

JULIANA DE OLIVEIRA FONSECA

**IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS NO
SISTEMA PREDADOR-PRESA-TOMATEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

F676i
2012

Fonseca, Juliana de Oliveira, 1984-

Identificação de compostos voláteis produzidos no sistema predador-presa-tomateiro / Juliana de Oliveira Fonseca. – Viçosa, MG, 2012.
viii, 48f. : il. ; 29cm.

Orientador: Angelo Pallini Filho

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Tetranychus evansi*. 2. *Tetranychus urticae*. 3. Relação inseto-planta. 4. Compostos orgânicos. 5. Cromatografia de gas. 6. Espectrometria de massa. 7. Tomate.
8. *Phytoseiulus macropilis*. 9. *Phytoseiulus longipes*.
10. *Cycloneda sanguinea*. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22. ed. 598.63

JULIANA DE OLIVEIRA FONSECA

**IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS NO
SISTEMA PREDADOR-PRESA-TOMATEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 30 de julho de 2012.



Arnoldus Rudolf Maria Janssen
(Coorientador)



Eraldo Rodrigues de Lima



Renato de Almeida Sarmiento



Angelo Pallini Filho
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por atender meus pedidos e me abençoar todos os dias.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia pela oportunidade de realizar o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor e orientador, Angelo Pallini, pelo conhecimento transmitido, pela compreensão e pela confiança em mim depositada desde o início, ainda como estudante de iniciação científica.

Ao professor e coorientador Arne Janssen por toda sua contribuição, valiosas sugestões e disponibilidade para a realização do trabalho.

Ao professor e coorientador Eraldo Rodrigues de Lima, pela grande colaboração e pelas correções e sugestões.

Ao professor Renato de Almeida Sarmiento pelas correções e sugestões.

Aos meus queridos pais, Ademir e Vera, pela presença, pelo apoio e carinho em todos os momentos de minha vida e que possibilitaram minha caminhada até aqui.

Aos meus irmãos Henrique e Luciano, pela família que formamos, pela força, incentivo e grande torcida.

Às amigas de república: Ruth e Ubiana, pela amizade, ótimo convívio e pela enorme ajuda e compreensão nos momentos difíceis.

Aos colegas e amigos do laboratório de acarologia: Felipe, Elisa, Aline, João, Cleber, Cleide, Livia, Caelum, Aninha, Fábio e Francisco pela ótima convivência e também pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas e amigos do laboratório de Feromônios em especial à Silvana e Alexandre por toda a ajuda e disponibilidade.

A todos os amigos de Viçosa, em especial, Anderson, Andreza, Bob, Dalila, Dalilinha, Elaine, Marcos, Matarazzo, Michelle, Katherine, Morgana e Renata que fizeram e fazem parte da minha vida e que tornaram minha estadia em Viçosa mais prazerosa e feliz.

Enfim, a todos que por razões não menos importantes aos citados aqui, mas que sabem o quanto colaboraram para o êxito deste trabalho, o meu eterno agradecimento e estima.

BIOGRAFIA

JULIANA DE OLIVEIRA FONSECA, filha de Ademir José da Fonseca e Vera de Oliveira Fonseca, nasceu na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, em 13 de janeiro de 1984.

Em março de 2004, ingressou no curso de graduação em Agronomia na Universidade Federal de Viçosa (UFV). Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica sob a orientação do Prof. Angelo Pallini, obtendo o título de Engenheira Agrônoma em julho de 2009.

Em agosto de 2010, iniciou o curso de Mestrado em Entomologia, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob orientação do Prof. Angelo Pallini, submetendo-se à defesa da dissertação em julho de 2012.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO GERAL	1
Referências	5
CAPÍTULO 1	8
RESPOSTA INATA DE PREDADORES A VOLÁTEIS DE PLANTAS DE TOMATE ATACADAS POR ÁCAROS FITÓFAGOS	8
Resumo	8
Abstract	9
Introdução.....	10
Material e Métodos.....	12
Resultados	17
Discussão.....	22
Referências	25
CAPÍTULO 2	29
IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DO TOMATEIRO QUANDO ATACADO POR ÁCAROS FITÓFAGOS.....	29
Resumo	29
Abstract	30
Introdução.....	31
Material e Métodos.....	33
Resultados	37
Discussão.....	41
Referências	44
CONCLUSÕES GERAIS	48

RESUMO

FONSECA, Juliana de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Identificação de compostos voláteis produzidos no sistema predador-presa-tomateiro.** Orientador: Angelo Pallini Filho. Coorientadores: Arnoldus Rudolf Maria Janssen e Madelaine Venzon.

As plantas se protegem contra o ataque de herbívoros através da combinação de defesas constitutivas e/ou induzidas que reduzem o desempenho dos herbívoros e, conseqüentemente, interrompem a propagação do dano. Plantas sadias ou sob o ataque de herbívoros liberam uma variedade de compostos orgânicos voláteis, os quais estão envolvidos na atração dos inimigos naturais desses herbívoros. Os inimigos naturais como ácaros predadores e coccinelídeos, por exemplo, são capazes de explorar esses voláteis para localizar suas presas, usando-os como sinais químicos da presença do alimento. Dessa forma, estudos de comportamento são importantes para o entendimento das interações que ocorrem entre os organismos em uma teia alimentar. Assim como o conhecimento dos compostos químicos que mediam a localização de plantas infestadas com herbívoros pelos inimigos naturais, para que se tenha uma melhor compreensão da interação inseto-planta influenciando o terceiro nível trófico. Diante disso, este trabalho objetivou investigar as respostas dos ácaros predadores *Phytoseiulus longipes* e *Phytoseiulus macropilis* e de joaninhas da espécie *Cycloneda sanguinea* aos voláteis de plantas de tomate infestadas ou não com *Tetranychus evansi* e *Tetranychus urticae*. O principal objetivo foi verificar se estes predadores são capazes de discriminar entre as fontes de odores produzidas pelo complexo planta-herbívoro. Nós também identificamos os compostos voláteis emitidos por plantas infestadas com o ácaro-vermelho *T. evansi* e com o ácaro rajado *T. urticae* e de plantas de tomate limpas. Para acessar esses resultados foram utilizadas as técnicas de olfatométrica para os testes comportamentais e o GC-MS para a identificação dos compostos. Os resultados mostram que os predadores testados são capazes de discriminar entre voláteis de plantas de tomate infestadas com *T. evansi* ou *T. urticae* e voláteis de plantas limpas. Isso mostra que o complexo planta-herbívoro libera odores atraentes a estes inimigos naturais. Porém, quando dada à escolha entre plantas infestadas com *T. evansi* e plantas infestadas com *T. urticae*, os predadores não são capazes de discriminar entre as duas fontes de odores produzidas. Quanto à identificação dos compostos foi verificado que ao

compararmos plantas limpas e plantas infestadas, seja com o ácaro-vermelho ou com o ácaro rajado, foram encontrados e identificados uma quantidade bastante superior de compostos voláteis nas plantas infestadas. Já quando comparamos plantas infestadas com *T. evansi* e plantas infestadas com *T. urticae*, o perfil de compostos voláteis encontrado em ambas foi bastante similar. Quanto à análise quantitativa dos compostos, observamos que não existe diferença significativa entre as concentrações de cada composto emitidos por plantas infestadas com *T. evansi* e *T. urticae*. Os resultados obtidos através da identificação e quantificação dos compostos voláteis podem explicar as respostas obtidas nos experimentos de olfatômetro.

ABSTRACT

FONSECA, Juliana de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **Identification of volatile compounds produced in the predator-prey-tomato system.** Adviser: Angelo Pallini Filho. Co-advisers: Arnoldus Rudolf Maria Janssen and Madelaine Venzon.

