



Universidade Federal
de São João del-Rei

DALILA DOMINIQUE DUARTE ROCHA

**DEFESA INDUZIDA INDIRETA EM SOJA ELICITADA POR
HERBIVORIA SIMPLES E MÚLTIPLA**

**SETE LAGOAS
2018**

DALILA DOMINIQUE DUARTE ROCHA

**DEFESA INDUZIDA INDIRETA EM SOJA ELICITADA POR
HERBIVORIA SIMPLES E MÚLPTIPLA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal de São João Del-Rei, Campus Sete Lagoas, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias, na área de concentração em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Matiello Fadini

Coorientador: Prof. Dr. Júlio Onésio Ferreira Melo

**SETE LAGOAS
2018**

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R672d Rocha, Dalila Dominique Duarte.
DEFESA INDUZIDA INDIRETA EM SOJA ELICITADA POR
HERBIVORIA SIMPLES E MÚLPTIPLA / Dalila Dominique
Duarte Rocha ; orientador Marcos Antonio Matiello
Fadini; coorientador Júlio Onésio Ferreira Melo. --
Sete Lagoas, 2018.
46 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Ciências Agrárias) -- Universidade Federal de São
João del-Rei, 2018.

1. Defesa induzida indireta. 2. Tetranychus
urticae. 3. Neoseiulus californicus. 4. Anticarsia
gemmatalis. 5. Infestação múltipla. I. Fadini, Marcos
Antonio Matiello , orient. II. Melo, Júlio Onésio
Ferreira , co-orient. III. Título.

DALILA DOMINIQUE DUARTE ROCHA

**DEFESA INDUZIDA INDIRETA EM SOJA ELICITADA POR
HERBIVORIA SIMPLES E MÚLPTIPLA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal de São João Del-Rei, Campus Sete Lagoas, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias, na área de concentração em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Matiello Fadini

Coorientador: Prof. Dr. Júlio Onésio Ferreira Melo

Sete Lagoas, 10 de agosto de 2018.

Banca examinadora:

Prof. Dra. Madelaine Venzon - EPAMIG

Prof. Dra. Simone Martins Mendes – Embrapa Milho e Sorgo

Prof. Dr. Marcos Antonio Matiello Fadini
Orientador

Ao meu filho Davi, minha família e ao meu companheiro Lucas.
DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre ser bondoso e misericordioso, me provendo força e sabedoria para vencer todos os obstáculos.

A minha mãe, Iêda, por sempre me apoiar e me ajudar, além de ser exemplo de mulher guerreira, honesta e amável com todos os filhos.

Ao meu amado filho Davi, por ser a razão de todo meu esforço, além de me ensinar a amá-lo incondicionalmente, e a meu sobrinho Ryan, por alegrar minha vida diariamente.

Ao meu namorado, Lucas, por ser carinhoso, companheiro, amigo e sempre me apoiar em todas as situações.

Aos companheiros do laboratório (Grupo ConhecimEnto) em especial a minha amiga Bárbara, por ter me auxiliado durante toda a execução experimental, esforçando-se e realizando parte do experimento, este trabalho é nosso! Sou grata também pelo agradável e divertido convívio, foi o início de uma grande amizade.

Ao meu orientador, Prof. Marcos A. M. Fadini, que se mostrou prestativo, incentivador da minha formação profissional, excelente professor, ético e comprometido, características cujas quais irei desenvolver no percurso acadêmico e na vida.

Ao meu coorientador, Prof. Júlio Onésio F. Melo, pela orientação, ensino e acompanhamento nas análises químicas.

Aos membros da banca, Dra. Madelaine Venzon e Dra. Simone M. Mendes, pela disponibilidade em participar da minha defesa.

À UFSJ, pelo espaço físico e laboratorial para realização dos experimentos.

À Embrapa Milho e Sorgo, por ceder as lagartas *Anticarsia gemmatalis*, ao Dr. Paulo Paulo pelo empréstimo do olfatômetro, e ao professor Hamilton por ceder as sementes de soja.

À UFMG, por disponibilizar o equipamento CG/MS para realização das análises químicas.

“Em seu coração o homem planeja o seu caminho, mas o Senhor determina os seus passos.” (Provérbios, 16:9)

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| RESUMO GERAL | I |
| GENERAL ABSTRACT..... | II |
| INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| REFERÊNCIAS | 4 |
| ARTIGO 1- PREFERÊNCIA DO ÁCARO PREDADOR <i>NEOSEIULUS CALIFORNICUS</i> (ACARI: PHYTOSEIIDAE) POR VOLÁTEIS DE SOJA INFESTADA PELO ÁCARO-RAJADO <i>TETRANYCHUS URTICAE</i> (ACARI: TETRANYCHIDAE) | 7 |
| Resumo..... | 7 |
| Abstract..... | 8 |
| Introdução..... | 9 |
| Material e métodos..... | 10 |
| Resultados..... | 14 |
| Discussão..... | 15 |
| Referências..... | 17 |
| ARTIGO 2 - PREFERÊNCIA DO ÁCARO PREDADOR <i>NEOSEIULUS CALIFORNICUS</i> (ACARI: PHYTOSEIIDAE) POR VOLÁTEIS DE SOJA INFESTADA POR MÚLTIPLOS HERBÍVOROS..... | 26 |
| Resumo..... | 26 |
| Abstract..... | 27 |
| Introdução..... | 28 |
| Material e métodos..... | 29 |
| Resultados..... | 32 |
| Discussão..... | 33 |
| Referências..... | 36 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 45 |

DEFESA INDUZIDA INDIRETA EM SOJA ELICITADA POR HERBIVORIA SIMPLES E MÚLTIPLA

RESUMO GERAL - As plantas possuem defesas constitutivas e induzidas (direta e indireta) contra o ataque de herbívoros. As rotas químicas nas plantas que acionam as defesas induzidas podem variar em relação ao tipo de aparelho bucal dos herbívoros. Diante da diversidade de ataques de herbívoros, que podem ocorrer de maneira simultânea, pode haver antagonismo ou sinergismo entre tais rotas. O presente trabalho objetivou avaliar se defesas induzidas indiretas são acionadas em plantas de soja transgênica (Bt) sob o ataque do ácaro-rajado *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) e/ou da lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae), bem como avaliar os compostos químicos que mediam essas defesas. A hipótese nula avaliada foi que plantas de soja sob infestação simples e múltipla não atrairiam o ácaro predador *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae). O experimento foi realizado em casa-de-vegetação (manutenção das plantas de soja e criação dos ácaros herbívoros) e em laboratório (utilização do olfatômetro em Y e arena) para avaliar a preferência olfativa do ácaro predador *N. californicus* e análise química dos voláteis. Os tratamentos para o teste de olfatomia do Capítulo I foram: Ar x ar; Ar x plantas de soja IPRO limpa; soja IPRO limpa x soja IPRO infestada com ácaro-rajado. No Capítulo II testou-se soja IPRO limpa x soja IPRO infestada com lagarta-da-soja; soja IPRO infestada com ácaro-rajado x soja IPRO infestada com lagarta-da-soja e soja IPRO infestada com ácaro-rajado x soja IPRO infestada com ácaro e lagarta-da-soja na mesma planta. Para as infestações utilizou-se 100 ácaros-rajado por planta durante 24 horas, e duas lagartas de quarto ínstar por planta durante 48 horas. Para realização das análises químicas dos voláteis foram retiradas amostras das plantas em frascos de *head space* e expostas a fibra PDMS-DVB para dessorção dos voláteis no CG/MS. Os testes em olfatômetro e em arena mostraram que o ácaro predador *N. californicus* prefere voláteis de soja infestada pelo ácaro-rajado. O mesmo padrão de preferência do ácaro predador foi observado quando as plantas estavam em infestação múltipla por ácaro-rajado e lagarta-da-soja. Houve diferenças químicas qualitativas e quantitativas entre os compostos voláteis encontrados nos tratamentos. Conclui-se que plantas de soja possuem defesa induzida indireta á infestação por ácaro-rajado e infestações simultaneas de lagartas-da-soja não alteram tais defesas. Isso mostra que as infestações múltiplas não afetam a localização de plantas de soja infestadas por *T. urticae* pelo ácaro predador *N. Californicus*, o que sugere a manutenção da eficiência do controle biológico de ácaros praga na soja.

Palavras-chave: Defesa induzida indireta, *Tetranychus urticae*, *Neoseiulus californicus*, *Anticarsia gemmatalis*, infestação múltipla.

INDIRECT INDUCED DEFENSE IN SOY ELIZED BY SIMPLE AND MULTIPLE HERBIVORY

GENERAL ABSTRACT- Plants have constitutive and induced (direct and indirect) defenses against the attack of herbivores. The chemical routes in the plants that activate the induced defenses may vary in relation to the type of oral of the herbivores. In view of the diversity of herbivorous attacks, which may occur simultaneously, there may be antagonism or synergism between such routes. The objective of this work was to evaluate whether indirect induced defenses are activated in transgenic soybean plants (Bt) in the presence of the mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and / or the *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). As well as evaluating the chemical compounds that mediate these defenses. The null hypothesis is that soybean plants under single and multiple infestations would not attract the predatory mite *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae). The experiment was carried out in greenhouse (maintenance of soybean plants and creation of phytophagous mites), and in the laboratory (use of olfactometer in Y and sand) to evaluate the olfactory preference of the predator mite *N. californicus* and chemical analysis of the volatiles. The treatments for the olfactometry test of chapter I were: Air x air; Air x Soybean plants IPRO clean; IPRO soybean cleaned x IPRO soybean infested with spider-mite. In the chapter II was tested soybean IPRO cleaned soybean IPRO infested with soybean caterpillar; IPRO soybean infested with spider-mite x IPRO soybean infested with soybean caterpillar and IPRO soybean infested with mite-pruned soybean IPRO infested mite and soybean caterpillar on the same plant. The infestation with spider-mite was 100 individuals per plant during 24 hours, and by two quarts larvae per plant for 48 hours. To perform the chemical analysis of the volatiles, samples were taken from the plants in *head space* flasks and exposed to PDMS-DVB fiber for desorption of the volatiles in the GC / MS. Olfactor and arena tests showed that the predatory mite *N. californicus* prefers volatiles of soybean infested by the spider-mite. The same pattern of preference of the predator mite was observed when the plants were in multiple infestation by spider-mite and soybean caterpillar. There were qualitative and quantitative chemical differences among the volatile compounds found in the treatments. It is concluded that soybean plants have indirectly induced defense to mite infestation and simultaneous infestations of soybean caterpillars do not alter such defenses. This shows that multiple infestations do not affect the location of *T. urticae* infested plants by the predator mite *N. californicus*, which suggests the maintenance of the efficiency of the biological control pest mite in soybean.

Keywords: Indirect Induced Defense, *Tetranychus urticae*, *Neoseiulus californicus*, *Anticarsia gemmatalis*, multiple infestation.

INTRODUÇÃO GERAL

As plantas, ao longo do tempo evolutivo, desenvolveram mecanismos de defesa contra fatores bióticos e abióticos, como as defesas contra herbivoria elicitadas por artrópodes (HEIL, 2008). Tais mecanismos de defesa podem, por exemplo, atrair predadores/parasitoides ou causar mudanças biológicas e comportamentais diretamente aos herbívoros (DICKE et al., 1999). As plantas também apresentam defesas constitutivas, as quais são caracterizadas pela presença contínua de estruturas morfológicas (e.g. pêlos, tricomas, espinhos) ou substâncias químicas que dificultam a utilização de seus tecidos pelos artrópodes, e podem ainda afetar negativamente parâmetros biológicos relacionados ao desenvolvimento e reprodução dos herbívoros (COLEY; BARONE, 1996). Essas estruturas podem ser encontradas em diferentes partes da planta e, normalmente, a sua distribuição varia de acordo com o estágio fenológico (COLEY; BARONE, 1996). A defesa induzida direta, por exemplo, é acionada pelas plantas após serem expostas com elicitores presentes nas secreções orais de herbívoros (HEIL, 2008). As plantas sintetizam compostos prejudiciais ao metabolismo dos insetos interferindo, por exemplo, na alimentação deles (TAKABAYASHI et al., 1994). Este efeito pode ser expresso tanto para limitar o fornecimento de alimentos, quanto para reduzir o valor nutricional absorvido pelo herbívoro (KESSLER e BALDWIN, 2002).

A defesa induzida indireta também é acionada pelas plantas após sofrerem injúrias de herbívoros (DICKE; VAN LOON; SOLER, 2009). Diante desse estresse, elas produzem metabólitos secundários, como os compostos orgânicos voláteis (COVs) ((DICKE; SABELIS, 1988; OZAWA et al., 2000). Tais compostos são utilizados para repelir herbívoros e/ou atrair inimigos naturais, funcionando como pistas químicas para eles localizarem plantas infestadas por hospedeiros e/ou presas (DICKE; SABELIS, 1988). Além disso, os compostos químicos voláteis possuem funções pouco conhecidas como desempenhar efeitos diretos na proteção contra microorganismos (SHIOJIRI et al., 2006) ou como feromônios de comunicação entre plantas (KARBAN et al., 2000). Os compostos orgânicos voláteis geralmente formam misturas complexas que dependem do genótipo da planta (FRITZSCHE-HOBALLAH et al., 2002) da espécie e do estágio de desenvolvimento do herbívoro em ataque (TAKABAYASHI et al., 1994; OZAWA et al., 2000).

As rotas químicas de defesa nas plantas são acionadas após o ataque de herbívoros. Um exemplo é o ácido jasmônico (AJ) o qual media interações tritróficas (AMENT et al., 2004; VAN DEN BOOM; VAN BEEK; DICKE, 2000a; GOLS et al., 2003) e é sintetizado

através da via octadecanóide após a liberação do ácido linolênico a partir de biomembranas (HEIL, 2014). Outro composto emitido pela indução da defesa é o ácido salicílico (AS), ele e seu éster volátil, salicilato de metila (MeSA), são produzidos a partir do ácido cinâmico por duas rotas químicas (LEE; LÉON; RASKIN, 1995). Uma envolve a descarboxilação da cadeia lateral do ácido cinâmico, em ácido benzóico seguido de 2 hidroxilações para AS. Alternativamente, o ácido cinâmico pode ser primeiro ácido 2-hidroxilado para *o*-coumarico e depois descarboxilado para AS (LEE; LÉON; RASKIN, 1995).

O tipo de aparelho bucal dos herbívoros também pode afetar os COVs produzidos (HEIL, 2014). Herbívoros mastigadores tendem a induzir a sinalização por AJ, ao passo que sugadores tendem a acionar a rota do AS (LEITNER et al., 2005). Ácaros fitófagos possuem estiletos que perfuram as células das folhas e alimentam-se do conteúdo celular extravasado (De MORAES e FLECHTMANN, 2008). Em estudo conduzido com plantas de feijão (*Phaseolus lunatus* L.) foi observada defesa induzida por *Tetranychus urticae* nas vias de sinalização controladas tanto por AJ quanto por AS (OZAWA et al., 2000). Existem evidências de que o AJ e o AS possam agir de forma antagônica (ZARATE; KEMPEMA; WALLING, 2007). As respostas acionadas pelas plantas em infestações simples ou múltiplas podem interferir nas etapas de sinalizações e, conseqüentemente, na informação química disponível para atração de predadores ou parasitoides (DE BOER et al., 2008).

