



**JÉSSICA MAYARA COFFLER BOTTI**

**PREFERÊNCIA DE *Neoseiulus californicus* (ACARI: PHYTOSEIIDAE)  
POR VOLÁTEIS DE MILHO CONVENCIONAL E Bt INDUZIDOS POR  
HERBIVORIA SIMPLES E MÚLTIPLA**

**SETE LAGOAS  
2017**

**JÉSSICA MAYARA COFFLER BOTTI**

**PREFERÊNCIA DE *Neoseiulus californicus* (ACARI: PHYTOSEIIDAE)  
POR VOLÁTEIS DE MILHO CONVENCIONAL E Bt INDUZIDOS POR  
HERBIVORIA SIMPLES E MÚLTIPLA**

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  
2017**

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)

B751p Botti, Jéssica Mayara Coffler.  
Preferência de *Neoseiulus californicus* (Acari:  
Phytoseiidae) por voláteis de milho convencional e  
Bt induzidos por herbivoria simples e múltipla /  
Jéssica Mayara Coffler Botti ; orientador Marcos  
Antonio Matiello Fadini; coorientador Júlio Onésio  
Ferreira Melo. -- Sete Lagoas, 2017.  
52 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Agrárias) -- Universidade Federal de São  
João del-Rei, 2017.

1. Defesa induzida indireta. 2. *Neoseiulus*  
*californicus*. 3. *Tetranychus urticae*. 4. Interação de  
defesas plantas. I. Fadini, Marcos Antonio Matiello  
, orient. II. Melo, Júlio Onésio Ferreira , co  
orient. III. Título.

**JÉSSICA MAYARA COFFLER BOTTI**

**PREFERÊNCIA DE *Neoseiulus californicus* (ACARI: PHYTOSEIIDAE)  
POR VOLÁTEIS DE MILHO CONVENCIONAL E Bt INDUZIDOS POR  
HERBIVORIA SIMPLES E MÚLTIPLA**

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, 07 de julho de 2017.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Maria Fernanda Gomes Villalba Peñaflor - UFLA

Prof. Dr. Marcus Alvarenga Soares - UFVJM

---

Prof. Dr. Marcos Antonio Matiello Fadini  
Orientador

Aos meus queridos pais, Margareth Maria Coffler e Antonio Carlos Botti, a minha irmã Tálita Coffler Botti e o meu namorado Natan Venturini Rizzi pelo amor, apoio e incentivo a mim ofertado ao longo da minha caminhada, nos momentos alegres e difíceis.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela força, sabedoria e por me permitir estar vivendo esta história, iluminando e me mostrando sempre os melhores caminhos.

Aos meus queridos e amados pais, pelo amor incondicional, pela força, pelo esforço incalculável para me ensinarem o bom caminho e me ajudarem a caminhar nele.

A minha irmã Tálita Coffler Botti, pela incessante demonstração de carinho e companheirismo.

A toda minha família (avôs, avós, tios, tias, primos e primas) pelo apoio, torcida e confiança que sempre depositam em mim; pelos momentos que não estivemos juntos e souberam entender. Em especial a minha pequena Luísa que contava os dias para me ver.

Ao meu namorado Natan pela compreensão, carinho, companheirismo e apoio quando mais precisei. Como você mesmo disse “entramos nessa juntos, para sairmos juntos”.

Ao pessoal que fez parte do grupo ConhecimEnto durante meu mestrado, Mayara Loss, Jéssica Martins, Amanda, Ítalo, Dalila, Taís, Luciane, Priscilla e Ana Clara. Pelo agradável convívio, ajuda nas montagens dos experimentos e pela amizade.

Aos companheiros de república, Mayara Loss e Marcus André, pelo apoio e companhia durante dois anos.

Ao meu orientador, Marcos Fadini, pela colaboração, paciência e seus conhecimentos repassados durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Ao meu Coorientador, Júlio, pelo apoio e suporte nas análises químicas.

Aos membros da banca, Maria Fernanda e Marcus, pela disponibilidade em participar da minha defesa.

À UFSJ, pela bolsa e espaço para realização dos experimentos concedidos.

À Embrapa Milho e Sorgo, por ter disponibilizado as sementes de milho, as lagartas de *Spodoptera frugiperda* e o olfatômetro.

Ao pesquisador Paulo Eduardo De Aquino Ribeiro, por me auxiliar nos testes no olfatômetro.

À UFMG e ao professor Rodinei Augusti, por disponibilizar o equipamento CG-MS para as análises químicas.

Ao professor Amauri, por me acompanhar nas análises feitas na UFMG.

À Koppert por ter disponibilizado os ácaros predadores.

À Fapemig pelo apoio financeiro.

Chega um momento em sua vida, que você sabe: Quem é imprescindível para você,  
quem nunca foi, quem não é mais, quem será sempre!  
Charles Chaplin

## SUMÁRIO

<b>RESUMO GERAL</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT GENERAL</b> .....	<b>II</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>5</b>
<b>ARTIGO 1 - VOLÁTEIS DE MILHO CONVENCIONAL E BT INDUZIDOS POR ÁCARO-RAJADO SÃO CAPAZES DE ATRAIR <i>Neoseiulus californicus</i>?</b> .....	<b>8</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>8</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>9</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>10</b>
<b>Material e métodos</b> .....	<b>11</b>
<b>Resultados</b> .....	<b>14</b>
<b>Discussão</b> .....	<b>16</b>
<b>Referências</b> .....	<b>18</b>
<b>ARTIGO 2 - PREFERÊNCIA DO ÁCARO PREDADOR <i>Neoseiulus californicus</i> POR VOLÁTEIS DE MILHO INFESTADO POR MÚLTIPLOS HERBÍVOROS</b> .....	<b>26</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>26</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>27</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>28</b>
<b>Material e métodos</b> .....	<b>29</b>
<b>Resultados</b> .....	<b>32</b>
<b>Discussão</b> .....	<b>33</b>
<b>Referências</b> .....	<b>35</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>42</b>

## **PREFERÊNCIA DE *Neoseiulus californicus* (ACARI: PHYTOSEIIDAE) POR VOLÁTEIS DE MILHO CONVENCIONAL E Bt INDUZIDOS POR HERBIVORIA SIMPLES E MÚLTIPLA**

**RESUMO GERAL** - As plantas possuem mecanismos de defesas contra herbívoros. As defesas induzidas direta e indireta são desencadeadas através da elicitação do ataque de herbívoros. Outro tipo de defesa são as constitutivas que são expressas continuamente na planta. Tais mecanismos de defesa podem apresentar interação entre si. Este estudo teve como objetivo avaliar se o ataque de *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) ou a herbivoria múltipla de *T. urticae* juntamente com a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) são capazes de elicitar defesa induzida indireta em plantas de milho convencional e Bt. O experimento foi realizado em laboratório com auxílio do olfatômetro em Y, avaliando a preferência olfativa do ácaro predador *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae) por voláteis de plantas. Os tratamentos foram: Planta Convencional limpa X Planta Convencional Infestada com ácaro-rajado; Planta Bt limpa X Planta Bt Infestada com ácaro-rajado; Planta Convencional Infestada com ácaro-rajado X Planta Bt Infestada com ácaro-rajado; Planta Convencional Infestada com ácaro-rajado X Planta Convencional Infestada com ácaro-rajado + lagarta-do-cartucho; Planta Bt Infestada com ácaro-rajado X Planta Bt Infestada com ácaro-rajado + lagarta-do-cartucho; Planta Convencional Infestada com ácaro-rajado + lagarta-do-cartucho X Planta Bt Infestada com ácaro-rajado + lagarta-do-cartucho. A extração dos compostos voláteis foi realizada pela microextração em fase sólida no modo headspace. Para as análises químicas foi empregado o cromatógrafo a gás Trace GC Ultra, acoplado a espectrômetro de massas Polaris Q, sistema GC-MS. O ácaro predador *N. californicus* não foi capaz de distinguir entre os odores de plantas limpas e infestadas por ácaro-rajado, isso ocorreu em milho convencional e Bt. *Neoseiulus californicus* também não distinguiu entre os voláteis de plantas de milho convencional e Bt infestadas por ácaro-rajado. Também não houve discriminação do ácaro predador entre plantas sob infestação simples e múltipla, tanto em milho convencional e Bt. Quando se comparou plantas convencionais com infestação múltipla e Bt com infestação múltipla, o ácaro predador *N. californicus* não teve preferência entre essas fontes de odores. Porém, ocorreram modificações químicas dos voláteis dentre os grupos de plantas estudadas. Desta forma, conclui-se que os grupos de plantas em estudo possuem modificações químicas, porém as mesmas não são capazes de atrair o *N. californicus*. Além disso, plantas Bt respondem igualmente como as plantas convencionais na atratividade do *N. californicus*. O conhecimento do desempenho do ácaro predador *N. californicus* frente aos odores liberados pelas plantas de milho, mostram que o ácaro predador não é capaz de identificar a presa por odores de longa distância.

**Palavras-chave:** Defesa induzida indireta. *Neoseiulus californicus*. *Tetranychus urticae*. Interação de defesas plantas.

**PREFERENCE OF *Neoseiulus californicus* (ACARI: PHYTOSEIIDAE) BY  
VOLATILES OF CONVENTIONAL AND Bt MAYZE INDUCED BY SIMPLE AND  
MULTIPLE HERBIVORIA**

**GENERAL ABSTRACT** - The plants have mechanisms of defenses against herbivores. Direct and indirect induced defenses are triggered by the elicitation of herbivorous attack. Another type of defense is constitutive that is expressed continuously in the plant. There may be interaction between them. This study aimed to evaluate whether the attack of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) or the multiple herbivory of *T. urticae* together with *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) is able to elicit indirect induced defense in conventional and Bt maize plants. The experiment was carried out in the laboratory with the aid of the Y-olfactometer, thus evaluating the olfactory preference of the predatory mite *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae). The treatments were: Conventional Plant Clean X Conventional Plant Infested with two-spotted spider mite; Plant Bt clean X Plant Bt Infested with two-spotted spider mite; Conventional Plant Infested with two-spotted spider mite X Plant Bt Infested with two-spotted spider mite; Conventional Plant Infested with two-spotted spider mite X Conventional Plant Infested with two-spotted spider mite + fall armyworm; Bt Plant Infested with two-spotted spider mite X Bt Plant Infested with two-spotted spider mite + fall armyworm; Conventional Plant Infested with two-spotted spider mite + fall armyworm X Plant Bt Infested with two-spotted spider mite + fall armyworm. The extraction of volatile compounds was by solid phase microextraction in the headspace mode. For the chemical analysis was applied Trace GC Ultra gas chromatograph coupled to a Polaris Q mass spectrometer, GC-MS system. The predatory mite was not able to distinguish between the odors of clean and infested plants by two-spotted spider mite, this occurred in conventional and Bt maize. *N. californicus* also did not differ between the volatiles of conventional and Bt maize plants infested by two-spotted spider mite. There was also no discrimination of the predator mite between plants under single and multiple infestation, both in conventional and Bt maize. When comparing conventional plants with multiple infestation and Bt with multiple infestation, the predator mite *N. californicus* exhibited no preference among these sources of odors. However, occurred chemical changes of the volatiles among the groups of plants studied. Thus, it is concluded that the groups of plants studied have chemical modifications, but they are not able to attract *N. californicus*. In addition, Bt plants also respond as conventional plants to the attractiveness of *N. californicus*. The knowledge of the performance of the predator mite *N. californicus* against the odors released by maize plants shows that the predatory mite is not able to identify prey by long-distance odors.

**Keywords:** Indirect Induced Defense. *Neoseiulus californicus*. *Tetranychus urticae*. Interaction of plant defenses.

## INTRODUÇÃO GERAL

As plantas desenvolveram uma diversidade de mecanismos de defesa contra condições adversas, tais como o ataque de herbívoros (BERGELSON et al., 2001). Um mecanismo contra herbívoros é a defesa induzida direta, que pode ser a produção de metabólitos secundários tóxicos e proteínas de defesa, como inibidores de proteases, os quais afetam diretamente os herbívoros (SCHOONHOVEN et al., 2006). Outro mecanismo de defesa é a defesa induzida indireta, caracterizada pela produção de voláteis de plantas após a herbivoria que são capazes de atrair inimigos naturais dos herbívoros (ARIMURA et al., 2005; SCHALLER, 2008).

Além de defesas induzidas, as plantas possuem defesas constitutivas que são expressas continuamente e independentes do ataque dos herbívoros (PRICE et al., 1980). Estruturas como tricomas, espinhos e a produção de metabólitos tóxicos são exemplos de defesa constitutiva (ARIMURA et al., 2005). Outro exemplo são as plantas Bt, pois expressam continuamente a proteína de defesa. O milho 30F35 Hx (iso-híbrido do milho 30F35) expressa a proteína Cry1F que confere resistência aos lepidópteros. Porém, não só os herbívoros alvos ficam expostos a toxinas, os herbívoros não-alvos e seus inimigos naturais consequentemente ficam expostos também (TORRES e RUBERSON, 2008). Embora a utilização de plantas geneticamente modificadas apresente algumas vantagens (KOUSER e QAIM, 2011), têm-se desconsiderado o papel que essas plantas possam exercer sobre o comportamento de forrageamento de inimigos naturais (POPPY e SUTHERLAND, 2004). Assim, é importante conhecer qual influência das proteínas de plantas Bt sobre organismos não-alvo.

Além disso, o cultivo de plantas Bt promove uma diminuição do uso de inseticidas (CATTANEO et al., 2006). Com isso, espécies de pragas que não são alvo e não possuem importância econômica, como *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) em milho, pode se tornar mais importantes por conseguirem aumentar sua população em decorrência da menor utilização de inseticidas aplicados em pragas-alvo, que agora são controladas pela tecnologia Bt. Portanto é importante saber se plantas de milho com tecnologia Bt são capazes de liberar voláteis para atrair os inimigos naturais do ácaro-rajado. Esse questionamento é realizado pois, a defesa induzida indireta tem custos para as plantas (STEPPUHN e BALDWIN, 2008). Para a planta acionar essa defesa precisa alocar recursos fisiológicos e ecológicos, isso pode afetar processos relevantes da planta, como crescimento e reprodução (STEPPUHN e BALDWIN, 2008).

