

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Expressão gênica e voláteis induzidos pela herbivoria de *Spodoptera frugiperda*
(J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho, *Zea mays* L. (Poaceae)**

Laura Silveira Drummond Moreira

**Dissertação apresentada para obtenção
do título de Mestre em Ciências. Área
de concentração: Entomologia**

**Piracicaba
2010**

Laura Silveira Drummond Moreira
Bióloga

**Expressão gênica e voláteis induzidos pela herbivoria de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)
(Lepidoptera: Noctuidae) em milho, *Zea mays* L. (Poaceae)**

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ MAURICIO SIMÕES BENTO**

**Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre em Ciências. Área de
concentração: Entomologia**

Piracicaba
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Moreira, Laura Silveira Drummond

Expressão gênica e voláteis induzidos pela herbivoria de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho, *Zea mays* L. (Poaceae) / Laura Silveira Drummond Moreira. - - Piracicaba, 2010.
80 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Compostos voláteis 2. Expressão gênica 3. Insetos Fitófagos 4. Interação planta-inseto
Milho I. Título

CDD 633.15
M838e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais e professores,
amigos e amores,
a todas as felicidades e dores
que me fizeram chegar onde cheguei,
ofereço esta dissertação

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer de coração a todas as pessoas que me ajudaram durante o processo do mestrado. Tenho plena consciência de que sem o apoio e auxílio das pessoas aqui citadas, nunca teria conseguido realizar este trabalho.

Primeiramente ao Prof. Dr. José Maurício Simões Bento, pela orientação, exemplo, oportunidade, confiança, paciência e bom humor, sempre, e principalmente por despertar em mim o fascínio pela Ecologia Química.

Ao Prof. Dr. Daniel Scherer de Moura, por toda a ajuda e conselhos, bom humor, paciência e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Márcio de Castro Silva Filho, por ter disponibilizado as dependências do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas do Dep. de Genética da ESALQ, pelo incentivo e acolhida no grupo.

À FAPESP, pelo auxílio concedido e incentivo à minha pesquisa, desde a graduação.

Aos professores e funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ, por toda a ajuda e ensinamentos nas disciplinas cursadas e pelo convívio do dia a dia.

Ao Prof. Dr. Celso Omoto pela ajuda e amparo e também pela excelente coordenação e senso crítico.

Às bibliotecárias da Biblioteca Central da ESALQ pelo suporte e ajuda nas correções, especialmente à Silvia pelo excelente trabalho e carinho.

À Dra. Maria Fernanda Gomes Villalba Peñaflor, pela amizade, ensinamentos, bom humor e inestimável ajuda nas minhas quedas, tanto as metafóricas quanto as literais.

Ao Wagner Moreira e ao Guilherme Gustinelli pela ajuda técnica na análise dos dados, amizade e disposição.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Comportamento de Insetos, os de antes, os de agora e os de sempre, Vitor, Andréa, Mariana, Ana Lia, Bel, Rejane Kuss, Rejane, Mayra, Marcy, Lucila, Luisa, Weliton, pela companhia, valiosas trocas intelectuais e pensamentos sobre a vida, risadas, auxílio e principalmente por formarem um grupo tão agradável de se trabalhar junto. Agradeço especialmente ao Newton, Nancy, Sinhá e Cris (e Fer, novamente) pela amizade e pela troca de idéias, pelo apoio e ajuda sempre, pelas risadas e pelas longas conversas sobre ciência e sobre a vida, vocês fizeram toda a diferença!

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Lígia, Taís, Fabi, Larissa, Marcela, Eveline, Wellington, Juliano, Juliana, Christine, Ricardo, Rafael, por toda a ajuda e companhia e pela acolhida, ensinamentos e troca de idéias, principalmente à Ligia Hansen por ter me ensinado tantas coisas com paciência e bom humor.

A todos os colegas de pós-graduação, especialmente Trivella, Greice, Fernanda, Agustín, Osmar, Edgar, Valdemir (*in memoriam*), Lorena e Luzimário, pelo companheirismo e troca de idéias durante estes três anos de curso.

Aos amigos de Piracicaba, Anaiá, Saldanha, Sarinha, Chavero, Vase, Hevelin, Jamile, Virgilio, por todos os momentos agradáveis, amizade essencial e por terem feito esta cidade realmente virar minha casa.

À Isabeli Bruno por ter me dado um teto quando mudei para Piracicaba.

À galera de Rio Claro e suas maluquices pelas fundamentais gargalhadas nos momentos de descontração.

Ao Manuel, nosso argentino favorito, pelo companheirismo, agradável convivência e amizade.

Aos amigos biólogos de São Paulo, Luísa, Débora, Ogro, Karina, Mingau, Ana, Nada Mal, Bira, Ju, Otite, Ceará, Bia, Lia, Caroxinha, Huno, por tudo o que passamos juntos no período fantástico que foi a faculdade, e pela amizade além dos tempos e das distâncias. Amo muito vocês.

Aos amigos de agora e sempre, Pat, Mau, Mari, Maria, Lia, Pica, Lígia, Paula, Érica, Ale, Carol, Lau e Fernando, pelos maravilhosos momentos juntos, sempre bons e revigorantes, e pela amizade incondicional.

Às amigas de casa, que viraram minha família durante este período, Lau e Vivian (e João, que também já faz parte da casa e se tornou um ótimo amigo), e mais recentemente a Tânia, minhas irmãzinhas queridas que foram fundamentais em todo esse processo e em todos os momentos, ruins ou bons, sempre estiveram lá para ajudar ou dar risada junto. Saibam que estarão para sempre no meu coração, muitíssimo obrigada.

Ao meu namorado, Guilherme Ambar, por todo o carinho, companheirismo, amor e cumplicidade, por toda a ajuda psicológica e intelectual durante este trabalho, e por ser uma pessoa maravilhosa. À sua família pela união e acolhimento.

Aos meus pais, Carlos Drummond e Maria Helena Silveira, pelo amor e amizade incondicionais, pelas conversas e risadas; por todo o suporte, educação e formação que me forneceram, pelo incentivo, confiança e fé em mim; por sempre terem despertado e alimentado o

interesse pelos estudos e pelo conhecimento; e por serem exemplos profissionais e seres humanos fantásticos. Amor eterno.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Tenho certeza que foram muitas, pois cada um sempre deixa um pedacinho de si na memória, por mais insignificante que possa parecer. Agradeço a todas as pessoas que fizeram e fazem parte da minha vida, que sempre foram minha fonte de esperanças e que me deram forças para continuar em frente.

“A natureza não faz milagres, faz
revelações.”

(Carlos Drummond de Andrade)

“E talvez esteja aí toda a diferença; talvez toda a
sabedoria, toda verdade e toda sinceridade estejam
apenas contidas naquele inapreciável momento em
que ultrapassamos o limiar do invisível.”

(Joseph Conrad)

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
LISTA DE ABREVIATURAS.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 Voláteis de plantas e interações tritróficas.....	23
2.2 Biossíntese de terpenos.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Criação de <i>S. frugiperda</i> em laboratório.....	29
3.2 Cultivo do milho <i>Zea mays</i> L.	30
3.3 Cálculo da Área Foliar Consumida (AFC) ao longo do tempo.....	30
3.4 Indução de voláteis pela herbivoria.....	31
3.5 Coleta e identificação dos voláteis.....	32
3.6 Coleta de tecidos.....	34
3.7 Preparação para o PCR em tempo real.....	35
3.7.1 Extração de RNA total.....	35
3.7.2 Tratamento com DNase.....	35
3.7.3 Síntese do cDNA.....	36
3.7.4 PCR em tempo real.....	36
3.7.5 Análise da expressão gênica diferencial.....	38
4 RESULTADOS.....	39
4.1 Área foliar consumida.....	39
4.2 Análise da expressão gênica diferencial.....	41
4.2.1 Gene Sequiterpeno Ciclase 1 (STC1).....	43
4.2.2 Gene Terpeno Sintase 23 (TPS23).....	45
4.2.3 Gene Terpeno Sintase 10 (TPS10)	47
4.2.4 Gene Lipoxigenase 10 (LOX10).....	49
4.2.5 Efeito da herbivoria na expressão dos genes.....	51
4.3 Análise dos voláteis.....	52

5 DISCUSSÃO.....	55
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
REFERÊNCIAS.....	63
ANEXO.....	69
APÊNDICE.....	73

RESUMO

Expressão gênica e voláteis induzidos pela herbivoria de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho, *Zea mays* L. (Poaceae)

Em resposta aos danos ocasionados por insetos, as plantas emitem voláteis que atraem os inimigos naturais desses herbívoros. Embora essa relação tritrófica venha sendo intensamente estudada, muitos mecanismos envolvidos nesta interação ainda permanecem inexplorados. Dentre os compostos voláteis induzidos por herbivoria e emitidos pelas plantas, os terpenos são os mais expressivos e abundantes. Em resposta ao dano ocasionado por um inseto, cascatas bioquímicas são iniciadas na planta, as quais podem alterar a expressão de genes envolvidos na resposta a tal dano. Este trabalho analisou as mudanças na expressão gênica e produção de compostos voláteis em plantas de milho, *Zea mays* (Poaceae) promovidas por lagartas *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) ao longo do tempo. Utilizando a técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR) foram verificadas respostas no nível da expressão gênica das plantas submetidas à indução por herbivoria. Foram analisados os genes de uma lipoxigenase e de três terpeno sintases, enzimas envolvidas na produção de compostos voláteis que atraem parasitóides de *S. frugiperda*. As plantas submetidas à herbivoria apresentaram níveis de expressão gênica e emissão de voláteis maiores do que as plantas sadias. Os resultados fornecem bases para o entendimento dos mecanismos endógenos responsáveis pela liberação de voláteis nas plantas visando o estabelecimento de novos fundamentos para o controle biológico de pragas.

Palavras-chave: Interação Inseto-Planta; Expressão gênica ; Voláteis de plantas; Herbivoria

ABSTRACT

Gene expression and volatile compounds induced by herbivory of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in corn, *Zea mays* L. (Poaceae)

In response to insect damage, plants emit volatiles that attract natural enemies of herbivores. Although this tritrophic interaction has been intensively studied, many mechanisms involved in this interaction remain unexplored. Among the herbivore-induced volatile compounds, terpenes are the most abundant and significant ones. In response to insect damage, biochemical pathways are activated, which can alter the expression of genes involved in the response to that damage. This study examined changes in gene expression and volatile compounds production in maize plants, *Zea mays* (Poaceae) promoted by *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae) caterpillars through time. Using the real-time PCR technique (qRT-PCR) we verified responses on the level of gene expression of plants subjected to herbivores feeding. We analyzed genes of lipoxygenase and three terpene synthases, enzymes involved in the synthesis of volatile compounds that attract parasitoids of *S. frugiperda*. Plants subjected to herbivory had higher levels of gene expression and volatile emission when compared to healthy plants. Results provide basis for better understanding of plant volatile emission endogenous mechanisms in order to set new foundations for biological control of pests.

Keywords: Insect-plant interactions; Gene expression; Plant volatiles; Herbivory.

LISTA DE ABREVIATURAS

AFC – Área Foliar Consumida

cDNA – DNA complementar

DMAPP – Dimetilalil Difosfato

FPP – Farnesil Difosfato

GPP – Geranil Difosfato

GGPP – Geranil Geranil Difosfato

IPP – Isopentenil Difosfato

LOX – Lipoxigenase

NTC – Controle sem fita molde (*Non-Template Control*)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)

RNA_m – RNA mensageiro

qRT-PCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real (*quantitative Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction*)

STC – Sesquiterpeno Ciclase

TPS – Terpeno Sintase

1 INTRODUÇÃO

Durante a alimentação de um herbívoro, são liberados elicitores (compostos cuja percepção pela planta induz uma resposta de defesa) presentes nas secreções orais do inseto. Esses elicitores, como a volicitina ou a beta-glucosidase, entram em contato com o interior da planta por meio do ferimento causado e lá iniciam reações químicas que são como que sinais indicativos de que a planta está sob ataque (MATTIACCI et al., 1995; TURLINGS et al., 2000). A partir dessa sinalização, tem início uma sucessão de cascatas bioquímicas que culminam numa resposta sistêmica na planta, em diversos níveis, chegando até a alteração de níveis de expressão gênica e a síntese de compostos químicos. Alguns desses compostos, como terpenos ou derivados de terpenos irão atrair inimigos dos herbívoros, incluindo predadores e parasitóides (TAKABAYASHI; DICKE, 1996; ALBORN et al., 1997).

Métodos de controle biológico com o uso de inimigos naturais de pragas são comumente propostos para reduzir o impacto de agroquímicos na agricultura. A descoberta de que terpenos voláteis de plantas atraem inimigos naturais de herbívoros pode contribuir para a exploração do potencial de controle biológico em sistemas agrícolas. Uma vez conhecidos os genes biossintéticos responsáveis pela formação desses voláteis, a manipulação destes genes em plantas cultiváveis poderá ser utilizada para melhorar a produção de voláteis isolados ou de misturas de voláteis.

A manipulação genética tem sido sugerida como um instrumento para desvendar aspectos da produção de voláteis induzidos pela herbivoria em plantas (DICKE; VAN LOON, 2000) e também para aumentar a atração dos inimigos naturais. Uma vez conhecidos os genes responsáveis pela biossíntese e formação dos voláteis induzidos pela herbivoria, as plantas transgênicas podem ser utilizadas para a produção de compostos isolados ou misturas de materiais voláteis. A compreensão dos mecanismos endógenos de defesas induzidas em plantas contra artrópodes herbívoros tem permitido o desenvolvimento de estratégias alternativas de controle biológico. O uso de voláteis de plantas para atrair predadores e parasitóides de organismos é uma estratégia complementar para o controle biológico de pragas, por meio do desenvolvimento de iscas atrativas ou da manipulação dos processos bioquímicos que induzem e regulam a produção de voláteis de plantas. Estudos recentes têm demonstrado que a manipulação genética teve um efeito significativo no aumento da resistência aos insetos fitófagos

(LOU;BALDWIN, 2006;KAPPERS et al., 2005;SCHNEE et al., 2006). A clonagem de genes que codificam enzimas-chave reguladoras da biossíntese de compostos voláteis e o cultivo de plantas com expressão alterada desses genes (*overexpression* ou *knock-out*), estabelece uma abordagem adequada para modificar a composição volátil e melhorar a defesa indireta das plantas. Expandindo-se a coleção de genes envolvidos na biossíntese de terpenos aumenta-se a possibilidade de desenvolvimento de plantas capazes de emitir sinais químicos mais concentrados e detectáveis. A manipulação genética para regular a biossíntese de terpenóides em plantas pode ser feita pela super-expressão de terpeno sintases (TPs), (YU;UTSUMI, 2009). Estudos demonstraram que a manipulação genética de enzimas envolvidas na síntese de voláteis de algumas plantas, teve um efeito significativo no aumento da resistência de insetos fitófagos (DEGENHARDT et al., 2003). Expandindo-se a coleção de genes que participam da biossíntese de terpenos será possível obter plantas modificadas capazes de emitir sinais químicos mais concentrados e detectáveis.

Técnicas de biologia molecular têm-se mostrado uma boa alternativa para a abordagem da resposta induzida por herbivoria nas plantas. Nesse contexto, a análise da expressão gênica por meio da técnica do PCR em tempo real (qRT-PCR) fornece informações sobre os genes que estão sendo preferencialmente expressos sob determinado tratamento, tecido ou tempo cronológico. Essas variáveis podem gerar perfis de expressão completamente distintos em genomas praticamente idênticos. Mantendo condições controladas para os diferentes indivíduos a serem estudados, é possível analisar os efeitos, na expressão dos genes, da alteração de uma única variável; ou ainda, mantendo todas as variáveis semelhantes para um e outro, analisar a resposta para um mesmo estímulo em diferentes espécies. Os resultados obtidos com esse tipo de análise podem fornecer dados quanto aos genes envolvidos em determinada alteração fisiológica e metabólica, o que pode indicar mecanismos moleculares de respostas. A expressão diferencial de genes pode ser apontada por técnicas como a do PCR em tempo real, que consiste na quantificação dos RNAs provenientes da expressão diferencial dos genes (LEUNG;CAVALIERI, 2003).

O estudo do sistema de defesas indiretas de plantas e seu papel em interações tritróficas entre plantas-herbívoros-parasitóides/predadores tem sido focado nos ambientes agrícolas devido ao seu potencial econômico. Pesquisas nesta área podem promover uma interação entre a

ecologia química básica (comunicação química entre insetos e plantas) e genética (genes envolvidos na resposta da planta), colocando assim a biologia molecular como ferramenta de estudo da ecologia envolvendo pragas de importância econômica. Conhecendo as bases moleculares dessas interações tritróficas pode-se esperar estabelecer mecanismos múltiplos de resistência nas plantas contra pragas, por meio do aumento o conhecimento das estratégias de defesa induzida de plantas e da utilização de bibliotecas gênicas baseadas em estudos dos transcriptomas de plantas atacadas por herbívoros.

Para o estudo dos voláteis de plantas foi escolhido o milho *Zea mays* L. (Poaceae), por ser de fácil condução em condições laboratoriais e ter ciclo de vida curto. O milho produz sinais químicos herbívoro-específicos em resposta à herbivoria que podem ser utilizados por parasitóides para localizarem hospedeiros (DE MORAES et al., 1998). Estes sinais pertencem, majoritariamente, à classe dos terpenóides, os quais são sintetizados *de novo* em resposta à alimentação por insetos (UDAYAGIRI; JONES, 1992), sugerindo que a análise dos transcritos dessa planta sob esse tipo de estresse resulta na expressão diferencial de genes envolvidos na produção desses compostos em relação à planta sadia.

Como herbívoro dessa espécie de planta foi selecionada a lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *S. frugiperda* é considerada uma das pragas mais importantes da cultura de milho no Brasil, que costuma atacar desde a fase de plântula até as de pendramento e espigamento (ÁVILA et al., 1997). Esse inseto é de fácil criação e apresenta alta porcentagem de sobrevivência em condições laboratoriais.

O conhecimento dos fatores que influenciam o comportamento de procura de hospedeiros pelos parasitóides tem avançado substancialmente nos últimos anos, mas pouco se fez em relação à busca de genes específicos envolvidos na produção da resposta induzida nas plantas. Informações a respeito do transcriptoma dessas plantas poderão favorecer uma melhor compreensão dessas respectivas interações e contribuir para o desenvolvimento de técnicas mais efetivas no controle biológico de pragas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Voláteis de plantas e interações tritróficas

As plantas possuem diferentes mecanismos para reagir à herbivoria. Sob o ataque de insetos, alterações metabólicas podem ocorrer no sentido de produzir uma reação ao ferimento provocado. Em primeira instância, as plantas produzem diversos compostos químicos de defesa que afetam diretamente herbívoros e patógenos, a chamada defesa direta. As defesas indiretas caracterizam-se por recorrerem a um terceiro nível trófico, mobilizando organismos carnívoros, parasitóides e predadores do local (DICKE;VET, 1999). Este tipo de reação inclui a produção e emissão de compostos voláteis que os inimigos naturais dos herbívoros utilizam para localizar suas presas (DICKE et al., 1990; TURLINGS et al., 1995; DE MORAES et al., 1998; KESSLER;BALDWIN, 2001; TAKABAYASHI;DICKE, 1996). Há evidências de que a emissão de certos voláteis é resultado de síntese protéica *de novo* (PARE;TUMLINSON, 1997) e envolve a indução da atividade de enzimas (DEGENHARDT;GERSHENZON, 2000), sugerindo um aumento nos níveis de genes transcritos associados a este processo (HERMSMEIER et al., 2001;HALITSCHKE et al., 2003).

Alterações metabólicas ocorridas em uma planta como consequência de herbivoria constituem uma resposta induzida (KARBAN;MYERS, 1989). Essas mudanças incluem indução fitoquímica (BALDWIN et al., 1994), aumentos de defesas físicas como espinhos e tricomas não glandulares (YOUNG, 1987; BAUR et al., 1991), emissão de voláteis que atraem predadores e parasitóides de herbívoros (TAKABAYASHI;DICKE 1996, DE MORAES et al., 1998), redução da qualidade nutricional das plantas para os herbívoros (BI et al., 1997) e até aumentos da produção de néctar extrafloral ou recrutamento de formigas em sistemas planta-formiga (SMITH et al., 1990; AGRAWAL, 1998; AGRAWAL; RUTTER, 1998).