Plants protect themselves against herbivore attacks by a combination of constitutive and induced defenses, which reduce the performance of herbivores and decrease the spread of damage. Plants under attack by herbivores release a variety of organic volatile compounds, which are involved in the attraction of natural enemies of herbivores. The natural enemies such as predatory mites and coccinellids, for example, are able to exploit these volatiles to locate their prey, using them as chemical signals for the presence of food. Thus, behavioral studies are important for understanding the interactions that occur between organisms in a food web. As well as the knowledge of the chemical compounds that mediate the location of plants infested with herbivores by natural enemies, in order to have a better understanding of insect-plant interactions mediating the third trophic level. In this study, we investigated the responses of the predators *Phytoseiulus longipes*, *Phytoseiulus macropilis* and *Cycloneda sanguinea* to volatiles from tomato plants infested or not infested with the phytophagous mites *Tetranychus evansi* or *Tetranychus urticae*. The main objective was to verify whether these predators are able to discriminate between sources of odors produced by the plant-herbivore complex. We also identified the volatile compounds emitted by plants infested with *T. evansi*, *T. urticae* and clean tomato plants. To access these results were used techniques of olfactometry for behavioral tests and GC-MS to identify the compounds. The results show that the tested predators are able to discriminate between volatile tomato plants infested with *T. evansi* or *T. urticae* and volatile of clean plants, showing that the plant-herbivore complex releases odors attractive to these natural enemies. But when given the choice between plants infested with *T. evansi* and plants infested with *T. urticae*, the predators are not able to discriminate between the two sources of odors produced. The identification of volatile compounds was verified that when comparing clean plants and plants infested with *T. evansi* or *T. urticae* was found and identified more volatile compounds in infested plants. When we compare plants infested with *T. evansi* and plants infested with *T. urticae*, the profile of the volatile

compounds were very similar in both. As for the quantitative analysis of compounds, we found no significant difference between the concentrations of each compound emitted by plants infested with *T. evansi* and *T. urticae*. The results obtained through the identification and quantification of volatile compounds may explain the responses obtained in the olfactometer experiments.

INTRODUÇÃO GERAL

Para se defenderem de doenças e pragas, as plantas estão equipadas com as defesas pré-formadas ou constitutivas, que são aquelas naturalmente presentes nas plantas e as defesas pós-formadas ou induzidas, que são ausentes ou de pouca expressividade em plantas saudáveis (Karban & Baldwin, 1997; Agrawal, 2000; Agrawal, 2007).

A defesa constitutiva de plantas se expressa fisicamente na forma de domácias, tricomas e cutículas espessas, ou bioquimicamente por meio de metabólitos secundários produzidos pelas plantas como os terpenóides, compostos fenólicos e nitrogenados (Lara, 1991; Agrawal, 1998; Schoonhoven *et al.*, 2005). A presença desses compostos nas plantas faz com que os insetos as evitem, sendo muitas vezes, responsáveis pela sua resistência à herbivoria (Karban & Baldwin, 1997; Agrawal, 2007).

As defesas induzidas são aquelas que se tornam evidentes somente após o ataque do herbívoro (Karban & Baldwin, 1997). Ela pode ser definida como uma mudança fisiológica na qualidade da planta, que é resultado de um dano causado pelo herbívoro e tem um efeito negativo no desempenho deste organismo na planta (Karban & Baldwin, 1997).

A defesa induzida pode ocorrer de forma direta ou indireta (Agrawal, 2002). A forma direta de defesa induzida expressa pelas plantas ao ataque de herbívoros está baseada em vários mecanismos de defesa como, por exemplo, a produção de inibidores de proteases em várias espécies de plantas incluindo o tomate (Kant *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005). A forma indireta da defesa induzida das plantas constitui a produção de compostos voláteis que servem como indicadores aos inimigos naturais

de herbívoros na localização das plantas com suas presas (Dicke *et al.*, 1998; Agrawal *et al.*, 2002; Dicke *et al.*, 2003).

Os voláteis liberados pelas plantas quando atacadas por herbívoros são metabólitos que as plantas liberam no ar (Baldwin, 2010). Vários estudos em laboratório têm demonstrado que em resposta à injúria de artrópodes, as plantas sintetizam e liberam compostos orgânicos voláteis que tornam essas plantas atrativas para os inimigos naturais desses herbívoros (Allison & Hare, 2009). Adicionalmente, estudos de campo observam a atração de inimigos naturais para voláteis induzidos e o aumento na atividade desses inimigos naturais em plantas induzidas (Allison & Hare, 2009).

Para uma correlação positiva entre a variação na composição de compostos orgânicos voláteis e o fitness da planta é importante que os inimigos naturais respondam de forma inata ou tenham a capacidade de aprender rapidamente a associar determinados voláteis com a presença de herbívoros (Allison & Hare, 2009).

O ataque de ácaros fitófagos como *Tetranychus evansi* e *Tetranychus urticae*, por exemplo, pode induzir a produção de voláteis pelas plantas, que por sua vez pode atrair os inimigos naturais desses herbívoros (Dicke *et al.*, 1998; Dicke *et al.*, 2003; Sarmiento *et al.*, 2011).

Dessa forma, estudos de comportamento são importantes para o entendimento das interações que ocorrem entre os organismos em uma teia alimentar. Assim como é importante o conhecimento dos compostos químicos que mediam a localização de plantas infestadas com herbívoros pelos inimigos naturais, para que se tenha uma melhor compreensão da interação inseto-planta influenciando o terceiro nível trófico (van Wijk *et al.*, 2008; Bleeker *et al.*, 2009; Proffit *et al.*, 2011; van Wijk *et al.*, 2011).

Recentemente foi descoberto que plantas de tomate atacadas pelo ácaro-vermelho *T. evansi* têm seu sistema de defesa direta suprimido (Sarmiento *et al.*, 2011). Foi observado que *T. evansi* promove uma supressão na defesa da planta que em caso contrário é induzida através de duas principais rotas de sinalização bioquímica, as rotas do ácido salicílico e do ácido jasmônico (Sarmiento *et al.*, 2011). Sarmiento *et al.* (2011) mostraram que o desempenho de *T. evansi* é bem maior em plantas infestadas por coespecíficos em relação a plantas limpas. Foi observado que genes responsáveis pela ativação da rota bioquímica do ácido jasmônico e ácido salicílico (WIPI II, PR-P6 e GGPS1) não são expressos em plantas danificadas por *T. evansi*. No entanto, em plantas danificadas por outro herbívoro, o ácaro rajado *T. urticae*, há a expressão desses genes após a herbivoria (Kant *et al.*, 2004; Sarmiento *et al.*, 2011). Com isso, compostos de defesa direta como inibidores de proteases são reduzidos após o ataque por *T. evansi*.

Quanto à defesa indireta, dois compostos voláteis foram emitidos por plantas infestadas por *T. urticae* em quantidades muito superiores em relação a plantas limpas: TMTT e β -mirceno. Já a emissão desses compostos voláteis de plantas atacados por *T. evansi* não foi diferente das plantas limpas (Sarmiento *et al.*, 2011). Entretanto, apesar do desligamento de genes relacionados com o sistema de defesa do tomateiro, as plantas continuam atrativas a ácaros predadores como *Phytoseiulus longipes* e *Phytoseiulus macropilis* e joaninhas como *Cycloneda sanguinea* (Sarmiento *et al.*, 2008; Sarmiento, 2011). Além do mais, *T. evansi* demonstra uma clara preferência por odores de plantas atacadas por co-específicos em relação a plantas atacadas por *T. urticae*, mostrando talvez que os voláteis emitidos a partir de plantas infestadas com estes dois ácaros fitófagos sejam diferentes (Sarmiento *et al.*, 2011).

Com base nessas informações, o estudo desenvolvido nesta dissertação investigou em um olfatômetro de tubo em “Y”, as respostas dos predadores *Phytoseiulus longipes*, *Phytoseiulus macropilis* e *Cycloneda sanguinea* aos voláteis de plantas de tomate infestadas ou não por *Tetranychus evansi* e *Tetranychus urticae*. Estes testes realizados no olfatômetro foram feitos com o intuito de testar a atratividade dos predadores às plantas, sendo as premissas para explicar os experimentos seguintes. A hipótese é que os predadores testados neste trabalho possam discriminar entre as fontes de odores produzidas por plantas infestadas com *T. evansi* e plantas infestadas com *T. urticae*.

Também foi realizada neste trabalho a identificação dos compostos voláteis do tomateiro infestado por *T. evansi*, *T. urticae* e plantas limpas, para que através dessa identificação seja possível explicar o comportamento de busca dos predadores *Phytoseiulus longipes*, *Phytoseiulus macropilis* e *Cycloneda sanguinea* pelas fontes de odores testadas anteriormente.

Espera-se com isso ter uma compreensão mais aprofundada de como ocorre essa interação mutualística entre plantas e inimigos naturais de herbívoros nessa teia alimentar de tomateiro.

