláteis em vez de uma. Os compostos de cada mistura foram selecionados com base nas suas diferenças no tempo de retenção (Tabela 1) compostos com

tempo de retenção muito próximos foram evitados em uma única mistura. Foram preparadas 4 misturas de voláteis, denominados mix 1, mix 2, mix 3 e mix 4 (Tabela 1).

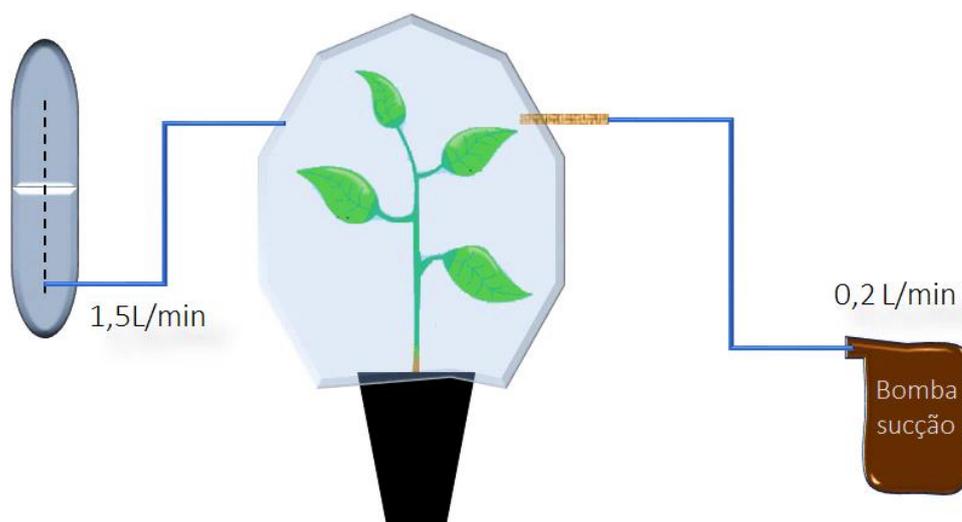
**Tabela 1.** Voláteis sintéticos utilizados no experimento de comunicação química e seus respectivos tempos de retenção.

	<i>Compostos Sintéticos</i>	<i>Tempo de Retenção</i>	<i>Concentração</i>
<i>Mix 1</i>	Cis-3-hexen-1-ol	8,32	42,30 ng/ $\mu$ l
	Nonanal	17,17	41,35 ng/ $\mu$ l
	Cis-3-hexenil acetato	13,57	42,30 ng/ $\mu$ l
	Ocimeno	15,06	40,00 ng/ $\mu$ l
	Metil Salicilato	20,04	58,70 ng/ $\mu$ l
	$\alpha$ - Farneseno	30,38	40,65 ng/ $\mu$ l
<i>Mix 2</i>	1-octen-3-ol	13,70	41,95 ng/ $\mu$ l
	Cis -Geraniol	21,85	43,90 ng/ $\mu$ l
	6-metil 5-hepten-2-ona	27,49	42,90 ng/ $\mu$ l
	3- Careno	11,23	43,35 ng/ $\mu$ l
<i>Mix 3</i>	Cariofileno	24,19	42,90 ng/ $\mu$ l
	$\alpha$ -Pineno	11,11	45,25 ng/ $\mu$ l
	Cis – 3 Hexenil isovalerato	16,32	44,45 ng/ $\mu$ l
<i>Mix 4</i>	(-)- $\beta$ -Pineno	12,51	43,60 ng/ $\mu$ l
	Limoneno	14,34	42,05 ng/ $\mu$ l
	(-)-Linalol	17,4	42,09 ng/ $\mu$ l
	Decanal	20,34	41,50 ng/ $\mu$ l
	(+)Aromadendreno	27,83	45,60 ng/ $\mu$ l

#### 4.7 Coleta e análise de Compostos Orgânicos Voláteis (COV)

Para a realização da coleta dos voláteis as plantas foram inseridas em sacos de polietileno, com papel alumínio recobrindo o vaso para dificultar a passagem de voláteis liberados pelo solo. O saco de polietileno possui duas aberturas, uma delas está conectada a um compressor com fluxo de entrada de 1,5 L/min, previamente filtrado por carvão ativado, sílica e peneira molecular impregnada com pergamanato de potássio.

A extremidade oposta foi conectada a um tubo de inox contendo 100mg de Tenax TAmesh 60/80 interligada a uma mangueira de silicone a uma bomba de vácuo com fluxo regulado para 0,2 L/min (Figura 15). O período de amostragem dos voláteis foi de 1h 30min ao final da amostragem os limbos foliares foram pesados (Massa fresca), deixados em estufa a 60° por 48h e pesados novamente (Massa seca).



**Figura 15.** Figura esquemática da coleta de compostos orgânicos voláteis. Adaptado de Bison (2015).

Os voláteis amostrados foram desorvidos em nitrogênio gasoso por sistema de dessorção térmica, turbo matrix 650 ATD da Perkin Helmer, e automaticamente analisados em cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-MS, Agilent 5977, USA). As análises foram desenvolvidas em uma coluna tendo sido utilizada em HP-6 (5% fenil metil silicone), em rampa de temperatura de 46°C mantida por 5 min até 150°C, com gradiente de temperatura de 20°C por minuto a 250°C e mantida por 5 minutos. O quadrupolo foi operado em ionização eletrônica a 60 eV, com fonte de temperatura de 200°C e interfase 220, com continuo scan de m/z 40 a 500.

Os voláteis foram identificados pela biblioteca NIST e quantificados por comparação com padrões de concentrações conhecidas. Para os compostos em que não havia disponibilidade de padrões, a quantificação foi realizada com base na curva do  $\alpha$ -Pino.

As curvas de calibração foram construídas nas concentrações de 80, 150 e 250 ng/ $\mu$ l aproximadamente. Os padrões utilizados nas curvas foram 1-octen-3-ol, Cis geraniol, 6-metil-5-hepten-ona, 3-careno, Farneseno, Cis-3-hexen-1-ol, Metil salicilato, Nonanal, 3-Hexen-1-ol acetato, Ocimeno,  $\alpha$  Pino, Cariofileno, Cis 3-hexenil valerato,  $\beta$ -Pino, D-limoneno, Linalol, Decanal e Aromadendreno.

Os voláteis foram expressos em nanograma (ng) de compostos coletado em um dado horário (h) e por grama de massa seca (DW- termo em inglês comumente utilizado, *dried weight*).

#### 4.8 Tratamento de dados

Para detecção dos principais compostos que contribuem para o buquê de voláteis induzidos, foi realizado a comparação entre as médias dos voláteis de *C. floribundus* infestado por *T. urticae* e seu controle, utilizando a análise de dissimilaridade (SIMPER) por meio do software Primer 6.0 (Plymouth Marine Laboratory, UK) (Clarke e Gorley 2006).

As respostas diárias das plantas receptoras aos voláteis induzidos (VI) e sintéticos (VS) foram comparadas individualmente com o seu controle por meio de teste *T* de *student*, com nível de significância de 0.05, utilizando o software SPSS (USA).

Os dados foram transformados em  $[\log(x+1)]$  com o objetivo de minimizar a heterogeneidade da variância. A utilização do log é recomendável quando os valores são muito pequenos e próximo de zero (Zar 1999).

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1 Caracterização dos voláteis

Foram identificados 24 voláteis orgânicos emitidos por *Croton floribundus* considerando o tratamento sob herbivoria de *T. urticae* e o controle (Tabela 2), sendo diferenciados por suas classes químicas: Monoterpenos, Sesquiterpenos, Voláteis de folhas verdes (VFV), além de outros compostos, que foram agrupados em diferentes classes químicas.

Os monoterpenos foram os compostos mais emitidos por *Croton floribundus* sob herbivoria. O 3-Careno e o Linalol foram os compostos que apresentaram maior taxa de emissão na exposição. A somatória diária da taxa de emissão do 3-Careno foi 4 vezes maior que o seu controle (Tabela 2). Dentre os sesquiterpenos, os compostos  $\alpha$ -Farneseno,  $\alpha$ -Cubebeno,  $\alpha$ -Copaeno, Cariofileno e  $\gamma$ -Elemeno foram majoritariamente induzidos pela herbivoria, apresentando uma taxa de indução até 25 vezes maior que o seu controle, como o  $\alpha$ -Farneseno. Contrariamente aos Mono e Sesquiterpenos, os VFV não foram amplamente induzidos pela herbivoria, exceto para cis 3-Hexenil valerato e 3-Hexen-1-ol benzoato. Ainda, os aldeídos 3-Hexanal e 2-Hexanal, bem como o álcool 3-Hexen-1-ol foram inibidos na presença de herbivoria.

Os outros compostos, que possuem diversas classificações químicas, dentre elas aldeídos, ésteres e monoterpenos oxigenados e acetatos, também apresentaram taxa de emissão significativa em relação ao seu controle. O metil salicilato (MeSA) e metil jasmonato (MeJA) foram os majoritariamente induzidos.

**Tabela 2.** Somatória dos valores médios diários dos voláteis expressos em ng.g.MS<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup> emitidos por *C. floribundus* no período de vinte sete dias. CON (controle); TUR (exposição à *T. urticae*).

<i>Monoterpenos</i>		
	CON	TUR
$\alpha$ -Pineno	25,13	22,98
$\alpha$ -Felandreno	28,46	9,18
Limoneno	15,97	5,30
3-Careno	211,37	999,20
Linalol	45,18	58,50
Geranyl Acetona	40,09	22,22
<b>TOTAL</b>	<b>366,2</b>	<b>1117,38</b>
<i>Sesquiterpenos</i>		
$\alpha$ -Cubebeno	1,12	7,12
$\alpha$ -Copaeno	48,30	118,90
$\beta$ -Bourboreno	10,40	4,95
Cariofileno	126,24	202,59
$\gamma$ Elemeno	75,62	117,62
$\alpha$ - Farneseno	8,30	229,00
<b>TOTAL</b>	<b>269,98</b>	<b>680,18</b>
<i>Voláteis das Folhas Verdes</i>		
2-Hexenal	2,78	1,06
3-Hexen-1-ol	337,72	169,21
Ácido Valérico	21,36	50,72
3-Hexen-1-ol benzoato	17,88	60,76
<b>TOTAL</b>	<b>379,74</b>	<b>281,75</b>
<i>Outros</i>		
Metil Salicilato	328,28	649,04
Metil Jasmonato	6,35	31,32
Nonanal	55,54	25,37
Decanal	73,74	42,27
Nerolidol	44,57	64,94
Nerolidil Acetato	25,94	54,37
<b>TOTAL</b>	<b>534,42</b>	<b>867,31</b>

A Tabela 3 apresenta os compostos que diferenciaram os tratamentos via Simper. Dentre eles, o 3-Careno, MeSA, 3-Hexen-1-ol,  $\gamma$ -Elemeno, Cariofileno,  $\alpha$ -Copeno, Linalol e Nerolidil acetato contribuíram para 60% do acumulativo da dissimilaridade. Já os compostos 3-Hexen-1-ol benzonato, 3-Hexenil valerato, Nerolidol e  $\alpha$ -Faneseno contribuíram minoritariamente para dissimilaridade. Todos esses compostos foram induzidos pela herbivoria, exceto o 3-Hexen-1-ol.

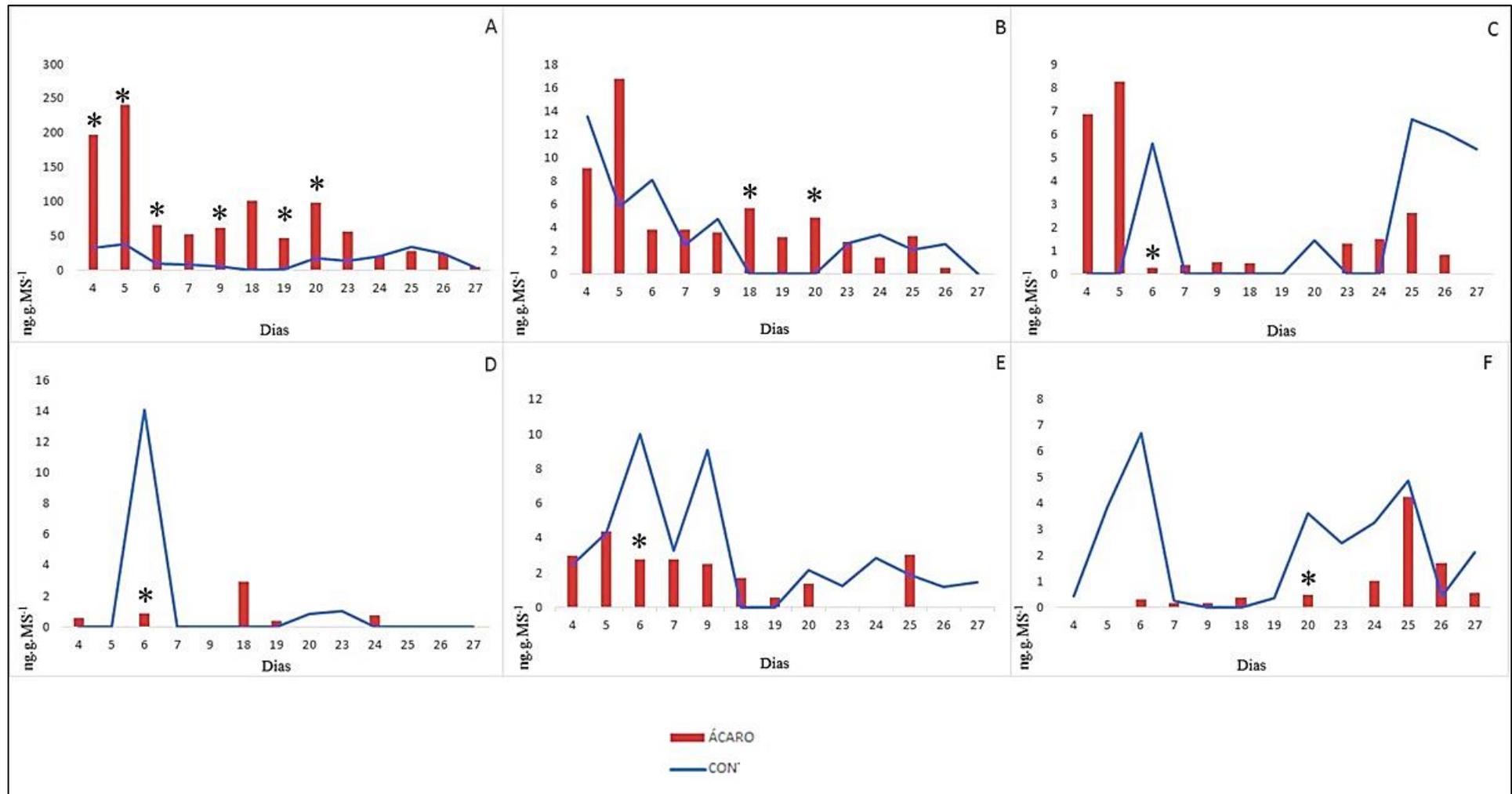
O *T. urticae* é um herbívoro generalista e infesta muitas espécies de plantas como feijão (Dicke *et al.* 1990), maçã (Takabayashi *et al.* 1991) e tomate (Dicke *et al.* 1998), por exemplo. Sabe-se que plantas infestadas por *T. urticae* induzem voláteis que são atrativos para o seu predador natural *Phytoseiulus persimilis* (Van Den Boom *et al.* 2003). Van Den Boom *et al.* (2003) em seu estudo encontrou voláteis semelhantes aos emitidos por *Croton floribundus* quando estava infestado por *T. urticae*, como no caso da soja, que emitiu Metil salicilato e  $\alpha$  Farneseno, Cariofileno e Linalol.