Se a resposta da planta ao dano inicial resulta em preferência reduzida e/ou pior desempenho dos herbívoros que dela se alimentarem em momento posterior a esse dano, ela é denominada resistência induzida (KARBAN; MYERS, 1989). Esse tipo de resistência foi constatada em centenas de sistemas herbívoro-plantas (revisado por KARBAN; BALDWIN, 1997) e geralmente está associada à produção de metabólitos secundários. No entanto, para uma resposta induzida ser classificada como defesa é necessário que a indução aumente o *fitness* da

planta, ou seja, que plantas apresentando esta resposta tenham sobrevivência e/ou maior produção de descendentes quando comparadas com plantas que não apresentem tal resposta. Apesar de existirem poucas demonstrações de respostas induzidas tendo como consequência o aumento do *fitness* da planta, há evidências dos benefícios da indução (KARBAN; BALDWIN, 1997; AGRAWAL, 1998; BALDWIN, 1998) e de que o custo da ativação deste sistema de defesa é relativamente baixo (AGRAWAL et al., 2002).

Demonstrou-se amplamente que plantas respondem de forma diferente a danos mecânicos (provocados por instrumentos confeccionados para este fim) em comparação ao que ocorre quando são atacadas por herbívoros e que essa diferença de reação é gerada por elicitores, presentes na saliva desses animais, que entram em contato com tecidos internos da planta (ENGELBERTH et al., 2007; FREY et al., 2000; PARE; TUMLINSON, 1997; TURLINGS et al., 2000; HALITSCHKE et al., 2001). Os diversos parâmetros que afetam a resposta da planta à herbivoria sugerem a existência de um sofisticado sistema de defesa que otimiza a resposta em conformidade com o organismo intruso (VOELCKEL; BALDWIN, 2004). Observou-se que respostas herbívoro-específicas na forma de voláteis são um fenômeno verificado em diversas famílias de plantas (Malvaceae, Solanaceae e Gramineae) (TURLINGS; WÄCKERS, 2004), presumivelmente a partir da ativação de cascatas de sinalização de defesa (PARE; TUMLINSON, 1999).

Predadores e parasitóides presumivelmente são seletivos na procura por suas presas e hospedeiros. Considerando que esta procura é muitas vezes guiada por voláteis liberados por plantas sob o ataque de herbívoros, a seleção começa na percepção destes voláteis, que são na realidade odores detectados pelas antenas de insetos carnívoros (CARPENTER; JEWETT, 2002; GOUINGUENÉ et al., 2005). Esses organismos são capazes de discriminar entre várias misturas de compostos em ambientes saturados com voláteis de plantas, de acordo com dados de TURLINGS e colaboradores (1995). Esses autores verificaram que as combinações de voláteis são específicas para cada espécie de planta e emitidas em grandes quantidades, sendo facilmente distinguíveis, pelos insetos, de outros odores aos quais sejam submetidos. Foi demonstrado em diversos casos que compostos isolados atraem predadores (DICKÉ et al., 1990; KESSLER; BALDWIN, 2001).

O estudo da defesa induzida nas plantas parece ter potencial para melhorar a eficiência do controle biológico, por meio do aumento da emissão de voláteis atrativos para os inimigos

naturais. O progresso na pesquisa sobre mecanismos moleculares envolvidos na emissão de voláteis induzidos por herbivoria pouco a pouco fornece bases para viabilizar a produção de variedades de plantas com capacidade aumentada de atrair inimigos naturais e repelir herbívoros (DEGENHARDT et al., 2003;HERMSMEIER et al., 2001;DUDAREVA et al., 2006).

Dentre os metabólitos secundários produzidos pelas plantas, os terpenos constituem o grupo mais diversificado. Esses compostos participam de diversas funções biológicas nas plantas, como a defesa contra insetos e a produção de odores florais, e podem ser explorados nas indústrias farmacêutica e alimentícia por suas propriedades anti-microbianas e flavorizantes, respectivamente. Os terpenos também são emitidos pelas plantas em resposta a danos causados por insetos. A liberação de terpenos nessas ocasiões pode atrair predadores e parasitóides do inseto que está se alimentando da planta (PARE; TUMLINSON, 1999; DICKE; VAN LOON, 2000; KESSLER; BALDWIN, 2001), atrair fungos entomopatogênicos (RASMANN et al., 2005) ou sinalizar para a própria planta que ela está sendo atacada, ativando mecanismos bioquímicos que a deixam preparada para se defender contra um possível ataque (TON et al., 2007) e constituindo um interessante sistema de pré-indução de defesa chamado de *priming*(VAN HULTEN et al., 2006). Plantas de milho produzem cerca de 100 terpenos diferentes, sendo que a maioria é constituída por sesquiterpenos (SCHNEE et al., 2002).

2.2 Biossíntese de Terpenos

Os terpenos são derivados de um precursor com cinco carbonos, o isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP). A condensação de duas, três ou quatro unidades de carbono resulta na formação do composto de dez carbonos geranyl difosfato (GPP), do de quinze carbonos farnesil difosfato (FPP) e do de vinte carbonos geranyl-geranyl difosfato (GGPP) (KOYAMA; OGURA, 1999). GPP, FPP e GGPP são substratos para terpeno sintases (TPS), enzimas que produzem monoterpenos de dez carbonos, sesquiterpenos de quinze carbonos e diterpenos de vinte carbonos. Enquanto os terpenos de vinte, trinta, quarenta ou mais átomos de carbono (diterpenos, triterpenos, tetraterpenos, politerpenos) são comuns e desenvolvem importantes funções na natureza em interações ecológicas e bioquímicas de plantas, os terpenos menores (sesquiterpenos e monoterpenos) têm particular importância na sinalização por voláteis das plantas.

Duas características da biossíntese dos terpenos, combinadas, fornecem substrato para a diversidade de estruturas encontrada neste grupo de compostos químicos. Primeiro, as estruturas dos substratos são tais que diversas possibilidades de ligações carbono-carbono e combinações de ligações são formadas. Segundo, há a formação de compostos quirais. A combinação da diversidade química dos terpenos com suas diversas características físicas (monoterpenos e sesquiterpenos são bastante voláteis e diterpenos são pouco voláteis) e efeitos fisiológicos (toxicidade e ativação de neurônios sensoriais animais, por exemplo) gera uma grande diversidade de funções e portanto de papéis químico-ecológicos dos diferentes compostos.

Sesquiterpenos (C15) são sintetizados no citoplasma de células vegetais enquanto monoterpenos (C10) e diterpenos (C20) o são nos plastídeos (MC GARVEY; CROTEAU, 1995). Os precursores IPP e DMAPP, no entanto, podem ser sintetizados por uma de duas rotas bioquímicas separadas uma da outra, dependendo de sua localização: a via do Mevalonato no citoplasma ou a via do 2-C-metil-D-eritrol 4-fosfato (MEP) no plastídeo (LANGE et al., 2001). Apesar desta compartimentalização, hoje se sabe que ocorre intercâmbio de moléculas de IPP entre o citossol e o plastídeo (Figura 1). IPP e DMAPP são convertidos em GPP, FPP ou GGPP, substratos para as muitas TPS, por meio da atividade de prenil transferases. TPS produzem a variedade de esqueletos básicos de terpenos presentes nas plantas. A formação das estruturas dos terpenos pelas TPS é comumente seguida de mudanças secundárias como oxidações, adição de grupos funcionais ou truncamentos, resultando numa grande diversidade estrutural de terpenos. A maioria dos terpenos é cíclica, e as várias classes de terpenos são formadas a partir de intermediários de 10, 15, 20 e 30 carbonos por terpeno sintases ou ciclases.

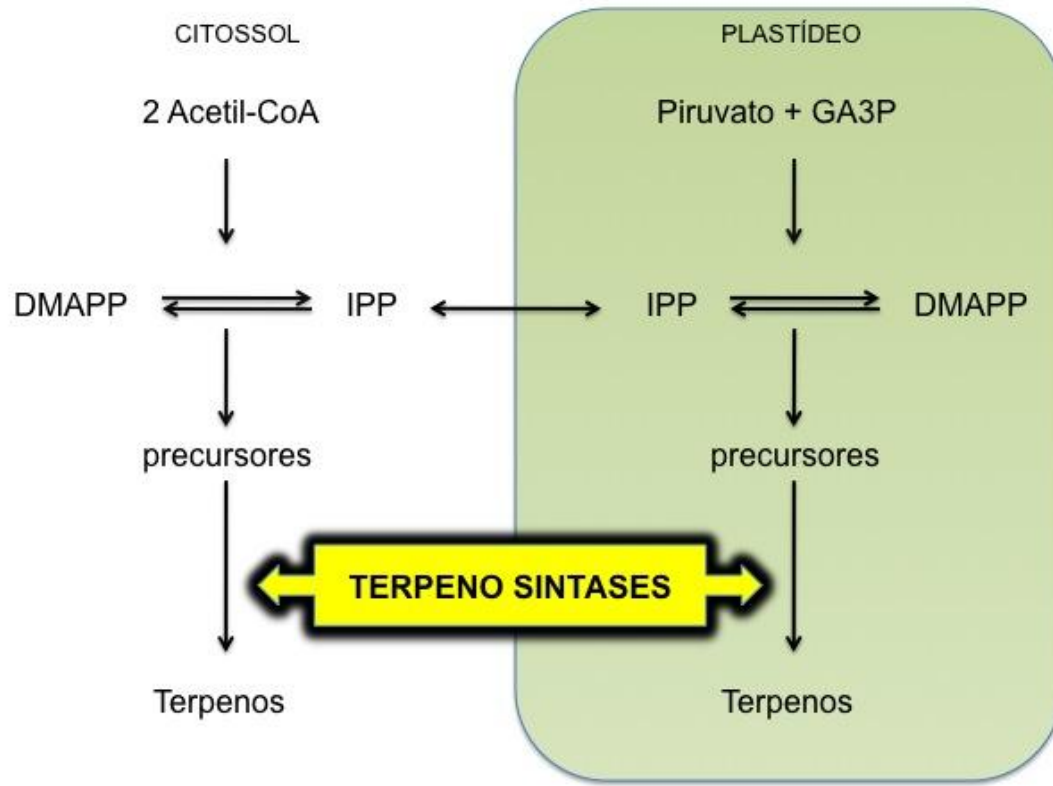


Figura 1 - Esquema mostrando as duas vias de biossíntese de terpenos: a do mevalonato no citossol (à esquerda) e a do metileritrol-fosfato no plastídeo (à direita). Apesar da compartimentalização intracelular, ocorre intercâmbio de moléculas de isopentenil difosfato (IPP) entre as duas vias. No plastídeo, As terpeno sintases participam no passo final de ambas as rotas bioquímicas de formação dos terpenos. Acetil CoA = Acetil Coenzima A; DMAPP = Dimetilalil Difosfato; GA3P = Gliceraldeído-3-Fosfato; IPP = Isopentenil Difosfato

As TPSs representam uma família de genes grande e diversificada e podem ser classificadas em sete subfamílias, baseando-se na correlação entre as sequências de aminoácidos (AUBOURG et al., 2002; DUDAREVA, 2003). A origem monofilética das TPS de plantas é demonstrada pela estrutura comum de exons e introns nas sete subfamílias de TPS (TRAPP; CROTEAU, 2001; AUBOURG et al., 2002). As sintases se agrupam tanto pelas relações filogenéticas dos organismos que as expressam quanto por sua função catalítica. Por exemplo, uma limoneno sintase em uma angiosperma provavelmente estaria em uma família diferente de

uma limoneno sintase de uma gimnosperma, mas limoneno sintases de diferentes gimnospermas provavelmente se agrupariam numa mesma família (BOHLMANN et al., 1998). Sequências de aminoácidos podem permitir uma predição a priori da função geral de uma TPS, mas não sua função específica. Conseqüentemente uma TPS de uma gimnosperma com uma sequência de aminoácido similar a uma limoneno sintase conhecida de outra espécie provavelmente é uma monoterpene sintase, mas não necessariamente uma limoneno sintase. Há uma série de motivos de sequências conservadas (AUBOURG, 2002) e também uma alta semelhança em estruturas de cristalografia e mecanismos catalíticos (WHITTINGTON et al., 2002) em TPS ao longo das espécies estudadas até o momento, confirmando a idéia de que a diversidade de TPS observada hoje teve origem em um único ancestral.

A diversidade de produtos das TPS presentes constitutivamente ou induzíveis em tecidos vegetais está diretamente relacionada ao arranjo de diferentes TPS presentes em uma única espécie. Além disso, enquanto algumas TPS produzem apenas um produto, muitas TPS produzem majoritariamente um terpeno e alguns outros terpenos em quantidades variáveis. (BOHLMANN et al., 2000; PHILLIPS et al., 2003) . Por outro lado, a produção de enantiômeros distintos do mesmo composto é geralmente, mas nem sempre, o papel de TPS distintas (SCHMIDT et al., 1998; PHILLIPS et al., 2003) e a estereoquímica dos terpenos pode ter importantes ramificações para sua atividade biológica (ERBILGIN; RAFA, 2001). O número de diferentes TPS em famílias gênicas, o fato de que muitas TPS produzem um grupo de produtos, e a habilidade das plantas de regular a expressão de genes de TPS fornece às plantas a capacidade de responder a pressões bióticas com modificações discretas ou relevantes na sua produção de terpenos. A combinação dos modelos de síntese de terpenos “enzima TPS múltipla” e “uma enzima, vários produtos” irá exercer um importante papel na reprodução seletiva ou na manipulação genética de plantas cultivadas no que diz respeito ao aumento de expressão ou à supressão de terpenos desejáveis ou indesejáveis.

A toxicidade dos terpenos age diretamente sobre insetos inimigos das plantas, fundamentando a assim chamada defesa direta. Ao longo da evolução, plantas e insetos acumularam uma série de adaptações um ao outro, num processo conhecido como co-evolução. Este processo incluiu o desenvolvimento de defesas indiretas, relacionando compostos liberados pelas plantas com a resposta de predadores e parasitóides de herbívoros.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no setor de Ecologia Química e Comportamento de Insetos, parte integrante do INCT de Semioquímicos na Agricultura e do Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP), em Piracicaba, SP. As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, no Departamento de Genética da ESALQ-USP. A análise dos voláteis foi realizada no Laboratório de Entomologia Evolutiva e Ecologia Química, parte integrante da Universidade de Neuchâtel (Neuchâtel, Suíça).

3.1 Criação de *S. frugiperda* em laboratório

As criações de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) foram iniciadas a partir de uma criação pré-existente no Laboratório de Comportamento de Insetos da ESALQ – USP. As criações foram mantidas em sala climatizada ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, UR $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas), e foram alimentadas utilizando dieta artificial produzida de acordo com metodologia previamente descrita (BURTON; PERKINS, 1972). Periodicamente, posturas ou lagartas provenientes de coletas em plantações de cana da Fazenda Areão (Piracicaba, SP) foram introduzidas na criação, para aumentar a variabilidade genética e evitar que a população entrasse em processo de degeneração.

As lagartas foram criadas em tubos de vidro contendo dieta artificial e individualizadas para evitar que o comportamento de canibalismo da espécie prejudicasse a manutenção da criação. As pupas foram retiradas de dentro dos tubos e colocadas em potes de plástico para emergência dos adultos, que foram então sexados e colocados aos pares em gaiolas de PVC, forradas com papel e teladas, para a cópula e postura de ovos. A alimentação dos adultos foi à base de solução de mel a 10%, disponibilizada dentro de um pequeno pote colocado dentro da gaiola, o qual continha um pedaço de algodão com uma das extremidades submersas permitindo que as mariposas sugassem o alimento através dele. As posturas depositadas pelas fêmeas no forro de papel das gaiolas foram retiradas e colocadas em pequenos copos com dieta artificial para a eclosão das lagartas, as quais foram então individualizadas em tubos de vidro, de acordo com metodologia descrita por PARRA (1996).

3.2 Cultivo do milho *Zea mays* L.

Em todos os experimentos foram utilizadas plantas de milho *Zea mays* L. var. Delprim com três folhas expandidas (8 a 10 dias após a germinação). As sementes foram pré-germinadas em placas de Petri com algodão umedecido por dois dias até se tornarem túrgidas, e então foram inseridas em recipientes plásticos (250mL) contendo substrato orgânico comercial Basaplant®. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação e umedecidas diariamente.

3.3 Cálculo da Área Foliar Consumida (AFC) ao longo do tempo

Para quantificar a extensão do dano realizado por uma lagarta de *S. frugiperda* em plantas de milho ao longo do tempo, utilizou-se o parâmetro de Área Foliar Consumida (AFC). Desta forma, foi possível comparar os dados de consumo foliar das lagartas com a expressão gênica das plantas de milho ao longo do tempo.

Para tanto, lagartas de *S. frugiperda* de terceiro instar foram aprisionadas em pequenas gaiolas de 1,0cm de diâmetro (Figura 2) acopladas às folhas de plantas de milho, sendo uma lagarta por gaiola por planta, a fim de restringir a área e o local do dano na planta, bem como evitar o escape e a migração para outras plantas.

O tempo do posicionamento das lagartas nas plantas foi considerado como $t=0$, e a mensuração da AFC foi realizada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 horas após a lagarta iniciar o dano. Os experimentos foram realizados em casa-de-vegetação durante o período das 8:00h às 18:00h, que compreendeu o período de luz. A temperatura média do dia no interior da casa-de-vegetação foi de $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ e $60 \pm 10\%$ de umidade relativa do ar (UR). Em cada intervalo de tempo, a gaiola com a lagarta foi removida, a folha seccionada e fotografada com escala. A estimativa da AFC foi feita pela análise das imagens fotográficas com auxílio do software AUTOCAD® (Autodesk, Inc.). Para cada horário o número de repetições foi de 10 plantas.

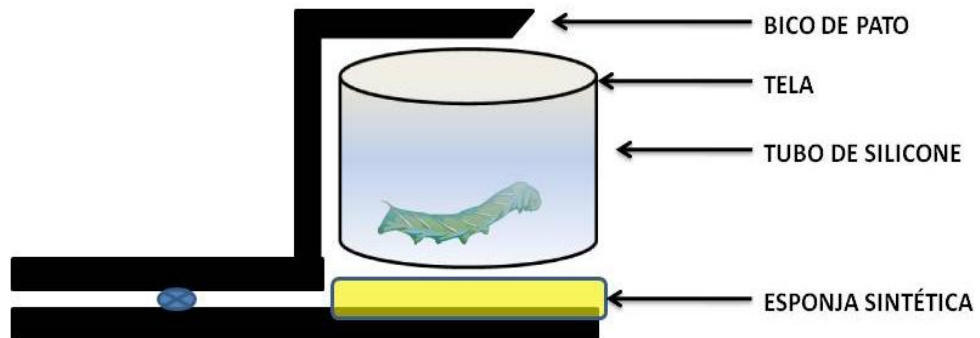


Figura 2 - Modelo esquematizado das gaiolas para as lagartas de *Spodoptera frugiperda* utilizadas nos experimentos de herbivoria em milho *Zea mays*L.. Diâmetro da gaiola = 1,0 cm

3.4 Indução de voláteis pela herbivoria

Para induzir a liberação de voláteis na planta de milho, foram acopladas pequenas gaiolas de 1,15cm de diâmetro contendo lagartas de *S. frugiperda* de terceiro ínstar, como descrito no item 5.3, sendo uma lagarta por gaiola por planta, sempre colocadas na terceira folha expandida (Figura 3), e mantidas por um período de duas (2) ou oito horas (8) na planta.



Figura 3 - Planta de milho *Zea mays* L. com gaiola (seta) para lagarta de *Spodoptera frugiperda*, mostrando o local de posicionamento do aparato na superfície foliar

3.5 Coleta e identificação dos voláteis

Para a realização da coleta de voláteis das plantas induzidas pela herbivoria, as gaiolas contendo as lagartas foram removidas das plantas nos tempos 2 e 8h, e as plantas foram transferidas para câmaras de vidro acopladas ao sistema de aeração (Figura 4). Além desses tratamentos, foi mensurada a emissão de voláteis pela planta contendo somente a gaiola, sem as lagartas (tratamento controle). As câmaras foram conectadas ao sistema de bombeamento de ar e os odores produzidos foram coletados em filtros contendo polímero adsorvente Super-Q® (25 mg, malha 80-100; Alltech Associates Deerfield, IL, E.U.A.) (TURLINGSet al., 1998; 2004). As colunas de polímero foram lavadas com 3mL diclorometano antes de cada período de coleta.