Estudos foram realizados com objetivo de avaliar defesas induzidas indiretas em plantas sob infestações simples e a atratividade de um predador e/ou parasitoide aos voláteis produzidas (PONZIO et al., 2016). Entretanto, as plantas podem sofrer múltiplos ataques, sendo estes simultâneos e/ou sequenciais (DICKE; VAN LOON; SOLER, 2009). Entender o mecanismo envolvido por ataque múltiplo de herbívoros é fundamental, uma vez que reflete de forma mais verossímil às condições naturais (PONZIO et al., 2016; AASTMA et al., 2017). Dessa forma, é possível compreender como ocorrem as respostas das plantas quando submetidas a infestações simultâneas, bem como estas interferem nas interações tritróficas (DICKE; VAN LOON; SOLER, 2009). O estudo dos compostos voláteis de plantas e seus efeitos sobre inimigos naturais podem fornecer informações importantes para o controle biológico de pragas em culturas onde há grande diversidade de herbívoros infestantes, como por exemplo, em lavouras da soja (MOSCARDI et al., 2012).

A cultura da soja é atacada por diversas pragas durante o seu ciclo de desenvolvimento. As folhas, por exemplo, são fonte de alimento para diversas espécies de insetos, sendo as lagartas e os coleópteros considerados os herbívoros mais relevantes

(MOSCARDI et al., 2012). Neste aspecto, a lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada importante na cultura e há relatos de sua ocorrência em todas as regiões brasileiras de cultivo (MOSCARDI et al., 2012). A cultura da soja é um exemplo clássico de um dos maiores programas de controle biológico mundial. O manejo integrado de pragas da soja (MIP-Soja), desenvolvido pela Embrapa Soja e outras instituições, foi responsável por desenvolver várias estratégias de controle, como por exemplo o *Baculovirus anticarsia* para o controle da lagarta da soja (MOSCARDI et al., 2012).

Vários trabalhos evidenciam que, além dos insetos, há diversas espécies de ácaros praga atacando lavouras de soja durante o estágio vegetativo (GUEDES et al., 2007; ROGGIA, 2008) . O ácaro-rajado *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) é generalista, considerado praga primária em muitas culturas (RAZMJOU; TAVAKKOLI; FALLAHI, 2009) e tem sido relatado atacando soja em diversas regiões brasileiras (GUEDES et al., 2007; REZENDE et al., 2014) causando danos severos (BUENO et al., 2009). O ácaro predador *Neoseiulus californicus* (McGregor, 1954) (Acari: Phytoseiidae) que é uma espécie de predador generalista tipo II, pode alimentar-se de *T. urticae* e contribuir para a estabilização de sistemas com infestações (McMURTRY e CROFT, 1977). Tais pragas, lagarta-da-soja e o ácaro-rajado, podem atacar plantas de soja simultaneamente durante o estágio vegetativo da cultura. O estudo do comportamento de inimigos naturais em resposta às infestações múltiplas de herbívoros em soja pode fornecer informações mais realísticas com relação à eficiência do controle biológico de pragas na cultura no campo.

Diante deste contexto, esta dissertação foi dividida em dois capítulos. No primeiro capítulo, objetivou-se avaliar se plantas de soja transgênica emitem compostos voláteis que são atrativos ao ácaro predador *Neoseiulus californicus* após infestação por ácaro-rajado. Testou-se a hipótese nula (H0) de que plantas de soja, após a infestação por ácaro-rajado, não seriam atrativas ao ácaro predador *N. californicus*. No segundo capítulo, além da herbivoria simples (i.e. ácaro-rajado), acrescentou-se a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae), para avaliar se herbivoria múltipla (i.e. ácaro-rajado + lagarta-da-soja) interferiria na produção dos compostos voláteis e na atratividade de *N. californicus*. Para isto, foi testada a hipótese nula (H0) de que plantas de soja sob infestação múltipla não alteraria a atratividade de *N. californicus*. Os resultados e discussões aqui apresentados contribuirão para o entendimento e avaliação do controle biológico de ácaros praga na cultura da soja.

REFERÊNCIAS

AARTSMA, Y.; BIANCHI, F. J. J. A.; WERF, VAN DER, W.; POELMAN, E. H.; DICKE, M. Herbivore-induced plant volatiles and tritrophic interactions across spatial scales. **New Phytologist**, v. 216, p. 1054–1063, 2017.

AMENT, K.; KANT, M. R.; SABELIS, M. W.; HARING, M. A.; SCHUURINK, R. C. Jasmonic acid is a key regulator of spider mite-induced volatile terpenoid and methyl salicylate emission in tomato. **American Society of Plant Biologists**, v. 135, p. 2025–2037, 2004.

COLEY, P. D.; BARONE, J. A. Herbivory and plant defenses in tropical forests. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 27, p. 305–335, 1996.

DE BOER, J. G.; HORDIJK, C. A.; POSTHUMUS, M. A.; DICKE, M. Prey and non-prey arthropods sharing a host plant: Effects on induced volatile emission and predator attraction. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, n. 3, p. 281–290, 2008.

BUENO, A. F.; BUENO, R. F.; NABITY, P. D.; HIGLEY, L. G.; FERNANDES, O. A. Photosynthetic response of soybean to twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) injury. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p. 825–834, 2009.

MORAES, G.J.; FLECHTMANN, C. H. W. Manual de acarologia, Acarologia básica e ácaros de plantas cultivadas no Brasil. p. 68, 2008.

DICKE, M.; GOLS, R.; LUDEKING, D.; POSTHUMUS, M. A. Jasmonic acid and herbivory differentially induce carnivore-attracting plant volatiles in lima bean plants. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 8, p. 1907–1922, 1999.

DICKE, M.; SABELIS, M. W. How plants obtain predatory mites as bodyguards. **Netherlands Journal of Zoology**, v. 38, n. 2, p. 148–165, 1988.

DICKE, M.; VAN LOON, J. J. A.; SOLER, R. Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 5, p. 317–324, 2009.

FRITZSCHE HOBALLAH, M. E.; TAMÒ, C.; TURLINGS, T. C. J. Differential attractiveness of induced odors emitted by eight maize varieties for the parasitoid *Cotesia marginiventris*: Is quality or quantity important? **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, n. 5, p. 951–968, 2002.

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**, v. 29, n. 12, p. 2651–2666, 2003.

GUEDES, J. V. C.; NAVIA, D.; LOFEGO, A. C.; DEQUECH, S. T. B. Ácaros associados à cultura da soja no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, v. 36, n. 2, p. 288–293, 2007.

HEIL, M. Indirect defence via tritrophic interactions. **New Phytologist**, v. 178, n. 1, p.

41–61, 2008.

HEIL, M. Herbivore-induced plant volatiles : targets, perception and unanswered questions. **New Phytologist**, v.204, p. 297–306, 2014.

KARBAN, R.; BALDWIN, I. T.; BAXTER, K. J.; LAUE, G.; FELTON, G. W. Communication between plants : induced resistance in wild tobacco plants following clipping of neighboring sagebrush. **Oecologia**, v. 125, p. 66–71, 2000.

KESSLER, A. ; BALDWIN, I. T. Plant responses to insect herbivory: The Emerging Molecular Analysis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 299–328, 2002.

LEE, H. I.; LEÓN, J.; RASKIN, I. Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, n. 10, p. 4076-4079, 1995.

LEITNER, M.; BOLAND, W.; MITHÖFER, A. Direct and indirect defences induced by piercing-sucking and chewing herbivores in *Medicago truncatula*. **New Phytologist**, v. 167, n. 2, p. 597–606, 2005.

McMURTRY, J.A.; CROFT, B. A. Life-styles of phytoseiid mites and their roles in biological control. **Annu. Rev. Entomol**, v. 42, p. 291–321, 1997.

MOSCARDI, F.; BUENO, A. F.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; ROGGIA, S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; POMARI, A. F.; CORSO, I. C.; YANO, S. A. C. Artrópodes que atacam as folhas da soja. **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**, cap. 4, p. 213-334, 2012.

OZAWA, R.; AIMURA, G.; TAKABAYASHI, J.; SHIMODA, T.; NISHIOKA, T. Involvement of jasmonate- and salicylate-related signaling pathways for the production of specific herbivore-induced volatiles in plants. **Plant Cell Physiology**, v. 41, n. 4, p. 391–398, 2000.

PONZIO, C.; CASCONI, P.; CUSUMANO, A.; WELDEGERGIS, B. T.; FATOUROS, N. E.; GUERRIERI, E.; DICKE, M.; GOLS, R. Volatile-mediated foraging behaviour of three parasitoid species under conditions of dual insect herbivore attack. **Animal Behaviour**, v. 111, p. 197–206, 2016.

RAZMJOU, J.; TAVAKKOLI, H.; FALLAHI, A. Effect of soybean cultivar on life history parameters of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Journal of Pest Science**, v. 82, n. 1, p. 89–94, 2009.

REZENDE, J. M.; LOFEGO, A. C.; NUVOLONI, F. M.; NAVIA, D. Mites from Cerrado fragments and adjacent soybean crops: does the native vegetation help or harm the plantation? **Experimental and Applied Acarology**, v. 64, n. 4, p. 501–518, 2014.

ROGGIA, S.; GUEDES, J. V. C.; KUSS, R. C. R.; ARNEMANN, J. A.; NÁVIA, D. Spider mites associated to soybean in Rio Grande do Sul. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 43, n. 1, p. 295–301, 2008.

SHIOJIRI, K.; KISHIMOTO, K.; OZAWA, R.; KUGIMIYA, S.; URASHIMO, S.; ARIMURA, G.; JUNICHIRO, H.; TAKAAKI, N.; KENJI, M.; JUNJI, T. Changing green leaf volatile biosynthesis in plants: An approach for improving plant resistance against. **PNAS**, v. 103, n. 45, p. 16672–16676, 2006.

TAKABAYASHI, J.; DICKE, M.; POSTHUMUS, M. A. Volatile herbivore-induced terpenoids in plant-mite interactions: variation caused by biotic and abiotic factors. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, n. 6, p. 1329-1354, 1994.

VAN DEN BOOM, C. E. M.; VAN BEEK, T. A.; DICKE, M. Attraction of *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae) towards volatiles from various *Tetranychus urticae*-infested plant species. **Bulletin of Entomological Research**, v. 92, n. 6, p. 539–546, 2002a.

ZARATE, S. I.; KEMPEMA, L. A.; WALLING, L. L. Silverleaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. **Plant Physiology**, v.143, n. 2, p.866-875, 2007.

ARTIGO 1

Preferência do ácaro predador *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae) por voláteis de soja infestada pelo ácaro-rajado *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae)

Artigo escrito conforme as normas do periódico Experimental and Applied Acarology

Resumo As plantas possuem defesas contra o ataque de herbívoros. Dentre essas, destaca-se a defesa induzida indireta que é acionada após o ataque de herbívoros, na qual, a emissão de compostos orgânicos voláteis podem ser utilizados como pistas químicas para atrair e direcionar o forrageamento de inimigos naturais. Apesar de bem estabelecido para algumas plantas, este conhecimento ainda é escasso para culturas agrícolas como a soja infestada por ácaros praga. Tais informações podem ser importantes para subsidiar programas de controle biológico. Este trabalho objetivou avaliar se defesas induzidas indiretas são acionadas em soja, após serem submetidas ao ataque de *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) e se tais compostos são atrativos ao ácaro predador *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae). O experimento foi realizado com plantas de soja transgênica (Bt) M6210 IPRO, no olfatômetro em Y, no qual os tratamentos foram dispostos na sequência: ar x ar; ar x plantas de soja limpa; soja limpa x soja infestada com ácaro-rajado *T. urticae* durante 24 horas. Avaliou-se também a preferência de *N. californicus* em arena tendo como tratamento soja limpa x soja infestada com ácaro-rajado durante 24 horas. Em arena, observou-se o caminhar dos predadores em direção aos tratamentos e o número de predadores sobre as plantas após 24 horas. Os resultados foram submetidos ao teste qui-quadrado a 5% de significância. Realizou-se a análise química das plantas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e análise de componentes principais (PCA) dos compostos. Os testes ar x ar e ar x planta limpa apresentaram a inexistência de preferência pelo ácaro predador *N. californicus*. Entretanto, soja infestada por *T. urticae* foi mais preferida em relação à soja limpa por *N. californicus*. A PCA explicou 73,6% da variação dos voláteis. Assim, plantas de soja infestadas por ácaro-rajado acionam defesa induzida indireta através da emissão de compostos voláteis, que são utilizados como pistas químicas por *N. californicus*. Os resultados potencializam as chances de utilização de táticas de resistência de plantas e aplicação de controle biológico de forma conjunta para controle de infestações por ácaro-rajado em lavouras de soja.

Palavras-chave: Defesa induzida indireta, controle biológico.

Preference of the predatory mite *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae) by soybean volatiles infested by the spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae)

Abstract The plants have defenses against insect attack. Among these, we highlight the indirect defense that is triggered after the attack of herbivores, in which the emission of volatile compounds can be used as crucial cues to attract and direct the attack of natural inactive. Despite well-being for some plants, this is still the scarce crop for such a soybean infested by pest mites. Such information may be important in supporting biological control programs. The objective of this work was to evaluate the plant species induced in soybean, after being affected by the attack of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and its compounds are attractive to the predatory mite *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae). The experiment was carried out with transgenic soybean (Bt) M6210 IPRO, no olfactometer in Y, of which was useful in the sequence: air x air; air x clean soybean plants; soybean cleaned x soybean infested with *T. urticae* mite for 24 hours. Also preferred are *N. californicus* in the arena having as support soybean clean soybean infested with spider mite for 24 hours. In the arena, we observed the predators stage of maintenance of the treatments and the number of predators on the plants after 24 hours. The results were submitted to the test chi-square at 5% significance. The chemical analysis of plants was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry and principal component analysis (PCA) of the compounds. The air x air x tests solubilize the plant with preference for the predatory mite *N. californicus*. However, the soybean infested by *T. urticae* was more preferred in relation to the soybean cleaned by *N. californicus*. The PCA explained 73.6% of the volatile change. Thus, soybean infestations infested with spider-mite indirectly induced defense through the emission of volatile compounds, which are used as chemical indications by *N. californicus*. The results potentiate the possibilities of using plant resistance tactics and applying biological control together for the control of mite infestations in soybean crops.

Keywords: Indirect induced defense; biological control.

Introdução

As plantas são capazes de acionar defesas que as tornam resistentes ao ataque de insetos fitófagos (Chen 2008; Dicke et al. 2009; War et al. 2011; Aartsma et al. 2017). Essas defesas de plantas podem ser divididas em constitutivas e induzidas (Leitner et al. 2005), sendo que as constitutivas encontram-se em atividade constante e independem do ataque prévio dos artrópodes (Chen 2008). As defesas induzidas, por sua vez, são acionadas após o ataque de herbívoros (Leitner et al. 2005; Yoneya and Takabayashi 2014). As defesas induzidas podem ser diretas (afetando diretamente o desenvolvimento, a reprodução e a sobrevivência dos herbívoros) ou indiretas, atraindo inimigos naturais (Dicke and Sabelis 1988).