**Tabela 3.** Dissimilaridade dos compostos emitidos por plantas do controle e tratamento e comparação entre eles. Resultados via SIMPER. Valores expressos em porcentagem (%).

Compostos	Contribuição	
	Contribuição %	Acumulativa %
3-Careno	12	12
Metil salicilato	9,99	21,99
3-Hexen-1-ol	8,07	30,06
$\gamma$ Elemeno	7,47	37,53
Cariofileno	6,39	43,93
$\alpha$ Copaeno	5,54	49,47
Linalol	5,45	54,92
Nerolidil acetato	5,38	60,3
3-Hexen-1-ol benzoato	4,77	65,06
3 Hexenil valerato	3,96	69,03
Nerolidol	3,58	72,61
Decanal	3,37	75,97
Nonanal	3,3	79,27
3-Hexenal	3,03	82,3
Geranil acetona	3,01	85,31
$\alpha$ Farneseno	2,75	88,06
$\alpha$ Pineno	2,48	90,54

Os perfis dos voláteis induzidos por *T. urticae* ao longo do período de vinte e sete dias de exposição estão apresentados nas (Figuras 16, 17, 18 e 19), em que é demonstrada a variação dos voláteis ao longo dos dias para cada classe de voláteis e suas respectivas diferenças estatísticas. A maioria dos voláteis foi estimulado pela herbivoria já nos primeiros dias de exposição, porém para alguns voláteis a taxa de emissão foi reduzida, sugerindo a inibição desses compostos pela herbivoria.

Para os monoterpenos (Figura 16) 3-Careno, Linalol e  $\alpha$  Pineno além de contribuírem para a dissimilaridade entre os tratamentos (Tabela 3), foram também estatisticamente distintos em vários dias de exposição. O 3-Careno apresentou diferença estatística em seis dos vinte sete dias de exposição e seu pico de indução foi no quinto dia (Figura 16 A). Kant *et al.* (2004) encontrou esse monoterpeno em plantas de tomate infestadas com *T. urticae*, o 3-Careno também já foi encontrado em coníferas que acumulam esse composto no seu xilema como estratégia de defesa contra as pragas e as flutuações em suas concentrações estão diretamente relacionadas com a resistência ou susceptibilidade da árvore (Fäldt 2003). Em clones de *Pinus* silvestres, altos níveis de 3-Careno estão correlacionados com baixa taxa de sobrevivência de lavas *Diprion pini* (Fäldt 2003).



**Figura 16.** Emissão diária de monoterpenos (ng g DW<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) em lâminas foliares de *C. floribundus* expostos a 200 indivíduos de *T. urticae* (ácaro) e seu respectivo controle (Con). Diferenças estatísticas estão representadas por \*. **A.** 3-Careno, **B.** Linalol, **C.** α Pineno, **D.** Limoneno, **E.** Geranil Acetona e **F.** α Felandreno.

O Linalol foi o segundo monoterpeneo mais emitido no tratamento com *T. urticae*, apresentando diferença estatística a partir do 18º dia, porém foi no 5ª dia em que a taxa de emissão duplicou em relação ao controle (Figura 16B). Esse composto já foi relatado pela literatura como induzido por herbivoria (Holopainen 2004, Holopainen & Blande 2013, Zakir *et al.* 2013) e segundo Kant *et al.* (2004) plantas de tomate infestadas com *T. urticae* aumentam a emissão de Linalol ao longo dos dias, com o pico no 5º dia, o que corrobora fortemente os resultados do presente estudo. Além disso, esse composto é encontrado constitutivamente e sintetizado “*de novo*” após a lesão de herbívoros. Ainda, liberado sistemicamente para proteção da planta contra novos ataques (Holopainen, 2004). Estudos realizados com outras espécies do gênero *Croton* (Lima *et al.* 2010, Neves & Câmara 2011), como *Croton lundianus* também relataram o Linalol como um composto constitutivo do *buquê* de voláteis (Neto *et al.* 2004).

Salatino *et al.* (2007) relataram que esse volátil é um dos maiores constituintes do óleo essencial de *Croton cajucara* e que este inibe o crescimento de alguns microrganismos, como *Candida albicans*, *Lactobacillus casei*, *Porphyromonas gengivalis*, *S. aureus* e *Streptococcus mutans* (Salatino *et al.* 2007). No presente estudo, Linalol também foi detectado constitutivamente ao longo de toda a exposição, o que indica sua relevância para o gênero *Croton*.

Embora o  $\alpha$ -Pino tenha apresentado as somatórias das médias muito semelhantes entre o tratamento e seu o controle (Tabela 2), foi o terceiro monoterpeneo mais emitido por *C. floribundus* infestado por *T. urticae* (Figura 16 C), apresentando diferença estatística a partir do sexto dia. Esse fato se explica devido à alta variabilidade das taxas de emissão ao longo do período de exposição.

O  $\alpha$ -Pino é frequentemente encontrado constitutivamente em muitas plantas nativas, no gênero *Croton* o já foi relatado como constituinte de 32,6% da composição de seu óleo essencial (Lima *et al.* 2010). Nos cultivares também é relatado como constitutivo. (Paré &

Tumlinson 1996, Holopainen & Blande 2013) e um dos mais comuns no buquê floral de diversas espécies (Knudsen *et al.* 2006, Maffei 2010).

O  $\alpha$ -Pino apresenta grande importância ecológica, é descrito como composto importante nas interações planta-inseto, como verificado por Paré & Tumlinson (1996), em que plantas de algodão responderam à herbivoria aumentando a emissão de  $\alpha$ -Pino. No Pinheiro-vermelho, o  $\alpha$ -Pino foi o monoterpene mais abundante no floema e exibiu forte atividade biológica em relação a insetos e fungos (Krokene *et al.* 2008). Agut *et al.* (2015) observou que plantas de laranjeiras emitem  $\alpha$ -Pino quando estão infestadas por *T. urticae* e o aumento desse composto, juntamente com outros COV possuem um efeito repelente acentuado. Em *C. floribundus* não se pode descartar a possibilidade de o  $\alpha$ -Pino ser um composto relevante nas interações tróficas já que o *T. urticae* estimulou o aumento da taxa de emissão desse volátil.

Com relação aos monoterpenos Limoneno, Geranyl acetona e  $\alpha$ -Felandreno, observou-se que as taxas de emissão diárias do tratamento foram inferiores ao controle, sugerindo uma possível supressão da emissão (Figura 16 D, E e F). O perfil diário do Limoneno demonstra que a média é apenas um reflexo da alta concentração no controle no sexto dia (Figura 16 D) e não uma inibição da emissão diária, como observado para o Geranyl acetona (Figura 16 E). Entretanto, o perfil de emissão diário de  $\alpha$ -Felandreno (Figura 16 F) apresenta uma alta variabilidade das taxas de emissão, tanto para o controle quanto para o tratamento, durante todo o período de exposição. Runyon, *et al.* (2006) também encontrou uma variabilidade nas taxas de  $\alpha$ -Felandreno e Limoneno constitutivamente em cultivares, Neves e Camara (2011) também relataram o  $\alpha$ -Felandreno constitutivamente em outras espécies de *Croton*, corroborando os resultados para *C. floribundus*.

O Geranyl acetona, por não ter apresentado alta variabilidade de suas taxas no tratamento por herbivoria, sugere que o *T. urticae* não apenas inibe como também afeta a produção desse composto, tornando a taxa de emissão com baixa variabilidade ao longo do período. Se esses

resultados forem comparados com os reportados por Das graças Fonseca (2010), em que Geranil acetona foi comprovado como precursor de feromônios do coleóptera *H. Betulinus* em plantas de erva mate, pode-se inferir que *T. urticae* apresenta um mecanismo semelhante em *C. floribundus*.

Os sesquiterpenos que contribuíram para a dissimilaridade do tratamento e controle (Tabela 3) foram  $\alpha$ -Farneseno, Cariofileno,  $\alpha$ -Copaeno,  $\gamma$ -Elemeno (Figura 17, G, H, I e J). O mesmo perfil de emissão desses sesquiterpenos já foram relatados em *Trifolium pratense* (Kigathi *et al.* 2010), *Centaurea* (Smith & Beck 2015) e *Zea mays* (Pinto-zevalos *et al.* 2013) acometidos por herbivoria.

Geralmente  $\alpha$ -Farneseno e o Cariofileno são concomitantemente emitidos e estão entre os mais típicos sesquiterpenos induzidos por herbivoria (Holopainen 2004), corroborando os resultados obtidos no presente estudo com *C. floribundus*. O  $\alpha$  Farneseno foi majoritariamente induzido, no 4° e 5° de exposição (Figura 17 G). Essa emissão foi tão expressiva que alcançou 30 vezes mais o valor encontrado no controle (tabela 2).

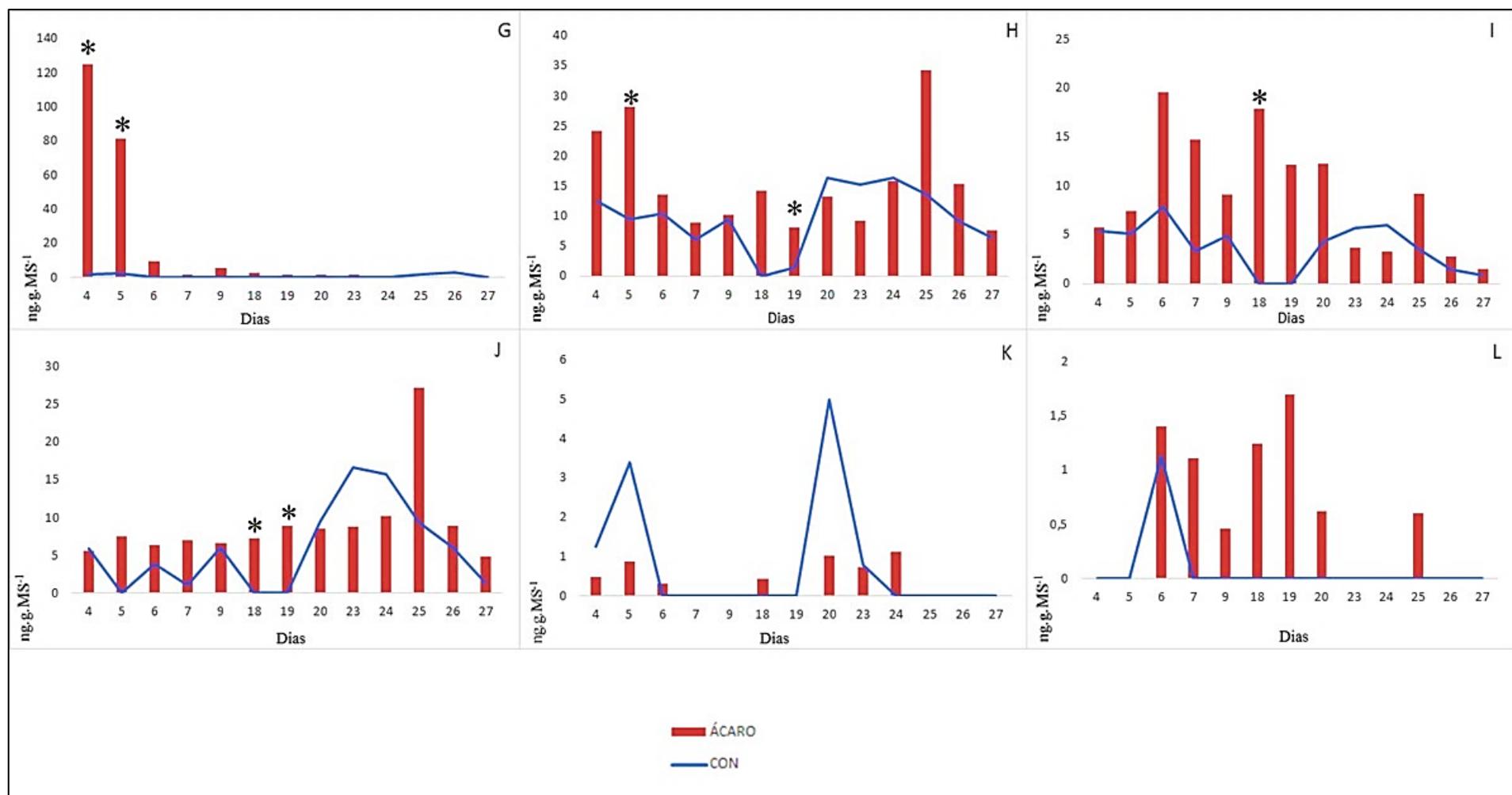
Farneseno é um dos mais importantes voláteis de alarme nas interações tróficas entre *T. urticae* e seu predador (*Phytoseiulus persimilis*) (Bernasconi *et al.* 1998 e Kant *et al.* 2004), indicando seu papel nas relações ecológicas, atuando na repelência de insetos, influenciando a oviposição, ou seja, mediando as defesas diretas e indiretas das plantas, sugerindo assim seu potencial na comunicação química entre plantas (Holopainen 2004, Hilker & Meiners 2005, Holopainen & Blande 2013).

