



PAULA DAIANA DE PAULO

DEFESA DIRETA INDUZIDA PELO ÁCARO-RAJADO
Tetranychus urticae **EM MILHO *Bt***

SETE LAGOAS – MG

2015



PAULA DAIANA DE PAULO

DEFESA DIRETA INDUZIDA PELO ÁCARO-RAJADO *Tetranychus urticae* EM MILHO BT

SETE LAGOAS/MG

2015

PAULA DAIANA DE PAULO

DEFESA DIRETA INDUZIDA PELO ÁCARO-RAJADO *Tetranychus urticae* EM MILHO *BT*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal de São João Del Rei, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Matiello Fadini

SETE LAGOAS/MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Divisão de Biblioteca da UFSJ, MG, Brasil.

P324d Paulo, Paula Daiana de, 1988 -
2015 Defesa direta induzida pelo ácaro-rajado *Tetranychus urticae* em milho
Bt/ Paula Daiana de Paulo. -- 2015.
68 f. : il.

Orientador: Marcos Antônio Matiello Fadini

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de São João Del-Rei,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias.

Inclui bibliografia.

1. Milho *Bt* - Doenças e pragas - Teses. 2. Milho *Bt*- Ácaro-rajado - Teses. 3. Milho *Bt* – Defesa direta - Teses. I. Fadini, Marcos Antônio Matiello. II. Universidade Federal de São João Del-Rei. Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 63

PAULA DAIANA DE PAULO

DEFESA DIRETA INDUZIDA PELO ÁCARO-RAJADO *Tetranychus urticae* EM MILHO BT

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal de São João Del Rei, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Matiello Fadini

Sete Lagoas, 13 de março de 2015.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Eugenio Eduardo De Oliveira- UFV

Dra. Simone Martins Mendes- Embrapa- CNPMS

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Matiello Fadini-UFSJ

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Júlio e Vânia, pelo apoio, incentivo e, sobretudo, ao amor e compreensão em todos os momentos, ao meu noivo Ronilson, pelo companheirismo, compreensão e apoio.

Dedico e Agradeço.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por suas bênçãos infinitas e proteção, e por permitir mais esta conquista em minha vida.

Ao Prof. Marcos Antonio Matiello Fadini, pela orientação, imenso incentivo, dedicação, confiança, oportunidade, por todos os ensinamentos e distinto exemplo que contribuíram de forma relevante em meu desenvolvimento profissional.

Aos meus pais Júlio de Paulo Filho e Vânia Lucia Rodrigues de Paulo pelo constante apoio e dedicação durante toda a minha vida.

À minha irmã Paloma Rodrigues de Paulo por torcer sempre por mim.

À minha sobrinha Manuella Rodrigues Dos Anjos por ser a luz e a alegria dos meus dias.

Ao meu noivo Ronilson Araújo, pelo amor, atenção, companheirismo, compreensão, apoio, por não medir esforços para me ajudar, por toda paciência, por acreditar em mim e simplesmente por existir em minha vida.

À minha amiga e irmã Anarely Costa Alvarenga, por sempre me apoiar, ajudar-me, pelo imenso carinho e por ser uma benção de Deus em minha vida.

À UFSJ pela oportunidade da realização do mestrado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, pelos ensinamentos e apoio.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Milho e Sorgo, pela disponibilização de recursos e infraestrutura para que o projeto pudesse ser realizado.

Aos Professores, Dr. Eugenio Eduardo De Oliveira e Dra. Simone Martins Mendes, por aceitarem compor a banca examinadora desta dissertação.

Aos amigos de turma Janaína, Kênia e Évélín pelos bons momentos, pela amizade verdadeira e apoio.

Aos amigos do Laboratório de Entomologia da UFSJ, Tamara, Valéria, Pedro, André e Victhória pela ajuda e risadas.

À todos os velhos e bons amigos que sempre me deram apoio e força, e contribuíram para o meu crescimento pessoal.

À todos meus familiares pelo apoio.

À UFSJ, Universidade Federal de São João Del Rei, pela concessão da bolsa de mestrado.

Enfim a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que eu pudesse realizar mais este sonho.

Muito Obrigada

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	6
3. Artigo 1: Defesa Induzida Direta Elicitada Pelo Ácaro-Rajado <i>Tetranychus urticae</i> Koch (Acari: Tetranychidae) Em Milho	13
3.1 RESUMO.....	14
3.2 INTRODUÇÃO.....	16
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.4 RESULTADOS.....	21
3.5 DISCUSSÃO.....	25
3.6 AGRADECIMENTOS.....	26
3.7 REFERÊNCIAS.....	27
4. Artigo 2: Defesa Induzida Direta Elicitada pelo Ácaro-Rajado <i>Tetranychus urticae</i> Koch (Acari: Tetranychidae) Em milho <i>Bt</i>	31
4.1 RESUMO.....	32
4.2 INTRODUÇÃO.....	34
4.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.4 RESULTADOS.....	39
4.5 DISCUSSÃO.....	43
4.6 AGRADECIMENTOS.....	44
4.7 REFERÊNCIAS.....	45
5. Artigo 3: Presença da proteína Cry No Ácaro-Rajado <i>Tetranychus urticae</i> Koch (Acari: Tetranychidae) alimentado com Milho Geneticamente Modificado com o Gene <i>bt</i> e no seu Predador <i>Neoseiulus californicus</i> McGregor (Acari: Pytoseiidae)	50

5.1 RESUMO.....	51
5.2 INTRODUÇÃO.....	53
5.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
5.4 RESULTADOS.....	57
5.5 DISCUSSÃO.....	61
5.6 AGRADECIMENTOS.....	63
5.7 REFERÊNCIAS.....	64
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	68

DEFESA DIRETA INDUZIDA PELO ÁCARO-RAJADO *Tetranychus urticae* EM MILHO *Bt*

RESUMO- As plantas desenvolvem mecanismos de defesa para se protegerem contra injúrias que podem sofrer por diversos herbívoros. Assim, mecanismo de proteção para se defenderem destes agentes é um diferencial para a sobrevivência e reprodução. Defesa induzida direta e indireta contra herbívoros pode manifestar-se em plantas de milho *Zea mays*. Além das defesas induzidas direta e indireta, existem as defesas constitutivas, em que as plantas expressam a resistência de forma contínua. Uma defesa constitutiva de planta que, nas últimas décadas, tem se difundido, são as das plantas geneticamente modificadas (GM) que expressam genes com atividade inseticida. Com a crescente utilização de cultivares transgênicas de milho com o gene *bt*, há uma demanda de estudo de impactos ambientais dessa tecnologia. O estudo das defesas de plantas e organismos não-alvo, como ácaros, pode fornecer informações sobre os possíveis efeitos do uso de cultivares transgênicas de milho sobre o agroecossistema. Apesar de não ser praga na cultura, o ácaro-rajado *Tetranychus urticae* é relatado infestando plantas de milho, podendo ser considerado, portanto, como organismo não-alvo. A presente dissertação foi realizada com os objetivos (i) Avaliar a indução de defesa induzida direta pelo ácaro-rajado *T. urticae* em milho; (ii) Avaliar a indução de defesa induzida direta pelo ácaro-rajado *T. urticae* em milho *Bt* e (iii) Avaliar a presença da proteína Cry no ácaro-rajado *T. urticae* alimentados com milho *Bt* e no seu predador *Neoseiulus californicus*. A infestação prévia de plantas de milho por *T. urticae* reduziu a sobrevivência das fêmeas adultas, reprodução e sobrevivência das formas imaturas do coespecífico. Os resultados sugerem a indução de defesa induzida direta. Este é primeiro relato de indução de defesa direta em milho pelo ácaro-rajado *T. urticae*. A infestação prévia de plantas de milho *Bt* por *T. urticae* não apresentou diferença nos padrões de sobrevivência de formas adultas e formas jovens do coespecífico em comparação com o milho convencional. Os resultados sugerem que o fato do milho *Bt* expressar a toxina inseticida Cry 1F não interfere a indução de defesa direta pelo ácaro-rajado *T. urticae*. Nos testes de presença da proteína Cry, os resultados mostram que a proteína Cry 1F está presente no terceiro nível trófico, ou seja, há o acúmulo da proteína Cry no ácaro fitófago *T. urticae* e no predador *Neoseiulus californicus*. A transgenia não afeta a indução de defesa direta elicitada pelo ácaro-rajado *T. urticae* em milho.

Palavras-chave: Acari, organismos geneticamente modificados, defesa direta, proteína *Bt*, organismos não-alvo

DIRECT DEFENSE INDUCED BY TWO-SPOTTED SPIDER MITE *Tetranychus urticae* ON *Bt* MAIZE

ABSTRACT- Plants develop defense mechanisms to protect themselves against injuries caused by various herbivores. Therefore, protection mechanisms to defend against these agents is an advantage for survival and reproduction. Direct and indirect induced defense against herbivores can manifest itself in *Zea mays* plants. In addition to direct and indirect induced defenses, there are constitutive defenses, in which the plants express resistance in a continuous manner. A constitutive defense that has spread in recent decades is that of genetically modified (GM) plants that express genes with insecticidal activity. With the increasing use of transgenic maize cultivars with the *bt* gene, there is a demand for studies on the environmental impacts this technology may cause. The study of plant and non-target organism defenses, such as dust mites, can provide information on the possible effects of the use of transgenic maize cultivars over the agro-ecosystem. Despite not being a pest for the culture, the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* is reported for infesting maize plants, and can, therefore, be considered as a non-target organism. The present thesis was conducted with the objectives of: (i) evaluating the induction of direct defense by the two-spotted spider mite *T. urticae* in maize; (ii) evaluating the induction of direct defense by the two-spotted spider mite *T. urticae* in *Bt* maize; and (iii) evaluating the presence of Cry protein in the two-spotted spider mite *T. urticae* fed *Bt* maize and in its predator, *Neoseiulus californicus*. The previous infestation of maize plants by *T. urticae* reduced the survival of adult females, reproduction and survival of immature forms of the conspecific. The results suggest the induction of direct defense. This is first report of direct defense induction in maize by the two-spotted spider mite *T. urticae*. The previous infestation of *Bt* maize plants by *T. urticae* showed no difference in survival standards for adult and juvenile forms of conspecific when compared with conventional maize. The results suggest that the fact that the *Bt* maize expresses insecticidal toxin Cry 1F does not interfere with the induction of direct defense by the two-spotted spider mite *T. urticae*. In the tests with the presence of the Cry protein, the results showed that the Cry1F protein is present in the third trophic level, i.e., there is an accumulation of the Cry protein in the phytophagous mite *T. urticae* and in the predator *Neoseiulus californicus*. Transgenics does not affect the induction of direct defense elicited by the two-spotted spider mite *T. urticae* in maize.

Keywords: Acari, genetically modified organisms, direct defense, *Bt* protein, non-target organisms

1. INTRODUÇÃO GERAL

As plantas desenvolvem uma variedade de mecanismos defensivos e modificações a fim de reduzir a perda de tecido pelos herbívoros (Cates, 1975). As defesas de plantas podem ser constitutivas ou induzidas (Karban & Myers, 1989; Price et al., 2001; Melo & Silva-Filho, 2002). Nas defesas constitutivas, as plantas expressam resistência de forma contínua e não dependem da ação de herbívoros, enquanto nas defesas induzidas, a resistência se expressa somente após a injúria, podendo atuar direta ou indiretamente sobre os herbívoros (Price, 1980). Os compostos produzidos pela planta em defesa direta e indireta são específicos e podem variar, pelo menos quantitativamente, entre variedades da mesma espécie e de acordo com o tipo de indutor (Baldwin et al., 2001).

As defesas constitutivas atuam continuamente e abrangem características estruturais que atuam como uma barreira mecânica, proporcionando dureza e rigidez, dificultando a locomoção e a alimentação pelo herbívoro (Becerra, 1994), por exemplo. Nessas, estão inclusas estruturas como tricomas, depósitos cuticulares, epiderme espessada, abundância de cristais, espinhos, fibras na folha, dentre outros (Becerra et al., 2001). As defesas constitutivas são metabólitos tóxicos e/ou repelentes, atuam minimizando o dano e reduzindo a palatabilidade (Arimura et al., 2005). A defesa induzida direta afeta a biologia do herbívoro (Schaller, 2008) e a defesa induzida indireta afeta os herbívoros, pela atração de inimigos naturais de tais herbívoros (Arimura et al., 2005; Dicke, 2009).

Na indução de defesa direta, estão envolvidas proteínas que se relacionam com os aspectos digestivos e de consumo dos alimentos pelo herbívoro, como inibidores de proteases (IPs), enzimas oxidativas (e.g. polifenol oxidase), enzimas que degradam aminoácidos, dentre outros (Howe & Jander, 2008).

A sinalização de defesa contra herbivoria é iniciada a partir da detecção por receptores presentes na membrana plasmática e, pelas vias de sinalização de transdução de sinal celular, ativam a transcrição de genes específicos contra o estresse. A resposta de defesa vegetal se dá por meio da interação de fito-hormônios, fatores de transcrição, genes e proteínas (Pandey, 2008). A sinalização da defesa direta está relacionada à produção de compostos, como o jasmonato e a sistemina que, por sua vez, estão relacionados à produção de IPs, nas células vegetais, responsáveis pela inativação das enzimas que digerem as proteínas no intestino dos insetos, por exemplo. Os insetos depois de ingerirem IPs apresentam má digestão seguida da

redução reprodutiva (Hilder, 1987). O jasmonato, além da indução de formação de proteínas relacionadas à defesa, também, é responsável pela regulação do desenvolvimento das plantas, como a senescência ou a formação do bulbo, dentre outras (Swamy, 2000). Outros octadecanoides, como o ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), o metil jasmonato (MJ) e os derivados do ácido linoleico também são responsáveis pela sinalização para a produção de compostos defensivos (Kessler & Baldwin, 2002).

Os metabólitos secundários foram considerados por muitos anos como produtos de excreção vegetal, em que não estão diretamente relacionados à fotossíntese, respiração e crescimento (Edwards & Wratten, 1981). Algumas destas substâncias, embora não necessariamente essenciais para as plantas, garantem vantagens para a sobrevivência e a perpetuação da espécie (Santos, 2003). A co-evolução das plantas, herbívoros e patógenos conduzem à síntese de metabólitos secundários, com função de defesa ou atração por parte da planta, determinada pelas necessidades ecológicas e possibilidades biossintéticas (Rhodes, 1994). As respostas das plantas à herbivoria podem reduzir, substancialmente, uma herbivoria subsequente. Desse modo, o dano causado, em algumas folhas, resulta em uma resposta sistêmica e na liberação de compostos voláteis por toda a planta (De Moraes et al., 2000). O entendimento dos mecanismos de defesa das plantas facilita o desenvolvimento de cultivares mais resistentes às pragas, bem como a determinação de relações evolutivas e bioquímicas entre as plantas e seus respectivos predadores (Walling, 2001; Bale et al., 2008; Chen, 2008).

Uma defesa constitutiva de planta que, nas últimas décadas, tem se difundido são as das plantas geneticamente modificadas (GM) que expressam proteínas com atividade inseticida e representam uma alternativa para o controle de insetos pragas, cujo aparelho bucal é do tipo mastigador (Prokopy, 1994). O milho geneticamente modificado com o gene bt é amplamente cultivado, essa tecnologia tem sido adotada no mundo todo (Kruger et al., 2012; Van den Berg, 2013). A bactéria *Bacillus thuringiensis* é o organismo mais utilizado como fonte de genes para a transformação de plantas visando à resistência, principalmente, a lepidópteros e coleópteros (Perlak, 2001).

Os principais benefícios do uso de culturas (GM) com o gene bt são: redução no número de aplicações de inseticidas sintéticos, ou ambos, favorecendo a manutenção de inimigos naturais (Gould, 1998), que auxiliam no controle de pragas e contribuem para retardar a evolução da resistência (Mascarenhas & Luttrell, 1997), o que resulta em aumento

de renda para os agricultores em muitos países (Raney 2006; Brookes & Barfoot 2008; Carpenter 2010).