A defesa induzida indireta caracteriza-se pela emissão de compostos orgânicos voláteis (COVs) que atraem inimigos naturais dos herbívoros (Dicke et al. 2009; Leitner et al. 2005; Aartsma et al. 2017) como predadores e parasitoides (van Poecke and Dicke 2004). Esses compostos voláteis mediam interações tróficas (Shiojiri et al. 2001; Aartsma et al. 2017). Michereff et al. (2011) ao avaliarem a atração do parasitoide *Telenomus podisi* aos voláteis de cultivares de soja resistentes e susceptíveis a herbivoria de *Euschistus heros*, mostraram que houve maior produção de compostos voláteis na cultivar resistente e, conseqüentemente, atração significativa do parasitoide em relação a cultivar suscetível, na qual *T. podisi* não distinguiu entre odores emitidos por plantas sem herbivoria e plantas danificadas.

A emissão dos compostos voláteis é, em parte, relacionada com a modificação nas concentrações de ácido jasmônico (AJ) e de ácido salicílico (AS) (Leitner et al. 2005; Yoneya and Takabayashi 2014). Alguns inimigos naturais utilizam-se das modificações dos compostos voláteis como pistas químicas e assim são mais atraídos para plantas infestadas do que para plantas limpas (Dicke and Sabelis 1988). O acionamento da defesa induzida apresenta custos fisiológicos para as plantas, pois os recursos fisiológicos que deveriam ser empregados para o desenvolvimento da planta são deslocados para a emissão de voláteis (Leitner et al. 2005).

A ocorrência de compostos voláteis aumenta a atração de inimigos naturais e podem potencializar a eficiência do controle biológico de pragas (War et al. 2011; Gish et al. 2015). A soja, por exemplo, é infestada por artrópodes-pragas, dentre os quais diversas espécies de ácaros, como por exemplo ácaro-verde (*Mononychellus planki*), ácaro-rajado (*Tetranychus*

urticae) e alguns ácaros vermelhos (*Tetranychus desertorum*, *Tetranychus gigas* e *Tetranychus ludeni*) são considerados importantes devido à sua alta ocorrência, comprometendo a produtividade (Guedes et al. 2007; Roggia et al. 2008; Rezende et al. 2014). Já foi relatado o acionamento de defesas induzidas indiretas em plantas de soja em resposta a herbivoria de percevejos e lagartas (Moraes et al. 2005; Rostás and Eggert 2008; Michereff et al. 2011). Contudo, ainda são escassos os estudos quanto à resposta por manipulação de ácaros praga.

Assim, este trabalho avaliou se plantas de soja com infestação por *Tetranychus urticae* são capazes de acionarem defesa induzida indireta através da emissão de compostos voláteis e atraírem o ácaro predador *Neoseiulus californicus*.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Entomologia Agrícola e Florestal e na casa-de-vegetação do Campus Sete Lagoas da Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ), Sete lagoas, Minas Gerais, Brasil. As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Criação do ácaro-rajado e obtenção do ácaro predador

Para o estabelecimento das criações, foram coletadas folhas de sorgo (*Sorghum bicolor*) infestadas com *T. urticae* em casa-de-vegetação. Após a coleta, os espécimes foram visualizados por meio de microscópio estereoscópico e transferidos individualmente para face abaxial das plantas para feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*). Os ácaros foram criados em plantas de feijão-de-porco, semeadas em vasos plásticos (6,3 L), com substrato Terral Solo®, mantidas em gaiolas com tela anti-afídeos em casa-de-vegetação, com temperatura de 25 °C ± 5. As plantas foram irrigadas e substituídas sempre que necessário. Durante o período experimental, foram utilizadas folhas de feijão-de-porco sem tratamento fitossanitário, para manter criações de *T. urticae* em câmara climatizada, tipo BOD, à temperatura de 25°C, ± 1° C, umidade relativa de 70% ± 10% e fotofase de 12 horas. As folhas foram mantidas sobre espuma embebida em água dentro de caixas plásticas com a face abaxial voltada para cima e revestidas com algodão umedecido para impedir os ácaros de saírem da folha.

Os ácaros predadores *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae) foram adquiridos da empresa Koppert com o nome comercial SPICAL®.

Semeadura e manutenção das plantas de soja

Três sementes de soja M6210IPRO, que expressam a proteína Cry1AC (Bt), foram semeadas em vasos plásticos de (1 L), utilizando-se substrato Terral Solo® e acondicionados no interior de gaiolas com tela anti-afídeos em casa-de-vegetação. Após germinação, foi realizado desbaste, deixando uma planta por vaso. A irrigação e demais tratamentos culturais foram realizados sempre que necessário. As plantas de soja foram utilizadas para os experimentos ao atingirem o estágio de desenvolvimento V3 (três folíolos abertos).

Análise de preferência do predador em olfatômetro

Infestações foram realizadas com 100 ácaros fêmeas adultas de *T. urticae* por planta 24 horas antes da realização do experimento. Estas foram levadas ao olfatômetro em Y (Sabelis and van de Baan 1983), cujas medidas são de 21,0 cm de comprimento em cada extremidade e 3,5 cm de diâmetro. Os tratamentos foram dispostos nas extremidades pares do aparelho da seguinte maneira: ar x ar, plantas limpas x ar, plantas limpas x plantas infestadas com *T. urticae*. Utilizou-se o tratamento ar x ar como controle, para avaliar a ausência de preferência devido fatores externos (e.g. luminosidade, odor externo, ruído, umidade, etc.). Foram realizadas três repetições, que constituíam três conjuntos de plantas, representadas por 20 respostas dos predadores.

Os ácaros predadores foram liberados individualmente na área de liberação (extremidade ímpar) sobre um arame de cobre, para facilitar o deslocamento dos indivíduos. Utilizou-se um fluxômetro com velocidade de 0,50 m/s para regular o direcionamento do fluxo dos recipientes para a área de liberação. Observou-se o comportamento do ácaro predador durante 5 minutos, e considerou-se a resposta após atingir 1/3 de uma das extremidades. Os ácaros predadores que não responderam após 5 minutos não foram contabilizados na análise estatística seguindo a metodologia de Janssen (1999). Indivíduos que saíram do arame ou foram perdidos de vista durante a realização do teste foram removidos e o teste foi retomado após lavagem do aparelho com água corrente e secagem. A cada cinco respostas, as posições das fontes de odor foram invertidas para evitar tendências.

Análise de preferência do predador em arena

As plantas de soja, em estágio de desenvolvimento V3, foram infestadas com 100 fêmeas adultas de *T. urticae* durante 24 horas. Foi utilizada uma arena de Eucatex® com 70 cm de diâmetro para realização do experimento, que foi realizado após os testes em olfatômetro cujo objetivo foi avaliar o comportamento dos predadores em ambientes diferentes (i.e: olfatômetro e arena). Foram realizadas quatro repetições por tratamento, no qual foram utilizadas 6 plantas sendo: 3 plantas infestadas com ácaro-rajado e 3 plantas limpas.

Os vasos foram dispostos em torno da arena de forma intercalada, planta limpa – planta infestada e assim sucessivamente, com a distância de 36,4 cm entre plantas. A arena foi apoiada sobre os vasos de forma que o caule das plantas tocava sua extremidade a fim de permitir o deslocamento dos predadores. No centro da arena foram liberados 100 fêmeas de *N. californicus* sob uma placa de plástico transparente (3 cm de diâmetro). Foi observado o caminhar em direção as plantas. Após 24 horas, cada planta foi cortada do vaso e com o auxílio de um microscópio foram contados os predadores por planta.

Análise química dos voláteis

Foram coletadas 0,25 gramas de amostras de folhas das plantas de soja limpas e infestadas durante 10 dias consecutivos, a fim de realizar análises químicas prévias e determinar o dia do início da indução dos compostos voláteis. As amostras foram identificadas e lacradas em frascos de *headspace* (25 mL). Cada amostra foi aquecida por 5 minutos a 50 °C antes da exposição da fibra de microextração em fase sólida (SPME) (Merkle et al. 2015).

A análise química foi realizada no cromatógrafo a gás Trace GC Ultra (ThermoScientific, San Jose, CA) acoplado a espectrômetro de massas Polaris Q (ThermoScientific, San Jose, CA), sistema GC-MS, com um analisador do tipo ion-trap com a microextração em fase sólida (SPME) no modo *headspace*. Utilizou-se a fibra semipolar Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno (PDMS/DVB) para exposição no recipiente com as folhas de soja, a 60 °C por 20 minutos. Após este período, a fibra foi inserida no injetor do cromatógrafo a 200 °C, por 5 minutos, para dessorção dos voláteis coletados.

As condições cromatográficas para coleta dos voláteis da soja foram: temperatura do injetor, 200 °C; injeção em modo splitless; splitless time, 5 minutos; temperatura da fonte de íons, 200 °C; temperatura da interface, 275 °C. A temperatura de aquecimento do equipamento foi de (40 °C por 1 minuto, gradiente de 5 °C/min até 110 °C, manutenção da isoterma por 3 minutos e depois 7 °C/min até 220 °C, temperatura na qual manteve-se a isoterma por 1 minuto, e por fim um gradiente de 12 °C/min até 245 °C, temperatura na qual manteve-se a isoterma por 1 minuto). O detector foi mantido no modo de varredura (*fullscan*, de 30 a 300), utilizando a técnica de ionização por impacto de elétrons (EI), com energia de 70 eV. A coluna cromatográfica utilizada foi a coluna capilar HP-5 MS (5 % fenil e 95 % metilpolisiloxano), contendo as seguintes dimensões: 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme (Agilent Technologies INC, Alemanha).

Após obtenção das informações do cromatógrafo, foram realizadas a identificação e a análise dos compostos através de comparações entre os espectros de massas presentes nas bibliotecas NIST/EPA/NIH (2005). Esta análise possibilitou definir o período com que as plantas de soja modificam quantitativa e qualitativamente os compostos voláteis. Esta informação foi utilizada para definir as infestações das plantas no olfatômetro e na arena. Após a realização do teste em olfatômetro, foram retiradas amostras das plantas de soja utilizadas no aparelho em Y. Realizaram-se novas análises e posterior identificação dos compostos presentes nas amostras através dos valores de tempo de retenção obtidos do programa Xcalibur 1.4 da ThermoElectron Corporation.

Análises estatísticas

No teste de olfatiometria, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com três experimentos (primeiro experimento (controle): ar x ar; segundo experimento: plantas limpas x ar; terceiro experimento: plantas limpas x plantas infestadas com *T. urticae*) com três repetições. Em cada repetição avaliou-se a resposta de 20 ácaros predadores em relação às fontes de odores analisadas. Estes resultados foram submetidos a testes de qui-quadrado ($\alpha=5\%$) para dados categóricos (Crawley 2013).

Para o teste em arena, também utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos (plantas limpas e infestadas com *T. urticae*) com quatro repetições, nas quais foram analisadas as respostas dos 100 ácaros predadores em direção as plantas. Os

resultados foram avaliados com modelos lineares generalizados ($\alpha=5\%$) com distribuição de Poisson, para dados de contagem (Crawley 2013).

Os resultados das porcentagens das áreas relativas de cada amostra foram submetidas à análise de componentes principais (PCA). Utilizou-se o programa R para realizar as análises estatísticas (R Development Core Team 2014).

Resultados

Teste em olfatômetro

O ácaro predador *N. californicus* não apresentou preferência entre ar x ar, como esperado, o que demonstra que não houve tendência de escolha para uma das extremidades do olfatômetro (Figura 1A). Também não houve preferência do ácaro predador *N. californicus* entre plantas limpas x ar (Figura 1B). Entretanto, foi observada preferência do ácaro predador *N. californicus* por plantas infestadas por *T. urticae* em relação à plantas limpas (Figura 1C).

Teste em arena

Obsevou-se que os ácaros predadores caminharam significativamente em direção as plantas infestadas por ácaros fitófagos ($X^2 = 31,77$; gl = 6; $p > 0,001$) (Figura 2).

Parâmetros químicos

Após análise dos voláteis para determinação do dia de indução de defesa, observou-se diferenças quantitativas e qualitativas na emissão dos compostos 24 horas após a manipulação por *T. urticae* e determinou-se o período de infestação das plantas que foram utilizadas em olfatômetro e arena. Foram identificados 22 compostos, sendo 14 em plantas limpas e 13 em plantas infestadas com *T. urticae*. Em relação aos parâmetros químicos, a presença/ausência e o tempo de retenção dos compostos identificados durante as análises químicas das plantas de soja limpas e infestadas com ácaro-rajado foram apresentados (Tabela 1). A PCA dos parâmetros químicos referentes à composição dos voláteis em folhas de soja limpa e infestada com ácaro-rajado explicou 73,6 % da variação dos dados. As amostras das três plantas limpas e infestadas agruparam-se em posições distintas, indicando que houve diferença entre os compostos voláteis emitidos em ambas as situações (Figura 3). A representação vetorial dos compostos foi apresentada separadamente para melhor visualização (Figura 4).

Plantas limpas apresentaram nove compostos que não foram encontrados nas amostras de plantas infestadas: 2-hexenal; 2,4-Hexadien-1-ol; 3-Octanol; Felandral; 3-Hexen-1-ol; α -

Carofileno; B-Ciclocitral; Etanona e Ionona. Ao passo que plantas infestadas também produziram nove compostos exclusivos: 2-Hepten-1-ol, 2-hexen-1-ol, 2-Octenal, 3-Octanona, Ácido 2,4-dimetil 4-pentenoico metil éster, Benzeno Acetaldeído, Isoborneol, e Nerol.

Discussão

Plantas de soja com infestação por *T. urticae* emitem compostos voláteis que direcionam o forrageamento do ácaro predador *N. californicus*. O teste envolvendo a escolha entre ar x ar não apresentou preferência pelo ácaro predador, sugerindo que o olfatômetro não apresentou fatores externos que influenciassem na resposta dos indivíduos do ácaro predador. O mesmo foi observado para plantas limpas x ar. Ou seja, plantas de soja limpas são pouco atrativas ao ácaro predador *N. californicus*. Esses resultados descartam a possibilidade de interferências externas nos testes realizados.

Entretanto, ao avaliar plantas de soja limpa x plantas de soja infestadas por *T. urticae*, observou-se que os compostos provenientes da infestação das plantas de soja pelo ácaro-rajado foram atrativos ao ácaro predador *N. californicus*. Este resultado sugere que plantas de soja são capazes de acionar defesa induzida indireta (i.e. voláteis) após manipulação por *T. urticae*. Esse resultado foi semelhante ao encontrado por van den Boom et al. (2002) ao avaliarem a preferência do ácaro predador *Phytoseiulus persimilis* em plantas de soja e outras seis espécies vegetais diferentes infestadas por *T. urticae* x plantas sem infestação. Verificou-se que as espécies avaliadas emitiram compostos, após a injúria pelo herbívoro, que atraíram os ácaros predadores. Em outro estudo, com feijão, Boer and Posthumus (2004) relataram a preferência do ácaro predador *P. persimilis* aos voláteis de folhas de feijão infestadas com *T. urticae*. Gols et al. (2003) obtiveram resultados semelhantes, em que *P. persimilis* também preferiu os odores do feijão infestados por *T. urticae*.