Um segundo questionamento diz respeito da interação de diferentes tipos defesas de plantas (PRICE et al., 1980; KANT et al., 2015). Um exemplo é a interação de defesa constitutiva e defesa induzida indireta. Estudos demonstram diferenças significativas nas quantidades dos voláteis emitidos entre plantas de milho Bt e não Bt (TURLINGS et al., 2005; DEAN e DE MORAES, 2006). Isso mostra que as plantas com defesas constitutivas (Bt) podem alterar a produção de voláteis e, conseqüentemente, a atração dos inimigos naturais (i.e. defesa induzida indireta). Desmostrando assim, uma interação entre essas defesas. Pois, a quantidade e a composição dos voláteis emitidos podem influenciar o forrageamento do inimigo natural (SHIMODA, 2010).

Turlings et al. (2005) observaram na cultura do milho que os parasitoides *Cotesia marginiventris* Cresson e *Microplitis rufiventris* Kokujev (Hymenoptera: Braconidae), não conseguiram distinguir entre os odores de planta de milho Bt (N4640Bt) e convencional (N4640), quando induzidas por regurgito de *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lepidoptera: Noctuidae). Isto indica que o milho Bt não afeta o forrageamento daqueles parasitoides. Porém, não há até o momento estudos sobre a emissão de voláteis e a interação das defesas, após a herbivoria de ácaro fitófagos em milho convencional e Bt.

Além disso, outro fator que pode alterar a defesa induzida são os ataques múltiplos de espécies de herbívoros, afetando a preferência e desempenho dos herbívoros e seus inimigos naturais (DICKE et al., 2009). Naturalmente, as plantas não estão expostas a um único herbívoro. O ataque de múltiplos herbívoros pode alterar a emissão de compostos, tanto positivamente como negativamente na atratividade dos inimigos naturais (RODRIGUEZ-SAONA et al., 2005; ZHANG et al., 2009 ).

Estudos em plantas de feijão demonstram esta variação na produção de compostos voláteis, por ataque múltiplo, e conseqüentemente na atratividade dos inimigos naturais (BOER et al., 2008; ZHANG et al., 2009). Um exemplo, é que as plantas de feijão infestadas por múltiplos herbívoros (*T. urticae* + *Spodoptera exigua*) liberaram compostos voláteis mais atrativos ao ácaro predador *Phytoseiulus persimilis* Banks (Acari: Phytoseiidae), do que os compostos voláteis induzidos por cada herbívoro separadamente (BOER et al., 2008). Porém, *P. persimilis* não foi mais atraído por voláteis liberados de plantas de feijão infestadas simultaneamente por ácaro-rajado e mosca-branca *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae), do que os voláteis liberados apenas por ácaro-rajado (ZHANG et al., 2009). Portanto, a herbivoria múltipla deve ser estudada em diferentes plantas e com diferentes

herbívoros, para compreensão da interação na produção de compostos voláteis e como isso atua na atração dos inimigos naturais.

A diferenciação na produção de compostos voláteis, por ataque múltiplos de herbívoros, está relacionada com o acionamento das principais rotas metabólicas de defesa de plantas, a rota do ácido jasmônico (AJ) e do ácido salicílico (AS) (VOS et al., 2005). A produção de AJ ocorre inicialmente nos plastídios das células do tecido atacado (ACOSTA e FARMER, 2010), após o reconhecimento por dano ao tecido, pelos herbívoros mastigadores (SCHALLER, 2008). Além deste reconhecimento, a presença de elicitores presentes na saliva do herbívoro pode acionar a síntese de AJ (ALBORN et al., 1997). O AJ é sintetizado a partir do seu precursor ácido  $\alpha$ -linolénico através da via octadecanóide. Já a síntese de AS está correlacionada a herbívoros picadores-sugadores (THALER et al., 2002). Sua síntese é através da via do Shikimato/Arogenato a partir da eritrose 4-fosfato e do fosfoenolpiruvato. Inicialmente a fenilalanina é formada e depois é convertida em transcinamato, através da ação da enzima fenilalanina amônia liase (PAL). O transcinamato é transformado em ácido benzóico que se converte em AA, após a ação da enzima ácido benzóico 2-hidroxilase. (RYALS et al., 1996).

Como as plantas estão expostas a ataques múltiplos de herbívoros (DICKE et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2016; PONZIO et al., 2016), a indução de defesa indireta pode ser afetada, pois as rotas do AJ e AS podem ter relações antagônicas ou sinérgicas (THALER et al., 2002, 2012; RODRIGUEZ-SAONA et al., 2005). É importante responder se as plantas de milho convencional e Bt, com infestação múltipla (e.g. ácaro-rajado e lagarta-do-cartucho) respondem igualmente na atração dos inimigos naturais do ácaro-rajado.

Entre os inimigos naturais de ácaros-rajado, destacam-se por serem eficazes no controle biológico os ácaros predadores da família Phytoseiidae (MCMURTRY e CROFT, 1997). Algumas das principais espécies desta família, utilizadas para o controle de ácaro-rajado, são o ácaro predador especialista tipo I *Phytoseiulus macropilis* Banks (Acari:Phytoseiidae) e o ácaro predador seletivo tipo II *Neoseiulus californicus* McGregor (Acari: Phytoseiidae) (MCMURTRY e CROFT, 1997).

Esta dissertação foi realizada com objetivo de avaliar, no Capítulo I, se plantas de milho convencional e Bt após a herbivoria de *T. urticae* induzem a produção de compostos voláteis atrativos ao *N. californicus*. Testou-se a hipótese nula (H0) de que plantas de milho convencional e Bt não são capazes de produzir voláteis atrativos ao *N. californicus* quando infestadas por ácaro-rajado. Foi investigado também se plantas de milho convencional e Bt, infestados com ácaro-rajado, são igualmente capazes de atrair o *N. californicus*. Para isto testou-

se a hipótese nula (H0) de que plantas de milho Bt foram igualmente capazes de induzir defesas indiretas à *T. urticae* após o ataque, como as plantas de milho convencional.

No Capítulo II, o objetivo foi avaliar se plantas de milho convencional e Bt induzidos por herbivoria simples (ácaro-rajado) e múltiplas (ácaro-rajado + lagarta-do-cartucho), produzem compostos voláteis atrativos ao *N. californicus*. Para isto, foi testada a hipótese nula (H0) de que plantas de milho convencional e Bt, infestadas apenas por ácaro-rajado e ácaro-rajado simultaneamente com a lagarta-do-cartucho, não são capazes de produzir voláteis atrativos ao *N. californicus*. Também foi investigado se transgenia de plantas de milho Bt pode interferir na capacidade de indução de defesa induzida indireta com infestações múltiplas de ácaro-rajado e lagarta-do-cartucho. Testou-se a hipótese nula (H0) de que plantas de milho Bt seriam igualmente capazes de induzir defesas indiretas ao ácaro-rajado com a lagarta-do-cartucho após o ataque simultâneo, como as plantas de milho convencional.

## REFERÊNCIAS

- ACOSTA, I. F.; FARMER, E. E. Jasmonates. **The Arabidopsis Book**, p. e0129, 2010.
- ALBORN, H. T.; TURLINGS, T. C. J.; JONES, T. H.; STENHAGEN, G.; LOUGHRIN, J. H.; TUMLINSON, J. H. An Elicitor of Plant Volatiles from Beet Armyworm Oral Secretion. **SCIENCE**, v. 8276, p. 945–949, 1997.
- ARIMURA, G. I.; KOST, C.; BOLAND, W. Herbivore-induced, indirect plant defences. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1734, n. 2, p. 91–111, 2005.
- BERGELSON, J.; KREITMAN, M.; STAHL, E. A.; TIAN, D. Evolutionary dynamics of plant R-genes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 292, n. 5525, p. 2281–2285, 2001.
- BOER, J. G. DE; 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. **J Chem Ecol**, v. 34, p. 281–290, 2008.
- CATTANEO, M. G.; YAFUSO, C.; SCHMIDT, C.; HUANG, C.; RAHMAN, M.; OLSON, C.; ELLERS-KIRK, C.; ORR, B. J.; MARSH, S. E.; ANTILLA, L.; et al. Farm-scale evaluation of the impacts of transgenic cotton on biodiversity, pesticide use, and yield. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 20, p. 7571–6, 2006.
- DEAN, J. M.; DE MORAES, C. M. Effects of genetic modification on herbivore-induced volatiles from maize. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, n. 4, p. 713–724, 2006.
- 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.
- KANT, M. R.; JONCKHEERE, W.; KNEGT, B.; LEMOS, F.; LIU, J.; SCHIMMEL, B. C. J.; VILLARROEL, C. A.; ATAIDE, L. M. S.; DERMAUW, W.; GLAS, J. J.; et al. Mechanisms and ecological consequences of plant defence induction and suppression in herbivore communities. **Annals of Botany**, v. 115, n. 7, p. 1015–1051, 2015.
- KOUSER, S.; QAIM, M. Impact of Bt cotton on pesticide poisoning in smallholder agriculture: A panel data analysis. **Ecological Economics**, v. 70, n. 11, p. 2105–2113, 2011.
- 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.
- OLIVEIRA, H.; FADINI, M. A. M.; VENZON, M.; REZENDE, D.; REZENDE, F.; PALLINI, A. 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. **Experimental and Applied Acarology**, v. 47, n. 4, p. 275–283, 2009.
- PONZIO, C.; CASCONI, P.; CUSUMANO, A.; WELDEGERGIS, B. T.; FATOUROS, N. E.; GUERRIERI, E.; DICKE, M.; GOLDS, R. Volatile-mediated foraging behaviour of three

parasitoid species under conditions of dual insect herbivore attack. **Animal Behaviour**, v. 111, p. 197-206, 2016.

POPPY, G. M.; SUTHERLAND, J. P. Can biological control benefit from genetically-modified crops? Tritrophic interactions on insect-resistant transgenic plants. **Physiological Entomology**, v. 29, n. 3 SPEC. ISS., p. 257–268, 2004.

PRICE, P. W.; BOUTON, C. E.; GROSS, P.; MCPHERON, B. A.; THOMPSON, J. N.; WEIS, A. E. Interactions Among Three Trophic Levels : Influence of Plants on Interactions Between Insect Herbivores and Natural Enemies. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 11, p. 41–65, 1980.

RODRIGUEZ-SAONA, C.; CHALMERS, J. A.; RAJ, S.; THALER, J. S. Induced plant responses to multiple damagers: differential effects on an herbivore and its parasitoid. **Oecologia**, v. 143, n. 4, p. 566–577, 2005.

RYALS, J. A.; NEUENSCHWANDER, U. H.; WILLITS, M. G.; MOLINA, A.; STEINER, H.-Y.; HUNT, M. D. Systemic Acquired Resistance. **The Plant Cell**, v. 8, n. 10, p. 1809, 1996.

SCHALLER, A. **Induced Plant Resistance to Herbivory**. 1. ed. Stuttgart, Germany: Springer Netherlands, 2008.

SCHOONHOVEN, L. M.; VAN LOON, J. J.; DICKE, M. **Insect-Plant Biology**, 2nd ed., Oxford University Press: Oxford, 2006.

SHIMODA, T. A key volatile infochemical that elicits a strong olfactory response of the predatory mite *Neoseiulus californicus*, an important natural enemy of the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 50, n. 1, p. 9–22, 2010.

STEPPUHN, A.; BALDWIN, I. T. Induced Defenses and the Cost-Benefit Paradigm. In: SCHALLER, A. **Induced Plant Resistance to Herbivory**. 1. ed. Stuttgart, Germany: Springer Netherlands, 2008. p. 61-83.

THALER, J. S.; HUMPHREY, P. T.; WHITEMAN, N. K. Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 5, p. 260-270, 2012.

THALER, J. S.; KARBAN, R.; ULLMAN, D. E.; BOEGE, K.; BOSTOCK, R. M. Cross-talk between jasmonate and salicylate plant defense pathways: Effects on several plant parasites. **Oecologia**, v. 131, n. 2, p. 227–235, 2002.

TORRES, J.B.; RUBERSON, J.R. Interactions of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in genetically engineered cotton with predatory heteropterans. **Transgenic Research**, v. 17, p. 345–354, 2008.

TURLINGS, T. C. J.; JEANBOURQUIN, P. M.; HELD, M.; DEGEN, T. Evaluating the induced-odour emission of a Bt maize and its attractiveness to parasitic wasps. **Transgenic Research**, v. 14, n. 6, p. 807–816, 2005.

VISWANATHAN, D. V.; NARWANI, A. J. T.; THALER, J. S. Specificity in induced plant

responses shapes patterns of herbivore occurrence on *Solanum dulcamara*. **Ecology**, v. 86, n. 4, p. 886–896, 2005.

VOS, M. DE; OOSTEN, V. R. VAN; POECKE, R. M. P. VAN; VAN PELT, J. A.; POZO, M. J.; MUELLER, M. J.; BUCHALA, A. J.; MÉTRAUX, J.-P.; LOON, L. C. VAN; DICKE, M.; et al. Signal Signature and Transcriptome Changes of Arabidopsis During Pathogen and Insect Attack. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 18, n. 9, p. 923-937, 2005.

ZHANG, P.-J.; ZHENG, S.-J.; LOON, J. J. A. VAN; BOLAND, W.; DAVID, A.; MUMM, R.; DICKE, M. Whiteflies interfere with indirect plant defense against spider mites in Lima bean. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 50, p. 21202–21207, 2009.