As proteínas de *B. thuringiensis* são expressas em altas doses nos tecidos verdes das plantas (GM) e podem ser expressas também no pólen, nas sementes, nas raízes e em outras partes da planta. De acordo com Andow & Hilbeck (2004), isso pode ocasionar efeitos negativos para herbívoros não-alvo, ou seja, artrópodes que não são alvos da proteína, que se podem adquirir a mesma direta ou indiretamente, por exemplo, os inimigos naturais. Herbívoros não-alvo têm longo prazo de exposição às culturas geneticamente modificadas, mas não são alvos diretos de toxinas Cry.

Os ácaros fitófagos são pragas importantes em diversas culturas agrícolas, pois provocam injúrias que resultam em perdas econômicas. O ácaro-rajado, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), é um herbívoro polífago, tendo uma gama de hospedeiros com mais de 1.100 espécies de plantas (Grbic et al., 2011). Apesar disso, a literatura técnica que recomenda estratégias de manejo de pragas na cultura do milho (*Zea mays* L.) no Brasil não faz referência a registros de populações de ácaros que alcançaram o *status* de praga (Fadini et al., 2010). No Brasil, o levantamento da incidência de espécies e estudos sobre ácaros como pragas na cultura do milho são escassos. Em revisão realizada por Moraes & Flechtmann (2008), a espécie *T. urticae* foi registrada infestando o milho. Apesar de apresentarem pouca importância como pragas do milho no Brasil, já que não são abundantes na cultura, os ácaros, principalmente, os da superfamília Eriophioidea e família Tetranychidae, estão presentes de forma endêmica e suas populações podem evoluir em função do desequilíbrio biológico (Cruz et al., 2008).

O ácaro-rajado pode causar infestações nas folhas de plantas GM, mas o *T. urticae* não é alvo de plantas modificadas com a proteína *Bt*, o que pode acarretar modificações adaptativas nos ácaros e seus inimigos naturais ao longo das gerações. Li & Romeis (2010) avaliaram os possíveis efeitos das proteínas *Bt* ao longo da cadeia alimentar de *T. urticae* e seu inimigo natural o besouro predador *Stethorus punctillum* Weize (Coleoptera: Coccinellidae), onde não foi encontrado nenhum efeito adverso da proteína *Bt* expressa em milho sobre *T. urticae* e seu predador *S. punctillum*. As proteínas *Bt*, presentes em plantas GM, podem ser adquiridas e concentradas pelos ácaros fitófagos. Dutton et al., (2002) verificaram que, comparando a outros herbívoros mastigadores e sugadores alimentados com milho *Bt*, *T. urticae* apresentou a maior quantidade da proteína. A proteína permanece

biologicamente ativa nos ácaros de acordo com Obrist et al., (2006). Dutton et al., (2002) verificaram que ocorreu decréscimo na taxa de crescimento da população de *T. urticae* mantidos em milho *Bt*, comparada com a população mantida na variedade de milho não *Bt*. As plantas transgênicas podem afetar o comportamento dos ácaros fitófagos, quando submetidos a estudos de preferência. Fêmeas adultas de *T. urticae* preferiram a variedade de berinjela (*Solanum melongena*) que expressam a proteína Cry3Bb que a convencional e, além disso, *T. urticae* também apresentou maior taxa de oviposição nesta variedade transgênica (Rovenská, 2005). Em vários trabalhos (Pilcher et al., 1997; Lozzia et al., 1998; Lozzia, 1999; Dutton et al., 2002) têm sido estudado, principalmente em insetos, entretanto um número reduzido de estudos foram realizados sobre os efeitos de plantas *Bt* em ácaros fitófagos e predadores.

O ácaro-rajado apresenta susceptibilidade a formulações comerciais à base da bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), que contém proteínas Cry 1AB e Cry 1AC e capacidade em adquirir e manter proteínas *Bt* da planta hospedeira no seu corpo (Dutton et al., 2002). Assim questiona-se sobre o possível efeito dessa proteína sobre seus predadores (Torres & Ruberson, 2008).

As toxinas Cry são produzidas constitutivamente pela planta, durante toda a sua fenologia, apresentam predominância em determinadas partes das plantas como as folhas. Ao serem expressas continuamente, as toxinas ficam expostas aos demais herbívoros não-alvo e, conseqüentemente, aos seus inimigos naturais. Por exemplo, Dutton et al., (2002) observaram que a toxina Cry1Ab, produzida pelo milho *Bt*, foi adquirida e acumulada por *T. urticae* em concentrações cerca de 10 vezes mais que os níveis encontrados nas folhas das plantas, fato também comprovado por Obrist et al., (2006) para este ácaro e, também, pela sua capacidade em adquirir e manter toxinas Cry da planta hospedeira no seu corpo (Torres & Ruberson, 2008).

É provável que a proteína possa ser transferida dos ácaros para o terceiro nível trófico, ou seja, os predadores, além da toxicidade em ácaro poder afetar a qualidade nutricional e/ou o comportamento de ácaros (Dutton et al., 2002). Entre os principais questionamentos em relação à interação tritrófica está: a possibilidade das plantas GM afetarem os organismos não-alvo de diferentes níveis tróficos. Além disso, há também a possibilidade da transgenia de plantas afetarem mecanismos de defesas que as plantas adquiriram ao longo da co-evolução. Com uma nova variável interagindo nos agroecossistemas (proteína Cry), é questionado se essa variável implica alterações nas defesas que as plantas desenvolvem ao longo da evolução.

Em estudos anteriores foi relatada a indução de defesa direta por *T. urticae* em plantas, resultando em redução do desempenho desses organismos em plantas que foram previamente infestadas (Karban et al., 1984; Kant et al., 2004). Li et al., (2002) relatam a indução de defesa direta em tomateiro em resposta a infestações de ácaro-rajado *T. urticae*. O ácaro *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae) é o predador de *T. urticae* (Drukker et al., 1997; Garthwaite, 2000). Tem sido bem estabelecido que tais espécies predadoras consigam discriminar entre as plantas infestadas e não infestadas pelas presas com base em odores (Dicke et al., 1998; Sabelis et al., 1999).

A introdução de tecnologias, como a introdução de genes que conferem resistência a insetos, não deveria prejudicar a indução de defesa direta e indireta em plantas geneticamente modificadas, tais abordagens são promissoras para o manejo integrado de pragas e para as futuras gerações de plantas transgênicas resistentes a insetos (Bates et al., 2005; Ferry et al., 2006). A avaliação das defesas induzidas e defesas constitutivas em milho *Bt*, poderão esclarecer os fatores que afetam o arranjo de espécies fitófagas e predadoras em teias alimentares naquele agroecossistema. Tais conhecimentos são fundamentais para o entendimento de práticas fitossanitárias como o uso de controle biológico de pragas e o aprimoramento do manejo integrado de pragas.

Esta dissertação foi realizada com o objetivo de avaliar, no Capítulo I, a indução de defesa direta elicitada pelo ácaro-rajado *Tetranychus urticae* em milho. Para isso, foi avaliado o efeito da pré-infestação de plantas de milho convencional 30F35 por *T. urticae* sobre seu desenvolvimento e reprodução de coespecíficos. Infestar plantas e submetê-las a reinfestações, medindo-se parâmetros biológicos e reprodutivos dos herbívoros, durante a reinfestação, é um modo de avaliar o surgimento de defesa induzida direta (Karban & Baldwin, 1997). No Capítulo II, foram avaliadas as defesas induzidas diretas elicitadas pelo ácaro-rajado *T. urticae* em milho geneticamente modificado com o gene *bt*. Para isso, as cultivares milho convencional 30F35 e transgênica 30F35Hx foram avaliadas quanto à indução de defesa direta pelo ácaro *T. urticae*. No Capítulo III, foi avaliada a presença da proteína Cry no ácaro-rajado *T. urticae* alimentado com milho geneticamente modificado com o gene *bt* e no ácaro predador *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari: Phytoseiidae).

Este é o primeiro estudo de defesa direta elicitada por *T. urticae* em milho no Brasil e pioneiro, também, em avaliar se a transgenia em plantas afeta a indução de defesa direta por ácaros fitófagos em milho.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDOW, D.A.; HILBECK, A. **Science-based risk assessment for non-target effects of transgenic crops**. *Bioscience*, v.54, p.637-649, 2004.

ARIMURA, G.I.; KOST, C. & BOLAND, W. **Herbivore-induced, indirect plant defences**. *Biochimica et Biophysica. Acta Lipida et Lipid Metabolism*, v.1734, p.91-111, 2005.

BALE, J.S.; VAN LENTEREN, J.C. & BIGLER, F. **Biological control and sustainable food production**. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences*, v.363, p.761-776, 2008.

BECERRA, J.X. **Squirt-gun defense in *Bursera* and the chrysomelid counterploy**. *Ecology*, v.75, p.1991-1996, 1994.

BECERRA, J.X.; VENABLE, D.L.; EVANS, P.H.; BOWERS, W.S. **Interactions between chemical and mechanical defenses in the plant genus *Bursera* and their implications for herbivores**. *American Zoologist*, v.41, p.865-876, 2001.

BALDWIN, I.T.; HALITSCHKE, R.; KESSLER, A.; SCHITTKO, U. **Merging molecular and ecological approaches in plant-insect interactions**. *Current Opinion in Plant Biology*, v.4, p.351-358, 2001.

BETZ, F.S.; HAMMOND, B.G.; AND FUCHS, R.L. **Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis* protected plants to control insect pests**. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.32, p.156-173, 2000.

BROOKES, G.; BARFOOT, P. **Global impact of biotech crops: socio-economic and environmental effects 1996–2006**. *AgBioForum* v.11, p.21–38, 2008.

CATES, R.G. **The interface between slugs and wild ginger: some evolutionary aspects.** Ecology, v.56, p.391-400, 1975.

CARPENTER, J.E. **Peer-reviewed surveys indicate positive impact of commercialized GM crops.** Nature Biotechnology v.28, p.319–321, 2010.

CHEN, M.S. **Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review.** Insect Science, v.15, p.101-114, 2008.

CRUZ, I.; VALICENTE, F. H.; SANTOS, J. P.; WAQUIL, J. M.; VIANA, P. A. **Manual de identificação de pragas do milho e de seus principais agentes de controle biológico.** Embrapa Informação Tecnológica; Brasília, DF, p 166, 2008.

DE MORAES, C. M.; LEWIS, W. J.; TUMLINSON, J. H. **Examining plant-parasitoid interactions in tritrophic systems.** Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, v. 29, n. 2, p. 189-203, 2000.

DICKE, M.; TAKABAYASHI, J.; POSTHUMUS, M.A.; SCHUTTE, C.; KRIPS, O.E. **Plant-phytoseiid interactions mediated by herbivore-induced plant volatiles: variation in Production of cues and in responses of predatory mites.** Experimental and Applied Acarology, v.22, p.311-333, 1998.

DICKE, M.; VAN, L.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.

DRUKKER, B.; JANSSEN, A.; RAVENSBERG, W.; SABELIS, M.W. **Improved control capacity of the mite predator predator *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae) on tomato.** Experimental and Applied Acarology, v.21, p.507-518, 1997.

DUTTON, A.; KLEIN, H.; ROMEIS, J.; BIGLER, F. **Uptake of Bt-toxin by herbivores feeding on transgenic maize and consequences for the predator. *Chrysoperla carnea*.** Ecological Entomology, v.27, p.441-447, 2002.

EDWARDS, P. J.; WRATTEN, S. D. **Ecologia das interações entre insetos e plantas**. v.27, São Paulo: EPU/EDUSP, 1981.

FADINI, M. A. M.; MENDES, S. M.; ARAUJO, O. G.; WAQUIL, J. M. **Os ácaros são pragas do milho no Brasil?** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 14p. (Série Documentos, 113). 2010.

FERRY, N.; EDWARDS, M.G.; GATEHOUSE, J.A.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P.; GATEHOUSE, A.M. **Transgenic plants for insect pest control: a forward looking scientific perspective**. Transgenic Research, v.15, n.1, p.13-9, 2006.

GARTHWAITE, D. **Changes in biological control usage in Great Britain between 1968 and 1995 with particular reference to biological control on tomato crops**. Biocontrol Science and Technology, v.10, p.451-457, 2000.

GOUD, F. **Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology**. Annual Review of Entomology, v.43, p.701-726, 1998.

GRBIĆ, M.; VAN LEEUWEN, T.; CLARK, R.M.; ROMBAUTS, S.; ROUZÉ, P. GRBIĆ, V.; VERDON, L. **The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations**. Nature, v.479, n.7374, p.487-492, 2011.

HILDER, V.A.; GATEHOUSE, A.M.R.; SHEERMAN, S.E.; BARKER, R.F.; BOULTER, D. **A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco**. Nature, v. 300, p.160-163, 1987.

HOY, C.W.; FELDMAN, J.; GOULD, F.; KENNEDY, G.G.; REED, G.; WYMAN, J.A. **Naturally occurring biological controls in genetically engineered crops**, p. 185-205. In Barbosa P (ed) Conservation biological control. San Diego, Academic Press, p.396, 1998.

HOWE, G.A. & JANDER, G. **Plant Immunity to Insect Herbivores**. Annual Review of Plant Biology, v.59, p.41-66, 2008.

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, p.483-495, 2004.

KARBAN, R.; CAREY, J.R. **Induced resistance of cotton seedlings to mites**. Science, v.225, n.4657, p.53-54, 1984.

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

KARBAN, R.; BALDWIN, I.T. **Induce responses to herbivory**. Chicago, University of Chicago Press p.317, 1997.

KESSLER, A. & BALDWIN, I.T. **Plant responses to insect herbivory: The emerging Molecular Analysis**. Annual Review of Plant Biology, v.53, n.299-328, 2002.

KRUGER, M.J.B.J.; VAN RENSBURG, J.; VAN DEN BERG. **Transgenic Bt maize: farmers' perceptions, refuge compliance and reports of stem borer resistance in South Africa**. Journal Applied Entomology, v.136. p. 38–50, 2012.

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

LI, Y.; ROMEIS, J. **Bt maize expressing Cry3Bb1 does not harm the spider mite, *Tetranychus urticae*, or its ladybird beetle predator, *Stethorus punctillum***. Biological Control, v.53, p.337-344, 2010.

LOZZIA, G.C.; FURLANIS, C.; MANACHINI, B.; RIGAMONTI, I. E. **Effects of Bt-corn on *Rhopalosiphum padi* L. (Rhynchotha Aphididae) and on its predator *Chrysoperla***

carnea Stephen (Neuroptera, Chysopidae). Bollettino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura. Ser. II, v.30, p.153-164, 1998.

LOZZIA, G.C. **Biodiversity and structure of ground beetle assemblages (Coleoptera, Carabidae) in Bt corn and its effect on non-target insects.** Bollettino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura. Ser. II, v.31, p.37-58, 1999.

MASCARENHAS, V.J.; LUTTRELL, R.G. **Combined effect of sublethal exposure to cotton expressing the endotoxin protein of *Bacillus thuringiensis* and natural enemies on survival of bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae.** Environmental Entomology, v.26, n.4, p. 939-945, 1997.

MELLO, M. O.; SILVA-FILHO, M. C. **Plant-Insect Intections: an Evolutionary Arms Race Between two Distinct Defense Mechanisms.** Brazilian Journal of Plant Physiology, Londrina, v. 14, p. 71-81, 2002.

MORAES, G.J.; FLECHTMANN, C.H.W. **Manual de Acarologia, Acarologia Básica e Ácaros de Plantas Cultivadas no Brasil.** Holos Editora, Ribeirão Preto p.308, 2008

OBRIST, L.B.; KLEIN, H.; DUTTON, A.; BIGLER, F. **Assessing the effects of Bt maize on the predatory mite *Neoseiulus cucumeris*.** Experimental and Applied Acarology, v.38, p.125-139, 2006.

PANDEY, G. K. **Emergence of a novel calcium signaling pathway in plants: CBL-CIPK signaling network.** Physiological and Molecular Plant Pathology, v.14, p.51-68, 2008.