REFERÊNCIAS

- Agrawal A A (2007). Macroeolution of plant defense strategies. *Trends in Ecology & Evolution*, 22, 103-109.
- Agrawal A A, Janssen A, Bruin J, Posthumus M A & Sabelis M W (2002). An ecological cost of plant defense: attractiveness of bitter cucumber plants to natural enemies of herbivores. *Ecology Letters*, 5:3, 377-385.
- Agrawal A A (2000). Mechanisms, ecological consequences and agricultural implications of tri-trophic interactions. *Current Opinion Plant Biology*, 3:4, 329-335.
- Agrawal A A (1998). Induced responses to herbivory and increased plant performance. *Science*, 279, 1201-1202.
- Allison J D, Hare J D (2009). Learned and naïve natural enemy responses and the interpretation of volatile organic compounds as cues or signals. *New Phytologist*, 184, 768-782.
- Baldwin I T (2010). Plant volatiles. *Current Biology*, 20, R392-R397.
- Baker E W & Pritchard A E (1960). The Tetranychoid mites of Africa. *Hilgardia*, 29, 540-543.
- Bleeker P M, Diergaarde P J, Ament K, Guerra J, Weidner M, Schutz S, de Both M T J, Haring M A, Schuurink R C (2009). The role of specific tomato volatiles in tomato-whitefly interaction. *Plant Physiology*, 151, 925-935.
- Chen M S, Kuang D Z, Zhang C H, Deng Y F, Li W & Yang Y Q (2005). Synthesis and crystal structure of a hexameric organooxotin cluster from benzilic acid. *China. Journal Structural Chemistry*, 24, 1249-1253.

- De Moraes C M, Lewis W J, Pare P W, Alborn H T & Tumlinson J H (1998). Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature*, 393, 570-573.
- de Moraes G J & McMurtry J A (1985). Comparison of *Tetranychus evansi* and *Tetranychus urticae* [Acari: Tetranychidae] as prey for eight species of Phytoseiidae mites. *Entomophaga*, 30, 393-397.
- Dicke M, De Boer J G, Höfte M, Rocha-Granados M C (2003). Mixed blends of herbivore-induced plant volatiles and foraging success of carnivorous arthropods. *Oikos*, 101, 38-48.
- Dicke M, Takabayashi J, Posthumus M A, Schute C, Krips O E (1998). Plant-phytoseiid interactions mediated by herbivore-induced plant volatiles: variation in production of cues and in responses of predatory mites. *Experimental & Applied Acarology*, 22, 311-333.
- Furtado I P, de Moraes G J, Kreiter S, Tixier M S, Kanpp M (2007). Potential of a Brazilian population of the predatory mite *Phytoseiulus longipes* as a biological control agent of *Tetranychus evansi* (Acari: Phytoseiidae: Tetranychidae). *Biological Control*, 42, 139-147.
- Kant M R, Ament K, Sabelis M W, Haring M A, Schuurink R C (2004). Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants. *Plant Physiology*, 135, 483-495.
- Karban R & Baldwin I T (1997). *Induced responses to herbivory*. Chicago, University of Chicago Press, Chicago. 317 p.
- Lara F M (1991). *Princípios de resistência de plantas a insetos*. 2ª ed., Ícone. São Paulo, 336 p.
- Oliveira E E, Oliveira C L, Sarmiento R A, Rezende L M, Fadini M A M (2005). Biological aspects of the predator *Cycloneda sanguinea* Linnaeus, 1763 (Coleoptera: Cocinellidae) fed with *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard,

1960 (Acari: Tetranychidae) and *Macrosiphum euphorbiae* Thomas, 1878 (Homoptera: Aphididae). *Bioscience Journal*, 21, 33-39.

Proffit M, Birgersson G, Bengtsson M, Jr R R, Witzgall P, Lima E (2011). Attraction and oviposition of *Tuta absoluta* females in response to tomato leaf volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, 37, 565–574.

Sarmiento R A, Lemos F, Bleeker P M, Schuurink R C, Pallini A, Oliveira M G A, Lima E R, Kant M, Sabelis M W, Janssen A (2011). A herbivore that manipulates plant defence. *Ecology Letters*, 14, 229-236.

Sarmiento R (2011). An acarine herbivore interferes with direct and indirect plant defences. University of Amsterdam, 90 p. (Ph.D. Thesis).

Sarmiento R A, de Lemos F, Dias C R, Pallini A, Venzon M (2008). Infoquímicos induzidos por herbivoria mediando a comunicação entre plantas de tomate e o predador *Cycloneda sanguinea* (Coleoptera: Coccinellidae). *Revista Ceres*, 55, 439-444.

Schoonhoven L M, Loon J J A V & Dicke M (2005). *Insect Plant-Biology*. 2^a ed. Oxford, New York, 440 p.

van Wijk M, Bruijn P J A, Sabelis M W (2011). Complex odor from plants under attack: herbivore's enemies react to the whole, not its parts. *PLoS One* 6(7): e21742. doi:10.1371/journal.pone.0021742.

van Wijk M, Bruijn P J A, Sabelis M W (2008). Predatory mite attraction to herbivore-induced plant odors is not a consequence of attraction to individual herbivore-induced plant volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, 34, 791-803.

CAPÍTULO 1

RESPOSTA INATA DE PREDADORES A VOLÁTEIS DE PLANTAS DE TOMATE ATACADAS POR ÁCAROS FITÓFAGOS

Juliana de Oliveira Fonseca¹, Felipe de Lemos¹, Arne Janssen² e Angelo Pallini¹.

¹Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil

²Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics, Section Population Biology, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands.

RESUMO

As plantas se defendem do ataque de herbívoros através da combinação de defesas constitutivas e induzidas que reduzem a propagação do dano. O ataque de ácaros fitófagos às plantas pode induzir a produção de compostos voláteis, os quais podem atrair os inimigos naturais desses herbívoros. Em um olfatômetro de tubo em “Y”, foram investigadas as respostas dos predadores *Phytoseiulus longipes*, *Phytoseiulus macropilis* e *Cycloneda sanguinea*, aos voláteis de plantas de tomate infestadas ou não com *Tetranychus evansi* e *Tetranychus urticae*. O objetivo foi verificar se estes predadores são capazes de discriminar entre as fontes de odores produzidas pelo complexo planta-herbívoro. Os resultados obtidos mostraram que os inimigos naturais testados são capazes de discriminar entre odores de plantas infestadas e não infestadas, mostrando uma maior atratividade para plantas infestadas. Porém, quando dada à escolha entre plantas infestadas com *T. evansi* e plantas infestadas com *T. urticae*, os mesmos predadores não são capazes de discriminar entre as duas fontes de odores produzidas. As implicações das respostas obtidas no olfatômetro para explicar este comportamento de preferência e não preferência dos predadores são discutidas.

Palavras chave: Defesa induzida da planta, resposta inata, voláteis, *Tetranychus evansi*, *Tetranychus urticae*, *Phytoseiulus longipes*, *Phytoseiulus macropilis*, *Cycloneda sanguinea*.

CHAPTER 1

INNATE RESPONSE OF PREDATORS TO TOMATO PLANTS VOLATILE ATTACKED BY PHYTOPHAGOUS MITES

ABSTRACT

Plants defend themselves against herbivore attacks by a combination of constitutive and induced defenses, which reduce the damage caused. The attack of plants by phytophagous mites may induce the production of volatile compounds, which can attract the natural enemies of herbivores. Using a Y-tube olfactometer, we investigated the responses of the predators *Phytoseiulus longipes*, *Phytoseiulus macropilis* and *Cycloneda sanguinea* to volatiles of tomato plants infested or not infested with *Tetranychus evansi* and *Tetranychus urticae*, in order to verify whether these predators are able to discriminate between sources of odors produced by the plant-herbivore complex. The results showed that the natural enemies tested were able to discriminate between odors of infested and uninfested plants, showing more attraction towards infested plants. However, when given the choice between plants infested with *T. evansi* and plants infested with *T. urticae*, the predators were not able to discriminate between the two sources of odors produced. The results obtained in the olfactometer tests are discussed.