## ARTIGO 1

### VOLÁTEIS DE MILHO CONVENCIONAL E Bt INDUZIDOS POR ÁCARO- RAJADO SÃO CAPAZES DE ATRAIR *Neoseiulus californicus*?

Artigo escrito conforme as normas do periódico Experimental and Applied Acarology

**Resumo** As plantas possuem mecanismos de defesas constitutivas e induzidas contra o ataque de herbívoros. Sabe-se que expressão de tais defesas pode interagir. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar se *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) é capaz de elicitar defesa induzida indireta em plantas (=voláteis induzidos) de milho convencional e Bt (=defesa constitutiva). O experimento foi realizado em laboratório com auxílio do olfatômetro em Y, avaliando a preferência olfativa do ácaro predador *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae). O experimento constituiu-se de três tratamentos: Planta Convencional limpa X Planta Convencional Infestada com *T. urticae*; Planta Bt limpa X Planta Bt Infestada com *T. urticae* e Planta Convencional Infestada com *T. urticae* X Planta Bt Infestada com *T. urticae*. Para a extração dos compostos voláteis de plantas utilizou-se a microextração em fase sólida no modo headspace. Para as análises químicas foi empregado o cromatógrafo a gás Trace GC Ultra, acoplado a espectrômetro de massas Polaris Q, sistema GC-MS. Não houve discriminação pelo ácaro predador por voláteis de plantas de milho limpas e infestadas, tanto em convencionais como em Bt. *Neoseiulus californicus* também não foi capaz de distinguir entre os voláteis de plantas de milho convencional e Bt infestadas. Houve diferença química entre plantas limpas e infestadas. Desta forma, conclui-se que os grupos de plantas em estudo possuem modificações químicas, porém não são capazes de atrair o *N. californicus*. Isso potencializa a chance de *T. urticae* alcançar o *status* de praga em milho pelo fato de haver menor chance de encontro entre o inimigo natural e a presa.

Palavras-chave: Defesa induzida indireta, *Tetranychus urticae*, Ácaro predador, Interação de defesas plantas

**ARE VOLATILES OF CONVENTIONAL AND Bt MAIZE INDUCED BY TWO-  
SPOTTED SPIDER MITE ABLE TO ATTRACT THE PREDATORY MITE  
*Neoseiulus californicus*?**

**Abstract** Plants have constitutive and induced defense mechanisms against the attack of herbivores. It is known that expression of such defenses may interact. Thus, this study aimed to evaluate if the *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) is able to elicit indirect induced defense (= induced volatile ) in conventional and Bt (= constitutive defense) maize plants. The experiment was performed in a laboratory using the Y-tube olfactometer, assessing the predator mite *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae) olfactory preference. The experiment consisted of three treatments: Clean Conventional Plant X Conventional Plant Infested with *T. urticae*; Clean Bt Plant X Bt Plant Infested with *T. urticae* and Conventional Plant Infested with *T. urticae* X Bt Plant Infested with *T. urticae*. The solid phase microextraction in headspace mode was used for the extraction of the volatile compounds of plants. For the chemical analyzes the Trace GC Ultra gas chromatograph was used, paired with the Polaris Q mass spectrometer, GC-MS system. There was no discrimination by the predatory mite for volatiles of clean and infested maize plants, either conventional or Bt. *N. californicus* was also unable to distinguish between volatiles from conventional and infested Bt maize plants. There was a chemical difference between clean and infested plants. Thus groups of plants under study had chemical modifications, however they were not able to attract *N. californicus*. This potentiates the chance of *T. urticae* to reach pest status in maize because there is less chance of contact between the natural enemy and prey.

Keywords: Indirect Induced Defense; *Tetranychus urticae*; Predator mite; Interaction of plant defenses

## Introdução

As plantas podem sofrer estresses bióticos como ataque de patógenos e insetos (Taiz and Zeiger 2008). Ao longo do tempo, as plantas evoluíram para se protegerem de tais estresses, desenvolvendo mecanismos de defesa (Schaller 2008; Taiz and Zeiger 2008). Quanto à herbívora de insetos, as plantas desenvolveram mecanismos de defesas constitutivas e induzidas (Schaller 2008).

Defesas constitutivas são expressas continuamente pela planta e são formadas por barreiras físicas ou químicas (Mello and Silva Filho 2002). Por exemplo, tricomas, espinhos, depósitos cuticulares e epiderme espessada caracterizam barreiras físicas as quais dificultam a locomoção e alimentação dos herbívoros (Arimura et al. 2005). Os metabólicos tóxicos são exemplos de barreiras químicas que podem atuar na redução da palatabilidade (Arimura et al. 2005). As plantas geneticamente modificadas com genes provenientes da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), são consideradas exemplos de defesas constitutivas, pois sua resistência é expressa de maneira contínua deixando assim os herbívoros alvo, não-alvos e seus inimigos naturais expostos à toxina (Prokopy 1994; Torres and Ruberson 2008; Paulo et al. 2017a).

O mecanismo de defesa induzida é dividido em direta e indireta. A defesa induzida direta afeta negativamente a fisiologia ou comportamento do herbívoro, por exemplo, pela produção de proteínas de defesa ou de metabolitos secundários tóxicos (Roda and Baldwin 2003; Schoonhoven et al. 2006; Paulo et al. 2017b). Enquanto a emissão de uma mistura de voláteis que são capazes de atrair uma grande variedade de inimigos naturais dos herbívoros caracterizam a defesa indireta da planta (Turlings and Wäckers 2004; Schaller 2008).

As plantas para se defenderem dos herbívoros têm custos, os quais podem ser fisiológicos, ecológicos e evolutivos (Steppuhn and Baldwin 2008). Por isso, quando as plantas utilizam de algum mecanismo de defesa, a mesma pode afetar suas atividades vitais, como seu crescimento vegetativo e reprodutivo (Steppuhn and Baldwin 2008). Isso evidencia que as plantas podem não usar desses mecanismos de defesas em toda situação de ataque de pragas. Uma hipótese é que quando as plantas já possuem alguma defesa constitutiva ou ainda estão em situação de ataque de praga secundária podem descolar ou não recursos para sua defesa. Além disso, outra hipótese é que o alocamento de recursos para um tipo de defesa pode alterar outro tipo de defesa. Estudos comprovam que mecanismos de defesas constitutivas podem ocasionar interferências sobre os mecanismos de defesas induzidas (Price et al. 1980; Kant et al. 2015). Isto possivelmente ocorre por “*trade-off*” onde a planta precisa fazer um balanço de

como dividir seus recursos. Toda vez que um organismo destina recursos a um fim, esse recurso fica indisponível para outro fim (Thaler et al. 1999).

Uma fonte de investigação sobre interação de defesa constitutiva e induzida é o estudo de milho geneticamente modificado com o gene Bt (*Bacillus thuringiensis*) infestado com uma praga de importância secundária, como o ácaro-rajado *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) que está presente na cultura do milho mas não há relatos na literatura de status de praga na cultura (Fadini et al. 2010).

Neste trabalho, investigou-se se plantas de milho convencional e Bt atacados pelo *T. urticae* emitem compostos voláteis atrativos ao *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae). Testou-se a hipótese nula (H0) de que plantas de milho convencional e Bt, infestadas por ácaro-rajado não são capazes de produzir voláteis atrativos ao *N. californicus*. Também investigou se a transgenia de plantas de milho Bt pode interferir na indução de defesa indireta ao ácaro *T. urticae*. Testou-se então a hipótese nula (H0) de que plantas de milho Bt respondem igualmente às convencionais na infestação por *T. urticae*, quanto à defesa induzida indireta.

## **Material e Métodos**

Os experimentos foram conduzidos, na casa-de-vegetação e nos laboratórios de Entomologia e de Química da Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ), Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil.

### *Criações de ácaro-rajado e ácaro predador*

Foram coletadas folhas de sorgo infestadas por *T. urticae* em casa-de-vegetação da Embrapa Milho e Sorgo e levadas para o Laboratório. Para o estabelecimento da criação, ácaros adultos foram coletados individualmente com auxílio de microscópio estereoscópio e pincel de pelos de Marta e transferidos para plantas de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) com duas folhas cotiledôneas completamente expandidas e sem tratamento fitossanitário.

As plantas de feijão utilizadas foram plantadas em vasos plásticos, com volume de 1,0 l, utilizando substrato Terral Solo® plantas infestadas foram mantidas isoladas em gaiolas teladas, a fim de evitar a entrada de outros herbívoros. A irrigação foi feita sempre que necessário. Plantas limpas de feijão-de-porco foram adicionadas à criação quando necessárias.

O ácaro predador utilizado nos experimentos foi o *N. californicus* e foi adquirido na empresa Koppert.

### *Cultivo de plantas de milho*

As sementes de milho utilizadas para o plantio foram as do híbrido comercial Pioneer® 30F35 (=milho convencional) e do híbrido comercial Pioneer® 30F35 Hx (=milho Bt). Duas sementes foram semeadas em vasos plásticos com volume de 1,0 l, utilizando-se substrato Terral Solo® e mantidas em casa-de-vegetação. Após 15 dias da semeadura, foi realizado o desbaste e a adubação com 0,2 gramas de sulfato de amônio por vaso. As plantas de milho foram divididas em dois grupos: plantas limpas, plantas infestadas com ácaro-rajado. Para a infestação do ácaro-rajado, 20 dias após a semeadura, 10 fêmeas foram isoladas em uma folha, com auxílio de cola entomológica. A cola foi aplicada na base da folha, não permitindo que as fêmeas se deslocassem para o restante da planta.

### *Análise química da indução de defesa indireta*

Folhas foram retiradas de plantas convencional e Bt. Foi definido seis grupos de plantas: limpas, com 1, 2, 3, 4 e 5 dias pós infestação. A análise química foi realizada utilizando a microextração em fase sólida (SPME) no modo headspace e 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 (Garcia et al. 2016). A análise química constituiu-se de uma amostra de 0,250 g de folhas não infestadas de cada planta. As amostras foram transferidas para um frasco de headspace de 25 mL e maceradas com auxílio de um bastão de vidro. Os frascos foram lacrados com lacre de alumínio e septo de borracha e mantidos no congelador a -18 °C até à análise. Cada amostra foi aquecida por 5 minutos a 65 °C antes da exposição da fibra de microextração em fase sólida (SPME). Após esse período de aquecimento, a fibra semipolar Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno (PDMS/DVB) de 65 µm foi exposta à fase gasosa acima da folha macerada de milho, a 65 °C por 20 minutos. Em seguida, a fibra foi deixada inserida no injetor do cromatógrafo a 200 °C, por 5 minutos, para dessorção dos voláteis coletados.

As condições para o cromatógrafo a gás são 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; aquecimento com temperatura programada (40 °C por 2 minutos, em seguida, um gradiente de 8 °C/min até 100 °C, temperatura na qual manteve-se a isoterma por 2 minutos e depois 15 °C/min até 180 °C, temperatura na qual manteve-se a isoterma por 2 minutos, e por fim um gradiente de 15 °C/min até 245 °C, temperatura na qual manteve-se a isoterma por 3 minutos). 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), específica para análise por espectrometria de massas. A pré-identificação dos compostos foi realizada comparando os espectros de massas presentes nas bibliotecas NIST/EPA/NIH (2005). Após a análise foi definido o dia de indução de voláteis e esse dia foi utilizado nos testes de olfatômetro.

#### *Teste de olfatômetro*

Plantas com 48 h após infestação foram utilizadas para a realização dos testes em olfatômetro em Y, sendo os tratamentos: Planta Convencional limpa X Planta Convencional Infestada com *T. urticae*; Planta Bt limpa X Planta Bt Infestada com *T. urticae*; Planta Convencional Infestada com *T. urticae* X Planta Bt Infestada com *T. urticae*. Cada tratamento constituiu-se de três repetições verdadeiras (i.e. fonte de odores) e de cada repetição obteve-se 15 respostas de ácaros predadores, totalizando 45 liberações de predadores por tratamento.

Um olfatômetro em tubo Y foi utilizado para estudar a resposta de *N. californicus*. O tubo de vidro na forma de um Y (com as dimensões de 21,0 cm de comprimento de cada braço e 3,5 cm de diâmetro) possuía um fio de metal em forma de Y no meio para facilitar o deslocamento dos ácaros. Os recipientes constituídos por uma caixa de plástico foram ligados a ambos os braços do tubo. A base do tubo foi ligada a uma bomba de vácuo que direcionava o fluxo dos recipientes para os braços do tubo Y. Um fluxômetro foi conectado à saída de ar dos recipientes e foi usado para calibrar a velocidade de entrada de ar em cada braço do olfatômetro. A velocidade do vento foi de 0,50 m/s em cada braço do tubo.

Os predadores foram introduzidos individualmente no ponto inicial no fio de aço e observado até que atingisse 1/3 de um dos braços, onde considerou-se a resposta do ácaro. Os predadores que não passaram 1/3 de qualquer dos braços em 5 minutos foram considerados “sem resposta”. A cada cinco respostas as posições das fontes de odores foram invertidas. Para

análise química, foi sorteada uma repetição verdadeira, onde retirou-se uma amostra de 0,250 g de folha de cada planta. Estas foram analisadas do mesmo modo que a análise química da indução de defesa indireta

### *Análises estatísticas*

O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado, com 3 tratamentos e 3 repetições por tratamento.

Para os dados químicos os valores de tempo de retenção e intensidade dos picos foram retirados do programa Xcalibur 1.4 da ThermoElectron Corporation. Realizou-se então a seleção dos picos, através de um corte de nove compostos de maior área em cada cromatograma. A cada tempo de retenção foi relacionado um composto, baseando-se nos espectros de massa e nos índices de retenção. Foi construída, uma tabela com as amostras nas linhas e os compostos nas colunas e no interior da matriz foram colocadas as intensidades relativas dos picos, obtidos na análise cromatográfica. Os dados foram analisados por análise dos componentes principais PCA (Crawley 2013).

Os dados de comportamento de preferência do ácaro predador em olfâmetro foram submetidos a testes de qui-quadrado para dados categóricos (Crawley 2013). Utilizou-se o programa R (R Development Core Team 2014) para a realização das análises estatísticas e a montagem dos gráficos.

## **Resultados**

### *Teste de indução*

A análise dos componentes principais (PCA) da composição de voláteis em folhas de milho limpa e infestada com ácaro-rajado explicou 62 % da variação (Figura 1). Houve o agrupamento das plantas convencional (3) e Bt (9) apenas com dois dias após a infestação, mostrando similaridade entre voláteis de plantas neste dia (Figura 1).

Analisando as plantas convencionais, limpa e infestada com ácaro-rajado por dois dias, detectou-se diferença entre as abundâncias relativas de compostos (Tabela 1). Plantas limpas apresentaram três compostos diferentes das infestadas, sendo os tempos de retenção de: 17,23;

18,81 e 20,34 minutos com abundância relativa de 2,1 %. Já as plantas infestadas produziram exclusivamente os compostos nos tempos de retenção de: 10,45; 13,84 e 15,41 minutos. Dentre os nove compostos de maior quantidade em cada amostra seis foram semelhantes entre elas. Porém, três compostos diminuíram de 1,6 a 2,6 % em plantas infestadas e quatro compostos aumentaram nessas plantas com variação de 1,1 a 4,9 % de abundância relativa (Tabela 1).