PERLAK, F.J.; OPPENHUIZEN, M.; GUSTAFSON, K.; VOTH, R.; SIVASUPRAMANIAM, S.; HEERING, D.; CAREY, B.; IHRIG, R.A.; ROBERTS, J.K. **Development and commercial use of Bolgard® cotton in the USA – early promises versus today’s reality.** The Plant Journal, v.27, n.6, p.489-501, 2001

PILCHER, C.D.; OBRYCKI, J.J.; RICE, M.E.; LEWIS, L.C. **Preimaginal development, survival, and field abundance of insect predators on transgenic *Bacillus thuringiensis* Corn.** Environmental Entomology, v.26, p.446-454, 1997.

PRICE, W.S.; TSUCHIYA, F.; ARATA, Y. **Time dependence of aggregation in crystallizing lysozyme solutions probed using NMR self-diffusion measurements.** Biophysical Journal, v.80, p.1585-1590, 2001.

PRICE W. S.; 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.

PROKOPY, R. J. **Integration in orchard pest and habitat management: a review.** Agriculture, Ecosystems & Environment, v.50, p.1-10, 1994.

RANEY, T. **Economic impact of transgenic crops in developing countries.** Current Opinion in Plant Biology v.17, p.1-5, 2006.

RHODES, M.J.C. **Physiological roles for secondary metabolites in plants: some process, many outstanding problems.** Plant Molecular Biology Reporter, v.24, p.1-20, 1994.

ROVENSKÁ, G. Z.; ZEMEK, R.; SCHMIDT, J.E.U.; HILBECK, A. **Altered host plant preference of *Tetranychus urticae* and prey preference of its predator *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae) on transgenic Cry3Bb egg plants.** Biological Control, v.33, p.293-300, 2005

SABELIS, M.W.; JANSSEN, A.; PALLINI, A.; VENZON, M.; BRUIN, J.; DRUKKER, B.; SCUTAREANU, P. **Behavioral responses of predatory and herbivorous arthropods to induced plant volatiles: from evolutionary ecology to agricultural implications.** In AA Agrawal, S Tuzun, E Bent, eds, Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores. American Phytopathological Society Press, St. Paul, p.269-29, 1999.

SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. **Taninos**. In: Simões C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R (org.) Farmacognosia: da planta ao medicamento. rev. ampl. Florianópolis: v.5, p.615-656, 2003.

SCHALLER, A. **Induced plant resistance to herbivore**. Springer, University of Hohenheim.Germany, 462p, 2008.

SWAMY, G.S. **Defense Signaling in Plants. Plants Cry for Help**. Resonance, v.5, n.8, p.43-53, 2000.

TORRES, J.B.; RUBERSON, J.R. **Interactions of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in genetically engineered cotton with predatory heteropterans**. Transgenic Research, v.17, p.345-54, 2008.

VAN DEN BERG, J 2013. **Evolution in action: field-evolved resistance of African stem borer to Bt maize**. Outlooks Pest on Management, v.24, p. 236–239, 2013.

WALLING, L.L. **Induced resistance: from the basic to the applied**. Trends in Plant Science, v.6, n.10, p.445-447, 2001.

Artigo para submissão ao Periódico Neotropical Entomology

Paula Daiana de Paulo

Universidade Federal de São João Del-Rei, Sete Lagoas-MG

paula.daiana4449@hotmail.com

**Defesa Induzida Direta Elicitada Pelo Ácaro-Rajado *Tetranychus urticae* Koch (Acari:
Tetranychidae) Em Milho**

PAULO, P.D¹; FADINI, M.A.M¹; DOMINQUINI, A.B¹

¹Universidade Federal de São João Del-Rei, Sete Lagoas-MG

**Induced Direct Defense elicited of Two-Spotted Spider Mite *Tetranychus urticae* Koch
(Acari: Tetranychidae) on Maize**

Resumo

As plantas podem ser atacadas por uma grande diversidade de herbívoros. Assim, desenvolver mecanismos de proteção para se defenderem destes agentes é um diferencial para a sobrevivência e reprodução. Ao longo da evolução, diversos mecanismos de defesa contra herbivoria foram desenvolvidos pelas plantas. Mecanismos de defesa direta e indireta contra herbívoros podem manifestar-se em plantas de milho *Zea mays*. O ácaro-rajado *Tetranychus urticae* é relatado, infestando plantas de milho, sem causar danos econômicos. Testou-se a hipótese de que plantas de milho seriam capazes de induzir defesas diretas à *T. urticae* após o ataque. Objetivou-se avaliar o efeito da pré-infestação em plantas de milho por *T. urticae* sobre seu desenvolvimento e reprodução de coespecíficos. As plantas de milho foram divididas em dois grupos de 30 plantas não pré-infestadas (controle) e 30 plantas pré-infestadas por *T. urticae*. Cada planta constituiu uma unidade amostral independente. A infestação prévia de plantas de milho por *T. urticae* reduziu a sobrevivência das fêmeas adultas (g.l.= 58; $P < 0,001$), números de indivíduos jovens (g.l.= 58; $P < 0,001$), números de ovos (g.l.= 58; $P = 0,027$) e sobrevivência das formas imaturas do coespecífico (g.l.= 58; $P < 0,001$). Os resultados sugerem a indução de defesa induzida direta. Este é primeiro relato de indução de defesa direta em milho pelo ácaro-rajado *T. urticae*.

Palavras-Chaves: Resistência de plantas, *Zea mays*, defesa induzida direta

Abstract

Plants can be attacked by a wide range of herbivores. Therefore, to develop protection mechanisms to defend themselves against these agents is an advantage for survival and reproduction. Throughout evolution, many defense mechanisms against herbivory were developed by plants. Direct and indirect defense mechanisms against herbivores can manifest in *Zea mays* plants. The two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* is reported for infesting maize plants without causing economic damage. We tested the hypothesis that maize plants would be capable of inducing direct defense for *T. urticae* after the attack. We aimed at evaluating the effect of the pre-infestation of *T. urticae* in maize plants over its development and reproduction of conspecifics. The maize plants were divided into two groups of 30 non-pre-infested plants (control) and 30 pre-infested plants. Each plant constituted an independent sample unit. The previous infestation of maize plants with *T. urticae* reduced the survival of adult females (df = 58, $P < 0.001$), the number of young individuals (df = 58, $P < 0.001$), the number of eggs (df = 58; $P = 0.027$) and the survival of immature forms of the conspecific (df = 58, $P < 0.001$). The results suggest the induction of direct defense. This is first report of direct defense induction in maize by the two-spotted spider mite *T. urticae*.

Keywords: Plant resistance, *Zea mays*, induced direct defense

Introdução

Uma diversidade de herbívoros artrópodes pode atacar as plantas, com isso as mesmas desenvolveram mecanismos de proteção para se defenderem desses agentes. Defesas de plantas, chamadas constitutivas ou induzidas, respondem ao ataque de herbívoros reduzindo a ação dos mesmos (Price *et al* 1980, Karban & Baldwin 1997). As defesas constitutivas atuam continuamente, dificultando a alimentação dos herbívoros pelos depósitos cuticulares, epiderme espessada, abundância de cristais, espinhos, tricomas, fibras na folha, dentre outros. (Becerra 1994). As defesas químicas, que são metabólitos tóxicos e/ou repelentes, atuam minimizando o dano e reduzindo a palatabilidade (Arimura *et al* 2005). As defesas induzidas podem ser classificadas como defesa induzida direta que afeta diretamente a biologia do herbívoro (Schaller 2008) e a defesa induzida indireta que afeta os herbívoros, promovendo a atração de inimigos naturais de tais herbívoros (Arimura *et al* 2005, Dicke 2009). A defesa induzida direta atua contra herbívoros, por exemplo, por meio da produção de metabólitos secundários e substâncias envolvidas nos mecanismos de defesa da planta (Corrêa 2007). Por exemplo, os inibidores da protease e fitoalexinas, afetam diretamente a sobrevivência do herbívoro (Howe & Jander 2008, Ryan 1990). Segundo Rhodes (1994), a coevolução das plantas conduz à síntese de metabólitos secundários com função de defesa ou atração, determinada pelas necessidades ecológicas e possibilidades biossintéticas. As respostas das plantas à herbivoria podem reduzir, substancialmente, uma herbivoria subsequente, desse modo, o dano causado em algumas folhas, resulta em uma resposta sistêmica e na liberação de compostos voláteis por toda a planta (De Moraes *et al* 2000). O entendimento dos mecanismos de defesa das plantas facilitaria o desenvolvimento de cultivares mais resistentes às pragas, bem como a determinação de relações evolutivas e bioquímicas entre as plantas e seus respectivos predadores (Walling 2001, Bale *et al* 2008, Chen 2008).

O ácaro-rajado, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), é uma praga importante em muitas culturas e tem uma gama de hospedeiros com mais de 1.100 espécies de plantas (Grbic *et al* 2011). Provocam injúrias que resultam em perdas econômicas. Apesar disso, a literatura técnica, que recomenda estratégias de manejo de pragas na cultura do milho (*Zea mays* L.) no Brasil, não faz referência a registros de populações de ácaros que alcançaram o *status* de praga (Fadini *et al* 2010).

No Brasil, o levantamento da incidência de espécies e estudos sobre ácaros como pragas na cultura do milho são escassos. Em revisão realizada por Moraes & Flechtmann (2008), a espécie *T. urticae* foi registrada infestando o milho. Apesar de apresentarem pouca importância como pragas do milho no Brasil, já que não são abundantes na cultura, os ácaros, principalmente os da família Eriophyidae e Tetranychidae, estão presentes de forma endêmica e suas populações e podem evoluir em função do desequilíbrio biológico (Cruz *et al* 2008).

Li *et al* (2002) relatam a indução de defesa direta em tomateiro em resposta às infestações de ácaro-rajado *T. urticae*. O ácaro predador *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae) é o inimigo natural de *T. urticae* e é comumente usado para controlar ácaros em tomate (Drukker *et al* 1997, Garthwaite 2000). Tem sido bem estabelecido que tais espécies predadoras consigam discriminar entre as plantas infestadas e não infestadas pelas presas com base em odores (Dicke *et al* 1998, Sabelis *et al* 1999).

O estudo das defesas de plantas é fundamental para o desenvolvimento de métodos de controle de pragas por meio de resistência em sistemas agrícolas. Testou-se a hipótese de que plantas de milho seriam capazes de induzir defesas diretas à *T. urticae* depois do ataque. Objetivou-se avaliar o efeito da pré-infestação de plantas de milho por *T. urticae* sobre seu desenvolvimento e reprodução de coespecíficos.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido na casa-de-vegetação e laboratório de Entomologia da Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ), na cidade de Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil. Para avaliar a possibilidade da indução de defesa direta em plantas de milho, estudou-se a biologia de *T. urticae* sobre plantas de milho pré-infestadas por coespecíficos e sobre plantas não previamente infestadas (=controle), denominadas plantas limpas. Infestar plantas e submetê-las a reinfestações, medindo-se parâmetros biológicos e reprodutivos dos herbívoros, durante a reinfestação, é um modo de avaliar o surgimento de defesa induzida direta (Karban & Baldwin 1997).

Para a realização do experimento, fez-se necessária a criação e manutenção do ácaro-rajado, assim como o plantio e manutenção das plantas de milho utilizadas para as avaliações.

Criações de estoque

Folhas de plantas de milho infestadas por *T. urticae* mantidas em casa-de-vegetação nas dependências da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, Minas Gerais, foram coletadas e levadas para o Laboratório de Entomologia da Universidade Federal de São João Del Rei, Campus Sete Lagoas. Os ácaros adultos, visualizados por meio de lupas (40 vezes), foram coletados individualmente com pincel de pelos de marta e transferidos para plantas de feijão para manutenção da criação. As plantas de feijão utilizadas foram plantadas em vasos plásticos, de 500 gramas, utilizando substrato Terral Solo[®] e separadas em plantas infestadas (mantidas isoladas em gaiolas teladas) e plantas não infestadas. Conforme observação diária da necessidade de novas plantas para infestação coletavam-se plantas não infestadas, que eram mantidas em casa-de-vegetação e adicionava-as ao local de criação dos ácaros.

Plantio e manutenção das plantas de Milho

A semeadura do milho foi feita em vasos plásticos de 500 gramas, utilizando-se substrato Terral Solo[®] e mantidas em casa-de-vegetação da UFSJ - Campus Sete Lagoas. Dois tratamentos foram utilizados: plantas limpas e plantas pré-infestadas. Cada tratamento foi composto por 30 plantas de milho (=repetição), resultando num total de 60 plantas. Foram colocadas duas sementes por vaso e depois de duas semanas foi feito o desbaste, deixando uma planta de milho por vaso, que foram separados em duas bancadas. Os vasos foram numerados de 1 a 30, para identificação, mantidos no interior de gaiolas teladas, para evitar contaminação com outros artrópodes.

Após 15 dias da semeadura, as plantas de milho foram adubadas com 0,2 gramas de sulfato de amônia por vaso. As sementes de milho utilizadas para o plantio dos vasos foram híbridos comercial Pioneer[®] 30F35.

Primeira infestação do grupo das Pré-infestadas

O grupo das plantas pré-infestadas foi composto por plantas de milho, submetidas a uma primeira infestação com 10 fêmeas de *T. urticae*, por um período de cinco dias. Deste modo, realizou-se a infestação de 30 plantas de milho, que compuseram o grupo das plantas pré-infestadas. Infestou-se uma folha de cada uma das 30 plantas com 10 fêmeas de *T. urticae*, procedentes da criação de estoque, que foram transferidas e mantidas em uma barreira feita, utilizando-se cola entomológica Biocontrole[®] para evitar fuga dos ácaros. As folhas escolhidas para a pré-infestação foram marcadas com fitas azuis para identificação futura.

Primeira infestação do grupo das plantas limpas e reinfestação do grupo das pré-infestadas

O controle experimental, ou seja, o grupo das plantas limpas foi representado por plantas de milho que não sofreram ataque prévio de *T. urticae*. Depois de cinco dias da primeira infestação do grupo das plantas pré-infestadas, iniciou-se a primeira e única infestação das 30 plantas de milho, que compuseram o grupo das plantas limpas. Infestou-se uma folha, em sua face abaxial, de cada uma das 30 plantas com 10 fêmeas de *T. urticae*, que foram mantidas em uma barreira feita, utilizando-se cola entomológica para evitar fuga dos ácaros. As folhas escolhidas para a infestação foram marcadas com fitas vermelhas para identificação futura.

Neste mesmo dia fez-se também a reinfestação das 30 plantas de milho pertencentes ao grupo das plantas previamente infestadas. Escolheu-se outra folha, com exceção da folha que já havia sido infestada, de cada uma das 30 plantas, foi feita a reinfestação com 10 fêmeas de *T. urticae*, que foram mantidas em uma barreira feita utilizando-se cola entomológica para evitar fuga dos ácaros. As folhas escolhidas para a reinfestação foram marcadas com fitas vermelhas para identificação futura.

Decorridos cinco dias, após a última infestação, para leitura do experimento, fez-se sorteio para ambos os grupos: plantas pré-infestadas e plantas limpas. Os vasos numerados de 1 a 30 foram sorteados, de maneira que cada vaso com uma planta de milho se tornou uma unidade amostral independente. A contagem foi feita retirando-se as folhas das plantas sorteadas previamente identificadas com fita vermelha, cortadas na sua extremidade com tesoura e levadas ao laboratório para visualização em lupas. As avaliações foram realizadas, durante 15 dias, lendo-se um total de quatro folhas por dia, sendo duas pertencentes ao grupo das plantas pré-infestadas e duas pertencentes ao grupo das plantas limpas. Diariamente em cada avaliação foi feita a contagem das fêmeas de ácaros vivas, mortas, número de indivíduos na forma jovem e número de ovos.

Análises estatísticas

O delineamento estatístico foi o delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos e 30 repetições por tratamento. Foram utilizados modelos lineares generalizados ($\alpha = 0,05 \%$), tendo como variável independente (x) o tempo, após a segunda infestação, além da qualidade da planta (limpa ou infestada) e, como variável dependente (y's) número de fêmeas de ácaro vivas, mortas, número de indivíduos na forma jovem e número de ovos, que foram avaliados diariamente. Os dados foram submetidos a testes de normalidade e análises de resíduos para avaliar os pressupostos das análises e a adequação dos modelos ajustados. Utilizou-se o programa R (R Development Core Team 2014) para a análise exploratória dos dados e análises estatísticas.