Assim como o  $\alpha$ -Farneseno, o Cariofileno também foi fortemente induzido no 4° e 5° dia de exposição (Figura 17 H) e diferenças estatísticas foram observadas para esses mesmos dias, corroborando os estudos reportados por Kant *et al.* (2007) que indicou o *T. urticae* como indutor de Cariofileno e os reportados por Kigathi *et al.* (2009), em que esse composto foi induzido e emitido após 30 min de exposição ao *T. urticae*.

A literatura relata que o poder de repelência do Farneseno e do Cariofileno está diretamente relacionado com a proporção desses compostos no buquê de voláteis induzidos (Holopainen 2004). Segundo Mostafavi *et al.* (1996), somente altas razões de Farneseno relativas a Cariofileno é atuante na repelência do afídeo generalista da alfafa. Ainda, Downson *et al.* (1984), relatam que o Cariofileno tem o poder de reduzir o potencial de repelência do Farneseno em *Humulus lupulus*. Entretanto, a presença do Cariofileno, mesmo que em baixas proporções, é importante ecologicamente por ser um volátil-chave na atração de predadores, como, por exemplo, vespas parasitóides (Dudareva *et al.* 2013).

Em *Croton floribundus*, a relação Farneseno/Cariofileno foi de 5 e 2 no 4° e 5° dia, respectivamente, e abaixo de 1 para os outros dias do tratamento e todos os dias do controle, sugerindo que as defesas indiretas ocorrem nos primeiros dias de indução.

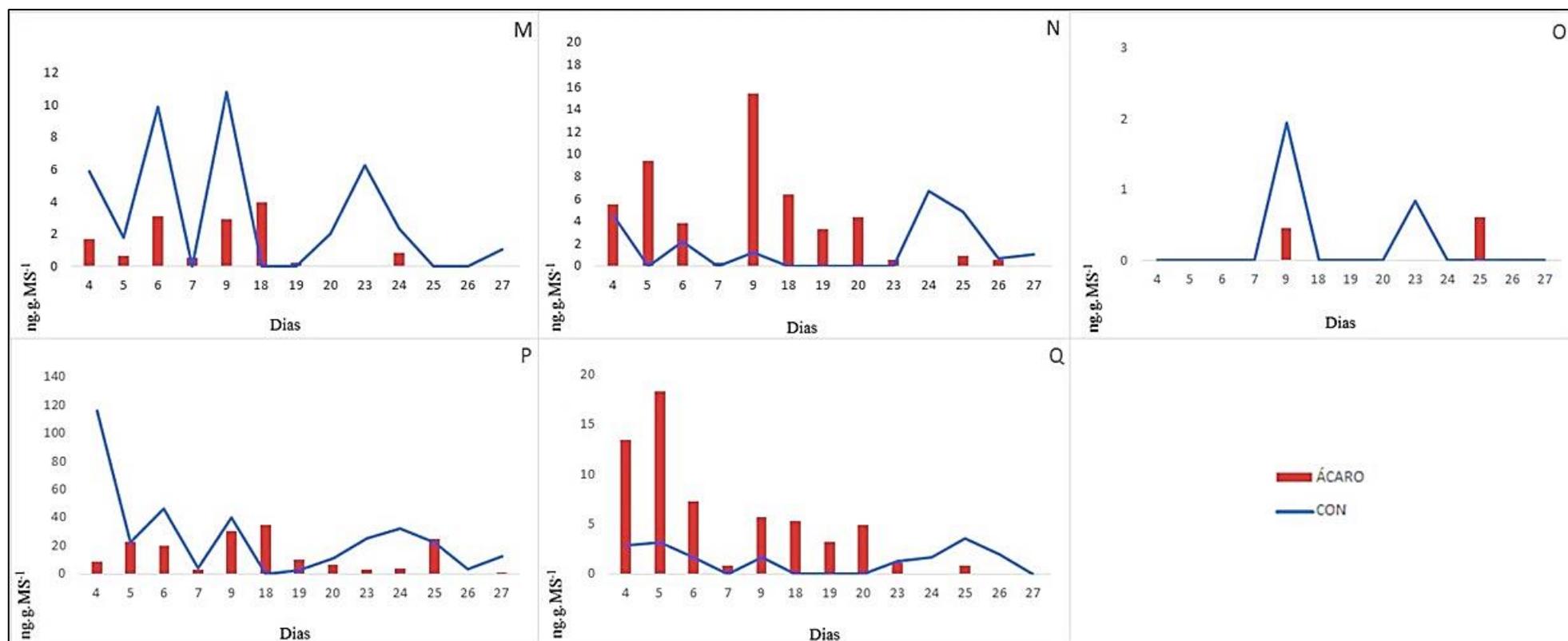
O  $\alpha$ -Copaeno e  $\gamma$ -Elemeno, marcadores da dissimilaridade entre o tratamento e o controle (Tabela 3), já foram relatados em diversos estudos entre plantas e herbívoros, em que são descritos como voláteis induzidos, porém não há relatos de sua relevância ecológica. Osawa *et al.* (2000) verificou que *Phaseolus vulgaris* quando estão sob herbivoria emitem  $\alpha$ -Copaeno como resposta. Kant *et al.* (2004) também observou o aumento de  $\alpha$ -Copaeno em plantas de tomate infestadas com *T. urticae*. Maeda & Takabayashi (2000) observaram a indução de  $\alpha$ -Copaeno por *Phaseolus vulgaris* somente após 8 dias de infestação de *T. urticae*, diferente dos resultados apresentados por *C. floribundus*, em que, o  $\alpha$ -Copaeno foi emitido por plantas do controle, e nas plantas tratadas ele foi emitido desde o 4° dia de exposição com pico de emissão no 6° dia (Figura 17 I).



**Figura 17.** Emissão diária de sesquiterpenos ( $\text{ng g DW}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) em lâminas foliares de *C. floribundus* expostos a 200 indivíduos de *T. urticae* (ácaro) e seu respectivo controle (Con). Diferenças estatísticas estão representadas por \*.

Os voláteis da rota LOX, conhecidos como voláteis das folhas verdes (VFV) apresentaram resultados com padrões diferentes das demais classes identificadas no experimento, em que os picos de emissão se concentraram entre o 4º e 6º dia. Os VFV apresentaram valores médios inferiores no tratamento (Tabela 2) comparado ao seu controle, além de terem sido a classe de compostos menos emitida tanto no tratamento quanto no controle (Figura 18). Dentre os VFV, o 3-Hexen-1-ol benzoato (Figura 18 Q), o Ácido valérico (Figura 18 N) e 3-Hexen-1-ol, foram os que contribuíram para distinguir o tratamento do controle (Tabela 3). Vários estudos indicam um aumento dos VFV, tais como (Z) -3-Hexenol, (E) -2-Hexenal, e (Z) -3-Hexenil acetato em plantas infestados por *T. urticae* (Pinto-Zevallos *et al.* 2013, Arimura *et al.* 2000 e Dicke 1999). Em *C. floribundus*, o aumento ocorreu apenas 3-Hexen-1-ol benzoato e Ácido valérico.

O 3-Hexen-1-ol apresentou níveis inferiores no tratamento comparado ao seu controle (Tabela 2). Esse fato pode ser explicado por um possível artefato de amostragem apenas para esse composto no momento da coleta dos COV, já que em vários trabalhos com *C. floribundus* realizados em nosso laboratório, o nível de 3-Hexen-1-ol sempre se manteve em níveis muito abaixo do que o encontrado (Bison 2015, Cardoso-Gustavson *et al.* 2014) e até mesmo no presente trabalho com herbivoria (item 5.2).



**Figura 18.** Emissão diária de voláteis de folhas verdes (VFV) ( $\text{ng g DW}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) em lâminas foliares de *C. floribundus* expostos a 200 indivíduos de *T. urticae* (ácaro) e seu respectivo controle (Con). Diferenças estatísticas estão representadas por \*.

Dentre os outros compostos que contribuíram para a dissimilaridade, destacam-se o Nerolidil acetato, Nerolidol, Decanal, Nonanal e particularmente, o MeSA (Tabela 3).

Nerolidil acetato e Nerolidol tiveram suas taxas de emissão elevadas nas plantas infestadas. O Nerolidol apresentou valores máximos no 4º e 5º dia, porém, diferenças estatísticas só foram observadas a partir do 23º. Já o Nerolidil acetato apresentou sua máxima emissão no 25º dia, e as diferenças estatísticas ocorreram a partir do 18º. Essas substâncias apresentam estruturas químicas semelhantes e são precursores do Geranyl acetona (Bartram 2006). Porém, não há relatos que esses compostos sejam atuantes nas relações ecológicas entre planta-planta e planta-herbívoro. Por esse motivo, esses compostos não foram selecionados para os estudos de comunicação química (Item 5.2).

Na grande maioria dos dias de exposição, os níveis dos compostos Nonanal e Decanal foram superiores no controle, ainda apresentaram perfis de emissão semelhantes ao longo de todo o período. Esses compostos não tem uma importância ecológica aparente e são relatados como constitutivos em *C. floribundus* (Bison 2015)

Entre os compostos que foram representativos para a dissimilaridade, o segundo maior contribuinte foi o MeSA. Foi encontrado ao longo de toda a exposição tanto para as plantas do controle quanto para as do tratamento, contudo os maiores níveis de emissão foram detectados nas plantas sob herbivoria, com máxima no 4º dia (Figura 19 R) (Tabela 2).



O MeSA é uma molécula sinalizadora importante, em relação ao mecanismo de defesa em plantas, capaz de induzir resistência às doenças locais ou sistêmicas (Hayat *et al.* 2010). Além disso, promove a expressão de vários genes de defesa, como os PRs (*protein release*) que promovem a resistência sistêmica adquirida (SAR) (Park *et al.* 2007) e essa indução do SAR leva uma redução nos sintomas decorrente do estresse (Neill *et al.* 2001, Pinto & Tommasi 2002, Verhage *et al.* 2010). Estudos recentes mostraram que esse composto é induzido em *Croton floribundus* sob a ação de estresse abiótico, como o ozônio (Bison 2015). Foi observado também que esse composto quando aplicado em plantas saudáveis aumenta as defesas químicas da planta ativando suas respostas sistêmicas (Cardoso-Gustavson *et al.* 2014), o que poderia indicar um potencial de ação do Metil salicilato no processo de defesa de *C. floribundus*.

Outro composto atuante nas respostas sistêmicas é o MeJA, que funciona como um *priming*, ativando e aumentando as respostas de defesa e participando ativamente da expressão gênica na produção de novos voláteis (Shah 2009, Pinto-zevallos *et al.* 2013, Dong *et al.* 2016, Martin *et al.* 2003). Em *C. floribundus*, o MeJA não contribuiu para a dissimilaridade, mas foi nitidamente induzido no 7º dia (Tabela 2) (Figura 19 S). Segundo Ament *et al.* (2004) o MeJA é muito importante para as defesas de plantas de tomate contra o *T. urticae*, pois além de funcionar como um sinalizador e mediador de novos voláteis, induz a conversão do Ácido salicílico em Metil salicilato. Ainda, o MeJA induz respostas complexas envolvendo reações que incluem a síntese *denovo*, aumento e acúmulo de monoterpenos e diterpenos, induzindo a produção de enzimas e expressão de genes como monoterpeno sintases e diterpeno sintases, acarretando em um sinergismo atuante nas respostas sistêmicas adquiridas.