Key Words: Induced plant defense, innate response, volatile, *Tetranychus evansi*, *Tetranychus urticae*, *Phytoseiulus longipes*, *Phytoseiulus macropilis*, *Cycloneda sanguinea*.

INTRODUÇÃO

As plantas se protegem contra o ataque de herbívoros através da combinação de defesas constitutivas e induzidas que reduzem o desempenho dos herbívoros e, conseqüentemente, interrompem a propagação do dano. Essas duas formas de defesa são cruciais para as plantas se defenderem contra pragas não patogênicas, como insetos e ácaros (Karban & Baldwin, 1997; Kant *et al.*, 2004; Kant, 2006).

As defesas induzidas são aquelas que se tornam evidentes somente após o ataque do herbívoro (Karban & Baldwin, 1997). Esta pode ser definida como uma mudança fisiológica na qualidade da planta, que é resultado de um dano causado pelo herbívoro e tem um efeito negativo no desempenho deste organismo na planta (Karban & Baldwin, 1997). Esse mecanismo de defesa pode atuar através da produção pela planta de compostos químicos do metabolismo secundário que vão afetar diretamente o herbívoro (Agrawal *et al.*, 2002). Ou atuam indiretamente, através da produção de compostos voláteis que servem como indicadores aos inimigos naturais de herbívoros na localização das plantas com suas presas (Dicke *et al.*, 1998; Agrawal *et al.*, 2002).

Diante disso, sabe-se que é importante conhecer bem as interações tritróficas existentes entre os organismos que compõem a teia alimentar formada no agroecossistema (Janssen *et al.*, 1998). Varias revisões já foram feitas a respeito dessas interações e vem sendo estudadas em diferentes organismos e ecossistemas (Dicke *et al.*, 1993; Dicke *et al.*, 1998; De Moraes *et al.*, 1998; Sabelis *et al.*, 1999; van Wijk *et al.*, 2008; Sznajder *et al.*, 2011; van Wijk *et al.*, 2011). Em todas essas revisões, a ideia expressa é de que as plantas e os inimigos naturais cooperam-se: as plantas auxiliam os inimigos naturais facilitando o seu acesso às presas/hospedeiro e os inimigos naturais livram estas de seus herbívoros.

O ácaro-vermelho *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae) e o ácaro rajado *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) são pragas comumente encontradas em cultivos de tomate (Gallo *et al.*, 2002). O ataque desses ácaros às plantas pode induzir a produção de voláteis, que por sua vez pode atrair os inimigos naturais desses herbívoros (Dicke *et al.*, 1998, Sarmiento *et al.*, 2011). Algumas espécies de predadores têm sido reportadas em associação com *T. evansi* e *T. urticae* em cultivos de tomate como os ácaros *Phytoseiulus longipes* e *Phytoseiulus macropilis* e o coccinelídeo *Cycloneda sanguinea* (de Moraes & McMurtry, 1985; Oliveira *et al.*, 2005; Rosa *et al.*, 2005; Furtado *et al.*, 2007).

Sabe-se que *P. longipes* se desenvolve bem se alimentando das duas espécies de ácaros fitófagos (Furtado *et al.*, 2007). Já *P. macropilis*, se desenvolve bem em uma dieta com *T. urticae*, mas não tem um bom desenvolvimento em uma dieta com *T. evansi* (Moraes & McMurtry, 1985). Quanto a *C. sanguinea*, que é um predador generalista, se alimenta destes dois ácaros fitófagos, porém somente como uma presa alternativa (Oliveira *et al.*, 2005).

Recentemente foi descoberto que o ácaro-vermelho do tomateiro *T. evansi* é capaz de manipular a planta através da eliminação da indução de compostos de defesa, desarmando o sistema de defesa induzido direto das plantas. (Sarmiento *et al.*, 2011). Quanto à defesa indireta, foi observado que dois compostos voláteis foram emitidos por plantas infestadas com *T. urticae* em quantidades muito superiores quando comparado a plantas limpas: TMTT e β -mirceno. Já a emissão desses compostos voláteis de plantas atacadas por *T. evansi* não foi diferente de plantas limpas (Sarmiento *et al.*, 2011).

O principal objetivo deste trabalho foi verificar se estes predadores são capazes de discriminar entre os voláteis produzidos por plantas de tomate atacadas

por *T. evansi* e *T. urticae*. Para isso foram investigadas as respostas dos predadores *P. longipes*, *P. macropilis* e *C. sanguinea* aos voláteis de plantas de tomate infestadas ou não com *T. evansi* e *T. urticae*. A hipótese é que os predadores testados neste trabalho possam discriminar entre as fontes de odores produzidas por plantas infestadas com *T. evansi* e plantas infestadas com *T. urticae*.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção das plantas de tomate

Sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) da variedade Santa Clara I-5300 foram semanalmente semeadas em uma casa de vegetação. Estas foram semeadas em bandejas de isopor (8 x 16 células) utilizando um substrato comercial para mudas (Bioplant®, Bioplant Misturadora Agrícola LTDA), sendo mantidas em casa de vegetação e regadas diariamente até atingirem a idade para o transplântio. Ao atingir os 20 dias de semeadura, as mudas foram então transplantadas para vasos plásticos de 2 L contendo o mesmo substrato para mudas utilizado na semeadura. Feito isso, elas foram acondicionadas dentro de gaiolas (1,0 x 1,0 x 4,0 m) com estrutura feita de canos de PVC e revestida por tecido de organza. Semanalmente, foi realizada uma fertirrigação com uma mistura de 30 g de superfosfato simples e 30 g de NPK (20-5-20), misturados a 15 L de água. A solução nutritiva foi então usada para a adubação via solo das plantas adultas. As plantas foram fornecidas para a criação dos ácaros ou para a realização dos experimentos, onde foram utilizadas plantas de mesma idade fenológica e com 4 folhas perfeitamente desenvolvidas.

Criação dos ácaros fitófagos

Os ácaros fitófagos *Tetranychus evansi* e *Tetranychus urticae*, obtidos em 2002 em casa de vegetação na Universidade Federal de Viçosa, foram transferidos para folhas de tomate da criação. As folhas com os ácaros foram acondicionadas com seu pecíolo dentro de tubos de acrílico (3 cm de Ø por 10 cm de altura) contendo água. Os tubos juntamente com as folhas já infestadas foram colocados em bandejas plásticas (40 x 20 x 10 cm), contendo uma mistura de água e detergente para evitar que as folhas fossem contaminadas com outras espécies de fitófagos. As bandejas foram colocadas em estantes dentro de uma sala de criação com fotoperíodo controlado (12:12, L:E) e foram devidamente identificadas. As criações de *T. evansi* e *T. urticae* foram usadas para o fornecimento de indivíduos para a realização dos experimentos e para a manutenção da criação massal.

Criação dos ácaros predadores

Para a criação dos ácaros *Phytoseiulus longipes* e *Phytoseiulus macropilis* foram fornecidas a estes predadores folhas de tomate infestadas com o ácaro vermelho *Tetranychus evansi* e com o ácaro rajado *Tetranychus urticae*, respectivamente. Para isso, a criação destes predadores se deu de forma semelhante à dos fitófagos. As folhas com os ácaros foram colocadas em tubos de acrílico (3 cm de Ø por 10 cm de altura) sobre bandejas plásticas (40 x 20 x 10 cm), contendo uma mistura de água e detergente. A diferença foi que aos ácaros predadores foram oferecidas folhas de tomate infestadas provenientes das criações dos ácaros fitófagos *T. evansi* e *T. urticae*.

Criação de *Cycloneda sanguinea*

Adultos de *C. sanguinea* foram coletados em uma área experimental localizada no campus da Universidade Federal de Viçosa e levados ao laboratório, sendo mantidas as condições de temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade de $70\pm 10\%$ UR. Os adultos foram colocados em potes plásticos de 500 mL, nos quais a tampa continha uma abertura central revestida com organza. Em cada pote, contendo três casais, eram fornecidos para a sua alimentação, pulgões da espécie *Macrosiphum euphorbiae* também coletados na mesma área experimental. Os ovos de *C. sanguinea* depositados no interior dos potes foram retirados e transferidos para tubos de acrílico (3 cm de Ø por 10 cm de altura) onde foram mantidos até a eclosão das larvas. Em seguida, estas foram individualizadas e separadas por idade, a fim de padronizar os indivíduos. As larvas foram alimentadas por pulgões e mantidas também em tubos de acrílico onde permaneceram até alcançar a fase adulta.