Resultados

A pré-infestação *T. urticae* em plantas de milho convencional reduziu o número de fêmeas adultas do coespecífico em reinfestação, quando comparado ao número de fêmeas mantidas sobre plantas limpas (g.l.= 58; $P < 0,001$). Apesar de tanto em pré-infestadas quanto plantas limpas o número de fêmeas adultas de *T. urticae* reduzirem com o tempo, nas plantas pré-infestadas a redução foi maior (Figura 1).

Resultado semelhante foi encontrado para o número de indivíduos jovens. A pré-infestação de *T. urticae* em plantas de milho convencional afetou o número de indivíduos jovens do coespecífico em reinfestação (g.l.= 58; $P < 0,001$). Plantas pré-infestadas apresentaram menor número de indivíduos jovens (Figura 2). O mesmo foi encontrado para o número de ovos produzidos (Figura 3). O número de ovos reduziu em plantas pré-infestadas

(g.l.= 58; $P = 0,027$). O número de fêmeas adultas mortas foi maior nas plantas pré-infestadas do que nas plantas limpas (g.l.= 58; $P < 0,001$) (Figura 4).

Os dados não apresentaram distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk, justificando a escolha de modelos lineares generalizados para a análise dos dados. Este resultado era esperado por se tratarem de dados de contagem. Nas análises de resíduos realizadas foram verificadas variações aleatórias. Ou seja, fontes de variação sistemática foram explicadas pelos modelos. Isto demonstra que modelos lineares generalizados com distribuição binomial negativa escolhido para análise explicaram de forma significativa a variação sistemática dos dados no experimento.

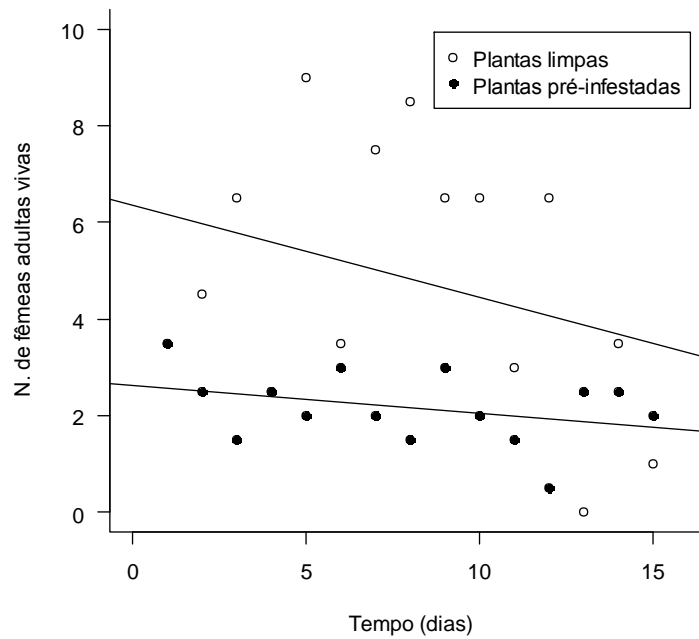


Figura 1. Número de fêmeas adultas vivas de *Tetranychus urticae* em plantas de milho convencional, limpas e pré-infestadas com coespecífico.

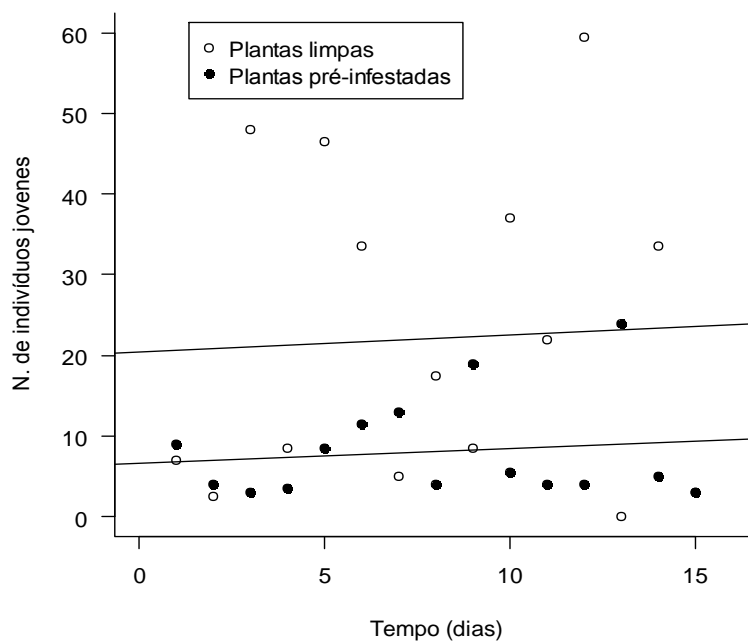


Figura 2. Número de indivíduos jovens de *Tetranychus urticae* em plantas de milho convencional, limpas e pré-infestadas com coespecífico.

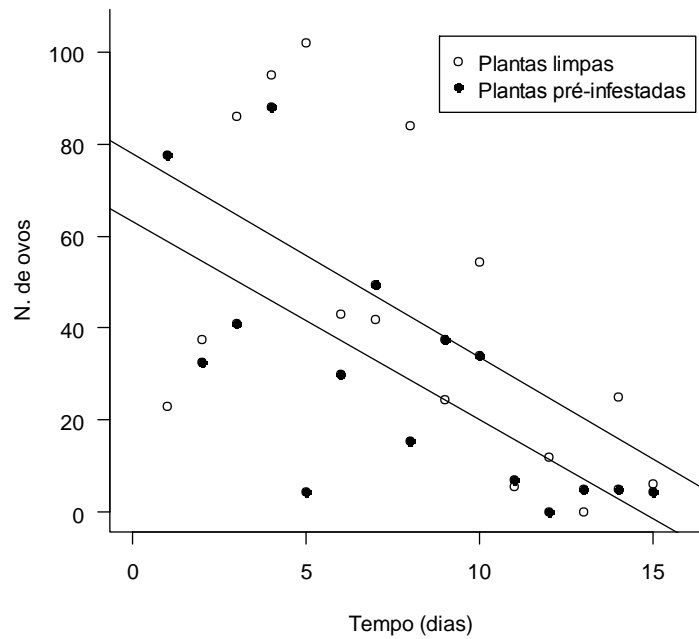


Figura 3. Número de ovos de *Tetranychus urticae* em plantas de milho convencional, limpas e pré-infestadas com coespecífico.

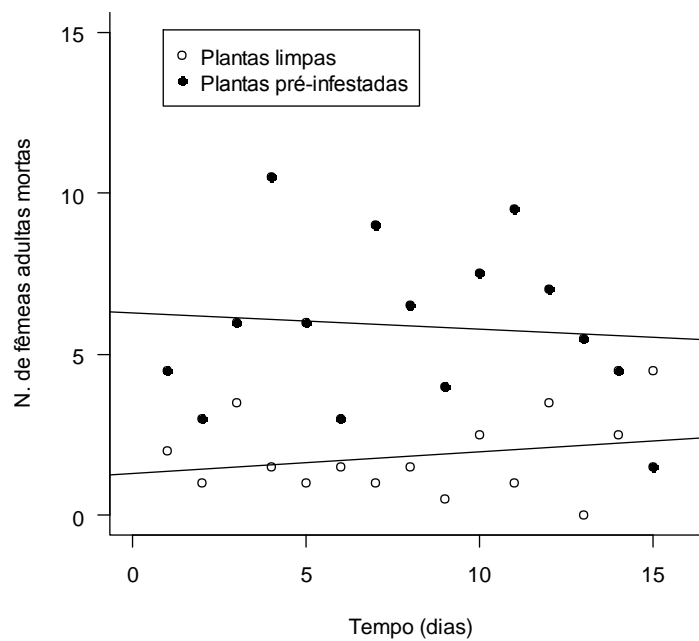


Figura 4. Número de fêmeas adultas mortas de *Tetranychus urticae* em plantas de milho convencional, limpas e pré-infestadas com coespecífico.

Discussão

A pré-infestação de plantas de milho convencional por *T. urticae* reduziu a sobrevivência e reprodução das fêmeas adultas do coespecífico. Além disso, reduziu também a sobrevivência das formas imaturas. Isto demonstra, aparentemente, que as plantas de milho que sofreram pré-infestação de *T. urticae* alteraram o padrão de sobrevivências de formas adultas do coespecífico, reduzindo o desempenho da população e sugerindo a indução de defesas diretas. Tais resultados corroboram com a hipótese de que plantas que sofreram infestações prévias por *T. urticae* são capazes de responder às injúrias com maior rapidez em comparação àquelas que não foram atacadas (Baldwin & Schmelz 1996).

Karban & Carey (1984) relataram a indução de defesa direta por *T. urticae* em plantas de algodão, que resultou em redução no desempenho desses ácaros fitófagos em plantas anteriormente atacadas. Em estudo realizado com folhas de morangueiro, previamente atacadas por *T. urticae*, Kielkiewicz (1988) constatou a mudança na concentração de compostos secundários, resultando, assim, em defesa da planta contra o herbívoro, caracterizada por efeitos tóxicos ou repelentes.

Em concordância com a hipótese de indução de defesa induzida direta em plantas de milho por *T. urticae*, em estudos realizados com plantas de tomate sugeriu-se que o ácaro-rajado *T. urticae* induz defesa direta regulada por jasmonatos em tomateiro (Li *et al* 2002, Kant *et al* 2004, Smart *et al* 2013). Szczepaniec *et al* (2013) verificaram aumento na expressão de genes de defesa induzida por ácaros fitófagos, bem como a expressão de genes relacionados à defesa induzida e redução da população do *T. urticae* em plantas tomate, milho e algodão. Este estudo corrobora com os resultados encontrados no presente trabalho, sugerindo a indução de defesa direta elicitada por *T. urticae* em plantas de milho.

A pré-infestação de *T. urticae* em plantas de milho convencional afetou a sobrevivência e reprodução do coespecífico em reinfestação. Em Plantas pré-infestadas, a sobrevivência de fêmeas adultas foi reduzida e o número de ovos e indivíduos jovens produzidos foi menor. Tais resultados podem estar relacionados ao fato das fêmeas adultas de ácaros se alimentarem de plantas para produzir até 50-70% do seu próprio peso em ovos por dia (Thurling 1980). Assim, a taxa de oviposição reduzida de *T. urticae* foi, provavelmente, causada pela redução da alimentação de fêmeas adultas vivas de *T. urticae* em plantas que foram previamente infestadas. Uma taxa de alimentação reduzida irá resultar em menor taxa de oviposição e uma taxa reduzida de crescimento da população (Sarmiento, *et al* 2011).

Assim, A pré-infestação por ácaros fitófagos *T.urticae* em plantas de milho altera o padrão de sobrevivência e reprodução do coespecífico, este resultado sugere a indução de defesas induzida diretas em milho por *T. urticae*. Este é primeiro relato de indução de defesa direta em milho pelo ácaro-rajado *T. urticae* e servirá como base para estudos futuros. Espera-se obter informações mais conclusivas sobre resistência induzida direta por ácaros fitófagos em milho em trabalhos futuros. A indução de defesa em milho por *T. urticae* pode vir a ser um componente de manejo de ácaros, minimizando perdas provocadas por este fitófago.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (**FAPEMIG**) pelo apoio financeiro ao projeto, e à Universidade Federal de São João Del- Rei (**UFSJ**) pela bolsa de mestrado concedida ao primeiro autor.

Referências

- Arimura C, Kost G, Boland W (2005) Herbivore-induced, indirect plant defences. *Acta Biochim Biophys* 34: 91-111.
- Baldwin IT, Schmelz EA (1996) Immunological" memory" in the induced accumulation of nicotine in wild tobacco. *Ecology* 77: 236-246.
- Bale JS, Van LJC, Bigeler F (2008) Biological control and sustainable food production. *Philos Trans R Soc Lond B Biol* 363:761-776.
- Becerra JX (1994) Squirt-gun defense in *Bursera* and the chrysomelid counterploy. *Ecology* 75: 1991-1996.
- Chen MS (2008) Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Sci* 15:101-114.
- Corrêa PG (2007). Defesas foliares em resposta à herbivoria em espécies lenhosas de restinga, Ipojuca-PE. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- Cruz I, Valicente FH, Santos JP, Waquil JM, Viana PA (2008) Manual de identificação de pragas do milho e de seus principais agentes de controle biológico. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo; Brasília; Embrapa Informação Tecnológica. 166p
- Dicke M, Takabayashi J, Posthumus MA, Schutte C, Krips OE (1998) Plant-phytoseiid interactions mediated by herbivore-induced plant volatiles: variation in Production of cues and in responses of predatory mites. *Exp Appl Acarol* 22:311–333.
- Dicke M, Van L, JJA Soler, R (2009) Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. *Nat Chem Bio* 5(5):317–324.
- De Moraes CM, Lewis WJ, Tumlinson JH (2000) Examining plant-parasitoid interactions in tritrophic systems. *An Soc Entomol Bras* 29(2):189-203.

- Drukker B, Janssen A, Ravensberg W, Sabelis MW (1997) Improved control capacity of the mite predator *Phytoseiulus persimilis persimilis* (Acari: Phytoseiidae) on tomato. *Exp Appl Acarol* 21:507-518.
- Fadini MAM, Mendes SM, Araujo OG, Waquil JM (2010) Os ácaros são pragas do milho no Brasil? Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, (Série Documentos, 113) 14p.
- Garthwaite D (2000) Changes in biological control usage in Great Britain between 1968 and 1995 with particular reference to biological control on tomato crops. *Biocontrol sci technol* 10:451–457.
- Grbić M, Van leeuwen T, Clark R M, Rombauts S, rouzé, P, Grbić V, Verdon L (2011) The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. *Nature* 479(7374): 487-492.
- Howe GA, Jander G (2008) Plant immunity to insect herbivores. *Annu Rev Plant Biol* 59:41-66.
- Kant MR, Ament K, Sabelis MW, Haring MA, Schuurink RC (2004) Differential timing of spider mite induced direct and indirect defenses in tomato plants. *Plant Physiol* 135:483-495.
- Karban R, Carey J R (1984) Induced resistance of cotton seedlings to mites. *Science* 225:53-54.
- Karban R, Baldwin IT. (1997) *Induce responses to herbivory*. Chicago, University of Chicago Press 317p.
- Kielkiewicz, M. (1988) Susceptibility of previously damaged strawberry plants to mite attack. *Entomol Exp Appl* 47: 201-203.

- Li CY, Williams MM, Loh YT, Lee G, Howe GA (2002) Resistance of cultivated tomato to cell content-feeding herbivores is regulated by the octadecanoid-signaling pathway. *J. Plant Physiol* 130: 494-503.
- Moraes GJ, Flechtmann CHW (2008) Manual de Acarologia, Acarologia Básica e Ácaros de Plantas Cultivadas no Brasil. Holos Editora, Ribeirão Preto 308p.
- Price WS, Boulton CE, Gross P, Mcpherson BA, Thompson JN, Weis AE (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 Development Core Team. R (2014) A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <http://www.R-project.org>.
- Rhodes MJC (1994) Physiological roles for secondary metabolites in plants: some process, many outstanding problems. *Plant Mol Biol* 24:1-20.
- Ryan CA (1999) Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 28:425-449.
- Sabelis MW, Janssen A, Pallini A, Venzon M, Bruin J, Drukker B, Scutareanu, P (1999) Behavioral responses of predatory and herbivorous arthropods to induced plant volatiles: from evolutionary ecology to agricultural implications. In AA Agrawal, S Tuzun, E Bent, eds, *Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, p.269–29.
- Sarmiento RA, Lemos L, Dias CR, Kikuchi WT, Rodrigues JCP, Pallini A, Sabelis MW, Janssen A (2011) A herbivorous mite down-regulates plant defence and produces web to exclude competitors *PLoS ONE* 6(8): 23757.