## 5.2 Comunicação Química de *Croton floribundus*

A somatória dos voláteis emitidos pelas folhas de indivíduos de *C. floribundus* receptores dos voláteis sintéticos (VS) e induzidos por ácaros (VI) estão apresentados na Tabela 4. No geral, os voláteis dos indivíduos do experimento de comunicação química, incluindo controle e receptoras de VS e VI, apresentam menor taxa de emissão comparado aos indivíduos utilizados no experimento de caracterização dos voláteis (item 5.1). Comparando a somatória dos voláteis das plantas receptoras de VS e VI, foi possível observar que as plantas que estiveram em contato com os voláteis sintéticos emitiram, em sua maioria, taxas mais elevadas de voláteis do que as plantas em contato com os voláteis induzidos por ácaros (Tabela 4). Metil Salicilato, Indol e  $\alpha$ -Farneseno apresentaram maiores taxas nas receptoras de VI, enquanto que emissões elevadas foram observadas para 3-Hexen-1-ol, Linalol e  $\beta$  Farneseno em receptoras de VS. Ressalta-se que o homoterpeno TMTT, que é de grande relevância para a comunicação entre plantas, foi observado tanto em indivíduos receptoras de VS quanto de VI na mesma proporção, indicando uma possível ocorrência da comunicação química mediada pelos VS e VI.

**Tabela 4.** Somatória dos valores médios diários dos voláteis emitidos por indivíduos de *C. floribundus* receptor de voláteis induzidos (VI), voláteis sintéticos (VS) e indivíduos controle.

<i>Monoterpenos</i>	<i>Receptor VI</i>	<i>Receptor VS</i>	<i>Controle</i>
$\alpha$ Felandreno	2,06	2,49	3,99
$\alpha$ Pineno	1,59	3,5	8,05
$\beta$ Pineno	2,86	0,6	2,75
$\beta$ Felandreno	8,22	19,11	22,87
$\beta$ Mirceno	0,39	0,49	1,42
Limoneno	0	14,53	114,54
3-Careno	0,01	0,15	0,22
$\beta$ -cis-Ocimeno	15,24	7,79	1,91
$\beta$ -Ocimeno	7,91	16,44	9,41
Linalol	67,99	114,03	31,95
Geranil Acetona	9,58	21,35	11,71
<b>TOTAL</b>	<b>115,85</b>	<b>200,48</b>	<b>208,82</b>

<i>Sesquiterpenos</i>	<i>Receptor VI</i>	<i>Receptor VS</i>	<i>Controle</i>
$\alpha$ Cubebeno	2,39	11,12	3,58
$\alpha$ Copaene	12,35	23,21	9,2
$\beta$ -Bourboreno	5,89	10,59	4,66
Cariofileno	17,67	14,59	43,97
Aromadendreno	4,32	19,19	3,69
Humuleno	14,89	8,64	47,93
$\beta$ Cubebeno	62,24	104,63	8,51
$\gamma$ Elemeno	10,9	31,32	5,26
cis- $\beta$ -Farneseno	0,51	19,39	0
$\alpha$ Farneseno	5,44	1,51	0
$\beta$ copaeno	5,26	4,86	5,73
(E) $\beta$ Faneseno	6,47	42,079	0,06
<b>TOTAL</b>	<b>148,33</b>	<b>291,129</b>	<b>132,59</b>

<i>Voláteis das folhas verdes</i>	<i>Receptor VI</i>	<i>Receptor VS</i>	<i>Controle</i>
3-Hexen-1-ol, (Z)-	15,4	29,77	13,23
3-Hexen-1-ol, acetato, (Z)-	4,89	9,99	11,36
3-Hexen-1-ol, benzoato, (Z)-	2,45	3,73	0
Ácido Valérico	2,34	0,22	0
<b>TOTAL</b>	<b>25,08</b>	<b>43,71</b>	<b>24,59</b>

<i>Outros</i>	<i>Receptor VI</i>	<i>Receptor VS</i>	<i>Controle</i>
Nonanal	5,85	13,17	4,83
MeSA	9,01	3,93	0,52
MeJA	0	0,11	0
Decanal	610,34	743,22	296,19
Indol	2,12	0,18	0
TMTT	19,51	20,5	3,3
$\beta$ nerolidol	4,46	9,64	0
<b>TOTAL</b>	<b>651,29</b>	<b>790,75</b>	<b>304,84</b>

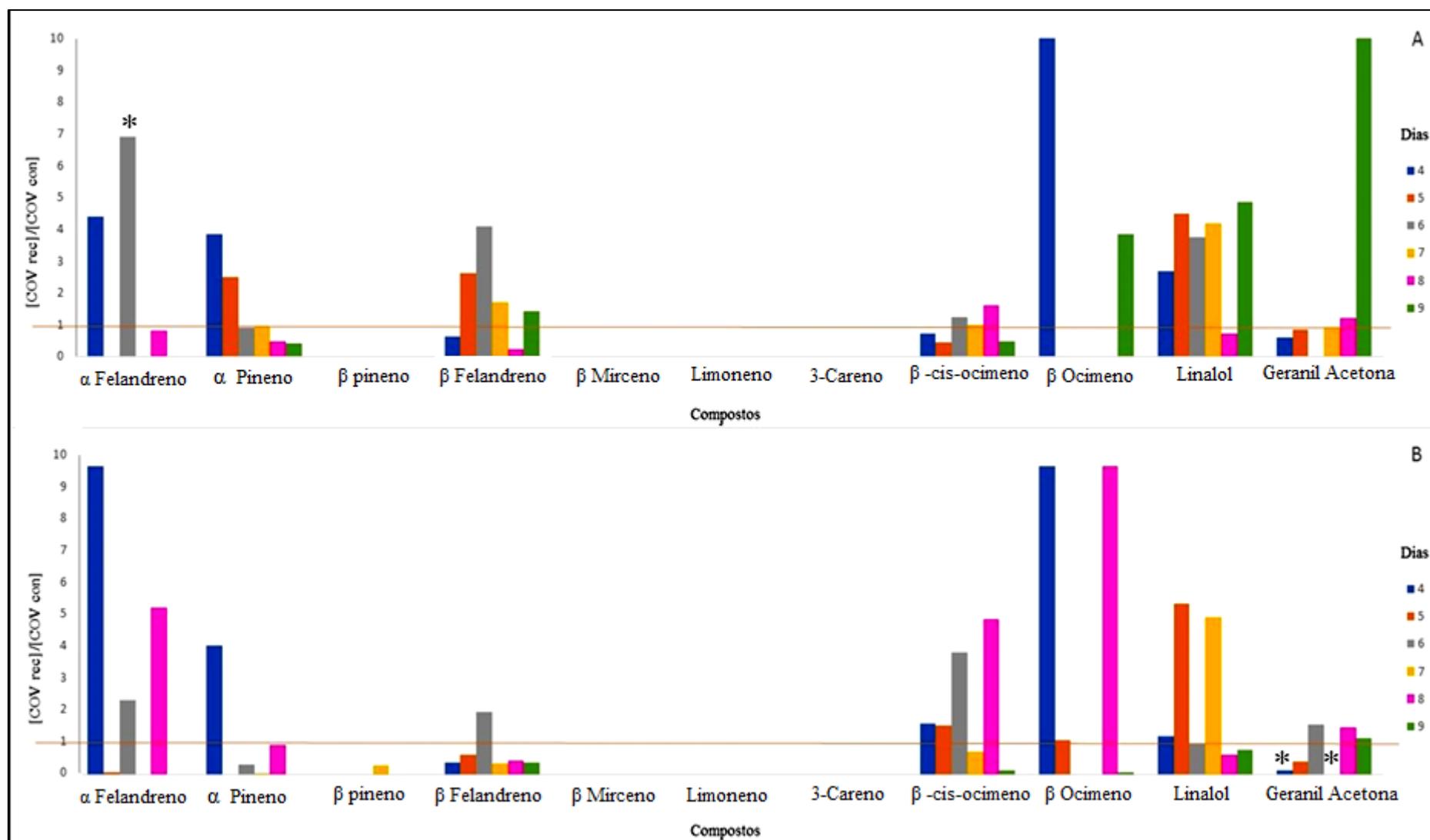
A relação entre as concentrações dos voláteis dos indivíduos receptores e o seu controle foi determinada para avaliar o incremento de voláteis que foram emitidos pelos indivíduos saudáveis e que estiveram em contato com a ação dos VS e VI, visando verificar se plantas sadias (receptoras) respondem aos voláteis induzidos ou sintéticos mediante a produção, inibição ou até mesmo na síntese de novos voláteis. Uma relação maior que 1 deve-se ao incremento dos voláteis nas plantas receptoras, indicando a indução desses voláteis quando a planta está sob ação dos VS e VI. Valores abaixo de 1 sugerem a inibição dos compostos pelo contato dos voláteis emissores (VS e VI).

A Figura 20 apresenta a relação entre os monoterpenos detectados nos indivíduos receptores de VS (Figura 20 A) e VI (Figura 20 B). Dentre todos os monoterpenos, apenas o  $\alpha$  Felandreno apresentou diferenças estatísticas entre os indivíduos receptores de VS e seu controle para o 6º dia, apesar de não ter sido observado diferenças estatísticas nos indivíduos receptores de VI, é possível notar uma tendência na indução desse composto a partir do 4º dia. No presente estudo, o  $\alpha$  Felandreno demonstrou ser uma resposta indicativa do processo de comunicação química entre plantas receptoras de voláteis sintéticos nos primeiros dias de indução, uma vez que foi amplamente induzido em indivíduos sadios.

Em relação às receptoras de VI, apenas o e o Geranil Acetona apresentou diferença estatística no quarto e no sétimo dia de exposição, sendo que esse composto foi inibido nesses dias, o *Croton floribundus* também inibiu esse composto na presença do *T. urticae* (Item 5.1), aparentemente esse composto tem sua emissão afetada na presença do herbívoro e dos voláteis induzidos por ele.

Embora os monoterpenos  $\alpha$  Pineno e Linalol não apresentarem diferenças estatísticas entre os indivíduos receptores e seu controle, observou-se uma tendência na indução do  $\alpha$  Pineno no 4º e 5º dia nas receptoras VS (Figura 20 A), e apenas no 4º dia para as receptoras VI (Figura 20 B). Já para Linalol, as receptoras VS o induziram todos os dias, exceto no 8º dia, enquanto as receptoras VI, induziram o linalol no 4º, 5º e 7º dia. Ressalta-se que esses mesmos compostos apresentaram diferenças estatísticas entre voláteis induzidos por herbivoria *T. urticae* e seu controle, conforme apresentado no item 5.1, e foram marcadores de indução. A não diferença estatística observada nos experimentos de comunicação, pode ser explicada pela própria peculiaridade do processo de sinalização em que depende da concentração dos gases que alcançam as lâminas foliares de *C. floribundus* receptoras, o que está diretamente relacionada com velocidade e direção dos gases, definida pelo movimento browniano das moléculas gasosas (Perrin 2013), podendo ou não permitir a absorção das moléculas via estômato, e conseqüentemente, estimular mais ou menos intensamente o mecanismo de

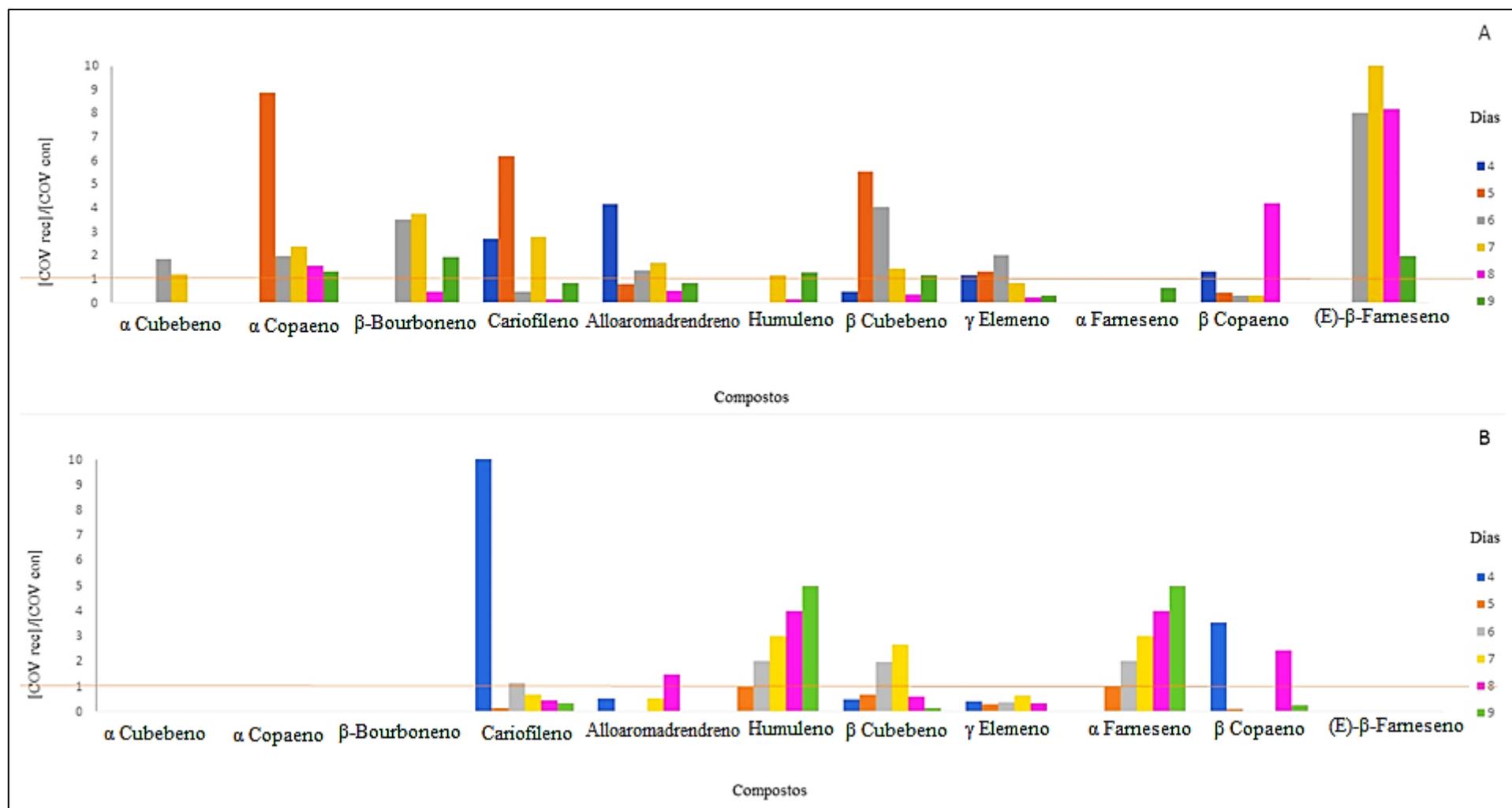
sinalização, propiciando ou não a indução dos voláteis de forma a encontrar diferenças estatísticas significativas entre o tratamento e seu controle.