As plantas de milho Bt, limpas e infestadas com ácaro-rajado por dois dias, também foram diferentes em comparação as abundâncias relativas de compostos (Tabela 2). Comparando os nove compostos de maior quantidade em cada amostra, oito compostos foram semelhantes, sete diferem na abundância relativa. Sendo que três compostos diminuíram em plantas infestadas com uma variação de 0,2 a 7,1 % e quatro compostos aumentaram de 0,3 a 3,7 % nessas plantas. Nas plantas Bt limpas, o composto 10,46 minutos foi detectado apenas nesse grupo de planta e teve abundância relativa de 2,1 %. Já o composto 14,77 minutos foi detectado apenas em plantas Bt infestadas com abundância relativa de 2,1 % (Tabela 2).

Padronizou-se então o segundo dia após a infestação para os testes de olfatosmetria, pelo fato da PCA mostrar similaridade entre plantas de milho convencional e Bt neste dia (Figura 1). A análise descritiva dos dados detectou diferenças químicas dessas plantas infestadas comparando com as plantas limpas (Tabela 1 e Tabela 2).

#### *Preferência olfativa de N. californicus*

Os ácaros predadores não discriminaram entre odores de plantas de milho não infestadas e plantas de milho infestadas, tanto em plantas convencionais e Bt. O *N. californicus* também não foi capaz de diferenciar entre os odores de plantas de milho convencional infestadas e plantas de milho Bt infestadas (Figura 2).

#### *Parâmetros químicos*

Para a análise do perfil de voláteis de folha de milho foram selecionados os 9 compostos de maior quantidade em cada amostra, totalizando 15 compostos voláteis, sendo que 11 foram identificados (Figura 3).

Os compostos (*E*)-Hex-2-enal, Heptanal, (*E*)-Oct-2-enal,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -cisocimeno,  $\beta$ -Ciclocitral,  $\beta$ -ionona e Ciclosativena foram compatíveis com os encontrados na literatura (Udayagiri and Jones 1992; Ngi-Song et al. 2000; Rubio et al. 2008; Mandour et al. 2011;

Xavier et al. 2011; Dias et al. 2016; Lange et al. 2016; Pinto-Zevallos et al. 2016). Já os compostos 1-metil-6-(3-metilbuta-1,3-dienil)-7-oxabicyclo[4,1,0]heptano, (*E*)-7-tetradecen-1-ol e etiléster do ácido linolênico ainda não haviam sido relatados em folhas de milho em estudos anteriores. Dentre os 11 compostos identificados, 4 pertencem ao grupo dos terpenóides (3 monoterpenos e 1 sesquiterpeno), 3 aldeídos, 1 éter, 1 cetona, 1 álcool e 1 éster.

A análise dos componentes principais da composição de voláteis em folhas de milho convencional e Bt, limpa e infestada com ácaro-rajado explicou 92.8 % da variação (Figura 4). O componente principal 1 separou as plantas Bt limpas das demais. Já o componente principal 2 separou as plantas Bt infestadas do restante. As plantas convencionais limpas e infestadas ficaram próximas pela semelhança de dois compostos: 1-metil-6-(3-metilbuta-1,3-dienil)-7-oxabicyclo[4,1,0]heptano e um não identificado C13. Já os voláteis ciclosativina e os não identificados C8 e C9 afastaram a planta Bt limpa das demais. O distanciamento da planta Bt infestada das demais se deu pelos compostos (*E*)-Oct-2-enal e  $\alpha$ -pineno.

## Discussão

O teste de indução mostrou que plantas de milho limpas eram diferentes quimicamente de plantas infestadas com ácaro-rajado. Então, era esperado que plantas de milho infestadas com *T. urticae* seriam capazes de atrair o ácaro predador, tanto em plantas de milho convencional e Bt. Porém, a nossa hipótese não foi confirmada. Ou seja, ácaro predador *N. californicus* não diferiu entre odores de plantas de milho (convencional e Bt) limpas e infestadas. A segunda hipótese também não foi confirmada, onde o ácaro predador não distinguiu entre odores de plantas convencionais infestadas e plantas Bt infestadas

Estudos demonstram que plantas infestadas por ácaro-rajado produzem voláteis capazes de atrair inimigos naturais. Um exemplo foi a atração do ácaro predador *N. californicus* por plantas de feijão infestadas por ácaro-rajado (Shimoda et al. 2005). Isso mostra que um mesmo herbívoro pode ou não acionar defesas em diferentes plantas. Além disso, Gardiner et al. (2005) estudando plantas de lúpulo *Humulus lupulus* Lineu (Rosales: Cannabaceae) infestadas por ácaro-rajado *versus* plantas limpas, comprovaram que na mesma planta pode ocorrer diferenciação na preferência de predadores distintos. Onde o ácaro predador *Neoseiulus fallacis* (Acari: Phytoseiidae) foi atraído por plantas infestadas, mas o ácaro predador *Galendromus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae) não foi. Isso possibilita novas pesquisas no forrageamento de outros inimigos naturais por plantas de milho infestadas por ácaro-rajado.

Outro fator que está diretamente correlacionado com a indução de defesa indireta é a cultivar (Dicke et al. 1990). Tahmasebi et al. (2014) estudaram quatro cultivares de feijão infestados com ácaro-rajado e observaram que apenas as cultivares Naz e G11867 foram capazes de atrair o ácaro predador *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae). Demonstrando assim, uma variação na produção de voláteis dentro de uma mesma espécie de planta. Isso mostra que os estudos devem ser expandidos para várias cultivares.

A análise dos componentes principais da composição de voláteis em folhas de milho mostrou uma diferenciação química dos grupos de planta em estudo. Porém, essa diferença não foi capaz de atrair o ácaro predador. Os compostos detectados em plantas infestadas convencionais foram: (*E*)-Hex-2-enal; heptanal;  $\beta$ -cisocimeno;  $\beta$ -Ciclocitral; 1-metil-6-(3-metilbuta-1,3-dienil)-7-oxabicyclo[4,1,0]heptano;  $\beta$ -ionona; (*E*)-7-tetradecen-1-ol. Já em Bt foram: (*E*)-Hex-2-enal; heptanal; (*E*)-Oct-2-enal;  $\alpha$ -pineno;  $\beta$ -cisocimeno;  $\beta$ -Ciclocitral;  $\beta$ -ionona; (*E*)-7-tetradecen-1-ol; Etiléster do ácido linolênico. Esses resultados químicos não são compatíveis com os voláteis induzidos por ácaro-rajado em plantas de feijão onde detectou os seguintes compostos (*E*)-Hex-2-enal, (*Z*)-3-hexen-1-ol, (*Z*)-3-hexenil acetate, salicilato de metila, linalool, (*Z*)- $\beta$ -ocimeno, (*Z*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno, (*E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno,  $\beta$ -cariofileno, (*E,E*)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno. O conjunto desses compostos foi capaz de atrair o ácaro predador *N. californicus* (Shimoda et al. 2005). Isso indica que, mesmo que as plantas de milho tenham mudado quimicamente após a infestação do ácaro-rajado, os voláteis produzidos não são capazes de atrair o *N. californicus*. Essa mudança química permite novos estudos com diferentes predadores, pois os voláteis produzidos podem ser atrativos a outros inimigos naturais.

Além dos voláteis já citados na literatura em milho, no presente estudo 1-metil-6-(3-metilbuta-1,3-dienil)-7-oxabicyclo[4,1,0]heptano, (*E*)-7-tetradecen-1-ol e etiléster do ácido linolênico foram identificados pela primeira vez em milho. Isso possivelmente ocorreu pelo fato de não ter relatos na literatura de voláteis do milho Pioneer 30F35 e 30F35 Hx. Degen et al. (2004) comprovaram que dentre 31 variedades de milho ocorre uma diferenciação em quantidade total de voláteis e os perfis de voláteis são altamente variáveis em cada genótipo.

As evidências deste estudo mostram uma diferenciação química nos grupos de plantas estudadas. Contudo, as mesmas não são capazes de atrair o *N. californicus*. Tal fato potencializa a chance de *T. urticae* alcançar o *status* de praga em milho por reduzir a chance de encontro entre predador e presa.

## Referências

- Arimura GI, Kost C, Boland W (2005) Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1734:91–111.
- Crawley MJ (2013) *The R Book*, 2nd edn. JohnWiley & Sons, Chichester
- Degen T, Dillmann C, Marion-Poll F, Turlings TCJ (2004) High genetic variability of herbivore-induced volatile emissions within a broad range of maize inbred lines. *Plant Physiol* 135:1928–1938.
- Dias AM, Pareja M, Laia M, et al (2016) Attraction of *Telenomus podisi* to volatiles induced by *Euschistus heros* in three different plant species. *Arthropod Plant Interact* 10:419–428.
- 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.
- Fadini MAM, Mendes SM, Araujo OG, Waquil JM (2010) Os Ácaros São Pragmas do Milho no Brasil? *Embrapa Milho e Sorgo* 14.
- Garcia YM, Guedes MNS, Rufini JCM, et al (2016) Volatile compounds identified in Barbados Cherry “ BRS - 366 Jaburu .” *Sci Electron Arch* 3:67–73.
- Gardiner MM, Eigenbrode SD, Cervantes DE, Barbour JD (2005) Response of *Neoseiulus fallacis* Garmen and *Galendromus occidentalis* Nesbitt (Acari: Phytoseiidae) to *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)- damaged hop *Humulus lupulus* (L.) (Urticales: Cannabaceae). *Agric For Entomol* 7:245–251.
- Kant MR, Jonckheere W, Knecht B, et al (2015) Mechanisms and ecological consequences of plant defence induction and suppression in herbivore communities. *Ann Bot* 115:1015–1051.
- Lange ES De, Farnier K, Gaudillat B, Turlings TCJ (2016) Comparing the attraction of two parasitoids to herbivore-induced volatiles of maize and its wild ancestors , the teosintes. *Chemoecology* 26:33–44.
- Mandour NS, Kainoh Y, Ozawa R, et al (2011) Effects of Time After Last Herbivory on the Attraction of Corn Plants Infested with Common Armyworms to a Parasitic Wasp *Cotesia kariyai*. *J Chem Ecol* 37:267–272.
- Mello MO, Silva Filho MC (2002) Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian J Plant Physiol* 14:71–81.
- Ngi-Song AJ, Njagi PGN, Torto B, Overholt WA (2000) Identification of behaviourally active

- components from maize volatiles for the stemborer parasitoid *Cotesia flavipes* cameron (hymenoptera: braconidae). *Insect Sci Applic* 20:181–189.
- Paulo PD, Fadini MAM, Dominiquini AB, et al (2017a) Cry protein in the predatory mite *Neoseiulus californicus* and spider mite *Tetranychus urticae* prey fed with transgenic maize. *Brazillian J Biol* 10–12.
- Paulo PD, Lima CG, Dominiquini AB, et al (2017b) Maize plants produce direct resistance elicited by *Tetranychus urticae* Koch (Acari : Tetranychidae). *Brazillian J Biol* 1–5.
- Pinto-Zevallos DM, Strapasson P, Zarbin PHG (2016) Herbivore-induced volatile organic compounds emitted by maize: Electrophysiological responses in *Spodoptera frugiperda* females. *Phytochem Lett* 16:70–74.
- Price PW, Bouton CE, Gross P, et al (1980) Interactions Among Three Trophic Levels : Influence of Plants on Interactions Between Insect Herbivores and Natural Enemies. *Annu Rev Ecol Syst* 11:41–65.
- Prokopy RJ (1994) Integration in orchard pest and habitat management: A review. *Agric Ecosyst Environ* 50:1–10.
- R Core Team. A Language and Environment for Statistical Computing. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna*. (2014). Available at: <http://www.r-project>.
- Roda AL, Baldwin IT (2003) Molecular technology reveals how the induced direct defenses of plants work. *Basic Appl Ecol* 4:15–26.
- Rubio A, Rambla JL, Santaella M, et al (2008) Cytosolic and plastoglobule-targeted carotenoid dioxygenases from *Crocus sativus* are both involved in  $\beta$ -ionone release. *J Biol Chem* 283:24816–24825.
- Schaller A (2008) *Induced Plant Resistance to Herbivory*, 1st edn. Springer Netherlands, Stuttgart, Germany
- Schoonhoven LM, Van Loon JJ, Dicke M (2006) *Insect-Plant Biology*, 2nd edn. Oxford, Oxford University Press
- Shimoda T, Ozawa R, Sano K, et al (2005) The involvement of volatile infochemicals from spider mites and from food-plants in prey location of the generalist predatory mite *Neoseiulus californicus*. *J Chem Ecol* 31:2019–2032.
- Stephuhn A, Baldwin IT (2008) Induced defenses and the cost-benefit paradigm. In: *Induced plant resistance to herbivory*, 1st edn. Springer Netherlands, Stuttgart, Germany, pp 61–83
- Tahmasebi Z, Mohammadi H, Arimura Gichiro, et al (2014) Herbivore-induced indirect

- defense across bean cultivars is independent of their degree of direct resistance. *Exp Appl Acarol* 63:217–239.
- Taiz L, Zeiger E (2008) *Fisiologia vegetal*, 4th edn. Artmed, Porto Alegre
- Thaler JS, Fidantsef AL, Duffey SS, Bostock RM (1999) Trade-offs in plant defense against pathogens and herbivores: a field demonstration of chemical elicitors of induced resistance. *Journal of Chemical Ecology* 25:1597-1609.
- Torres JB, Ruberson JR (2008) Interactions of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in genetically engineered cotton with predatory heteropterans. *Transgenic Res* 17:345–354.
- Turlings TCJ, Wäckers F (2004) Recruitment of predators and parasitoids by herbivore-injured plants. *Adv Insect Chem Ecol* 2:21–75.
- Udayagiri S, Jones RL (1992) Role of plant odor in parasitism of European corn borer by braconid specialist parasitoid *Macrocentrus grandii* Goidanich: Isolation and characterization of plant synomones eliciting parasitoid flight response. *J Chem Ecol* 18:1841–1855.
- Xavier LMS, Laumann RA, Borges M, et al (2011) *Trichogramma pretiosum* attraction due to the *Elasmopalpus lignosellus* damage in maize. *Pesq agropec bras* 46:578–585.