O ar purificado por meio de filtros de carvão ativado entrou nas câmaras de tratamento a uma taxa de 0,8 L/min que, em seguida, penetrou no filtro contendo o polímero adsorvente, onde os compostos voláteis liberados pelas plantas foram coletados. O ar foi puxado pela bomba a uma taxa de 2 L / min, o que permitiu que duas plantas fossem aeradas simultaneamente. Todas as coletas foram realizadas durante o fotoperíodo, visto que a produção de voláteis pela planta é dependente da atividade fotossintética (ARIMURA et al., 2005).

Após 2h de coleta, as colunas de Super-Q® foram submetidas à extração com 150µL diclorometano (Super solvente; Merck, Dietikon, Suíça), e adicionado 200ng de octano e n-acetato de n-nonilfenol (Sigma, Buchs, Suíça), em diclorometano (10µL) em cada amostra, como padrão interno (PI). As amostras em solvente foram injetadas em um cromatógrafo a gás (Agilent 7890A) acoplado a um espectrômetro de massa (Agilent 5975C VL MSD com Triple-Axis Detector; linha de transferência 230 ° C, a fonte 230 ° C, potencial de ionização de 70 eV), no modo pulsado em splitless em uma coluna apolar (HP-1 MS, 30m, 0,25 milímetros ID, 0.25µm de espessura do filme, Alltech Associates, Inc, E.U.A.). Foi usado, como gás de transporte, hélio a um fluxo constante (0,9 mL / min). Após a injeção de 2µL da amostra, a temperatura foi mantida a 40 ° C por 3,5.

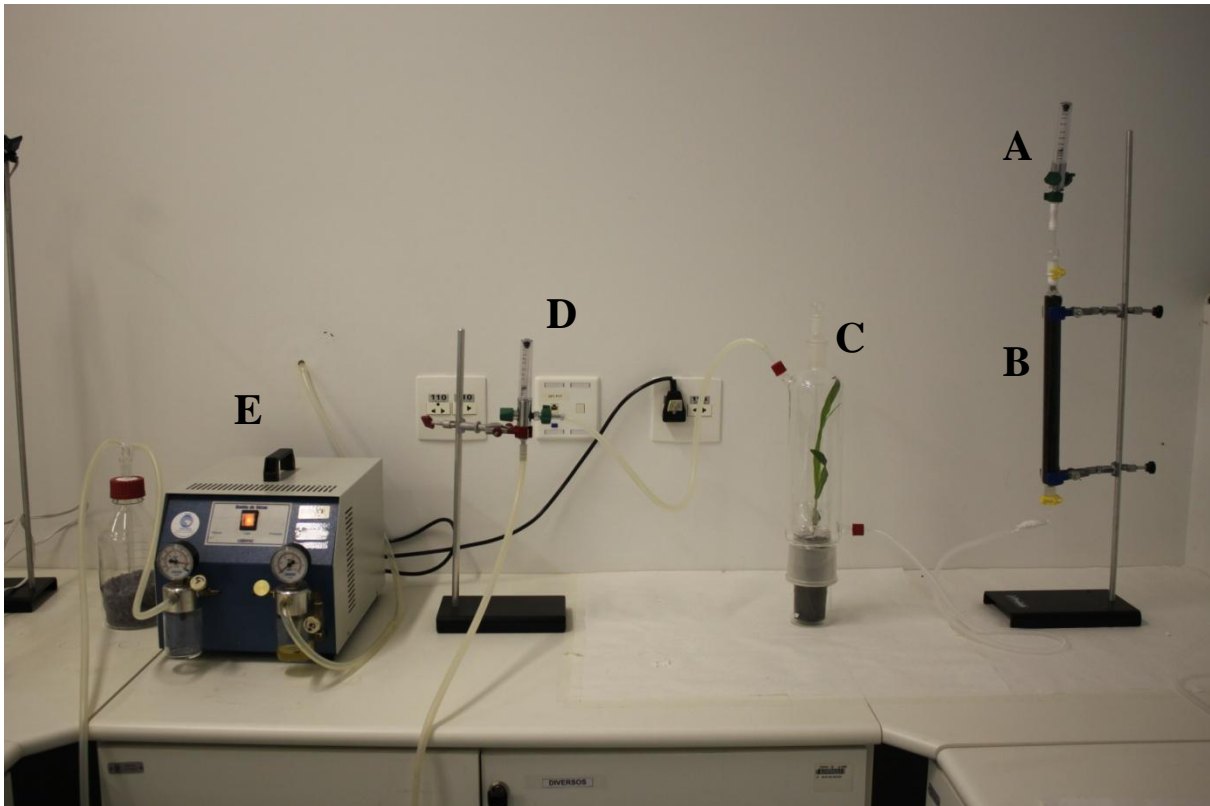


Figura 4 - Sistema utilizado para coleta de voláteis de milho, *Zea mays* L. mostrando, da direita para a esquerda (sentido do fluxo de ar): (A) fluxômetro de entrada de ar; (B) colunas de carvão ativado; (C) câmara de vidro contendo a planta a ser analisada; (D) fluxômetro de saída; e (E) bomba a vácuo

3.6 Coleta de Tecidos

Para a coleta de tecidos com o intuito de se extrair o RNA, para posterior análise de expressão gênica, foi realizado um experimento de forma análoga ao descrito acima. Lagartas foram colocadas em gaiolas sobre as plantas e o material (folha) foi coletado 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 horas após o início da alimentação da lagarta na folha. Foram utilizados 5 indivíduos por amostra, e foram coletadas 3 amostras distintas de cada tratamento. Foram utilizadas plantas inteiras, considerando-se somente a porção aérea das mesmas. As três amostras foram submetidas à extração, constituindo 3 amostras biológicas. A área coletada foi determinada pelo local do dano feito pela lagarta, sendo os limites inferior e superior a 2 cm do mesmo, seccionando transversalmente a folha em toda a extensão da largura (Figura 5).

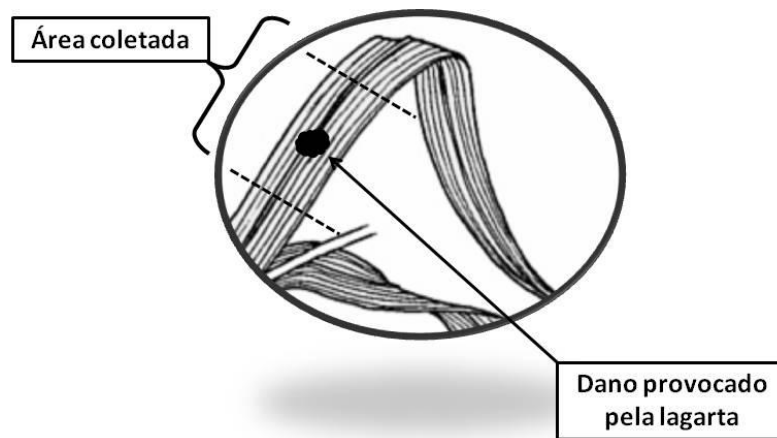


Figura 5 – Representação de uma folha de milho *Zea mays* L., evidenciando área coletada para extração de RNA, que contém a área danificada pela lagarta de *Spodoptera frugiperda*.

Optou-se por utilizar a própria herbivoria das lagartas como indução para verificar a resposta da planta a esta agressão, sem excluir nenhum fator componente da injúria. Como controle negativo foi realizado o tratamento planta com gaiola, onde apenas a gaiola era posicionada na planta, sem a lagarta – para excluir-se qualquer possibilidade de os resultados

observados serem frutos de dano provocado pela própria gaiola, e não pela alimentação da lagarta.

3.7 Preparação para o Real Time PCR

3.7.1 Extração de RNA total

Os tecidos vegetais das plantas de milho utilizadas foram primeiramente congelados em nitrogênio líquido e então macerados. A extração de RNA total foi realizada utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen). Cada amostra foi colocada em 1 mL do reagente, misturada em vórtex e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 200 µL de clorofórmio, agitou-se vigorosamente por 15 segundos, incubou-se à temperatura ambiente por 2 minutos e então as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 15 minutos sob temperatura de 4° C. Após este passo são formadas 3 fases no tubo, sendo que a superior, aquosa, corresponde ao RNA e foi coletada e transferida para outro tubo. Adicionou-se 500 µL de isopropanol, agitou-se, incubou-se à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugou-se a 14000 rpm por 10 minutos, sob temperatura de 4° C. Neste passo é formado um pellet no fundo do tubo, que corresponde ao RNA. O sobrenadante foi, portanto, descartado. Lavou-se a amostra com 1 mL álcool 75%, agitou-se no vórtex e centrifugou-se a 7500 rpm por 5 minutos sob temperatura de 4° C, descartando-se o sobrenadante ao final do processo. O pellet restante foi deixado sobre a bancada para secar, e então ressuspendido em 50 µL de água livre de RNase e armazenado a -80° C para posterior utilização.

3.7.2 Tratamento com DNase

Foram aliqüotados 4 µg de RNA total extraído das amostras, padronizados para um volume de 11,5 ml, e tratados com a enzima DNase I (Fermentas, Brasil). Esse passo é importante para reduzir qualquer contaminação da amostra por DNA genômico proveniente da extração. As amostras contendo 4 µg de RNA total, 4U da enzima DNase (1U/µl), e 2,0 µl de Buffer 10x foram incubadas por 20 min a 37°. Após a incubação as amostras passaram por um processo de

purificação, onde às amostras foram adicionados 300 µl de Trizol e o procedimento se seguiu exatamente como o descrito para extração do RNA, porém com os volumes ajustados proporcionalmente a esta quantidade de Trizol: 60 µl de clorofórmio, 150 µl de isopropanol e 300 µl de álcool 75% . Após a precipitação a fase líquida foi descartada e o tubo colocado de boca para baixo sobre um lenço de papel para secagem por no máximo 10 minutos.

O *pellet* de RNA precipitado foi ressuspendido em 50 µl de água livre de RNase e analisado quanto a sua integridade. A quantidade e a qualidade do RNA extraído foram verificadas por meio de leitura em espectrofotômetro de massa e eletroforese em gel de agarose. O procedimento para a preparação das amostras a serem verificadas na eletroforese ocorreu de forma a desnaturar o RNA (fervendo-o) para que fossem visualizadas quatro bandas: 28S, 18S, 58S e uma banda mais leve que corresponde ao RNA presente nos cloroplastos. Protocolos e dados de referência foram obtidos do manual de SAMBROOK e RUSSELL (2001) e das recomendações do fabricante dos produtos utilizados.

3.7.3 Síntese do cDNA

A síntese do cDNA foi feita utilizando-se 2µg do RNA tratado com DNase, 20mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50mM de KCl, 2,5mM de MgCl₂, 10mM de DTT, 0,5µg de oligo(dT), 0,5mM de cada nucleotídeo, dATP, dGTP, dCTP, dTTP e 200U da enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Brazil), em um volume total de 20µl. Primeiramente o RNA e o oligo(dT) foram aquecidos a 70°C por 10 min e colocados no gelo até a adição dos demais componentes. A reação foi incubada a 50°C por 1 hora e interrompida pelo aquecimento a 70°C por 15 min, e os tubos contendo o cDNA foram armazenados em freezer a -20°C até o uso.

3.7.4 PCR em Tempo Real

A análise da expressão gênica foi feita através do PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). As reações de qRT-PCR foram feitas no equipamento *Step One* (*Applied Biosystems, Foster City – CA, USA*). O qRT-PCR determina o Ct para cada amostra, ou seja, o ciclo de amplificação onde o acúmulo de fluorescência na amostra atinge a linha de detecção arbitrária (*threshold*). O resultado é coletado durante a fase exponencial de amplificação, que é quando a

emissão de fluorescência é proporcional ao número inicial de cópias do produto amplificado, ou concentração da amostra. As reações continham 200nM de primers, sais, deoxinucleotídeos, o mix com a enzima polimerase Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG, que contém o composto fluorescente *SYBR Green I*, otimizados para um volume final de 20µl. Para a escolha da concentração ideal de DNA a ser amplificado, foram feitas 5 diluições seriadas do cDNA obtido das amostras, 50ng, 25ng, 12.5ng, 6.25ng e 3.125ng por µL. Após a análise da curva padrão de amplificação com as diluições para cada par de primer, escolheu-se a de 25 ng/µL, aquela com maior eficiência para a concentração de trabalho. As reações foram incubadas a 50°C por 2 min e 95°C por 2 min para a ativação da enzima DNA polimerase, seguido por 40 ciclos de: a) 15 seg a 95°C para desnaturação, b) 30 seg a 60°C para anelamento, extensão e coleta do sinal de fluorescência. Para cada corrida foi feito o controle negativo NTC (ausência do DNA), para verificar a existência de contaminações. As amostras referentes as réplicas de grupos amostrais, controle e experimental, para cada gene, foram processadas sempre na mesma corrida, ou seja, na mesma placa de preparação e em triplicata. Após o término de cada corrida, a especificidade do produto de PCR formado foi determinada através de uma corrida de dissociação (95°C por 15 seg, estabilização a 60°C seguido de aumento gradual de temperatura de 1°C por min). Assim, somente foram utilizados os *primers* cujos produtos amplificados mostraram pico único, claro e bem definido na temperatura correta. O software *Step One* (Applied Biosystems, Foster City - CA, USA) foi utilizado para gerar a curva padrão de cada produto de amplificação, as curvas de dissociação, bem como suas análises. A quantidade de transcrito em cada amostra foi determinada, relativamente, utilizando o *aplet geNorm* (VANDESOMPELE et al., 2002) e baseada no Ct de cada amostra.

3.7.5 Desenho de iniciadores (*primers*)

Os primers *sense* e *antisense* específicos para cada gene do milho *Zea mays* L. e para genes candidatos a controle interno (genes com expressão similar entre os tratamentos), foram desenhados utilizando-se o software Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (ROZEN; SKALETSKY, 2000) tiveram sua estrutura e interação analisada a partir do software NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>) e sua especificidade verificada através do BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Foram utilizados dois genes de referência: ATUB

(tubulina) e PUBQ (ubiquitina), cuja expressão independe dos fatores externos sendo testados no experimento por se tratarem de genes envolvidos na produção de componentes estruturais da célula. Foram escolhidos quatro genes a serem analisados: Terpeno Sintase 23 (TPS23), Terpeno Sintase 10 (TPS10), Sesquiterpeno Ciclase 1 (STC1), e Lipoxigenase 10 (LOX10), e *primers* específicos foram desenhados a partir da sequência do RNA mensageiro (RNAm) de cada gene (Tabela 1).

Tabela 1 - Sequência dos pares de *primers* utilizados para qRT-PCR

Gene / Número de acesso *	Sequência sense / antisense (5'→3')
TPS10 / NM_001112380.1	CGTGGTGGATGATACGAAATG / GCGTCTGGTGAAGGTAATGG
TPS23 / EU259633.1	TGCTCACGCAGTTGTTTATGA / CATTGCTCCACGCCTTCTT
STC1 / NM_001112412.1	GGAGCAGCGTCGTTAGCAT / ACCAGTTCATCAGCCTCAGC
LOX10 / NM_001112510.1	CTTCAGCACCAAGCCAAGC / CCTCCTCCATTACATCCAGA
PUBQ / NM_001154981.1	TAAGCCATCAGTCGTTGAAGC / CATGAAACCAGCTCAGTCACG
ATUB / NM_001111970.1	CCTTCAGCACCTTCTTCAGC / TTGTTAGCGGCATCCTCCTT

* Sequências obtidas no Centro Nacional de Informação em Tecnologia (NCBI, EUA <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

3.7.6 Análise da expressão gênica diferencial

Para cada horário, a quantidade de transcrito (referente ao RNAm) de cada gene foi calculada a partir da normalização dos resultados brutos pela expressão de genes que não se alteraram nessas regiões com o tratamento realizado. Após a quantificação dos transcritos, os dados das diferentes amostras biológicas foram comparados entre si, gerando o erro padrão da análise. A quantidade de transcrito foi analisada comparando os diferentes horários dentro de um mesmo grupo utilizando o teste de Kruskal-Wallis com nível de significância de 0,05 (análise de variância não paramétrica). Os dados de expressão também foram comparados entre os grupos teste e controle utilizando o teste de Wilcoxon.

4 RESULTADOS

4.1 Cálculo da Área foliar consumida (AFC)

Este primeiro experimento permitiu estabelecer o período de execução dos experimentos subsequentes, de forma que a quantidade de tecido de milho, *Z. mays* L. disponível para a lagarta *S. frugiperda* não se esgotasse e que o dano fosse suficientemente grande para gerar respostas induzidas nas plantas de milho. Como a metodologia descrita utilizada para manter as lagartas num mesmo trecho da planta foi desenvolvida especialmente para os experimentos deste trabalho, o cálculo da AFC ao longo do tempo foi etapa inicial deste trabalho para determinar em quanto tempo a lagarta consumiria a quase totalidade de tecido delimitado pela gaiola. Ensaios preliminares nos permitiram verificar que ao final de dez horas de experimento a região delimitada pela gaiola havia sido quase totalmente consumida pela lagarta de *S. frugiperda*. É importante ressaltar que em nenhum dos casos a área foi consumida em sua totalidade pois caso isto ocorresse a gaiola estaria impedindo que a lagarta continuasse comendo, fazendo com que o estímulo do dano sendo realizado na planta fosse cessado.

A região da folha de milho *Z. mays* consumida pela lagarta de *S. frugiperda* foi registrada de hora em hora (Figura 6) e posteriormente digitalizada. As imagens resultantes da digitalização foram submetidas à análise escalonada no programa AutoCAD (Autodesk, Inc.) e sua área calculada em centímetros quadrados (Figura 7).

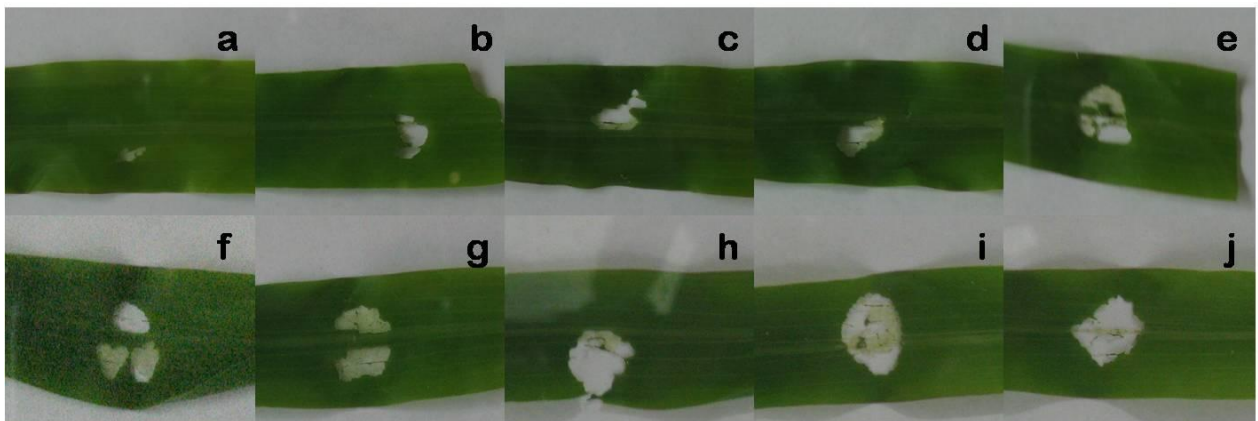


Figura 6 - Imagens de dano realizado em plantas de milho *Zea mays* L., de hora em hora após o posicionamento da lagarta de *Spodoptera frugiperda* sobre a folha: a) 1 hora; b) 2 horas; c) 3 horas; d) 4 horas; e) 5 horas; f) 6 horas; g) 7 horas; h) 8 horas; i) 9 horas; e j) 10 horas. A área explorada pela lagarta foi delimitada por gaiola de 1cm de diâmetro

Observa-se que o dano é visivelmente crescente ao longo das horas, com uma certa regularidade. A lagarta se alimenta do tecido foliar ao redor da nervura central da folha da monocotiledônea. No entanto, na hora oito podemos notar uma diferença no consumo da folha. Ao final deste horário a lagarta consome também a nervura central. O registro fotográfico demonstrou que as lagartas consumiram o tecido vegetal a cada hora, dentro do limite da gaiola, chegando à quase totalidade da área à qual está restrita ao final de dez horas (Figura 8). Com este experimento preliminar definimos que o período de experimentação seria de dez horas, pois é o tempo que a lagarta demorou para consumir a área foliar à qual foi confinada.