**Figura 20.** Razão da concentração dos monoterpenos emitidos por *C. floribundus* receptor de VS (A) e VI (B) pelos seus respectivos controles nos diferentes dias de indução (4 -9). A linha representa o limiar entre os compostos inibidos (abaixo de 1) e emitidos (acima de 1). \* Representam as diferenças estatísticas.

O  $\alpha$  Pineno é emitido por muitas plantas como, tomate (Zebelo *et al.* 2012), *Arabidopsis thaliana* (Rohloff & Bones 2005), *Pinus sylvestris* (Köpke *et al.* 2010) e muitas outras espécies. Ainda, sabe-se que o  $\alpha$  Pineno é importante nas relações tróficas, por exemplo no caso do *Picea abies* que emite  $\alpha$  Pineno quando está sendo atacada por besouros (*Ips typographus*) e esse composto norteia o predador em direção ao besouro (Phillips *et al.* 2003). Já o Linalol tem relevância nas interações entre plantas e insetos, por exemplo no estudo de Kessler & Baldwin (2001) em que o composto Linalol foi adicionado a uma pasta de lanolina e esta ficou em contato com plantas de *Nicotiana attenuata*, tendo como consequência a diminuição da oviposição de *Manduca sexta* e aumento da predação de ovos e larvas por seu inimigo natural, o *Geocoris pallens*.

Aharoni *et al.* (2003) reportou que o Linalol possui efeito repelente sob o herbívoro *M. persicae* em experimentos com *Arabidopsis* transgênicas. Ainda, Raguso & Pichersky (1999) reportaram que a mistura de voláteis contendo Linalol é atraente para vespas parasitóides e as norteiam ao encontro de lagartas *Spodoptera*, outros herbívoros também podem ser movidos por Linalol, como o predador do *T. urticae* que é atraído para o *Phaseolus vulgaris*. (Dicke *et al.* 1990). No presente estudo,  $\alpha$  Pineno e Linalol emitidos em lâminas foliares de *C. floribundus* em resposta a ação de voláteis sintéticos e voláteis induzidos é mais um indicativo de que os voláteis são mediadores de sinalização das defesas químicas indiretas dessas espécies vegetais, sugerindo que esta emissão deve ser uma tentativa da planta recrutar predadores do *T. urticae*.



**Figura 21.** Sesquiterpenos emitidos por *C. floribundus* receptor de VS (A) e VI (B). O gráfico representa a razão entre os receptores e seus respectivos controles. A linha representa o limiar entre os compostos inibidos (abaixo de 1) e emitidos (acima de 1). \* Representam as diferenças estatísticas.

Assim como apresentado no item 5.1, a relação entre Farneseno e Cariofileno, indica o potencial de repelência ao herbívoro. A razão desses compostos foi elevada ( $R > 8$ ) no 5º dia para *C. floribundus* receptor de VI, mas o mesmo não foi observado para as receptoras de VS. Isso indica que as plantas receptoras perceberam o sinal oriundo do buquê do voláteis induzido pela herbivoria (VI) ao ponto de responder como se estivesse sendo predada por herbívoros, fato esse que comprova o poder de sinalização dos VI a defesas químicas indiretas.

É interessante ressaltar que o Farneseno é um sesquiterpeno que apresenta isomeria ótica e pode ser encontrado na sua forma  $\alpha$  e  $\beta$ . O  $\alpha$  Farneseno foi detectado tanto em *C. floribundus* infestado por *T. urticae* quanto em indivíduos receptores de VI. Já, o  $\beta$  Farneseno foi induzido por indivíduos receptores de VS (Figura 21). Ainda, a relação entre Farneseno e Cariofileno mostrou-se relevante somente para os indivíduos que emitiram  $\alpha$  Farneseno, indicando que o buquê dos voláteis mediados por *T. urticae* deve apresentar um potencial de sinalização mais específico à repelência de afídeos do que os voláteis sintéticos.

Os isômeros  $\alpha$  Farneseno e  $\beta$  Farneseno possuem funções ecológicas muito importantes. Plantas de milho emitem ambos os isômeros,  $\alpha$  Farneseno foi encontrado constitutivamente e aumentou quando a planta foi exposta a herbivoria,  $\beta$  Farneseno foi detectado após 2 horas de herbivoria (Turlings *et al.* 1998). Zhu & Park (2005) também relataram que plantas de soja emitem ambos os isômeros quando estão sob herbivoria de afídeos. Assim como observado no presente trabalho, vários autores relatam que  $\alpha$  Farneseno é emitido em abundância por plantas que estão sob herbivoria de *T. urticae* (Birkett, *et al.* 2000, Van den boom *et al.* 2003, War *et al.* 2011).

Enquanto o  $\alpha$  Farneseno parece estar mais relacionado com o poder de repelência, o  $\beta$  Farneseno, aqui detectado apenas em indivíduos receptores de VS, é um composto atuante na atração dos inimigos naturais e parasitóides (Beale *et al.* 2006, Kant *et al.* 2009). Segundo McCormick *et al.* (2012) *Pinnus sylvestris* quando está sob oviposição do *Closterocerus*

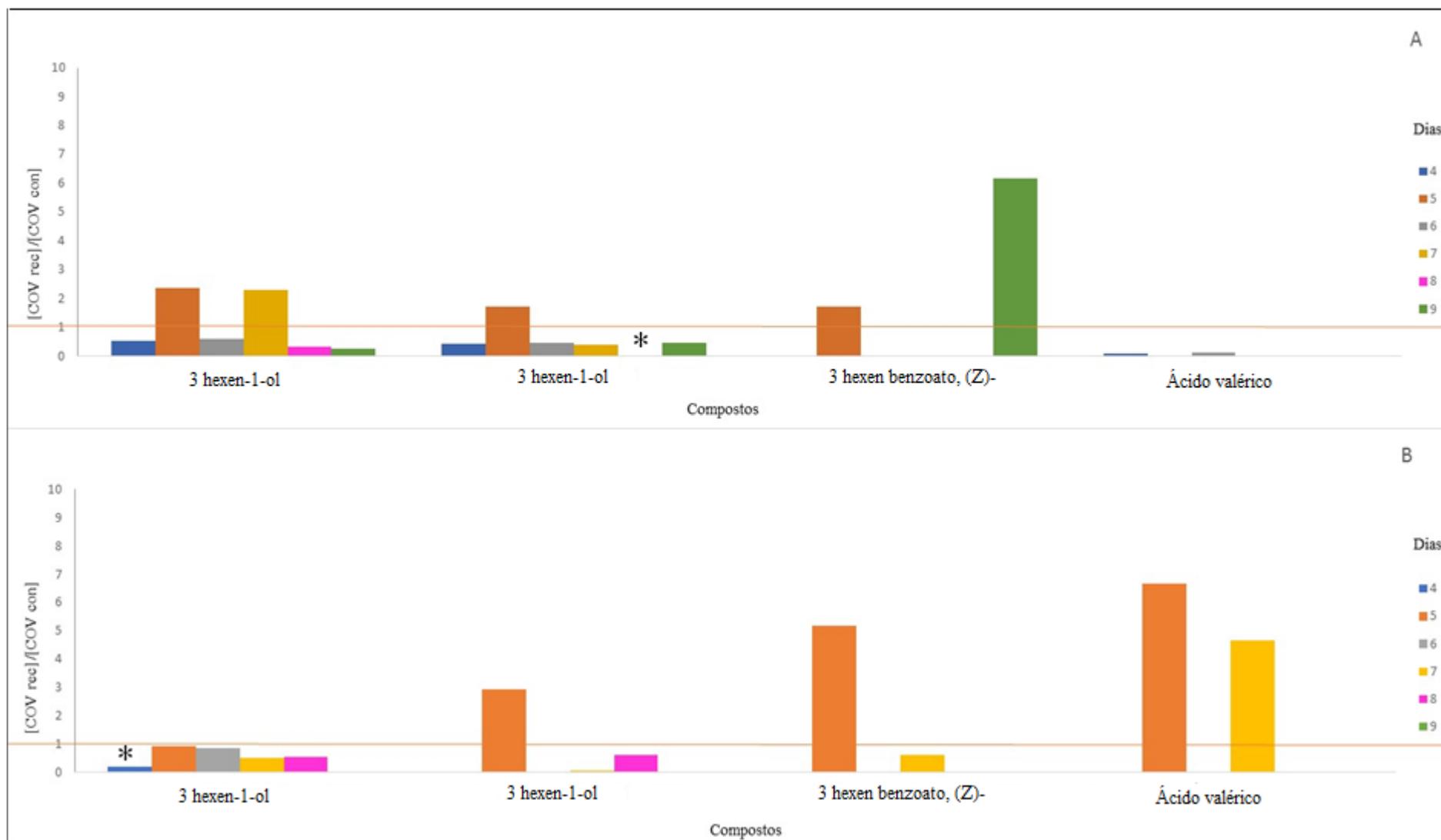
*ruforum* emite uma mistura de voláteis que atrai o parasitóide *Diprion pini*, entretanto essa mistura só tem potencial atraente se tiver  $\beta$  Farneseno no buquê de voláteis. Ainda, como já mencionado no item 5.1, o  $\beta$  Farneseno é relatado como feromônio de alarme de afídeos (Schwartzberg *et al.* 2008). Muitas espécies de afídeos liberam o  $\beta$  Farneseno como um feromônio de alerta, e a liberação deste composto está relacionada com a diminuição da predação por pulgões (Degenhardt 2008). Assim, é possível inferir que os voláteis sintéticos, devido à indução de  $\beta$  Farneseno, são mais atuantes na atração dos inimigos naturais do que os voláteis induzidos por herbivoria (VI).

Ainda, Van den boom *et al.* 2003 relatou que Metil salicilato combinado a altas concentrações de  $\alpha$  Farneseno atrai predadores. Os autores relacionaram o  $\alpha$  Farneseno como o composto responsável pela atração desses predadores.

Os voláteis de folhas verdes foram os compostos menos emitidos comparados às outras classes (Tabela ). Dentre eles, o 3-Hexen-1-ol acetato tem sido considerado o de maior importância ecológica e foi induzido em *C floribundus* receptores de VS e VI. As plantas receptoras dos voláteis sintéticos induziram o 3-Hexen-1-ol acetato no 5° dia de exposição, porém diferenças estatísticas só foram relatadas no 8° dia de exposição (Figura 22). As plantas receptoras de voláteis induzidos liberaram esse composto também no 5° dia de exposição, entretanto, diferenças estatísticas não foram observadas.

O 3-Hexen-1-ol acetato é relatado como um composto chave na sinalização, interação entre plantas (Kost & Heil 2006, Holopainen & Blande 2013), além de ser induzido por herbivoria (Arimura *et al.* 2001, Engelberth *et al.* 2004, Himanen *et al.* 2005, Frost *et al.* 2008). Esse composto é conhecido como *priming* (Frost *et al.* 2008) pois, quando ele é emitido, ativa as respostas de defesa como aumento da transcrição de genes de defesa (Arimura *et al.* 2001, Heil & Ton 2008) e induz a emissão do fitohormônio Metil jasmonato (Engelberth *et al.* 2004). Nesse cenário, a identificação do 3-Hexen-1-ol acetato em *C. floribundus* receptora de VI e VS

pode indicar a ocorrência do processo de comunicação química, preparando a planta saudável para um futuro ataque (Himanen *et al.* 2005, Shimoda 2010, Michereff *et al.* 2012).



**Figura 22.** Voláteis das folhas verdes emitidos por *C. floribundus* receptor de VS (A) e VI (B). O gráfico representa a razão entre os receptores e seus respectivos controles. A linha representa o limiar entre os compostos inibidos (abaixo de 1) e emitidos (acima de 1). \* Representam as diferenças estatísticas.

