



MAYARA LOSS FRANZIN

**INDUÇÃO DE MECANISMOS DE DEFESA DIRETA AO ÁCARO-
RAJADO *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) EM MILHO Bt E
NÃO-Bt**

**SETE LAGOAS
2017**

MAYARA LOSS FRANZIN

**INDUÇÃO DE MECANISMOS DE DEFESA DIRETA AO ÁCARO-
RAJADO *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) EM MILHO Bt E
NÃO-Bt**

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)

F837i Franzin, Mayara Loss.
Indução de mecanismos de defesa direta ao ácaro rajado *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) em milho Bt e não-Bt / Mayara Loss Franzin ; orientador Marcos Antonio Matiello Fadini; coorientador Júlio Onésio Ferreira Melo. -- Sete Lagoas, 2017.
56 p.

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

1. Defesas de plantas. 2. Herbivoria múltipla. 3. Ácaro-rajado. 4. Lagarta-do-cartucho. 5. Mecanismos de defesa direta. I. Fadini, Marcos Antonio Matiello, orient. II. Melo, Júlio Onésio Ferreira, co-orient. III. Título.

MAYARA LOSS FRANZIN

**INDUÇÃO DE MECANISMOS DE DEFESA DIRETA AO ÁCARO-
RAJADO *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) EM MILHO Bt E
NÃO-Bt**

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, 03 de julho de 2017.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Cidália Gabriela Santos Marinho - UFSJ

Dr. José Magid Waquil – Embrapa Milho e Sorgo/Aposentado

Prof. Dr. Marcos Antonio Matiello Fadini
Orientador

Aos meus pais Nilda e Ademir, minhas irmãs Jussara e Viviam, minhas sobrinhas Gabrielly, Maria Eduarda e Ana Júlia, meu namorado Paulo Henrique, amores da minha vida
DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, autor e mestre da minha vida, por me conceder saúde para concluir mais essa etapa da minha vida.

Aos meus amados pais, Nilda e Ademir, que com amor me apoiaram e me educaram. Também por serem exemplo de fé, honestidade, amor e perseverança para mim.

Às minhas queridas irmãs, Jussara e Viviam, que são como amigas e, muitas vezes, como mãe para mim. Por sonharem meus sonhos e se alegrarem com minhas alegrias.

Às minhas lindas sobrinhas, Gabrielly, Maria Eduarda e Ana Júlia, que me ensinaram que é possível amar alguém, mesmo antes de conhecer.

Aos meus avós, Maria, Adamo e Olga, por aguardarem com muita alegria os períodos em que eu voltava para casa.

Ao meu namorado, Paulo Henrique, por ser companheiro, amigo e acreditar em mim mais do que eu mesma.

A todos os meus amigos velhos e novos, em especial aqueles que fiz nesses 2 anos em Sete Lagoas, por me proporcionarem momentos de alegria.

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

Aos integrantes da minha república, Jéssica Mayara e Marcus André, por terem sido companhia diária nesses dois anos.

Ao meu orientador, Marcos Fadini, que com paciência orientou, ensinou, incentivou e se tornou exemplo de profissional para mim.

Ao meu Coorientador, Júlio, que me deu suporte nas análises químicas.

Aos membros da banca, Cidália Gabriela e José Waquil, 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 as clip-cage.

À UFMG, por disponibilizar o equipamento ESI/MS para as análises químicas.

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

“Tudo posso naquele que me fortalece.”
(Filipenses, 4:13)

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	I
GENERAL ABSTRACT.....	II
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS.....	5
ARTIGO 1 - MILHO CONVENCIONAL E Bt RESPONDEM IGUALMENTE A INFESTAÇÕES DE <i>Tetranychus urticae</i>.....	9
Resumo.....	9
Abstract.....	10
Introdução.....	11
Material e métodos.....	12
Resultados.....	16
Discussão.....	17
Referências.....	19
ARTIGO 2 - INFESTAÇÃO MÚLTIPLA INDUZ DEFESA DIRETA AO ÁCARO- RAJADO EM PLANTAS DE MILHO.....	30
Resumo.....	30
Abstract.....	31
Introdução.....	32
Material e métodos.....	33
Resultados.....	35
Discussão.....	37
Referências.....	39
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47

INDUÇÃO DE MECANISMOS DE DEFESA DIRETA AO ÁCARO-RAJADO *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) EM MILHO Bt E NÃO-Bt

RESUMO GERAL - As plantas possuem mecanismos de defesas contra o ataque de herbívoros, podendo ser defesas constitutivas ou induzidas direta e indireta. Dependendo da espécie de herbívoro, diferentes mecanismos de defesas podem ser acionados em uma planta. Estudos ainda mostram haver interação entre esses mecanismos de defesas quando há infestações múltipla. O objetivo dessa dissertação foi investigar a interação dos mecanismos de defesas de plantas de milho a herbívoros, tendo como hipótese que plantas de milho convencional e Bt respondem igualmente a infestações pelo ácaro-rajado *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) e infestações múltiplas deste com lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). O experimento foi realizado em casa-de-vegetação, com seis grupos de plantas, tendo 20 plantas por grupo. Os tratamentos foram: milho Bt infestado com ácaro-rajado, milho Bt com infestação múltipla de ácaro-rajado e lagarta-do-cartucho (A+L), milho Bt limpo (=sem infestação), milho convencional infestado com ácaro-rajado, milho convencional com infestação A+L e milho convencional limpo. Em todos os tratamentos, foi feita a reinfestação com ácaro-rajado, afim de avaliar a interferência de infestações prévias por ácaro-rajado ou A+L nas populações reinfestadas. As avaliações começaram 24 horas após a reinfestação e duraram 10 dias. Foi avaliado diariamente nas populações reinfestadas, o número de ovos, indivíduos jovens, fêmeas adultas vivas e mortas. Foram retiradas 500 mg das folhas das plantas de milho, avaliadas com 1, 3, 5 e 10 dias de reinfestação, para o preparo das amostras da análise química. Além dessas plantas, fez-se amostras de duas plantas limpas de cada tratamento, que serviram de testemunha. As amostras foram analisadas por Espectrometria de Massas com Ionização Electrospray. As variáveis biológicas não diferiram entre plantas, Bt e convencional, limpas e infestadas pelo ácaro-rajado, exceto o número de fêmeas adultas vivas no milho Bt. Esses quatro grupos de plantas apresentaram-se quimicamente similares, tendo um mesmo padrão de íons. Nas plantas convencionais infestadas com A+L, a população de ácaro-rajado reinfestada apresentou sobrevivência e reprodução reduzida. Além disso, nessas plantas foram identificados compostos de defesa, o HMBOA-Glc, Linoleoil-GPI e kaempferol rutinose. Conclui-se que há defesa induzida direta ao ácaro-rajado, em milho convencional com infestação A+L. No milho convencional infestado com *T. urticae* não houve defesa induzida direta. Isso mostra que infestações múltiplas inteferem nas respostas de milho convencional, quanto à defesa direta à *T. urticae*. As plantas de milho Bt e convencional respondem igualmente a infestações pelo ácaro-rajado, mostrando que a toxina inseticida Cry 1F no milho Bt não influencia nas populações de *T. urticae*. Isso sugere também que não há interação de defesa constitutiva e induzida direta para as espécies testadas.

Palavras-chave: Defesas de plantas. Herbivoria múltipla. Ácaro-rajado. Lagarta-do-cartucho

INDUCTION OF DIRECT DEFENSE MECHANISMS TO TWO-SPOTTED SPIDER MITE *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) IN Bt AND NON-Bt MAIZE

GENERAL ABSTRACT - Mechanisms of plant defenses against herbivores attack, being able to be constitutive defenses or direct and indirect induced. Depending on the species of herbivore, different defense mechanisms can be triggered in a plant. Studies still show that there is interaction between these mechanisms of defenses when there are multiple infestations. The objective of this dissertation was to investigate the interaction of the defensive mechanisms of maize plants with herbivores, based on the hypothesis that conventional and Bt maize plants equally respond to two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) infestations and multiple infestations with this mite and fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). The experiment was carried out in a greenhouse, with six groups of plants, with 20 plants per group. The treatments were: infested with two-spotted spider mite Bt maize, Bt maize with multiple infestation of two-spotted spider mite and fall armyworm (A+L), clean Bt maize (= without infestation), infested with two-spotted spider mite conventional maize, conventional maize infestation with A+L and clean conventional maize. In all treatments, re-infestation with two-spotted spider mite was carried out in order to evaluate the interference of previous infestations by two-spotted spider mite or A+L in re-infested populations. Evaluations started 24 hours after re-infestation and lasted 10 days. The number of eggs, young individuals, alive and dead adult females were evaluated daily in re-infested populations. They were removed 500 mg of maize plants leaves, evaluated at 1, 3, 5 and 10 days of re-infestation, for preparation of the chemical analysis samples. In addition to these plants, two clean plants were sampled from each treatment and used as control. Samples were analyzed by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. The biological parameters did not differ between plants, Bt and conventional, cleaned and infested by two-spotted spider mite, except the number of adult females alive in Bt maize. These four groups of plants were chemically similar, having the same pattern of ions. In conventional plants infested with A+L, the population of re-infested two-spotted spider mite showed reduced survival and reproduction. In addition, defense compounds have been identified in these plants, HMBOA-Glc, Linoleoyl-GPI and kaempferol rutinose. It is concluded that there is direct induced defense against the two-spotted spider mite in conventional maize with A+L infestation. In conventional maize infested with *T. urticae* there was no direct induced defense. This shows that multiple infestations interfere in the responses of conventional maize, as for the direct defense to *T. urticae*. Bt and conventional maize plants equally respond to two-spotted spider mite infestations, showing that the insect toxin Cry 1F in Bt maize does not influence the *T. urticae* populations. This also shows that there is no interaction of constitutive and direct induced defense for the species tested.

Keywords: Defenses of plants. Multiple herbivory. Two-spotted spider mite. Fall armyworm

INTRODUÇÃO GERAL

Os herbívoros dependem das plantas para sua sobrevivência (JANDER e HOWE, 2008). Alimentando-se dos tecidos das plantas, os herbívoros assimilam nutrientes, proteínas e nitrogênio essenciais para seu crescimento e desenvolvimento (SLANSKY e FEENY, 1977). Para garantir vantagem na interação com as plantas, os herbívoros desenvolveram estratégias de alimentação (JANDER e HOWE, 2008). Essas estratégias permitiram que os herbívoros superassem os obstáculos, presentes nos seus hospedeiros, que impedissem sua alimentação. Como por exemplo, parede celular espessa, látex, tricomas, dentre vários outros tipos de barreiras físicas e químicas (TAIZ e ZEIGER, 2009). Contudo, as plantas não são passíveis à perda de tecidos para herbívoros. Com isso, as plantas desenvolveram mecanismos de defesas contra o ataque de herbívoros (CATES, 1975; SCHALLER, 2008). Essa interação recíproca entre plantas e herbívoros, no decorrer do tempo, em que as espécies envolvidas buscam adaptar-se umas às outras, é chamada de coevolução (JÄREMO et al., 1999).

Os mecanismos de defesas das plantas podem ser induzidos e constitutivos (KARBAN e MYERS, 1989). As defesas induzidas são os mecanismos ativados após o ataque de herbívoros (CHEN, 2008). Quando as plantas sofrem injúrias por herbívoros, sensores presentes na planta percebem os sinais físicos e químicos vindos da alimentação dos herbívoros como, por exemplo, elicitores presentes na saliva de insetos (WU e BALDWIN, 2009). Esses elicitores se ligam aos receptores putativos nas membranas plasmáticas das plantas e o processo de sinalização de defesa induzida é ativado, produzindo compostos químicos de defesa (WU e BALDWIN, 2009).

Esse processo de sinalização varia de acordo com o tipo de injúria que o herbívoro causa na planta (WALLING, 2000; VOS et al., 2005). A injúria causada por um inseto que apresenta aparelho bucal mastigador desencadeia defesas induzidas sistêmicas nas plantas, pela rota do ácido jasmônico (JA). O JA é sintetizado a partir do seu precursor ácido linoléico, pela via octadecanóide (SCHALLER, 2008). A síntese inicia-se nos plastídios das células dos tecidos atacados pelo herbívoro (ACOSTA e FARMER, 2010). O JA é liberado e transportado através da planta e atua como um fitohormônio que ativa vários mecanismos de defesa nas plantas (SCHALLER, 2008). Entretanto, quando a planta é atacada por inseto que apresenta aparelho bucal picador-sugador, a sinalização de defesa é realizada pela rota do ácido salicílico (SA) (THALER et al., 2002). O SA é sintetizado nas plantas a partir da eritrose 4-fosfato e do fosfoenolpiruvato, através da via do Shikimato/Arogenato. Primeiramente, é formada a fenilalanina que é convertida em transcinamato, por meio da ação

da enzima fenilalanina amônia liase (PAL). O transcinamato é transformado em ácido benzóico que, após a ação da enzima ácido benzóico 2-hidroxilase, se converte em SA (RYALS et al., 1996).

Os compostos produzidos através das rotas do JA e SA podem ser de defesa induzida direta ou indireta (KESSLER e BALDWIN, 2002; CHEN, 2008). Os compostos de defesa induzida direta são os que atuam diretamente sobre o herbívoro, afetando sua biologia (KARBAN e MYERS, 1989; FÜRSTENBERG-HÄGG et al., 2013). São compostos fenólicos, nitrogenados e terpenos caracterizados como fitoalexinas e inibidores de protease. Agem no herbívoro como repelentes, deterrentes alimentar e de oviposição ou tóxicos (KARBAN e MYERS, 1989; KESSLER e BALDWIN, 2002; HOWE e SCHALLER, 2008; FÜRSTENBERG-HÄGG et al., 2013). Por sua vez, os compostos de defesa induzida indireta são atrativos aos inimigos naturais do herbívoro (CHEN, 2008). Nesse caso, as plantas liberam compostos químicos voláteis que sinalizam para predadores e parasitoides a presença do herbívoro (HEIL et al., 2001). Porém, as defesas induzidas têm custos adaptativos para as plantas (STEPPUHN e BALDWIN, 2008). Quando a planta utiliza tais mecanismos, há uma alocação de recursos fisiológicos, ecológicos e evolutivos para o acionamento de defesas, deixando de estar disponíveis a processos relevantes da planta, como crescimento e reprodução (STEPPUHN e BALDWIN, 2008).

Diferente das defesas induzidas, as constitutivas são caracterizadas por barreiras químicas e físicas presentes nas plantas independente do ataque de herbívoros (KARBAN e MYERS, 1989; MELLO e SILVA FILHO, 2002), as quais atuam dificultando a sua utilização como hospedeiro, atração, locomoção, alimentação e oviposição. Como exemplo, têm-se tricomas, depósitos cuticulares, epiderme espessada, abundância de cristais e espinhos (BECERRA, 1994). Há também metabólitos tóxicos e/ou repelentes que reduzem a palatabilidade dos herbívoros (ARIMURA et al., 2005). Um exemplo de defesa constitutiva, mas que não é resultado de um processo coevolutivo, são as plantas geneticamente modificadas (GM), como é o caso do milho Bt. Neste caso, houve a introdução de um ou mais genes da bactéria de solo *Bacillus thuringiensis* (Bt), que expressa proteínas tóxicas de forma contínua, conferindo um alto grau de resistência à planta, principalmente a espécies de lepidópteros-praga (MACINTOSH et al., 1990; MAAGD et al., 1999). Uma das vantagens do milho Bt é a redução da aplicação de inseticidas, uma vez que estas plantas são resistentes determinadas espécies-alvo (SHELTON et al., 2002). Porém, herbívoros não-alvos podem ser afetados negativamente ou positivamente em plantas GM, pois as proteínas Bt são expressas

em doses elevadas nos tecidos verdes da planta (JOUANIN et al., 1998). Isto pode ser estudado com o ácaro-rajado *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) em milho Bt, visto que esta espécie pode causar infestações em milho GM, mas não é alvo dessas defesas de plantas (FADINI et al., 2010).