Dicke et al. (1990) relataram aumento dos compostos voláteis após herbivoria. Os presentes resultados, contudo, mostram que apesar de não haver aumento na quantidade dos compostos, a diversidade proveniente a partir da emissão de compostos encontrados nas plantas infestadas foi atrativa ao ácaro predador. Foi comprovado que *T. urticae* é capaz de perceber e evitar voláteis de plantas infestadas por *P. persimilis*, porém não apresentam a mesma habilidade com plantas infestadas por *N. californicus* (Pallini et al. 1999). Uma possível razão para ocorrência deste fenômeno é que populações de *T. urticae* ainda não desenvolveram a habilidade de reconhecer *N. californicus* como predador (Pallini et al. 1999).

Esta informação sustenta a utilização de *N. californicus* como agente de controle biológico de ácaros em soja, inclusive de maneira preventiva (controle biológico natural). Pois, por não serem capazes de evitar os predadores, as infestações por *T. urticae* poderiam ser reduzidas, impedindo que colonizem plantas em áreas próximas, reduzindo o risco de infestações subsequentes.

Em arena verificou-se que *N. californicus* preferem plantas infestadas pelo ácaro-rajado (Figura 2). Oliveira et al. (2009), encontraram resultados semelhantes ao avaliarem o comportamento de *Phytoseiulus macropilis* em plantas de morango limpas e infestadas com *T. urticae*, sendo os predadores atraídos significativamente para plantas infestadas tanto em olfatômetro quanto em arena. Janssen (1999) também observou a preferência de *P. persimilis* aos voláteis de pepino infestados por *T. urticae* em casa-de-vegetação. Estes resultados sugerem que as três diferentes espécies de predadores conseguem localizar os odores de plantas infestadas com a presa em diferentes ambientes. Segundo Aartsma et al. (2017) a capacidade de detecção dos voláteis por si só é insuficiente para encontrar o herbívoro, é necessário a capacidade física para deslocar-se em direção à fonte de odor para eficiência de forrageamento. Neste contexto, *N. californicus* poderia ser aplicado sobre as folhas de soja infestadas por *T. urticae* para predação de adultos, formas jovens e ovos.

Sabe-se que, em testes de olfatiometria, predadores são mais atraídos para plantas infestadas do que para plantas sem infestação (Dicke and Sabelis 1988). Nosso resultado em arena comprova as chances de encontro entre predador e presa. Assim, é possível utilizar a tática de resistência de plantas de maneira conjunta com controle biológico com ácaros predadores para potencializar a eficiência do manejo integrado de ácaros. Estudos futuros, entretanto, devem ser desenvolvidos a fim de investigar a eficiência de *N. californicus* em campo para lavouras de soja.

No presente estudo foram identificados compostos que já haviam sido descritos na literatura ao avaliar a emissão de compostos voláteis em soja. Os compostos 2-hexenal; 3-Octanona; 3-Octanol e Benzeno Acetaldeído encontrados no tratamento soja limpa também foram encontrados em amostras de soja limpas em outros trabalhos (Boue et al. 2003; Liu et al. 1989; del Rosario et al. 1984; Damiani et al. 2000). Os compostos α -Carofileno; Linalol; Beta-Ocimeno e 2-hexen-1-ol encontrados no tratamento de soja infestada também foram descritos em outros trabalhos em amostras de folhas de soja infestadas por herbívoros (Rostás and Eggert 2008; De Boer et al. 2004; Zhu and Park 2005). O composto 3-Hexen-1-ol, encontrado no presente estudo somente em plantas limpas, foi encontrado em amostras de

plantas limpas e infestadas por outros herbívoros em outros trabalhos (Damiani et al. 2000; Liu et al. 1989; De Boer et al. 2004; Zhu and Park 2005; Rostás and Eggert 2008). Os compostos 2-Hepten-1-ol, 2,4-Hexadien-1-ol, 4-hexen-1-ol, Ácido 2,4-dimetil 4-pentenoico metil éster, Fellandral, 5-Octen-1-ol, Isoborneol, Nerol, B-Ciclocitral, Etanona, Ionona e Fenol 2,4,6-tris (1-metiletil) ainda não haviam sido relatados em plantas de soja.

Os compostos 2-hexen-1-ol, 4-hexen-1-ol, 5-Octen-1-ol, Ácido acético linalol éster e fenol 2,4,6-tris (1-metiletil) foram comuns em plantas limpas e infestadas por ácaros. Os compostos 2-Hepten-1-ol, 2-hexen-1-ol, 2-Octenal, 3-Octanona, Ácido 2,4-dimetil 4-pentenoico metil éster, Benzeno Acetaldeído, Isoborneol, e Nerol foram encontrados exclusivamente em plantas de soja infestadas com ácaros. Ramachandran e Norris (1991) ao estudarem a sensibilidade da antena do parasitoide *Microplitis demolitor* (Wilkinson) (Hymenoptera: Braconidae) a compostos fitoquímicos, observaram que houve maior resposta por compostos hidrocarbonetos de sete e oito carbonos, aldeídos e cetonas, o que corrobora os nossos resultados. Pois, com exceção dos compostos 2-hexen-1-ol, isobermeol e nerol, todos os compostos exclusivos de plantas de soja com infestação possuem sete ou oito carbonos. Isso sugere que estes compostos podem ter sido mais fortemente utilizados como pistas para atração de *N. californicus*.

Assim, estudos futuros podem ser desenvolvidos com plantas de soja para identificar qual/ quais composto(s) são, de fato, os responsáveis pela atração, além de esclarecer como estes afetam as interações tritróficas no aspecto da paisagem na qual os ecossistemas estão inseridos. Desta forma, associado aos resultados apresetados, poderia-se ter maior previsibilidade e chances de eficiência do controle biológico de ácaros praga na cultura da soja.

Referências

- Aartsma Y, Bianchi FJJA , Werf van der W et al (2017) Herbivore-induced plant volatiles and tritrophic interactions across spatial scales. *New Phytol* 216:1054–1063.
- Boer JGDE, Posthumus MA (2004) Identification of volatiles that are used in discrimination between plants infested with prey or nonprey herbivores by a predatory mite. *J Chem Ecol* 30:2215–2230.
- Boue SM, Shih BY, Carter-Wientjes CH, Cleveland TE (2003) Identification of volatile compounds in soybean at various developmental stages using solid phase microextraction. *J Agric Food Chem* 51:4873–4876.

- Crawley MJ (2013) *The R Book*, 2nd edn. JohnWiley & Sons, Chichester.
- Chen MS (2008) Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Sci* 15:101-114.
- Damiani P, Cossignani L, Castellini M, Bin F (2000) Clean recovery and HRGC-MS/HRGC FTIR identification of volatiles from soybean (*Glycine max*). *Ital J Food Sci* 2:175–182.
- del Rosario R, de Lumen BO, Habu T et al (1984) Comparison of *headspace* volatiles from winged beans and soybeans. *J Agric Food Chem* 32:1011–1015.
- Dicke M, Sabelis MW, Takabayashi J et al (1990) Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals: prospects for application in pest control. *J Chem Ecol* 16:3091–3118.
- Dicke M, Sabelis MW (1988) How plants obtain predatory mites as bodyguards. *Netherlands J Zool* 38:148–165.
- Dicke M, Van Loon JJA, Soler R (2009) Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. *Nat Chem Biol* 5:317–324.
- Gish M, Consuelo MM, Mescher MC (2015) Herbivore-induced plant volatiles in natural and agricultural ecosystems: open questions and future prospects. *Curr Opin Insect Sci* 9:1–6.
- Gols R, Roosjen M, Dijkman H, Dicke M (2003) 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. *J Chem Ecol* 29: 2651–2666.
- Guedes JVC, Navia D, Lofego AC, et al (2007) Ácaros associados à cultura da soja no Rio Grande do Sul. *Neotrop Entomol* 36:288–293.
- Heil M (2008) Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist* 178:41–61.
- Janssen A (1999) Plants with spider-mite prey attract more predatory mites than clean plants under greenhouse conditions. *Entomol Exp App* 90: 191–198.
- Leitner M, Boland W, Mithöfer (2005) A Direct and indirect defences induced by piercing sucking and chewing herbivores in *Medicago truncatula*. *New Phytol* 167:597–606.
- Merkle S, Kleeberg KK, Fritsche J (2015) Recent developments and applications of solid phase microextraction (SPME) in food and environmental analysis - A review. *Chromatogr* 2:293-381.
- Michereff MFF, Laumann RA, Borges M et al (2011) Volatiles Mediating a Plant-Herbivore Natural Enemy Interaction in Resistant and Susceptible Soybean Cultivars. *J Chem Ecol* 37:273–285.

- Moraes MCB, Laumann R, Sujii ER et al (2005) Induced volatiles in soybean and pigeon pea plants artificially infested with the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, and their effect on the egg parasitoid, *Telenomus podisi*. *Entomol Exp Appl* 115: 227–237.
- Oliveira H, Fadini MAM, Venzon M, et al (2009) Evaluation of the predatory mite *Phytoseiulus macropilis* (Acari: Phytoseiidae) as a biological control agent of the two-spotted spider mite on strawberry plants under greenhouse conditions. *Exp Appl Acarol* 47:275–283
- Pallini A, Janssen A, Sabelis MW (1999) Spider mites avoid plants with predators. *Exp Appl Acarol* 23: 803–815.
- R Core Team. A Language and Environment for Statistical Computing (2014) R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Available at: <http://www.r-project>.
- Ramachandran R, Norris DM (1991) Volatiles mediating plant-herbivore-natural enemy interactions: Electroantennogram responses of soybean looper, *Pseudoplusia includens*, and a parasitoid, *Microplitis demolitor*, to green leaf. *J Chem Ecol* 17:1665-1690.
- Rezende JM, Lofego AC, Nuvoloni FM et al (2014) Mites from Cerrado fragments and adjacent soybean crops: does the native vegetation help or harm the plantation? *Exp Appl Acarol* 64:501–518.
- Roggia S, Guedes JVC, Kuss RCR et al (2008) Spider mites associated to soybean in Rio Grande do Sul , Brazil *Pesq Agropec Brasi* 43:295–301.
- Rostás M, Eggert K (2008) Ontogenetic and spatio-temporal patterns of induced volatiles in *Glycine max* in the light of the optimal defence hypothesis. *Chemoecology* 18:29–38.
- Sabelis MW, Van de Baan HE (1983) Location of distant spider mite colonies by phytoseiid predators: demonstration of specific kairomones emitted by *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi*. *Entomol Exp Appl* 33:303–314.
- Shiojiri K, Takabayashi J, Yano S (2001) Infochemically mediated tritrophic interaction webs on cabbage plants. *Popul Ecol* 43:23–29.
- van den Boom CEM, van Beek TA, Dicke M (2002) Attraction of *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae) towards volatiles from various *Tetranychus urticae*-infested plant species. *Bull Entomol Res* 92:539–546.
- van Poecke RM, Dicke M (2004) Indirect defence of plants against herbivores: using *Arabidopsis thaliana* as a model plant. *Plant Biol* 6:387-401.
- War AR, Sharma H.C, Paulraj MG et al (2011) Herbivore induced plant volatiles: Their role in plant defense for pest management. *Plant Signal Behav* 6:1973-1978.

- Yoneya k, Takabayashi J (2014) Plant–plant communication mediated by airborne signals: ecological and plant physiological perspectives. *Plant Biotechnol J* 31:409–416.
- Zhu JW, Park KC (2005) Methyl salicylate, a soybean aphid-induced plant volatile attractive to the predator *Coccinella septempunctata*. *J Chem Ecol* 31:1733–1746.

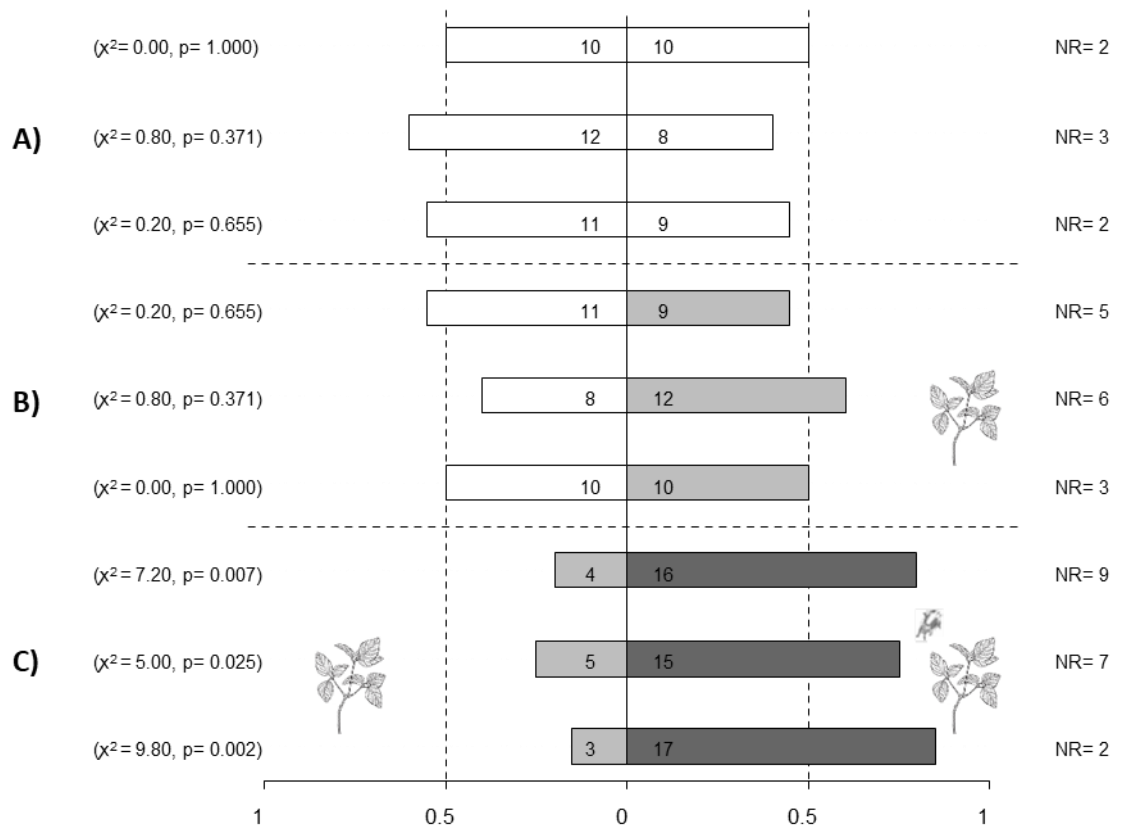


Figura 1 Resposta de ácaros predadores *N. californicus* em olfatômetro em Y. A) Ar x ar; B) Ar limpo x plantas de soja sem infestação C) Plantas de soja sem infestação x plantas de soja infestadas por *T. urticae*. Cada barra representa uma repetição do experimento após 20 respostas (teste qui-quadrado). O número de ácaros que não responderam (NR) após 5 minutos estão contabilizados fora das barras.