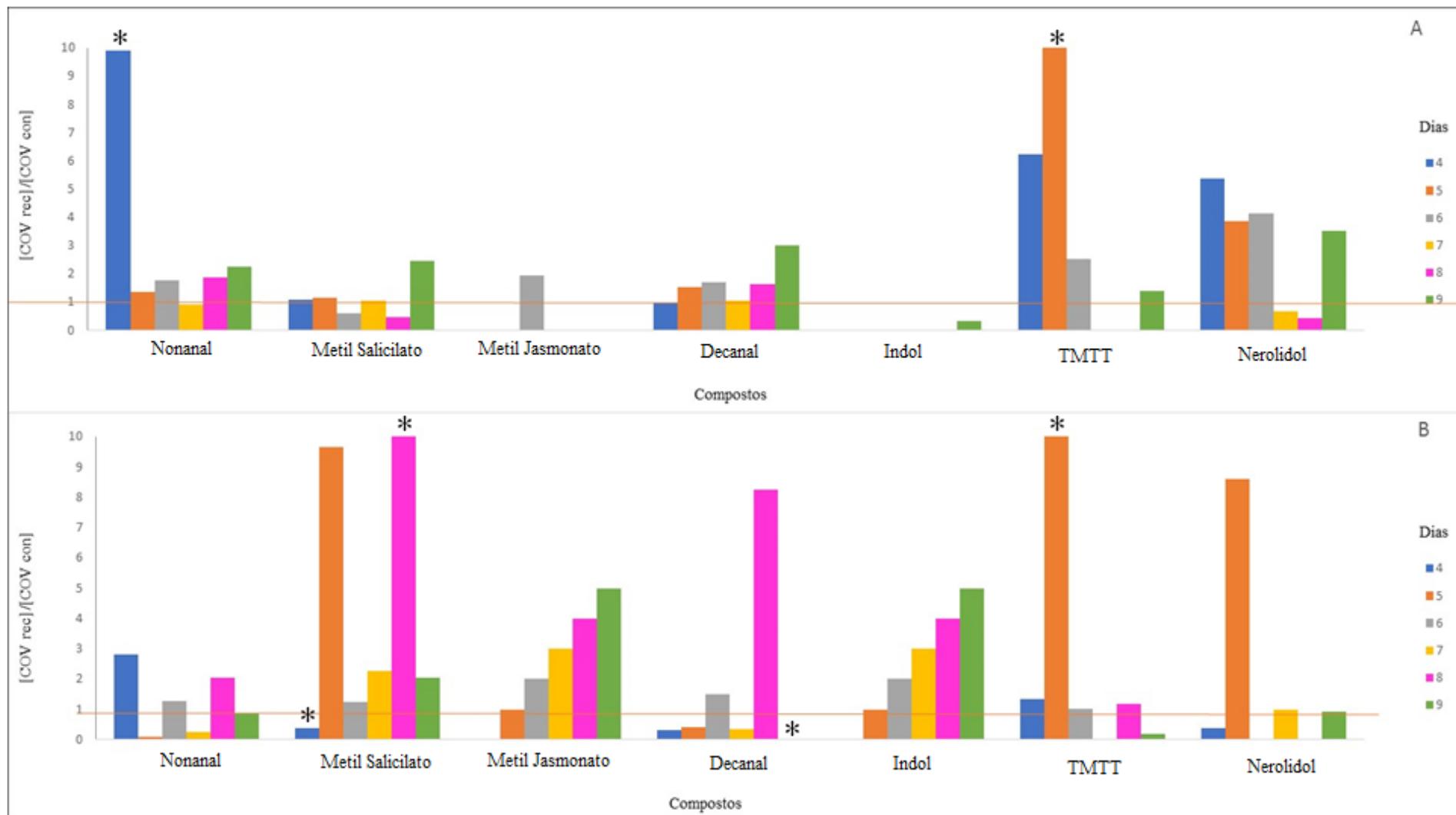
O TMTT é relatado como sendo um composto induzido por *T. urticae* e *T. evansis* (Sarmiento *et al.* 2011), ele pode ser induzido por elicitores presentes na saliva dos herbívoros (Arimura 2009) e no caso do *T. urticae* pode ser induzido pelos ácidos jasmônico e salicílico (Arimura *et al.* 2004, Okada *et al.* 2015). Ainda, é conhecido que TMTT tem o poder de atrair o predador de *T. urticae* e, segundo Ueda *et al.* (2012), o TMTT em sinergia com o DMTT aumenta a expressão de genes de defesa folhas intactas de *Phaseolus lunatus*, como um dos genes da LOX. É notório a importância do TMTT no buquê de voláteis mediadores da sinalização de defesas químicas das plantas e interações tróficas e o seu surgimento em plantas receptoras de VS e VI (Figura 23), com diferenças estatísticas observadas no 5º dia de exposição, apenas reforça a hipótese de que o processo de comunicação entre plantas saudáveis e infestadas ocorrem para a espécie *C. floribundus*.

Outro componente que indica a presença de comunicação química entre plantas infestadas e saudáveis é o Indol, que foi liberado em plantas receptoras de VI (Figura 23) durante toda a exposição, com exceção do 4º dia. Diferenças estatísticas não foram observadas (Figura 23). Erb *et al.* (2015) relatou o Indol como um *priming* volátil, pois esse composto é emitido por muitas plantas e é liberado em resposta a herbivoria e elicitores, favorecendo a formação de fitohormônios. Além disso, Turlings *et al.* (1998) verificou que plantas de milho emitem esse composto antes de sesquiterpenos.

Além do Indol, os compostos de destaque encontrados foram os Metil jasmonato (MeJA) e Metil salicitato (MeSA) que são um dos principais atores do mecanismo de sinalização química. No presente estudo, o MeSA foi inibido pelas plantas receptoras de voláteis sintéticos, com exceção do 9º dia, o que parece não ter importância no processo de comunicação, já que a maioria dos compostos de importância ecológica foram emitidos entre o 4º e 7º dia. Para as plantas receptoras de voláteis induzidos, o MeSA foi muito induzido no 5º dia, entretanto diferenças estatísticas só foram observadas no 8º dia. Em relação ao MeJA, esse foi inibido pelas plantas receptoras de voláteis sintéticos, com exceção do 6º dia. Nas plantas

receptoras de voláteis induzidos, o MeJA foi induzido durante toda a exposição, exceto no 4º dia.

Esses fitohormônios são potentes indutores de defesa (Heil & Ton 2008, Ueda *et al.* 2012, Kant *et al.* 2009) e são transportados pelo ar e vias vasculares das plantas. O MeJA e MeSA são sinalizadores cruciais na regulação da resistência induzida a herbívoros e patógenos. Também tem sido documentado que esses compostos se movem no sistema vascular e também se volatilizam, regulando a resistência induzida (Heil & Ton 2009). As plantas combinam as duas vias de transporte desses sinalizadores, o que favorece uma reação de defesa sistêmica cuidadosamente equilibrada ao local de ataque por herbívoros e agentes patogênicos (Heil & Ton 2009). Ainda, ressalta-se que tanto MeSA quanto MeJA ativam a transcrição de genes de defesa que irão promover a biossíntese de novos voláteis (Okada *et al.* 2015), tais como TMTT e GLV. Esses últimos promovem a biossíntese dos fitohormônios (MeSA e MeJA) potencializando as respostas de defesas (Das *et al.* 2013).



**Figura 23.** Outros voláteis emitidos por *C. floribundus* receptor de VS (A) e VI (B). O gráfico representa a razão entre os receptores e seus respectivos controles. A linha representa o limiar entre os compostos inibidos (abaixo de 1) e emitidos (acima de 1). \* Representam as diferenças estatísticas

Um fato interessante observado no presente estudo foi a inibição de alguns compostos voláteis de lâminas foliares de *C. floribundus* receptoras de VS e VI. A literatura relata que a inibição dos voláteis pode ocorrer na presença de herbivoria, como no *Tetranychus urticae* por exemplo, este herbívoro possui capacidade de suprimir defesas induzidas de plantas de tomate a níveis mais baixos (Kant *et al.* 2008). *T. evansis* também reduz significativamente as defesas nessas mesmas plantas (Sarmiento *et al.* 2011), inibindo algumas proteínas de defesa e voláteis, como Metil salicilato. De acordo com Schwartzberg (2014) os pulgões inibem as defesas das plantas suprimindo a emissão de compostos orgânicos voláteis que atraem predadores, aparentemente pela eliminação direta da molécula de sinalização chave, o ácido jasmônico. A inibição não seria esperada no processo de comunicação via voláteis, já que não se trata de um contato direto de sugadores na lâmina foliar. No entanto, foi observado uma inibição para 3-Careno e 3-Hexen-1-ol em lâminas foliares exposta a VI e VS, indicando que o buquê de voláteis induzidos pela herbivoria são os responsáveis pela inibição nessas plantas receptoras e não o ataque do herbívoro.

Os resultados do presente trabalho indicam claramente que indivíduos sadios de *C. floribundus* respondem a voláteis sintéticos e a voláteis induzidos por *T. urticae*, sugerindo que as plantas sadias, quando em contato com o buquê de voláteis específicos, ativam os sinais químicos de alerta contra ao ataque de possíveis predadores e dessa forma, é estabelecido o processo de comunicação entre indivíduos sadios e infestados.

## 6. Considerações Finais

*Croton floribundus* mostrou-se ser uma planta com alto potencial de resistência, pois muitos dos voláteis emitidos constitutivamente por essa espécie são considerados importantes na repelência de pragas e relevantes para as relações tritróficas com outros organismos.

Além disso, essa espécie respondeu ao estímulo causado pelos voláteis sintéticos e por voláteis induzidos por *T. urticae*. As respostas das plantas receptoras foram distintas, como por exemplo  $\beta$  Farneseno foi induzido em receptoras de VS e  $\alpha$  Farneseno em receptoras de VI, entre outros. Os resultados demonstram claramente que a composição química do buquê de voláteis, é dependente dos fatores físico-químicos relativos a emissão desses compostos, como volatilidade, temperatura e umidade no ambiente, e dos fatores bióticos intrínsecos à indução pela herbivoria, como variabilidade genética da planta, população e gênero da herbivoria, entre outros, são importantes no processo de comunicação.

Um dos resultados de destaque observado no presente estudo foi a produção do composto TMTT em ambas as plantas receptoras (VS e VI) no 5º dia, e sua ausência no buquê de voláteis em plantas expostas a *T. urticae*. A produção desse composto é um forte indicativo de que as plantas receptoras de *C. floribundus* perceberam os voláteis sintéticos e induzidos ao ponto de ativar sua defesa químicas indiretas e se protegerem precocemente de possíveis agentes agressores.

Compreender as habilidades de comunicação das plantas com outras plantas, insetos e microrganismos, intra e interespecíficos usando os milhares de voláteis como mediadores é um grande desafio. Entretanto, estudos nessa área podem proporcionar um alto retorno, pois poderá trazer medidas alternativas para a agricultura convencional e, especialmente, para o sistema de agroecologia. Por exemplo, utilizar os COV de plantas nativas como armadilhas químicas para afastar possíveis predadores, ou até mesmo, utilizá-los para atrair inimigos naturais em cultivares, pode ser uma excelente alternativa de semioquímicos para controle biológico de pragas.

É de extrema importância o desenvolvimento de medidas alternativas para a agricultura tradicional para que possamos ter um planeta mais sustentável, saudável e harmonioso para as pessoas e outros organismos presentes. Por fim, é necessário que os conhecimentos gerados com a ciência básica possam ser aplicados e testados em campo, favorecendo o desenvolvimento da ecologia química e desvendando os mistérios por trás da linguagem química das plantas.

## 7. Referências Bibliográficas

**Agut, B., Gamir, J., Jaques, J. A., & Flors, V.** 2015. *Tetranychus urticae*- triggered responses promote genotype- dependent conspecific repellence or attractiveness in citrus. *New Phytologist*, 207(3), 790-804.

**Aharoni, A., Giri, A. P., Deuerlein, S., Griepink, F., de Kogel, W. J., Verstappen, F. W., ... & Bouwmeester, H. J.** 2003. Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic *Arabidopsis* plants. *The Plant Cell*, 15(12), 2866-2884.

**Ament, K., Kant, M. R., Sabelis, M. W., Haring, M. A., & Schuurink, R. C.** 2004. Jasmonic acid is a key regulator of spider mite-induced volatile terpenoid and methyl salicylate emission in tomato. *Plant Physiology*, 135(4), 2025-2037.

**Arimura G., Matsui K., Takabayashi J.** 2009. Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. *Plant Cell Physiology*, 50, 911-923.

**Arimura, G. I., Ozawa R., Horiuchi J. I., Nishioka T., Takabayashi, J.** 2001. Plant–plant interactions mediated by volatiles emitted from plants infested by spider mites. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(10), 1049-1061.

**Arimura, G. I., Ozawa, R., Kugimiya, S., Takabayashi, J., & Bohlmann, J.** 2004. Herbivore-induced defense response in a model legume. Two-spotted spider mites induce emission of (E)- $\beta$ -ocimene and transcript accumulation of (E)- $\beta$ -ocimene synthase in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, 135(4), 1976-1983.

**Arimura, G. I., Tashiro, K., Kuhara, S., Nishioka, T., Ozawa, R., & Takabayashi, J.** 2000. Gene responses in bean leaves induced by herbivory and by herbivore-induced volatiles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 277(2), 305-310.

**Atkinson, R., & Arey, J.** 2003. Gas-phase tropospheric chemistry of biogenic volatile organic compounds: a review. *Atmospheric Environment*, 37, 197-219.

- Baldwin I.T., Halitschke R., Paschold A., von Dahl C.C., Preston C.A.**2006. Science. 311, 812–816.
- Baluška F., & Vivanco J.**2009. Signaling and Communication in plants. Spring H.D. London, 1st edition.
- Bartram, S., Jux, A., Gleixner, G., & Boland, W.**2006. Dynamic pathway allocation in early terpenoid biosynthesis of stress-induced lima bean leaves. *Phytochemistry*, 67(15), 1661-1672.
- Beale, M. H., Birkett, M. A., Bruce, T. J., Chamberlain, K., Field, L. M., Huttly, A. K., ... & Prosser, I. M.**2006. Aphid alarm pheromone produced by transgenic plants affects aphid and parasitoid behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(27), 10509-10513.
- Bensoussan, A., Sung, K. C. J., Yam, S. C. P., & Yung, S. P.**2016. Linear-quadratic mean field games. *Journal of Optimization Theory and Applications*, 169(2), 496-529.
- Bernasconi, M. L., Turlings, T. C., Ambrosetti, L., Bassetti, P., & Dorn, S.**1998. Herbivore- induced emissions of maize volatiles repel the corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 87(2), 133-142.
- Berry, P. E., Cordeiro, I., Wiedenhoef, A. C., Vitorino-Cruz, M. A., & de Lima, L. R.**2005. Brasil croton, a new crotonoid genus of Euphorbiaceae ss from eastern Brazil. *Systematic Botany*, 30(2), 357-365
- Birkett, M. A., Campbell, C. A., Chamberlain, K., Guerrieri, E., Hick, A. J., Martin, J. L., ... & Poppy, G. M.**2000. New roles for cis-jasmone as an insect semiochemical and in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 9329-9334.
- Bison, J. V. S.**2015. Ação de indutores químicos (ozônio, salicilato de metila e óxido nítrico) na composição de voláteis de *Croton floribundus* Spreng.