A resistência das plantas ao ataque de espécies-alvo é um componente do manejo integrado de pragas (MIP). Por reduzir o uso de inseticidas, as plantas GM favorecem a utilização do controle biológico (SHELTON et al., 2002). Além disso, contribui com a redução dos riscos de resistência de insetos aos produtos químicos (FRIZZAS e OLIVEIRA, 2008). Entender sobre as interações herbívoro-planta é fundamental para o sucesso do MIP, pois possibilita identificar se as plantas possuem defesas induzidas contra o ataque de pragas, por exemplo.

Contudo, ainda existem vários questionamentos envolvendo defesas de plantas. Um deles é sobre quais situações as plantas utilizam dos mecanismos de defesa. Por exemplo, quando plantas são infestadas por herbívoros que não são pragas de importância primária, talvez não desenvolvam processos para induzir defesa direta. Visto que esse mecanismo tem custo para as plantas (STEPPUHN e BALDWIN, 2008), fazendo com que recursos necessários a sua sobrevivência sejam alocados para a indução de defesa direta. A resposta para isso pode se dar estudando plantas de milho infestadas pelo ácaro-rajado. Uma vez que esse herbívoro é capaz de infestar plantas de milhos, mas não é praga primária da cultura no Brasil (FADINI et al., 2010).

Outro questionamento é sobre a interação de diferentes mecanismos de defesas de plantas (THALER et al., 2002, 2012). Como exemplo, entre defesa constitutiva e defesa induzida direta. Alguns autores afirmam que os mecanismos de defesas constitutivas podem diminuir os de defesas induzidas diretas (PRICE et al., 1980), enquanto outros afirmam que um mecanismo de defesa constitutiva pode aumentar os de defesa induzida direta (KANT et al., 2015). Hagenbucher et al. (2013) relatam uma relação de antagonismo entre plantas de algodão Bt e a indução de defesa direta por lagarta-da-maça *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). Plantas Bt pré-infestadas tiveram um menor nível de terpenóides e maior número de pulgão-do-algodão *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) reinfestantes em comparação a plantas convencionais. Este tipo de interação pode ser estudado também com infestações de ácaro-rajado em milho Bt e convencional, visto que esta praga é capaz de induzir defesa direta em diversas culturas (LI et al., 2002; KANT et al., 2004; ARGOLO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2016; PAULO et al., 2017, no prelo).

O terceiro questionamento é sobre a interação das rotas do JA e SA na defesa induzida direta. As plantas estão expostas a ataques múltiplos de herbívoros (DICKE et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2016; PONZIO et al., 2016). Isto pode interferir na indução de defesa direta nas plantas, uma vez que as rotas do JA e SA podem ter relações antagônicas ou sinérgicas (THALER et al., , 2002, 2012; RODRIGUEZ-SAONA et al., 2005). Por exemplo, uma planta de milho está naturalmente exposta a infestações múltiplas de lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), que é praga primária da cultura, e *T. urticae*. Sabe-se que a indução das rotas do JA e SA são específicas ao tipo de injúria causada pelo herbívoro (WALLING, 2000; VOS et al., 2005). Sendo *T. urticae* e *S. frugiperda* herbívoros com aparelho bucal distintos, infestações múltiplas dos mesmos podem interferir na sinalização das rotas de defesa. O estudo desse sistema de plantas de milho infestadas pelo ácaro-rajado e lagarta-do-cartucho pode evidenciar a interação das rotas JA e SA na indução de defesa direta. Isto pode ser feito através de infestações e reinfestações em plantas de milho com esses herbívoros, avaliando-se os compostos químicos produzidos e as variáveis biológicas das populações reinfestadas, uma vez que medir parâmetros biológicos de herbívoros é uma maneira de se estudar o surgimento de defesa induzida direta (ALBA et al., 2011).

Nesta dissertação, avaliou-se, no capítulo I, se o ácaro-rajado é capaz de induzir defesa direta em plantas de milho convencional e Bt. A primeira hipótese nula (H0) testada foi que o ácaro-rajado não induz defesa direta em plantas de milho convencional e Bt. A segunda H0 foi que a plantas de milho convencional e Bt respondem igualmente a infestações por *T. urticae*.

No capítulo II, avaliou se infestações múltiplas de lagarta-do-cartucho e ácaro-rajado, em milho convencional e Bt, podem interferir na indução de defesa direta. A hipótese nula testada foi que infestações múltiplas de lagarta-do-cartucho e ácaro-rajado não diferem na indução de defesa direta quando somente infestada com ácaro-rajado.

As hipóteses apresentadas foram testadas através de infestações e reinfestações de milho convencional e Bt com ácaro-rajado e ácaro-rajado mais lagarta-do-cartucho (variáveis independentes ou explanatórias) e análises de compostos químicos produzidos nestas plantas e os parâmetros biológicos das populações que foram reinfestadas (variáveis dependentes ou respostas).

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, I. F.; FARMER, E. E. Jasmonates. **The Arabidopsis Book**, p. e0129, 2010.
- ALBA, J. M.; GLAS, J. J.; SCHIMMEL, B. C. J.; KANT, M. R. Avoidance and suppression of plant defenses by herbivores and pathogens. **Journal of Plant Interactions**, v. 6, n. 4, p. 221-227, 2011.
- ARGOLO, P. S.; OLIVEIRA, H. G.; FADINI, M. A. M.; OLIVEIRA, E. F.; OLIVEIRA, M. G. A.; PALINI, A. Inibidores de protease não explicam defesa induzida direta ao ácaro-rajado *Tetranychus urticae* Kock (Acari: Tetranychidae) em morangueiro. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, v. 36, p. 139-147, 2010.
- ARIMURA, G. I.; KOST, C.; BOLAND, W. Herbivore-induced, indirect plant defences. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1734, n. 2, p. 91-111, 2005.
- BECERRA, J. X. Squirt-gun defense in *Bursera* and the chrysomelid counterploy. **Ecology**, v. 75, n. 7, p. 1991-1996, 1994.
- CATES, R. E. X. G. The Interface between Slugs and Wild Ginger : Some Evolutionary. **Ecology**, v. 56, n. 2, p. 391-400, 1975.
- CHEN, M. Inducible direct plant defense against insect herbivores : A review. **Insect Science**, v. 15, p. 101-114, 2008.
- 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.
- 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**, p. 14, 2010.
- FRIZZAS, M. R.; OLIVEIRA, C. M. DE. Plantas transgênicas resistentes a insetos e organismos não-alvo: predadores, parasitóides e polinizadores. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 4, n. 1, p. 63-82, 2008.
- FÜRSTENBERG-HÄGG, J.; ZAGROBELNY, M.; BAK, S. Plant defense against insect herbivores. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 10242-10297, 2013.
- HAGENBUCHER, S.; WACKERS, F. L.; WETTSTEIN, F. E.; OLSON, D. M.; RUBERSON, J. R.; ROMEIS, J. Pest trade-offs in technology: reduced damage by caterpillars in Bt cotton benefits aphids. **Proceedings of the Royal Society**, v. 280, n. 1758, p. 20130042-20130042, 2013.
- HEIL, M.; KOCH, T.; HILPERT, A.; FIALA, B.; BOLAND, W.; LINSENMAIR, K. E. Extrafloral nectar production of the ant-associated plant , *Macaranga tanarius* , is an induced , indirect , defensive response elicited by jasmonic acid. **Ecology**, v. 98, n. 3, p. 1083-1088, 2001.
- HOWE, G. A.; SCHALLER, A. Direct defenses in plants and their induction by wounding

and insect herbivores. In: SCHALLER, A. (Ed.). **Induced Plant Resistance to Herbivory**. 1. ed. Stuttgart, Germany: Springer Netherlands, 2008. p. 7–29.

JANDER, G.; HOWE, G. Plant Interactions with Arthropod Herbivores: State of the Field. **Plant Physiology**, v. 146, n. 3, p. 801-803, 2008.

JÄREMO, J.; TUOMI, J.; NILSSON, P.; LENNARTSSON, T. Plant adaptations to herbivory : mutualistic versus antagonistic coevolution. **Oikos**, v. 84, n. 2, p. 313-320, 1999.

JOUANIN, L.; BONADÉ-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; MORROT, G.; GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science**, v. 131, p. 1-11, 1998.

KANT, M. R.; AMENT, K.; SABELIS, M. W.; HARING, M. A; SCHUURINK, R. C. Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants. **Plant Physiology**, v. 135, n. 1, p. 483-495, 2004.

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.; EGAS, M.; JANSSEN, A.; VAN LEEUWEN, T.; SCHUURINK, R. C.; SABELIS, M. W.; ALBA, J. M. Mechanisms and ecological consequences of plant defence induction and suppression in herbivore communities. **Annals of Botany**, v. 115, n. 7, p. 1015-1051, 2015.

KARBAN, R.; MYERS, J. H. Induced Plant Responses to Herbivory. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 20, p. 331-348, 1989.

KESSLER, A.; BALDWIN, I. T. Plant Responses to Insect herbivory: The Emerging Molecular Analysis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, n. 1, p. 299-328, 2002.

LI, C.; WILLIAMS, M. M.; LOH, Y.-T.; LEE, G. I.; HOWE, G. A. Resistance of cultivated tomato to cell content-feeding herbivores is regulated by the octadecanoid-signaling pathway. **Plant physiology**, v. 130, n. 1, p. 494-503, 2002.

MAAGD, R. A. DE; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. Bacillus thuringiensis toxin-mediated insect resistance in plants. **Elsevier Science**, v. 4, n. 1, p. 9-13, 1999.

MACINTOSH, S. C.; STONE, T. B.; SIMS, S. R.; HUNST, P. L.; GREENPLATE, J. T.; MARRONE, P. G.; PERLAK, F. J.; FISCHHOFF, D. A.; FUCHS, R. L. Specificity and efficacy of purified Bacillus thuringiensis proteins against agronomically important insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 56, n. 2, p. 258-266, 1990.

MELLO, M. O.; SILVA FILHO, M. C. Plant-insect interactions:an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 14, n. 2, p. 71-81, 2002.

OLIVEIRA, E. F. DE; PALLINI, A.; JANSSEN, A. Herbivores with similar feeding modes interact through the induction of different plant responses. **Oecologia**, v. 180, p. 1-10, 2016.

PAULO, P. D.; LIMA, C. G.; DOMINQUINI, A. B.; FADINI, M. A. M.; MENDES, S. M.; MARINHO, C. G. S. Maize plants produce direct resistance elicited by *Tetranychus urticae* Koch (Acari : Tetranychidae). **Brazilian Journal Biology**, p. 1-5, 2017 (no prelo).

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

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. 1809-1819, 1996.

SCHALLER, A. **Induced Plant Resistance to Herbivory**. 1. ed. Stuttgart, Germany: Springer Netherlands, 2008. 462 p.

SHELTON, A. M.; ZHAO, J.; ROUSH, R. T. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p. 845-81, 2002.

SLANSKY, F.; FEENY, P. Stabilization of the Rate of Nitrogen Accumulation by Larvae of the Cabbage Butterfly on Wild and Cultivated Food Plants. **Ecological Monographs**, v. 47, n. 2, p. 209-228, 1977.

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.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

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.

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.

WALLING, L. L. The myriad plant responses to herbivores. **Journal Of Plant Growth Regulation**, v. 19, n. 2, p. 195-216, 2000.

WU, J.; BALDWIN, I. T. Herbivory-induced signalling in plants: Perception and action. **Plant, Cell and Environment**, v. 32, n. 9, p. 1161-1174, 2009.

ARTIGO 1

MILHO CONVENCIONAL E Bt RESPONDEM IGUALMENTE A INFESTAÇÕES DE *Tetranychus urticae*

Artigo escrito conforme as normas do periódico Experimental and Applied Acarology

Resumo A evolução das plantas levou ao desenvolvimento de mecanismos de defesa contra herbívoros constitutivo e induzido, podendo ainda haver interação entre esses mecanismos. Com o objetivo de investigar a interação de defesa constitutiva e induzida direta, este trabalho testou a hipótese nula que plantas de milho convencional e Bt respondem igualmente a infestações pelo ácaro-rajado *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). O experimento foi realizado com quatro grupos de plantas, tendo 20 plantas cada. Os tratamentos foram: milho Bt infestado, milho Bt limpo (=sem infestação), milho convencional infestado e milho convencional limpo. Em todos os tratamentos, foi feita a reinfestação com coespecífico. Vinte e quatro horas após a reinfestação, foi avaliado diariamente, durante 10 dias, o número de ovos, indivíduos jovens, fêmeas adultas vivas e mortas nas populações reinfestadas. Realizou-se a análise química das plantas por Espectrometria de Massas com Ionização Electrospray. A infestação do milho convencional e Bt pelo ácaro-rajado não interferiu no desempenho da população coespecífica reinfestada. As variáveis biológicas não diferiram entre plantas limpas e infestadas, exceto o número de fêmeas adultas vivas no milho Bt. Os quatro tratamentos apresentaram-se quimicamente similares, tendo um mesmo padrão de íons. Conclui-se que milho Bt e convencional respondem igualmente a infestações pelo ácaro-rajado e que o milho não possui defesa induzida direta contra infestações de *T. urticae*. Os resultados potencializam as chances do ácaro-rajado alcançar *status* de praga em milho, por não induzir defesa direta. Este é o primeiro trabalho que investigou a interação de defesas em milho Bt infestado por ácaro-rajado, com análise química e biológica.

Palavras-chave: Interação de defesas plantas, Defesa constitutiva, Defesa induzida, Ácaro-rajado

CONVENTIONAL AND Bt MAIZE RESPOND EQUALLY TO INFESTATION WITH *Tetranychus urticae*

Abstract The evolution of the plants led to the development of mechanisms defense against herbivores constitutive and induced, and there may still be interaction between these mechanisms. In order to investigate the interaction of constitutive and direct induced defense, this work tested the null hypothesis that conventional and Bt maize plants equally respond to two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) infestations. The experiment was carried out with four groups of plants, each with 20 plants. The treatments were: infested Bt maize, clean Bt maize (= without infestation), infested conventional maize, and clean conventional maize. In all treatments, re-infestation was performed with co-specific. Twenty-four hours after re-infestation, the number of eggs, young individuals, alive and dead adult females in the re-infested populations was evaluated daily for 10 days. The chemical analysis of the plants was carried out by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. The infestation of conventional and Bt maize by two-spotted spider mite did not interfere in the performance of the re-infested coexistent population. The biological variables did not differ between clean and infested plants, except the number of alive adult females in Bt maize. The four treatments were chemically similar, having the same pattern of ions. It is concluded that Bt and conventional maize equally respond to infestations to two-spotted spider mite and that maize does not have direct induced defense against infestations of *T. urticae*. The results potentiate the chances of the two-spotted spider mite reaching pest status in maize as it does not induce direct defense. This is the first work that investigated the interaction of defenses in Bt maize infested by two-spotted spider mite, with chemical and biological analysis.

Keywords: Interaction of plant defenses; Constitutive defense; Induced defense; Two-spotted spider mite

Introdução

As plantas estão continuamente expostas a condições desfavoráveis ao seu desenvolvimento, seja por fatores abióticos ou bióticos (Taiz and Zeiger 2009) e assim desenvolveram mecanismos contra estas condições de estresse durante sua evolução (Schaller 2008; Taiz and Zeiger 2009). Mudanças fisiológicas, bioquímicas e morfológicas que expressam defesas, por exemplo, ocorreram para permitir que as plantas suportem condições edáficas e climáticas extremas e ao ataque de herbívoros (Price et al. 1980; Schaller 2008; Taiz and Zeiger 2009).