Experimento de olfatômetro

A preferência dos ácaros predadores *Phytoseiulus longipes* e *Phytoseiulus macropilis* e de joaninhas da espécie *Cycloneda sanguinea* foi testada oferecendo-se aos animais testes odores de plantas infestadas com *Tetranychus evansi*, *Tetranychus urticae* e plantas limpas.

Para testar esta preferência foi utilizado um olfatômetro de tubo em “Y” (Pallini *et al.*, 1997; Janssen, 1999) para estudar a resposta das fêmeas adultas dos predadores às diferentes fontes de odores. O olfatômetro consiste de um tubo de vidro em forma de “Y” com um arame acoplado por dentro do vidro para facilitar o caminhamento dos predadores. Em cada braço (lado) do olfatômetro foi conectado, por meio de mangueiras de plástico escuras, um recipiente de vidro (50 x 36 x 43

cm) onde foram colocadas as fontes de odores: um conjunto com 3 plantas, infestadas sete dias antes dos testes, com *T. evansi* ou *T. urticae* com aproximadamente 300 indivíduos por folha ou não foram infestadas (controle). Os recipientes foram fechados com as tampas de vidro, com o objetivo de fechar o sistema, evitando com isso a passagem de ar por frestas. Uma bomba de vácuo foi conectada à base do olfatômetro para formar uma corrente de ar para que pudesse conduzir os voláteis das fontes de odores para dentro do olfatômetro. A velocidade da corrente de ar em cada braço foi medida por meio de um anemômetro (VelociCalc®, Modelo: 9545-A) e essa velocidade era a mesma nos dois braços do olfatômetro (0,45 m/s). As velocidades foram testadas previamente, visando obter a melhor resposta dos artrópodes na tomada de decisão.

Os ácaros predadores foram deixados por aproximadamente 3 horas sem alimento antes dos testes e as joaninhas por 24 horas, e testados individualmente. Cada predador foi liberado na extremidade basal do olfatômetro de forma a caminhar contra a corrente de ar formada em direção às fontes de voláteis. Ao atingirem a junção do tubo, os predadores respondiam por uma das fontes. O teste era terminado quando cada predador atingia o extremo final do braço escolhido.

Para o predador *P. longipes* foram testadas as seguintes combinações de odores: (i) plantas de tomate limpas x plantas de tomate infestadas com *T. evansi*; (ii) plantas de tomate limpas x plantas de tomate infestadas com *T. urticae*; (iii) plantas de tomate infestadas com *T. evansi* x plantas de tomate infestadas com *T. urticae*. Para o predador *P. macropilis* foi testado: (i) plantas infestadas com *T. evansi* x plantas infestadas com *T. urticae*. Neste trabalho não foi testada a combinação de odores provenientes de plantas limpas x plantas infestadas, pois este resultado já é conhecido (Sarmiento, 2011). Para o predador *C. sanguinea* foram testadas as

seguintes combinações: (i) plantas limpas x plantas infestadas com *T. urticae*; (ii) plantas infestadas com *T. evansi* x plantas infestadas com *T. urticae*. Neste trabalho também não foi testada a combinação de odores de plantas limpas x plantas infestadas com *T. evansi*, pois este resultado já é conhecido (Sarmiento *et al.*, 2008).

Em cada experimento foram feitas três repetições e com cada repetição foram utilizados diferentes grupos de plantas e artrópodes. Foram testados 20 predadores por repetição, totalizando 60 insetos por tratamento. A cada cinco animais testados, as fontes de odores eram trocadas de posição nos braços do olfatômetro, em função de possíveis interferências do meio ambiente. Foi tolerado um prazo de até cinco minutos para a escolha de cada predador pelas fontes de odores. Não havendo escolha após este tempo, o resultado em questão era eliminado.

Os dados foram analisados usando o Modelo Linear Generalizado (GLM) com erros do tipo Poisson (Crawley, 2007).

RESULTADOS

Plantas limpas x plantas infestadas com *Tetranychus evansi*

Adultos do ácaro predador *P. longipes* foram significativamente mais atraídos para plantas infestadas com o ácaro vermelho *T. evansi* na análise conjunta das três repetições testadas (GLM: Dev. = 20,5; $P < 0,001$), quando foram dadas plantas limpas como alternativa, (Figura 1). Não houve diferença significativa entre o número de ácaros predadores que se moveu para o lado direito ou para o lado esquerdo do olfatômetro em nenhuma das repetições (GLM: Dev. = 0,60; $P = 0,438$), mostrando que o experimento não foi afetado por outros fatores que não os voláteis.

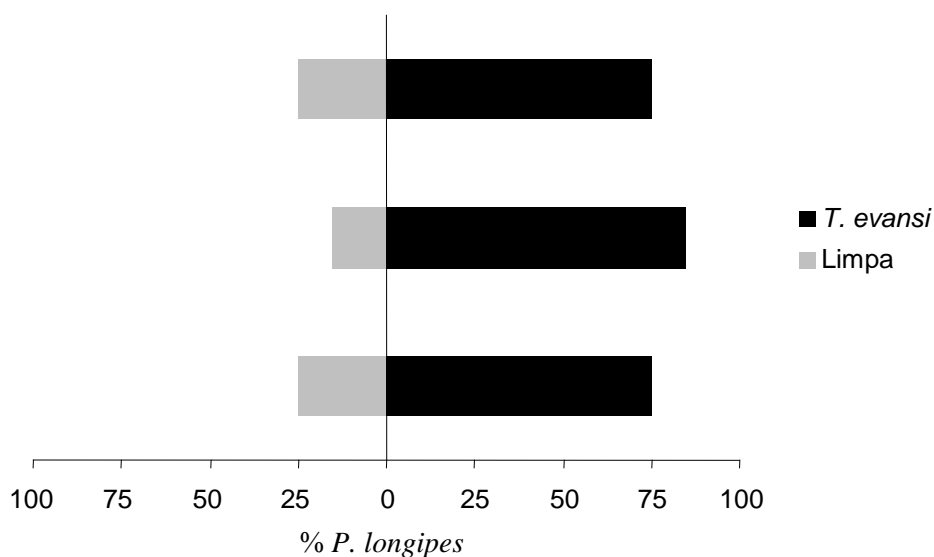


Figura 1: Resposta de fêmeas adultas de *P. longipes* a voláteis de plantas limpas (barras cinzas) x plantas infestadas com *T. evansi* (barras pretas) no olfatômetro. Cada barra representa uma repetição, na qual foram testadas 20 fêmeas do ácaro predador.

Plantas limpas x plantas infestadas com *Tetranychus urticae*

Ao serem testadas plantas limpas x plantas infestadas com *T. urticae*, o ácaro predador *P. longipes* novamente respondeu significativamente para as plantas infestadas nas três repetições (GLM: Dev. = 18,0; $P < 0,001$), (Figura 2). Já o predador *C. sanguinea* mostrou maior atratividade para plantas infestadas em duas das três repetições. Porém na análise conjunta das três repetições houve diferença significativa entre as fontes de odores (GLM: Dev. = 18,0; $P < 0,001$), mostrando uma preferência para as plantas infestadas (Figura 3).

Neste experimento também não houve diferença significativa entre o número de ácaros predadores que se moveu para o lado direito ou para o lado esquerdo do olfatômetro (GLM: Dev. = 0,27; $P = 0,605$). Também não houve diferença significativa no número de joaninhas da espécie *C. sanguinea* que se moveu para cada lado do olfatômetro (GLM: Dev. = 1,07; $P = 0,301$). Isso mostra novamente que o experimento não foi afetado por outros fatores que não os voláteis.