- Blande J.D., Tiiva P., Oksanen E., Holopainen J.K.**2007. Emission of herbivore induced volatile terpenoids from two hybrid aspen (*Populus tremula x tremuloides*) clone under ambient and elevated ozone concentration in the field. *Global Change Biology*. 13, 2538-2550.
- Bolwell, G.P. & Daudi, A.** 2009. Reactive oxygen Species in Plant-pathogen interaction In: Río, L. A., Puppo A. Reactive oxygen Species in plant signaling. *Signalling in communication in plant*. Springer-Verlag, Berlin
- Bracho-Nunez, A., Knothe, N., Welter, S., Staudt, M., Costa, W. R., Liberato, M. A. R., ... & Kesselmeier, J.**2013. Leaf level emissions of volatile organic compounds (VOC) from some Amazonian and Mediterranean plants. *Biogeosciences*, 10(9), 5855-5873.
- Bruin, J., Dicke, M., & Sabelis, M. W.**1992. Plants are better protected against spider-mites after exposure to volatiles from infested conspecifics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 48(5), 525-529.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L.**2015. Biochemistry and molecular biology of plants. John Wiley & Sons.
- Calfapietra, C., Fares, S., Manes, F., Morani, A., Sgrigna, G., & Loreto, F.**2013. Role of Biogenic Volatile Organic Compounds (BVOC) emitted by urban trees on ozone concentration in cities: A review. *Environmental pollution*, 183, 71-80.
- Cardoso-Gustavson P., Bolsoni V. P., Oliveira D. P., Guaratini M. T. G., Aidar M. P. M., Marabesi M. A., Souza, S. R.**2014. Ozone-Induced Responses in *Croton floribundus* Spreng.(Euphorbiaceae): Metabolic Cross-Talk between Volatile Organic Compounds and Calcium Oxalate Crystal Formation. *PloS One*. 9(8), 1-10.
- Carrenho, R., Bononi, V. L. R., & Barbosa, L. M.** 1997. Glomales em áreas de recomposição de mata ciliar de Moji-Guaçu, SP, Brasil. *Hoehnea*, 24(1), 107-113.

- Carter, W. P., Cocker, D. R., Fitz, D. R., Malkina, I. L., Bumiller, K., Sauer, C. G., ... & Song, C.**2005. A new environmental chamber for evaluation of gas-phase chemical mechanisms and secondary aerosol formation. *Atmospheric Environment*, 39(40), 7768-7788.
- Choh, Y., & Takabayashi, J.**2006. Herbivore-induced extrafloral nectar production in lima bean plants enhanced by previous exposure to volatiles from infested conspecifics. *Journal of chemical ecology*, 32(9), 2073-2077.
- Clarke, K. R., & Gorley, R. N.**2006. PRIMER V6: user manual-tutorial. Plymouth Marine Laboratory.
- Conklin, P.L.** 2001. Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Plant, Cell and Environment*. 24: 383-394. *Global Change biology* 9: 295-394.
- das Graças Fonseca, M.**2010. Estudo da ecologia química da broca-da-erva-mate, *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae) (Doctoral dissertation, Universidade Federal do Paraná).
- das, A., Lee, S. H., Hyun, T. K., Kim, S. W., & Kim, J. Y.**2013. Plant volatiles as method of communication. *Plant biotechnology reports*, 7(1), 9-26.
- Dawson, G. W., Griffiths, D. C., Pickett, J. A., Smith, M. C., & Woodcock, C. M.**1984. Natural inhibition of the aphid alarm pheromone. *Entomologia experimentalis et Applicata*, 36(2), 197-199.
- De Araújo-Neves, I., & Da Camara, C.**2012. Volatile constituents of two croton species from caatinga biome of Pernambuco-Brasil. *Rec. Nat. Prod*, 6(2), 161-165.
- Degenhardt, J.**2008. Ecological roles of vegetative terpene volatiles. In *Induced Plant Resistance to Herbivory* (pp. 433-442). Springer Netherlands.
- Dicke M., Van Loon J.A.L, Soler R.**2009. Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. *Nature Chemical Biology*. 5, 317-324
- Dicke, M.**1999. Evolution of induced indirect defense of plants. The ecology and evolution of inducible defenses, 62-88.

- Dicke, M., Sabelis, M. W., Takabayashi, J., Bruin, J., & Posthumus, M. A.**1990) Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals: prospects for application in pest control. *Journal of Chemical Ecology*, 16(11), 3091-3118.
- Dicke, M., Takabayashi, J., Posthumus, M. A., Schütte, C., & Krips, O. E.**1998. Plant—Phytoseiid interactions mediated by herbivore-induced plant volatiles: variation in production of cues and in responses of predatory mites. *Experimental and Applied Acarology*, 22(6), 311-333
- Domingos, P., Prado, A. M., Wong, A., Gehring, C., & Feijo, J. A.**2015. Nitric oxide: a multitasked signaling gas in plants. *Molecular plant*, 8(4), 506-520.
- Dong, F., Fu, X., Watanabe, N., Su, X., & Yang, Z**2016. Recent advances in the emission and functions of plant vegetative volatiles. *Molecules*, 21(2), 124.
- Dudareva N., Negre F., Nagegowda, Orlova I.**2006. Plant volatile; recent advance and future perspectives. *Plant Science*. 25, 417-440.
- Dudareva, N., Andersson, S., Orlova, I., Gatto, N., Reichelt, M., Rhodes, D., ... & Gershenzon, J.**2005. The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(3), 933-938.
- Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J. K., & Kaplan, I.**2013. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*, 198(1), 16-32.
- Dudareva, N., Pichersky, E., & Gershenzon, J.**2004. Biochemistry of plant volatiles. *Plant physiology*, 135(4), 1893-1902.
- Durrant W.E. & Dong X.**2004. Systemic Acquires Resistance. *Annual Review Phytopathology*. 42, 185-209.

**Engelberth L., Seidl-Adams I., Schultz J.C.**2007. Insect elicitors and exposure to green leafy volatiles differentially upregulate major octadecanoic and transcripts of 12-oxo phytyldienoic acid reductases in *Zea mays*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20 (6), 707-716.

**Engelberth, J., Alborn, H. T., Schmelz, E. A., & Tumlinson, J. H.**2004. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(6), 1781-1785.

**Erb, M., Veyrat, N., Robert, C. A., Xu, H., Frey, M., Ton, J., & Turlings, T. C.** 2015. Indole is an essential herbivore-induced volatile priming signal in maize. *Nature communications*.

**Fäldt, J., Martin, D., Miller, B., Rawat, S., & Bohlmann, J.**2003. Traumatic resin defense in Norway spruce (*Picea abies*): methyl jasmonate-induced terpene synthase gene expression, and cDNA cloning and functional characterization of (+)-3-carene synthase. *Plant molecular biology*, 51(1), 119-133

**Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., & Scheffer, J. J.** 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(4), 213-226.

**Fineschi, S., & Loreto, F.**2012. Leaf volatile isoprenoids: an important defensive armament in forest tree species. *Forest-Biogeosciences and Forestry*, 5(1), 13.

**Frost, C. J., Appel, H. M., Carlson, J. E., De Moraes, C. M., Mescher, M. C., & Schultz, J. C.**2007. Within- plant signalling via volatiles overcomes vascular constraints on systemic signalling and primes responses against herbivores. *Ecology Letters*, 10(6), 490-498.

**Frost, C. J., Mescher, M. C., Carlson, J. E., & De Moraes, C. M.**2008. Plant defense priming against herbivores: getting ready for a different battle. *Plant Physiology*, 146(3), 818-824.

**Grbić, M., Van Leeuwen, T., Clark, R. M., Rombauts, S., Rouzé, P., Grbić, V., ... & Hernández-Crespo, P.**2011. The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. *Nature*, 479(7374), 487-492.

- Halliwell B. & Gutteridge J.M.C.**1989. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press. Oxford.
- Hartmann, T.**2007. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plantsecondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22), 2831-2846.
- Hayat S., Mori M., Pichtel J., Ahmad A.** 2010. Nitric Oxide in Plant Physiology. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.Weinheim, Alemanha.
- Heath R. L.**2008. Modification of the biochemical pathways of plants induced by ozone: what are the varied routes to change? *Environmental Pollution*.155(3), 453-463.
- Heil, M. & Karban R.**2009. Explaining evolution of plant communication by airborne signals. *Trends in Ecology and Evolution*. 25(3). 137-144
- Heil M. & Ton, J.**2008. Long-distance signalling in plant Defence.*Trends in Plant Science*. 13, 264-272.
- Heil, M. & Bueno, J.C.S.** 2007. Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 5467-5472.
- Hilker, M., & Meiners, T.**2006. Early herbivore alert: insect eggs induce plant defense. *Journal of chemical ecology*, 32(7), 1379-1397.
- Himanen, S., Vuorinen, T., Tuovinen, T., & Holopainen, J. K.**2005. Effects of cyclamen mite (*Phytonemus pallidus*) and leaf beetle (*Galerucella tenella*) damage on volatile emission from strawberry (*Fragaria× ananassa* Duch.) plants and orientation of predatory mites (*Neoseiulus cucumeris*, *N. californicus*, and *Euseius finlandicus*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(22), 8624-8630.
- Holopainen J.K & Gerhenson, J.**2010. Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. *Trends in Plant Science*. 15, 1360- 1385.

- Holopainen J.K.**2004. Multiple functions of inducible plant volatiles. *Trends in Plant Science*, 11, 529-533.
- Holopainen, J. K., & Blande, J. D.**2013. Where do herbivore-induced plant volatiles go?.
- Iriti, M., & Faoro, F.**2009. Chemical diversity and defence metabolism: how plants cope with pathogens and ozone pollution. *International journal of molecular sciences*, 10(8), 3371-3399.
- Kant, M. R., Ament, K., Sabelis, M. W., Haring, M. A., & Schuurink, R. C.**2004. Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants. *Plant Physiology*, 135(1), 483-495.
- Kant, M. R., Bleeker, P. M., Van Wijk, M., Schuurink, R. C., & Haring, M. A.**2009. Plant volatiles in defence. *Advances in botanical research*, 51, 613-666.
- Kant, M. R., Sabelis, M. W., Haring, M. A., & Schuurink, R. C.**2008. Intraspecific variation in a generalist herbivore accounts for differential induction and impact of host plant defences. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 275(1633), 443-452.
- Karban, R., & Baldwin, I. T.**2007. *Induced responses to herbivory*. University of Chicago Press. [baldw](#)
- Karnosky, D. F., Percy, K. E., Chappelka, A. H., Simpson, C., & Pikkarainen, J.** .2003. *Air pollution, global change and forests in the new millennium (Vol. 3)*. Elsevier.
- Kessler, A., & Baldwin, I. T.**2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*, 291(5511), 2141-2144.
- Kigathi, R. N., Unsicker, S. B., Reichelt, M., Kesselmeier, J., Gershenzon, J., & Weisser, W. W.**2009. Emission of volatile organic compounds after herbivory from *Trifolium pratense* (L.) under laboratory and field conditions. *Journal of chemical ecology*, 35(11), 1335.

- Klessig, D. F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D. A., Wendehenne, D., Kumar, D., ... & Trifa, Y.**2000. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 8849-8855.
- Knudsen, J. T., & Gershenzon, J.**2006. The chemical diversity of floral scent. *Biology of floral scent*, 27-52.
- Knudsen, Jette T., Lars Tollsten, and L. Gunnar Bergström.**1993. "Floral scents—a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques." *Phytochemistry* 33.2 253-280.
- Kocsy, G., Galiba, G., Brunold, C.** 2001. Role of glutathione in adaptation and signaling during chilling cold acclimation in plants. *Physiologia Plantarum* 113(2): 158-164.
- Köpke, D., Beyaert, I., Gershenzon, J., Hilker, M., & Schmidt, A.**2010. Species-specific responses of pine sesquiterpene synthases to sawfly oviposition. *Phytochemistry*, 71(8), 909-917.
- Kost, C., & Heil, M.**2006. Herbivore- induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants. *Journal of Ecology*, 94(3), 619-628.
- Kost, C., & Heil, M.**2008. The defensive role of volatile emission and extrafloral nectar secretion for lima bean in nature. *Journal of chemical ecology*, 34(1), 2-13.
- Krokene, P., Nagy, N. E., & Krekling, T.**2008. Traumatic resin ducts and polyphenolic parenchyma cells in conifers. In *Induced plant resistance to herbivory* (pp. 147-169). Springer Netherlands.
- Lima, L. R. D., & Pirani, J. R.** 2008. Taxonomic revision of *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae ss). *Biota Neotropica*, 8(2), 0-0.
- Lima, S. G. D., Citó, A. M., Lopes, J. A., Neto, J. M., Chaves, M. H., & Silveira, E. R.**2010. Fixed and volatile constituents of genus *Croton* plants: *C. adenocalyx* Baill-Euphorbiaceae. *Revista latinoamericana de química*, 38(3), 133-144.