Os mecanismos de defesas contra herbívoros podem ser constitutivos e induzidos (Karban and Myers 1989; Schaller 2008). Defesa constitutiva é expressa de forma contínua, independente da ação de herbívoros, atuando como uma barreira mecânica, dificultando a locomoção e a alimentação do herbívoro (Karban and Myers 1989; Mello and Silva-filho 2002). Como exemplo, podemos citar tricomas, depósitos cuticulares, epiderme espessada, abundância de cristais e espinhos (Becerra 1994). Também estão inclusos metabólitos tóxicos e/ou repelentes que atuam minimizando o dano e reduzindo a palatabilidade dos herbívoros (Arimura et al. 2005). Outro exemplo de defesa constitutiva, porém que não é resultado de um processo coevolutivo, são as plantas geneticamente modificadas (GM). Por exemplo, no milho Bt houve a introdução de genes da bactéria de solo *Bacillus thuringiensis* (Bt), conferindo um alto grau de resistência da planta, principalmente a espécies de lepidópteros-praga (Maagd et al. 1999).

Já a defesa induzida é elicitada somente após a planta sofrer injúrias por herbívoros, através da produção de compostos químicos (Schaller 2008). Estes compostos podem promover a defesa induzida direta, quando exercem impacto negativo sobre herbívoros, afetando sua biologia (Kessler and Baldwin 2002). Ou ainda podem conferir a defesa induzida indireta, que incluem níveis tróficos superiores, através da liberação de compostos voláteis atrativos aos inimigos naturais dos herbívoros infestantes (Kessler and Baldwin 2002; Chen 2008).

Essas defesas têm custos adaptativos (e.g. fisiológicos, ecológicos e evolutivos) para as plantas (Steppuhn and Baldwin 2008). Quando a planta utiliza tais mecanismos, há uma alocação de recursos para o acionamento de defesas, deixando de estar disponíveis a processos relevantes da planta, como crescimento e reprodução (Steppuhn and Baldwin 2008). Com isto, é questionável se as plantas utilizam de mecanismos de defesas em qualquer

situação de ataque. No caso de plantas que sofrem injúrias por herbívoros de importância secundária ou que já possua um tipo de defesa constitutiva, talvez não utilizem seus recursos para o acionamento de defesa induzida. A resposta para este questionamento pode se dar em estudos com plantas de milho convencional e Bt infestadas com o ácaro-rajado *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae), considerando que este é capaz de causar infestações em milho (Fadini et al. 2010). Além disso, há relatos de interação entre as rotas de defesas de plantas. Kempel et al. (2011) estudando espécies de plantas melhoradas e não-melhoradas infestadas com *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) demonstraram haver um balanço entre defesa constitutiva e induzida, onde plantas com menor defesa constitutiva apresentavam maior acionamento de defesas induzidas.

Diante desses questionamentos, neste trabalho foi investigado se o ácaro-rajado é capaz de eliciar defesa induzida direta em plantas de milho convencional e Bt. A primeira hipótese nula (H0) testada é que o ácaro-rajado não induz defesa direta em plantas de milho convencional e Bt. A segunda hipótese (H0) é que plantas de milho convencional e Bt respondem igualmente a infestações por ácaro-rajado. O objetivo foi avaliar compostos químicos produzidos nas plantas e as variáveis biológicas das populações reinfestadas do ácaro-rajado *T. urticae*.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Entomologia Agrícola e Florestal e casa-de-vegetação da Universidade Federal de São João Del Rei - Campus Sete Lagoas, Sete lagoas, Minas Gerais, Brasil.

Criação do ácaro-rajado

Amostras de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*) infestadas com ácaros foram coletadas em casa-de-vegetação da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG. Após a coleta, com o auxílio de microscópio estereoscópico, os ácaros foram identificados e os ácaros-rajados *Tetranychus urticae* foram transferidos individualmente com pincel pelo de Marta (n. zero) para plantas de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), onde a criação foi mantida.

Essas plantas foram obtidas com o plantio via sementes em vasos plásticos (6,3 L), com o substrato Terral Solo® e mantidas em gaiolas com tela anti-afídeos em casa-de-

vegetação, com temperatura controlada a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5$. A irrigação foi feita sempre que necessária. Quinze dias após a semeadura, com duas folhas completamente expandidas, as plantas foram infestadas. Plantas novas e sem infestação foram acrescentadas à criação a cada 7 dias, colocando-as ao lado das plantas infestadas para que os ácaros-rajado passassem para as plantas novas. As plantas velhas foram retiradas após a passagem dos ácaros.

Plantio e manutenção das plantas de milho

Plantas do milho híbrido 30F35 Hx (Herculex, Pioneer®), que expressam a proteína Cry1F (Bt), e do milho não-Bt, 30F35 (convencional) foram utilizadas no ensaio. A semeadura foi realizada em vasos plásticos de (1 L), utilizando-se o substrato Terral Solo® e mantidas no interior de gaiolas com tela anti-afídeos em casa-de-vegetação. Foram colocadas três sementes por vaso. Após duas semanas, foi realizado o desbaste, deixando uma planta por vaso e realizou-se adubação com 0,2 gramas de sulfato de amônio por planta. A adubação foi repetida a cada 15 dias e a irrigação foi feita de acordo com a necessidade das plantas. Quarenta dias após o semeio as plantas estavam prontas para serem utilizadas nos experimentos.

Análise química no teste de indução de defesa direta

Em casa-de-vegetação, foram mantidas uma gaiola telada com seis plantas de milho Bt e outra com seis plantas de milho convencional. Uma planta de cada grupo foi mantida sem infestação (testemunha) e 5 foram infestadas com 10 fêmeas de ácaro-rajado. As fêmeas foram mantidas em uma barreira feita com cola entomológica Biocontrole© para evitar fuga dos ácaros na parte abaxial de uma folha de cada planta de milho. Uma planta de milho convencional e uma de milho Bt foram retiradas para amostra 1, 2, 3, 4 e 5 dias após a infestação, além das plantas testemunhas que foram retiradas no primeiro dia.

Amostras de 500 mg de folhas de cada planta foram feitas macerando separadamente, em um béquer (50 mL) com o auxílio de um bastão de vidro. Em seguida, foi acrescentado 5 mL de metanol e vedado com papel alumínio e filme PVC, deixando em repouso durante 4 horas para a extração dos compostos presentes nas folhas. Após a extração, o sobrenadante foi retirado com uma seringa descartável de 10 mL, acoplada a um filtro de seringa pré-limpo,

soldado, membrana de PVDF, 25 mm x 0,45 μm , e transferido para um eppendorf. Foram transferidos 10 μL da solução para outro eppendorf e acrescentado 1 mL de metanol.

As soluções foram injetadas no aparelho de Espectrometria de Massas com Ionização Electrospray (ESI-MS) (Catharino et al. 2005). Nesta técnica, íons gasosos são gerados e separados da amostra, de acordo com suas razões massa/carga (m/z) (Silverstein et al. 2006). Uma pequena quantidade de energia é transferida para a amostra, resultando em íons com energia residual interna relativamente baixa. Os espectros de massas obtidos se caracterizam pela presença de poucos íons fragmentos e de íons precursores relativamente intensos. Com isso, pouca ou nenhuma informação estrutural pode ser obtida, pelo número reduzido de íons fragmentos formados (Yamashita and Fenn 1984).

Com a análise prévia dos resultados foi identificado quantos dias após a infestação possivelmente pode iniciar a indução de defesa na planta. Partindo da premissa que na defesa induzida direta ocorre a formação de compostos de defesas na planta elicitada por herbívoros (Kessler and Baldwin 2002; Schaller 2008), a escolha do possível dia em que ocorre o acionamento das defesas levou em consideração o número total de íons, visto que o aumento de íons pode ser pela formação de metabólitos de defesas a partir da infestação pelo ácaro-rajado.

Análise das variáveis biológicas do ácaro-rajado e compostos químicos das plantas

Na casa-de-vegetação, dois grupos de plantas de milho convencional e dois grupos de plantas de milho Bt foram mantidos em gaiolas teladas, sendo cada grupo composto por 20 plantas. Um grupo de plantas Bt e outro convencional foram infestados com 10 fêmeas do ácaro-rajado, na parte abaxial de uma folha de cada planta de milho, mantidas em uma barreira feita com cola entomológica. Essas folhas foram marcadas com fita amarela para posterior identificação. Outro grupo de cada híbrido de milho permaneceu sem infestação. De acordo com o resultado da análise química do início da indução de defesa direta, após dois dias foi realizada a reinfestação em todas as plantas. A reinfestação foi feita em uma folha distinta da primeira infestação, usando o mesmo procedimento. As folhas foram identificadas com fitas vermelhas.

Após 1 dia da reinfestação foi feito o sorteio para a avaliação das plantas limpas e infestadas. Os vasos numerados de 1 a 20 foram sorteados, de maneira que cada vaso com uma planta de milho tornou-se uma unidade amostral (=repetição) independente e verdadeira.

A avaliação foi feita retirando-se as folhas que foram reinfestadas. Tais folhas foram cortadas na sua base com tesoura, colocadas em vasilha plástica com tampa e levadas ao laboratório para visualização em microscópio estereoscópico. As avaliações foram realizadas durante 10 dias, lendo-se um total de oito folhas por dia. Sendo duas pertencentes ao grupo das plantas Bt limpas, duas do grupo das plantas Bt infestadas, duas do grupo das plantas convencionais limpas e duas do grupo das plantas convencionais infestadas. Foram avaliados variáveis biológicas, contando-se o número de fêmeas de ácaros vivos, mortos, número de indivíduos na forma jovem e número de ovos.

Folhas limpas das duas plantas avaliadas em cada grupo nos dias 1, 3, 5 e 10 de reinfestação foram retiradas. Realizou-se a análise química destas folhas, seguindo a mesma metodologia do teste de indução de defesa direta. Para cada grupo, duas plantas de milho foram mantidas limpas, ou seja, sem infestação e/ou reinfestação com ácaro-rajado. Essas plantas serviram como testemunhas na análise dos íons, a fim de garantir que qualquer modificação no padrão dos íons seja resultado do tratamento e não de alguma variação aleatória. Como por exemplo, danos mecânicos na manipulação das plantas.

Análises estatísticas

O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e 20 repetições. Para os dados biológicos foram utilizados modelos lineares generalizados (GLM) com distribuição de Poisson. Tendo como variável independente (x) a qualidade da planta (i.e. Bt e convencional: limpa ou infestada com ácaro-rajado) e, como variáveis dependentes (y 's) as características biológicas das populações de ácaros fêmeas reinfestadas (i.e. número de fêmeas adultas vivas, mortas, número de indivíduos na forma jovem e número de ovos) e as variáveis químicas. Os dados foram submetidos a testes de normalidade e análises de resíduos para avaliar os pressupostos das análises e a adequação dos modelos ajustados (Crawley 2013). Para análise do início de defesa induzida direta e dos parâmetros químicos dos quatro tratamentos, foi realizada a média dos íons detectados em cada dupla de plantas. Estes foram submetidos a uma análise dos componentes principais (PCA). Com os íons detectados e a abundância relativa dos mesmos, foi montada uma tabela para análise descritiva destes íons (Crawley 2013). Utilizou-se o programa R (R Development Core Team 2014) para a análise exploratória dos dados e análises estatísticas.

Resultados

Teste de indução

A análise dos componentes principais dos íons detectados, em plantas de milho convencional e Bt limpas após a infestação por ácaro-rajado, explicou 48,6% da variação (Figura 1). Os componentes principais 1 (PC1) e 2 (PC2) não mostraram um padrão de formação de grupos distintos (Figura 1).

Os íons variaram entre plantas de milho convencional (Tabela 1) e Bt (Tabela 2). Alguns íons somente foram detectados em plantas convencionais limpas (e.g. 491,34 e 550,69 m/z) (Tabela 1). Alguns íons não se repetiram nos tratamentos, o íon 522,65 m/z apareceu somente na planta convencional com 2 dias de infestação (Tabela 1) e o íon 567,22 m/z na planta Bt com 2 dias de infestação (Tabela 2). Já os íons 475,43; 701,53 e 871,47 m/z estiveram presentes em todas as plantas, Bt e convencional, limpas ou infestadas (Tabela 1 e Tabela 2).

As plantas convencionais com 1 dia de infestação e Bt com 2 dias de infestação tiveram o maior número de íons totais, com 15 e 10 íons, respectivamente (Tabela 1 e Tabela 2). Para padronizar o tempo entre a infestação e a reinfestação para milho convencional e Bt, escolheu-se o segundo dia. Visto que com 2 dias de infestação, em ambas as plantas, houve um aumento no número de íons, em comparação às plantas limpas (Tabela 1 e Tabela 2).

Variáveis biológicas

O número de fêmeas adultas vivas da população reinfestada não foi afetado pela infestação prévia em plantas de milho convencional (Figura 2A). O mesmo ocorreu para o número de indivíduos jovens (Figura 2B), ovos (Figura 2C) e fêmeas adultas mortas (Figura 2D), que não diferiram estatisticamente entre as plantas infestadas e limpas.

A infestação de ácaro-rajado não apresentou diferença significativa para o número de indivíduos jovens (Figura 3B) e número de ovos (Figura 3C) em milho Bt. Em plantas de milho Bt limpa o número de fêmeas adultas vivas foi menor, quando comparado às plantas Bt infestadas (Figura 3A). O mesmo não ocorreu com o número de fêmeas adultas mortas, onde as populações reinfestadas, em plantas limpas e infestadas, não diferiram entre si (Figura 3D).

Entre plantas convencionais e Bt infestadas, houve diferença significativa apenas para o número de fêmeas adultas mortas, que foi menor nas plantas convencionais (Figura 4D). Os demais parâmetros avaliados não diferiram entre plantas convencionais e Bt infestadas (Figura 4).

Variáveis químicas

Foi explicado 44,1% da variação pela análise dos componentes principais, de íons detectados via ESI/MS, nos grupos de plantas de milho convencional e Bt limpas e infestadas com o ácaro-rajado, com diferentes dias de reinfestação (Figura 5).

As plantas Bt testemunhas, dos grupos das plantas infestadas e limpas, ficaram sobrepostas, mostrando haver similaridade entre as mesmas (Figura 5). Isto garante que as diferenças que ocorreram na detecção dos íons destes dois grupos, são resultados do tratamento, visto que, comparando as plantas testemunhas o padrão de íons é semelhante. O mesmo ocorreu para as plantas convencionais (Figura 5).

Não se formaram grupos distintos com plantas convencionais e Bt, limpas e infestadas (Figura 5). Algumas plantas Bt infestadas mostraram padrão similar às plantas convencionais infestadas (Figura 5). Além disso, plantas convencionais, limpas e infestadas, com um dia de reinfestação ficaram sobrepostas, o que indica um padrão de íons similares (Figura 5). Entende-se então, que os dois componentes principais (PC1 e PC2) não possuíram um padrão que divergissem os quatro grupos de plantas entre si. Isto mostra similaridade entre os grupos. Foram detectados 19 íons via ESI/MS nos quatro grupos de plantas. Os íons 274,36; 318,37; 701,53; 871,47 e 959,51 estiveram presentes nos quatro grupos (Tabela 3). O número total de íons foi próximo entre as plantas, variando de 9 em plantas de milho convencional infestadas com o ácaro-rajado a 12 em plantas de milho convencional limpa e Bt infestada (Tabela 3). Mostrou-se, assim, que as plantas de milho convencional e Bt, limpas e infestadas, tiveram um padrão de íons semelhante.