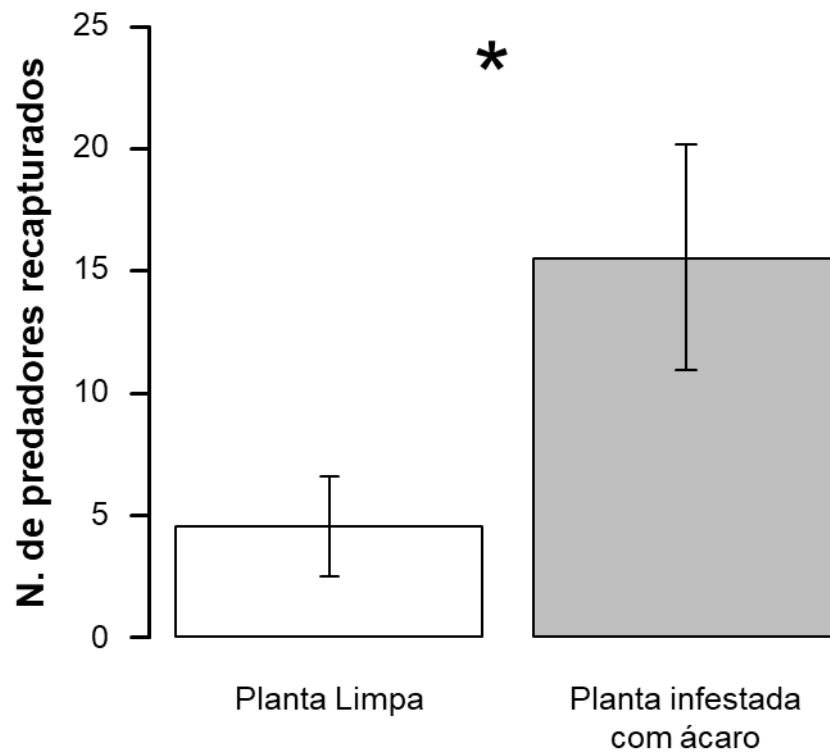


Figura 2 Número de ácaros predadores *Neoseiulus californicus* recapturados em plantas de soja limpas e infestadas com *T. urticae* após 24 horas em arena.

Tabela 1 Compostos orgânicos voláteis (COVs) identificados em plantas de soja (M6210IPRO) limpa e infestada com 100 indivíduos de *Tetranychus urticae* por planta.

| Nº | COVs | Soja limpa e com infestação de <i>T. urticae</i> (% relativa da área) | | | | |
|--------------------|---|---|-----------------------------|----------|------------|----------------|
| | | Classe | RT | Fórmula | Soja limpa | Soja com ácaro |
| 1 | 2-Hepten-1-ol | Álcool | 2,61 | C7H14O | | X |
| | 2-hexen-1-ol | Álcool | | | | |
| 2 | | | 5,19(limpa); 5,40(ácaro) | C6H12O | X | X |
| 3 | 2-hexenal | Aldeído | 5,22 | C6H10O | X | |
| 4 | 2-hexin-1-ol | Álcool | 5,92 | C6H10O | | X |
| 5 | 2,4-Hexadien-1-ol | Álcool | 5,50 | C6H10O | X | |
| 6 | 2-Octenal | Aldeído | 8,50 | C8H14O | | X |
| 7 | 4-hexen-1-ol | Álcool | 8,94 | C10H18O | X | X |
| 8 | 3-Octanona | Acetona | 9,02 | C8H16O | | X |
| 9 | 3-Octanol | Álcool | 9,25 | C8H18O | X | |
| | Ácido-4-pentenoico, 2,4-dimetil metil éster | Ester | | | | |
| 10 | | | 9,29 | C8H14O2 | | X |
| 11 | Fellandral | Aldeído | 10,88 | C10H16O | X | |
| 12 | Benzeno Acetaldeído | Aldeído | 10,63 | C8H8O | | X |
| | 5-Octen-1-ol | Álcool | | | | |
| 13 | | | 11,55limpa 11,73 ácaro | C8H16O | X | X |
| 14 | 3-Hexen-1-ol | Álcool | 11,78 | C6H12O | X | |
| | Ácido acético linalol éster | Ester | | | | |
| 15 | | | 12,26 | C12H20O2 | X | X |
| 16 | α -Carofileno | Hidrocarboneto | 12,39 | C6H12O | X | |
| 17 | Isoborneol | Álcool | 14,12 | C10H18O | | X |
| 18 | Nerol | Álcool | 14,40 | C10H18O | | X |
| 19 | B-Ciclocitral | Álcool | 16,07 | C10H16O | X | |
| 20 | Etanona | Ácetona | 17,15 | C10H16O | X | |
| 21 | Ionona | Acetona | 24,60 | C13H20O | X | |
| | Fenol 2,4,6-tris(1-metiletil) | Fenol | | | | |
| 22 | | | 25,20 | C15H24O | X | X |
| Total de compostos | | | | | 14 | 13 |

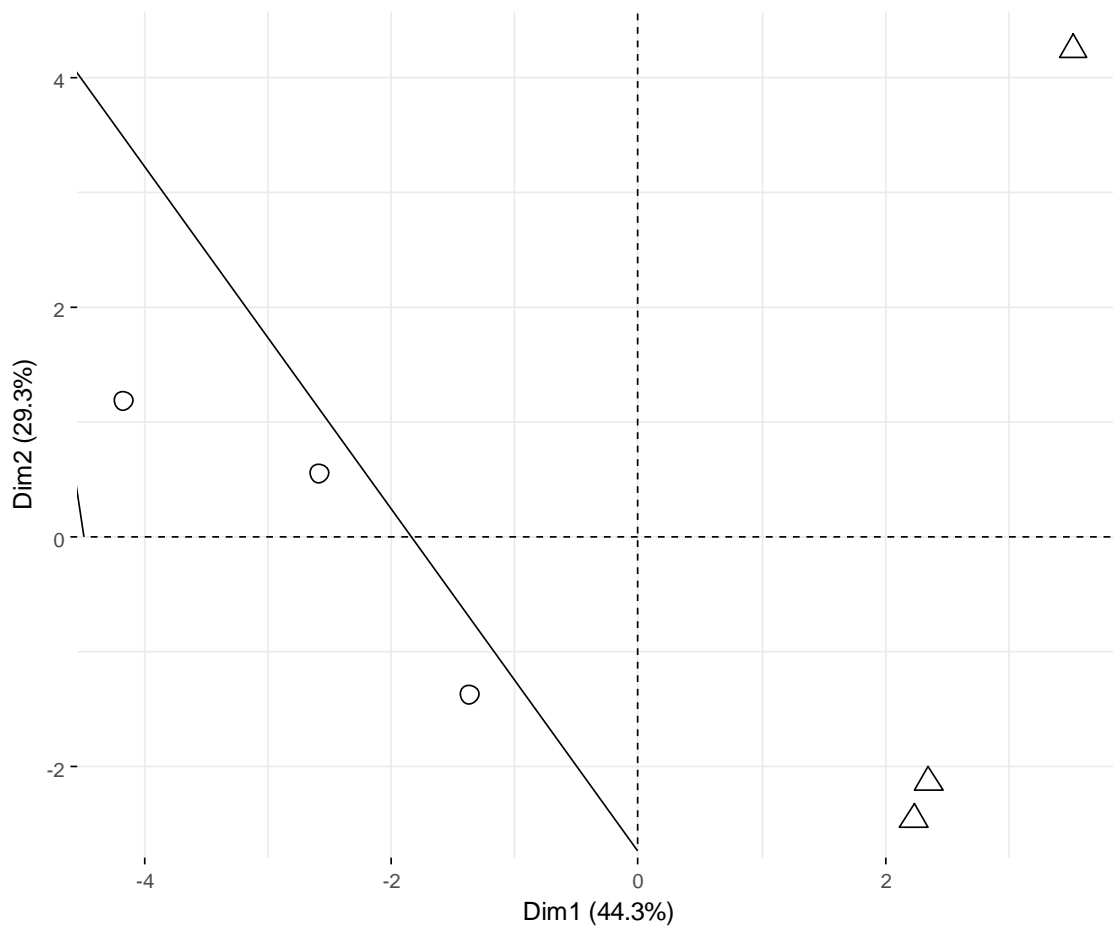


Figura 3 Análise de componentes principais (PCA) dos compostos voláteis presentes em plantas de soja sem infestação (○); e após infestação de 24 horas de manipulação por *T. urticae* (△) detectados via CG/MS.

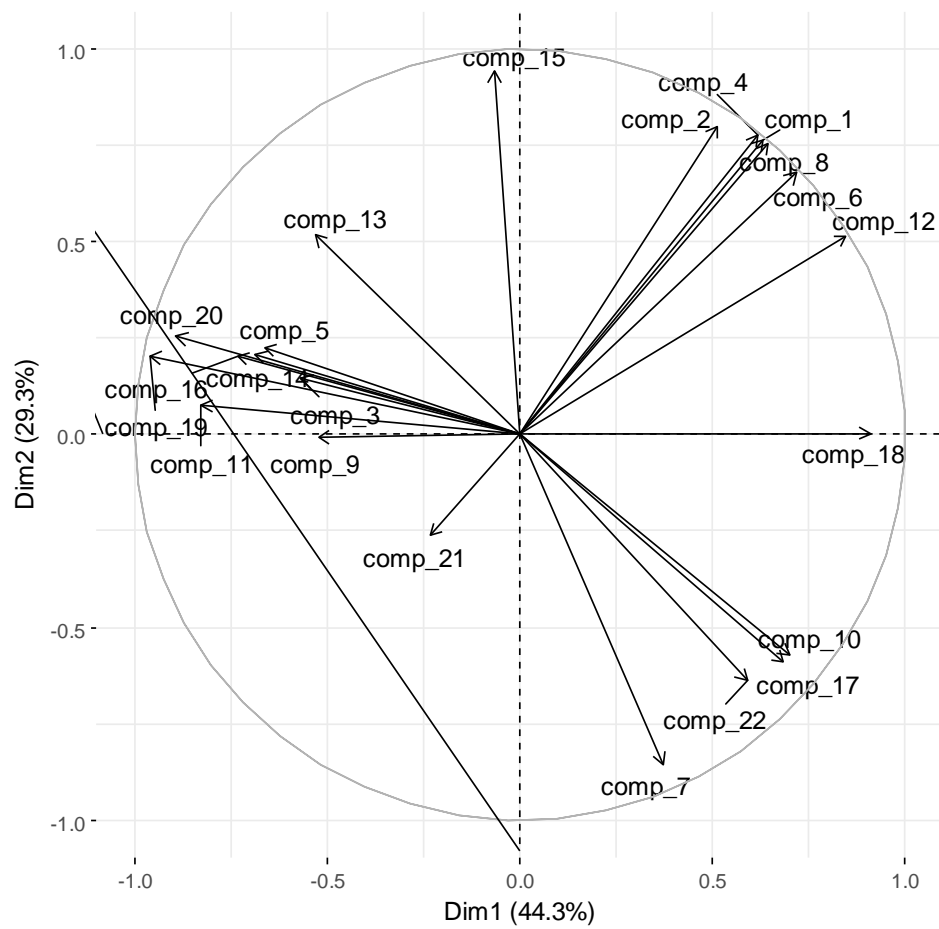


Figura 4 Análise de componentes principais (PCA) dos compostos voláteis presentes em plantas de soja sem infestação e após infestação de 24 horas de manipulação por *T. urticae* detectados via CG/MS. Para facilitar a identificação dos compostos, os números no gráfico referem-se aos compostos da tabela 1.

ARTIGO 2

O ácaro predador *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae) responde igualmente aos voláteis de soja sob herbivoria múltipla?

Artigo escrito conforme as normas do periódico Experimental and Applied Acarology

Resumo O aparelho bucal dos herbívoros possui elicitores que mediam o acionamento de rotas químicas de defesa indiretas que são utilizadas pelas plantas. Sob o ataque simultâneo ou sequencial de herbívoros, os voláteis emitidos por plantas podem variar quanto à complexidade química e consequentemente interferir no forrageamento de inimigos naturais. Assim, objetivou-se avaliar a preferência do ácaro predador *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae) aos voláteis de plantas de soja submetidas ao ataque múltiplo por *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) e *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera, Noctuidae). O experimento foi realizado com plantas de soja transgênica (Bt) M6210 IPRO, em olfatômetro em Y. Os tratamentos foram dispostos na sequência: soja limpa x soja infestada com *A. gemmatalis*; soja infestada com *T. urticae* x soja infestada com *A. gemmatalis* e soja infestada com *T. urticae* x soja infestada com *T. urticae* e *A. gemmatalis* na mesma planta. Nas infestações por *T. urticae* foram utilizados 100 indivíduos por planta durante um dia, e por lagartas, dois indivíduos durante dois dias. Os resultados foram submetidos ao teste qui-quadrado a 5% de significância. Realizou-se a análise química dos voláteis por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e análise de componentes principais (PCA) dos compostos. A infestação das plantas com *T. urticae* foi preferida em relação aos demais tratamentos investigados quanto à preferência de *N. californicus*. Quando plantas de soja foram submetidas a infestações de *T. urticae* e *A. gemmatalis* o ácaro predador *N. californicus* não alterava sua preferência por plantas de soja com infestadas unicamente com *T. urticae*. A PCA mostrou diferenças entre os grupos de compostos e explicou 43,5% da variação dos voláteis. Conclui-se que plantas de soja infestadas por *T. urticae* de maneira simples e múltipla acionam defesa induzida indireta através da produção de compostos voláteis, que são utilizados como pistas químicas pelo ácaro predador. Conclui-se que mesmo em infestações múltiplas de *A. gemmatalis*, o ácaro predador *N. californicus* pode ser utilizados como estratégia de controle biológico em programas de manejo integrado de ácaros praga em lavouras de soja.

Palavras-chave: Defesa induzida indireta, múltiplo ataque, controle biológico.

The predatory mite *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae) respond also by soybean volatiles infested by multiples herbivores?