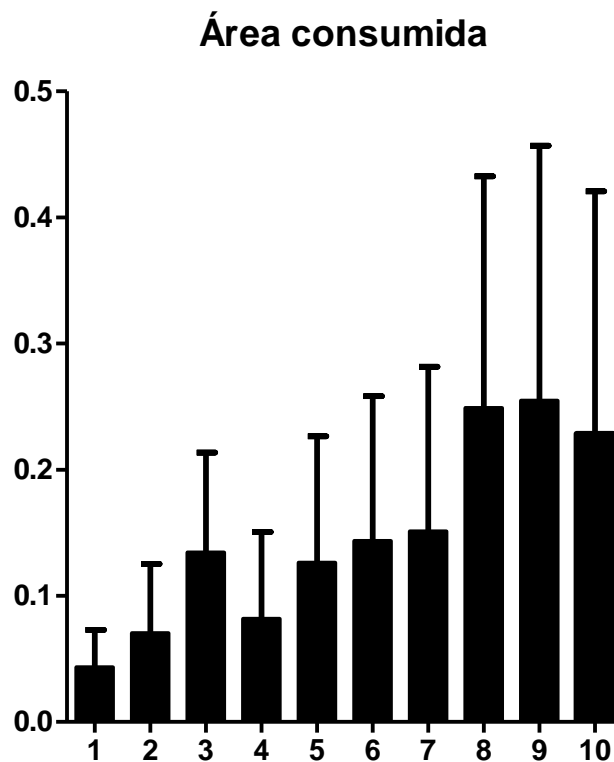


Figura 7 - Consumo foliar de milho *Zea mays* L. por hora, em cm² (eixo y) após o início da herbivoria por lagarta de *Spodoptera frugiperda* (eixo x). A área explorada pela lagarta foi delimitada por gaiola de 1cm de diâmetro. Média \pm EP, n=10

O consumo foliar das lagartas de *S. frugiperda* foi crescente ao longo do tempo nas plantas de milho *Zea mays* L. (Figura 7). Observa-se um aumento progressivo até oito horas de

alimentação, quando o valor médio da área consumida subiu 80%. A diferença deste tempo (8h) em relação aos anteriores foi significativo em relação às horas 1, 2, 3, 4 e 5, evidenciando assim o salto no valor médio observado após oito horas. É possível que esta diferença esteja relacionada ao consumo, pela lagarta, da nervura central da folha de milho, evidenciado pelo registro fotográfico (Figura 6) e observado em todas as repetições do experimento (observação pessoal). Ao final do experimento (10h) a área consumida média foi $0,42 \text{ cm}^2$, e a maior área calculada para este horário foi de $0,53 \text{ cm}^2$, ambas inferiores à área delimitada pela gaiola ($0,535 \text{ cm}^2$), mostrando que a gaiola não limitou a quantidade de folha que a lagarta pode consumir neste período de tempo, apenas a área a ser explorada (Figura 8).

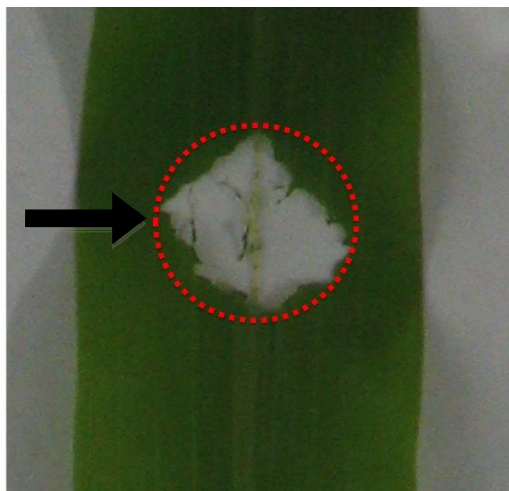


Figura 8 – Folha de milho *Zea mays* L. com dano realizado por lagarta de *Spodoptera frugiperda* de terceiro ínstar dez horas após o posicionamento da lagarta na planta. A área explorada pela lagarta foi delimitada por gaiola de 1cm de diâmetro, cujo limite está evidenciado pelo pontilhado em vermelho (seta).

4.2 Análise da expressão gênica diferencial

Os cDNAs proveniente das amostras de RNA de qualidade comprovada (ver quantificação em espectrofotômetro no Anexo 1) foram analisados em PCR de tempo real para verificar a quantidade de transcritos dos genes escolhidos. A análise do produto da reação por meio da curva de dissociação gerada após cada corrida de qRT-PCR mostrou especificidade dos *primers*, com apenas um pico na curva de desnaturação (Figura 8).

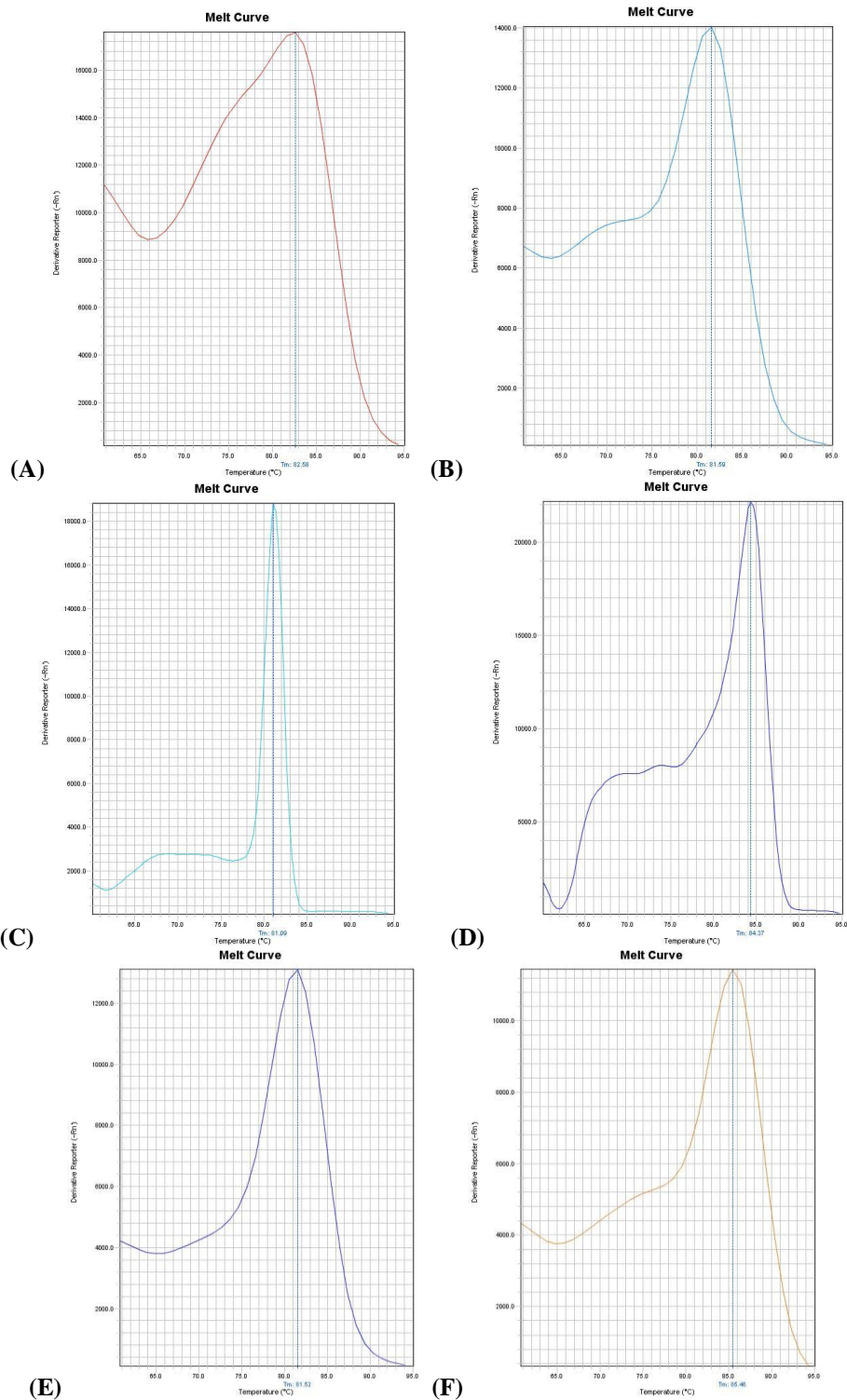


Figura 9 - Curvas de desnaturação dos fragmentos amplificados utilizando os pares de primers específicos. dissociação para os *primers* desenhados. As curvas foram obtidas com o programa: 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, aumentando gradativamente a cada 1°C até atingir 95°C e manter por 15 segundos. (A) TPS10; (B) TPS 23; (C) STC1; (D) LOX10; (E) PUBQ; e (F) ATUB

4.2.1 Gene Sesquiterpeno Ciclase 1 (STC1)

A quantidade de transcrito calculada para as amostras de plantas de milho *Z. mays* L. que sofreram herbivoria de lagartas de *S. frugiperda* foi maior do que para as plantas sadias. O gene da sesquiterpeno ciclase 1 apresentou seu pico de expressão seis horas após o início da herbivoria (Figura 10) nas plantas submetidas a este tratamento. Nesse horário, o aumento da quantidade relativa de transcrito na planta sob herbivoria quando comparada com a planta sadia foi de 175%.

A quantidade relativa de transcrito ao longo do tempo para o grupo teste aumentou progressivamente durante seis horas após o início da herbivoria, horário no qual observamos o pico de expressão deste gene, e diminuiu depois de seis horas até o final do experimento (Figura 10). Até o horário cinco observamos um crescimento regular na quantidade de transcrito, de hora em hora. No entanto, às seis horas após o início do experimento a expressão do gene apresenta um salto, aumentando 240% em uma hora de experimento. Após este aumento, o nível de expressão diminuiu sua média em 70%, apresentando quantidades de transcrito cada vez menores até o horário dez.

No grupo controle a expressão do gene variou pouco entre os horários, e a quantidade de transcrito chegou ao seu maior nível no horário cinco. Mesmo assim, nesse horário a quantidade de transcrito nas plantas do tratamento foi 100% maior do que nas plantas sadias. Foram comparados o grupo tratamento (plantas atacadas por lagartas) com o grupo controle (plantas sadias) como um todo. Para este gene, a análise dos transcritos do controle e do tratamento variou significativamente ($P < 0,01$). A partir de duas horas após o início da herbivoria, a quantidade de transcrito acumulada as plantas sob herbivoria foi significativamente maior em relação às sadias. A maior diferença encontrada entre o tratamento e o controle foi nas horas seis e sete, quando a média da quantidade de transcrito nas plantas de milho atacadas por *S. frugiperda* foi mil vezes maior do que a média encontrada nas plantas sadias.

A diferença nos níveis de expressão do gene STC1 entre os horários resultou em um valor de F não significativo para o grupo controle ($P = 0,1$). Já para o grupo teste, a diferença entre os níveis de expressão gênica foi significativa ($P < 0,05$).

A quantidade de transcrito do gene STC1 nas plantas submetidas à herbivoria foi, portanto, significativamente maior do que nas plantas sadias. Entre os horários de um mesmo grupo a quantidade de transcrito não variou significativamente.

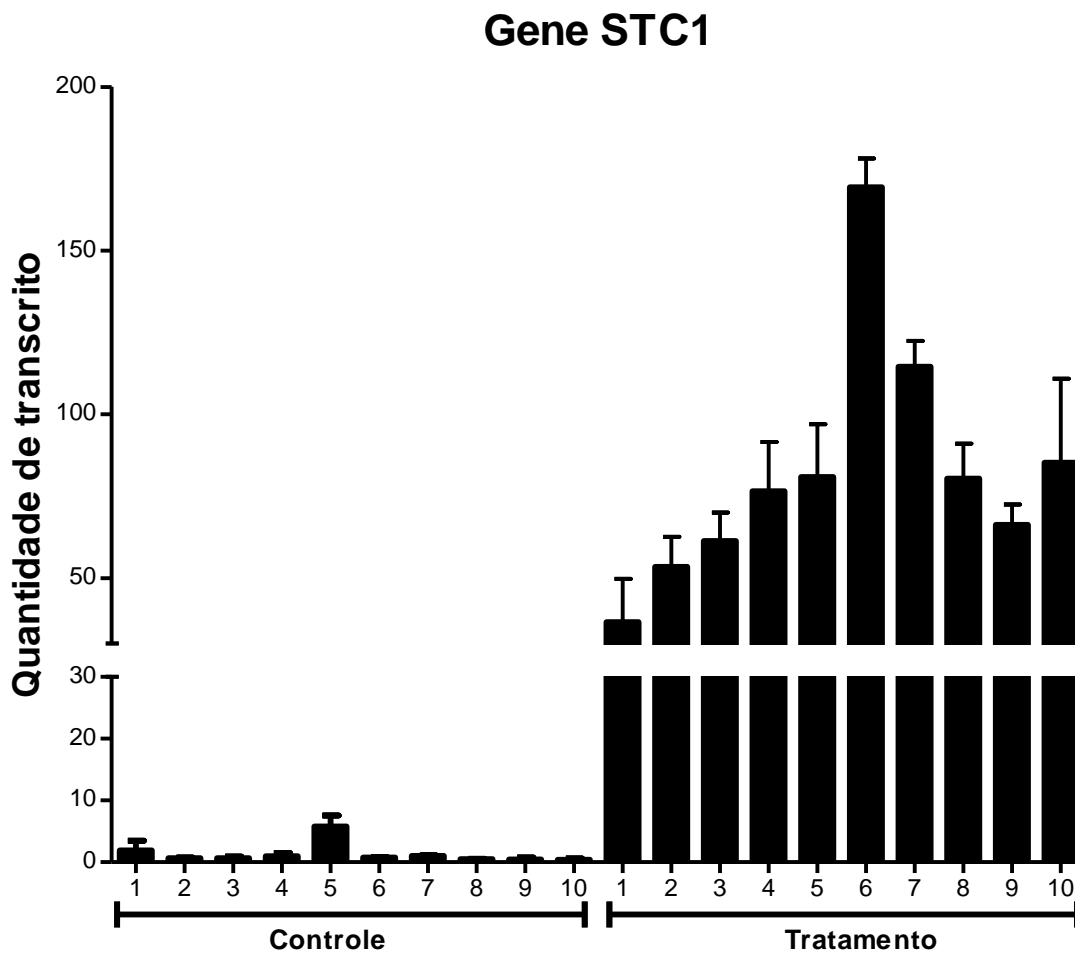


Figura 10 – Análise de PCR quantitativo em tempo real da abundância relativa de transcritos do gene STC1 (sesquiterpeno ciclase) em plantas de milho *Zea mays* L. sadias (controle, à esquerda do gráfico) e submetidas à herbivoria de *Spodoptera frugiperda* (tratamento, à direita do gráfico). Eixo Y: quantidade relativa de transcrito. Eixo X: horas após o início da herbivoria. A quantificação relativa de RNAm foi desenvolvida com correção de eficiência e ATUB e PUBQ como genes de referência. Os valores são a média de três replicatas normalizadas pela expressão dos genes de referência. Média \pm EPM ($P > 0,05$)

4.2.2 Gene Terpeno Sintase 23 (TPS23)

Os transcritos do gene TPS23 apresentaram quantidade crescente nas plantas de milho sob herbivoria a partir de duas horas após o início do experimento. Os níveis de transcrito tendem a subir, no grupo teste, até o horário de dez horas após o início do tratamento. Nesse horário atinge-se a média máxima da quantidade de transcritos, a qual é mais de 100 vezes maior do que a média da quantidade de transcrito observada para o grupo controle no mesmo horário (Figura 11).

No grupo controle a expressão do gene da terpeno sintase 23 foi significativamente menor ($P<0,05$) do que no grupo teste. A quantidade de transcrito desse gene nas plantas sadias teve variação entre os horários, apresentando sua maior média cinco horas após o início do experimento. No entanto, mesmo no horário de maior expressão do gene no grupo controle a expressão nas plantas submetidas à herbivoria foi 40 vezes maior, sendo essa diferença significativa ($P<0,05$).

Os maiores níveis de expressão deste gene foram observados nas plantas de milho sob herbivoria nos horários nove e dez. Após nove horas de alimentação da lagarta sobre a planta, a quantidade de transcrito observada no tratamento foi 350 vezes maior do que no controle. Ao final de dez horas de experimento, o nível de expressão nas plantas atacadas foi 600 vezes maior do que nas plantas sem o ataque da lagarta.

Para este gene, a diferença do nível de expressão entre os horários do grupo teste foi significativa ($P<0,01$). Para o grupo controle, as diferenças da expressão do gene entre os horários também foram significativas ($P<0,05$). Portanto, ao longo do tempo os níveis de expressão do gene TPS23 foram diferentes entre si, tanto nas plantas de milho sob herbivoria de *S. frugiperda* quanto nas plantas de milho sadias.

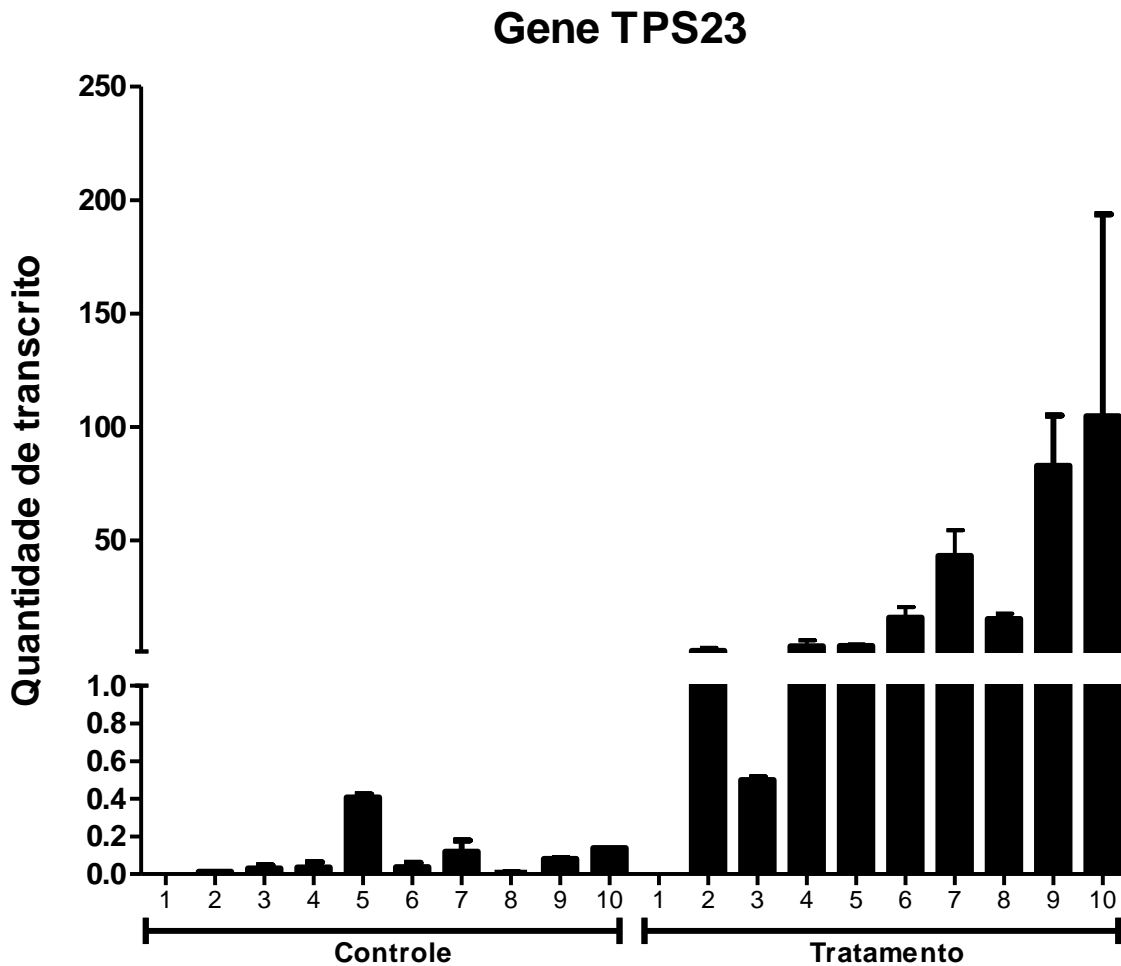


Figura 11 - Análise de PCR quantitativo em tempo real da abundância relativa de transcritos do gene TPS23 (terpeno sintase 23) em plantas de milho *Zea mays* L. sadias (controle, à esquerda do gráfico) e submetidas à herbivoria de *Spodoptera frugiperda* (tratamento, à direita do gráfico). Eixo Y: quantidade relativa de transcrito. Eixo X: horas após o início da herbivoria. A quantificação relativa de RNAm foi desenvolvida com correção de eficiência e ATUB e PUBQ como genes de referência. Os valores são a média de três replicatas normalizadas pela expressão dos genes de referência. Média \pm EPM

4.2.3 Gene Terpeno Sintase 10 (TPS10)

A análise da expressão do gene da terpeno sintase 10 em folhas de milho *Zea mays* L. submetidas à herbivoria de *S. frugiperda* evidenciou um aumento na quantidade de transcrito ao longo do tempo. Nas plantas sob esse tratamento, a quantidade de transcrito deste gene foi significativamente maior do que no grupo controle ($P < 0,05$).