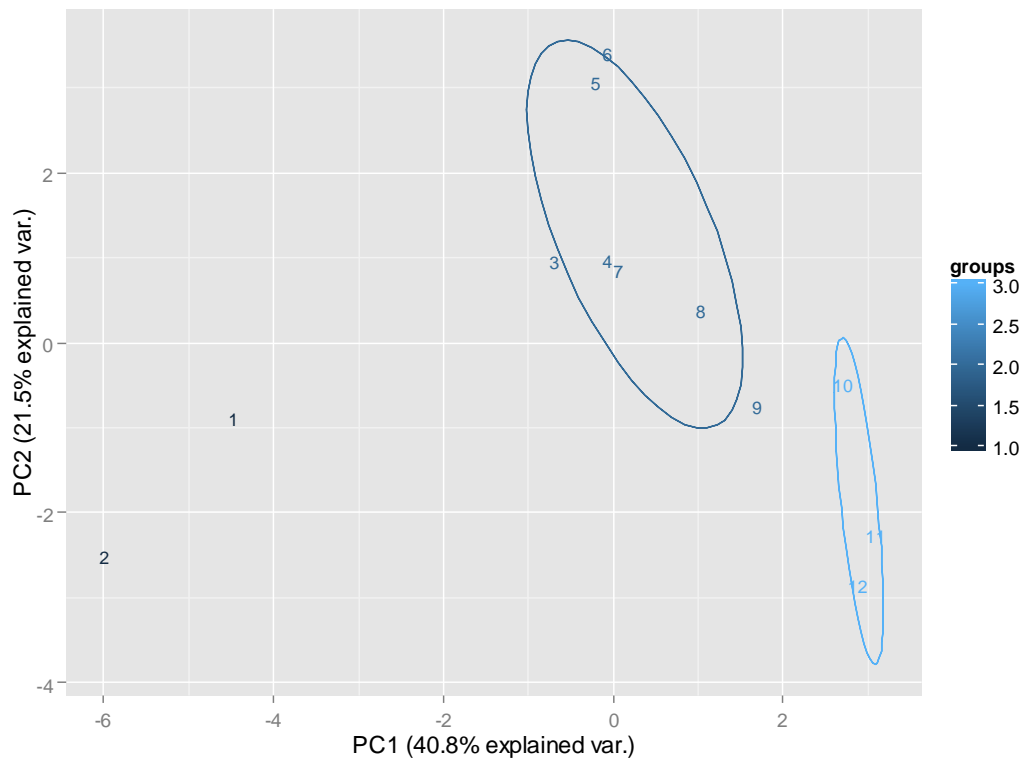


Figura 1: Análises de componentes principais (PCA) dos compostos voláteis presentes nas folhas de milho convencional (30F35) e Bt (30F35 Hx) limpas e com diferentes dias de infestação por *Tetranychus urticae*. (1) planta convencional limpa; (2) convencional com 1 dia de infestação; (3) convencional com 2 dias de infestação; (4) convencional com 3 dias de infestação; (5) convencional com 4 dias de infestação; (6) convencional com 5 dias de infestação; (7) planta Bt limpa; (8) Bt com 1 dia de infestação; (9) Bt com 2 dias de infestação; (10) Bt com 3 dias de infestação; (11) Bt com 4 dias de infestação; (12) Bt com 5 dias de infestação.

Tabela 1: Diferença descritiva da porcentagem relativa da área compostos químicos detectados via CG/MS em plantas de milho convencional (30F35) limpas e com dois dias de infestação por ácaro-rajado *Tetranychus urticae*.

Tempo de retenção (min) de cada composto	Planta limpa (% relativa da área)	Planta com 2 dia de infestação (% relativa da área)	Diferença (%)
3,23	22,8	20,2	2,5
6,07	4,4	1,8	2,6
10,45		2,3	
13,84		2,3	
14,61	3,7	4,8	-1,1
15,16	12,6	15,5	-2,9
15,41		1,8	
17,23	2,1		
17,33	2,0	6,9	-4,9
18,81	2,1		
19,28	8,5	6,9	1,6
20,34	2,1		

Tabela 2: Diferença descritiva da porcentagem relativa da área compostos químicos detectados via CG/MS em plantas de milho Bt (30F35Hx) limpas e com dois dias de infestação por ácaro-rajado *Tetranychus urticae*.

Tempo de retenção (min) de cada composto	Planta limpa (% relativa da área)	Planta com 2 dia de infestação (% relativa da área)	Diferença (%)
3,24	26,8	19,7	7,1
10,46	2,1		
13,83	2,7	2,5	0,2
14,62	8,6	10,2	-1,6
14,77		2,1	
14,94	2,0	2,3	-0,3
15,17	14,6	18,3	-3,7
15,42	3,8	3,3	0,4
17,34	3,7	6,8	-3,1
19,28	4,5	4,5	0,0

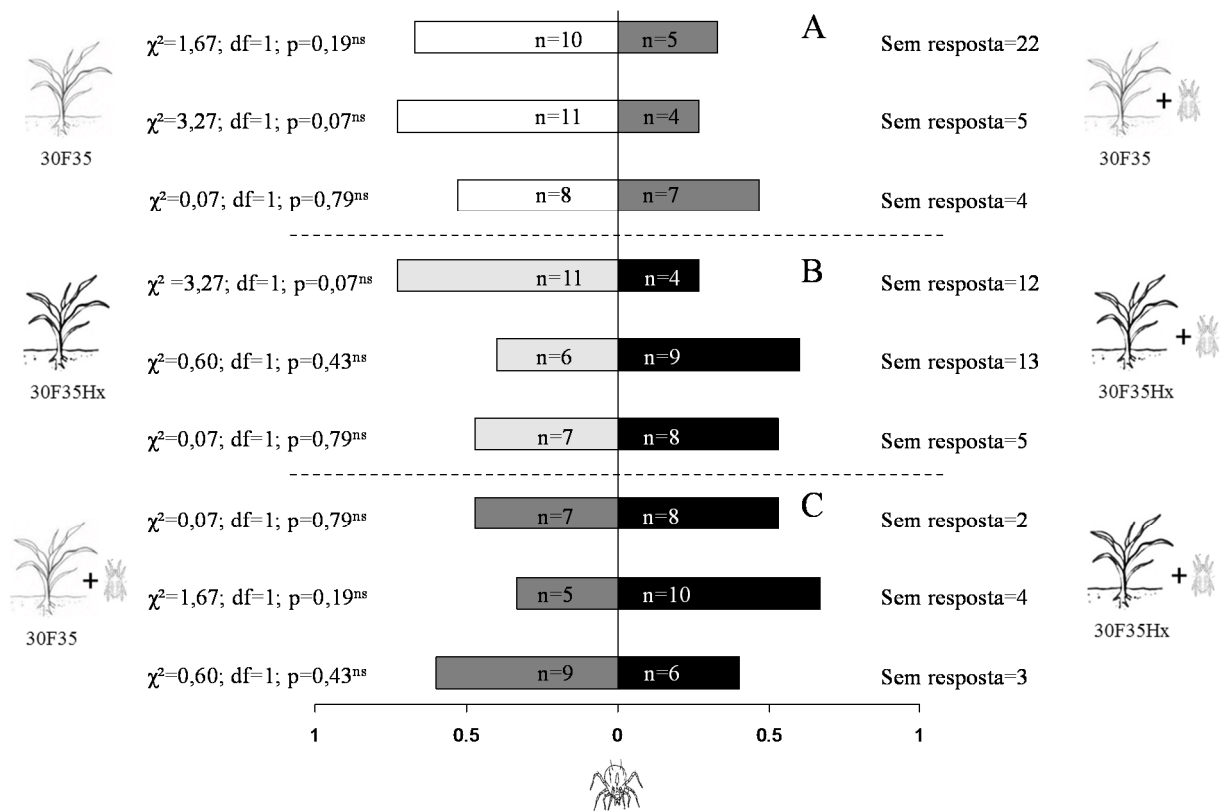


Figura 2: Resposta de ácaros predadores *Neoseiulus californicus* em olfatômetro em Y. (A) Plantas de milho convencional limpas X Plantas de milho convencional infestadas por *Tetranychus urticae*; (B) Plantas de milho Bt limpas X Plantas de milho Bt infestadas por *T. urticae*; (C) Plantas de milho convencional infestadas por *T. urticae* X Plantas de milho Bt infestadas por *T. urticae*. Cada barra representa um único experimento replicado envolvendo 15 libertações de ácaros com resposta (teste do qui-quadrado).

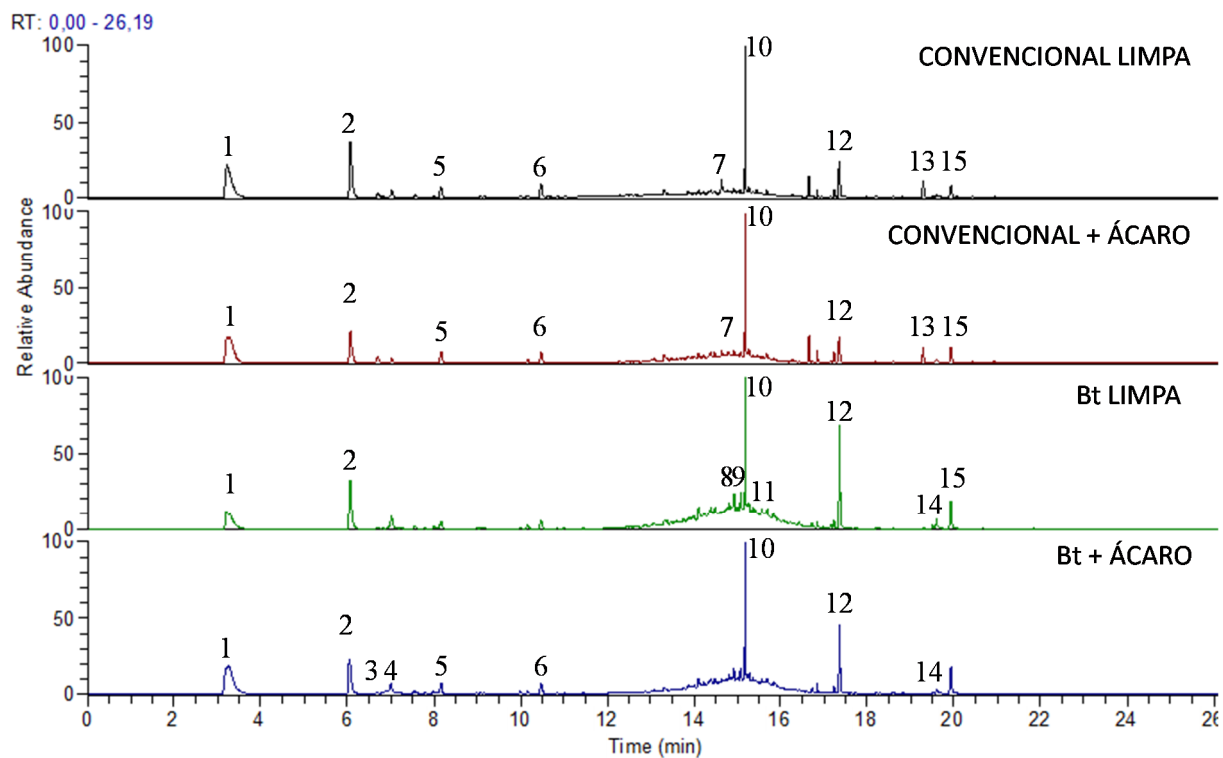


Figura 3: Cromatogramas dos perfis de compostos voláteis extraídos de folhas milho convencional (30F35) e Bt (30F35 Hx), limpas e infestadas por *Tetranychus urticae*. Os compostos pré-identificados foram: 1 = (*E*)-Hex-2-enal; 2 = heptanal; 3 = (*E*)-Oct-2-enal; 4 =  $\alpha$ -pineno; 5 =  $\beta$ -cisocimeno; 6 =  $\beta$ -Ciclocitral; 7 = 1-metil-6-(3-metilbuta-1,3-dienil)-7-oxabicyclo[4,1,0]heptano; 8 = não identificado = C8; 9 = não identificado = C9; 10 =  $\beta$ -ionona; 11 = Ciclosativena; 12 = (*E*)-7-tetradecen-1-ol; 13 = não identificado = C13; 14 = Etiléster do ácido linolênico; 15 = não identificado = C15.