Abstract The oral apparatus of herbivores have elicitors that measure the activation of chemical defense routes that are driven by plants. Under the simultaneous or sequential attack of herbivores, the volatiles emitted by plants may vary in chemical complexity and consequently interfere with the foraging of natural enemies. The aim of this study was to evaluate the preference of the predatory mite *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae) to soybean volatiles submitted to multiple attack by *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera, Noctuidae). The experiment was carried out with transgenic soybean M6210 IPRO, in a Y-olfactometer. The treatments were arranged in the following sequence: soybean clean soybean infested with *A. gemmatalis*; soybean infested with *T. urticae* x soybean infested with *A. gemmatalis* and soybean infested with *T. urticae* x soybean infested with *T. urticae* and *A. gemmatalis* on the same plant. In *T. urticae* infestations, 100 individuals per plant were used for one day, and for caterpillars, two individuals were used for two days. The results were submitted to chi-square test at 5% significance. The volatile chemical analysis was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry and principal component analysis (PCA) of the compounds. Infestation of plants with *T. urticae* was preferred over the other treatments investigated for *N. californicus* preference. When soybean plants were submitted to infestations of *T. urticae* and *A. gemmatalis*, the predator mite *N. californicus* its preference for soybean plants infested with *T. urticae* alone. The PCA showed differences between the groups of compounds and explained 43.5% of the variation of the volatiles. It is concluded that soybean plants infested by *T. urticae* in a simple and multiple way trigger indirect induced defense through the production of volatile compounds, which are used as chemical clues by the predatory mite. It is concluded that even in multiple infestations, predatory mites can be used as a strategy for biological control in programs of integrated pest mite management in soybean crops.

Keywords: Indirect induced defense; multiple attack, biological control.

Introdução

Os compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos na defesa induzida indireta são utilizados pelos inimigos naturais para localizar plantas infestadas por presas ou hospedeiros (van Poecke and Dicke 2004; Leitner et al. 2005; Aartsma et al. 2017). Esses compostos, por sua vez, variam de acordo com a presença de substâncias elicitoras que dependem do tipo de aparelho bucal dos herbívoros (Heil 2014). As plantas possuem receptores que reconhecem estes elicitores e ao se conectarem promovem alterações no potencial da membrana, e ativação das proteínas quinases que mediam etapas de sinalizações (Maffei et al. 2007).

Combinações de múltiplos herbívoros podem induzir a emissão de diferentes compostos voláteis (Dicke et al. 2009). Herbívoros mastigadores comumente podem induzir vias de sinalização mediadas por ácido jasmônico (AJ). Ao passo que insetos sugadores tendem a acionar a rota do ácido salicílico (AS) (Leitner et al. 2005; Yoneya and Takabayashi 2014; Aartsma et al. 2017). Quando uma planta é atacada por múltiplos herbívoros pode ocorrer o chamando “crosstalk” entre as rotas químicas de defesas induzidas, para permitir que ela consiga ajustar uma resposta defensiva adequada a um atacante específico, direcionando a atração de predadores ou parasitóides (Pieterse et al. 2012; Heil 2014).

Pode-se considerar que ocorre incremento do controle biológico quando um predador que é atraído por uma planta infestada pelo primeiro herbívoro também ataca outros artrópodes que a manipulem simultaneamente ou subsequentemente (Pieterse et al. 2012). A complexidade da escala espacial em que o agroecossistema está inserido torna-se importante quando a presença dos predadores favorecem mudanças comportamentais nos herbívoros, fazendo com que eles movam-se para outros tecidos das plantas ou colonizem áreas próximas (Utsumi et al. 2010; Aartsma et al. 2017).

Com a herbivoria múltipla torna-se mais complicado prever a resposta em relação ao forrageamento de inimigos naturais (Dicke et al. 2009). Principalmente quando artrópodes manipulam a planta ao mesmo tempo (Zhang et al. 2009) podendo alterar a produção dos voláteis provenientes da infestação (Dicke et al. 2009). Assim, as interações entre herbívoros associados a uma cultura são influenciadas por vários fatores em que as plantas acionam respostas conforme o tipo e a sequência de artrópodes que as atacam (de Rijk et al. 2013). Esses herbívoros secundários poderão induzir outras vias de sinalização e, conseqüentemente, proporcionarem atração de outros inimigos naturais, formando um constante ciclo de interações tróficas (Stam et al. 2014).

A cultura da soja é alvo de ataque de múltiplos herbívoros, como várias espécies de lagartas (Moscardi et al. 2012) e por ácaros praga (Guedes et al. 2007; Roggia et al. 2008; Rezende et al. 2014). Pesquisas sobre interações inseto-planta em soja, abordam os efeitos das interações entre a planta e uma espécie de inseto, a fim de esclarecer como os voláteis direcionam os herbívoros para plantas com a presa (Moraes et al. 2005; Michereff et al. 2011; Cai et al. 2015), bem como a herbivoria modifica a emissão destes compostos conforme a fase de desenvolvimento da planta (Rostás and Eggert 2008). Contudo, são escassos os estudos em relação a resposta após serem submetidas à infestação múltipla, particularmente se estes pertencem a diferentes guildas de alimentação (Zhang et al. 2009). Moraes et al. (2005) avaliaram a atração de *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Scelionidae) aos voláteis de plantas de soja com infestação de *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) e *Anticarsia gemmatalis*, verificaram diferenças específicas nos compostos voláteis provenientes da saliva de *E. heros* que orientaram a preferência das plantas relacionados ao seu hospedeiro ao passo que não responderam ao tratamento com a *A. gemmatalis*.

Entender o mecanismo envolvido por ataque múltiplo de herbívoros é fundamental para seleção de cultivares que são resilientes às adversidades ambientais caracterizadas pela diversidade de espécies de herbívoros atacantes (Giron et al. 2018). Além de esclarecer o efeito das defesas induzidas nas interações tritróficas em paisagens nas quais os agroecossistema estão inseridos (Dicke et al. 2009; Ponzio et al. 2016; Aartsma et al. 2017). Neste contexto, este trabalho investigou se plantas de soja sob herbivoria múltipla de *Tetranychus urticae* e *Anticarsia gemmatalis* são capazes de acionarem defesa induzida indireta através da emissão de compostos voláteis atrativos ao ácaro predador *Neoseiulus californicus*.

Material e Métodos

As plantas de soja foram mantidas em casa-de-vegetação (25 °C ± 5) e as análises de olfatométrica foram conduzidas no Laboratório de Entomologia Agrícola e Florestal, Campus Sete Lagoas da Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ), Sete lagoas, Minas Gerais, Brasil. As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Criações de T. urticae, A. gemmatalis e obtenção de N. californicus

Para o estabelecimento das criações de *T. urticae*, realizou-se a semeadura de plantas de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) em vasos plásticos (6,3 L), com substrato Terral Solo®, mantidas em gaiolas com tela anti-afídeos dentro da casa-de-vegetação, com temperatura de 25 °C ± 5. Estes ácaros foram coletados previamente em folhas de sorgo (*Sorghum bicolor*) na casa-de-vegetação na Embrapa Milho e Sorgo. Após a coleta, os espécimes foram visualizados por meio de microscópio estereoscópico e transferidos individualmente para face abaxial das plantas. Elas foram irrigadas e substituídas sempre que apresentavam aspecto que justificasse a necessidade de manejo. Foram utilizadas as folhas de feijão-de-porco sem tratamento fitossanitário, para manter criações de *T. urticae* em câmara climatizada, tipo BOD, à temperatura de 25°C, umidade relativa de 70% ± 10% e fotofase de 12 horas. As folhas foram mantidas sobre espuma embebida em água dentro de caixas plásticas de 20 x 30 centímetros de comprimento com a face abaxial voltada para cima e revestida com algodão umedecido para impedir os ácaros de saírem da folha.

As lagartas *A. gemmatilis* foram criadas pela equipe do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo, alimentando-se de dieta artificial e solução açucarada na fase adulta. As mariposas adultas foram colocadas em gaiolas confeccionadas com tubos de PVC (30 cm de diâmetro e 20 cm de altura) para a multiplicação e oviposição. Guardanapos contendo os ovos foram retirados e armazenados em sacos plásticos em temperatura controlada (25 ± 2 °C). Após eclosão as larvas foram individualizadas em copos plásticos de 50 mL até empupar (Vilela et al. 2014).

Os ácaros predadores *N. californicus* foram adquiridos da empresa Koppert pela compra do produto comercial SPICAL®.

Semeadura e manutenção das plantas de soja

Utilizou-se vasos plásticos (1 L) com substrato Terral Solo® para semear com plantas de soja M6210IPRO, que expressam a proteína Cry1AC (Bt). As plantas foram acondicionadas em gaiolas com tela anti-afídeos em casa-de-vegetação. A irrigação e demais tratamentos culturais foram realizados sempre que necessário. As plantas de soja foram utilizadas para os experimentos ao atingirem o estágio de desenvolvimento V3.

Análise de preferência do predador em olfatômetro

Infestações foram realizadas nas plantas de soja com 100 ácaros fêmeas adultas por planta durante 24 horas e com duas lagartas de *A. gemmatalis* de quarto ínstar durante 36 horas antes da realização do experimento. As plantas foram levadas ao olfatômetro em forma de Y (Sabelis and van de Baan 1983), cujas medidas são de 21,0 cm de comprimento de cada lado e 3,5 cm de diâmetro. Os tratamentos foram soja limpa x soja infestada com *A. gemmatalis*; soja infestada com *T. urticae* x soja infestada com *A. gemmatalis* e soja infestada com *T. urticae* x soja infestada com *T. urticae* e *A. gemmatalis*. Foram realizadas três repetições, representadas por 20 respostas dos predadores.

Os ácaros predadores foram liberados individualmente na extremidade ímpar (área de liberação) sobre arame de cobre, para facilitar o deslocamento dos indivíduos. Utilizou-se um fluxômetro com velocidade de 0,50 m/s para regular o direcionamento do fluxo dos recipientes para a área de liberação. Após liberação dos indivíduos, observou-se o comportamento durante 5 minutos, e considerou-se a resposta após atingir 1/3 de uma das extremidades. Os ácaros predadores que não responderam após 5 minutos não foram contabilizados na análise estatística segundo a metodologia de Janssen (1999). Indivíduos que saíram do arame ou foram perdidos de vista durante a realização do teste foram removidos e o teste foi retomado após lavagem do aparelho com água corrente e secagem. A cada cinco respostas, as posições das fontes de odor foram invertidas para evitar tendências.

Análise química dos voláteis

A análise química foi realizada no cromatógrafo a gás Trace GC Ultra (ThermoScientific, San Jose, CA) acoplado a espectrômetro de massas Polaris Q (ThermoScientific, San Jose, CA), sistema GC-MS, com um analisador do tipo ion-trap em microextração em fase sólida (SPME) no modo *headspace* (Merkle et al. 2015). As amostras coletadas das plantas de soja que foram utilizadas no olfatômetro foram identificadas e lacradas em frascos de *headspace* (25 mL). Utilizou-se a fibra semipolar Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno (PDMS/DVB) para exposição nos frascos a 60 °C por 20 minutos.

As condições cromatográficas para coleta dos voláteis da soja foram: temperatura do injetor, 200 °C; injeção em modo splitless; splitless time, 5 minutos; temperatura da fonte de

íons, 200 °C; temperatura da interface, 275 °C. A temperatura de aquecimento do equipamento foi de (40 °C por 1 minuto, gradiente de 5 °C/min até 110 °C, manutenção da isoterma por 3 minutos e depois 7 °C/min até 220 °C, temperatura na qual manteve-se a isoterma por 1 minutos, e por fim um gradiente de 12 °C/min até 245 °C, temperatura na qual manteve-se a isoterma por 1 minuto). O detector foi mantido no modo de varredura (*fullscan*, de 30 a 300), utilizando a técnica de ionização por impacto de elétrons (EI), com energia de 70 eV. A coluna cromatográfica utilizada foi a coluna capilar HP-5 MS (5 % fenil e 95 % metilpolisiloxano), contendo as seguintes dimensões: 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme (Agilent Technologies INC, Alemanha).

Os compostos foram identificados através de comparações entre os espectros de massas presentes nas bibliotecas NIST/EPA/NIH (2005) com base nos valores de tempo de retenção obtidos do programa Xcalibur 1.4 da ThermoElectron Corporation.

Análises estatísticas

No teste de olfatomia, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com três experimentos e três repetições. Em cada repetição avaliou-se a resposta de 20 ácaros predadores em relação às fontes de odores analisadas. Estes resultados foram submetidos a testes de qui-quadrado ($\alpha=5\%$) para dados categóricos (Crawley 2013).

Os resultados das porcentagens das áreas relativas de cada amostra foram submetidas à análise de componentes principais (PCA). Utilizou-se o programa R para realizar as análises estatísticas (R Development Core Team 2014).

Resultados

Teste em olfatômetro

O ácaro predador *N. californicus* não apresentou preferência entre planta de soja limpa x planta de soja infestada com *A. gemmatilis* (Figura 1 A), não havendo diferença estatística entre o número de escolhas. *Neoseiulus californicus* preferiu plantas de soja infestadas com *T. urticae* em relação às plantas infestadas com *A. gemmatilis* (Figura 1 B). Tal preferência de *N. californicus*, observada anteriormente, não foi alterada quando plantas de soja infestadas

com *T. urticae* x plantas com infestações múltiplas de *T. urticae* e *A. gemmatalis* foram avaliadas (Figura 1 C).

Parâmetros químicos

Foram identificados 29 compostos, sendo 14 em plantas limpas, 13 em plantas infestadas com *T. urticae*, 16 em plantas infestadas com *A. gemmatalis* e 9 em plantas com infestações múltiplas (*T. urticae* e *A. gemmatalis*), pertencentes ao grupos químicos: álcool, aldeído, éster, cetona, monoterpene e sesquiterpene. Quanto aos parâmetros químicos dos grupos funcionais, presença/ausência e o tempo de retenção dos compostos identificados foram apresentados (Tabela 1). A PCA dos parâmetros químicos referentes à composição dos voláteis em folhas de soja limpa e com as respectivas infestações explicou 67,7 % da variação dos dados. As amostras das três plantas infestadas com *A. gemmatalis* e por herbivoria múltipla de *T. urticae* e *A. gemmatalis* agruparam-se em posições distintas, indicando que houve diferença entre os compostos voláteis emitidos em ambas as situações (Figura 2). O gráfico com a representação vetorial dos compostos (Figura 3) foi apresentado separadamente para melhor visualização do leitor.

Plantas com a presença de *A. gemmatalis* emitiram quatro compostos exclusivos: 2,4-Decadien-1-ol, 1,3,7-Octatriene, 2,7- dimetil, 3,5-Octadiene e Pulegona. As plantas com infestações múltiplas de *T. urticae* e *A. gemmatalis* emitiram os compostos Cis-o-mentha-2,8-dien-1-ol e Beta Ionona que não haviam sido emitidos com a presença dos herbívoros separadamente.