- Schaller A (2008) Induced plant resistance to herbivore. Springer, University of Hohenheim. Germany 462 p.
- Smart L, Martin J, Limpalaer M, Bruce TA, Pickett J (2013) Responses of herbivore and predatory mites to tomato plants exposed to jasmonic acid seed treatment. *J Chem Ecol* 39:1297-1300.
- Szczepaniec A, Raupp MJ, Parker RD, Kerns D, Eubanks MD (2013) Neonicotinoid insecticides alter induced defenses and increase susceptibility to spider mites in distantly related crop plants. *PloS one* 8(5):62620.
- Thurling DJ (1980) Metabolic rate and life stage of the mites *Tetranychus cinnabarinus* Biosd. (Prostigmata) and *Phytoseiulus persimilis* A-H. (Mesostigmata). *Oecologia* 46: 391–396.
- Walling LL (2001) Induced resistance: from the basic to the applied. *Trends Plant Sci*, 6(10):445-447.

Artigo para submissão ao Periódico Neotropical Entomology

Paula Daiana de Paulo

Universidade Federal de São João Del-Rei, Sete Lagoas-MG

paula.daiana4449@hotmail.com

**Defesa Induzida Direta Elicitada Pelo Ácaro-Rajado *Tetranychus urticae* Koch (Acari:
Tetranychidae) Em Milho *Bt***

PAULO, P.D¹; FADINI, M.A.M¹; DOMINQUINI, A.B¹

¹Universidade Federal de São João Del-Rei, Sete Lagoas-MG

**Induced Direct Defense elicited by the Two-Spotted Spider Mite *Tetranychus urticae*
Koch (Acari: Tetranychidae) on *Bt* Maize**

Resumo

Mecanismos de defesa induzida direta e indireta contra herbívoros podem manifestar-se em plantas de milho *Zea mays*. Além das defesas induzidas direta e indireta existem as defesas constitutivas, em que as plantas expressam a resistência de forma contínua. Uma defesa constitutiva de planta que, nas últimas décadas, tem se difundido, são as das plantas geneticamente modificadas (GM), que expressam proteínas com atividade inseticida. Com a crescente utilização de cultivares transgênicas de milho com o gene *bt* (*Bacillus thuringiensis*), há uma demanda de estudos que avaliem os impactos dessa tecnologia sobre mecanismos de defesa das plantas. Mesmo não causando danos econômicos, o ácaro-rajado *Tetranychus urticae* é relatado infestando plantas de milho. Testou-se a hipótese de que plantas de milho *Bt* seriam capazes de induzir defesas diretas à *Tetranychus urticae* após o ataque. Objetivou-se avaliar a indução de defesa induzida direta por ácaro-rajado *T. urticae* em plantas de milho geneticamente modificada com o gene *Bt*. Uma forma de avaliar defesa induzida direta é realizar pré-infestação e medir parâmetros biológicos em reinfestação. Assim, plantas de milho com 30 dias foram divididas em dois grupos: 30 plantas do seu respectivo isogênico não-*Bt* (30F35) (=controle) e 30 plantas de milhos híbridos comerciais (30F35 Hx) que expressam a proteína Cry1F. Cada planta constituiu uma unidade amostral independente. A infestação prévia de plantas de milho *Bt* por *T. urticae* não apresentou diferença nos padrões de sobrevivência de formas adultas e formas jovens do coespecífico em comparação com o milho convencional. Os resultados sugerem que o fato do milho *Bt* expressar a toxina inseticida Cry 1F não interfere na indução de defesa direta pelo ácaro-rajado *T. urticae* quando comparado com plantas de milho convencional.

Palavra Chave: Resistência de plantas, *Zea mays*, defesa induzida direta, organismos geneticamente modificados

Abstract

Direct and indirect induced defense mechanisms against herbivores can manifest in *Zea mays* plants. In addition to the direct and indirect induced defenses, there are constitutive defenses, in which plants express resistance in a continuous manner. A constitutive defense that has spread in recent decades is that of genetically modified (GM) plants that express proteins with insecticidal activity. With the increasing use of transgenic maize cultivars with the bt (*Bacillus thuringiensis*) gene, there is a demand for studies that evaluate the impacts caused by this technology over plant defense mechanisms. Even not causing economic damage, the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* is reported for infesting maize plants. We tested the hypothesis that Bt maize plants would be capable of inducing direct defenses to *Tetranychus urticae* after the attack. We aimed at evaluating the induction of direct defense by the two-spotted spider mite *T. urticae* on maize plants genetically modified with the bt gene. One manner of evaluating the induced direct defense is to perform pre-infestation and measure the biological parameters in reinfestation. Thus, maize plants with 30 days were divided into two groups: 30 plants of their respective non-Bt isogenic (30F35) (control) and 30 plants of commercial maize hybrids (30F35 Hx) that express the Cry1F protein. Each plant constituted an independent sampling unit. The previous infestation of Bt maize plants by *T. urticae* showed no difference in survival standards of adult and young forms of the conspecific when compared with the conventional maize. The results suggest that the fact of Bt maize expressing the Cry1F insecticidal toxin does not interfere in the induction of direct defense by the *T. urticae* two-spotted spider mite when compared with conventional maize plants.

Keywords: Plant resistance, *Zea mays*, induced direct defense, genetically modified organisms

Introdução

As plantas podem sofrer injúrias por uma grande diversidade de herbívoros artrópodes. Com isso, ao longo do tempo evolutivo, mecanismos de defesas foram desenvolvidos pelas plantas em que são capazes de reconhecer o ataque e reagir com indução de respostas de defesa direta e indireta contra o ataque de tais herbívoros. Por exemplo, a biossíntese e acumulação de compostos tóxicos, chamado de defesa induzida direta, e emissão de voláteis que atraem predadores, chamado de defesa induzida indireta (Kessler & Baldwin 2001, Mithöfer *et al* 2009). As especificidades das defesas induzidas podem depender da planta e as espécies de herbívoros que as atacam (De Moraes *et al* 1998, Stout *et al* 1998, Leitner *et al* 2005). As defesas induzidas direta afetam a biologia do herbívoro, por exemplo, a produção de metabólitos secundários, tais como inibidores de proteases e fitoalexinas, que afetam a sobrevivência dos herbívoros (Schaller 2008, Howe & Jander 2008, Ryan 1999).

Além das defesas induzidas, as plantas desenvolveram também as defesas constitutivas, que atuam continuamente, dificultando a alimentação dos herbívoros, pelos depósitos cuticulares, epiderme espessada, abundância de cristais, espinhos, tricomas, fibras na folha, dentre outros. (Becerra 1994). Uma defesa constitutiva de planta que, nas últimas décadas, tem se difundido são as das plantas geneticamente modificadas (GM) que expressam genes com atividade inseticida e representam uma alternativa para o controle de insetos pragas mastigadores (Prokopy 1994). Entre as plantas cultivadas, o milho geneticamente modificado com o gene *Bt* é o mais amplamente cultivado no mundo (Kruger *et al.*, 2012; Van den Berg, 2013).

A bactéria *Bacillus thuringiensis* é o organismo mais utilizado como fonte de genes para a transformação de plantas visando à resistência, principalmente, a lepidópteros e coleópteros (Perlak 2001). As proteínas de *B. thuringiensis* são expressas nos tecidos verdes

das plantas geneticamente modificadas e podem ser expressas também no pólen, nas sementes, nas raízes e em outras partes da planta (Koziel *et al* 1993). Isso pode ocasionar efeitos negativos para herbívoros não-alvos bem como inimigos naturais de diferentes maneiras, por exemplo, sugadores podem adquirir a proteína expressa na seiva das plantas transgênicas, quando se alimentam, uma vez que, em muitas plantas, a expressão da proteína é feita pelo promotor CaMV/35s (Jouanin *et al* 1998, Sims & Berberich 1996) ativo em todos os tecidos da planta. Alguns herbívoros podem ter longo prazo de exposição às culturas geneticamente modificadas, mas não são alvos diretos de proteínas Cry (Andow & Hilbeck 2004).

O ácaro-rajado, *Tetranychus urticae*, é um herbívoro polífono, tendo uma gama de hospedeiros com mais de 1.100 espécies de plantas (Grbic *et al* 2011). Apesar disso, a literatura técnica que recomenda estratégias de manejo de pragas na cultura do milho (*Zea mays* L.) no Brasil não faz referência a registros de populações de ácaros que alcançaram o *status* de praga. Os ácaros fitófagos na cultura do milho podem ser estudados também como indicadores do impacto de milho *Bt* sobre organismos não alvos. (Fadini *et al* 2010)

A coevolução de plantas e herbívoros conduz à síntese de metabólitos secundários com função de defesa, determinada pelas necessidades ecológicas e possibilidades biossintéticas (Rhodes 1994). A liberação de compostos em resposta à herbivoria são provenientes de processos bioquímicos complexos e parecem ser comuns em várias espécies de plantas (Fadini *et al* 2010). Os compostos mais comuns são os álcoois, aldeídos, monoterpenos, sesquiterpenos. (Turlings *et al* 1998, Ferry *et al* 2004).

As respostas das plantas à herbivoria podem reduzir uma herbivoria subsequente (Karban *et al* 1984 e Agrawal 2000). Assim, o dano causado em parte da planta resulta em resposta sistêmica e na liberação de compostos voláteis por toda a planta (De Moraes *et al*

2000). Em estudos anteriores foi relatada a indução de defesa direta por *T. urticae* em plantas, resultando em redução do desempenho desses organismos em plantas que foram previamente infestadas (Karban *et al* 1984, Kant *et al* 2004). O entendimento dos mecanismos de defesa das plantas facilitaria o desenvolvimento de cultivares mais resistentes às pragas, bem como a determinação de relações evolutivas e bioquímicas entre as plantas e seus respectivos predadores (Walling 2001, Bale *et al* 2008, Chen 2008).

A introdução de tecnologias, como a introdução de genes exógenos que conferem resistência a insetos em plantas (GM), não deve prejudicar a indução de defesa direta e indireta em plantas geneticamente modificadas, tais abordagens são promissoras para o manejo de pragas e para as próximas gerações de plantas transgênicas resistentes a insetos (Bates *et al* 2005, Ferry *et al* 2006).

Foi estudado se a transgenia de plantas de milho interferiria na capacidade de indução de defesa induzida direta. Testou-se a hipótese de que plantas de milho *Bt* seriam capazes de induzir defesas diretas à *T. urticae* após o ataque, assim como as plantas de milho convencional. Objetivou-se avaliar o efeito da pré-infestação de plantas de milho *Bt* por *T. urticae* sobre seu desenvolvimento e reprodução de coespecíficos.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido na casa-de-vegetação e laboratório de Entomologia da Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ), na cidade de Sete Lagoas, Minas Gerais. Para a avaliação da possibilidade da indução de defesa direta em plantas de milho *Bt*, estudou-se a biologia de *T. urticae* sobre plantas de milho *Bt* pré-infestadas por coespecíficos e sobre plantas pré-infestadas de milho convencional. Infestar plantas e submetê-las a reinfestações, medindo-se parâmetros biológicos e reprodutivos dos herbívoros, durante a reinfestação, é um

modo de verificar o surgimento de defesa induzida direta (Karban & Baldwin 1997). Para a realização do experimento, foi necessária a criação e manutenção do ácaro-rajado, bem como o plantio e manutenção das plantas de milho utilizadas para as avaliações.

Criações estoque

Folhas de plantas de milho infestadas por *T. urticae* mantidas foram coletadas em casa-de-vegetação nas dependências da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, Minas Gerais, e levadas para o Laboratório de Entomologia da Universidade Federal de São João Del Rei, Campus Sete Lagoas. Os ácaros adultos, visualizados por meio de lupas (40 vezes), foram coletados individualmente com pincel de pelos de marta e transferidos para plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) para manutenção da criação. As plantas de feijão utilizadas foram plantadas em vasos plásticos de 500 gramas, utilizando substrato Terral Solo[®] e separadas em plantas-infestadas (mantidas em gaiolas teladas) e plantas não infestadas. Conforme observação diária da necessidade de novas plantas para infestação, coletavam-se plantas não infestadas, que foram mantidas em casa-de-vegetação e adicionava-as ao local de criação dos ácaros.

Plantio e manutenção das plantas de Milho

As cultivares de milho avaliados quanto à indução de defesa direta pelo ácaro *T. urticae* foram: híbrido comercial Pioneer[®]. (30F35 Hx) que expressa a proteína Cry1F e seu respectivo isogênico não-*Bt* (30F35) como controle. A semeadura foi realizada em vasos plásticos de 500 gramas, utilizando-se substrato Terral Solo[®] e mantida em casa-de-vegetação. Dois tratamentos foram utilizados, plantas de milho convencional (30F35) e *Bt* (30F35 Hx) ambos pré-infestados.

Cada tratamento foi composto por 30 plantas de milho (=repetição), resultando em um total de 60 plantas. Foram colocadas duas sementes por vaso e depois de duas semanas foi

feito o desbaste, deixando uma planta de milho por vaso, que foram separados em duas bancadas e numerados de 1 a 30 para identificação. Após 15 dias da semeadura as plantas de milho, foram adubadas com 0,2 gramas de sulfato de amônia por vaso e colocadas em gaiolas teladas, colocaram-se 30 plantas por gaiola para evitar possíveis infestações com outros artrópodes.

Pré-infestação

As plantas de milho convencional (30F35) e as plantas de milho geneticamente modificadas com o gene bt (30F35HX) foram submetidas à primeira infestação com 10 fêmeas de *T. urticae* por um período de cinco dias. Deste modo, realizou-se a infestação das 30 plantas de milho convencional e *Bt*. Infestou-se uma folha de cada uma das 60 plantas com 10 fêmeas de *T. urticae*, procedentes da criação de estoque, que foram transferidas e mantidas em uma barreira feita utilizando-se cola entomológica para evitar fuga dos ácaros. As folhas escolhidas para a pré-infestação foram marcadas com fitas azuis para identificação futura.

Reinfestação

Após cinco dias, as plantas de milho convencional (30F35) e as plantas de milho geneticamente modificadas com o gene bt (30F35HX) que foram previamente infestadas foram reinfestadas. Escolheu-se outra folha, com exceção da folha que já havia sido infestada, e fez-se a reinfestação com 10 fêmeas de *T. urticae*, que foram mantidas em uma barreira feita utilizando-se cola entomológica para evitar fuga dos ácaros. As folhas escolhidas, para a reinfestação, foram marcadas com fitas vermelhas para identificação futura.

Decorridos cinco dias após a última infestação, para leitura do experimento, fez-se um sorteio para ambos os grupos: Cultivar (30F35) e (30F35HX). Os vasos devidamente numerados de 1 a 30 foram sorteados, de maneira que cada vaso com uma planta de milho se tornou uma unidade amostral independente. A contagem foi feita retirando-se as folhas das

plantas sorteadas previamente identificadas com fita vermelha, cortadas na sua extremidade com tesoura e levadas ao laboratório para visualização em lupas. As avaliações foram realizadas diariamente durante 15 dias, lendo-se duas folhas pertencentes ao grupo das plantas de milho convencional (30F35), e duas pertencentes ao grupo das plantas de milho geneticamente modificadas com gene bt (30F35HX). Diariamente, em cada avaliação, foi realizada a contagem das fêmeas de ácaros vivas, mortas, número de indivíduos na forma jovem e número de ovos.

Análises estatísticas

O delineamento estatístico foi o delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos e 30 repetições por tratamento. Foram utilizados modelos lineares generalizados ($\alpha = 0,05 \%$), tendo como variável independente (x) o tempo após a segunda infestação, além da qualidade da planta, convencional (30F35) e *Bt* (30F35HX). Como variável dependente (y's) número de fêmeas de ácaro vivas, mortas, número de indivíduos na forma jovem e número de ovos, que foram avaliados diariamente. Os dados foram submetidos a testes de normalidade e análises de resíduos, para avaliar os pressupostos das análises e a adequação dos modelos ajustados. Utilizou-se o programa R (R Development Core Team 2014) para a análise exploratória dos dados e análises estatísticas.