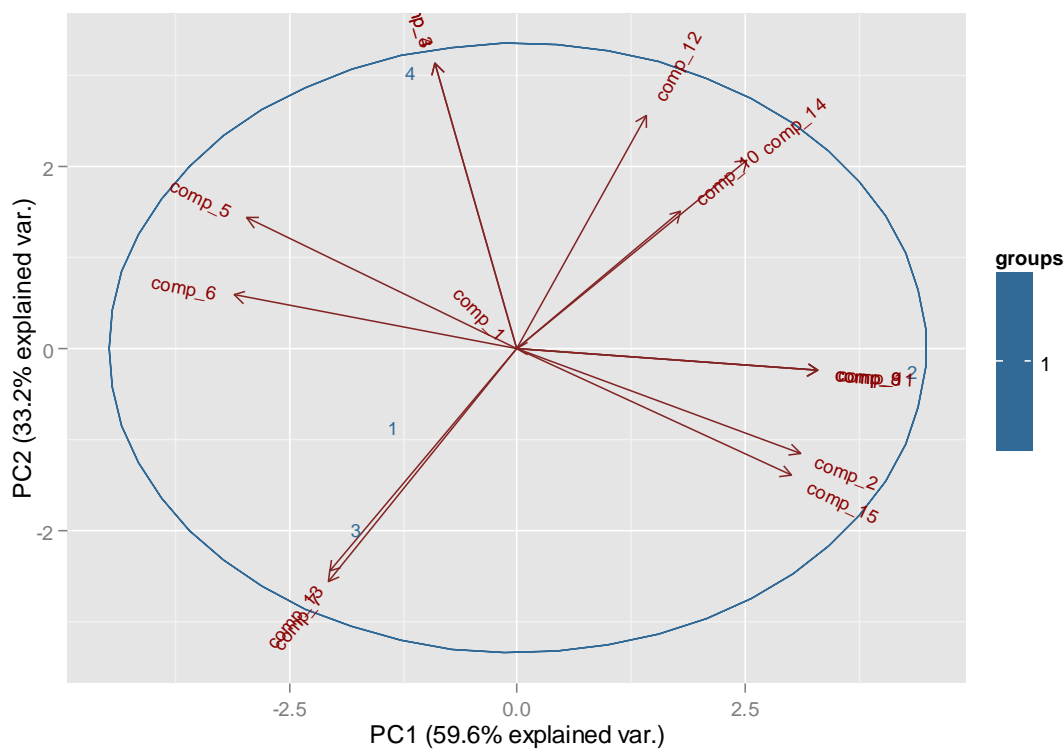


Figura 4: Análises dos componentes principais (PCA) dos compostos voláteis presentes nas folhas de milho convencionais (30F35) e Bt (30F35 Hx) limpas e infestadas por *Tetranychus urticae* por dois dias. (1) planta convencional limpa; (2) planta Bt limpa; (3) planta convencional infestada; (4) planta Bt infestada. Os compostos são: comp\_1 = (*E*)-Hex-2-enal; comp\_2 = heptanal; comp\_3 = (*E*)-Oct-2-enal; comp\_4 =  $\alpha$ -pineno; comp\_5 =  $\beta$ -cisocimeno; comp\_6 =  $\beta$ -Ciclocitral; comp\_7 = 1-metil-6-(3-metilbuta-1,3-dienil)-7-oxabicyclo[4,1,0]heptano; comp\_8 = não identificado = C8; comp\_9 = não identificado = C9; comp\_10 =  $\beta$ -ionona; comp\_11 = Ciclosativena; comp\_12 = (*E*)-7-tetradecen-1-ol; comp\_13 = não identificado = C13; comp\_14 = Etiléster do ácido linolênico; comp\_15 = não identificado = C15.

## ARTIGO 2

### **PREFERÊNCIA DO ÁCARO PREDADOR *Neoseiulus californicus* POR VOLÁTEIS DE MILHO INFESTADO POR MÚLTIPLOS HERBÍVOROS**

Artigo escrito conforme as normas do periódico Pest Management Science

#### **Resumo**

**CONHECIMENTO PRÉVIO:** A defesa induzida indireta pode sofrer alteração por ataque simultâneo de herbívoros diferentes. Além disso, a defesa induzida pode interagir com as defesas constitutivas. Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar se o ácaro-rajado isolado ou em infestação múltipla com a lagarta-do-cartucho, é capaz de eliciar defesa induzida indireta em plantas de milho convencional e Bt. **RESULTADOS:** Não houve discriminação pelo ácaro predador por voláteis de plantas de milho sob infestação simples e múltipla, tanto em convencionais como em Bt. O predador *N. californicus* também não foi capaz de distinguir entre os voláteis de plantas de milho convencional e Bt sob infestações múltiplas. Ocorreu modificações químicas entre plantas sob infestação simples e múltipla. **CONCLUSÃO:** Desta forma, conclui-se que mesmo havendo diferenças químicas, o predador *N. californicus* não foi capaz de distinguir plantas com diferentes infestações. Isso demonstra que infestações múltiplas não afetam o forrageamento do ácaro predador.

**Palavras-chave:** lagarta-do-cartucho; ácaro-rajado; defesa induzida indireta; interação de defesas plantas

**PREFERENCE OF THE PREDATORY MITE *Neoseiulus californicus* BY  
VOLATILES OF INFESTED MAYZE BY MULTIPLE HERBIASES**

**Abstract**

**BACKGROUND:** Indirect induced defense may be altered by simultaneous attack of different herbivores. In addition, induced defense can interact with the constitutive defenses. Thus, the objective of this study was to evaluate whether the two-spotted spider mite (= A) alone or in multiple infestation with the fall armyworm (= L) is able to elicit indirect induced defense in conventional (= conv) and Bt (= Bt) maize plants. **RESULTS:** There was no discrimination by the predatory mite by volatiles of maize plants under single and/or multiple infestation, both in conventional and in Bt. The predator *N. californicus* was also unable to distinguish between the volatiles of conventional and Bt maize plants under multiple infestations. There were chemical changes between plants under single and multiple infestations. **CONCLUSION:** In this way, it was concluded that even if there were chemical differences, the predator *N. californicus* was not able to distinguish the plants with different infestations. This demonstrates that multiple infestations do not affect the foraging of the predatory mite.

**Keywords:** fall armyworm; two-spotted spider mite; indirect induced defense; interaction of plant defenses

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas vivem em uma comunidade complexa que incluem herbívoros, polinizadores, microorganismos e plantas vizinhas<sup>1,2</sup>. Portanto, além de lidar com fatores abióticos, é necessário conviver com fatores bióticos que podem resultar em interações positivas ou negativas<sup>3</sup>. A herbivoria é um fator biótico em que a planta responde com vasta gama de defesas induzidas<sup>4</sup>. Dentre essas, a defesa induzida indireta é a produção de compostos orgânicos voláteis que promovem a atração de inimigos naturais dos herbívoros<sup>4-9</sup>.

As plantas também possuem defesas constitutivas contra herbívoros que são expressas de forma contínua<sup>10</sup>. Essas podem ser barreiras físicas (tricomas e espinhos entre outros) e barreiras químicas (metabólitos secundários)<sup>11</sup>. Ou ainda podem ocorrer por interferência humana como as plantas geneticamente modificadas com genes provenientes da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt)<sup>12</sup>. Estudos demonstram que defesas constitutivas podem alterar defesas induzidas<sup>13,14</sup>.

O ataque simultâneo de herbívoros pode também alterar positivamente ou negativamente a emissão de compostos orgânicos voláteis de outra espécie de herbívoro<sup>15-17</sup>. Segundo Boer *et al.*<sup>18</sup> os ácaros predadores *Phytoseiulus persimilis* (Acarina: Phytoseiidae) preferiram os compostos orgânicos voláteis induzidos por múltiplos herbívoros (*Tetranychus urticae* Acari: Tetranychidae + *Spodoptera exigua* Lepidoptera: Noctuidae) do que os compostos orgânicos voláteis induzidos por cada herbívoro separadamente em plantas de pepino e feijão. No feijão, verificou-se que a maioria dos compostos foi mais fortemente induzida por herbivoria múltipla do que pela soma de cada um dos herbívoros separadamente. Os autores sugerem que os dois herbívoros que se alimentam juntos na mesma planta têm um efeito aditivo sobre a emissão volátil. Isso indica que, possivelmente, as vias biossintéticas podem atuar como sinergistas. Já em pepino, na herbivoria múltipla, dois compostos voláteis foram menos induzidos do que a soma dos dois herbívoros separadamente, sugerindo que sua indução foi suprimida pela alimentação simultânea de *T. urticae* e *S. exigua*. Resta saber se esta redução é causada por uma interação negativa entre as vias biossintéticas induzidas por cada herbívoro, ou ocorreu uma redução na alimentação de uma ou ambas espécies herbívoras como resultado da alimentação na mesma planta.

As rotas metabólicas do ácido salicílico (AS) e do ácido jasmônico (AJ) possuem papéis essenciais nas vias de defesa de plantas e na produção de compostos orgânicos voláteis

induzidos por herbívoros <sup>19</sup>. Assim, estudos com ataques múltiplos de herbívoros são necessários para entender como cada rota metabólica é acionada ou como podem interagir.

Neste trabalho, objetivou-se avaliar se voláteis de milho convencional e Bt induzidos herbivoria simples (ácaro-rajado) e múltiplas (ácaro-rajado + lagarta-do-cartucho) foram capazes de atrair o predador *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae). Testou-se a hipótese nula (H0) de que plantas de milho convencional e Bt, infestadas por ácaro-rajado e ácaro-rajado + lagarta-do-cartucho, não são capazes de produzir voláteis atrativos ao *N. californicus*. Também investigou-se se a transgenia de plantas de milho Bt pode interferir na capacidade de indução de defesa induzida indireta com infestações múltiplas de ácaro-rajado *T. urticae* e lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Testando-se a hipótese nula (H0) de que plantas de milho Bt seriam igualmente capazes de induzir defesas indiretas ao ácaro-rajado com a lagarta-do-cartucho após o ataque simultâneo, como as plantas de milho convencional.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Criações de ácaro-rajado e ácaro predador**

Foram semeadas sementes de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) em vasos plásticos (6,3 l) com substrato Terral Solo® e mantidos em casa-de-vegetação da Universidade Federal de São João Del Rei, Campus Sete Lagoas, MG. As plantas de feijão, antes da infestação, foram mantidas isoladas em gaiolas teladas, com o propósito de evitar a entrada de herbívoros. O solo nos vasos foi irrigado sempre que necessário. Para o estabelecimento da criação, ácaros foram obtidos nas dependências da Embrapa Milho e Sorgo em sorgo, Sete Lagoas, MG. Foram identificados com auxílio do microscópio estereoscópio e transferidos para plantas de feijão que possuía duas folhas cotiledôneas completamente expandidas, sem nenhum tratamento fitossanitário. Para a manutenção da criação plantas de feijão sem infestação com duas folhas cotiledôneas completamente expandidas foram adicionadas na criação sempre que necessário. A empresa Koppert forneceu os ácaros predadores *N. californicus* utilizados nesse experimento através do produto SPICAL®.

### **2.2 Cultivo das plantas de milho**

As sementes de milho que foram utilizadas no experimento são híbrido comercial Pioneer® 30F35 (milho convencional) e 30F35Hx (Cry1F). Em vasos plásticos (1,0 l) de volume com substrato Terral Solo® duas sementes de milho foram semeadas, os vasos permaneceram em casa-de-vegetação. O desbaste e adubação com sulfato de amônio (0,2 g) por vaso foram realizados após 15 dias da semeadura. As plantas de milho foram divididas em dois grupos sendo: plantas infestadas com ácaro-rajado e plantas infestadas com ácaro-rajado + lagarta-do-cartucho. Para o grupo de plantas infestadas com ácaro-rajado, 20 dias após a semeadura, 10 fêmeas foram isoladas em uma folha, com auxílio de cola entomológica. A cola foi aplicada na base da folha, impedindo que as fêmeas se deslocassem para o restante da planta. Já o grupo de plantas infestadas com ácaro-rajado + lagarta-do-cartucho, além da infestação do ácaro-rajado que foi idêntica ao grupo anterior, uma lagarta de terceiro ínstar foi isolada com “clip cage”. Isto foi realizado em uma folha diferente da infestação dos ácaros-rajado, também 20 dias após a semeadura.

### 2.3 Teste de olfatometria

Plantas com 48h após infestação foram utilizadas para a realização dos testes no olfatômetro em Y, sendo os tratamentos: Planta Convencional Infestada com *T. urticae* X Planta Convencional Infestada com *T. urticae* + *S. frugiperda*; Planta Bt Infestada com *T. urticae* X Planta Bt Infestada com *T. urticae* + *S. frugiperda*; Planta Convencional Infestada com *T. urticae* + *S. frugiperda* X Planta Bt Infestada com *T. urticae* + *S. frugiperda*. Cada tratamento constituiu-se de três repetições verdadeiras (i.e. fonte de odores) e de cada repetição obteve-se 15 respostas de ácaros predadores.

Para estudar a resposta de *N. californicus* foi utilizado um olfatômetro em tubo Y (com as dimensões de 21,0 cm de comprimento de cada braço e 3,5 cm de diâmetro). Para facilitar o deslocamento dos ácaros predadores no meio do tubo de vidro na forma de um Y possuía um fio de metal também em forma de Y. Nos braços do tubo foram ligados recipientes constituídos por uma caixa de plástico. Já a base do tubo foi ligada a uma bomba de vácuo que direcionava o fluxo dos recipientes para os braços do tubo Y. Para calibrar a velocidade de entrada de ar em cada braço do olfatômetro um fluxômetro foi conectado entre o recipiente e o braço do tubo. A velocidade do vento em cada braço do tubo foi de 0,50 m/s.

Os predadores foram colocados individualmente no ponto inicial no fio de aço, foi considerado que o ácaro predador respondeu quando o mesmo atingisse 1/3 de um dos braços.

Já se o ácaro predador não ultrapassou 1/3 de qualquer dos braços em 5 minutos foi considerado sem resposta. As fontes de odores foram invertidas a cada cinco respostas. Para cada tratamento foi observado 45 respostas do ácaro predaor.

#### **2.4 Análise química dos voláteis das plantas**

A análise química foi realizada utilizando a microextração em fase sólida (SPME) no modo headspace e cromatógrafo a gás Trace GC Ultra (Thermo Scientific, San Jose, CA) acoplado a espectrômetro de massas Polaris Q (Thermo Scientific, San Jose, CA), sistema GC-MS, com um analisador do tipo ion-trap<sup>20</sup>. Para essa análise foi sorteada uma repetição verdadeira onde retirou-se uma amostra de folha (0,250 g) de cada planta, que foram transferidas para um frasco de headspace (25 ml) e maceradas com auxílio de um bastão de vidro. Os frascos foram lacrados com lacre de alumínio e septo de borracha e acondicionados no congelador a -18 ° C até à análise. Cada amostra antes da exposição da fibra de microextração em fase sólida (SPME) foi aquecida por 5 minutos a 65°C. Em seguida, acima da folha macerada de milho, a fibra semipolar Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno (PDMS/DVB) de 65 µm foi exposta à fase gasosa, nos frascos de headspace, a uma temperatura de 65° C por um período de 20 minutos. Após a exposição da fibra PDMS/DVB com a amostra a mesma foi deixada inserida no injetor do cromatógrafo a 200° C, por 5 minutos, para dessorção dos voláteis coletados.