Discussão

A presença da lagarta *A. gemmatalis* não interfere no forrageamento do ácaro predador em plantas de soja com infestação múltipla por ácaros e lagartas. No teste entre planta limpa x planta com *A. gemmatalis* não houve preferência do predador *N. californicus*, o que sugere que plantas infestadas por lagartas não atraem ácaros predadores. Entretanto, no teste entre planta infestada com *A. gemmatalis* x planta infestada por *T. urticae*, *N. californicus* preferiu os voláteis das plantas infestadas pelo ácaro *T. urticae*. Este resultado sugere que plantas de soja são capazes de acionar defesa induzida indireta a este herbívoro e o predador, por sua vez, é capaz de identificar voláteis produzidos por suas presas. Resultado semelhante foi

observado por De Boer et al. (2004) ao avaliarem a atração do ácaro predador *Phytoseiulus persimilis* aos voláteis de plantas de feijão com herbivoria de *T. urticae* ou pela lagarta *Spodoptera exigua*, sendo que também houve atração por plantas infestadas com *T. urticae*. Estes resultados indicam ainda que os ácaros predadores conseguem diferir entre os odores de plantas infestadas por sua presa. Shimoda and Dicke (1999) ao avaliarem a resposta de *P. persimilis* aos voláteis de feijão em baixa densidade de *S. exigua* (2 lagartas por planta) e alta densidade (100 lagartas por planta) observaram preferência ao primeiro e repelência do predador ao último grupo. Entretanto, ao não remover as fezes das lagartas, os predadores não preferiram este tratamento. Neste trabalho os autores evidenciaram que os voláteis de fezes da lagarta mediam a não preferência. Tal observação é pertinente, pois as fezes das lagartas permaneceram sobre as folhas de soja durante a condução experimental, o que pode justificar a não preferência de *N. californicus*.

Quanto à escolha entre soja com *T. urticae* x *T. urticae* e *A. gemmatilis* na mesma planta, o ácaro *N. californicus* não aterou sua preferência por plantas infestadas por sua presa mesmo na presença da lagarta. Isto sugere que, apesar da presença de *A. gemmatilis* em plantas de soja promover alteração do perfil químico dos voláteis, não há diferença quanto à preferência do predador. Resultados opostos foram relatados por De Boer et al. (2008) ao compararem as emissões voláteis em plantas de feijão e pepino com herbivoria simples de *T. urticae* e múltiplas por *T. urticae* e *S. exigua* e observaram que para o feijão, o ataque múltiplo atuou sinergicamente devido o efeito aditivo evidenciado no aumento na emissão de compostos, ao passo que para o pepino, parece haver efeito antagônico devido a supressão da emissão de compostos. Porém, a atração de *P. persimilis* em olfatômetro foi significativa em direção aos odores provenientes da infestação por múltiplos herbívoros nas duas espécies de plantas em estudo. Assim, diferente de *P. persimilis*, *N. californicus* não prefere uma das fontes de odores especificamente, uma vez que em ambas as opções existe a presença da presa. Os parâmetros químicos encontrados assemelham-se aos observados no pepino, pois a herbivoria múltipla também reduziu a quantidade de compostos encontrados na soja.

Outros inimigos naturais, como formigas predadoras, preferem voláteis de pepino com múltiplo ataque de *Aphis gossypii* Glöver, 1877 (Hemiptera: Aphididae) e *Mamestra brassicae* (Linnaeus, 1758) x plantas infestadas apenas por *Aphis gossypii* (Schettino et al. 2017). Moayeri et al. (2007) observaram preferência do predador *Macrolophus caliginosus* (Heteroptera: Miridae) a voláteis de pimenta infestada por *T. urticae* e *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) em comparação aos voláteis das plantas infestadas pelos

herbívoros em infestação simples. Nessas situações, a herbivoria múltipla é justificada pela disponibilidade de uma dieta mista, uma vez que os inimigos naturais estudados são generalistas. No presente trabalho não houve preferência uma vez que *N. californicus* não demonstrou resposta significativa na escolha entre os voláteis da presa ou por ataque múltiplo. Este resultado sugere que ao ser confrontado com voláteis de plantas com infestações múltiplas em campo, *N. californicus* pode ser utilizado como estratégia de controle biológico em ambas as situações, uma vez que sua preferência não é comprometida com a presença da lagarta, e conseqüentemente não reduz sua taxa de encontro com a sua presa.

Segundo De Boer et al. (2008), a alimentação de um herbívoro não-presa pode suprimir a indução de compostos voláteis usados por predadores. Esta informação suporta o que foi encontrado nos parâmetros comportamentais e químicos, pois plantas de soja infestadas por *T. urticae* e *A. gemmatalis* emitiram oito compostos, ao passo que a manipulação pelos herbívoros em infestação simples emitiram treze e dezesseis respectivamente. Assim, a redução no número de compostos pode ter sido uma das causas pelas quais não observou-se preferência de *N. californicus* a plantas infestadas com lagartas. Dessa forma, é possível utilizar a tática de resistência de plantas de maneira conjunta com controle biológico com ácaros predadores para potencializar a eficiência do manejo integrado de ácaros. Estudos futuros podem ser desenvolvidos a fim de investigar a eficiência de aplicação de *N. californicus* em campo para lavouras de soja em ataque múltiplo.

Os compostos 2-hexen-1-ol (2), 2-hexenal (3), 3-Octanona (9), 3-Octanol (10), 3-Hexen-1-ol (16), Linalol (18), Benzeno Acetaldeído (14), Beta-Ocimeno (25) e α -Carofileno (19) encontrados no presente estudo, também foram identificados em plantas de soja em vários trabalhos ao avaliar a emissão de compostos voláteis (del Rosario et al. 1984; Liu et al. 1989; Damiani et al. 2000; Boue et al. 2003; De Boer et al. 2004; Moraes et al. 2005; Zhu and Park 2005; Rostás and Eggert 2008; Michereff et al. 2011; Cai et al. 2015). Os outros vinte compostos não haviam sido relatados em plantas de soja. Os compostos voláteis emitidos por plantas da mesma espécie infestadas por herbívoros de espécies diferentes podem ser semelhantes, mas diferem em relação à proporção relativa da área (De Boer et al. 2004). Os resultados encontrados corroboram os encontrados na análise comportamental de *N. californicus*, uma vez que os compostos voláteis provenientes da infestação por *T. urticae* e *A. gemmatalis* na mesma planta assemelham-se de tal forma que favoreceu a formação de apenas um grupo de compostos, ao passo que plantas infestadas por *A. gemmatalis* apresentam diferenças qualitativas e quantitativas mais acentuadas, agrupando-os em posições distintas.

Segundo De Boer et al. (2004) os inimigos naturais utilizam voláteis induzidos por herbívoros não presas para evitar plantas com herbívoros inadequados. Aqueles autores observaram altas emissões do composto beta-ocimeno após herbivoria de *S. exigua* em plantas de feijão-de-lima e, conseqüentemente, não preferência do predador *P. persimilis*. Esse composto também foi encontrado em plantas de soja limpa em outros trabalhos (Zhu and Park 2005; Róstas and Eggert 2008). Assim, beta-ocimeno pode ter sido utilizado por *N. californicus* para evitar plantas sem infestação e com presença de *A. gemmatalis*, uma vez que foi emitido em plantas limpas e com lagartas, mas não em amostras com infestação da presa. Róstas e Eggert (2008) ao avaliarem a emissão de voláteis em plantas de soja após herbivoria por *Spodoptera frugiperda* detectaram diferenças qualitativas e quantitativas dos compostos em relação ao tempo, fase de crescimento, órgão da planta e idade da folha, e que o estágio vegetativo emite maiores quantidades de compostos do que no estágio reprodutivo. Assim é possível afirmar que observou-se grande parte da quantidade total dos voláteis que foram emitidos pelas plantas de soja, pois as amostras que foram utilizadas para análise química, foram retiradas no estágio vegetativo V3.

Conclui-se que, apesar da herbivoria múltipla alterar o perfil químico dos voláteis emitidos em plantas de soja, não há diferença entre o comportamento do predador. Ou seja, a presença da lagarta *A. gemmatalis* não interfere no encontro do ácaro predador com sua presa. Assim, mesmo em infestações múltiplas, *N. californicus* pode ser utilizado como inimigo natural de ácaros praga em programas de controle biológico na cultura da soja.

Referências

- Aartsma Y, Bianchi FJJA , Werf van der W et al (2017) Herbivore-induced plant volatiles and tritrophic interactions across spatial scales. *New Phytol* 216:1054–1063.
- Boue SM, Shih BY, Carter-Wientjes CH, Cleveland TE (2003) Identification of volatile compounds in soybean at various developmental stages using solid phase microextraction. *J Agric Food Chem* 51:4873–4876.
- Cai L, Koziel JA, O’Neal ME (2015) Studying plant–insect interactions with solid phase microextraction: Screening for airborne volatile emissions response of soybeans to the soybean aphid, *Aphis glycines* Matsumura (Hemiptera: Aphididae). *Chromatogr* 2:265-276.
- Crawley MJ (2013) *The R Book*, 2nd edn. JohnWiley & Sons, Chichester.
- Damiani P, Cossignani L, Castellini M, Bin F (2000) Clean recovery and HRGC-MS/HRGC

- FTIR identification of volatiles from soybean (*Glycine max*). Ital J Food Sci 2:175–182.
- de Boer JC, Hordijk CA, Posthumus MA et al (2008) Prey and non-prey arthropods sharing a host plant: Effects on induced volatile emission and predator attraction. J Chem Ecol 34:281–290.
- de Boer JG, Posthumus MA (2004) Identification of volatiles that are used in discrimination between plants infested with prey or nonprey herbivores by a predatory mite. J Chem Ecol 30:2215–2230.
- del Rosario R, de Lumen BO, Habu T, et al (1984) Comparison of *headspace* volatiles from winged beans and soybeans. J Agric Food Chem 32:1011–1015.
- de Rijk M, Dicke M, Poelman EH (2013) Foraging behaviour by parasitoids in multiherbivore communities. Anim Behav 85:1517-1528.
- Dicke M, Van Loon JJA, Soler R (2009) Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. Nat Chem Biol 5:317–324.
- Giron D, Dubreuil G, Bennett A, et al (2018) Promises and challenges in insect–plant interactions. Entomol Exp Appl 1–25.
- Guedes JVC, Navia D, Lofego AC, et al (2007) Ácaros associados à cultura da soja no Rio Grande do Sul. Neotrop Entomol 36:288–293.
- Heil M (2014) Herbivore-induced plant volatiles: targets, perception and unanswered questions. New Phytol 204:297–306.
- Janssen A (1999) Plants with spider-mite prey attract more predatory mites than clean plants under greenhouse conditions. Entomol Exp Appl 90:191–198.
- Leitner M, Boland W, Mithöfer (2005) A direct and indirect defences induced by piercing-sucking and chewing herbivores in *Medicago truncatula*. New Phytol 167:597–606.
- Liu SH, Norris DM, Lyne P (1989) Volatiles from the foliage of soybean, *Glycine max*, and Lima Bean, *Phaseolus lunatus*: Their behavioral effects on the insects *Trichoplusia ni* and *Epilachna varivestis*. J Agric Food Chem 37:496-501.
- Maffei ME, Mithöfer A, Boland W (2007) Before gene expression: early events in plant-insect interaction. Trends Plant Sci 7:310-316.
- Merkle S, Kleeberg KK, Fritsche J (2015) Recent developments and applications of solid phase microextraction (SPME) in food and environmental analysis - A review. Chromatogr 2:293-381.
- Michereff MFF, Laumann RA, Borges M et al (2011) Volatiles mediating a plant herbivore natural enemy interaction in resistant and susceptible soybean cultivars. J Chem Ecol

37:273-385.

- Moayeri HRS, Ashouri A , Poll L, Enkegaard A (2007) Olfactory response of a predatory mirid to herbivore induced plant volatiles: multiple herbivory vs. single herbivory. *J. Appl. Entomol* 131:326–332.
- Moraes MCB, Laumann R, Sujii ER, et al (2005) Induced volatiles in soybean and pigeon pea plants artificially infested with the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, and their effect on the egg parasitoid, *Telenomus podisi*. *Entomol Exp Appl* 115:227–237.
- Moscardi F, Bueno AF, Sosa-gómez DR et al (2012) Artrópodes que atacam as folhas da soja. Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga 1th edn. Embrapa Soja pp 213-334.
- Pieterse CMJ, Van der Does D, Zamioudis C, et al (2012) Hormonal modulation of plant immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28:489–521.
- Ponzio C, Cascone P, Cusumano A, et al (2016) Volatile-mediated foraging behaviour of three parasitoid species under conditions of dual insect herbivore attack. *Anim Behav* 111:197–206.
- R Core Team. A Language and Environment for Statistical Computing (2014) R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Available at: <http://www.r-project>.
- Rezende JM, Lofego AC, Nuvoloni FM, et al (2014) Mites from Cerrado fragments and adjacent soybean crops: does the native vegetation help or harm the plantation? *Exp Appl Acarol* 64: 501–518.
- Roggia S, Guedes JVC, Kuss RCR, et al (2008) Spider mites associated to soybean in Rio Grande do Sul , Brazil *Pesq Agropec Bras* 43:295–301.
- Rostás M, Eggert K (2008) Ontogenetic and spatio-temporal patterns of induced volatiles in *Glycine max* in the light of the optimal defence hypothesis. *Chemoecol* 18:29–38.
- Sabelis MW, van de Baan HE (1983) Location of distant spider mite colonies by phytoseiid predators: demonstration of specific kairomones emitted by *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi*. *Entomol Exp Appl* 33:303–314.
- Schettino M, Grasso DA, Weldegergis BT, et al (2017) Response of a predatory ant to volatiles emitted by aphid and caterpillar-infested cucumber and potato plants. *J chem ecol* 10:1007-1022.
- Shimoda T, Dicke M (1999) Volatile stimuli related to feeding activity of nonprey caterpillars, *Spodoptera exigua*, affect olfactory response of the predatory mite *Phytoseiulus persimilis*. *J Chem Ecol* 25:1585-1595.

- Shiojiri K, Takabayashi J, Yano S, Takafuji A (2000) Flight response of parasitoids toward plant-herbivore complexes: A comparative study of two parasitoid-herbivore systems on cabbage plants. *Appl Entomol Zool* 1:87-92.
- Stam JM, Kroes A, Li Y, et al (2014) Plant interactions with multiple insect herbivores: From community to genes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 65:689–713.
- Utsumi S, Ando Y, Miki T (2010) Linkages among trait-mediated indirect effects: a new framework for the indirect interaction web. *Popul Ecol* 52:485–97.
- van Poecke RM, Dicke M (2004) Indirect defence of plants against herbivores: using *Arabidopsis thaliana* as a model plant. *Plant Biol* 6:387-401.
- Vilela M, Mendes S.M, Valicente F.H et al (2014) Metodologia para criação e manutenção de *Helicoverpa armigera* em laboratório. Circular técnica, ISSN 1679-1150.
- Yoneya k, Takabayashi J (2014) Plant communication mediated by airborne signals: ecological and plant physiological perspectives. *Plant Biotechnol J* 31:409–416.
- Zhang PJ, Zhenga S, van Loon JJA, et al (2009) Whiteflies interfere with indirect plant defense against spider mites in Lima bean. *PNAS* 106:21202–21207.
- Zhu JW, Park KC (2005) Methyl salicylate, a soybean aphid-induced plant volatile attractive to the predator *Coccinella septempunctata*. *J Chem Ecol* 31:1733–1746.