A partir de duas horas após o início do experimento já se observou diferença nos níveis de expressão das plantas atacadas em relação às plantas sadias. Nesse horário, a quantidade de transcrito foi dez vezes maior no tratamento do que no grupo controle. O nível de expressão deste gene nas plantas submetidas a herbivoria foi crescente ao longo das horas após o início do experimento. A quantidade de transcrito apresentou média máxima na hora dez, quando a expressão do gene TPS10 foi mais de 300% maior nas plantas submetidas à herbivoria do que nas plantas sadias (Figura 12).

Na análise da expressão deste gene, comparando os horários dentro de cada um dos dois grupos (controle e tratamento) obteve-se diferenças significativas apenas para o grupo teste ($P > 0,05$). No entanto, ao comparar os níveis de expressão nas plantas de milho submetidas à herbivoria da lagarta com os níveis obtidos para as plantas sadias, a diferença tem alto grau de confiabilidade ($P < 0,01$)

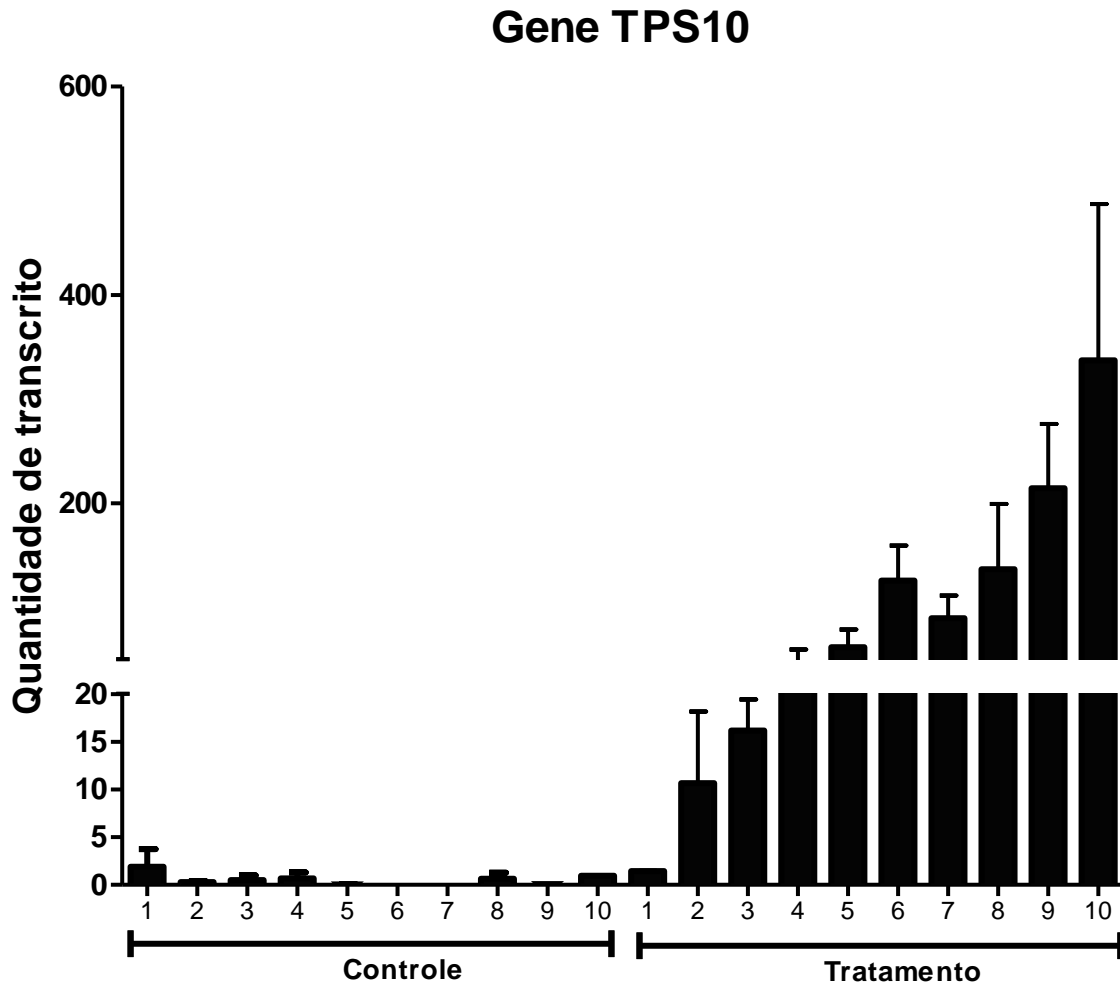


Figura 12 - Análise de PCR quantitativo em tempo real da abundância relativa de transcritos do gene TPS10 (terpeno sintase 10) em plantas de milho *Zea mays* L. sadias (controle, à esquerda do gráfico) e submetidas à herbivoria de *Spodoptera frugiperda* (tratamento, à direita do gráfico). Eixo Y: quantidade relativa de transcrito. Eixo X: horas após o início da herbivoria. A quantificação relativa de RNAm foi desenvolvida com correção de eficiência e utilizando ATUB e PUBQ como genes de referência. Os valores são a média de três replicatas normalizadas pela expressão dos genes de referência. Média ± EPM

4.2.4 Gene Lipoxigenase (LOX10)

A análise dos transcritos do gene da lipoxigenase escolhida para o milho *Zea mays* L. mostram menor expressão nas plantas sadias quando comparadas às plantas submetidas a herbivoria por *S. frugiperda* (Figura 13). A expressão desse gene nas plantas submetidas à herbivoria foi significativamente maior do que o controle ($P < 0,01$), apresentando um pico às três horas após o início do experimento, sendo que neste horário o acúmulo de transcrito nas plantas do tratamento é mais de 400 vezes maior do que no controle. A quantidade relativa de transcrito nas plantas sob tratamento sobe logo no início do experimento, exibe um pico às três horas e depois declina até a hora sete, subindo novamente após oito horas de exposição à herbivoria.

A diferença na expressão deste gene das plantas atacadas em relação às sadias foi evidente desde a primeira hora após o início do experimento, quando a quantidade de transcrito foi 200 vezes maior no tratamento do que no controle. Ao longo do experimento, todos os valores de expressão encontrados para as plantas sob tratamento foram significativamente maiores do que os do controle.

Quando comparadas as médias da quantidade de transcrito entre os horários dentro de cada um dos grupos, tratamento e controle, as diferenças não foram significativamente diferentes, apesar de ter sido observada uma forte tendência a um pico de expressão no três horas após o início do experimento. No grupo controle, a expressão deste gene parece descrever uma suave curva a partir da primeira hora de experimento, tendo seu valor máximo observado no horário quatro. No entanto, estas diferenças não apresentaram confiabilidade estatística.

A análise dos transcritos do gene da lipoxigenase 10 mostrou níveis de expressão desse gene significativamente maiores nas plantas de milho sob herbivoria de *S. frugiperda* do que nas plantas sadias. Entre os horários, dentro de cada grupo, a variação na quantidade de transcrito não variou significativamente. No entanto, observa-se uma tendência de aumento na quantidade de transcrito nas plantas sob tratamento no horário três.

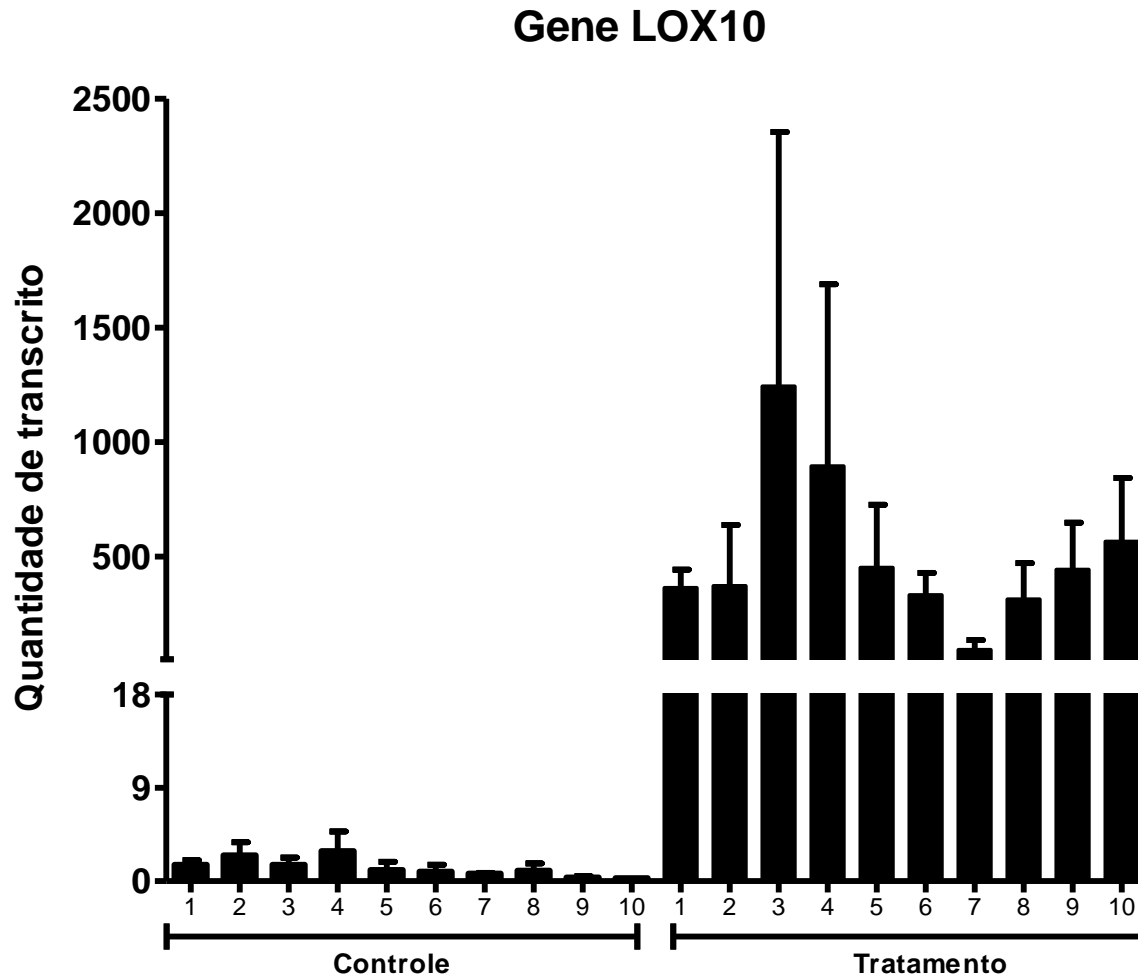


Figura 13 - Análise de PCR quantitativo em tempo real da abundância relativa de transcritos do gene LOX10 (lipoxigenase 10) em plantas de milho *Zea mays* L. sadias (controle, à esquerda do gráfico) e submetidas à herbivoria de *Spodoptera frugiperda* (tratamento, à direita do gráfico). Eixo Y: quantidade relativa de transcrito. Eixo X: horas após o início da herbivoria. A quantificação relativa de RNAm foi desenvolvida com correção de eficiência e ATUB e PUBQ como genes de referência. Os valores são a média de três replicatas normalizadas pela expressão dos genes de referência. Média \pm EPM

4.2.5 Efeito da herbivoria sobre a expressão gênica

A herbivoria de *S. frugiperda* sobre plantas de milho *Zea mays* L. levou ao aumento significativo nos níveis de expressão, em relação a plantas de milho sadias, dos genes da sesquiterpeno ciclase 1, das terpeno sintases 10 e 23 e da lipoxigenase 10 (Figura 14). A confiabilidade da diferença encontrada foi alta ($P < 0,001$), revelando uma forte indução destes genes por efeito da herbivoria.

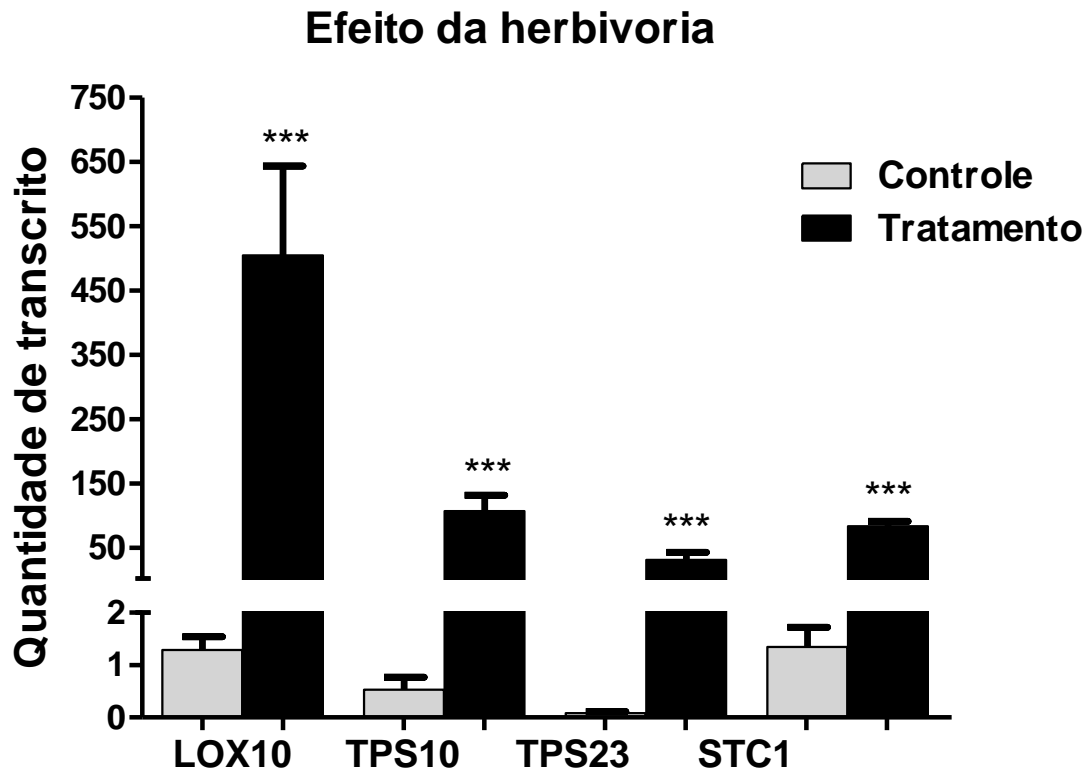


Figura 14 – Efeito da herbivoria de *Spodoptera frugiperda* sobre a quantidade de transcrito (eixo Y) dos genes lipoxigenase 10 (LOX10), terpeno sintase 10 (TPS10), terpeno sintase 23 (TPS23) e sesquiterpeno sintase 1 (STC1) (eixo X) em folhas de plantas de milho *Zea mays* L., comparando as plantas sob herbivoria (tratamento) com plantas sadias (controle). Os asteriscos indicam diferença significativa ($P < 0,001$) entre tratamento e controle de um mesmo gene, indicado pelas siglas no eixo X.

Observou-se que, dentre os genes analisados, o gene da lipoxigenase foi o que apresentou maior expressão, sendo que a média da quantidade de transcrito do gene LOX10 foi seis vezes

maior do que a do gene TPS10, 15 vezes maior do que a do gene TPS23 e oito vezes maior do que a do gene STC1.

Em relação ao controle, os níveis de expressão dos quatro genes nas plantas submetidas à herbivoria foi de pelo menos dez vezes mais. Os valores das médias da quantidade de transcrito nas plantas sadias foi menor que dois, enquanto que os mesmo valores para as plantas atacadas foi da ordem de dezenas para os genes TPS23 e STC1 e centenas para os genes LOX10 e TPS10.

4.3 Análise dos Voláteis

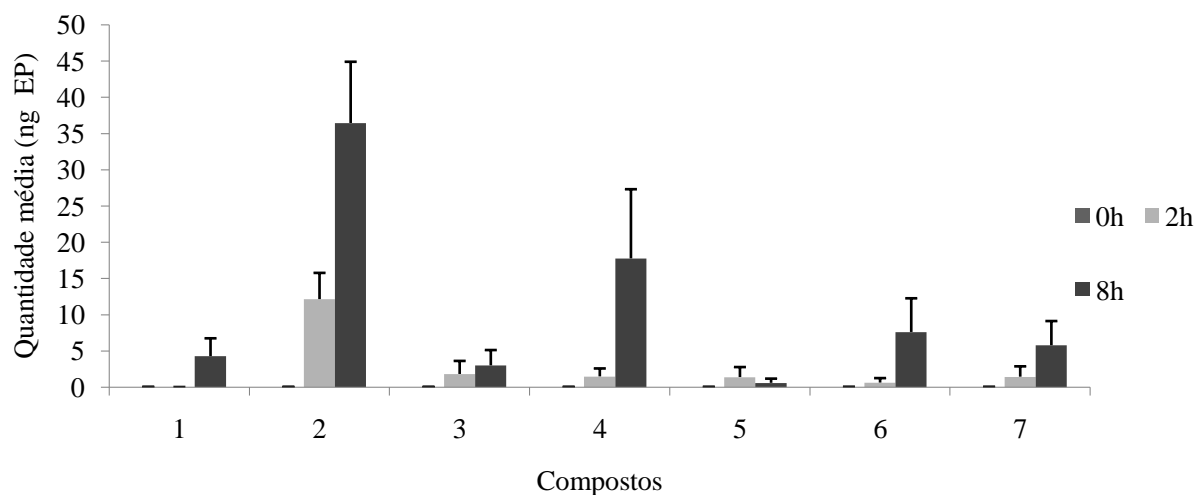


Figura 15 - Voláteis de plantas de milho *Zea mays* L. (var. Delprim) após herbivoria de *Spodoptera frugiperda*. A quantidade média (+/- EP) (ng) de voláteis adsorvida por filtros de Super-Q foi obtida de plantas de milho induzidas em 0, 2 e 8h após a herbivoria de *Spodoptera frugiperda*. Os compostos numerados correspondem a: (1) (Z)-hexen-1-ol; (2) (Z)-3-Hexenil acetato; (3) Fenil-metil acetato; (4) Indol; (5) Cariofileno; (6) Beta-bergamoteno; e (7) (E)-beta-farneseno

Houve um aumento na quantidade de voláteis em plantas de milho *Z. mays* após 2 e 8h de herbivoria realizada por *S. frugiperda* quando comparadas com as plantas intactas, que não

apresentaram estes mesmos compostos de forma significativa no tempo zero (Figura 15). Dos sete compostos analisados somente o (Z)-hexen-1-ol apresentou contagem quase nula com 2h após a herbivoria por *S. frugiperda*. Os demais compostos, por sua vez, apresentaram aumento na sua produção no intervalo de 1 a 8h após o início da herbivoria.