- Lorenzi H.** 1992. Arvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Plantarum, Nova Odessa
- Loreto, F., & Schnitzler, J. P.** 2010. Abiotic stresses and induced BVOCs. Trends in plant science, 15(3), 154-166
- Lopes, E. L., Andrade Neto, M., Silveira, E. R., Pessoa, O. D. L., & Braz-Filho, R.** 2012. Flavonoids and sesquiterpenes of *Croton pedicellatus* Kunth. *Química Nova*, 35(11), 2169-2172.
- Maeda, T., Takabayashi, J., Yano, S., & Takafuji, A.** 2000. Effects of light on the tritrophic interaction between kidney bean plants, two-spotted spider mites and predatory mites, *Amblyseius womersleyi* (Acari: Phytoseiidae). Experimental and Applied Acarology, 24(5), 415-425.
- Maffei M. E., Mithöfer A., & Boland, W.** 2007. Before gene expression: early events in plant–insect interaction. Trends in Plant Science, 12(7), 310-316.
- Maffei, M. E.** 2010. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. South African Journal of Botany, 76(4), 612-631.
- Martin, D. M., Gershenzon, J., & Bohlmann, J.** 2003. Induction of volatile terpene biosynthesis and diurnal emission by methyl jasmonate in foliage of Norway spruce. Plant physiology, 132(3), 1586-1599.
- Matos F.J.A.** 1989. Guia de seleção e emprego de plantas medicinais do nordeste do brasil. Fortaleza, IOCE, vol. 2.
- McCormick, A. C., Unsicker, S. B., & Gershenzon, J.** 2012. The specificity of herbivore-induced plant volatiles in attracting herbivore enemies. Trends in plant science, 17(5), 303-310.
- Moraes, M. C., Pareja, M., Laumann, R. A., & Borges, M.** 2008. The chemical volatiles (Semiochemicals) produced by neotropical stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae). Neotropical Entomology, 37(5), 489-505.

- Mostafavi, R., Henning, J. A., Gardea-Torresday, J., & Ray, I. M.** 1996. Variation in aphid alarm pheromone content among glandular and eglandular-haired *Medicago* accessions. *Journal of chemical ecology*, 22(9), 1629-1638.
- Moura, B. B.** 2013. Análises estruturais e ultraestruturais em folhas de espécies nativas sob influência de poluentes aéreos (Doctoral dissertation, Instituto de Botânica).
- Neill, S., Desikan, R., Clarke, A., Hust, R., Hancock, J.T.** 2001. Hydrogen peroxide and nitric oxide is signaling molecules in plants. *Journal of experiment Botany* 53: 1237-1247.
- Neto, M. A., de Alencar, J. W., Cunha, A. N., & Silveira, E. R.** 1994. Volatile Constituents of *Croton lundianus* (F. Diedr.) Muell. and *C. glandulosus* (L.) Muell. *Journal of Essential Oil Research*, 6(2), 191-193.
- Neto, M. R. N., Botelho, S. A., Fontes, M. A. L., Davide, A. C., & Farias, J. M. R.** 2000. Estrutura e composição florística da comunidade arbustivo-arbórea de uma clareira de origem antrópica, em uma floresta estacional semidecídua motana, Lavras-MG, Brasil. *Cerne*, 6(2), 79-94.
- Okada, K., Abe, H., & Arimura, G. I.** 2014. Jasmonates induce both defense responses and communication in monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Plant and Cell Physiology*, pcu158.
- Orians C.** 2005. Herbivores, vascular pathways, and systemic induction: facts and artifacts. *Journal of Chemical Ecology*. 31(10), 2231-2242.
- Ozawa, R., Arimura, G. I., Takabayashi, J., Shimoda, T., & Nishioka, T.** 2000. Involvement of jasmonate- and salicylate-related signaling pathways for the production of specific herbivore-induced volatiles in plants. *Plant and Cell Physiology*, 41(4), 391-398.
- parasitoid behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:10509–10513
- Paré, P. W., & Tumlinson, J. H.** 1996. Plant volatile signals in response to herbivore feeding. *Florida Entomologist*, 93-103.

- Paré, P. W., & Tumlinson, J. H.**1997. De novo biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants. *Plant physiology*, 114(4), 1161-1167.
- Park, S. W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S. and Klessig, D. F.**2007. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* 318, 113–116.
- Peñaflor, M. F. G. V., Erb, M., Robert, C. A. M., Miranda, L. A., Werneburg, A. G., Dossi, F. C. ,... & Bento, J. M. S.**2011. Oviposition by a moth suppresses constitutive and herbivore-induced plant volatiles in maize. *Planta*, 234(1), 207-215.
- Perrin, J.** 2013. Brownian movement and molecular reality. Courier Corporation
- Pfaffl M. W.**2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research*. 29(9), 45-46.
- Phillips, M. A., Wildung, M. R., Williams, D. C., Hyatt, D. C., & Croteau, R.**2003. cDNA isolation, functional expression, and characterization of (+)- $\alpha$ -pinene synthase and (–)- $\alpha$ -pinene synthase from loblolly pine (*Pinus taeda*): Stereocontrol in pinene biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 411(2), 267-276.
- Pichersky, E., & Gang, D. R.**2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in plant science*, 5(10), 439-445.
- Pichersky, E., Noel, J. P., & Dudareva, N.**2006. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science*, 311(5762), 808-811.
- Pierik C., Ballaré C.L., Dicke M.**2014. Ecology of plant volatiles: taking a plant community perspective. *Plant Cell Environment*. 37(8), 1845-1853.
- Pinto, M.C. & Tommasi, Gara, L.** 2002. Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in Tobacco Bright-Yellow 2 cell. *Plant Physiology* 130: 698-708.
- Pinto-Zevallos D. M., Martins C. B., Pellegrino A. C., Zarbin P. H.**2013. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. *Química Nova*, 36(9), 1395-1405.

- Pinto-Zevallos, D. M., & Zarbin, P. H.**2013. A química na agricultura: perspectivas para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis. *Quim Nova*, 36, 1509-1513
- Price P W, Bouton C E, Gross P, McPheron B A, Thompson J N, Weis A E.**1980. Interactions among three tropic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 11, 41–65.
- Raguso, R. A., & Pichersky, E.**199. A day in the life of a Linalol molecule: chemical communication in a plant-pollinator system. Part 1: Linalol biosynthesis in flowering plants. *Plant Species Biology*, 14(2), 95-120.
- Rohloff, J., & Bones, A. M.**2005. Volatile profiling of *Arabidopsis thaliana*—Putative olfactory compounds in plant communication. *Phytochemistry*, 66(16), 1941-1955.
- Runyon, J. B., Mescher, M. C., & De Moraes, C. M.**2006. Volatile chemical cues guide host location and host selection by parasitic plants. *Science*, 313(5795), 1964-1967.
- Salatino, A., Salatino, M. L. F., & Negri, G.**2007. Traditional uses, chemistry and pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18(1), 11-33.
- Sarmiento, R. A., Lemos, F., Bleeker, P. M., Schuurink, R. C., Pallini, A., Oliveira, M. G. A., ... & Janssen, A.**2011. A herbivore that manipulates plant defence. *Ecology letters*, 14(3), 229-236.
- Scandalios, J. G.**1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant physiology*, 101(1), 7.
- Schwartzberg, E. G., Kunert, G., Röse, U. S., Gershenzon, J., & Weisser, W. W.**2008. Alarm pheromone emission by pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, clones under predation by lacewing larvae. *Entomologia experimentalis et applicata*, 128(3), 403-409.
- Shah, J.**2009. Plants under attack: systemic signals in defence. *Current opinion in plant biology*, 12(4), 459-464.

**Shimoda, T.**201). A key volatile infochemical that elicits a strong olfactory response of the predatory mite *Neoseiulus californicus*, an important natural enemy of the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *Experimental and Applied Acarology*, 50(1), 9-22.

**Shriner, D. S., & Karnosky, D. F.**2003. What is the role of demographic factors in air pollution and forests?. *Developments in Environmental Science*, 3, 43-55.

**Silveira, E. C. D.** História de vida de *Euseius concordis* (Chant, 1959) tendo como presa *Oligonychus ilicis* (McGregor, 1917)(Acari: Phytoseiidae, Tetranychidae).

**Smith, L., & Beck, J. J.**2015. Duration of emission of volatile organic compounds from mechanically damaged plant leaves. *Journal of plant physiology*, 188, 19-28.

**Souza e Lorenzi, H.** Botânica e sistemática. Guia ilustrado das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. São Paulo, instituto plantarum, 2005.

**Souza S.R, Vasconcellos P., Mantovani W., Carvalho L.R.F.**2002. Emissão por folhas de *Ficus benjamina* L. (Moraceae) de compostos orgânicos voláteis oxigenados. *Revista Brasileira de Botânica*, 25, 413-418.

**Souza, S. R., & Pagliuso, J. D.**2009. Design and assembly of an experimental laboratory for the study of atmosphere–plant interactions in the system of fumigation chambers. *Environmental monitoring and assessment*, 158(1), 243-249.

**Taiz, L. & Zeiger, E.**2010. *Plant Physiology* . Universitat Jaume I. 5th edition.

**Takabayashi, J., Dicke, M., & Posthumus, M. A.**1991. Variation in composition of predator-attracting allelochemicals emitted by herbivore-infested plants: relative influence of plant and herbivore. *Chemoecology*, 2(1), 1-6.

**Tamogami, S., Rakwal, R., & Agrawal, G. K.** 2008. Interplant communication: airborne methyl jasmonate is essentially converted into JA and JA-Ile activating jasmonate signaling pathway and VOCs emission. *Biochemical and biophysical research communications*, 376(4), 723-727.

- Theis, N., & Lerdau, M.**2003. The evolution of function in plant secondary metabolites. *International Journal of Plant Sciences*, 164(S3), S93-S102.
- Tonial, R. P. L.** 2011. Influência da estrutura filogenética das comunidades sobre respostas das plantas à poluição por ozônio.
- Truong, D. H., Heuskin, S., Delaplace, P., Francis, F., & Lognay, G.**2014. VOC emissions and protein expression mediated by the interactions between herbivorous insects and *Arabidopsis* plant. A review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 18(3), 455.
- Turlings, T. C., Lengwiler, U. B., Bernasconi, M. L., & Wechsler, D.**1998. Timing of induced volatile emissions in maize seedlings. *Planta*, 207(1), 146-152.
- Turlings, T. C., Tumlinson, J. H., Heath, R. R., Proveaux, A. T., & Doolittle, R. E.**1991. Isolation and identification of allelochemicals that attract the larval parasitoid, *Cotesia marginiventris* (Cresson), to the microhabitat of one of its hosts. *Journal of chemical ecology*, 17(11), 2235-2251.
- Ueda, H., Kikuta, Y., & Matsuda, K.**2012. Plant communication: mediated by individual or blended VOCs?. *Plant signaling & behavior*, 7(2), 222-226.
- Van Den Boom, C. E., Van Beek, T. A., Posthumus, M. A., De Groot, A., & Dicke, M.**2004. Qualitative and quantitative variation among volatile profiles induced by *Tetranychus urticae* feeding on plants from various families. *Journal of chemical ecology*, 30(1), 69-89.
- Van Hulten M., Pelser M., Van Loon L. C., Pieterse C. M., Ton J.**2006. Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(14), 5602-5607.
- Van Loon , L. C. & Van Strien, E. A.**1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant pathology*. 55, p. 85-97.

- Verhage, A., VanWess, S.C.M, Piterse, M.J.** 2010. Plant Immunity: It's Hormones talking, but what do they say? *Plant Physiology* 154: 536-540.
- Voigt, D., Gorb, E., & Gorb, S.**2007). Plant surface–bug interactions: *Dicyphus errans* stalking along trichomes. *Arthropod-Plant Interactions*, 1(4), 221-243.
- War, A. R., Sharma, H. C., Paulraj, M. G., War, M. Y., & Ignacimuthu, S.**2011. Herbivore induced plant volatiles: their role in plant defense for pest management. *Plant signaling & behavior*, 6(12), 1973-1978.
- Webster, G. L.**1993. A provisional synopsis of the sections of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon*, 793-823
- Wink, M.**2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64(1), 3-19.
- Yu, J., Lei, J., Yu, H., Cai, X., & Zou, G.**2004. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Scutellaria barbata*. *Phytochemistry*, 65(7), 881-884.
- Yuan, J. S., Himanen, S. J., Holopainen, J. K., Chen, F., & Stewart, C. N.**2009. Smelling global climate change: mitigation of function for plant volatile organic compounds. *Trends in ecology & evolution*, 24(6), 323-331.
- Zar, J.H.** 1999. *Biostatistical analysis*. Person Education India. 947 p.
- Zakir, A., Bengtsson, M., Sadek, M. M., Hansson, B. S., Witzgall, P., & Anderson, P.**2013. Specific response to herbivore-induced de novo synthesized plant volatiles provides reliable information for host plant selection in a moth. *Journal of experimental Biology*, 216(17), 3257-3263.
- Zebelo, S. A., Matsui, K., Ozawa, R., & Maffei, M. E.**2012. Plasma membrane potential depolarization and cytosolic calcium flux are early events involved in tomato (*Solanum lycopersicon*) plant-to-plant communication. *Plant science*, 196, 93-100.

**Zhu, J., & Park, K. C.**2005. Methyl salicylate, a soybean aphid-induced plant volatile attractive to the predator *Coccinella septempunctata*. *Journal of chemical ecology*, 31(8), 1733-1746.