Resultados

A pré-infestação de *T. urticae* em plantas de milho *Bt* (30F35HX) não apresentou diferença significativa quanto ao número de fêmeas adultas do coespecífico em reinfestação, quando comparado com sua isolinha não *Bt* (30F35) (g.l.= 57; $P=0,118$) (Figura 1). Esse resultado sugere que o fato das plantas de milho *Bt* que expressa a proteína Cry 1F não interferiu na sobrevivência de fêmeas adultas de ácaro-rajado *T. urticae*, quando comparado a

plantas de milho convencional em pré-infestação. De maneira semelhante, a pré- infestação de *T. urticae* em plantas de milho *Bt* Cry 1F, não apresentou diferença significativa para o número de indivíduos jovens (g.l.= 57; $P = 0,587$) (Figura 2), e o número de ovos (g.l.= 57; $P = 0,087$) (Figura 3). A pré-infestação em plantas de milho *Bt* não apresentou diferença significativa para o número de fêmeas adultas mortas do coespecífico, em comparação com plantas de milho convencional. O número de fêmeas adultas mortas aumentou com o tempo em plantas de milho (GM), assim como nas plantas de milho convencional que foram previamente infestadas (g.l.= 57; $P = 0,934$) (Figura 4). Assim, a pré-infestação em plantas de milho *Bt* (30F35HX) por *T. urticae* não alterou a sobrevivência e reprodução das fêmeas adultas do coespecífico e sobrevivência das formas imaturas e ovos quando comparada a plantas isolinha não *Bt* (30F35).

Os dados não apresentaram distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk, justificando a escolha de modelos lineares generalizados para a análise dos dados. Este resultado era esperado por se tratarem de dados de contagem. Nas análises de resíduos realizadas foram verificadas variações aleatórias. Ou seja, fontes de variação sistemática foram explicadas pelos modelos. Isto demonstra que modelos lineares generalizados com distribuição binomial negativa escolhido para análise explicaram de forma significativa a variação sistemática dos dados no experimento.

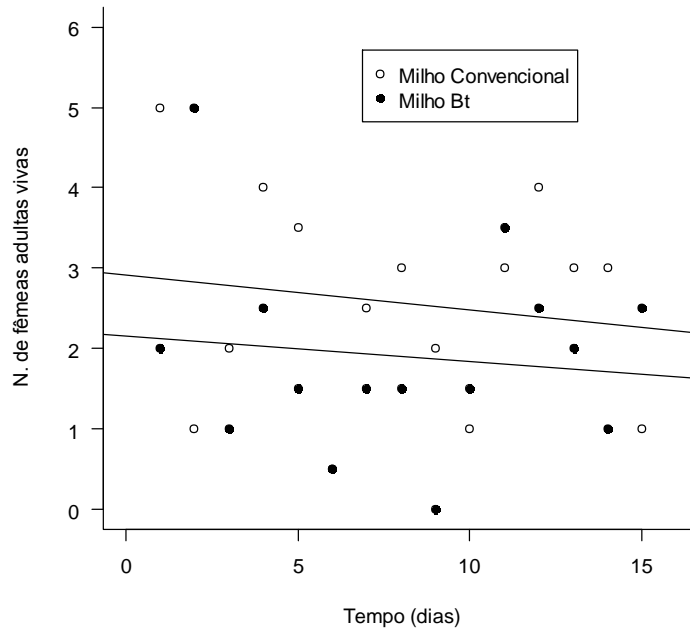


Figura 1 Número de fêmeas adultas vivas de *Tetranychus urticae* em plantas de milho convencional e Bt pré-infestadas com coespecífico.

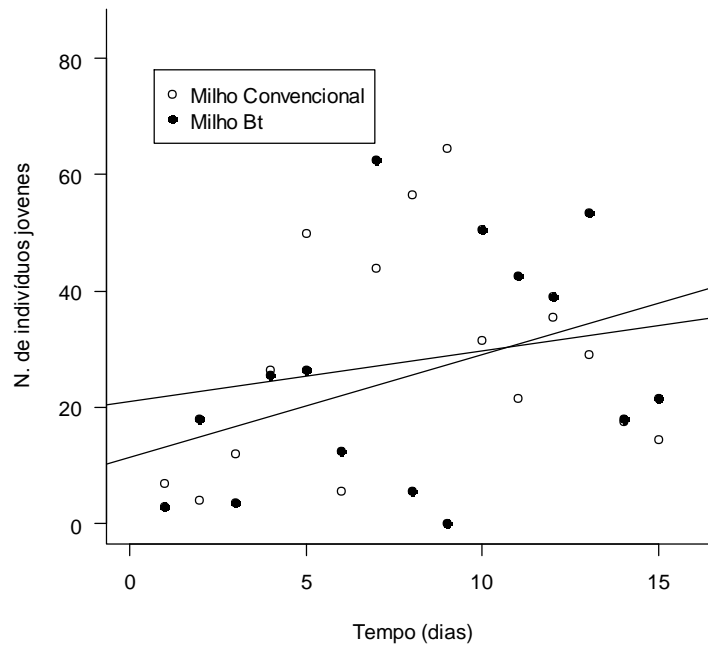


Figura 2 Número de indivíduos jovens de *Tetranychus urticae* em plantas de milho convencional e Bt pré-infestadas com coespecífico.

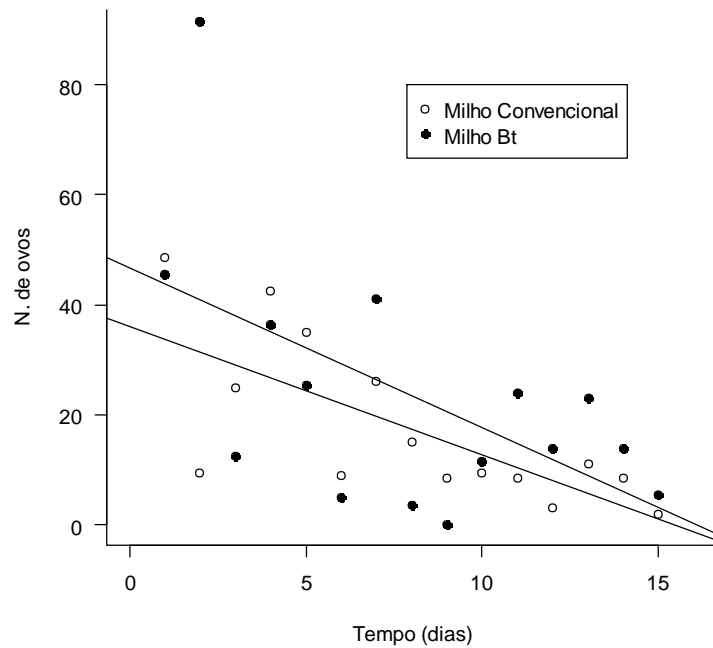


Figura 3 Número de ovos de *Tetranychus urticae* em plantas de milho convencional e Bt pré-infestadas com coespecífico.

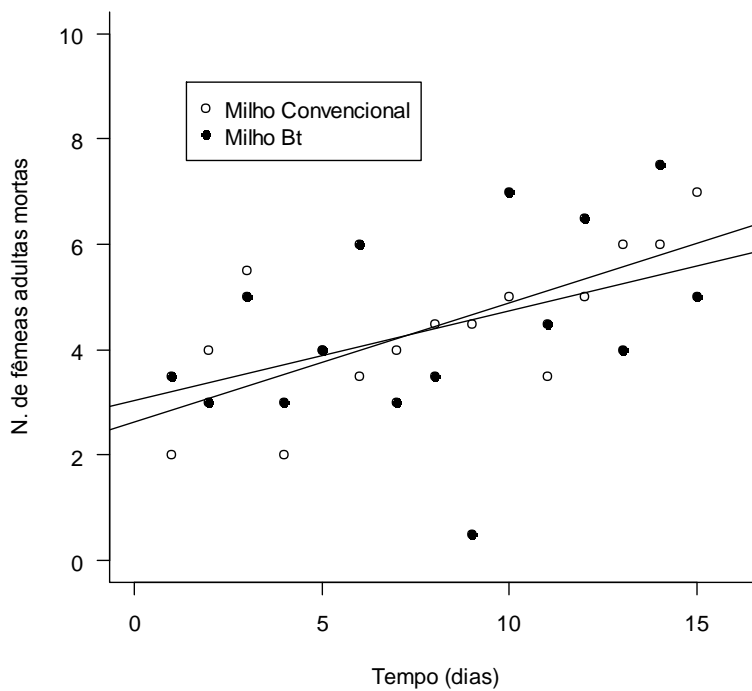


Figura 4 Número de fêmeas adultas mortas de *Tetranychus urticae* em plantas de milho convencional e Bt pré-infestadas com coespecífico.

Discussão

A pré-infestação em plantas de milho geneticamente modificadas com o gene *Bt* por *T. urticae* não apresentou diferenças para a sobrevivência das fêmeas adultas do coespecífico, comparando com as plantas de milho convencional. Entretanto, nas duas cultivares de milho (*Bt* e convencional) a reprodução e sobrevivência das formas imaturas foram afetadas pelo tempo. Estes resultados indicam que as plantas de milho (GM) expressando Cry 1F, que sofreram pré-infestação por *T. urticae*, o padrão de sobrevivência de formas adultas do coespecífico não apresentaram diferenças no desempenho da população em comparação com as plantas de milho convencional. Tais resultados suportam a hipótese de que plantas de milho geneticamente modificadas com o gene *Bt* que sofreram infestações prévias por *T. urticae*, não diferem de plantas de milho convencional quanto à indução de defesas diretas em respostas às injúrias de *T. urticae*.

Hagenbucher *et al* (2014) verificaram que plantas de algodão *Bt* e não *Bt* não diferiram em níveis de terpenoides, em ambos os tipos de plantas, a indução de terpenoides em respostas ao tratamento com jasmonatos se mostraram com padrões comparáveis. Esse resultado corrobora com os resultados encontrados no presente trabalho, em que a transgenia em plantas de milho não afetou a indução de defesa induzida direta por *T. urticae*. No entanto, Wu *et al* (2000) relataram que o conteúdo de taninos condensados e teor de ácidos fenólicos totais foram significativamente menores em algodão *Bt* R93-1 e R93-4 comparando-se com suas variedades parentais não *Bt*. O conteúdo de taninos condensados em algodão *Bt* foi significativamente menor comparando-se a plantas de algodão não *Bt* (Zhang & Guo 2000).

Feng *et al* (2007) constataram que pode haver sinergismo entre gene *Bt* e defesa induzida direta desencadeada por jasmonatos. Ou seja, o gene *Bt* pode potencializar a defesa induzida direta desencadeada por jasmonatos em plantas de milho. Em milho *Bt*, os autores

verificaram que a expressão de genes relacionados à resposta induzida direta foi significativamente maior que em plantas convencionais.

Plantas de milho *Bt* Cry 1F, previamente infestadas, não alteraram no número de indivíduos jovens e ovos de *T. urticae* quando comparadas a plantas de milho convencional. A qualidade da planta hospedeira é fator determinante para o desempenho de um herbívoro, alterações na fisiologia e bioquímica da planta afetam diretamente a fecundidade desses (Awmack & Leather 2002). Rovenská *et al* (2005) verificaram que *T. urticae* preferiu plantas transgênicas de berinjela (*Solanum melongena* L.) expressando a toxina Cry3Bb, e depositou maior quantidade de ovos, em relação à planta não-*Bt*. Esse fato indica que o comportamento de ácaros pode ser influenciado pela planta hospedeira, e o tipo de toxina expressada pela planta.

Assim, a defesa da planta, conferida pela toxina do milho *Bt* Cry 1F, não afeta o padrão de sobrevivência e reprodução do coespecífico, comparando com plantas de milho convencional. Este resultado sugere que a expressão da proteína Cry em plantas de milho *Bt* não altera na indução de defesa induzida direta por ácaro-rajado *T. urticae* nessas plantas.

A indução de defesa por *T. urticae* em milho pode vir a ser um componente de manejo integrado de ácaros, minimizando perdas provocadas por este fitófago, bem como serem organismos indicadores de ocasionais efeitos de cultivares transgênicas sobre organismo não-alvo na comunidade de artrópodes.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (**FAPEMIG**) pelo apoio financeiro ao projeto, e à Universidade Federal de São João Del- Rei (**UFSJ**) pela bolsa de mestrado concedida ao primeiro autor.

Referências

- Agrawal AA, R Karban and R Colfer (2000) How leaf domatia and induced plant resistance affect herbivores, natural enemies and plant performance. *Oikos* 89: 70–80.
- Andow DA. & Hilbeck A (2004) Science-based risk assessment for non target effects of transgenic crops. *BioScience* 54: 637–649.
- Awmack CS & Leather SR (2002) Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Annu Rev Entomol* 47: 817-844.
- Bale JS, Van LJC, Bigeler F (2008) Biological control and sustainable food production. *Philos Trans R Soc Lond B Biol* 363:761-776.
- Bates SL, Zhao JZ, Roush RT, Shelton AM (2005) Insect resistance management in GM crops: past, present and future. *Nat Biotechnol* 23:57-62.
- Becerra JX (1994) Squirt-gun defense in *Bursera* and the chrysomelid counterploy. *Ecology* 75:1991-1996.
- Chen MS (2008) Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Sci* 15:101-114.
- De Moraes CM, Lewis WJ, Pare PW, Alborn HT, and Tumlinson JH (1998) Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature* 393: 570-573.
- De Moraes CM, Lewis WJ, Tumlinson JH (2000) Examining plant-parasitoid interactions in tritrophic systems. *An Soc Entomol Bras* 29(2):189-203.
- Fadini MAM, Venzon M, Oliveira HGDE, Pallini A, Vilella EF (2010) Response of the predatory mite *Phytoseiulus macropilis* (Banks) to volatiles produced by strawberry plants in response to attack by Tetranychid mites (Acari: Phytoseiidae: Tetranychidae). *Neotrop Entomol* 39,248-252.

- Fadini MAM, Mendes SM, Araujo OG, Waquil JM (2010) Os ácaros são pragas do milho no Brasil? Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 14p. (Série Documentos, 113).
- Feng YJ, Wang JW , Luo SM (2007) Effects of Exogenous Jasmonic Acid on Concentrations of Direct-Defense Chemicals and Expression of Related Genes in Bt (*Bacillus thuringiensis*) Corn (*Zea mays*) Agr Sci China 6(12): 1456-1462.
- Ferry N, Edwards MG, Gatehouse J, Capell T, Christou P, Gatehouse AM (2006) Transgenic plants for insect pest control: a forward looking scientific perspective. Transgenic Res 15:13-9.
- Ferry N, Edwards MG, Gatehouse, AMR (2004) Plant-insect interactions molecular approaches to insect resistance. Curr Opin Plant Biol 15:155-161.
- Grbić M, Van leeuwen T, Clark R M, Rombauts S, rouzé, P, Grbić V, Verdon L (2011) The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. Nature 479(7374): 487-492.
- Hagenbucher S, Waçckers FL, Romeis J (2014) Aphid Honeydew Quality as a Food Source for Parasitoids Is Maintained in Bt Cotton. PLoS ONE 9(9):e107806.
- Howe GA, Jander G (2008) Plant immunity to insect herbivores. Annu Rev Plant Biol 59:41-66.
- Jouanin L, Bonadé-Bottino M, Girard C, Morrot G, Giband M (1998) Transgenic plants for insect resistance. Plant Sci 131:1-11.
- Kant MR, Ament K, Sabelis MW, Haring MA, Schuurink RC (2004) Differential timing of spider mite induced direct and indirect defenses in tomato plants. Plant Physiol 135:483-495.
- Karban R, Baldwin IT. (1997) Induce responses to herbivory. Chicago, University of Chicago Press 317p.