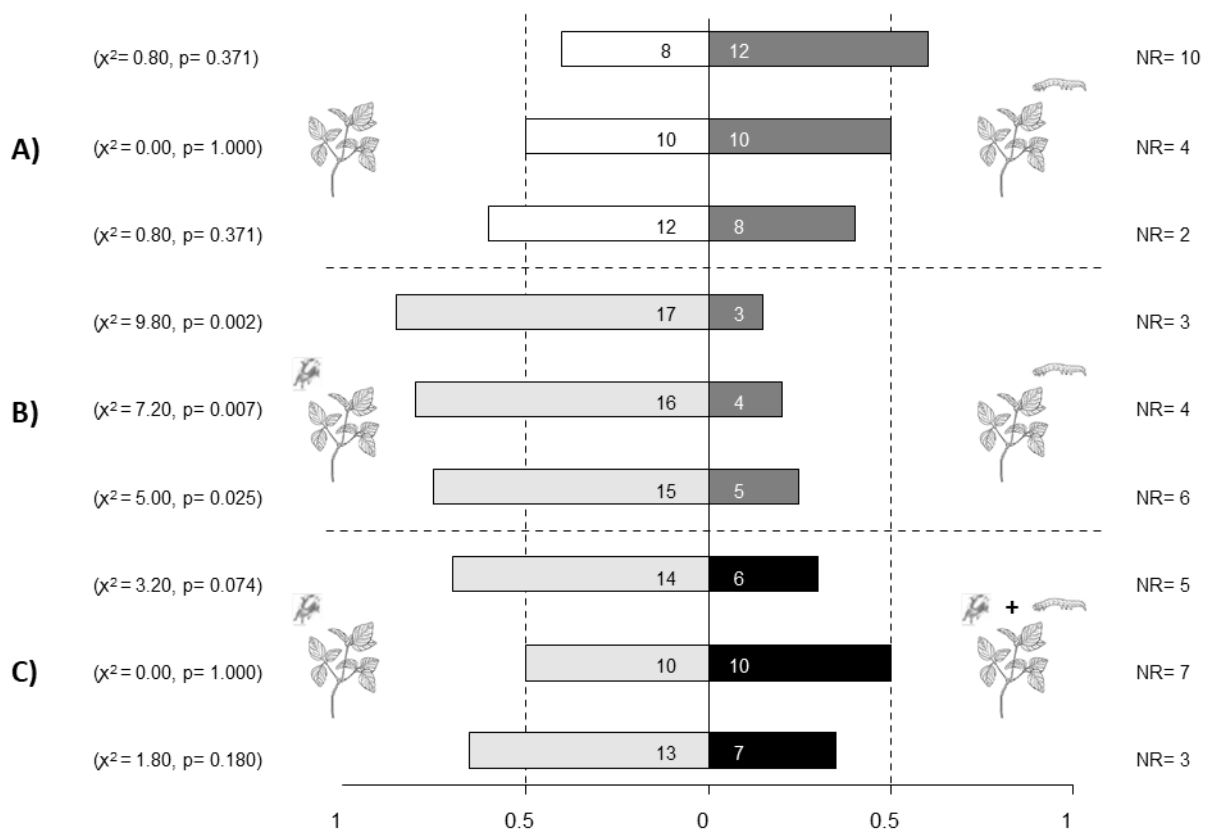


Figura 1 Resposta de ácaros predadores *N. californicus* em olfatômetro em Y. A) Plantas de soja limpas x plantas com infestação de *A. gemmatalis*; B) Plantas de soja infestadas com *T. urticae* x plantas infestadas com *A. gemmatalis*; C) Plantas de soja infestadas com *T. urticae* x plantas infestadas com *T. urticae* e *A. gemmatalis* na mesma planta. O número de ácaros que não responderam (NR) após 5 minutos estão contabilizados fora das barras.

Tabela 1 Compostos orgânicos voláteis (COVs) identificados em plantas de soja (M6210IPRO), sendo: Plantas de soja limpa (S), infestada com ácaro-rajado, *Tetranychus urticae* (SA), infestadas com 2 lagartas *A. gemmatalis* (SL) e por *T. urticae* + *A. gemmatalis* (SAL) na mesma planta respectivamente.

| Nº | COVs | Soja limpa (S) e com infestações de ácaro-rajado (SA), por lagarta (SL) e ácaro e lagarta (SAL) na mesma planta respectivamente. | | | | | | |
|----|--|--|--------------------------------------|---------|---|----|----|-----|
| | | Classe | RT | Fórmula | S | SA | SL | SAL |
| 1 | 2-Hepten-1-ol | Álcool | 2,61 | C7H14O | | X | X | |
| 2 | 2-hexen-1-ol | Álcool | 4,08 (SL); 5,19(S); 5,40(SA) | C6H12O | X | X | X | |
| 3 | 2-hexenal | Aldeído | 5,22 | C6H10O | X | | X | |
| 4 | 2-hexyn-1-ol | Álcool | 5,92 | C6H10O | | X | | X |
| 5 | 2,4-Hexadien-1-ol | Álcool | 5,50 | C6H10O | X | | | |
| 6 | 2,4-Decadien-1-ol | Álcool | 8,09 | C10H18O | | | X | |
| 7 | 2-Octenal | Aldeído | 8,50(SA; SAL); 8,70(SL) | C8H14O | | X | X | X |
| 8 | 4-hexen-1-ol | Álcool | 8,94 | C10H18O | X | X | | |
| 9 | 3- Octanona | Cetona | 9,02 | C8H16O | | X | | |
| 10 | Octan-3-ol | Álcool | 9,25 | C8H18O | X | | X | X |
| 11 | 1,3,7-Octatriene,2,7-dimetil | Monoterpeno | 9,80 | C10H16 | | | X | |
| 12 | 4-pentenoic acid, 2,4-dimethyl metil ester | Ester | 9,55(SAL); 9,29(SA) | C8H14O2 | | X | | X |
| 13 | Felandral | Monoterpeno | 10,88 | C10H16O | X | | X | |
| 14 | Benzeno Acetaldeído | Aldeído | 10,63 | C8H8O | | X | | |
| 15 | 5-Octen-1-ol | Alcool | 11,52(SL); 11,55(S); 11,73(SA) | C8H16O | X | X | X | |
| 16 | 3-Hexen-1-ol | Alcool | 11,78 | C6H12O | X | | X | |
| 17 | 3,5-Octadieno | Monoterpeno | 11,92 | C10H18O | | | X | |
| 18 | Linalol | Monoterpeno | 12,26 | C10H18O | X | X | X | |
| 19 | α- Carofileno | Sesquiterpeno | 12,39 | C15H24 | X | | | X |
| 20 | Citronelol | Monoterpeno | 12,54 | C10H20 | | | X | X |
| 21 | Isoborneol | Monoterpeno | 14,12 | C10H18O | | X | X | |
| 22 | Nerol | Monoterpeno | 14,40 | C10H18O | | X | | |
| 23 | Pulegona | Monoterpeno | 15,99 | C10H16O | | | X | |
| 24 | Cis-o-mentha-2,8-dien-1-ol | Monoterpeno | 16,04 | C10H16O | | | | X |
| 25 | B-Ocimeno | Monoterpeno | 16,07 | C10H16 | X | | X | |
| 26 | Etanona | Monoterpeno | 17,15 | C10H16O | X | | | |
| 27 | Beta Ionona | Cetona | 24,49 | C13H20O | | | | X |
| 28 | Ionona | Cetona | 24,60 | C13H20O | X | | | |
| 29 | Fenol2,4,6-tris(1-metiletil) | Sesquiterpeno | 25,20 | C15H24O | X | X | | |

| | | | | |
|--------------------|----|----|----|---|
| Total de compostos | 14 | 13 | 16 | 9 |
|--------------------|----|----|----|---|

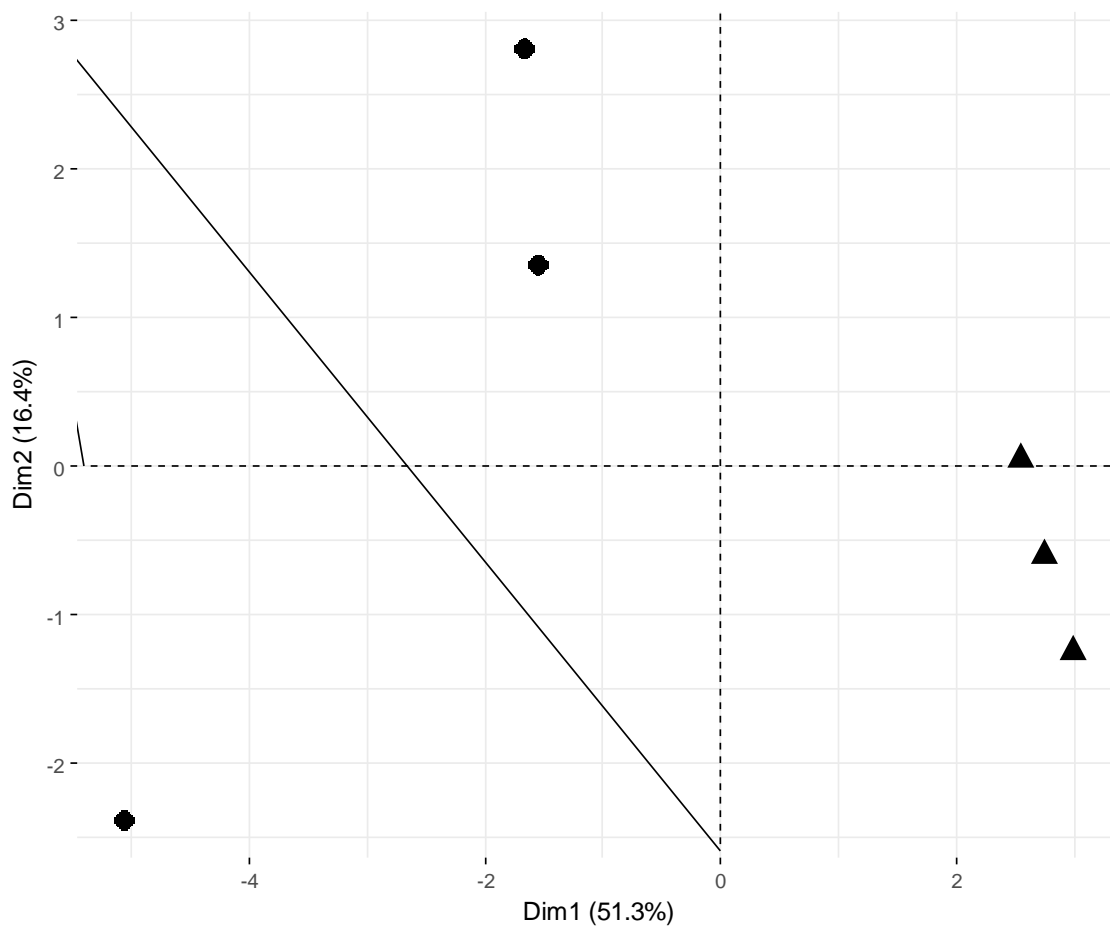


Figura 2 Análise de componentes principais (PCA) dos compostos voláteis presentes em plantas de soja após infestação por *A. gemmatalis* (◆) e após ataque múltiplo de *T. urticae* e *A. gemmatalis* (▲) na mesma planta detectados via CG/MS.

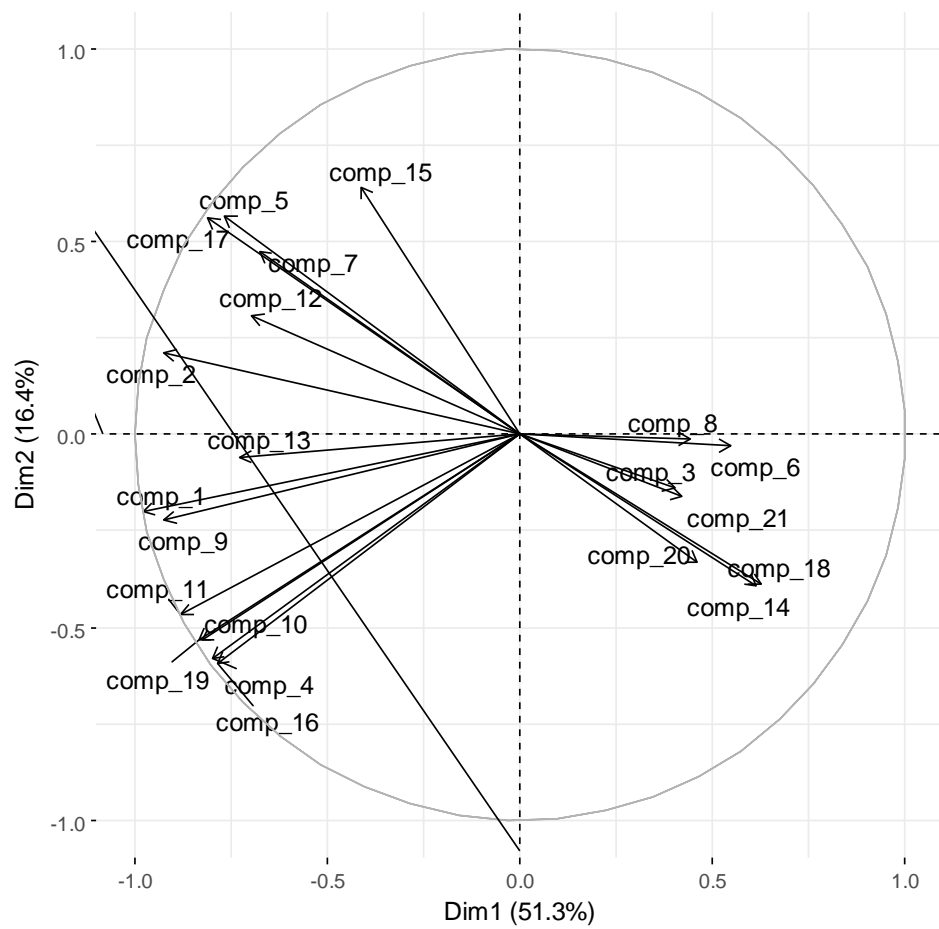


Figura 3 Análise de componentes principais (PCA) dos compostos voláteis presentes em plantas de soja após infestação por *A. gemmatalis* e *T. urticae* e *A. gemmatalis* detectados via CG/MS. Para facilitar a identificação dos compostos, os números no gráfico são os mesmos da Tabela 1.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Essa dissertação possui a primeira investigação sobre o acionamento de defesa induzida indireta em plantas de soja transgênica (Bt) sob infestação simultânea de ácaro-rajado e lagarta-da-soja. Ressalta-se que os resultados aqui apresentados foram analisados tanto na parte comportamental (i.e. preferência do ácaro predador) em olfatômetro e em arena, quanto nos parâmetros químicos (i.e. compostos voláteis). Além disso, apresenta o primeiro relato de vinte novos compostos que ainda não haviam sido descritos em literatura para esta cultura.

Conclui-se que defesas induzidas indiretas são elicitadas em plantas de soja tanto em infestações simples e múltiplas e que o ácaro predador *Neoseiulus californicus* responde igualmente a infestações por ácaro-rajado na presença da lagarta-da-soja.

Futuramente, outros trabalhos devem ser conduzidos para investigar o comportamento do predador em campo, pois, apesar de ser importante fazer essa avaliação em ambiente controlado, as condições ambientais do agroecossistema podem interferir na eficiência do controle biológico.