As condições para o cromatógrafo a gás são 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; aquecimento com temperatura programada (40° C por 2 minutos, em seguida, um gradiente de 8° C/min até 100° C, temperatura na qual manteve-se a isoterma por 2 minutos e depois 15° C/min até 180° C, temperatura na qual manteve-se a isoterma por 2 minutos, e por fim um gradiente de 15° C/min até 245° C, temperatura na qual manteve-se a isoterma por 3 minutos). O detector foi mantido no modo de varredura (*full scan*, 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: comprimento (30 m), diâmetro interno (0,25 mm) e espessura de filme (0,25 µm) (Agilent Technologies INC, Alemanha), específica para análise por espectrometria de massas. A identificação dos componentes foi realizada comparando os espectros de massas presentes nas bibliotecas NIST/EPA/NIH (2005).

## 2.5 Análises estatísticas

O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado, com 3 tratamentos e 3 repetições por tratamento. Para os dados químicos os valores de tempo de retenção e intensidade dos picos foram retirados do programa Xcalibur 1.4 da Thermo Electron Corporation e transferidos para o Microsoft Office Excel 2013. Onde realizou-se a seleção dos picos, através de um corte de nove compostos de maior área em cada cromatograma. A cada tempo de retenção foi relacionado um composto, baseando-se nos espectros de massa e nos índices de retenção. Foi construída, uma tabela com as amostras nas linhas e os compostos nas colunas e no interior da matriz foram colocadas as intensidades relativas dos picos, obtidos na análise cromatográfica. Os dados foram analisados por análise dos componentes principais PCA<sup>21</sup>. Os dados de comportamento de preferência do ácaro predador em olfâmetro foram submetidos ao teste de qui-quadrado para dados categóricos<sup>21</sup>. Utilizou-se o programa R (R Development Core Team 2014)<sup>22</sup> para a realização das análises estatísticas e a montagem dos gráficos.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Preferência olfativa de *N. californicus*

Não houve preferência dos ácaros predadores *N. californicus* entre os voláteis de plantas de milho infestadas por *T. urticae* frente à infestação múltipla de *T. urticae* + *S. frugiperda*, tanto em plantas de milho convencionais quanto em plantas Bt. O mesmo ocorreu na preferência de voláteis de plantas de milho convencional e Bt sobre infestação múltipla (ácaro+lagarta) (Figura 1).

### 3.2 Parâmetros químicos

Foram selecionados os nove compostos de maior quantidade em cada amostra para a análise do perfil de voláteis. Totalizando em 13 compostos nos quatro grupos de plantas, sendo que 10 foram pré-identificados sendo, 3 monoterpenos, 3 aldeídos, 1 éter, 1 cetona, 1 álcool e 1 éster (Figura 2).

Dentre os 10 compostos, os (*E*)-Hex-2-enal, Heptanal, (*E*)-Oct-2-enal,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -cisocimeno,  $\beta$ -Ciclocitral e  $\beta$ -ionona já foram descritos em plantas de milho na literatura<sup>23-29</sup>. Porém, os compostos 1-metil-6-(3-metilbuta-1,3-dienil)-7-oxabicyclo[4,1,0]heptano, (*E*)-7-tetradecen-1-ol e etiléster do ácido linolênico foram identificados pela primeira vez em plantas de milho.

A análise dos componentes principais (PCA) da composição de voláteis em folhas de milho convencional e Bt, com infestação simples e múltipla, explicou 80,1% da variação (Figura 3). O componente principal 1 separou as plantas convencionais com infestação simples e Bt com infestação múltipla das demais. Já o componente principal 2 separou as plantas convencionais das plantas Bt. As plantas convencionais com infestação simples se distanciaram das demais pela presença do composto não identificado C11. Diferentemente, as plantas Bt com infestação simples afastaram-se das demais pelos compostos (*E*)-Oct-2-enal e (*E*)-7-tetradecen-1-ol. O distanciamento das plantas convencionais com infestação múltipla das demais deu-se pelo composto heptanal. Já o volátil não identificado C9 afastou a planta Bt com infestação múltipla das demais.

#### 4 DISCUSSÃO

O ácaro predador *N. californicus* não apresentou preferência entre voláteis de plantas de milho (convencional e Bt) com infestações simples e múltipla. Isto indica que a hipótese da herbivoria múltipla mudar a atratividade do predador, não foi aceita. A segunda hipótese também não foi confirmada, onde o ácaro predador não distinguiu entre voláteis de plantas convencionais e Bt com infestação múltipla.

Estudos demonstraram que plantas podem responder de formas diferentes quando atacadas por um ou mais herbívoros<sup>30</sup>. Uma resposta da planta que pode ser alterada é a produção de compostos voláteis e, conseqüentemente, pode ocorrer uma alteração na atração dos inimigos naturais<sup>31</sup>. A atração do inimigo natural pode aumentar quando a planta está sob herbivoria múltipla. Por exemplo, plantas de pimentão infestadas com apenas um herbívoro, ou ácaro-rajado ou pulgão-verde *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), foram menos atrativas ao predador *Macrolophus caliginosus* (Heteroptera: Miridae) do que plantas infestadas com os dois herbívoros simultaneamente. Isto demonstra que os voláteis produzidos por herbivoria múltipla são mais atrativos ao predador do que os voláteis induzidos por apenas um herbívoro

Porém, em plantas de feijão-de-lima, o ácaro predador *P. persimilis* preferiu plantas infestadas por ácaro-rajado do que plantas infestadas, simultaneamente, por ácaro-rajado e mosca-branca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). Os autores afirmaram que essa interferência foi pela redução na emissão do composto (*E*)- $\beta$ -ocimeno em plantas com infestação múltipla. Mostrando assim que a infestação múltipla pode reduzir a atração dos inimigos naturais <sup>33</sup>. Outro exemplo demonstra que em plantas de milho, a vespa parasitoide *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae) foi mais atraída por plantas infestadas por *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) do que as plantas infestadas simultaneamente por *S. littoralis* e *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) <sup>34</sup>.

Além disso, a infestação múltipla pode não alterar a atratividade dos inimigos naturais, como foi encontrado no presente estudo. Um estudo que comparava a neutralidade na atração de inimigos naturais, mostra que o ácaro predador *Neoseiulus baraki* (Acari: Phytoseiidae) não distingue os odores de frutos de coqueiros infestados por *Aceria guerreronis* (Acari: Eriophyidae) ou *Steneotarsonemus concavuscutum* (Acari: Tarsonemidae) dos odores de frutos infestados, simultaneamente, por esses herbívoros <sup>35</sup>.

Os voláteis libertados em resposta à alimentação de herbívoros são geralmente indicadores detectáveis da presença de herbívoros e podem potencialmente atrair inimigos naturais para próximo de suas presas <sup>36</sup>. Porém, como o acaro-rajado não é uma praga que causa danos severos a cultura do milho, possivelmente essas plantas não coevoluíram para uma produção de compostos eficientes na atração de ácaros predadores. Além disso, quando as plantas estavam sob herbivoria múltipla ocorreu uma mudança na produção de compostos, que não foram atrativos ao ácaro predador *N. californicus*, porém essa mudança pode ser específica para algum inimigo natural da lagarta-do-cartucho, a qual a planta de milho possui uma interação maior e conseqüentemente o processo de coevolução é mais específico.

No presente estudo a tecnologia Bt não alterou o forragamento do ácaro predador *N. californicus*, porém estudos comprovam que as toxinas Bt podem ter efeitos indiretos sobre os inimigos naturais, um exemplo é ter a presa nutricionalmente inadequada <sup>37</sup>. Como exemplo, a emergência de *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) foi menor em larvas de *Chilo partellus* (Lepidoptera: Crambidae) alimentadas com milho Bt, em comparação com *C. partellus* não alimentadas com milho Bt <sup>38</sup>. Isto demonstra que não só o forrageamento do *N. californicus* pode ser estudado, mas também sua biologia quando alimentados por *T. urticae* que se alimentam de plantas de milho Bt.

A análise dos componentes principais mostrou uma diferenciação química dos grupos de planta com infestação múltipla e as plantas com infestação simples, tanto em milho convencional como no Bt. Isto indica que as plantas são capazes de modificar a produção de compostos voláteis quando estão sob herbivoria múltipla. Porém, o ácaro predador *N. californicus* não teve preferência entre esses grupos de plantas. As plantas Bt para produzirem a toxina Cry1F necessitam de recursos energéticos que podem alterar no investimento de compostos secundários de defesa, como os voláteis, possivelmente a diferença de perfil químico dessas plantas se deram pela interação das defesas constitutiva e induzida<sup>13,14</sup>. Porém, o predador não distingue entre os odores liberados por plantas em infestação simples e múltipla, o que indica que a defesa constitutiva (Milho Bt) não alterou o forrageamento do predador em estudo. Com tudo, essa mudança química encontrada permite novos estudos com outros inimigos naturais.

Nesse estudo foi identificado pela primeira vez, em milho, os compostos 1-metil-6-(3-metilbuta-1,3-dienil)-7-oxabicyclo[4,1,0]heptano, (*E*)-7-tetradecen-1-ol e etiléster do ácido linolênico. Não há na literatura descrição de compostos voláteis induzidos por herbívoros no genótipo de milho estudado (Pioneer 30F35 e 30F35 Hx). Possivelmente, esses compostos não haviam sido relatados, pois cada genótipo de milho possuiu um perfil de voláteis específicos<sup>39</sup>.

As evidências deste estudo mostram uma diferenciação química nos grupos de plantas estudadas. Contudo, o *N. californicus* não difere entre infestação simples e múltipla em plantas de milho. Tal fato indica que a infestação múltipla não altera o forrageamento do ácaro-predador.

## 5 REFERÊNCIAS

- 1 Kessler, A. & Baldwin, I. T. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 299–328 (2002).
- 2 Pieterse, C. M. J. & Dicke, M. Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology. *Trends Plant Sci.* **12**, 564–569 (2007).
- 3 Fadini, M. A. M., Mendes, S. M., Araujo, O. G. & Waquil, J. M. Os Ácaros São Pragas do Milho no Brasil? *Embrapa Milho e Sorgo* 14 (2010).
- 4 Schaller, A. *Induced Plant Resistance to Herbivory*. Springer (Springer Netherlands, 2008).
- 5 Dicke, M. & Baldwin, I. T. The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the ‘cry for help’. *Trends Plant Sci.* **15**, 167–175 (2010).

- 6 Heil, M. Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytol.* **178**, 41–61 (2008).
- 7 Rasmann, S. *et al.* Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature* **434**, 732–737 (2005).
- 8 Turlings, T. C. J. & Wäckers, F. Recruitment of predators and parasitoids by herbivore-injured plants. *Adv. Insect Chem. Ecol.* **2**, 21–75 (2004).
- 9 Vet, L. E. M. & Dicke, M. Ecology of info chemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annu. Rev. Entomol.* **37**, 141–172 (1992).
- 10 Mello, M. O. & Silva Filho, M. C. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian J. Plant Physiol.* **14**, 71–81 (2002).
- 11 Arimura, G. I., Kost, C. & Boland, W. Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1734**, 91–111 (2005).
- 12 Maagd, R. A. De, Bosch, D. & Stiekema, W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Elsevier Sci.* **4**, 12–16 (1999).
- 13 Kant, M. R. *et al.* Mechanisms and ecological consequences of plant defence induction and suppression in herbivore communities. *Ann. Bot.* **115**, 1015–1051 (2015).
- 14 Price, P. W. *et al.* Interactions Among Three Trophic Levels: Influence of Plants on Interactions Between Insect Herbivores and Natural Enemies. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **11**, 41–65 (1980).
- 15 Rodriguez-Saona, C., Chalmers, J. A., Raj, S. & Thaler, J. S. Induced plant responses to multiple damagers: differential effects on an herbivore and its parasitoid. *Oecologia* **143**, 566–577 (2005).
- 16 Kaplan, I., Sandanelli, S. & Denno, R. F. Field evidence for indirect interactions between foliar-feeding insect and root-feeding nematode communities on *Nicotiana tabacum*. *Ecol. Entomol.* **34**, 262–270 (2009).
- 17 Viswanathan, D. V., Narwani, A. J. T. & Thaler, J. S. Specificity in induced plant responses shapes patterns of herbivore occurrence on *Solanum dulcamara*. *Ecology* **86**, 886–896 (2005).
- 18 Boer, J. G. De, 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. *J Chem Ecol* **34**, 281–290 (2008).
- 19 Vos, M. De *et al.* Signal Signature and Transcriptome Changes of Arabidopsis During Pathogen and Insect Attack. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**, 923–937 (2005).
- 20 Garcia, Y. M. *et al.* Volatile compounds identified in Barbados Cherry ‘BRS - 366 Jaburú’.