- Karban R, Carey J R (1984) Induced resistance of cotton seedlings to mites. *Science* 225:53-54.
- Kessler A and Baldwin IT (2001) Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* 291:2141–2144.
- Koziel MG, Beland GL, Bowman C, Carozzi NB, Crenshaw R, Crossland L, Dwason J, Desai, N Hill, M Kadwel L S, Launis K, Lewis K, Maddox D, McPherson K, Meghji MR, Merlin E, Rhodes R, Warren GW, Wright M, Evola SV (1993) Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology* 11:194-200.
- Kruger MJB, Van Rensburg J, VAN DEN BERG J (2012) Transgenic Bt maize: farmers' perceptions, refuge compliance and reports of stem borer resistance in South Africa. *J. Appl. Entomol* 136:38–50.
- Leitner M, Boland W and Mithöfer A (2005) Direct and indirect defences induced by piercing-sucking and chewing herbivores in *Medicago truncatula*. *New Phytol* 167:597–606.
- Mithöfer A, Boland W and Maffei ME (2009) Chemical ecology of plant-insect interactions. *J. Parker (ed.)* 34:261-291.
- Perlak FJ, Oppenhuizen M, Gustafson K, Voth R, Sivasupramaniam S, Heering D, Carey BR, Ihrig A, Roberts JK (2001) Development and commercial use of Bollgard cotton in the USA early promises versus today reality. *Plant J* 27:489-501.
- Prokopy RJ (1994) Integration in orchard pest and habitat management: a review. *Agric Ecosyst Environ.* 50:1-10.
- R Development Core Team. R (2014) A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <http://www.R-project.org>

- Rovenská GZR, Zemek JEU, Schmidt & Hilbeck A (2005) Altered host plant preference of *Tetranychus urticae* and prey preference of its predator *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae) on transgenic Cry3Bb-eggplants. *Biol Control* 33:293-300.
- Rhodes MJC (1994) Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems. *Plant Mol Biol* 24:1-20.
- Ryan CA (1999) Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 28:425–449.
- Schaller A (2008) Induced plant resistance to herbivore. Springer, University of Hohenheim. Germany 462 p.
- Sims SR, Berberich SA (1996) *Bacillus thuringiensis* CryIA protein levels in raw and processed seed of transgenic cotton: determination using insect bioassay and ELISA. *J Econ Entomol* 89:247-25.
- Stout MJ, Workman KV, Bostock RM and Duffey SS (1998) Specificity of induced resistance in the tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Oecologia* 113:74–81.
- Turlings TCJ, Lengwiler UB, Bernasconi ML, Wechsler D (1998) Timing of induced volatile emissions in maize seedlings. *Plant* 207:146-152.
- Van Den Berg J (2013) Evolution in action: field-evolved resistance of African stem borer to Bt maize. *Outlooks Pest Manage*, v.24: 236–239.
- Zhang YJ, Guo YY, Wu KM, Wang WG (2002) Changes of Bt-ICP and main secondary resistant metabolites in Bt transgenic cotton after being induced by chemical regulators. *J Cotton Sci* 14:131-133.
- Walling LL (2001) Induced resistance: from the basic to the applied. *Trends Plant Sci* 6(10):445-447.

Wu YQ, Guo YY, Zeng QL (2002) Preliminary testing of contents of total phenolics and condensed tannins in the Bt cotton. *Henan Agric Univ*, 34(2): 134-135.

Artigo para submissão ao Periódico Neotropical Entomology

Paula Daiana de Paulo

Universidade Federal de São João Del-Rei, Sete Lagoas-MG

paula.daiana4449@hotmail.com

Presença da proteína Cry 1F No Ácaro-Rajado *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) alimentado com Milho Geneticamente Modificado com o Gene bt e no Predador *Neoseiulus californicus* Mc Gregor (Acari: Phytoseiidae)

PAULO, P.D¹; FADINI, M.A.M¹; DOMINQUINI, A.B¹; MENDES, S.M²; SOUZA, V.S¹

¹Universidade Federal de São João Del-Rei, Sete Lagoas-MG

²Embrapa Milho e Sorgo, Sete lagoas- MG

Presence of the Cry1F protein in the Two-Spotted Spider Mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) fed with maize genetically modified with the bt gene and in the Predator *Neoseiulus californicus* McGregor (Acari: Phytoseiidae)

Resumo

O milho geneticamente modificado (GM) com o gene do *Bacillus Thuringiensis* é amplamente utilizado em todo o mundo. As plantas GM contendo proteínas de *Bt* interagem com os organismos não-alvo dos diferentes níveis tróficos, pois em ambiente natural, as culturas abrigam não somente pragas, mas também outros artrópodes, os quais desempenham a regulação dessas populações. As proteínas presentes nas plantas geneticamente modificadas podem ser adquiridas e concentradas em ácaros fitófagos e em seus predadores. Mesmo não causando danos econômicos, o ácaro-rajado *Tetranychus urticae* é relatado infestando culturas de milho. É provável que a proteína possa ser transferida dos ácaros fitófagos para o terceiro nível trófico, ou seja, os predadores. Avaliou-se a presença da proteína Cry 1F expressa em plantas de milho *Bt* no ácaro fitófago *T. urticae* e no seu predador *Neoseiulus californicus*. Foi realizado o teste com o Kit Bt-Cry1F ImmunoStrip® Test para detecção de proteína Cry 1F. Os testes mostraram que a proteína Cry 1F presente no milho *Bt* estava presente no terceiro nível trófico, ou seja, ocorre o acúmulo da proteína Cry presente no milho *Bt* no ácaro-rajado *T. urticae* e no seu predador *N. californicus*. Entretanto, apesar da presença da proteína, não há alteração de parâmetros biológicos dos ácaros. Isto em razão, possivelmente, da inexistência de receptores específicos para proteína no trato digestivo dos ácaros.

Palavras-Chaves: Interação tritrófica, organismos não-alvo, ácaros, plantas geneticamente modificadas

Abstract

The maize genetically modified (GM) with the *Bacillus thuringiensis* gene is widely used throughout the world. GM plants containing *Bt* proteins interact with non-target organisms of different trophic levels, given that, in the natural environment, cultures harbor not only pests, but also other arthropods, which regulate these populations. The proteins present in genetically modified plants can be purchased and concentrated in phytophagous mites and their predators. Even without causing economic damage, the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* is reported for infesting maize crops. It is likely that the protein can be transferred from phytophagous mites to the third trophic level, that is, the predators. We evaluated the presence of the Cry1F protein expressed in *Bt* maize plants in the phytophagous mite *T. urticae* and its predator, *Neoseiulus californicus*. We conducted the Bt-Cry1F ImmunoStrip® Test for detecting the Cry1F protein. The tests showed that the Cry1F protein present in the *Bt* maize was present in the third trophic level, i.e., the accumulation of the Cry protein present in *Bt* maize occurs in the two-spotted spider mite *T. urticae* and its predator, *N. californicus*. However, despite the presence of the protein, there is no change of biological parameters of the mites. This is possibly due to the lack of specific receptors for protein in the digestive tract of the mites.

Keywords: Tritrophic interaction, non-target organisms, mites, genetically modified plants

Introdução

O uso de culturas geneticamente modificadas resistentes a insetos (GM) com o gene do *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) que expressam proteínas tóxicas é um eficiente meio de controle de pragas. Desde 1996, plantas GM que expressam genes Cry que conferem resistência a pragas, são cultivadas em áreas em todo o mundo, resultando em redução de aplicações de inseticidas (Shelton *et al* 2002, Wilson *et al* 2004, Wu e Guo 2003). Entre estes, o milho *Bt* é o mais amplamente cultivado no mundo (Ramirez-Romero *et al* 2008).

A bactéria *B. thuringiensis* é o organismo mais utilizado como fonte de genes para a transformação de plantas visando à resistência, principalmente, a lepidópteros e coleópteros (Perlak 2001). Culturas como soja, milho, algodão, batata e fumo, têm sido modificadas geneticamente, para expressar as proteínas derivadas da bactéria *B. thuringiensis* e são utilizadas em escala comercial em vários países (James 2006). As proteínas de *B. thuringiensis* são expressas em altas doses nos tecidos verdes das plantas GM (Koziel 1993). Quando são expressas, as proteínas ficam expostas aos demais herbívoros não-alvo e aos seus inimigos naturais (Dutton *et al* 2003). Embora Herrero (2001) discuta que tais proteínas são altamente tóxicas e específicas, por isso inócua para maioria dos outros organismos, incluindo insetos benéficos. As plantas GM contendo proteínas de *B. thuringiensis* interagem com os organismos não-alvo dos diferentes níveis tróficos, pois, em ambiente natural, as culturas abrigam não somente os insetos pragas, mas também outros artrópodes, os quais desempenham papel na regulação das populações de pragas (Schuler 1999). A interação entre planta, fitófago e predadores é denominada interação tritrófica, em que a planta representa o primeiro nível trófico, o fitófago ou inseto praga, o segundo nível e os inimigos naturais, o terceiro nível (Schuler 1999). O nível em que diferentes herbívoros podem ingerir proteínas

Cry depende do local e tempo da expressão da proteína nas plantas, o modo da alimentação dos herbívoros e da quantidade de material vegetal que ingerem (Romeis *et al* 2009).

Herbívoros considerados não-alvo da proteína do milho *Bt*, como o ácaro-rajado *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), é uma das mais importantes pragas polífagas de plantas como algodão e soja (Moares & Flechtmann 2008, Capinera 2001, Opit *et al* 2004, Liburd *et al* 2007). O ácaro-rajado *T. urticae* é conhecido como uma das maiores pragas em muitas culturas, ele pode ser encontrado em plantas de numerosas espécies (Bolland *et al* 1998). As proteínas presentes em plantas GM, modificadas podem ser adquiridas e concentradas pelos ácaros fitófagos. Dutton *et al* (2002) verificaram que ocorreu decréscimo na taxa de crescimento da população de *T. urticae* criada em milho *Bt*, comparada com a população mantida na variedade de milho não *Bt*.

Em vários trabalhos (Dutton *et al* 2002, Lozzia 1999, Lozzia *et al* 1998, Pilcher *et al* 1997) tem sido estudado, principalmente em insetos, entretanto um número reduzido de estudos foram realizados sobre os efeitos de plantas *Bt* em ácaros fitófagos e predadores. O ácaro-rajado apresenta susceptibilidade a formulações comerciais de *Bt* e capacidade em adquirir e manter proteínas *Bt* da planta hospedeira no seu corpo (Dutton *et al* 2002). Tem-se questionado sobre o possível efeito dessa proteína sobre seus predadores (Torres & Ruberson 2008).

É provável que a proteína possa ser transferida dos ácaros para o terceiro nível trófico, ou seja, os predadores, além da possível toxicidade em ácaro poder afetar a qualidade nutricional e/ou o comportamento de ácaros (Dutton *et al* 2002). O *Neoseiulus Californicus* McGregor (Acari: Phytoseiidae) é um ácaro predador especialista em ácaros da família Tetranychidae (McMurtry & Croft 1997) e pode adquirir a proteína Cry pela ingestão do ácaro *T. urticae* que se alimenta de plantas *Bt* (Dutton *et al* 2002, Obrist *et al* 2006).

Entre os principais questionamentos em relação à interação tritrófica está: a possibilidade das plantas GM afetarem os organismos não-alvo de diferentes níveis tróficos. Vários estudos foram conduzidos para determinar os possíveis efeitos de plantas *Bt* nas interações entre insetos predadores e herbívoros presas (Dutton *et al* 2002, Ponsard *et al* 2002), porém, poucos estudos com plantas *Bt* foram conduzidos com ácaros predadores e ácaros fitófagos (Rovenská *et al* 2005, Obrist *et al* 2006). Assim, objetivou-se avaliar a presença da proteína Cry1F, expressa em plantas de milho geneticamente modificadas, no ácaro fitófago *T. urticae* e no seu predador *N. californicus*.

Material e métodos

O experimento foi conduzido na casa-de-vegetação e laboratório de Entomologia da Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ), Sete Lagoas, Minas Gerais. Para verificar a presença da proteína Cry 1F no ácaro-rajado *Tetranychchus urticae*, alimentados com milho *Bt*, e no ácaro predador *Neoseiulus californicus*, fez-se necessária a criação e manutenção do ácaro-rajado *T. urticae*, assim como o plantio e manutenção das plantas de milho. Os ácaros predadores, utilizados no experimento, foram adquiridos do produto comercial utilizado em programas de controle biológico NEOMIP MAX[®].

As cultivares de milho utilizados para avaliar o acúmulo da proteína Cry 1F no ácaro *T. urticae* e no predador *N. californicus* foram: híbridos comerciais Pioneer[®] (30F35 Hx) que expressa a proteína Cry1F e seu respectivo isogênico não-*Bt* (30F35) como controle. A semeadura foi realizada em vasos plásticos de 500 gramas, utilizando-se substrato Terral Solo[®] e mantidos em casa-de-vegetação. Dois tratamentos foram utilizados, plantas de milho convencional (30F35=controle) e *Bt* (30F35 Hx).

Cada tratamento foi composto por 10 plantas de milho, resultando em um total de 20 plantas. Foram colocadas duas sementes por vaso e após duas semanas foi feito o desbaste, deixando uma planta de milho por vaso, que foram separados em duas bancadas. Depois de 15 dias da semeadura, as plantas de milho foram adubadas com 0,2 gramas de sulfato de amônia por vaso e colocadas em gaiolas teladas, foram colocadas 10 plantas por gaiola para evitar possíveis infestações com outros artrópodes.

Após 30 dias do plantio do milho convencional e *Bt*, na base do caule de cada planta de milho foi feita uma barreira com cola entomológica para evitar a fuga dos ácaros, em seguida foi realizada a infestação com *T. urticae*. As folhas das plantas de milho, pertencentes ao grupo de milho convencional e *Bt*, foram infestadas com 20 fêmeas de *T. urticae* cada. Após 15 dias da infestação com *T. urticae*, foi feita a infestação com os ácaros predadores *N. californicus*, em cada planta de milho adicionaram-se cinco fêmeas de *N. californicus* para se alimentarem do *T. urticae* mantidos sobre plantas de milho convencional e *Bt*.

Depois de quatro dias da infestação do predador *N. californicus*, as plantas de milho convencional e *Bt* foram levadas para o laboratório de entomologia da UFSJ e foram coletadas as amostras de folhas de milho convencional e *Bt*, ácaros *T. urticae* mantidos em plantas de milho convencional e *Bt*, e os predadores *N. californicus* que se alimentaram de *T. urticae* mantidos sobre plantas de milho convencional e *Bt*. As amostras foram armazenadas em Eppendorf Tubes® 1,0 mL. Cada amostra foi constituída por 15 eppendorfs representando o grupo de plantas *Bt* e 15 eppendorfs representando o grupo das plantas convencional (controle). Dessa forma, as amostras foram compostas da seguinte maneira:

Milho *Bt*

Cinco eppendorfs com discos de folha de milho *Bt*.

Cinco eppendorfs, com 15 fêmeas de *T. urticae*.

Cinco eppendorfs com cinco fêmeas de *N. californicus*.

Milho convencional (Controle)

Cinco eppendorfs com discos de folha de milho convencional.

Cinco eppendorfs com 15 fêmeas de *T. urticae*.

Cinco eppendorfs com cinco fêmeas de *N. californicus*.

As amostras foram identificadas e armazenadas em freezer a -20°C, durante dois meses.

Para avaliar a presença da proteína Cry 1F nos ácaros fitófagos *T. urticae* e no seu predador *N. californicus*, utilizou-se o kit Bt-Cry1F ImmunoStrip® Test, desenvolvido para extrair e detectar a presença da proteína *Bt* Cry1F em milho HERCULEX®. As amostras foram retiradas do freezer e esperou-se atingir a temperatura ambiente. Em cada eppendorf, contendo as amostras de folhas, *T. urticae* e *N. californificus*, foi adicionado 0,4 ml do tampão de extração (SEB4), em seguida com pistilo descartável as amostras foram maceradas para misturar a solução tampão com o material de cada amostra (i.e. discos de folhas de milho *Bt*, *T. urticae* e *N. californicus*) e para as amostras do grupo controle (i.e. discos de folha de milho convencional, *T. urticae* e *N. californicus*). Em seguida, os eppendorfs foram fechados e agitados cuidadosamente por aproximadamente 30 segundos. Posteriormente os tubos foram colocados em um suporte e adicionou-se uma tira ImmunoStrip® Cry 1F em cada eppendorf, as tiras foram mantidas no interior de cada eppendorf por dez minutos para interpretação dos resultados. As amostras com a presença da proteína Cry1F, uma segunda linha (i.e. linha de teste) foi desenvolvida na região entre a linha de controle e a extremidade inferior da tira. Se o extrato foi de uma amostra negativa, a tira somente desenvolveu a linha de controle.

Resultados

Os resultados foram negativos para as amostras do grupo controle [i.e. discos de folhas de milho convencional (30F35), *T. urticae* e *N. Californicus*], ou seja, houve a formação de uma linha (linha de controle) nas tiras ImmunoStrip® Cry 1F como esperado, o que confirma a ausência da proteína Cry nesse grupo (Figura 1).