Discussão

A infestação por *T. urticae* não influenciou na sobrevivência e reprodução do coespecífico reinfestado, em milho Bt e convencional. Quando há defesa induzida direta, infestações prévias por herbívoros afetam as populações reinfestadas. Caso o ácaro-rajado

induzisse defesa direta, a sobrevivência e reprodução seriam maiores em plantas limpas. Porém, isto não foi encontrado. Os parâmetros biológicos não diferiram entre plantas limpas e infestadas, exceto para o número de fêmeas adultas vivas em milho Bt. É possível que isto tenha ocorrido devido a fêmeas adultas presas na cola em plantas limpas, na avaliação. Ácaros fêmeas adultas mortas presas na cola, não entraram para a contagem de indivíduos mortos e nem de indivíduos vivos. Esses indivíduos foram excluídos, devido a ser uma variação aleatória em experimentos deste tipo. Com isso, o número de fêmeas adultas vivas nas plantas limpas pode ter sido menor do que em plantas infestadas, pelo número de ácaros fêmeas adultas presas na cola.

Em trabalho com milho convencional e ácaro-rajado, foi relatado que as populações de *T. urticae* reinfestadas tem sobrevivência reduzida em plantas infestadas pelo coespecífico (Paulo et al. 2017, no prelo). Isto sugere a indução de defesa direta, discordando dos resultados encontrados. Essa divergência de resultados na indução de defesa direta, também é encontrada em plantas de morango infestadas por ácaro-rajado. Fadini et al. (2004) relataram que a duração das fases imaturas, a fecundidade e a sobrevivência de *T. urticae* não foram afetadas pela infestação prévia de plantas de morangueiro com coespecífico, enquanto Argolo et al. (2010), encontraram que a flutuação populacional de *T. urticae* foi menor nas plantas de morango previamente atacadas pelo coespecífico.

O que pode explicar as diferenças entre trabalhos que investigam a defesa induzida direta é o tempo de exposição das plantas ao ataque de herbívoros, pois as respostas das plantas podem ser afetadas pelo tipo e intensidade da injúria (Brown et al. 1991; Nachappa et al. 2006). Então, pode ser que o tempo de infestação do ácaro-rajado nas plantas de milho não foi suficiente para induzir defesa direta.

Entre plantas Bt e convencional infestadas, os parâmetros biológicos também não diferiram, exceto o número de fêmeas adultas mortas. Aceitou-se então a hipótese nula de que milho Bt e convencional respondem igualmente a infestações por ácaro-rajado.

Na análise dos componentes principais, as plantas apresentaram similaridade. Os componentes principais não separaram plantas limpas e infestadas, Bt e convencional. Sendo assim, a infestação por ácaro-rajado não influenciou no padrão de íons das plantas. Uma explicação para a não separação dos quatro grupos de plantas é a presença de vários íons iguais e abundância relativa próxima nos mesmos. Os íons 274,36; 318,37; 701,53; 871,47 e 959,51 estiveram presentes em todos os grupos de plantas, proporcionando similaridade suficiente para não separá-los em quatro grupos distintos. A identificação dos íons não foi

possível, devido à falta de informação estrutural pelo método de ESI/MS (Yamashita and Fenn 1984; Silverstein et al. 2006). É provável que esses íons detectados sejam metabólitos primários das plantas e não compostos de defesas, pois a semelhança entre plantas infestadas e limpas, no padrão de íons e parâmetros biológicos avaliados, indica não haver indução de defesa direta. Na defesa induzida direta há presença de compostos químicos de defesa que acarretam efeitos negativos sobre herbívoros, após a planta sofrer injúrias pelos mesmos (Schaller 2008).

Os resultados da análise química suportam o que foi encontrado nos parâmetros biológicos. A sobrevivência e reprodução, no geral, não são afetadas pela infestação do ácaro-rajado nas plantas de milho, indicando a ausência de defesa induzida direta. Na análise química isto é comprovado pela similaridade dos íons entre as plantas, mostrando que a infestação do ácaro-rajado não induz a produção de possíveis compostos de defesa direta.

Defesas contra herbívoros têm custos adaptativos para as plantas (Steppuhn and Baldwin 2008). No custo adaptativo são comprometidos recursos de processos relevantes, como crescimento e reprodução, para o acionamento de defesas (Steppuhn and Baldwin 2008; Taiz and Zeiger 2009). Com isto, questiona-se sobre quais situações as plantas utilizam dessas defesas. Os resultados encontrados mostram que infestações do ácaro-rajado, que não é considerado praga de importância primária em milho convencional e Bt, não induziu defesa direta. É possível, então, que a herbivoria de *T. urticae*, em milho, não seja suficiente para que essas plantas aloquem seus recursos no acionamento de defesas.

Este é o primeiro trabalho que realizou análise biológica e química de milho Bt e convencional infestados pelo ácaro-rajado. Os resultados encontrados sugerem o aumento das chances de *T. urticae* vir a se tornar praga em milho, pela ausência de defesa induzida direta.

Referências

- Argolo PS, Oliveira HG, Fadini MAM, et al (2010) Inibidores de protease não explicam defesa induzida direta ao ácaro-rajado *Tetranychus urticae* Kock (Acari: Tetranychidae) em morangueiro. *Boletín Sanid Veg Plagas* 36:139–147.
- Arimura GI, Kost C, Boland W (2005) Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochim Biophys Acta* 1734:91–111.
- Becerra JX (1994) Squirt-gun defense in *Bursera* and the chrysomelid counterploy. *Ecology* 75:1991–1996.

- Brown GC, Nurdin F, Rodriguez JG, Hildebrand DF (1991) Inducible Resistance of Soybean (var ' Williams ') to Two-spotted Spider Mite (*Tetranychus urticae* Koch). *J Kansas Entomol Soc* 64:388–393.
- Catharino RR, Haddad R, Cabrini LG, et al (2005) Characterization of vegetable oils by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting: Classification, quality, adulteration, and aging. *Anal Chem* 77:7429–7433.
- Chen MS (2008) Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Sci* 15:101–114.
- Crawley JM (2013) *The R Book*, 2nd edn. JohnWiley & Sons, Chichester
- Fadini MAM, Lemos WP, Pallini A, et al (2004) Herbivoria de *Tetranychus urticae* Koch (Acari : Tetranychidae) Induz Defesa Direta em Morangueiro? *Neotrop Entomol* 33(3):293–297.
- Fadini MAM, Mendes SM, Araujo OG, Waquil JM (2010) Os Ácaros São Pragas do Milho no Brasil? *Embrapa Milho e Sorgo* 14.
- Karban R, Myers JH (1989) Induced Plant Responses to Herbivory. *Annu Rev Ecol Syst* 20:331–348.
- Kempel A, Schädler M, Chrobock T, et al (2011) Tradeoffs associated with constitutive and induced plant resistance against herbivory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:5685–5689.
- Kessler A, Baldwin IT (2002) Plant Responses to Insect herbivory: The Emerging Molecular Analysis. *Annu Rev Plant Biol* 53:299–328.
- Maagd RA De, Bosch D, Stiekema W (1999) *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Elsevier Sci* 4:9–13.
- Mello MO, Silva-filho MC (2002) Plant-insect interactions : an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Jounal Plant Physiol* 14:71–81.
- Nachappa P, Margolies DC, Nechols JR, Loughin T (2006) *Phytoseiulus persimilis* response to herbivore-induced plant volatiles as a function of mite-days. *Exp Appl Acarol* 40:231–239.
- Paulo PD, Lima CG, Dominiquini AB, et al (2017) Maize plants produce direct resistance elicited by *Tetranychus urticae* Koch (Acari : Tetranychidae). *Brazillian J Biol* 1–5. (no prelo)
- 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.

- R Core Team. A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. (2014). Available at: <http://www.r-project>.
- Schaller A (2008) Induced Plant Resistance to Herbivory, 1st edn. Springer Netherlands, Stuttgart, Germany
- Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DL (2006) Identificação espectrométrica de compostos orgânicos, 7th edn. LTC, Rio de janeiro
- Steppuhn 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
- Taiz L, Zeiger E (2009) Fisiologia Vegetal, 4th edn. Artmed, Porto Alegre
- Yamashita M, Fenn JB (1984) Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. Journal Phys Chem 88:4451–4459.

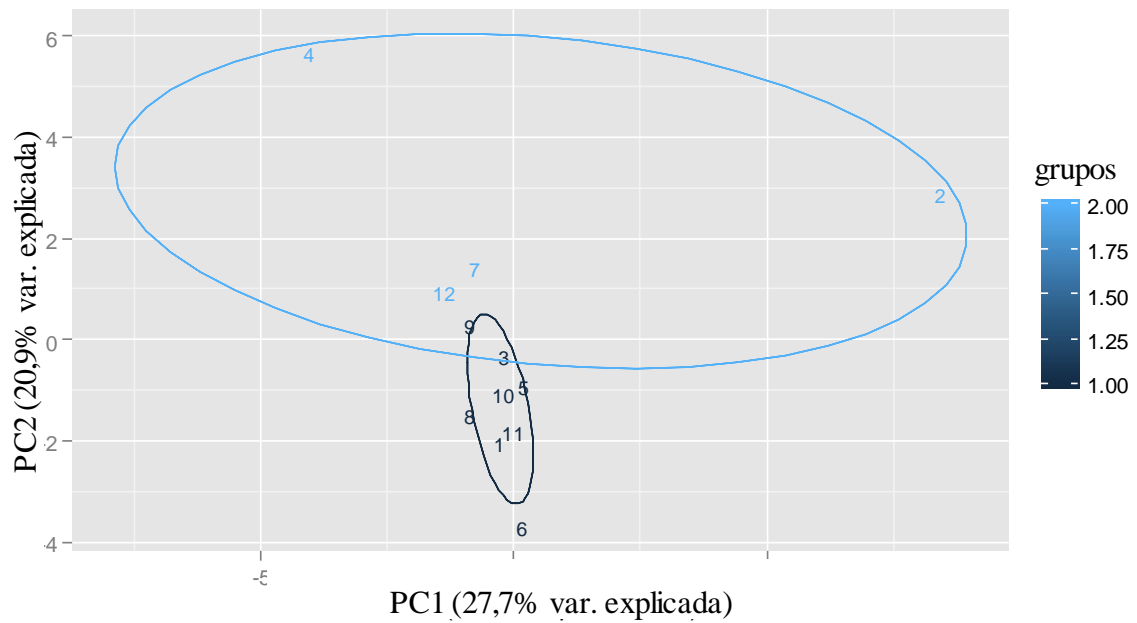


Figura 1 Análise de componentes principais (PCA) dos íons detectados, via Espectrometria de Massas com Ionização Electrospray, em plantas de milho convencional (30F35) e Bt (30F35 Hx) limpas e com diferentes dias de infestação por *Tetranychus urticae*. (1) planta convencional limpa; (2) convencional 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 Íons detectados, via Espectrometria de Massas com Ionização Electrospray, em plantas de milho convencional (30F35) limpas e com diferentes dias de infestação por *Tetranychus urticae*.

Íons (m/z)	Tratamentos ^a					
	cv_0	cv_1	cv_2	cv_3	cv_4	cv_5
203,19	0	0	7,5 ^b	0	0	0
274,36	0	20	12,5	15	0	0
293,12	0	0	0	10	0	0
318,37	0	25	25	31,5	16,5	0
362,33	17	20	17,5	16	12,5	0
406,36	0	10	0	0	0	0
437,3	0	20	0	0	0	0
453,21	0	0	0	25	0	0
475,43	64	45	65	64,5	52,5	52
481	0	0	19	65	17	12
491,34	27					
522,65	0	0	16	0	0	0
550,69	7	0	0	0	0	0
551,28	0	10	0	0	0	0
568,31	0	0	0	0	0	10
639,55	0	10	0	0	0	0
655,44	0	0	0	0	0	8,5
679,51	17,5	0	0	0	0	0
701,53	100	100	100	94	100	100
702,59	41,5	40	35	0	36	35
717,56	47	10	25	69	25,5	0
729	0	10	0	0	0	0
770,97	0	10	0	0	0	0
797,45	0	0	7,5	0	7,5	25
871,47	20	10	52,5	50	11	22
939,37	0	10	7,5	0	0	0
955,3	0	0	0	24	0	0
959,51	0	0	7,5	0	0	7,5
Número total de íons	9	15	14	11	9	9

^a cv_0: planta limpa; cv_1: planta com 1 dia de infestação; cv_2: planta com 2 dias de infestação; cv_3: planta com 3 dias de infestação; cv_4: planta com 4 dias de infestação; cv_5: planta com 5 dias de infestação.

^b abundância relativa do íon (%).

Tabela 2 Íons detectados, via Espectrometria de Massas com Ionização Electrospray, em plantas de milho Bt (30F35Hx) limpas e com diferentes dias de infestação por *Tetranychus urticae*.

Íons (m/z)	Tratamentos ^a					
	Bt_0	Bt_1	Bt_2	Bt_3	Bt_4	Bt_5
203,19	0	5 ^b	0	0	0	0
274,36	25	0	0	0	0	23
318,37	35	0	20,5	0	0	43
362,33	0	0	15,5	0	0	0
453,21	20	0	0	0	0	20,5
475,43	45	60,5	56,5	44,5	55	65
481	20	36	23	26	0	28
567,22	0	0	9	0	0	0
679,51	0	0	0	0	11,5	0
701,53	100	100	100	100	100	100
702,59	0	35	32	41	45	36
717,56	30	33,5	39	39	23	30
797,45	0	0	0	0	0	18
871,47	30	22,5	37,5	21,5	29	58
909,15	0	6,5	0	0	0	0
955,3	0	0	8,5	0	0	0
959,51	0	5	0	0	0	0
Número total de íons	8	9	10	6	6	10

^a Bt_0: planta limpa; Bt_1: planta com 1 dia de infestação; Bt_2: planta com 2 dias de infestação; Bt_3: planta com 3 dias de infestação; Bt_4: planta com 4 dias de infestação; Bt_5: planta com 5 dias de infestação.

^b abundância relativa do íon (%).

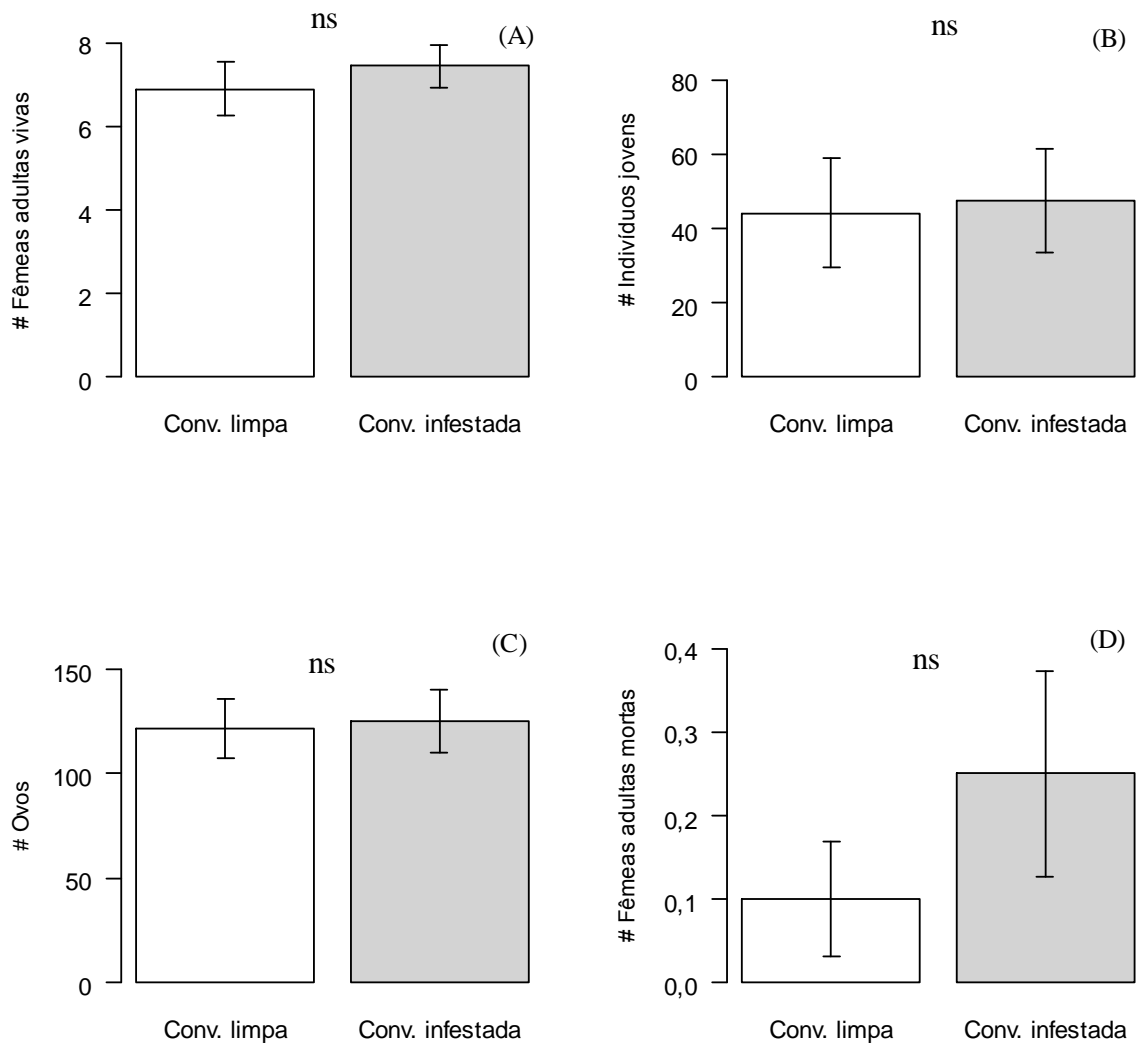


Figura 2 Número (média \pm erro padrão da média) de fêmeas adultas vivas (A, $\chi^2=45,2$; g.l.=36; $p=0,861$) indivíduos jovens (B, $\chi^2=38,7$; g.l.=37; $p=0,608$), ovos (C, $\chi^2=38,1$; g.l.=36; $p=0,624$) e fêmeas adultas mortas (D, $\chi^2=29,7$; g.l.=37; $p=0,203$) de *Tetranychus urticae* em plantas de milho convencional (30F35) limpas (barras brancas) e infestadas com coespecífico (barras cinzas).