Muitos compostos aumentaram sua emissão no intervalo de 8h após a herbivoria por *S. frugiperda* comparativamente com o intervalo de 2h. Foi o caso dos compostos (Z)-hexen-1-ol, (Z)-3-Hexenil acetato, Fenil-metil acetato, Indol, Beta-bergamoteno e (E)-beta-farneseno. O Cariofileno foi o único composto volátil quantificado a apresentar maior emissão no horário de duas horas em relação ao que foi detectado oito horas após o início do experimento. Nenhum dos compostos foi detectado significativamente no tempo zero, antes do início da herbivoria pela lagarta.

Contudo, dos compostos analisados o Hexenil acetato e o Indol foram os únicos a apresentarem aumento significativo após 2 e 8h de herbivoria por *S. frugiperda* ($P < 0,05$). O bergamoteno e o farneseno, ambos compostos envolvidos na atração de predadores e parasitóides de herbívoros, apresentaram baixa contagem no horário de duas horas, a qual se elevou na análise dos voláteis oito horas após o início da herbivoria.

5 DISCUSSÃO

A curva obtida com os dados de AFC demonstrou um consumo crescente e relativamente constante da lagarta do cartucho, *S. frugiperda*, o que era esperado. Após oito e até dez horas foi observado um aumento no consumo, proporcionalmente em relação aos demais tempos e foi levantada a hipótese de que isto seja devido ao consumo, neste horário, da nervura central da folha de milho, evidenciada pelo registro fotográfico. No entanto, na análise da expressão dos genes, não se nota alteração no nível de transcrito neste horário passível de correlação com o fato observado.

Os transcritos dos genes escolhidos mostraram uma tendência a um perfil de expressão ao longo do tempo. Dentro dessa tendência, o perfil temporal pode sugerir que a lipoxigenase seja um gene de expressão precoce (*early gene*), enquanto os genes envolvidos nos últimos passos da biossíntese de terpenos parecem ser genes de expressão tardia (*late genes*), considerando os tempos analisados nos experimentos deste trabalho. Apesar de em alguns casos aqui observados, como o da lipoxigenase 10, os níveis de expressão não terem sido estatisticamente diferentes entre si dentro de um mesmo grupo (controle ou tratamento), podemos observar uma forte tendência a perfis claros de expressão. Dentro do que foi observado, a lipoxigenase teve um aumento rápido na quantidade de transcrito nas plantas tratadas, apresentando um pico após três horas desde o início do experimento. Depois do pico observado para a lipoxigenase, observou-se um aumento na expressão do gene da sesquiterpeno ciclase 1, que apresentou um pico às seis horas após o início da herbivoria. Ambos os genes de terpeno sintases analisados no presente estudo tiveram expressão crescente ao longo do tempo, tendo seus picos de expressão às dez horas (final do experimento). Este perfil faz sentido quando confrontamos a literatura e notamos que a lipoxigenase pode estar envolvida na indução da expressão de terpeno sintases através da indução da produção de ácido jasmônico, através da via octadecanoide. SARAVITZ e SIEDOW (1996), estudando a expressão diferencial de lipoxigenases na soja, verificaram que o nível de transcrito dessa categoria de gene tem um rápido aumento em plantas danificadas. O ácido jasmônico proveniente da cascata bioquímica desencadeada pela lipoxigenase pode estar envolvido na ativação de enzimas que levam a expressão diferencial de genes envolvidos na resposta induzida na planta, e já foi demonstrado que este composto participa na ativação de

proteínas e emissão de compostos envolvidos na defesa indireta, por meio da atração de insetos inimigos dos herbívoros.

A lipoxigenase é uma enzima envolvida nos primeiros passos da resposta a herbivoria na planta. Já na quebra da parede celular causada pela herbivoria da lagarta, a lipoxigenase entra em ação dando origem a toda uma rota bioquímica que culmina na ativação de diversas enzimas resultando na produção de muitos compostos diferentes (Figura 16). As funções das lipoxigenases foram extensamente descritas por NEMCHENKO e colaboradores (2006). PARÉ e TUMLINSON (1997) mostraram que hexenil e hexenol são sintetizados *de novo* em resposta à herbivoria e que estes compostos estão diretamente relacionados à ativação da via da lipoxigenase, que quebra o ácido linolenico formando esses compostos (SCHILMILLER; HOWE, 2005). A herbivoria continuada, como foi feito nos experimentos deste trabalho, mantém alto o nível de ácido jasmônico, principalmente por se constituir, além do efeito dos elicitores provenientes do herbívoro, em uma série de danos mecânicos consecutivos. Os níveis altos de ácido jasmônico levam a um aumento na expressão de genes precoces e genes tardios, como foi observado neste estudo e em estudo anterior em tabaco (VANDENBORRE et al., 2009).

A análise dos voláteis revelou um aumento da emissão de compostos envolvidos na defesa indireta das plantas, principalmente após 8 horas de experimento. Os compostos cuja produção envolve os genes escolhidos para a análise de expressão foram detectados, mostrando assim uma correlação temporal e experimental entre os diferentes dados obtidos. A produção de bergamoteno e farneseno em plantas de milho em resposta ao dano feito pela lagarta já foi demonstrada em milho (TURLINGS et al., 1997) e, no caso cariofileno, também em arroz (CHENG et. al.; 2007).

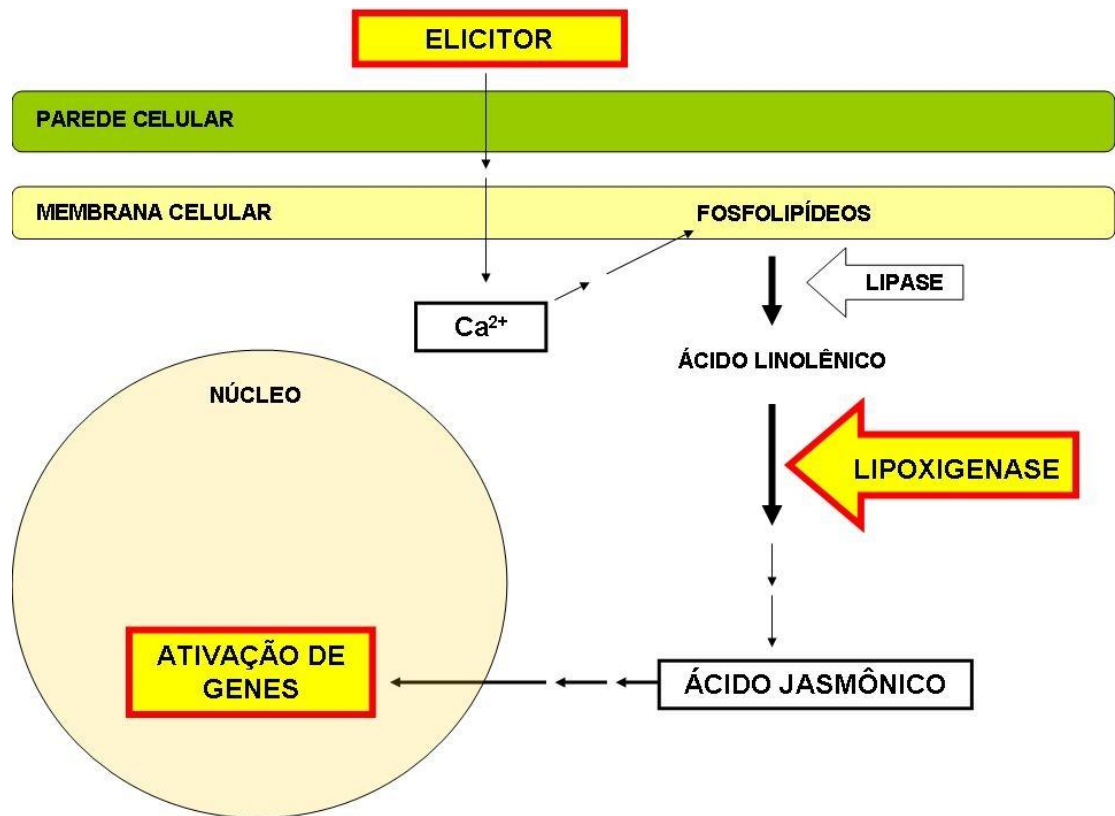


Figura 16 – Esquema representando a transdução do sinal elicitor do herbívoro na célula vegetal. A lipoxigenase é uma das primeiras enzimas da rota bioquímica, e a produção de ácido jasmônico leva à ativação de genes relacionados à resposta induzida por herbivoria.

Os dados obtidos da expressão gênica foram corroborados pelo perfil de emissão de voláteis. Bergamoteno, Farneseno e Cariofileno são compostos cuja produção é regulada pela expressão dos genes TPS10 e TPS23 (SCHNEE et al., 2006). A expressão aumentada nestes genes nas plantas induzidas por herbivoria em relação ao grupo controle sugere que esteja havendo ativação dos genes envolvidos na produção de compostos voláteis sinalizadores. A correlação entre o aumento na quantidade de transcrito de terpeno sintases e o aumento da emissão de voláteis já foi demonstrada por NAVIA-GINÉ e colaboradores (2009). O grupo analisou a resposta de *Mendicago truncatula* à herbivoria de *Spodoptera exigua* e verificou o acúmulo de transcritos de terpeno sintases em correlação com a emissão de beta-ocimeno.

A área crescente de dano no tecido vegetal, causado pela lagarta, sugere que a planta responde diferentemente em cada horário devido ao aumento de tecido consumido, contato maior de elicitores do herbívoro com partes internas da planta e ao desencadeamento de respostas na

planta envolvendo a ativação de cascatas bioquímicas que culminam na expressão diferencial de genes e alteração no perfil de voláteis emitidos pela planta.

A emissão aumentada de compostos voláteis vegetais após danos provocados por herbivoria já foi comprovada anteriormente (D'ALESSANDRO et al., 2009) bem como a expressão diferencial de genes resultante do mesmo tipo de stress (SHEN et al., 2000; NEMCHENKO et al., 2006; LAWRENCE; NOVAK, 2004). A expressão diferencial dos genes testados também já foi comprovada em outros estudos. A Terpeno Sintase 10, envolvida na produção de bergamoteno e beta-farneseno, tem expressão de seu gene aumentada sob herbivoria (KÖLLNER et al., 2009). Este estudo também verificou aumentos na emissão desses dois compostos quando as plantas foram submetidas as mesmas condições que causaram a expressão diferencial de TPS10. Nossos dados mostraram tanto a expressão aumentada nas plantas submetidas à herbivoria quando comparadas ao controle, quanto a emissão aumentada de bergamoteno e beta-farneseno após 8h de herbivoria, estando portanto de acordo com o descrito anteriormente na literatura.

A expressão aumentada do gene da Sesquiterpeno Ciclase, enzima envolvida presumivelmente na produção de naftaleno, foi verificada após indução por herbivoria e também por volicitina (SHEN et al., 2000; LAWRENCE; NOVAK, 2004). Em ambos os tratamentos, o acúmulo de mRNAs provenientes da transcrição desse gene foi significativamente maior do que nos tratamentos controles, observado através da técnica de northern blot. No presente estudo, o gene STC1 foi o que apresentou maior expressão nas plantas submetidas a herbivoria. Apesar de não termos detectado a presença do composto naftaleno na coleção de voláteis das plantas atacadas, a função exata da STC1 no metabolismo dos terpenóides ainda não foi descrita com precisão. Em estudo de 2008, LIN e colaboradores sugerem que a enzima Sesquiterpeno Ciclase 1, juntamente com a Terpeno Sintase 26 (cujos genes são ortólogos, isto é, possuem a mesma função mas ocorrem em organismos diferentes) é responsável pela produção de monoterpenos apenas.

O envolvimento do gene da Terpeno Sintase 23 na resposta à herbivoria foi amplamente observado em estudo realizado por KÖLLNER e colaboradores (2008). Os autores identificaram não apenas o envolvimento desta enzima em reações subsequentes ao ataque de lagartas de *Spodoptera littoralis* como também verificaram que variedades na qual o gene TPS23 não era expresso atraíam menos parasitóides deste herbívoro. Como comentado na introdução, dentre as

respostas apresentadas por uma planta após a herbivoria, uma delas é o recrutamento de predadores e parasitóides do herbívoro a partir da emissão de compostos voláteis, principalmente terpenos. A indução de genes envolvidos na produção destes terpenos após a herbivoria fornece base para a confirmação de uma relação de causa e efeito, caracterizando a defesa induzida. O gene da TPS23 em nosso estudo também teve expressão aumentada nas plantas submetidas a herbivoria, e o perfil de emissão do cariofileno foi levemente maior nas plantas atacadas do que na planta sadia. Em relação ao cariofileno, sua associação com a TPS23 foi verificada por CHENG e colaboradores (2007), em estudo demonstrando seu envolvimento na resposta induzida por herbivoria em arroz (*Oryza sativa* L.).

Todos os genes analisados neste estudo apresentaram maiores níveis de transcritos nas plantas submetidas a herbivoria, em relação as plantas sadias. Observou-se também que os níveis de expressão variam ao longo do tempo, conforme a lagarta continua se alimentando da planta e a planta aos poucos vai ativando seu sistema de defesa, começando pela regulação da expressão de genes e terminando com a emissão de compostos voláteis.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo analisou perfis de expressão de quatro genes do milho *Zea mays* L. em resposta a herbivoria de *S. frugiperda* ao longo do tempo, bem como a emissão de voláteis induzidos por herbivoria na mesma condição experimental.

Primeiramente se estabeleceu uma metodologia para a realização dos experimentos de herbivoria, a partir da confecção de uma pequena gaiola para manter a lagarta se alimentando da planta; da determinação do tempo necessário para que a área delimitada pela lagarta fosse consumida e da escolha dos genes a serem analisados. O foco do estudo foi à detecção de voláteis e análise da expressão de genes envolvidos na atração de inimigos naturais de herbívoros, ou seja, fatores relacionados ao mecanismo de defesa induzida da planta.

A análise da expressão mostrou que a herbivoria induziu fortemente a expressão dos genes selecionados (LOX10, TPS10, TPS23 e STC1), apesar de por vezes a diferença ao longo do tempo não ter sido significativa. Observamos também uma forte tendência do gene da lipoxigenase ser expresso antes dos demais, o que poderia indicar que a expressão do gene da lipoxigenase induz o aumento na expressão dos demais genes, de acordo com dados da literatura.

Os voláteis identificados nas plantas de milho, *Z. mays* foram relacionados aos genes escolhidos, e também tiveram quantidade aumentada por efeito da herbivoria. Além disso, a quantidade de voláteis aumentou proporcionalmente ao tempo em que a planta foi submetida à herbivoria.

O gene da lipoxigenase 10 teve os níveis mais altos de expressão, em relação aos demais genes, e isso pode estar relacionado ao fato de as lipoxigenases estarem envolvidas em diversas funções na célula vegetal, principalmente na resposta à herbivoria. Os genes envolvidos diretamente na produção de terpenos voláteis, responsáveis pela produção de sinais atrativos pela planta, são expressos em menor escala e este fato é condizente com a função dos terpenos de importantes sinalizadores biológicos.

A correlação entre a expressão aumentada de genes envolvidos na produção de terpenos e a emissão destes compostos por plantas submetidas a herbivoria foi por nós comprovada neste estudo. Já foi sugerido anteriormente que o principal mecanismo de regulação da produção de terpenos deve ocorrer ao nível da transcrição dos genes das enzimas responsáveis por sua biossíntese (MCGARVEY; CROTEAU, 1995). A análise profunda das rotas bioquímicas

envolvidas na produção destes compostos vem há tempos sendo sugerida como a melhor abordagem para incrementar o controle biológico de pragas em estratégias de manejo integrado, no sentido de gerar plantas com emissão aumentada de voláteis atraentes para parasitóides e predadores (SHIOJIRI et al., 2006; BABU et al., 2003; KAPPERS et al., 2005; DUDAREVA; PICHERSKY, 2008; TURLINGS; TON, 2006; DEGENHARDT et al., 2003; AHARONI et al., 2005).

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, A.A. Leaf damage and associated cues induce aggressive ant recruitment in a neotropical ant-plant. **Ecology**, New York, v. 79, p. 2100-2112, 1998.
- AGRAWAL, A.A.; RUTTER, M.T. Dynamic anti-herbivore defense in ant-plants: the role of induced responses. **Oikos**, Lund, v. 83, p. 227-236, 1998.
- AGRAWAL, A.A.; CONNER, J.K.; JOHNSON, M.T.J.; WALLSGROOVE, R. Ecological genetics of an induced plant defense against herbivores: additive genetic variance and costs of phenotypic plasticity. **Evolution**, Oklahoma, v. 56, p. 2206-2213, 2002.
- AHARONI, A.; JONGSMA, M.A.; BOUWMEESTER, H.J. Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. **Trends in Plant Science**, Cambridge, v. 10, p. 594-602, 2005.
- ARIMURA, G.; OZAWA, R.; SHIMODA, T.; NISHIOKA, T.; BOLAND, W.; TAKABAYASHI, J. Herbivory-induced volatiles elicit defense genes in lima bean. **Nature**, London, v. 406, p. 512-515, 2000.
- ÁVILA, C.J.; DEGRANDE, P.E.; GOMEZ, A.S. Insetos pragas: reconhecimento, comportamento, danos e controle. In: _____. **Milho: informações técnicas**. Dourados: EMBRAPA-CPAO, 1997. p.157-170.
- BABU, R.M.; SAJEENA, A.; SEETHARAMAN, K.; REEDY, M.S. Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management – an overview. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 22, p. 1071-1086, 2003.
- BALDWIN, I.T.; SCHMELZ, E.A.; OHNMEISS, T.E. Wound-induced changes in root and shoot jasmonic acid pools correlate with induced nicotine synthesis in *Nicotiana sylvestris* Spegazzini and Comes. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 20, p. 2139-2157, 1994.
- BAUR, R.; BINDER, S.; BENZ, G. Nonglandular leaf trichomes as short-term inducible defense of the grey alder, *Alnus incana* (L.), against the chrysomelid beetle, *Agelastica alni* L. **Oecologia**. Heidelberg, v. 87, p. 219-226, 1991.
- BI, J.L.; MURPHY, J.B.; FELTON, G.W. Antinutritive and oxidative components as mechanisms of induced resistance in cotton to *Helicoverpa zea*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 23, p. 97-117, 1997.
- BOER, J.D.; DICKE, M.; DE BOER, J.G. The role of methyl salicylate in prey searching behavior of the predatory mite *Phytoseiulus persimilis*. **Journal of Chemical Ecology**. New York, v. 30, p. 255-271, 2004.
- BURTON, R.L.; PERKINS, W.D. WSB, a new laboratory diet for the corn earworm and the fall armyworm. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 65, p. 385-386, 1972.

CHENG, A.; XIANG, C.; LI, J.; YANG, C.; HU, W.; WANG, L.; LOU, Y.; CHEN, X. The rice (E)-B-Caryophyllene synthase (OsTPS3) accounts for the major inducible volatile sesquiterpenes. **Phytochemistry**, New York, v. 68, p. 1632-1641,2007.

DEGENHARDT, J.; GERSHENZON, J. Demonstration and characterization of (E)-nerolidol synthase from maize: a herbivore-inducible terpene synthase participating in (3E)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene biosynthesis. **Planta**, Heidelberg, v. 210, p. 815-822,2000.

DEGENHARDT, J.; GERSHENZON, J.; BALDWIN, I. T.; KESSLER, A. Attracting friends to feast on foes: engineering terpene emission to make crop plants more attractive to herbivore enemies. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 14, p. 169-176,2003.

DE MORAES, C.M.; LEWIS, W.J.; PARE, P.W.; ALBORN, H.T.; TUMLINSON, J.H. Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. **Nature**, London, v. 393, p. 570-573, 1998.

DICKE, M.; VET, L.E.M. Plant-carnivore interactions: Evolutionary and ecological consequences for plant, herbivore and carnivore, in. OLFF, H.; BROWN, V.K.; DRENT R.H. (Ed.). **Herbivores: Between plants and predators**. Oxford: Blackwell Science, 1999. p. 483-520

DICKE, M.; VAN LOON, J.J.A. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. **Entomologia Experimentails et Applicata**, Dordrecht, v. 97, p. 237-249,2000.