Os resultados foram positivos para as amostras com os discos de folhas de milho *Bt* (30F35 HX), em que uma segunda linha (linha de teste) foi desenvolvida na região entre a linha de controle e a extremidade inferior da tira. Esse resultado confirma a presença da proteína Cry 1F nas folhas de milho híbrido comercial 30F35 HX (Figura 2). Nas amostras com os ácaros fitófagos *T. urticae*, que se alimentaram com o milho *Bt*, após a adição das tiras Immunustrip® Cry 1F, houve a formação da linha de controle e a linha de teste, indicando a presença da proteína Cry 1F nestes ácaros (Figura 3). De maneira semelhante, as amostras com o predador *N. californicus* que se alimentaram de *T. urticae*, mantidos em folha de milho *Bt* (30F35HX), o resultado foi positivo, o que indica a presença da proteína Cry nos ácaros predadores *N. californicus* (Figura 4).

Os resultados são provenientes de teste qualitativo que constata a presença ou ausência da proteína Cry 1F. Desta forma, indicam que a proteína Cry 1F presente no milho *Bt* é transferida e acumulada no ácaro-rajado *T. urticae* e no seu predador *N californicus*.

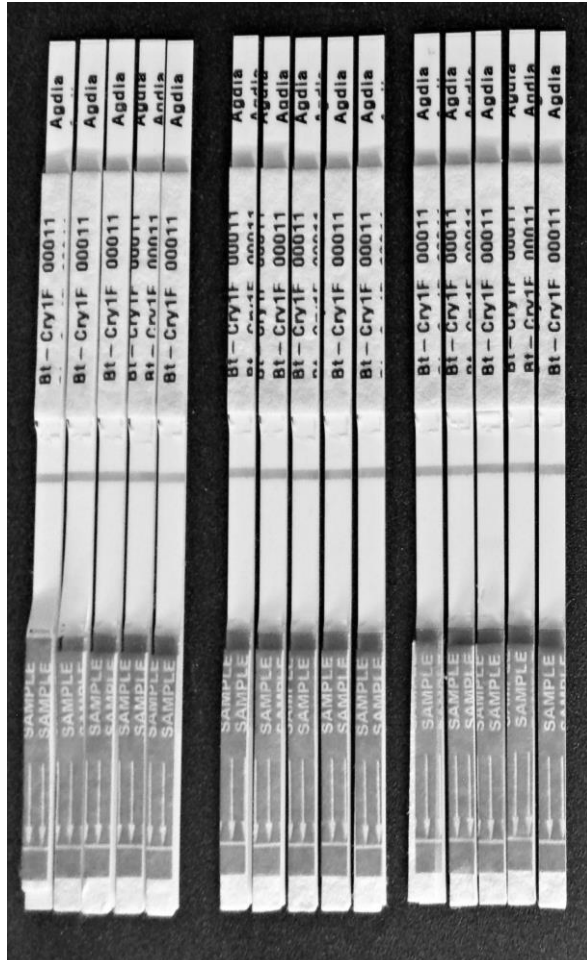


Figura 1. Tiras ImmunoStrip® Cry 1F provenientes da amostra controle (Folhas de milho convencional, *T. urticae* e *N. californicus*).



Figura 2. Tiras ImmunoStrip® Cry 1F provenientes da amostra com discos de folhas de milho *Bt* (30F35HX).



Figura 3. Tiras ImmunoStrip® Cry 1F provenientes da amostra com *T. urticae* alimentados com plantas de milho Bt (30F35HX).



Figura 4. Tiras ImmunoStrip® Cry 1F provenientes da amostra com predador *N. californicus* alimentados com *T. urticae* mantidos em plantas de milho Bt (30F35HX).

Discussão

Os resultados indicam que a proteína Cry 1F, expressa em plantas de milho 30F35 HX, é transferida para o segundo nível trófico, ou seja, os ácaros fitófagos *T. urticae*. Esses herbívoros, apesar de não serem alvos da proteína Cry, acumulam a proteína expressa em plantas de milho *Bt*. Dutton *et al* (2002) verificaram que ocorreu decréscimo na taxa de crescimento da população de *T. urticae*, criada em milho *Bt*, comparada com a população mantida na variedade de milho não *Bt*. A expressão da proteína Cry em plantas *Bt* pode afetar o comportamento dos ácaros. Segundo esses autores, fêmeas adultas de *T. urticae* preferiram a variedade de berinjela (*Solanum melongena*) que expressam a proteína Cry3Bb que a convencional e, além disso, *T. urticae* também apresentou maior taxa de oviposição nesta variedade transgênica.

Os resultados encontrados mostram que a proteína Cry 1F é transferida do segundo para o terceiro nível trófico, os ácaros predadores *N.californicus*. Ao se alimentarem de *T.urticae*, que se alimentaram de plantas de milho 30F35 HX, os predadores *N. californicus* apresentaram a proteína Cry 1F proveniente de plantas de milho *Bt*. O ácaro predador *Phytoseiulus persimilis*, em teste de livre escolha, consumiu menos *T. urticae* que se alimentou com a berinjela transgênica contendo a toxina Cry3Bb do que aqueles que tinham consumido a variedade não transgênica (Rovenská 2005). Os autores argumentam que essa mudança pode ser em razão de mudanças na qualidade nutricional da presa causada pela planta hospedeira ou por causa do reconhecimento da toxina na presa, ou ambos. É igualmente possível que o efeito pode não ser em decorrência da presença da toxina *Bt*.

Entretanto, Li & Romeis (2010) avaliaram os possíveis efeitos das proteínas *Bt* ao longo da cadeia alimentar de *T. urticae* e seu inimigo natural o besouro predador *Stethorus punctillum* Weise (Coleoptera: Coccinellidae), onde não foi encontrado efeito adverso da

proteína *Bt* expressa em milho sobre *T. urticae* e seu predador *S. punctillum*. Esteves Filho *et al* 2010 estudaram os efeitos do algodão *Bt* expressando a Toxina Cry1Ac (Acala DP 90B) e sua isolinha (Acala DP 90) e compararam a biologia e comportamento de *T. urticae* e seu predador *Phytoseiulus macropilis* (Banks) e não encontraram efeito nos estágios de desenvolvimento, sobrevivência, reprodução e comportamento dos predadores. Em um estudo realizado com ácaro predador *Neoseiulus cucumeris*, Obrist *et al* (2006) observaram que não houve efeitos de a toxina Cry1Ab sobre os parâmetros biológicos quando alimentados com *T. urticae* mantidos em milho Bt (Bt11). Castro *et al* (2013), avaliaram o risco de toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* sobre os ácaros predadores *Euseius concordis* e *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae) e obtiveram como resultados que proteínas Cry de *B. thuringiensis* estudados, nas concentrações utilizadas no campo ou expresso em plantas transgênicas, não afetou estes ácaros predadores. Esses resultados indicam que, apesar de ocorrer o acúmulo da proteína Cry no ácaro fitófago *T. urticae* e no predador *N.californicus* como encontrados neste estudo, a proteína não deve afetar esses ácaros.

A proteína Cry presente nas variedades de milho *Bt* (30F35 HX, 30F35 yg e impacto viptera) não afetou a abundância de ácaros fitófagos em campo, assim como a taxa instantânea de crescimento e preferência alimentar de *T. urticae* não diferiu em milho *Bt* e convencional (Ferreira, 2014). Tais resultados demonstram que, apesar da exposição via aquisição da proteína e a presença em seu corpo como encontrado neste estudo, ácaros, aparentemente, não são susceptíveis à proteína (Van Der Geest *et al* 2000). Este resultado pode ser em virtude da especificidade da proteína Cry contra insetos mastigadores, onde a proteína Cry se liga a receptores específicos na superfície celular no epitélio do intestino médio dos insetos. Essa ligação leva à formação de poros nas membranas, causando lise no intestino e, conseqüentemente, a morte dos insetos (Glare & O'Callaghan 2000). Este fato

sugere que os ácaros fitófagos não apresentam receptores específicos para a Proteína Cry. Ao se alimentarem diretamente da planta, a Proteína Cry não deve causar efeitos deletérios em ácaros em razão de sua especificidade.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (**FAPEMIG**) pelo apoio financeiro ao projeto, e à Universidade Federal de São João Del- Rei (**UFSJ**) pela bolsa de mestrado concedida ao primeiro autor.

Referências

- Bolland HR, Gutierrez J, Flechtmann CHW. 1998. World catalogue of the spider mite family (Acari: Tetranychidae). Brill Academic Publishers, Leiden, 392 p.
- Capinera JL (2001) Hand book of Vegetable Pests. Academic Press, New York. 729p.
- Castro TR, Ausique JJS, Nunes DH, Ibanhes FH, Delalibera Júnior I (2013) Risk assessment of Cry toxins of *Bacillus thuringiensis* on the predatory mites *Euseius concordis* and *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae). Exp Appl Acarol (2013) 59:421–433.
- Dutton A, Klein H, Romeis J, Bigler F (2002) Uptake of Bt-toxin by herbivores feeding on transgenic maize and consequences for the predator *Chrysoperla carnea*. Ecol Entomol 27:441-447.
- Dutton A, Klein H, Romeis J, Bigler F (2003) Prey-mediated effects of *Bacillus thuringiensis* spray on the predator *Chrysoperla carnea* in maize. Biol Control 26: 209-215.
- Esteves filho AB, Oliveira JV, Torres JB, Gondim JR, MGC (2010) Biologia comparada e comportamento de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) e *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae) em Algodoeiro Bollgard™ e Isolinha não-Transgênica. Neotrop Entomol 39:338-344.
- Ferreira TE (2014) Ácaros fitófagos em milho geneticamente modificado com o gene do *Bacillus thuringiensis* (Bt). Dissertação (mestrado) Universidade Federal de São João Del-rei 42p.
- Glare TR, O’Callaghan M (2000) *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology, and Safety. John Wiley & Sons, Chichester, 350p.
- Herrero S, Oppert B, Ferré J (2001) Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indianmeal moth. Applied and Environ Microbiol 67:1085-1089.

- James C (2006) Global review of commercialized transgenic crops .ISAAA. (Briefs, 36: Preview). Ithaca: ISAAA, p.20.
- Koziel MG, Beland GL, Bowman C, Carozzi NB, Crenshav R, Crossland L, Dawson J, Desai N, Hill M, Kadwell S, Launis K, Lewis K, Maddox D, MC Pherson K, Meghji MR, Merlin E, Rhodes R, Warren G, Wright M, Evola SV (1993) Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Nat Biotechnol* 11:194-200.
- Li Y, Romeis J (2010) *Bt* maize expressing Cry3Bb1 does not harm the spider mite, *Tetranychus urticae*, or its ladybird beetle predator, *Stethorus punctillum*. *Biol Control* 53(3):337-344.
- Liburd OE, White JC, Rhodes EM, Browdy AA (2007) The residual and direct effects of reduced-risk and conventional miticides on two-spotted spider mites, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae), and predatory mites (Acari: Phytoseiidae). *Fla Entomol* 90:249-257.
- Lozzia GC (1999) Biodiversity and structure of ground beetle assemblages (Coleoptera: Carabidae) in Bt corn and its effect on non-target insects. *Boll Zool Agrar Bachic* 31:37-58
- Lozzia GC, Rigamonti E (1998) Preliminary study on the effects of transgenic maize on nontarget species. *IOBC/WPRS Bull* 21(8):171–180.
- McMurtry JA & Croft BA (1997) Life-styles of Phytoseiid mites and their roles in biological control. *Annu Ver Entomol* 42: 291-321.
- Moraes GJ, Flechtmann CHW (2008) Manual de acarologia: acarologia básica e ácaros de plantas cultivadas no Brasil. Ribeirão Preto: Holos, 288p.
- Obrist LB, Dutton A, Albajes R, Bigler F (2006) Exposure of arthropod predators to Cry1Ab toxin in Bt maize fields. *Ecol Entomol* 31:143–154.

- Opit GP, Nechols R, Margolies DC (2004) Biological control of twospotted spider mites *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), using *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae) on ivy geranium: assessment of predator release ratios. *Biol Control* 29:445-452.
- Perlak FJ, Oppenhuizen M, Gustafson K, Voth R, Sivasupramaniam S, Heering D, Carey BR, Ihrig A, Roberts JK (2001) Development and commercial use of Bollgard cotton in the USA early promises versus today reality. *Plant J* 27:489-501.
- Pilcher CD, Obrycki JJ, Rice ME, Lewis LC (1997) Preimaginal development, survival, and field abundance of insect predators on transgenic *Bacillus thuringiensis* corn. *Environ Entomol* 26, 446–454.
- Ponsard S, Gutierrez AP, Mills NJ (2002) Effect of Bt-toxin (Cry1Ac) in transgenic cotton on the adult longevity of four heteropteran predators. *Environ Entomol* 31:1197–1205.
- Ramirez-Romero R, Desneux N, Decourtye A, Chaffiol A, Pham-Dele`gue MH (2008) Does Cry1Ab protein affect learning performances of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)? *Ecotoxicol. Environ Saf* 70:327.
- Romeis J, Meissle M, Raybould A, Hellmich RL (2009) Impact of insect-resistant transgenic crops on aboveground non-target arthropods. In: *Environmental impact of genetically modified crops*. Ed. by Ferry N, Gatehouse AMR, CABI, Wallingford, UK, 165–198.
- Rovenská GZ, Zemek R, Schmidt JEU, Hilbeck A (2005) Altered host plant preference of *Tetranychus urticae* and prey preference of its predator *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae) on transgenic Cry3Bb-eggplants. *Biol Control* 33:293-300.
- Schuler TH, Poppy GM, Kerry BR, Denholm I (1999) Potential side effects of insect resistant transgenic plants on arthropod natural enemies. *Trends Biotechnol* 17:210-215.

- Shelton AM, Zhao JZ, Roush RT (2002) Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annu Rev Entomol* 47:845-881.
- Torres JB., Ruberson JR & Adang MJ (2006) Expression of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protein in cotton plants, acquisition by pests and predators: a tritrophic analysis. *Agric For Entomol* 8:191-202.
- Torres JB & Ruberson JR (2008) Interactions of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in genetically engineered cotton with predatory heteropterans. *Transg Res* 17:345-354.
- Van Der Geest LPS, Elliot SL, Breeuwer JAJ, Beerling EAM (2000) Diseases of mites. *Exp Appl Acarol* 24:497-560.
- Wilson LJ, Mensah RK, Fitt GP (2004) Implementing Integrated Pest Management in Australian cotton. In 'Insect pest management, field and protected crops'. (Eds AR Horowitz, I Ishaaya) pp. 97–118. (Springer-Verlag: Berlin/Heidelberg).
- Wu K, and Guo Y (2003) Influences of *Bacillus thuringiensis* cotton planting on population dynamics of the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover, in northern China. *Environ Entomol.*32:312-318.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho permitiu avaliar o efeito da expressão da proteína Cry em plantas de milho sobre a defesa induzida direta por ácaros fitófagos.

A pré-infestação por ácaros fitófagos *Tetranychus urticae* em plantas de milho afeta o padrão de sobrevivência e reprodução do coespecífico. Este resultado sugere a indução de defesas induzidas diretas em milho por *T. urticae*.

A defesa da planta, conferida pela proteína do milho *Bt*, não afeta o padrão de sobrevivência e reprodução do coespecífico, comparando com plantas de milho convencional. Este resultado sugere que a expressão da proteína Cry, em plantas de milho geneticamente modificada com o gene *bt*, não altera a indução de defesa induzida direta por ácaro-rajado *T. urticae* nessas plantas.

A proteína Cry, expressa em plantas de milho *Bt*, é transferida para os ácaros fitófagos *T. urticae* e seu predador *N. californicus*. No entanto, a presença da proteína Cry 1F não causa efeitos deletérios em virtude de sua especificidade.

Este é o primeiro relato de indução de defesa direta em milho pelo ácaro-rajado *T. urticae*, no qual permitiu avaliar que a transgenia em plantas de milho não afeta a indução de defesa induzida direta por ácaros fitófagos.