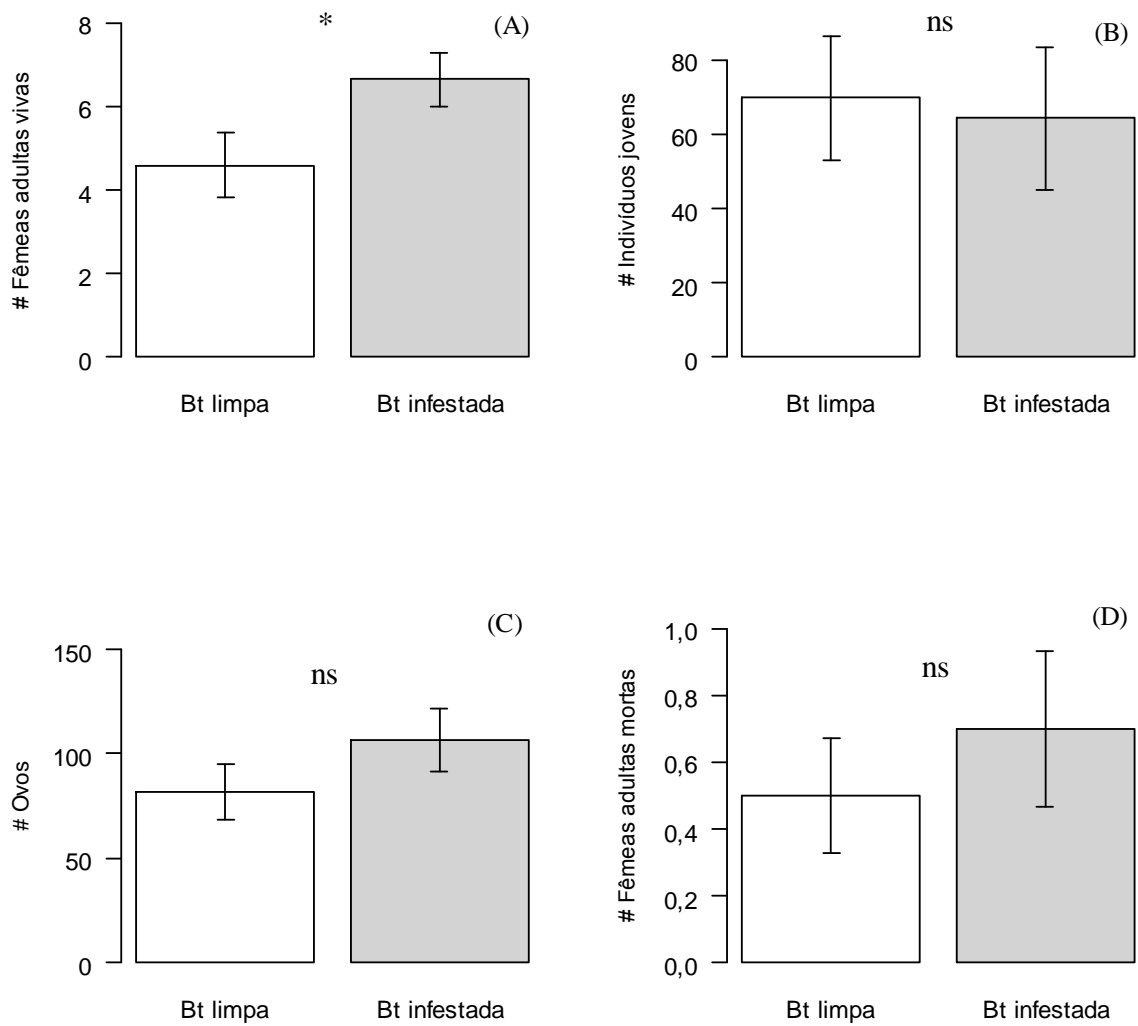


Figura 3 Número (média \pm erro padrão da média) de fêmeas adultas vivas (A, $\chi^2=21,9$; g.l.=37; $p=0,02$), indivíduos jovens (B, $\chi^2=40,9$; g.l.=37; $p=0,698$), ovos (C, $\chi^2=30,5$; g.l.=37; $p=0,235$) e fêmeas adultas mortas (D, $\chi^2=21,9$; g.l.=37; $p=0,383$) de *Tetranychus urticae* em plantas de milho Bt (30F35 Hx) limpas (barras brancas) e infestadas com coespecífico (barras cinzas).

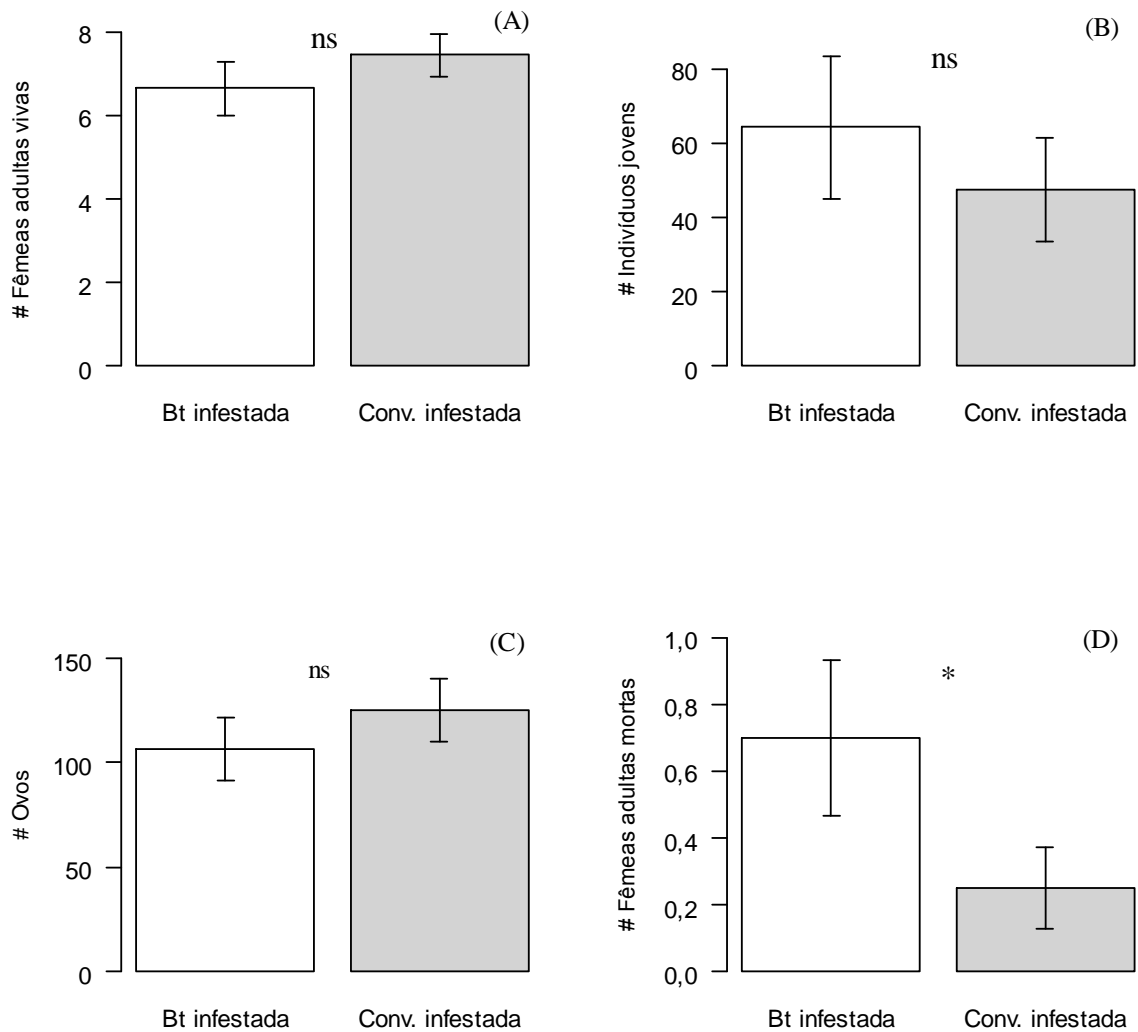


Figura 4 Número (média \pm erro padrão da média) de fêmeas adultas vivas (A, $\chi^2=31,11$; g.l.=37; $p=0,259$), indivíduos jovens (B, $\chi^2=27,67$; g.l.=37; $p=0,133$), ovos (C, $\chi^2=27,67$; g.l.=36; $p=0,240$) e fêmeas adultas mortas (D, $\chi^2=23,58$; g.l.=37; $p=0,042$) de *Tetranychus urticae* em plantas de milho convencional (30F35) (barras cinzas) e Bt (30F35 Hx) (barras brancas) infestadas com coespecífico.

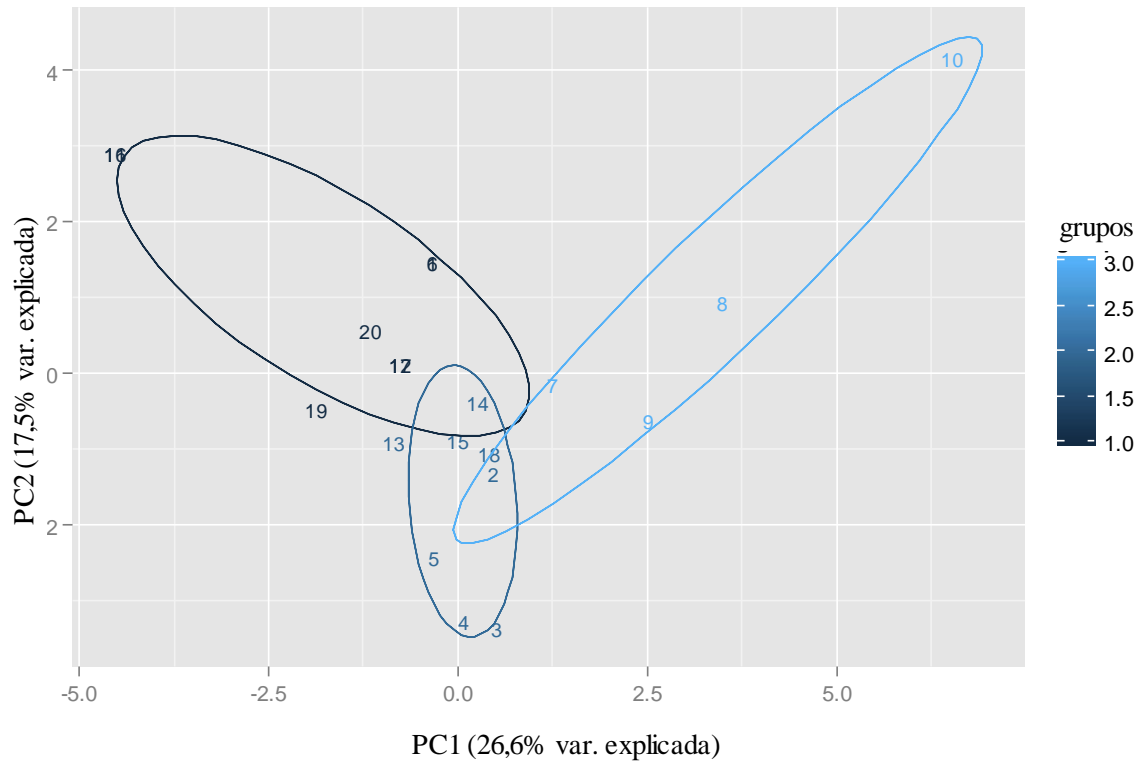


Figura 5 Análise de componentes principais (PCA) dos íons detectados, via Espectrometria de Massas com Ionização Electrospray, em plantas de milho convencionais (30F35) e Bt (30F35 Hx) limpas e infestadas com *Tetranychus urticae*. em diferentes dias de reinfestação. (1) planta Bt limpa e sem reinfestação (testemunha); (2) Bt infestada com 1 dia de reinfestação; (3) Bt infestada com 3 dias de reinfestação; (4) Bt infestada com 5 dias de reinfestação; (5) Bt infestada com 10 dias de reinfestação; (6) planta Bt limpa e sem reinfestação (testemunha); (7) Bt limpa com 1 dia de reinfestação; (8) Bt limpa com 3 dias de reinfestação; (9) Bt limpa com 5 dias de reinfestação; (10) Bt limpa com 10 dias de reinfestação; (11) planta convencional limpa e sem reinfestação (testemunha); (12) convencional infestada com 1 dia de reinfestação; (13) convencional infestada com 3 dias de reinfestação; (14) convencional infestada com 5 dias de reinfestação; (15) convencional infestada com 10 dias de reinfestação; (16) planta convencional limpa e sem reinfestação (testemunha); (17) convencional limpa com 1 dia de reinfestação; (18) convencional limpa com 3 dias de reinfestação; (19) convencional limpa com 5 dias de reinfestação; (20) convencional limpa com 10 dias de reinfestação.

Tabela 3 Íons detectados via Espectrometria de Massas com Ionização Electrospray, em plantas de milho convencional (30F35) e milho Bt (30F35Hx) limpas e infestadas por *Tetranychus urticae*.

Íons (m/z)	Tratamentos			
	Bt infestada	Bt limpa	Convencional infestada	Convencional limpa
274,36	21 ^{a,b}	45,87	20,33	23,5
318,37	33,5	76	32,25	50
362,33	0	0	14,5	16
453,26	11	30	0	0
475,43	0	0	70	70
550,69	38,5	0	0	33
568,3	0	10	0	0
701,53	100	100	97	92
702,58	38,75	0	39,25	30,75
717,56	20	0	22,5	19,37
787,64	0	10	0	0
797,45	41,5	0	0	12,5
871,47	61,5	55,33	50,5	29,83
872,2	0	31	0	0
893,47	29,33	7,5	0	0
939,36	51	0	0	0
955,3	0	18,5	0	0
959,51	16,87	17,75	9,16	12,5
975,5	0	0	0	10,5
Número total de íons	12	11	9	12

^a abundância relativa do íon (%).