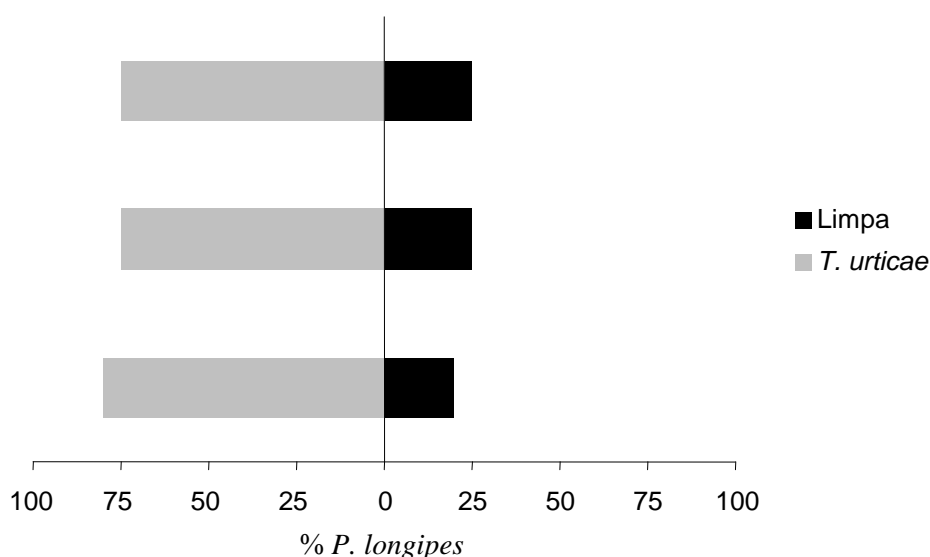


Figura 2: Resposta de fêmeas adultas de *P. longipes* a voláteis de plantas limpas (barras pretas) x plantas infestadas com *T. urticae* (barras cinzas) no olfatômetro. Cada barra representa uma repetição, na qual foram testadas 20 fêmeas do ácaro predador.

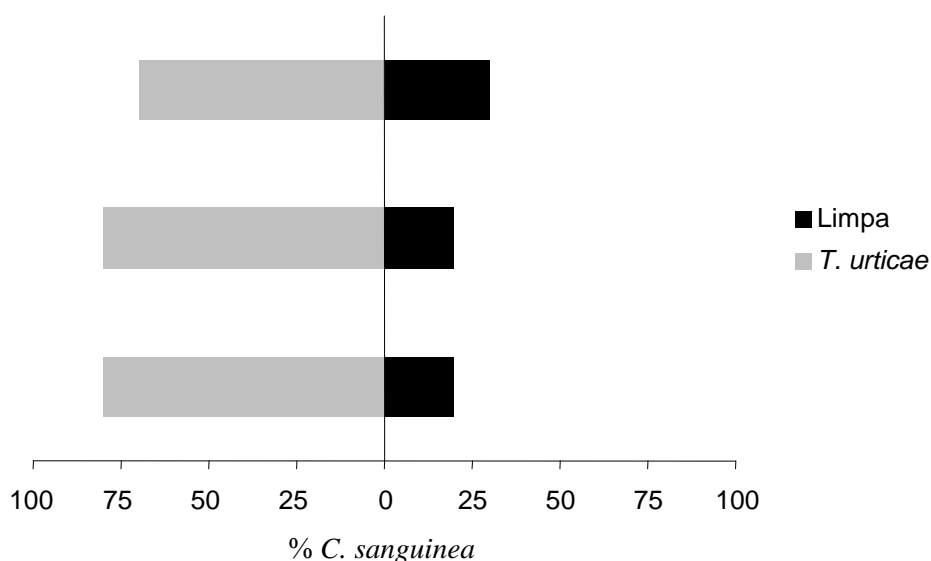


Figura 3: Resposta de fêmeas adultas de *C. sanguinea* a voláteis de plantas limpas (barras pretas) x plantas infestadas com *T. urticae* (barras cinzas) no olfatômetro. Cada barra representa uma repetição, na qual foram testadas 20 fêmeas do predador.

Plantas infestadas com *Tetranychus evansi* x plantas infestadas com *Tetranychus urticae*

Quando testadas plantas infestadas com *T. evansi* x plantas infestadas com *T. urticae*, o ácaro predador *P. longipes* não demonstrou preferência significativa para as fontes de odores oferecidas em nenhuma das três repetições (GLM: Dev. = 0,27; P = 0,605), (Figura 4). O ácaro predador *P. macropilis* também não mostrou preferência significativa entre as fontes de odores na análise conjunta das quatro repetições testadas (GLM: Dev. = 0,45; P = 0,502), (Figura 5). O mesmo aconteceu ao testar o predador *C. sanguinea*, que também não teve uma resposta significativa por nenhuma das duas fontes de odores, novamente nas três repetições realizadas (GLM: Dev. = 2,42, P = 0,120), (Figura 6). Em ambos os experimentos, novamente não foram constatadas diferenças significativas entre o número de ácaros predadores que se moveram para o lado direito ou esquerdo do olfatômetro em nenhuma

repetição (GLM: Dev. = 1,07; P = 0,301; Dev. = 1,25; P = 0,263). Também não houve diferença significativa no número de joaninhas que se moveu para cada lado do olfatômetro (GLM: Dev. = 1,07; P = 0,301), mostrando mais uma vez que o experimento não foi afetado por outros fatores que não os voláteis.

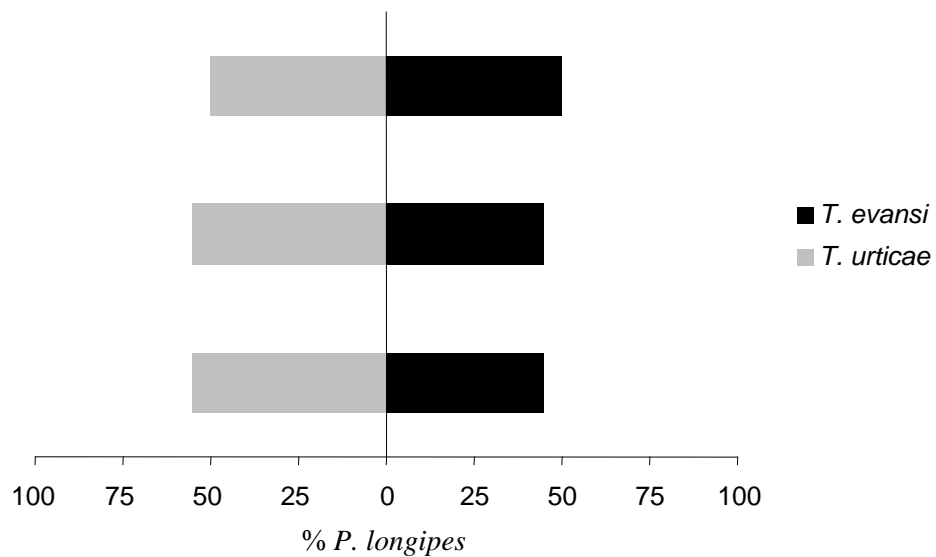


Figura 4: Resposta de fêmeas adultas de *P. longipes* a voláteis de plantas infestadas com *T. evansi* (barras pretas) x plantas infestadas com *T. urticae* (barras cinzas) no olfatômetro. Cada barra representa uma repetição, na qual foram testadas 20 fêmeas do ácaro predador.

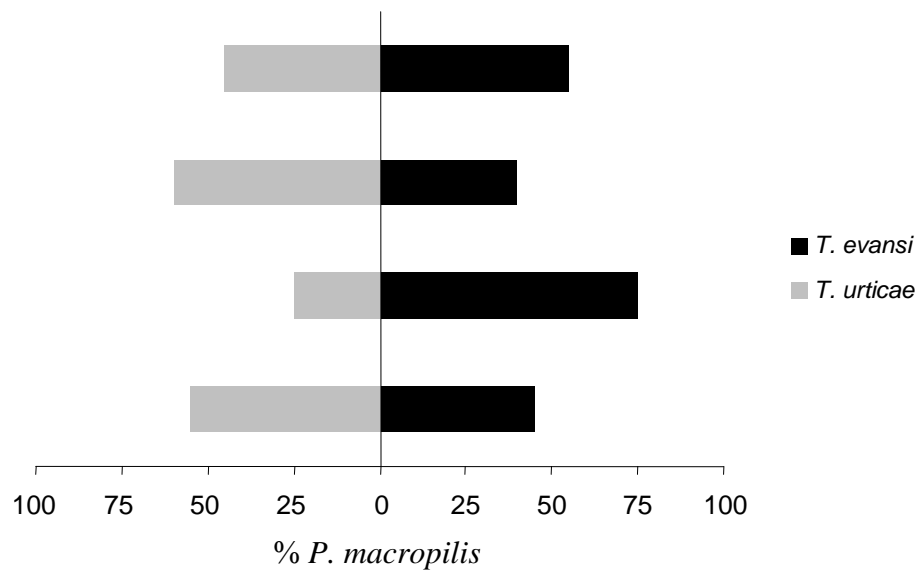


Figura 5: Resposta de fêmeas adultas de *P. macropilis* a voláteis de plantas infestadas com *T. evansi* (barras pretas) x plantas infestadas com *T. urticae* (barras cinzas) no olfatômetro. Cada barra representa uma repetição, na qual foram testadas 20 fêmeas do ácaro predador.