DICKE, M.; VAN BEEK, T.A.; POSTHMUS, M.A.; BEM DOM, N.; VAN BOKHOVEN, H.; DE GROOT, A.E. Isolation and identification of volatile kairomone that affects acarine predator-prey interactions. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 16, p. 381-396,1990.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. Metabolic engineering of plant volatiles. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 19, p. 181-189,2008.

DUDAREVA, N.; NEGRE, F.; NAGENONDA, D.A.; ORLOVA, I. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Sciences**, London, v. 25, p. 417-440, 2006.

ENGELBERTH, J.; SEIDL-ADAMS, I.; SCHULTZ, J.C. Insect elicitors and exposure to green leafy volatiles differentially upregulate major octadecanoids and transcripts of 12-oxo phytodienoic acid reductases in *Zea mays*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Dallas, v. 20, p. 707-716,2007.

FREY, M.; STETTNER, C.; PARE, P.W.; SCHMELZ, E.A.; TUMLINSON, J.H.; GIERL, A. An herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize. **Proceedings of the National Academy of Science**, New York, v. 97, p. 14801-14806,2000.

GOLS, R.; ROOSJEN, M.; DIJKMAN, H.; DICKE, M. Induction of direct and indirect plant responses by jasmonic acid, low spider mite densities, or a combination of jasmonic acid

treatment and spider mite infestation. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 29, p. 2651-2666;2003.

HEIL, M. Direct defense or ecological costs: Responses of herbivorous beetles to volatiles released by wild lima bean (*Phaseolus lunatus*). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 30, p.1289-1295, 2004.

HILKER, M.; MEINERS, T. Induction of plant responses towards oviposition and feeding of herbivorous arthropods: a comparison. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Edinburgh, v. 104, p. 181-192,2002.

KARBAN, R.; MYERS, J.H. Induced plant responses to herbivory. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Berlin, v. 20, p. 331-348, 1989.

KARBAN, R.; BALDWIN, I. **Induced responses to herbivory**. Chicago:University of Chicago Press, 1997. 349p.

KAPPERS, I.F.; AHARONI, A.; VAN HERPEN, T.W.J.M.; LUCKERHOFF, L.L.P.; DICKE, M.; BOUWMEESTER, H.J. Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to *Arabidopsis*. **Science**, Washington, v. 309, p. 2070-2072,2005.

KESSLER, A.; BALDWIN, I.T. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. **Science**, Washington, v. 291, p. 2141-2144,2001.

LAWRENCE, S.D.; NOVAK, N.G. Maize genes induced by herbivory and volicitin. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 30, p. 2543-2557,2004.

LEUNG, Y.F.; CAVALIERI, D. Fundamentals of cDNA microarray data analysis. **Trends in Genetics**, Oxford, v. 19, p. 649-658,2003.

LIN, C.; SHEN, B.; XU, Z.; KOLLNER, T.G.; DEGENHARDT, J.; DOONER, H.K. Characterization of the monoterpene synthase gene tps26, the ortholog of a gene induced by insect herbivory in maize. **Plant Physiology**, Rockville, v. 146, p. 940-951,2008.

LOUGHRIN, J.H.; MANUKIAN, A.; HEATH, R.R., TURLINGS, T.C.J., TUMLINSON, J.H. Diurnal cycle of emission of induced volatile terpenoids by herbivore-injured cotton plant. **Proceedings of the National Academy of Science**, New York, v. 91 p. 11836–11840, 1994.

MATTIACCI, L.; DICKE, M.; POSTHUMS, M.A. B-glucosidase: an elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts most searching parasitic wasps. **Proceedings of the National Academy of Science**, New York, v. 92, p. 2036-2040, 1995.

MCGARVEY, D.J.; CROTEAU, R. Terpenoid metabolism. **The Plant Cell**, Oxford, v. 7, p. 1015-1026, 1995.

- NAVIA-GINÉ, W.G.; YUAN, J.S.; MAUROMOUSTAKOS, A.; MURPHY, J.B.; CHEN, F.; KORTH, K.L. *Mendicago truncatula* (E)-B-ocimene synthase is induced by insect herbivory with corresponding increases in emission of volatile ocimene. **Plant Physiology and Biochemistry**, London, v. 47, p. 416-425, 2009.
- NEMCHENKO A, KUNZE S, FEUSSNER I & KOLOMIETS M. Duplicate maize 13-lipoxygenase genes are differentially regulated by circadian rhythm, cold stress, wounding, pathogen infection, and hormonal treatments. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, p. 3767-3779, 2006.
- PARÉ, P.W.; TUMLINSON, J.H. Induced synthesis of plant volatiles. **Nature**, London, v. 385, p. 30-31, 1997a.
- PARÉ, P.W.; TUMLINSON, J.H. De Novo biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 114, p. 1161-1167, 1997b.
- PARÉ, P.W.; TUMLINSON, J.H. Cottons Volatiles synthesized and released distal to the site of insect damage. **Phytochemistry**, New York, v. 47, p. 521-526, 1998.
- PARRA, J.R.P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico** 3ª ed. Piracicaba: FEALQ, 1996. 137p.
- RASMANN, S.; KÖLLNER, T.G.; DEGENHARDT, J.; HITPOLD, I.; TOEPFER, S.; KUHLMANN, U.; GERSHENZON, J.; TURLINGS, T.C.J. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. **Nature**, London, v. 434, p. 732-737, 2005.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (Ed.). **Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology**. Totowa: Humana Press, 2000. p. 365-386.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2044p.
- SARAVITZ, D.M.; SIEDOW, J.N. The differential expression of wound-inucible lipoxygenase genes in soybean leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 110, p. 287-299, 1996.
- SCHILMILLER, A.L.; HOWE, G.A. Systemic signaling in the wound response. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 8, p. 369-377, 2005.
- SCHNEE, C.; KÖLLNER, T.G., GERSHENZON, J., DEGENHARDT, J. The maize gene terpene synthase 1 encodes a sesquiterpene synthase catalyzing the formation of (E)-B-Farnesene, (E)-Nerolidol, and (E,E)-Farnesol after herbivore damage. **Plant Physiology**, v. 130, p. 2049-2060, 2002.
- SHIOJIRI, K.; TAKABAYASHI, J.; YANO, S.; TAKAFUJI, A. Infochemically mediated tritrophic interaction webs on cabbage plants. **Population Ecology**, Berlin, v. 43, p. 23-29, 2001.

SMITH, L.L.; LANZA, J.; SMITH, G.C. Amino acid concentrations in extrafloral nectar of *Impatiens sultani* increase after simulated herbivory. **Ecology**, Washington, v. 71, p. 107-115,1990.

STEIDLE, J.L.M.; VAN LOON, J.J.A. Dietary specialization and infochemical use in carnivorous arthropods: testing a concept. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Edinburgh, v. 108, p. 133-148,2003.

TAKABAYASHI, J.; DICKE, M. Plant-carnivore mutualism through herbivore-induced carnivore attractants. **Trends in Plant Science**, Cambridge, v. 1, p. 109-113,1996.

TON, J.; D'ALESSANDRO, M.D.; JOURDIE, V.; JAKAB, G.; KARLEN, D.; HELD, M.; MAUCH-MANI, B.; TURLINGS, T.C.J. Priming by airborne signals boosts direct and indirect resistance in maize. **The Plant Journal**, Vancouver, v. 49, p. 16-26,2007.

TURLINGS, T.C.J.; WÄCKERS, F. Recruitment of predators and parasitoids by herbivore-injured plants. In: CARDÉ, R.T.; MILLAR, J.G. (Ed.). **Advances in insect chemical ecology**. Cambridge;Cambridge University Press, 2004. chap. 2, p. 21-75.

TURLINGS, T.C.J.; LENGWILER, U.B.; BERNASCONI, M.L.; WECHSLER, D. Timing of induced volatile emissions in maize seedlings. **Planta**, Heidelberg, v. 207, p. 146-152,1998.

TURLINGS, T.C.J.; ALBORN, H.T., LOUGHRIN, J.H., TUMLINSON, J.H. Volicitin, an elicitor of maize volatiles in oral secretion of *Spodoptera exigua*: isolation and bioactivity. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 92, p. 189-202, 2000.

TURLINGS, T.C.J.; GOUINGUENE, S.; DEGEN, T.; FRITZSCHE HOBALLAH, M.E. The chemical ecology of plant-caterpillar-parasitoid interactions, In: TSCHARNTKE, T.; HAWKINS, B.A. (Ed.). **Multitrophic Level Interactions**. Cambridge.:Cambridge University Press,. 2002. p. 148-173.

TURLINGS, T.C.J.; LOUGHRIN, J.H.; MCCALL, P.J.; ROSE, U.S.R.; LEWIS, W.J.; TUMLINSON, J.H. How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. **Proceedings of the National Academy of Science**, New York, New York v. 92, p. 4169-4174,1995.

UDAYAGIRI, S.; JONES, R.L.J. Role of plant odor in parasitism of European corn borer by braconid specialist parasitoid *Macrocentrus grandii* Goidanich: isolation and characterization of plant synomones eliciting parasitoid flight response. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 18, p. 1841-1855, 1992.

VANDENBORRE, G.; MIERSCH, O.; HAUSE, B., SMAGGHE, G.; WASTERACK, C.; VAN DAMME, E.J.M. *Spodoptera littoralis*-induced lectin expression in tobacco. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 50, p. 1142-1155, 2009.

VANDESOMPELE, J.; KATLEEN, D.P.; FILIP, P.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 3, p. 34.1-34.11, 2002.

VAN HULTEN, M.; PELSER, M.; VAN LOON, L.C.; PIETERSE, C.M.J.; TON, J. Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Science**, New York, New York, v. 103, p. 5602-5607, 2006.

VET, L.E.M.; LENTEREN, J.C. VAN; HEYMANS, M.; MEELIS, E. An airflow olfactometer for measuring olfactory responses of hymenopterous parasitoids and other small insects. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 8, p. 97-106, 1983.

VOELCKEL, C.; BALDWIN, I.T. Generalist and specialist lepidopteran larvae elicit different transcriptional responses in *Nicotiana attenuata*, which correlate with larval FAC profiles. **Ecology Letters**, Oxford, v. 7, p. 770-775, 2004.

YOUNG, T.P. Increased thorn length in acacia-depranolobium – an induced response to browsing. **Oecologia**, Heidelberg, v. 71, p. 436-438, 1987.

ANEXO

ANEXO

Valores obtidos através da quantificação as amostras de RNA de tecido foliar de *Zea mays* L. em espectrofotômetro de massa. Estão representadas as amostras da primeira repetição experimental. A razão 260/280 indica pureza da amostra em relação à quantidade de RNA. GAI = planta sadia; LAG = planta sob herbivoria de *Spodoptera frugiperda*

amostra	260 nm	280 nm	320 nm	260/280
GAI n1 t1	0,159	0,084	0,005	1,8929
GAI n1 t2	0,245	0,123	0,004	1,9919
GAI n1 t3	0,241	0,122	0,001	1,9754
GAI n1 t4	0,226	0,117	0,001	1,9316
GAI n1 t5	0,223	0,108	0,002	2,0648
GAI n1 t6	0,19	0,091	0	2,0879
GAI n1 t7	0,739	0,341	0	2,1672
GAI n1 t8	0,304	0,147	0	2,0680
GAI n1 t9	0,72	0,332	0,001	2,1687
GAI n1 t10	0,224	0,113	0	1,9823

amostra	260 nm	280 nm	320 nm	260/280
LAG n1 t1	0,219	0,102	0	2,1471
LAG n1 t2	0,585	0,275	0,005	2,1273
LAG n1 t3	0,381	0,181	0,005	2,1050
LAG n1 t4	0,195	0,097	0,002	2,0103
LAG n1 t5	0,287	0,141	0,003	2,0355
LAG n1 t6	0,349	0,164	0,006	2,1280
LAG n1 t7	0,589	0,273	0,004	2,1575
LAG n1 t8	0,754	0,35	0,006	2,1543
LAG n1 t9	0,467	0,224	0,007	2,0848
LAG n1 t10	0,325	0,151	0,002	2,1523

APÊNDICE

APÊNDICE – Sequências de genes utilizadas para desenho dos *primerse* sequências dos primers gerados pelo programa Primer 3

Gene Terpeno Sintase 10

gi|162457716|ref|NM_001112380.1| *Zea mays* terpene synthase 10 (TPS10), mRNA

ATGGATGCCACCGCCTTCCACCCAAGTCTGTGGGGCGATTTCTTCGTGAAGTACAAGCCTCCAACCGCG
 CCAAGCGTGGACACATGACGGAAAGAGCCGAGCTGTTAAAAGAAGAGGTTTCGCAAAACGCTCAAGG
 CGGCTGCAAACCAGATAAAAAATGCTTTAGATCTTATAATCACACTGCAGAGGCTTGGGCTGGACCAC
 CACTACGAGAATGAGATCAGCGAGCTGCTGCGCTTTGCTACAGCAGTTCGGATTACGACGATAAAGA
 CCTGTATGTAGTCTCGCTGAGGTTTTATCTTCTGCGGAAACATGGTCATTGTGTTTCATCAGATGTATTT
 ACGAGTTTTAAAGACGAGGAAGGGAACCTTCGTGGTGGATGATACGAAATGTCTCTTGACCTTATACAA
 TGCAGCGTACCTTAGGACTCAAGGGGAGAAAGTACTCGACGAAGCCATTACCTTCACCAGACGCCAGC
 TTGAAGCTTCATTATTAGATCCACTGGAACCAGCATTATTAGCAGATGAAGTATCTCTCACCTTCAA
 CCCACTCTTCCGAAGGCTTAGGATACTGGAAGCAATAAACTATATCCCAATATATGGGAAAGAAGCT
 GGACGAAACGAGGCCATATTAGAGCTTGCAAAGCTGAATTTCAACCTTGCTCAGCTTATTTACTGTGAG
 GAGTTGAAAGAGGTTACACTATGGTGGAAAGCAGCTTAATGTTGAGACAACTTGAGTTTCATTTCGAGA
 CAGAATCGTAGAATGTCATTTCTGGATGACAGGCGCGTGCTGTGAACCACAGTATTCTCTTTCACGGGT
 CATAGCTACGAAGATGACAGCCTTGATCACCGTATTAGATGACATGATGGACACCTACAGCACAACCTG
 AGGAGGCCATGCTCCTTGCTGAAGCAATATACAGATGGGAAGAGAATGCCGCAGAACTACTTCCAAGA
 TACATGAAAAGATTTCTATCTCTACTTACTGAAGACAATTGATTCGTGTGGGGATGAACTAGGACCAAAC
 AGAAGCTTCCGGACATTTTATCTCAAAGAGATGCTAAAGGTGTTAGTCCGAGGAAGCTCTCAAGAGAT
 AAAATGGCGTAATGAAAATTACGTCCCAAAAACAATCAGTGAACACTTAGAACATTCAGGACCAACGG
 TGGGAGCCTTTCAAGTAGCATGTTCTTCATTTGTTGGGATGGGTGACAGCATAACAAAGGAAAGTTTTG
 AGTGGCTTTTGACATATCCAGAACTTGCCAAGTCTTTGATGAATATTTACGACTCTTGAATGATACTG
 CATCAACAAAGCGTGAGCAAAAATGCGGGGCAGCATGTGTCCACGGTCCAATGTTATATGTTGAAGCAT
 GGGACAACAATGGATGAAGCATGTGAGAAGATAAAAAGAGTTAACTGAAGACTCATGGAAGGATATGA
 TGGAACTCTATCTTACACCAACAGAACATCCAAAACCTCATCGCACAAACAATCGTTGATTTTGCAAGG
 ACAGCGGACTACATGTACAAGGAAACAGATGGATTTACTTTTTCACACACAATCAAAGATATGATAGC
 AAAACTCTTTGTGGATCCAATATCATTATTCTAG

Primers:

LEFT PRIMER 372 21 61.15 47.62 3.00 0.00 CGTGGTGGATGATACGAAATG
 RIGHT PRIMER 474 20 60.52 55.00 2.00 0.00 GCGTCTGGTGAAGGTAATGG
 PRODUCT SIZE: 103, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 0.00

Gene Terpeno Sintase 23

gi|166065277|gb|EU259633.1| Zea mays cultivar Delprim (E)-beta-caryophyllene synthase (tps23) mRNA, tps23-Del1 allele, complete cds

ATGGCAGCTGATGAGGCAAGATCCGTCAGCAGGCTCCACAGTGAGGAGGACATGCATGGGAAGCACC
 ACTCCACTCTATGGGGTGACTTCTTCCTTCACCATGTCCCATGTCGTCCAGGACAGTATTTGATTATGAA
 GGATAACGTCGAAATAATGAAGGAGGAGGTGAAGAAAATGTTACTGGATGTTGGATCCTCTGATTTGT
 CTCATAAGTTAGACTGCATTGATACACTAGAACGGCTTGGACTGGATTACCACTATAACCAAGGAGATT
 GATGAATTAATGTGCAATGTCTTCGAAGCTAGGGATCAAGATCTTGATCTTACTACAACATCACAGCTT
 TTCTATTTGCTTAGGAAGCATGGATATCATATTTCTTCTGATGTATTTTTGAAGTTCAGAGATGATAAAG
 GAGATATCGTAACAAATGATGCAAGGTGTTTACTGAGGATGTACGAAGCGGCACATGTTAGAGTGAAC
 GGTGAAGAAATACTTGACAATATTCTCATTACACCAAGAGACAACCTTCAATGTATTGTAGATGATCTC
 GAACCAACACTGCAAGAAGAAGTTAGATATGCATTGGAGACACCTCTTTTCAGAAGACTCAACAGAGT
 ACAGGCCAGGCAATTCATCTCAACATACGAGAAAAGCACTACGCGTATCAATATGCTCCTGGAGTTCT
 CAAAATTAGACTTCAACATCTTGCTCACCTATACTGTGAGGAGCTAAAAGATCTTACGCTGTGGTGGA
 AAGAGTTCCAAGCACAGGCTAACACGACAATCTATGCACGAGATAGGATGGTGGAGATGCATTTCTGG
 ATGATGGGAGTCTTCTTTGAGCCCCAATACTCCTATTACGAAAGATGCTCACGCAGTTGTTTATGATC
 GTGTCTGTACTCGATGACTTGTATGACAGCCATTGCACCACAGAGGAAGGCAACGCCTTCACTGCAGC
 ATTACAAAGGTGGGATGAAGAAGGCGTGGAGCAATGCCCAACATACTTGAGGACTCTGTATACAAATA
 TACGTGCCACCATAAAAAGCCATCGAGGAGGACTTGAATTTTTCAAACAACAAACATGCAAAGTTGGTA
 AAAGGACTGATAATCGACATGGCCATGTGCTATAATGCCGAGACAGAATGGCGTGACAAGAAATATGT
 GCCAGCCACCGTTGATGAACATCTGAAAATTCAGCACGCAGCAGTGGCTGTATGCACTTGGTGAGCC
 AGGGGTTCAATTCGATGGGAGATGTGGCAACTAGCGAGGCCCTCGAGTGGGCCTCTACCTATCCCAA
 ATCGTTCGAGCTGTCTGTATCATTGCACGCCTCGCTAATGATATAATGTCGTACAAGCGAGAAGCATCA
 AACAATACTATGGTGTCTACAGTGCAAACCTTGTGCAAAAAGAATACGGCACCACCACAGTAGAACAGGC
 CATAGAAAAGATCAGAGAGCTGATCGAGGAAGCGTGGATGGACATCACCCATGAGTGCCTCAGACAG
 CCACAGCCGAAGGCTCTTCTAGAGAGGGCGGTCAACCTGGCTCGTACAATGGATTTTCTGTACAAAGA
 TCGGATGGATACACAGATTCACGGAGTATCAAAGGCATATTGGATTTCATTGTATGTGCATCTAATAG
 ACTAA

Primers:

LEFT PRIMER 869 21 60.45 42.86 3.00 2.00 TGCTCACGCAGTTGTTTATGA
 RIGHT PRIMER 995 19 61.33 52.63 3.00 0.00 CATTGCTCCACGCCTTCTT
 PRODUCT SIZE: 127, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 2.00