^b média das plantas avaliadas com 1, 3, 5 e 10 dias após a reinfestação.

ARTIGO 2

INFESTAÇÃO MÚLTIPLA INDUZ DEFESA DIRETA AO ÁCARO-RAJADO EM PLANTAS DE MILHO

Artigo escrito conforme as normas do periódico Pest Management Science

Resumo

CONHECIMENTO PRÉVIO: Mecanismos de defesas podem ser induzidos pelas plantas quando infestadas por herbívoros. Sob infestações múltiplas pode haver interação das rotas de defesas. O objetivo deste trabalho foi avaliar se há interação das rotas de defesas em plantas de milho Bt e convencional com infestações múltiplas de ácaro-rajado *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) e lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (A+L). **RESULTADOS:** As populações de ácaro-rajado reinfestadas em milho convencional e Bt infestado com ácaro-rajado não diferiram quanto as variáveis biológicas avaliadas. Milho convencional infestado com A+L diferiu dos demais tratamentos na análise de componentes principais, reduzindo a sobrevivência e reprodução do ácaro-rajado. Nessas plantas foram identificados compostos de defesa. **CONCLUSÃO:** Infestação múltipla de A+L em milho convencional, reduziu a sobrevivência e reprodução do ácaro-rajado reinfestado. Além disso, nessas plantas foram identificados três compostos de defesa nessas plantas, o HMBOA-Glc, Linoleoil-GPI e kaempferol rutinose. Isto sugere que infestação múltipla induz defesa ao ácaro-rajado em milho convencional. Esse é o primeiro relato de defesa induzida direta ao ácaro-rajado, em milho convencional com infestação de A+L. A toxina inseticida Cry 1F no milho Bt não afeta as variáveis biológicas de *T. urticae*. Isto indica que o ácaro-rajado pode tornar-se praga nessas plantas por não apresentar defesa induzida direta.

Palavras-chave: resistência de plantas; interação de defesas de plantas; defesa constitutiva; *Spodoptera frugiperda*, *Tetranychus urticae*

MULTIPLE INFESTATION INDUCES DIRECT DEFENSE OF TWO-SPOTTED SPIDER MITE ON MAIZE PLANTS

Abstract

BACKGROUND: Mechanisms of defenses can be induced by plants when infested by herbivores. Under multiple infestations there may be interaction of the defensive routes. The objective of this work was to evaluate the interaction of defensive routes in Bt and conventional corn plants with multiple infestations of two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (A+L). **RESULTS:** Two-spotted spider mite populations reinfested in conventional and Bt maize infested with two-spotted spider mite did not differ as to the biological parameters evaluated. Conventional maize infested with A+L differed from the other treatments in the analysis of main components, reducing the survival and reproduction of the mite. In these plants, defense compounds were identified. **CONCLUSION:** Multiple infestation of A+L in conventional maize, reduced survival and reproduction of reinfested mite. Moreover, in these plants, three defense compounds were identified in these plants, HMBOA-Glc, Linoleoyl-GPI and kaempferol rutinose. This suggests that multiple infestation induces defense against the two-spotted spider mite in conventional maize. Cry 1F insecticide toxin in Bt maize does not affect biological parameters of *T. urticae*. This is the first report of direct induced defense against the two-spotted spider mite in conventional maize with A+L infestation. This indicates that the spider mite may become a pest in these plants because it does not present direct induced defense.

Keywords: resistance of plants; interaction of plant defenses; constitutive defense; *Spodoptera frugiperda*, *Tetranychus urticae*

1 INTRODUÇÃO

As plantas podem induzir mecanismos de defesas contra os herbívoros. Um exemplo é a defesa induzida direta, onde as plantas, após serem infestadas por herbívoros, produzem compostos repelentes, deterrentes alimentar e de oviposição ou tóxicos sobre os próprios herbívoros¹⁻⁴. Para produzir tais compostos, ocorrem mudanças químicas nas plantas através das rotas do ácido salicílico (SA) e ácido jasmônico (JA)⁵⁻⁷. Essas rotas são específicas ao tipo de injúria causada pelo herbívoro^{5,8}. Insetos com aparelho bucal mastigador induzem defesa pela rota do JA, enquanto insetos picador-sugadores induzem a rota do SA^{9,10}. Porém, as plantas estão expostas a infestações múltiplas¹¹. Diversos estudos mostram a interferência antagônica ou de sinergismo em ataques simultâneos na indução das rotas de defesa nas plantas^{9,10,12-14}.

Outro exemplo de defesa das plantas é a defesa constitutiva, que é expressa de forma contínua na planta, independente da presença do herbívoro^{3,6,15}. As plantas geneticamente modificadas, como o milho Bt, são exemplos de defesa constitutiva, visto que essas plantas possuem um alto grau de resistência, principalmente a espécies de lepidópteros-praga, pela introdução de um ou mais genes da bactéria de solo *Bacillus thuringiensis* (Bt)¹⁶.

Sabe-se que pode haver interação entre os mecanismos de defesas nas plantas^{10,13}. Estudos realizados em plantas de algodão mostraram uma relação de antagonismo entre plantas de algodão Bt e a indução de defesa direta por *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), onde plantas Bt infestadas apresentaram menor nível de terpenóides e maior número de *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) reinfestados em comparação as plantas convencionais¹⁷. Plantas de milho convencional e Bt infestadas por diferentes herbívoros podem ser uma ferramenta para investigar a interação de defesas de plantas. Visto que o milho Bt já possui defesa constitutiva, comparações com o milho não-Bt podem mostrar se há interferência entre defesa constitutiva e defesa induzida direta com infestação de herbívoros. Além disso, infestações simples e múltiplas nessas plantas podem indicar se há interação das rotas de defesa direta.

Neste trabalho foi avaliado se infestações múltiplas de lagarta-do-cartucho e ácaro-rajado (A+L), em milho convencional e Bt, podem interferir na defesa induzida direta dessas plantas. Foi testada a hipótese nula (H0) de que milho Bt e convencional respondem igualmente a infestações por ácaro-rajado e A+L. Objetivou-se, através de infestações e

reinfestações, de milho convencional e Bt, com ácaro-rajado e A+L, analisar os compostos químicos das plantas e as variáveis biológicas das populações de ácaro-rajado reinfestadas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado nas dependências da Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ), Campus Sete Lagoas, Sete lagoas, Minas Gerais, Brasil.

2.1 Herbívoros utilizados

Foi estabelecida uma criação de ácaro-rajado *Tetranychus urticae* em casa-de-vegetação. Para isso, sementes de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) foram semeadas em vasos plásticos (6,3 L) com o substrato Terral Solo® e mantidas em gaiolas com tela anti-afídeos. As gaiolas foram colocadas em casa-de-vegetação com temperatura controlada (25 ± 5 °C). Foi feita a irrigação sempre que necessária. Cerca de 15 dias após a semeadura, as plantas foram infestadas pelo ácaro-rajado *T. urticae*. Plantas novas e sem infestação foram acrescentadas na criação a cada 7 dias, colocando-as ao lado das plantas infestadas para que os ácaros passassem para as plantas novas. Após a passagem dos ácaros, as plantas velhas foram retiradas. Para iniciar a criação, ácaros-rajados foram coletados de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*) em casa-de-vegetação da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG. O material coletado foi levado ao laboratório para a triagem em microscópio estereoscópico para identificação e os indivíduos da espécie *T. urticae* foram transferidos individualmente para plantas de feijão-de-porco. As lagartas-do-cartucho utilizadas foram de 3º instar. Essas lagartas foram adquiridas da colônia estoque da Embrapa Milho e Sorgo.

2.2 Plantas de milho

Foi utilizado o milho híbrido 30F35 Hx (híbrido comercial Pioneer®), que expressa a proteína Cry1F (Bt), o híbrido não-Bt, 30F35 (convencional). Foram semeadas três sementes em vasos plásticos (1 L), com o substrato Terral Solo® e mantidas no interior de gaiolas com tela anti-afídeos em casa-de-vegetação. Após duas semanas foi realizado o desbaste, deixando uma planta por vaso que foi adubada com sulfato de amônio (0,2 g). A adubação foi repetida a

cada 15 dias e a irrigação foi feita sempre que necessária. Com 40 dias após a semeadura, as plantas foram utilizadas nos experimentos.

2.3 Defesa induzida direta com infestação múltipla em milho convencional e Bt

O experimento foi realizado em casa-de-vegetação com quatro grupos de 20 plantas, sendo dois grupos de milho convencional e dois de milho Bt. Os grupos de plantas foram separados em gaiolas teladas. Um grupo de milho Bt e outro convencional foram infestados com 10 fêmeas do ácaro-rajado. A infestação foi feita na parte abaxial de uma folha de cada planta de milho, mantidas em uma barreira feita com cola entomológica Biocontrole[®]. Outro grupo de cada híbrido de milho foi infestado em uma folha com 10 fêmeas do ácaro-rajado, e em outra folha com uma lagarta-do-cartucho de terceiro ínstar. A infestação com a lagarta foi feita na parte adaxial da folha, utilizando uma “clip-cage”.

Após dois dias, todas as plantas foram reinfestadas com 10 fêmeas do ácaro-rajado, seguindo a mesma metodologia da infestação.

Um dia após a reinfestação, foi feito o sorteio para a avaliação, que durou 10 dias. Os vasos numerados de 1 a 20 foram sorteados, de maneira que cada vaso com uma planta de milho tornou-se uma unidade amostral (=repetição), independente e verdadeira. Foi retirada a folha que foi reinfestada, cortando-a na sua extremidade com tesoura, colocando-a em uma vasilha plástica com tampa e levada ao laboratório para avaliação em microscópio estereoscópico. Em cada dia foram avaliadas um total de oito folhas, sendo duas pertencentes ao grupo das plantas Bt infestadas com ácaro-rajado, duas do grupo Bt infestadas com A+L, duas do grupo convencional infestadas com ácaro-rajado e duas do grupo convencional infestadas com A+L. Avaliou-se o número de indivíduos jovens, ovos e de fêmeas adultas vivas e mortas.

Foram retiradas folhas limpas das plantas avaliadas em cada grupo nos dias 0, 1, 3, 5 e 10 de reinfestação, para a análise química. Para garantir que qualquer modificação no padrão dos íons seja resultado do tratamento e não de alguma variação aleatória, manteve-se plantas testemunhas (= sem infestação e/ou reinfestação). O preparo das amostras foi feito macerando 500 mg de folhas de cada planta separadamente, em um béquer (50 ml) com bastão de vidro. Foi acrescentado metanol (5 ml) e vedado com papel alumínio e filme PVC. Após 4 horas, com uma seringa (10 ml), descartável, acoplada a um filtro de seringa pré-limpo soldado

PVDF (25mm x 0,45µm), foi retirado o sobrenadante e transferido para um eppendorf. Em seguida, a solução (10 µL) foi transferida para outro eppendorf e acrescentou metanol (1 ml).

Utilizou-se o aparelho de Espectrometria de Massas com Ionização Electrospray (ESI-MS) ¹⁸, onde íons gasosos são gerados e separados da amostra, de acordo com suas razões massa/carga (m/z) ¹⁹. Como pouca energia é transferida para a amostra, os íons formados possuem energia residual interna relativamente baixa. Nessa técnica, os espectros de massas obtidos possuem poucos íons fragmentos e de íons precursores relativamente intensos. Diante disso, pouca informação estrutural pode ser obtida ²⁰.

2.4 Análises estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro tratamentos e 20 repetições por tratamento. Para os dados biológicos utilizou-se modelos lineares generalizados com distribuição de Poisson, tendo como variável independente (x) a qualidade da planta (i.e. Bt e convencional: infestada com A+L ou infestada com ácaro-rajado). As variáveis dependentes (y's) foram os parâmetros biológicos dos ácaros fêmeas reinfestados (i.e. número de fêmeas vivas, mortas, número de indivíduos jovens e número de ovos) e os parâmetros químicos das plantas. Submeteu-se os dados a testes de normalidade e análises de resíduos para avaliar os pressupostos das análises e a adequação dos modelos ajustados ²¹. Na análise dos parâmetros químicos das plantas, realizou-se a média dos íons detectados em cada dupla de plantas. Submeteu-se os dados a uma análise dos componentes principais (PCA). Com os íons detectados e a abundância relativa dos mesmos, foi montada uma tabela para análise descritiva destes íons. Foi utilizado o programa R (R Development Core Team 2014) para a análise exploratória dos dados e análises estatísticas.

3 RESULTADOS

3.1 Parâmetros biológicos

As variáveis avaliadas nas populações reinfestadas do ácaro-rajado foram significativamente afetadas em plantas de milho convencional infestadas com A+L, em comparação às plantas infestadas somente com ácaro-rajado (Figura 1). Houve uma redução

no número de fêmeas adultas vivas em plantas infestadas com A+L (Figura 1A). Os números de ovos (Figura 1C) e de indivíduos jovens (Figura 1B) também reduziram. E o número de fêmeas mortas aumentou (Figura 1D).

Em plantas de milho Bt, a infestação com A+L não interferiu no número de fêmeas adultas vivas (Figura 2A), indivíduos jovens (Figura 2B) e número de ovos (Figura 2C) da reinfestação. Não houve diferença destes parâmetros em comparação à população reinfestada em plantas de milho Bt infestadas com ácaro-rajado. O número de fêmeas adultas mortas foi menor em plantas Bt infestadas com ácaro-rajado (Figura 2D).

Ao comparar plantas Bt e convencionais infestadas com A+L, nota-se que todos os parâmetros biológicos avaliados foram negativamente influenciados em plantas de milho convencional (Figura 3). Houve redução no número de fêmeas adultas vivas (Figura 3A), ovos (Figura 3C) e indivíduos jovens (Figura 3B). Aumentou o número de fêmeas adultas mortas (Figura 3D) das populações mantidas em plantas convencionais. As lagartas mantidas nas plantas Bt apresentaram alimentação reduzida. Já em plantas convencionais, as lagartas alimentaram-se de boa parte da folha em que estavam. Nota-se, então, que plantas convencionais sofreram uma injúria maior pelas lagartas, em comparação ao milho Bt.

3.2 Variáveis químicas

A análise dos componentes principais (PCA) explicou 39,9% da variação dos compostos químicos detectados em plantas de milho convencional e Bt, infestadas por *T. urticae* ou/e *S. frugiperda*, após diferentes dias de reinfestação (Figura 4).

Há similaridade entre os íons das plantas Bt testemunha, assim como das convencionais (Figura 4). As plantas testemunhas ficaram sobrepostas, indicando um mesmo padrão entre as mesmas. Com isso, houve garantia de que o padrão dos compostos químicos é resultado do tratamento.

Plantas convencionais e Bt infestadas por ácaro-rajado tiveram padrão similar dos compostos químicos, ficando próximas e até sobrepostas (Figura 4). As plantas convencionais infestadas com A+L ficaram afastadas das citadas anteriormente, indicando uma divergência no padrão dos compostos químicos (Figura 4). As plantas Bt infestadas com A+L, ficaram mais próximas daquelas infestadas somente com ácaro-rajado (Figura 4).

O número total de compostos detectados foi próximo entre as plantas Bt com ambos os tipos de infestação e a convencional infestada com ácaro-rajado, variando de 9 a 12 (Tabela

1). Já as plantas convencionais tiveram o maior número de composto total, chegando a 19 compostos (Tabela 1).