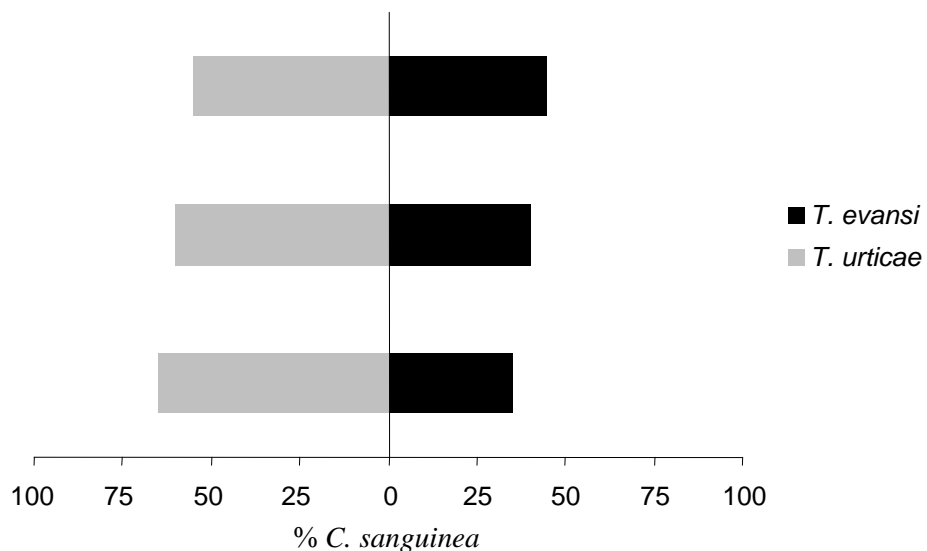


Figura 6: Resposta de fêmeas adultas de *C. sanguinea* a voláteis de plantas infestadas com *T. evansi* (barras pretas) x plantas infestadas com *T. urticae* (barras cinzas) no olfatômetro. Cada barra representa uma repetição, na qual foram testadas 20 fêmeas do predador.

DISCUSSÃO

Plantas sob o ataque de herbívoros são capazes de iniciar uma defesa indireta sintetizando e liberando misturas complexas de substâncias voláteis que atraem os inimigos naturais desses herbívoros (Zhang *et al.*, 2009; Sznajder *et al.*, 2011). Vários estudos têm fornecido evidências desta atração de predadores pelos voláteis de plantas sob ataque (Dicke *et al.*, 1993; Janssen, 1999; Venzon *et al.*, 1999; Kessler & Baldwin, 2001; Dicke *et al.*, 2003; Arimura *et al.*, 2005; Moayeri *et al.*, 2007), incluindo em plantas de tomate (Takabayashi *et al.*, 2000; Kant *et al.*, 2004).

Neste trabalho, os resultados obtidos indicam que o predador *Phytoseiulus longipes* mostra uma preferência significativa a odores de plantas de tomate infestadas com *T. evansi* ou *T. urticae* a odores de plantas limpas (Figuras 1 e 2). O predador *Cycloneda sanguinea* também mostra maior atratividade a odores de plantas infestadas com *T. urticae* a plantas limpas (Figura 3). É conhecido que *C. sanguinea* também demonstra uma preferência significativa a odores de plantas infestadas com *T. evansi* em relação a odores de plantas limpas (Sarmiento *et al.*, 2008). O mesmo acontece quando é testada a resposta de *P. macropilis* a odores de plantas infestadas com *T. evansi* ou *T. urticae* em relação a plantas limpas (Sarmiento, 2011). Resultados semelhantes foram encontrados por Takabayashi *et al.* (2000) que mostraram que o ácaro predador *Phytoseiulus persimilis* apresentou uma maior atratividade por voláteis de plantas de tomate infestadas com *T. urticae* quando voláteis de plantas limpas eram dados como alternativa.

Shimoda *et al.* (2005) demonstraram também que plantas de feijão infestadas com o ácaro rajado *T. urticae* são significativamente mais atrativas às fêmeas do ácaro predador *Neoseiulus californicus* do que plantas limpas. Neste estudo também foi investigado a resposta deste ácaro predador a amostras sintéticas identificadas

como componentes voláteis emitidos a partir de plantas de feijão infestadas com *T. urticae*. Os resultados mostraram uma maior atração de *N. californicus* a cada um dos cinco compostos testados.

Em relação ao tratamento plantas infestadas com *T. evansi* x plantas infestadas com *T. urticae*, observou-se que para todos os predadores testados, não houve preferência significativa para nenhuma das duas fontes de voláteis (Figuras 4, 5 e 6). Estes resultados estão de acordo com os apresentados por Sarmiento *et al.* (2011), onde eles mostraram que o predador *P. longipes* também não mostrou preferência por odores de plantas com *T. urticae* ou *T. evansi*.

Sabe-se que o ácaro-vermelho *Tetranychus evansi* é capaz de suprimir a liberação de produtos voláteis induzidos, os quais estão relacionados com a defesa da planta (Sarmiento *et al.*, 2011). Além do mais, *T. evansi* demonstra uma clara preferência por odores de plantas atacadas por co-específicos em relação a plantas atacadas por *T. urticae*. É possível, portanto, que os voláteis emitidos a partir de plantas infestadas com estes dois ácaros fitófagos sejam diferentes (Sarmiento *et al.*, 2011). Devido a esta informação, era de se esperar que os predadores testados neste trabalho pudessem discriminar entre as duas fontes de odores produzidas.

Para *Cycloneda sanguinea*, uma possível explicação para essa não preferência pode ser pelo fato de que este predador não é capaz de completar o seu ciclo de vida se alimentando somente com o ácaro-vermelho (Oliveira *et al.*, 2005). O mesmo acontece quando este predador tem sua alimentação constituída somente pelo ácaro rajado *T. urticae* (Observações pessoais).

Já para *Phytoseiulus longipes*, Furtado *et al.* (2007) mostraram que este predador se desenvolve bem se alimentando de ambas as espécies dos ácaros fitófagos, podendo explicar essa não preferência por nenhuma das duas fontes de

voláteis. Entretanto, é curioso que quando dada à escolha entre plantas atacadas pelos dois ácaros fitófagos, o predador *P. macropilis* não demonstra preferência por nenhuma dessas plantas. No entanto, este predador se desenvolve bem em uma dieta constituída somente de *T. urticae* e não se desenvolve em uma dieta somente de *T. evansi* (Moraes & McMurtry, 1985).

Diante de todos esses fatos, é possível levantar algumas questões que podem explicar este comportamento de não preferência dos predadores: o perfil volátil de plantas de tomate atacadas por essas duas espécies de herbívoros pode ser muito similar; esses predadores podem usar outros compostos que não o TMTT e o β -mirceno para identificar plantas infestadas; a resposta inata desses predadores pode ocorrer sobre compostos voláteis que não diferem entre plantas infestadas por essas duas espécies de herbívoros, porém a aprendizagem pode ser importante para definir uma mudança no comportamento de busca.

Este estudo evidencia, portanto, que os predadores *P. longipes*, *P. macropilis* e *C. sanguinea* são capazes de discriminar entre voláteis de plantas de tomate infestadas com *T. evansi* ou *T. urticae* e voláteis de plantas limpas. Isso mostra que o complexo planta-herbívoro libera odores atraentes a estes inimigos naturais. Porém, quando dada à escolha entre plantas infestadas com *T. evansi* e plantas infestadas com *T. urticae*, os predadores não são capazes, na situação testada, de discriminar entre as duas fontes de odores produzidas. Diante disso, é necessário que seja feita a identificação dos compostos voláteis produzidos por tomateiro atacados por *T. evansi* e *T. urticae*, os quais possam explicar porque estes predadores não fazem discriminação dos odores produzidos.