- Sci. Electron. Arch.* **3**, 67–73 (2016).
- 21 Crawley, M. J. *The R Book*. (JohnWiley & Sons, 2013).
- 22 R Core Team. A Language and Environment for Statistical Computing. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna*. (2014). Available at: <http://www.r-project>.
- 23 Dias, A. M. *et al.* Attraction of *Telenomus podisi* to volatiles induced by *Euschistus heros* in three different plant species. *Arthropod. Plant. Interact.* **10**, 419–428 (2016).
- 24 Lange, E. S. De, Farnier, K., Gaudillat, B. & Turlings, T. C. J. Comparing the attraction of two parasitoids to herbivore-induced volatiles of maize and its wild ancestors, the teosintes. *Chemoecology* **26**, 33–44 (2016).
- 25 Mandour, N. S., Kainoh, Y., Ozawa, R., Uefune, M. & Takabayashi, J. Effects of Time After Last Herbivory on the Attraction of Corn Plants Infested with Common Armyworms to a Parasitic Wasp *Cotesia kariyai*. *J. Chem. Ecol.* **37**, 267–272 (2011).
- 26 Ngi-Song, A. J., Njagi, P. G. N., Torto, B. & Overholt, W. A. Identification of behaviourally active components from maize volatiles for the stemborer parasitoid *cotesia flavipes cameron* (Hymenoptera: Braconidae). *Insect Sci. Applic* **20**, 181–189 (2000).
- 27 Pinto-Zevallos, D. M., Strapasson, P. & Zarbin, P. H. G. Herbivore-induced volatile organic compounds emitted by maize: Electrophysiological responses in *Spodoptera frugiperda* females. *Phytochem. Lett.* **16**, 70–74 (2016).
- 28 Rubio, A. *et al.* Cytosolic and plastoglobule-targeted carotenoid dioxygenases from *Crocus sativus* are both involved in  $\beta$ -ionone release. *J. Biol. Chem.* **283**, 24816–24825 (2008).
- 29 Xavier, L. M. S. *et al.* *Trichogramma pretiosum* attraction due to the *Elasmopalpus lignosellus* damage in maize. *Pesq. agropec. bras.* **46**, 578–585 (2011).
- 30 Dicke, M., van Loon, J. J. A. & Soler, R. Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 317–324 (2009).
- 31 Shiojiri, K., Takabayashi, J., Yano, S. & Takafuji, A. Infochemically mediated tritrophic interaction webs on cabbage plants. *Popul. Ecol.* **43**, 23–29 (2001).
- 32 Moayeri, H. R. S., Ashouri, A., Poll, L. & Enkegaard, A. Olfactory response of a predatory mirid to herbivore induced plant volatiles: Multiple herbivory vs. single herbivory. *J. Appl. Entomol.* **131**, 326–332 (2007).
- 33 Zhang, P.-J. *et al.* Whiteflies interfere with indirect plant defense against spider mites in Lima bean. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 21202–21207 (2009).
- 34 Rasmann, S. & Turlings, T. C. J. Simultaneous feeding by aboveground and belowground herbivores attenuates plant-mediated attraction of their respective natural enemies. *Ecol.*

- Lett.* **10**, 926–936 (2007).
- 35 Lima, D. B. *et al.* Predator performance is impaired by the presence of a second prey species. *Bull. Entomol. Res.* **3**, 313–321 (2016).
- 36 De Moraes, C. M., Lewis, W. J. & Tumlinson, J. H. Examining plant-parasitoid interactions in tritrophic systems. *An. da Soc. Entomológica do Bras.* **29**, 189–203 (2000).
- 37 Dively, G. P. *et al.* Effects on Monarch Butterfly Larvae (Lepidoptera: Danaidae) After Continuous Exposure to Cry1Ab-Expressing Corn During Anthesis. *Environ. Entomol.* **33**, 1116–1125 (2004).
- 38 Prütz, G. & Dettner, K. Effect of Bt corn leaf suspension on food consumption by *Chilo partellus* and life history parameters of its parasitoid *Cotesia flavipes* under laboratory conditions. *Entomol. Exp. Appl.* **111**, 179–187 (2004).
- 39 Degen, T., Dillmann, C., Marion-Poll, F. & Turlings, T. C. J. High genetic variability of herbivore-induced volatile emissions within a broad range of maize inbred lines. *Plant Physiol.* **135**, 1928–1938 (2004).

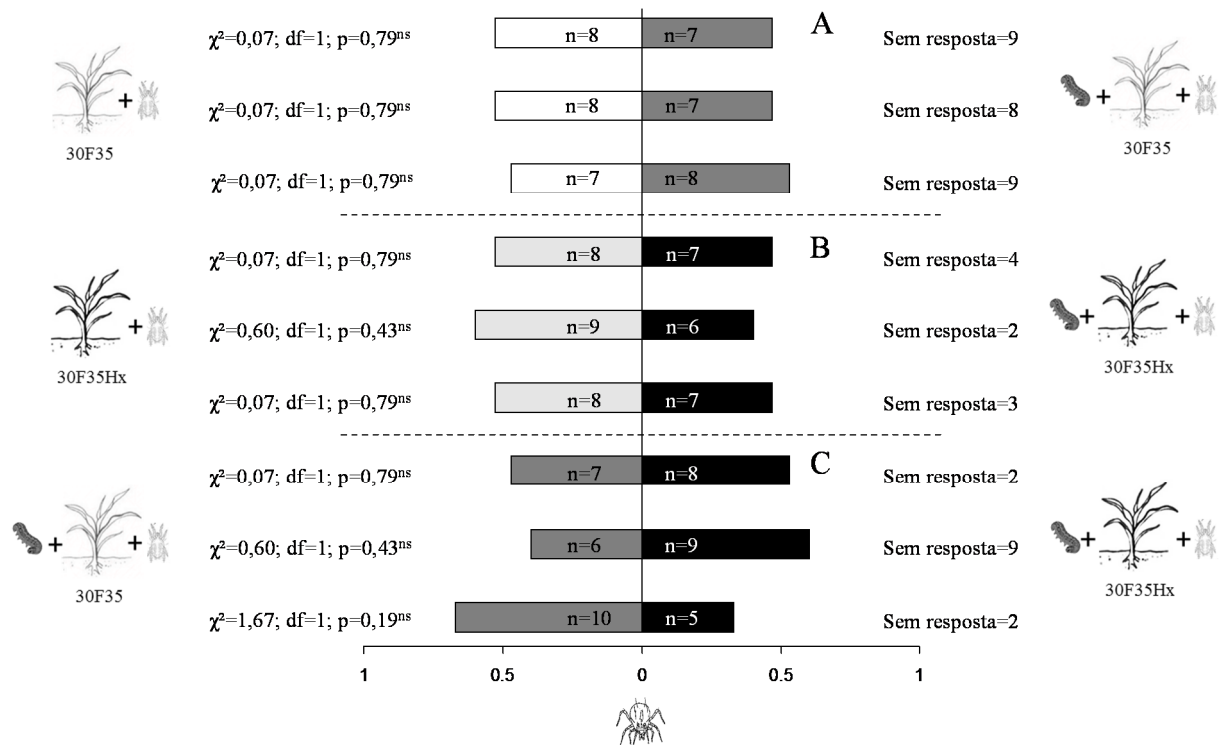


Figura 1: Resposta de ácaros predadores *Neoseiulus californicus* em olfatômetro em Y. (A) Planta Convencional Infestada por *Tetranychus urticae* X Planta Convencional Infestada por *T. urticae* + *Spodoptera frugiperda*; (B) Planta Bt Infestada por *T. urticae* X Planta Bt Infestada por *T. urticae*+*S. frugiperda*; (C) Planta Convencional Infestada por *T. urticae* + *S. frugiperda* X Planta Bt Infestada por *T. urticae* + *S. frugiperda*. Cada barra representa um único experimento replicado envolvendo 15 libertações de ácaros com resposta (teste do qui-quadrado).

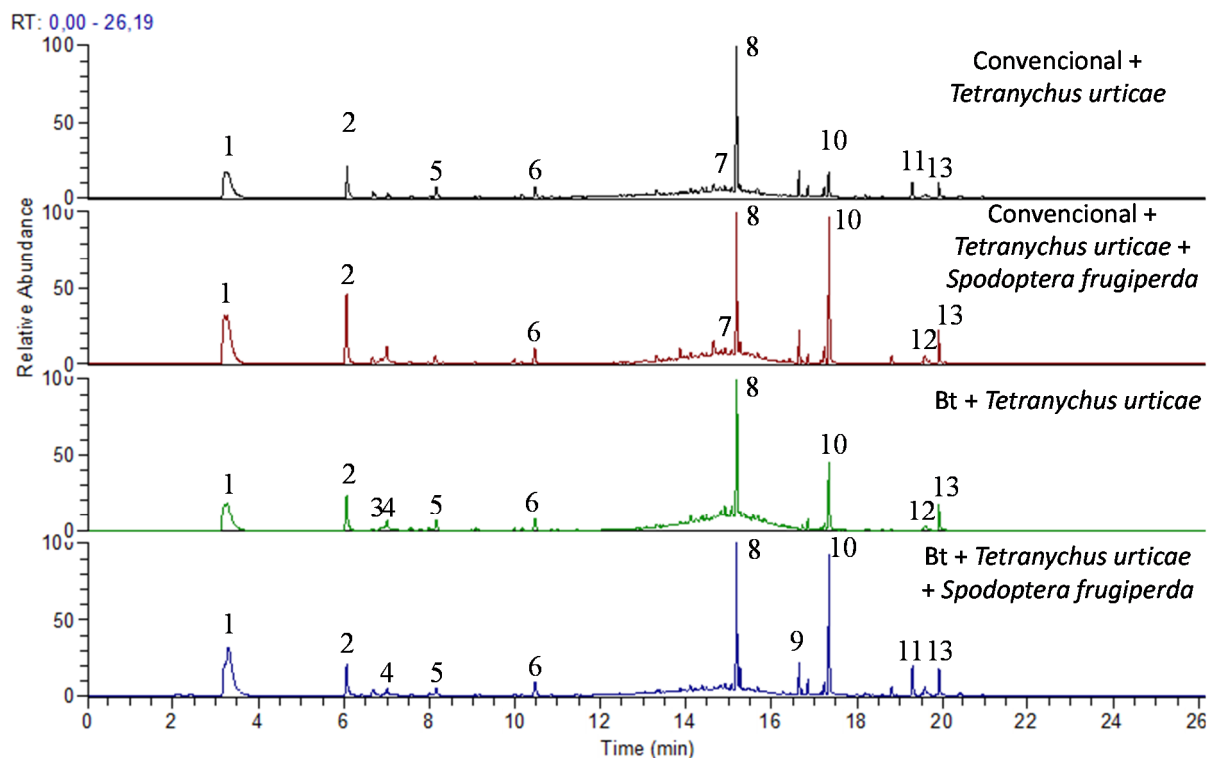


Figura 2: Cromatogramas dos perfis de compostos voláteis extraídos de folhas milho convencional (Pioneer 30F35) e Bt (Pioneer 30F35 Hx), com infestações simples (por *Tetranychus urticae*) e múltipla (por *T. urticae* + *Spodoptera frugiperda*). Os compostos pré-identificados foram: 1 = (*E*)-Hex-2-enal; 2 = heptanal; 3 = (*E*)-Oct-2-enal; 4 =  $\alpha$ -pineno; 5 =  $\beta$ -cisocimeno; 6 =  $\beta$ -Ciclocitral; 7 = 1-metil-6-(3-metilbuta-1,3-dienil)-7-oxabiciclo[4,1,0]heptano; 8 =  $\beta$ -ionona; 9 = não identificado = C9; 10 = (*E*)-7-tetradecen-1-ol; 11 = não identificado = C11; 12 = Etiléster do ácido linolênico; 13 = não identificado = C13.

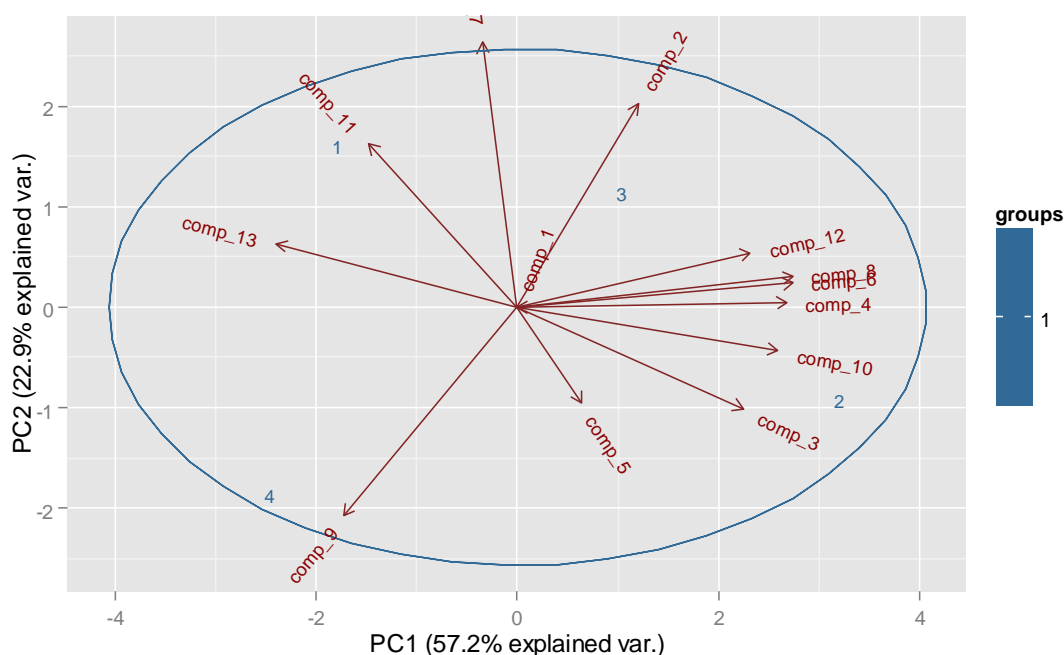


Figura 3: Análises dos componentes principais (PCA) dos compostos voláteis presentes nas folhas de milho convencionais (Pioneer 30F35) e Bt (Pioneer 30F35 Hx) com infestações simples (por *Tetranychus urticae*) e múltipla (por *T. urticae* + *Spodoptera frugiperda*). (1) planta convencional com infestação simples; (2) planta Bt com infestação simples; (3) planta convencional com infestação múltipla; (4) planta Bt com infestação múltipla. Os compostos são: comp\_1 = (*E*)-Hex-2-enal; comp\_2 = heptanal; comp\_3 = (*E*)-Oct-2-enal; comp\_4 =  $\alpha$ -pineno; comp\_5 =  $\beta$ -cisocimeno; comp\_6 =  $\beta$ -Ciclocitral; comp\_7 = 1-metil-6-(3-metilbuta-1,3-dienil)-7-oxabicyclo[4,1,0]heptano; comp\_8 =  $\beta$ -ionona; comp\_9 = não identificado = C9; comp\_10 = (*E*)-7-tetradecen-1-ol; comp\_11 = não identificado = C11; comp\_12 = Etiléster do ácido linolênico; comp\_13 = não identificado = C13.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ácaro predador *N. californicus* não discrimina entre voláteis de plantas de milho limpa e infestada por ácaro-rajado, tanto em plantas convencionais como em Bt. Também não diferencia plantas infestadas por ácaro-rajado das plantas com infestações múltiplas, isso ocorre tanto em plantas convencionais como em Bt.

Trabalhos futuros devem ser realizados com outros inimigos naturais do ácaro-rajado, pois as plantas de milho (convencionais e Bt) limpas, infestadas por ácaro-rajado e infestadas por ácaro-rajado e lagarta-do-cartucho, possuem diferenças na produção de voláteis, porém os mesmos não são capazes de atrair o ácaro predador *N. californicus*.