O íon 701, 53 m/z foi detectado com abundância relativa alta em quase todos os grupos de plantas, exceto no milho convencional com infestação múltipla, que não foi detectado (Tabela 1). Além disso, houve compostos que foram detectados apenas nas plantas convencionais com infestação múltipla (Tabela 1). Dentre esses compostos, alguns foram encontrados em trabalhos com milho infestados por herbívoros. O composto com massa 279, 06 m/z foi identificado como Linoleoil-GPI ²². O 356,08 m/z foi identificado como HMBOA-Glc (2-hidroxi-7-metoxi-1,4 (2H) -benzoxazin-3 (4H) -on) - β -d-glucopiranosido) ²²⁻²⁴ e o 593,4 m/z como kaempferol rutinose ²². Foi constatado que as plantas de milho convencional infestadas com A+L tiveram um padrão de compostos químicos diferente dos demais grupos. Além disso, nesse grupo de plantas foram identificados compostos de defesa de plantas.

4 DISCUSSÃO

Infestações múltiplas de *T. urticae* e *S. frugiperda* em milho convencional afetaram as variáveis biológicas da população de *T. urticae* reinfestada, em comparação às plantas infestadas com ácaro-rajado. A sobrevivência e reprodução de *T. urticae* foram menores nas plantas convencionais com infestação múltipla. Os resultados sugerem a indução de defesa direta ao ácaro-rajado em milho convencional com infestação de A+L, uma vez que a interferência negativa em parâmetros biológicos de herbívoros é um sinal da elicitação de defesa induzida direta ²⁵. Já entre o milho Bt infestado por ácaro-rajado e A+L, os parâmetros biológicos de *T. urticae* reinfestado não diferiram

A sobrevivência e reprodução de *T. urticae* foram menores no milho convencional com infestação simultânea de *T. urticae* e *S. frugiperda*, que no milho Bt sob a mesma infestação. Isto sugere a indução de defesa direta apenas em milho convencional. Uma explicação para essa diferença de indução de defesa entre milho Bt e convencional é a intensidade da injúria nas plantas ^{26,27}. As lagartas apresentaram alimentação reduzida nas plantas Bt, enquanto nas plantas convencionais, alimentaram-se de parte da folha em que estavam. Sendo assim, a menor intensidade da injúria nas plantas Bt, provavelmente não foi suficiente para induzir defesa direta contra o ácaro-rajado. Outra explicação para esses resultados é devido ao milho Bt apresentar defesa constitutiva. Por já possuir um tipo de

defesa contra herbivoria, talvez essas plantas não utilizem seus recursos para o acioamento de outro tipo de defesa ²⁸.

Na análise dos componentes principais, as plantas de milho Bt e convencional infestadas com ácaro-rajado e milho Bt infestado com A+L apresentaram similaridade. Esses resultados mostram que a infestação múltipla ou simples em milho Bt não interfere no padrão de íons da planta. Além disso, constata-se que milho convencional e Bt infestados por *T. urticae* não diferem quanto ao padrão de íons, sugerindo que a toxina inseticida Cry 1F presente no milho Bt não interfere na produção de compostos pela herbivoria de *T. urticae*.

O grupo de plantas de milho convencional sob infestação múltipla difere dos demais grupos de plantas, pela análise dos componentes principais. O íon 701, 53 m/z que foi detectado em todos os grupos, está ausente no milho convencional com A+L. Esse íon não foi identificado pela falta de informação estrutural com o método de ESI/MS ^{19,20}. É possível que esse íon 701, 53 m/z seja um precursor na formação de compostos de defesas da planta a herbívoros. Isso explicaria a ausência desse íon no milho convencional com infestação múltipla, pois nessas plantas foram identificados três compostos indicados na literatura como de defesa das plantas, que são o Linoleoil-GPI, HMBOA-Glc e Kaempferol rutinose ²².

O composto HMBOA-Glc, possui propriedades tóxicas e anti-alimentar para herbívoros ²⁹. Não estão relatados na literatura as propriedades inseticidas dos compostos Kaempferol rutinose e Linoleoil-GPI, mas foram relatados em trabalhos que evidenciam defesa induzida direta ²⁴. A presença desses compostos no milho convencional infestado por *T. urticae* e *S. frugiperda* explica a sobrevivência e reprodução da população de *T. urticae* reinfestado. A infestação múltipla nessas plantas foi capaz de induzir a produção dos compostos de defesa que agiram diretamente sobre o ácaro reinfestado. Conclui-se então, que houve defesa induzida direta, onde a presença de compostos químicos de defesa acarretou efeitos negativos sobre herbívoros, após a planta sofrer herbivoria ⁷. A indução das rotas do JA e SA é específica ao tipo de injúria causada pelo herbívoro ^{5,8}. Como a lagarta *S. frugiperda* ou/e *T. urticae* possuem aparelho bucal diferentes, pode ser que rotas de defesa distintas foram acionadas. Estudos investigando as rotas acionadas podem esclarecer se foram as herbivorias de ambos herbívoros juntas que induziram a produção dos compostos de defesas ou se apenas um desses herbívoros foi responsável por isso.

Este trabalho possui o primeiro relato de defesa induzida direta ao ácaro-rajado, em milho convencional com infestação múltipla de *T. urticae* e *S. frugiperda*, com identificação de compostos de defesas da planta. Os resultados mostram que a toxina inseticida Cry 1F no

milho Bt não influencia nas populações de *T. urticae*. Isto sugere que o ácaro-rajado pode tornar-se praga nessas plantas por não apresentar defesa induzida direta. Trabalhos futuros devem ser conduzidos para evidenciar se plantas de milho convencional infestadas com *S. frugiperda* e com *T. urticae* + *S. frugiperda* são igualmente capazes de induzir defesa direta ao ácaro-rajado. Assim, comprovando quais rotas de defesa são acionadas e se há interação das rotas sob infestação múltipla.

5 REFERÊNCIAS

- 1 Fürstenberg-Hägg J, Zagrobelny M and Bak S, Plant defense against insect herbivores. *Int J Mol Sci* **14**:10242–10297 (2013).
- 2 Howe GA and Schaller A, Direct Defenses in Plants and Their Induction by Wounding and Insect Herbivores, in *Induced Plant Resistance to Herbivory*, ed. by Schaller A. Springer Netherlands, Stuttgart, Germany, pp. 7–29 (2008).
- 3 Karban R and Myers JH, Induced Plant Responses to Herbivory. *Annu Rev Ecol Syst* **20**:331–348 (1989).
- 4 Kessler A and Baldwin IT, Plant Responses to Insect herbivory: The Emerging Molecular Analysis. *Annu Rev Plant Biol* **53**:299–328 (2002).
- 5 Vos M, Van Oosten VR, Van Poecke RMP, Van Pelt JA, Pozo MJ, Mueller MJ et al., Signal Signature and Transcriptome Changes of Arabidopsis During Pathogen and Insect Attack. *Mol Plant-Microbe Interact* **18**:923–937 (2005).
- 6 Chen M, Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Sci* **15**:101–114 (2008).
- 7 Schaller, A. *Induced Plant Resistance to Herbivory*, 2008, 462
- 8 Walling LL, The myriad plant responses to herbivores. *J Plant Growth Regul* **19**:195–216 (2000).
- 9 Thaler JS, Humphrey PT and Whiteman NK, Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends Plant Sci* **17**:260–270 (2012).
- 10 Thaler JS, Karban R, Ullman DE, Boege K and Bostock RM, Cross-talk between jasmonate and salicylate plant defense pathways: Effects on several plant parasites. *Oecologia* **131**:227–235 (2002).
- 11 Dicke M, Van Loon JJA and Soler R, Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. *Nat Chem Biol* **5**, 317–324 (2009).

- 12 de Oliveira EF, Pallini A and Janssen A, Herbivores with similar feeding modes interact through the induction of different plant responses. *Oecologia* **180**:1–10 (2016).
- 13 Rodriguez-saona C, Chalmers JA, Raj S and Thaler JC, Induced plant responses to multiple damagers : differential effects on an herbivore and its parasitoid. *Oecologia* **143**:566–577 (2005).
- 14 Rodriguez-Saona CR, Musser RO, Vogel H, Hum-Musser SM and Thaler JS, Molecular, Biochemical, and Organismal Analyses of Tomato Plants Simultaneously Attacked by Herbivores from Two Feeding Guilds. *J Chem Ecol* **36**:1043–1057 (2010).
- 15 Mello MO and Silva Filho MC, Plant-insect interactions:an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian J Plant Physiol* **14**:71–81 (2002).
- 16 Maagd RA, Bosch D and Stiekema W, Bacillus thuringiensism toxin-mediated insect resistance in plants. *Elsevier Sci* **4**:9–13 (1999).
- 17 Hagenbucher S, Wackers FL, Wettstein FE, Olson DM, Ruberson JR and Romeis J, Pest trade-offs in technology: reduced damage by caterpillars in Bt cotton benefits aphids. *Proc R Soc* **280**, DOI: 20130042–20130042 (2013).
- 18 Catharino RR, Haddad R, Cabrini LG, Cunha IBS, Sawaya ACHF and Eberlin MN, Characterization of vegetable oils by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting: Classification, quality, adulteration, and aging. *Anal Chem* **77**:7429–7433 (2005).
- 19 Silverstein RM, Webster FX and Kiemle DL, *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*, 2006, 506
- 20 Yamashita M and Fenn JB, Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *Journal Phys Chem* **88**:4451–4459 (1984).
- 21 Crawley JM, *The R Book*, 2013, 975
- 22 Marti, G. Erb M, Boccard J, Glauser G., Doyen GR, Villard N et al., Metabolomics reveals herbivore-induced metabolites of resistance and susceptibility in maize leaves and roots. *Plant, Cell Environ* **36**:621–639 (2013).
- 23 Oikawa A, Ishihara A, Hasegawa M, Kodama O and Iwamura H, Induced accumulation of 2-hydroxy-4,7-dimethoxy-1,4-benzoxazin-3-one glucoside (HDMBOA-Glc) in maize leaves. *Phytochemistry* **56**:669–675 (2001).
- 24 Wouters FC, Blanchette B, Gershenson J and Vassão DG, Plant defense and herbivore counter-defense: benzoxazinoids and insect herbivores. *Phytochem Rev* **15**:1127–1151 (2016).

- 25 Alba JM, Glas JJ, Schimmel BC, J and Kant MR, Avoidance and suppression of plant defenses by herbivores and pathogens. *J Plant Interact* **6**:221–227 (2011).
- 26 Brown GC, Nurdin F, Rodriguez JG and Hildebrand DF, Inducible Resistance of Soybean (var 'Williams') to Two spotted Spider Mite (*Tetranychus urticae* Koch). *J Kansas Entomol Soc* **64**:388–393 (1991).
- 27 Nachappa P, Margolies DC, Nechols JR and Loughin T, Phytoseiulus persimilis response to herbivore-induced plant volatiles as a function of mite-days. *Exp Appl Acarol* **40**:231–239 (2006).
- 28 Steppuhn A and Baldwin IT, Induced Defenses and the Cost-Benefit Paradigm, in *Induced Plant Resistance to Herbivory*, ed. by Schaller A. Springer Netherlands, Stuttgart, Germany, pp. 61–83 (2008).
- 29 Wouters FC, Gershenzon J and Vassão DG, Benzoxazinoids: Reactivity and modes of action of a versatile class of plant chemical defenses. *J Braz Chem Soc* **27**:1379–1397 (2016).
- 30 R Core Team. A Language and Environment for Statistical Computing. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna*. (2014). Available at: <http://www.r-project>.

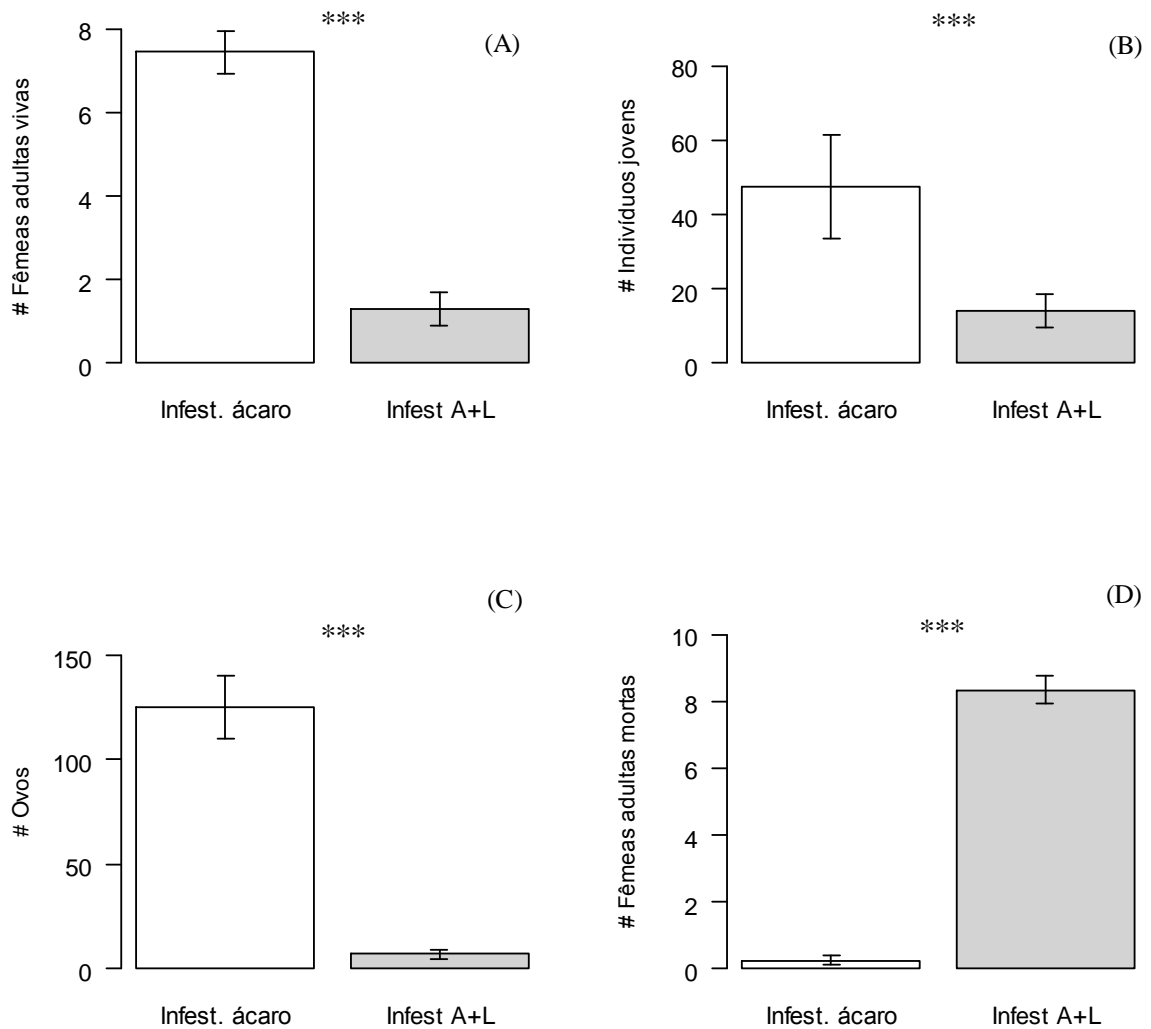


Figura 1 Número (média \pm erro padrão da média) de fêmeas adultas vivas (A, $\chi^2=7,65$; g.l.=37; $p<0,001$), indivíduos na fase jovem (B, $\chi^2=2,60$; g.l.=36; $p<0,001$), ovos (C, $\chi^2=2,14$; g.l.=36; $p<0,001$) e fêmeas adultas mortas (D, $\chi^2=5,38$; g.l.=37; $p<0,001$) de *Tetranychus urticae* em plantas de milho convencional (30F35) infestadas com *T. urticae* (barras brancas) e com infestação múltipla de *T. urticae* e *Spodoptera frugiperda* (barras cinzas).