Gene Alfa Tubulina**gi|162458675|ref|NM_001111970.1| Zea mays Alpha-tubulin #3 (tua3), mRNA**

AGATCTTCAATTCCTCCGCCCCACCGATCGACCTTCACGCCAGTCTCGGTCTCTTCCGAAGGCGTC
 GCGCGCGGTTGTTTGGAGAGGAGAGGAGGAAGATGAGGGAGTGCATCTCCGTCCACATCGGGCAGGCC
 GGCATCCAAGTCGGCAACGCGTGCTGGGAACTTTACTGCCTCGAGCACGGCATCCAGCCTGATGGCCA
 AGTGCCTGGAGATAAGACCGCGGGACATCACGATGATGCCTTCAGCACCTTCTTCAGCCAGACTGGTG
 CTGGGAAGCACGTTCCCCGTGCAATCTTCGTTGATCTAGAACCCTACTGTGATCGATGAGGTGCGCACTG
 GCACGTACCGCCAGCTCTTCCACCCTGAGCAGCTCATCAGTGGCAAGGAGGATGCCGCTAACAATTC
 GCCCCGTGGCCACTACACAATTGGCAAGGAGATTGTTGATCTGTGCCTTGACCGTATCCGCAAGCTTGCT
 GACAACCTGCACCGGCTCCAGGGCTTCCCTGGTCTTCAATGCCGTTGGTGGTGGCACTGGCTCTGGCCTT
 GGTTCTCTCCTCTTGAGCGCTGTCTGTGGAGTACGGCAAGAAATCCAAGCTGGGCTTCACTGTGTAC
 CCATCTCCCCAGGTGTCAACCTCTGTTGTGGAGCCTTACAACAGCGTGCTCTCCACTCACTCACTCCTG
 GAGCACACTGATGTCTCCATCCTGCTCGACAACGAGGCCATCTATGACATCTGCAGGCGCTCCCTCGAC
 ATTGAGAGGCCCAACTACTCCAACCTGAATCGCCTTGTGTCTCAGGTGATCTCATCGCTGACTGCTTCT
 CTGAGGTTTCGATGGTGCCTCAATGTGGATGTGAACGAGTTCCAGACCAACCTGGTTCCTTACCCGAGG
 ATCCACTTCATGCTCTCCTCCTACGCACCGGTGATCTCTTCTGCGAAGGCCTTCCACGAGCAGCTGTCTG
 TGGCGGAGATCACCAGCAGCGCTTCGAGCCGGCTTCCATGATGGTCAAGTGCAGCCACGGCACGGC
 AAGTACATGGCTTGCTGCCTGATGTACCGCGGCGACGTGGTGCCCAAGGACGTGAACGCCGCGGTGGC
 CACCATCAAGACGAAGCGCACCATCCAGTTCGTGGACTGGTGCCCGACGGGGTTCAAGTGCGGCATCA
 ACTACCAGGCGCCGACAGTGGTGCCGGGTGCCGACCTCGCCAAGGTGCAGCGCGGGTGTGCATGATC
 TCCAACCTCCACCAGCGTCGTCGAGGTGTTCTCCCGCATCAACAGCAAGTTCGACCTCATGTACGCCAAG
 CGCGCGTTCGTGCACTGGTACGTCCGGCAGGGCATGGAGGAGGGGGAGTTCTCCGAGGCACGCGAGG
 ACCTGGCCGCCCTGGAGAAGGACTACGAGGAGGTCGCCGCAGAGGGCGGCAGTGATGACGGTGACGA
 GGAGGAGGAATACTGATCTGCTTGCATGAATCTGTTTGGCTGTTCGAGCCAGGTTGTGGTGTGAAAAA
 CCTTTGTTTGTGTCTGGCCCCCTGGGTAATGTTTGGGTGTTTCTTCCATCATCACTTGTGAACTGC
 TCTAGTATTTGCATTTGTAATTGAAGTCTGTTCGCTTTAAGCACTCTTGGTTCTAAAGATCTCTGTGCTT
 TGGGGGGTGTGTTTGCATTGCCCCAGATTCCAATAAACTCACCAAATTCGGGTCTGTGCGTAGT

Primers:

LEFT PRIMER 243 20 60.13 55.00 2.00 2.00 CCTTCAGCACCTTCTTCAGC
 RIGHT PRIMER 405 20 62.00 50.00 3.00 0.00 TTGTTAGCGGCATCCTCCTT
 PRODUCT SIZE: 163, PAIR ANY COMPL: 2.00, PAIR 3' COMPL: 0.00

Gene Sesquiterpeno Ciclase**gi|162462602|ref|NM_001112412.1| Zea mays sesquiterpene cyclase1 (stc1), mRNA**

ATGGTGGTAGCAGCAGCCAGCAGGCATATTCCAACCCCCAAGCACACTGGCAAATGACAGGCAGCA
 GCTACGCTGCACGTGCACGGCCTTCCGCTCCATCAGCACGAAGCTAGCAGCACGGTCCAGCGGTGGC
 CGCCGTTCTGCCGTGGCCCCCTCTGCTGGAGGGCCGCCGCTGCCGCCGCCACCACCAGTTGTCATGGCC
 GGCGCCGTGGCGTCGCCGGGCAAGCGAATCCCGCCGTACCAATTGGTTGCACCAGCAGGGCCGCCAG
 CGGCGTCGCCGTCTCTGCTAGTGCCACCGTCGCCGCCCCCGCTAGTAGTAGTAGGCAGGCGAAAGAGG
 ACGATGGCGCGAGCAGAAACGTCTCGGGCTTTGAGCCATCCATCTGGGGCGATTTCTTCTCACCTACT
 CCAGCCCTCTGGCCACGTTCGTCCTTCAACAAGGCATGGATGGTACATCGAGCAGAGCAGCTGAAGGAA
 CAAGTGGCAGCAAACTGGTAGCAGCTTCGTCGAGCGCCTGTAGCCTGCACCGTAGGATTCATCTCAT
 CCACGTCTTGGAGCGTCTCTGTCTGGATCATCTCTTCGAGGACGAGATCAGCGACATGCTAGCTGAAT
 GAACGACGTGATGTCAGTGGCTGCGACCTCAACCGGTGGCCATGTGGTTCTATCTTCTCCGAAAGCA
 CGGATACAGTGTCTCGTACAGTGTCTTTGCCGAGTTCAGAGACGAACAGGGGGGTGGTTTTACAGCAA
 ACAGTGCAAGGGATCTGCTGAGCCTTCACTGCGCTGCTTGTCTCGCGACGCGTGGAGAGACGATACTT
 GACGAGGCCATTTCTTACAGCCAAGAGTTTAAAATCAACAGCGCCGTATACGGGAGCAGCGTCTGTT
 AGCATGTGAAATAAAGCGTGCCTCGAGATCCCCCTCCCAAGACGTGTGAGAATTTACGAGGCTAAAT
 CTCGTATAGCTGAATATGGAAGAGAGGCTGAGGCTGATGAACTGGTAATGGAGCTAGCAAAGCTCAAC
 TATAATCTCGTGCAACTCCAGTATCAACAAGAGCTGAAGATCATAACAAGGTGGTGGAAATGGTCTAGA
 GCTTCAGTCAAGGCTATCGTTTCGCTCGAGACAGAGTTGTGGAGTGCTACTTCTGGATCGTGGGAGTATA
 TTTTGAGCCAAGCTACTCTCGAGCTCGAATAATACTAACAAGTTCATCGCCATCGTGTCCCTATTGGA
 CGACTTATGATGTCTATGGAAGTCCACAGGAGTGCAGGTTATTTACCGAGTGTATAGAAAGCTGGG
 ACCCTGCAGTTGCTGGAGGTCTTCCAGAGAACATGAAGTTCATTTTTGGAAAAATTTGGATACTTACC
 AAAGCATTGAGGAAGAATTAGCGCCGGAAGAGAAATACCGCATGCCCTACATAAAAAATTTTATTATA
 GATCTAGTAAGAGCATAACAAGGAGGTAAGATGGCGCGAACAAGGGTATGTGCCTGCAACCGTTG
 AGGAGCACCTGCAGGTTTCAGCAAGAAGTGGCGCTTGTACCTCTTGTCTGCGCATCATTTGTTGGAA
 TGGGAGATGTTGCAGGTGAAGAAGCTTTCGAATGGGTGTGCAGTGTGCCTAACTAGTGCAGGCGCTC
 TGCATCATTCTCAGACTTCCGATGATCTCAAGTCATATGAGCGAGAGAAAATGGCCCCGCATGTTGCC
 TCGACAATAGAAAGCTGCATGAGAGAGCACGAGGTCCCGCTCGAAGTGGCTCGCGTGAAGATACAGG
 AAATGATAGATGAAACATGGAAAGATTTCAACGAGGAGTGGCTGAACATGAACAAGCACCAGCCGGC
 GGAGCTGCTCGAGAGGATCTTCAACCTGACAAGAACAATGGTGTATATGTACAAGAATGATGACCGGT
 ACACAAATTGCCATGTCATCAAAGACACCATAAACTCGTTGTTTGTGGAGCCTGTTTTTCATAGCCTAGG
 ACGTTTCGTTAAATAGTTGTGATGCCCCATGCATGGTTGTGTGATGACACA

Primers:

LEFT PRIMER 874 19 61.50 57.89 3.00 2.00 GGAGCAGCGTCGTTAGCAT
 RIGHT PRIMER 1001 20 60.42 55.00 3.00 2.00 ACCAGTTCATCAGCCTCAGC
 PRODUCT SIZE: 128, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

Gene Lipoxigenase 10**gi|162464002|ref|NM_001112510.1| Zea mays lipoxigenase (LOX10), mRNA**

CCACGCGTCCGGGTGCTCAGCGGAACAGCTAGCTATAGCCTGTAGCTAGCAGCTAGCTTCAGTCACAG
GCCGGACGGTCGGCTCACACACAGCTAGCCGCCGCCGCGCTAGCTTAGCCACCAGTAGTCCGATCTG
ATCTACAGGCAAGGGGCAACTAGCTAGCTAGCCGCGCGCCGGCCATGATGAACCTGAACCTGAAGC
AGCCTCTGGTGTGCCCGCACCACAGCAATGTCGTGGCTCGCGCCTGTCGTCTGTCGCCCTCGG
CAGCCGCCGCCAGCAGGAGGACCGGCGGGCGTGTCTCCCGGTCCGGCTCCCGGCGGCACGTGCGG
CTGCCGAGGATCAGCTGCAGCGCCACCGAGGAGGTCAGCGGCCCGTGTCTGTCGCCGTACCGTGGAGAG
GATGCTCACGGTGACGGCGTGGTGGAGGCGTCCGGCCATCGGGCAGATGTACTTCCAGCGCGCCG
TCGACGACATCGGCGACCTCCTCGGCAAGACGCTGCTGCTCGAGCTCGTACGCTCCGAGCTCGACGCA
AAGTCGGGCGTGGAGAAGACGCGGGTGACGGCGTACGCGACAAGACGCTGCGGGAGGGCCACTACG
AGGCGGAGTTCAAGGTGCCGGCGTCTCGGGCCGGTGGGCGCGGTGCTGGTGGAGAACGAGCACCA
CAAGGAGGTCTTCATCAAGGAGATCAAGCTCGTACCGGCGGGCAGCAGCACCGCCGTCACCTTCG
ACTGCAACTCCTGGGTGCACTCCAAGTTCGACAACCCGGAGAAGCGCATCTTCTTACCCTCAAGTCAT
ACCTGCCGTCCGACACGCCAAGGGGCTGGAGGACCTGAGGAAGAAGGACCTGCAGGCGCTGCGCGG
CGACGGGCACGGCGAGCGCAAGGTGTTGAGCGCGTCTACGACTACGACGTGTACAACGACCTGGGCG
ACCCGGACAAGAACCCGGCCCACCAGCGGCCCGTGTGGGCGGCAACAAGCAGTACCCATAACCCGCG
CCGCTGCCGCACCGGCCGCCCCAGGACCAAGAAGGACCCCGAGACGGAGATGCGCGAGGGGCCACAAC
TACGTGCCCGCGACGAGCAGTTCGAGGAGTGAAGCAGCTCACGTTCCGGGGCCACCACGCTGCGCTC
CGGCCTGCACGCGTGTGCCGGCGCTCCGCCCGTGTCTATCAACAAGAAGGATCTGCGCTTCCCGCA
CTTCCCGCCATCGACGACCTCTTACGCGACGGCATCCCCTGCCGGCGCAGACCCGGGTTCCGACGCTT
CCGCACCGTCGTCCCGCGCATGGTCAAGCTGGTGGAGGACACCACCGACCAGTCTCCGCTTCGAGG
TGCCGGAGATGATAGAGAGGGACCGGTTCTCGTGGTTCAAGGACGAGGAGTTCGCGAGGCAGACGAT
CGCGGGGCTCAACCCGCTGTGCATCCAGCTGCTGACTGAGTTCCCCATCAAGAGCAAGCTGGACCCGG
AGGTGTACGGGCCAGCGGAGTCCGCCATACCAAGGAGATCCTGGAGAAGCAGATGAACGGCGCGCT
GACCGTGGAGCAGGCGCTGGCGGCAAGCGGCTGTTTCATCCTGGACTACCACGACGTGTTCTTCCCT
ACGTGCACAAGGTGCGGGAGCTGCAGGACGCGACGCTCTACGCCTCGCGCACCATCTTCTTCCCTGACG
GACCTGGGCACGCTGATGCCGCTGGCCATCGAGCTGACGCGGCCAAGTCGCCGACGCGGCCGACGTG
GAAGCGGGCGTTACGACACGGGCCCGACGCCACCGACGCTGGTGTGGAAGTGGCCAAGGCGCAC
GTGCTGACCCACGACGGGTACCACCAGTGGTGAGCCACTGGCTGCGCAGCAGTGGTGGTGGGA
GCCCTACATCATCGCCGCCAACCAGCAGTGGCCGCTGACCCGCTGTACCCTGCTGACCCCGC
ACTTCCGCTACACCATGGAGATCAACGCGCTGGCCAGGAGGCGCTCATCAACGCCGACGGCATCATC
GAGGAGTCTTCTGCGCGGCAAGTACGCCGTCGAGCTCAGCTCCGTGGCGTACGGCGGACGTGGCA
GTTTCGACACGGAGGCGCTGCCAACGACCTCATCAAGCGCGGGCTGGCCGTGCGCGGGGAGGACGGG
GAGCTGGAGCTACCATCAAGGACTACCCCTACGCCACGACGGGCTCCTGGTCTGGGACTCCATCAG
GCAGTGGGCGTCCGAGTACGTCAACGTCTACTACAAGTCCGACGAGGCCGTGGCCGCCGACCCCGAGC
TGAGGGCGTCTGGGACGAGGTGCGCAACGTGGGGCACGGCGACAAGAAGGACGAGCCGTGGTGGCC
CGTGTGGACACCCGCGACAGCCTGGTGGAGACGTGACCACCATCATGTGGGTACCTCCGGCCACC
ACTCGGCCGTAACCTTCGGCCAGTACCCTTCGCCGGCTACTTCCCAACCGGCCGACCACCATCCGGA
AGAACATGCCGGTGGAGGAGGGCGGGCCGGGCGAGGAGATGGAGAAGTTCCTCAAGCAGCCGGAGAC
GACGCTGCTGGACATGCTGCCACGCAGATGCAGGCCATCAAGGTCATGACGACGCTGGACATCCTCT
CGTCGCACTCGCCGACGAGGAGTACATGGGGGAGTTCGCGGAGCCGTCGTGGCTGGCGGAGCCCATG
GTGAAGGCGGCGTTCGAGAAGTTCGGCGGCAGGATGAAGGAGATCGAGGGGTTTCATCGACGAGTGCA
ACAACAACCTGGACCTCAAGAACCGCTGCGGGCGCCGGGATCGTGCCGTACGAGCTGCTCAAGCCCTT
TCCAAGCCGGGAGTACCCGGGAGGGGCATCCCAGCAGCATCTCCATCTGATCCATCCTCAGCATGCA
TTAGTCCAATTAATCGGGGGGTGACTATTATTGCATGCAGAGGCTGCTTGTGCAATAAAAACGTACTA
TATGTACGATTGTATTGTACATGTGTGCAATGCAACAAGAGGCACGTTTGAGACTTTGAGTTTAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Primers:

LEFT PRIMER 5708 19 62.07 57.89 3.00 2.00 CTTCAGCACCAAGCCAAGC
RIGHT PRIMER 872 21 62.36 52.38 2.00 2.00 CCTCCTCCATTACATCCAGA
PRODUCT SIZE: 165, PAIR ANY COMPL: 2.00, PAIR 3' COMPL: 0.00

Gene Poliubiquitina

gi|226502870|ref|NM_001154981.1| Zea mays polyubiquitin containing 7 ubiquitin monomers (LOC100282068), mRNA

ACATCTCATCTTCGTCTGTGTTCTTGGGCGTACGCGGACACAGCCCCGATCCGAATCGTCGTCCTTGCG
 AGCCTCGCCGATCCCCACTCCCCTCCCCTCGCTTCAAGATGCAGATCTTTGTGAAGACCCTCACCGGC
 AAGACTATCACCTCGAGGTGGAGTCTTCTGACACCATTGACAATGTCAAGGCTAAGATCCAGGACAA
 GGAGGGCATCCCTCCTGACCAGCAGCGGCTTATCTTCGCCGGCAAGCAGCTTGAGGACGGACGCACAC
 TTGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGTCAACCCTCCACTTGGTGCTGCGCCTTAGGGGAGGCATGCAG
 ATCTTTGTCAAGACCTTGACTGGCAAGACAATCACCTTGAGGTGGAGTCCTCAGACACCATTGACAAT
 GTCAAGGCAAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCACCTGACCAGCAACGTCTCATCTTTGCCGGCAA
 GCAGTTGGAGGATGGGAGGACCCTTGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGAGCACCTCCACTTGGTGC
 TCGCTCTTAGGGGTGGTATGCAGATCTTTGTGAAAACCCTTACTGGCAAGACCATCACTCTTGAGGTGG
 AGTCTTCAGATAACCATTGACAATGTCAAGGCCAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCGCCGACCAG
 CAGCGTCTTATCTTTGCCGGCAAGCAGCTGGAGGATGGACGCACCCTTGCGGATTACAACATTGAGAA
 GGAGAGCACCTCCACCTGGTGCTGCGCCTCAGGGGAGGAATGCAGATCTTCGTGAAGACATTGACTG
 GCAAGACCATCACCTTGGAGGTTGAGAGCTCCGACACCATTGATAATGTGAAGGCCAAGATCCAGGAC
 AAGGAGGGTATCCCCCGGACCAGCAGCGGCTGATCTTCGCCGGCAAGCAGCTGGAGGATGGTCGCAC
 CTTGGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGAGCACCTCCATCTGGTGCTCCGCCTGAGGGGCGGTATGC
 AGATCTTTGTGAAGACCTTGACTGGCAAGACCATAACCCTGGAGGTTGAGAGCTCTGACACCATCGAC
 AACGTGAAGGCTAAGATCCAGGACAAGGAGGGGATTCCCCCAGACCAGCAGCGTCTGATCTTCGCCGG
 CAAGCAGCTGGAGGATGGTCGCACCCTTGACAGACTACAATATCCAGAAGGAGAGCACCTCCACCTGG
 TGCTCCGTCTTCGCCGGTGGTTATTAAGCCATCAGTCGTTGAAGCTGCTGCTGTATCTGGGTTATCTAGTG
 TCTCTGCCATTGCCATGGATGGTGCTGCTTTCAAAGTATTTGTATGGTTTGTGTCGTGAGTCGTGACT
 GAGCTGGTTTCATGGACCAGTTGTGTTCTCGTTACCCAAAACACTATCGTGCGACCCGCATATGGCTTAATC
 ATGAATAAATGTTGTTTGAATTTAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Primers:

LEFT PRIMER 1252 21 60.40 47.62 3.00 2.00 TAAGCCATCAGTCGTTGAAGC
 RIGHT PRIMER 1382 21 61.83 52.38 4.00 2.00 CATGAAACCAGCTCAGTCACG
 PRODUCT SIZE: 131, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 1.00