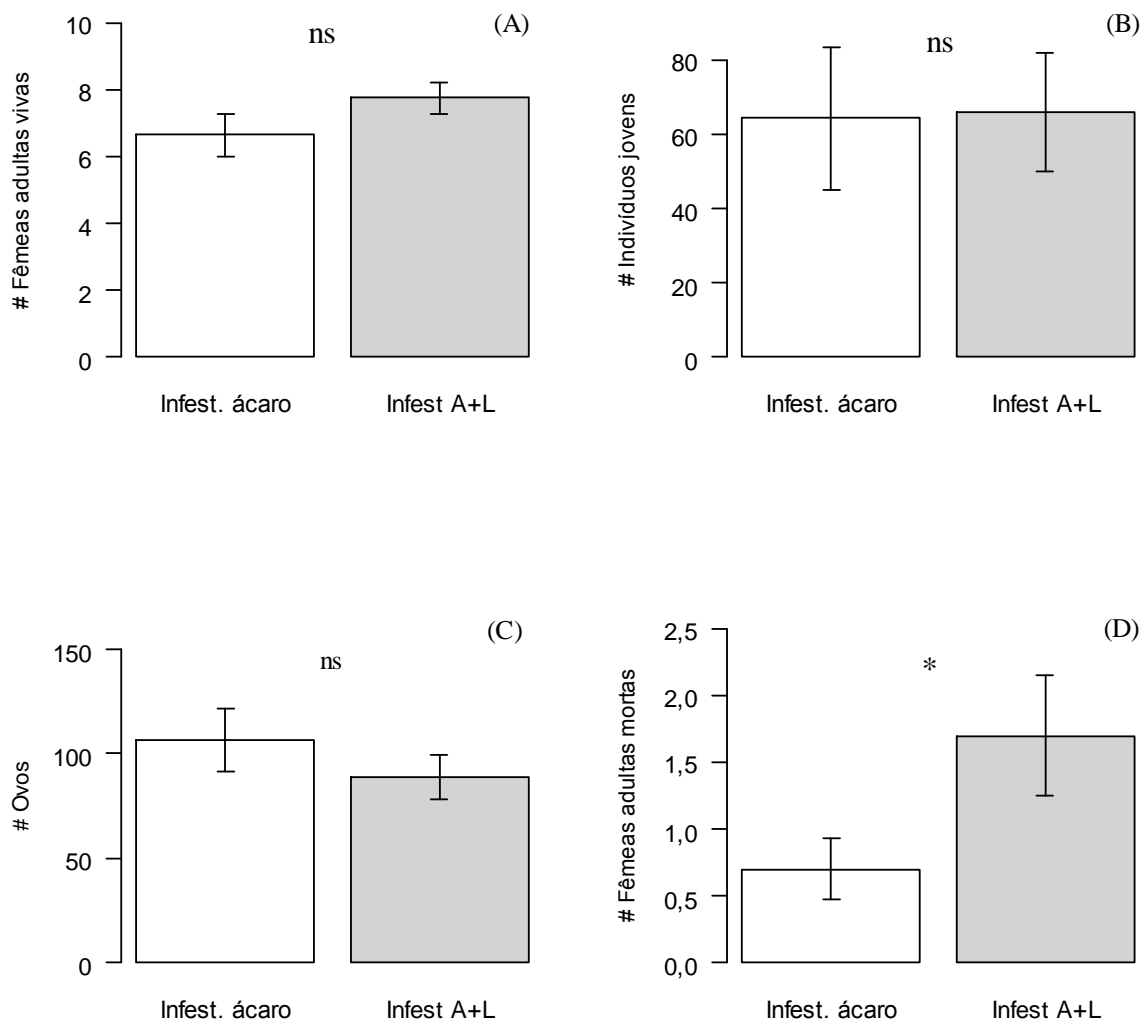


Figura 2 Número (média \pm erro padrão da média) de fêmeas adultas vivas (A, $\chi^2=29,5$; g.l.=37; $p=0,195$), indivíduos jovens (B, $\chi^2=39,1$; g.l.=36; $p=0,670$), ovos (C, $\chi^2=31,7$; g.l.=36; $p=0,326$) e fêmeas adultas mortas (D, $\chi^2=22,0$; g.l.=37; $p=0,024$) de *Tetranychus urticae*, em plantas de milho Bt (30F35Hx) infestadas com *T. urticae* (barras brancas) e com infestação múltipla de *T. urticae* e *Spodoptera frugiperda* (barras cinzas).

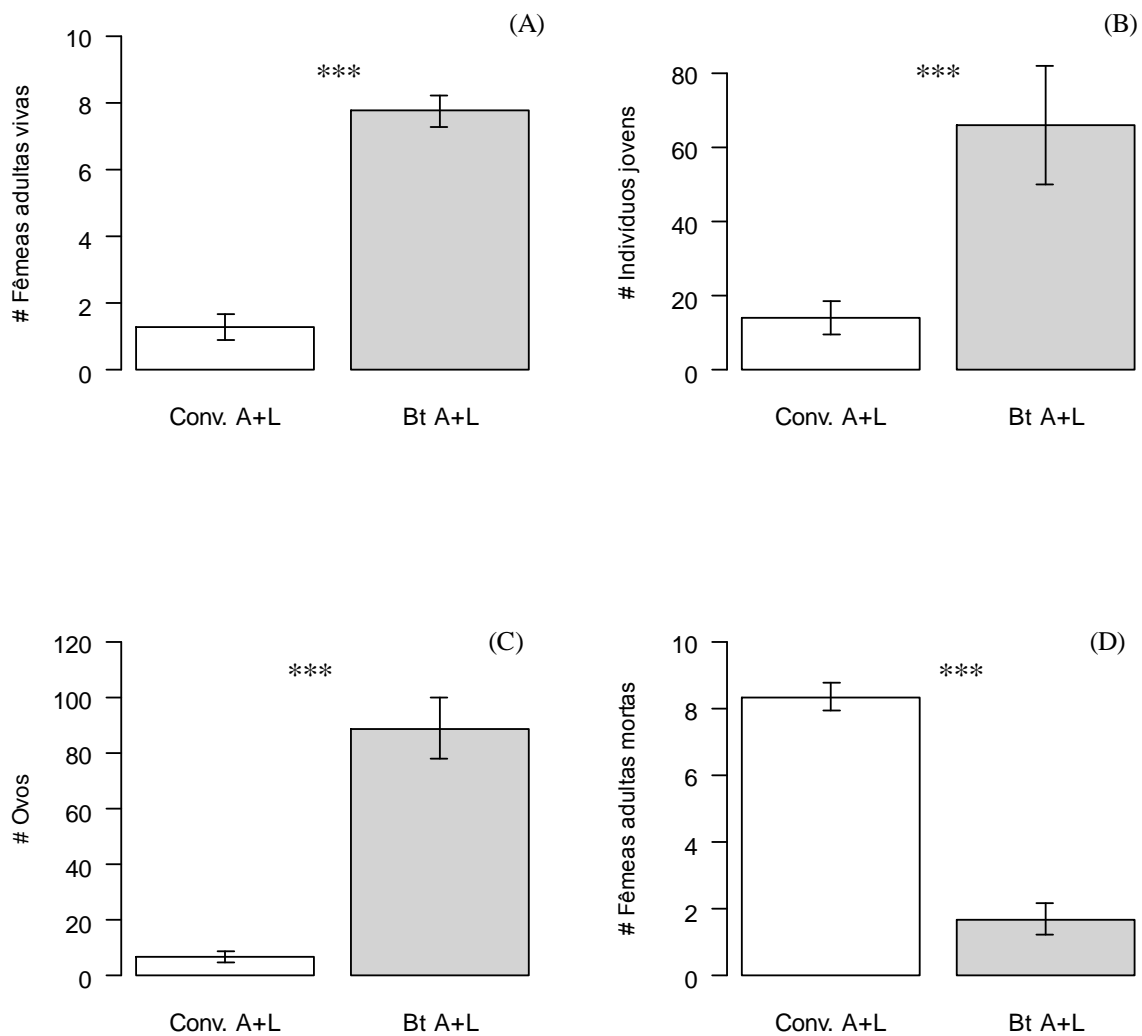


Figura 3 Número (média \pm erro padrão da média) de fêmeas adultas vivas (A, $\chi^2=7,39$; g.l.=37; $p<0,001$), indivíduos jovens (B, $\chi^2=2,14$; g.l.=36; $p<0,001$), ovos (C, $\chi^2=2,14$; g.l.=36; $p<0,001$) e fêmeas adultas mortas (D, $\chi^2=7,7$; g.l. =36; $p<0,001$) de *Tetranychus urticae*, em plantas de milho convencional (30F35) (barras brancas) e milho Bt (30F35 Hx) (barras cinzas) com infestação múltipla de *T. urticae* e *Spodoptera frugiperda*.

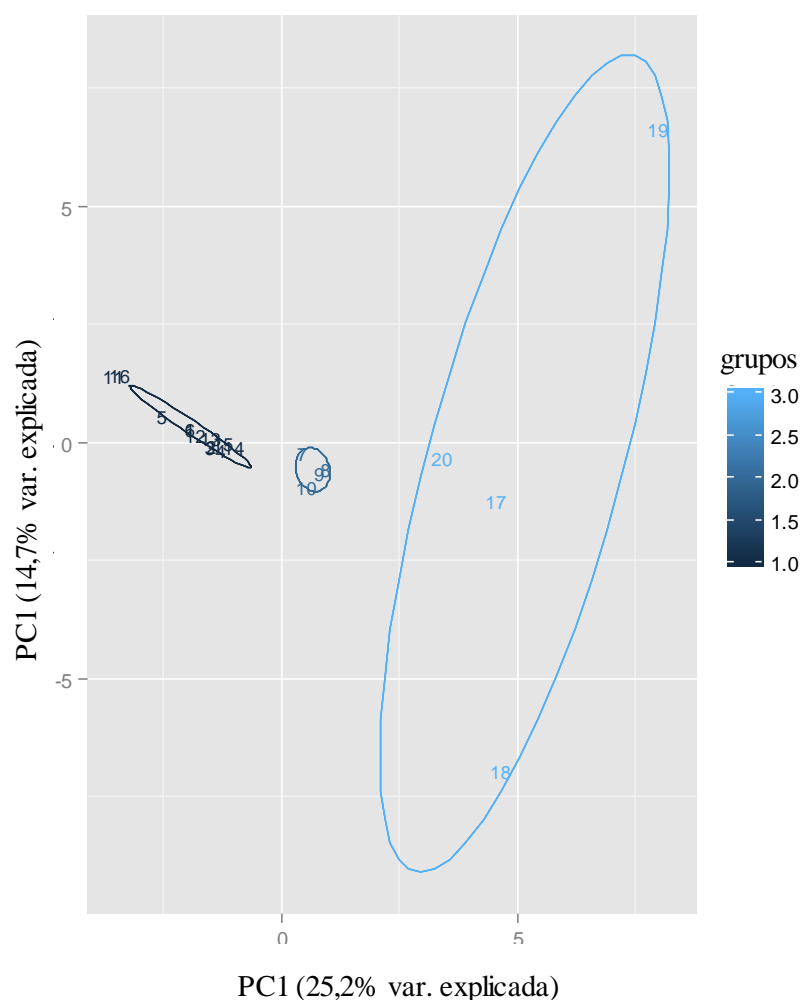


Figura 4 Análise de componentes principais (PCA) dos compostos químicos detectados, via Espectrometria de Massas com Ionização Electrospray, em plantas de milho convencional (Pioneer 30F35) e Bt (30F35 Hx) infestadas com *Tetranychus urticae* ou *T. urticae* mais *Spodoptera frugiperda* (A+L), em diferentes dias de reinfestação. (1) planta Bt limpa (testemunha); (2) Bt com ácaro-rajado e 1 dia de reinfestação; (3) Bt com ácaro-rajado e 3 dias de reinfestação; (4) Bt com ácaro-rajado e 5 dias de reinfestação; (5) Bt com ácaro-rajado e 10 dias de reinfestação; (6) planta Bt limpa (testemunha); (7) Bt com A+L e 1 dia de reinfestação; (8) Bt com A+L e 3 dias de reinfestação; (9) Bt com A+L e 5 dias de reinfestação; (10) Bt com A+L e 10 dias de reinfestação; (11) planta convencional limpa (testemunha); (12) convencional com ácaro-rajado e 1 dia de reinfestação; (13) convencional com ácaro-rajado e 3 dias de reinfestação; (14) convencional com ácaro-rajado e 5 dias de reinfestação; (15) convencional com ácaro-rajado e 10 dias de reinfestação; (16) planta convencional limpa (testemunha); (17) convencional com A+L e 1 dia de reinfestação; (18) convencional com A+L e 3 dias de reinfestação; (19) convencional com A+L e 5 dias de reinfestação; (20) convencional com A+L e 10 dias de reinfestação.

Tabela 1 Íons detectados, via Espectrometria de Massas com Ionização Electrospray, em plantas de milho convencional (Pioneer 30F35) e milho Bt (Pioneer 30F35Hx) infestadas por *Tetranychus urticae* ou por *T. urticae* mais *Spodoptera frugiperda*.

Íons (m/z)	Tratamentos †			
	Bt_ácaro	Bt_A+L	cv_ácaro	cv_A+L
218,5	0	0	0	5 ‡ §
234,8	0	0	0	5
274,36	21	5	20,33	0
279,06	0	0	0	5
318,37	33,5	30,12	32,25	65
320	0	0	0	14
356,8	0	0	0	6,5
362,33	0	0	14,5	0
369,3	0	0	0	5
390,9	0	0	0	14,5
413,8	0	0	0	5
430,51	0	7,5	0	0
453,26	11	0	0	0
475,43	0	0	70	0
522,64	0	0	0	5
550,69	38,5	0	0	5
568,3	0	24,66	0	0
593,4	0	0	0	5
701,53	100	100	97	0
702,58	38,75	0	39,25	0
717,56	20	0	22,5	0
797,45	41,5	0	0	0
871,47	61,5	100	50,5	92,5
872,2	0	49,33	0	53,5
887,3	0	0	0	16,12
893,47	29,33	29	0	0
917,2	0	0	0	5
931,1	0	0	0	5,75
939,36	51	0	0	0
947,28	0	0	0	7,5
955,3	0	7,5	0	0
959,51	16,87	5	9,16	0
961,2	0	0	0	6,5
Número total de Íons	12	10	9	19

† Bt_ácaro: planta de milho Bt infestada com ácaro-rajado; Bt_A+L: plantas de milho Bt infestada com ácaro-rajado+lagarta-do-cartucho; cv_ácaro: plantas de milho convencional infestada com ácaro-rajado; cv_A+L: plantas de milho convencional infestada com ácaro-rajado+lagarta-do-cartucho

‡ abundância relativa do íon (%).

§ média das plantas avaliadas com 1, 3, 5 e 10 dias após a reinfestação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Essa dissertação aborda a primeira investigação de interação de mecanismos de defesa, com análise biológica e química, de milho Bt e convencional infestados pelo ácaro-rajado e com infestações múltiplas de ácaro-rajado e lagarta-do-cartucho. Também apresenta o primeiro relato de defesa induzida direta ao ácaro-rajado, em milho convencional com infestação simultânea de ácaro-rajado e lagarta-do-cartucho.

A toxina inseticida Cry 1F no milho Bt não afeta as populações de *T. Urticae*, pois o milho convencional e Bt respondem igualmente a infestações pelo ácaro-rajado. Os resultados sugerem a possibilidade de *T. urticae* vir a se tornar praga em milho convencional e Bt, pela ausência de defesa induzida direta.

Trabalhos futuros devem ser conduzidos para evidenciar se plantas de milho convencional infestadas com *S. frugiperda* e com *T. urticae* mais *S. frugiperda* são igualmente capazes de induz defesa direta ao ácaro-rajado. Ainda, será importante comprovar quais rotas de defesa são acionadas e se há interação das rotas sob infestação múltipla.