REFERÊNCIAS

- Agrawal A A, Janssen A, Bruin J, Posthumus M A & Sabelis M W (2002). An ecological cost of plant defense: attractiveness of bitter cucumber plants to natural enemies of herbivores. *Ecology Letters*, 5:3, 377-385.
- Arimura G I, Kost C, Boland W (2005). Herbivore-induced, indirect plant defences. *Bioch. Bioph Acta* 1734, 91-111.
- Crawley M J (2007). *The R Book*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK.
- De Moraes C M, Lewis W J, Pare P W, Alborn H T & Tumlinson J H (1998). Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature*, 393, 570-573.
- de Moraes G J & McMurtry J A (1985). Comparison of *Tetranychus evansi* and *Tetranychus urticae* [Acari: Tetranychidae] as prey for eight species of Phytoseiidae mites. *Entomophaga*, 30, 393-397.
- Dicke M, De Boer J G, Höfte M, Rocha-Granados M C (2003). Mixed blends of herbivore-induced plant volatiles and foraging success of carnivorous arthropods. *Oikos*, 101, 38-48.
- Dicke M, Takabayashi J, Posthumus M A, Schute C, Krips O E (1998). Plant-phytoseiid interactions mediated by herbivore-induced plant volatiles: variation in production of cues and in responses of predatory mites. *Experimental & Applied Acarology*, 22, 311-333.
- Dicke M, Van Baarlen P, Wessels R & Dijkman H (1993). Herbivory induces systematic production of plant volatiles that attract predators of the herbivore: extraction of endogenous elicitor. *Journal of Chemical Ecology*, 19:3, 581-599.
- Furtado I P, de Moraes G J, Kreiter S, Tixier M S, Knapp M (2007). Potential of a Brazilian population of the predatory mite *Phytoseiulus longipes* as a biological

control agent of *Tetranychus evansi* (Acari: Phytoseiidae: Tetranychidae). *Biological Control*, 42, 139-147.

Gallo D O, Nakano S, Silveira Neto R P L, Carvalho G C, Batista E, Berti Filho J R P, Parra R A, Zucchi S B, Alves J D, Vendramim L C, Marchini J R S, Lopes & Omoto C (2002). *Manual de Entomologia Agrícola*. 2ª ed. São Paulo, FEALQ, 920 p.

Janssen A (1999). Plants with spider-mite prey attract more predatory mites than clean plants under greenhouse conditions. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 90, 191-198.

Janssen A, Pallini A, Venzon M, Sabelis M W (1998). Behaviour and indirect interactions in food webs of plant-inhabiting arthropods. *Experimental & Applied Acarology*, 22, 497-521.

Kant M R (2006). The consequences of herbivore variability for direct and indirect defenses of plants. In, vol. PhD. University of Amsterdam, Amsterdam, p 192.

Kant M R, Ament K, Sabelis M W, Haring M A, Schuurink R C (2004). Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants. *Plant Physiology*, 135, 483-495.

Karban R & Baldwin I T (1997). *Induced responses to herbivory*. Chicago, University of Chicago Press, Chicago, 317 p.

Kessler A & Baldwin I T (2001). Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*, 291, 2141-2144.

Moayeri H R S, Ashouri A, Poll L, Enkegaard A (2007). Olfactory response of a predatory mirid to herbivore induced plant volatiles: multiple herbivory vs. single herbivory. *Journal Applied Entomology*, 131, 326-332.

- Oliveira E E, Oliveira C L, Sarmiento R A, Rezende L M, Fadini M A M (2005). Biological aspects of the predator *Cycloneda sanguinea* Linnaeus, 1763 (Coleoptera: Cocinellidae) fed with *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard, 1960 (Acari: Tetranychidae) and *Macrosiphum euphorbiae* Thomas, 1878 (Homoptera: Aphididae). *Bioscience Journal*, 21, 33-39.
- Pallini A, Janssen A & Sabelis M W (1997). Odour-mediated responses of phytophagous mites to conspecific and heterospecific competitors. *Oecologia*, 110, 179-185.
- Rosa A A, Gondim M G C, Fiaboe K K M, de Moraes G J, Knapp M (2005). Predatory mites associated with *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae) on native solanaceous plants of coastal Pernambuco, State Brazil. *Neotropical Entomology*, 34, 689-692.
- Sabelis M W, Van Baalen M, Bakker F, Bruin J, Drukker B, Egas M, Janssen A, Lesna I, Pels B, Van Rijn P & Scutareanu P (1999). The evolution of direct and indirect plant defense against herbivorous arthropods. In Olf, H., Brown V. K. & Drent R. H. (eds), *Herbivores: between plants and predators*. Oxford, Blackwell Science, 109-166.
- Sarmiento R A, Lemos F, Bleeker P M, Schuurink R C, Pallini A, Oliveira M G A, Lima E R, Kant M, Sabelis M W, Janssen A (2011). A herbivore that manipulates plant defence. *Ecology Letters*, 14, 229-236.
- Sarmiento R (2011). An acarine herbivore interferes with direct and indirect plant defences. University of Amsterdam, 90 p. (Ph.D. Thesis).
- Sarmiento R A, de Lemos F, Dias C R, Pallini A, Venzon M (2008). Infoquímicos induzidos por herbivoria mediando a comunicação entre plantas de tomate e o predador *Cycloneda sanguinea* (Coleoptera: Coccinellidae). *Revista Ceres*, 55(5), 439-444.

- Shimoda T, Ozawa R, Sano K, Yano E, Takabayashi J (2005). The involvement of volatile infochemicals from spider mites and from food-plants in prey location of the generalist predatory mite *Neoseiulus californicus*. *Journal of Chemical Ecology*, 31, 2019-2032.
- Sznajder B, Sabelis M W, Egas M. (2011). Innate responses of the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* to a herbivore-induced plant volatile (2011). *Experimental and Applied acarology*, 54, 125-138.
- Takabayashi J, Shimoda T, Dicke M, Ashihara W, Takafuji A (2000). Induced response of tomato plants to injury by green and red strains of *Tetranychus urticae*. *Experimental & Applied Acarology*, 24, 377-383.
- van Wijk M, Bruijn P J A, Sabelis M W (2011). Complex odor from plants under attack: herbivore's enemies react to the whole, not its parts. *PLoS One* 6(7): e21742. doi:10.1371/journal.pone.0021742.
- van Wijk M, Bruijn P J A, Sabelis M W (2008). Predatory mite attraction to herbivore-induced plant odors is not a consequence of attraction to individual herbivore-induced plant volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, 34, 791-803.
- Venzon M, Janssen A, Sabelis M W (1999). Attraction of a generalist predator towards herbivore-infested plants. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 93, 305-314.
- Zhang P J, Zheng S J, van Loon J J A, Bolland W, David A, Mumm R, Dicke M (2009). Whiteflies interfere with indirect plant defense against spider mites in lima bean. *PNAS*, 106, 50, 21202 - 21207.

CAPÍTULO 2

IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DO TOMATEIRO QUANDO ATACADO POR ÁCAROS FITÓFAGOS

Juliana de Oliveira Fonseca¹, Arne Janssen², Eraldo R. de Lima¹ e Angelo Pallini¹

¹Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil

²Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics, Section Population Biology,
University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands.

RESUMO

Plantas sob o ataque de herbívoros liberam uma variedade de compostos orgânicos voláteis, os quais estão envolvidos na atração dos inimigos naturais desses herbívoros. O conhecimento destes compostos voláteis é extremamente importante para uma melhor compreensão da interação inseto-planta influenciando o terceiro nível trófico. Neste trabalho, foram identificados os compostos voláteis emitidos por plantas de tomate infestadas com o ácaro-vermelho *Tetranychus evansi*, com o ácaro rajado *Tetranychus urticae* e de plantas de tomate limpas. Os compostos foram identificados usando-se o processo de aeração das plantas para a extração dos compostos voláteis e análise por GCMS. Os resultados mostram que ao compararmos plantas infestadas com *T. evansi* ou *T. urticae* e plantas limpas foram encontradas uma quantidade bastante superior de compostos voláteis nas plantas infestadas em relação às plantas limpas. Já quando comparamos plantas infestadas com *T. evansi* e plantas infestadas com *T. urticae*, o perfil de compostos voláteis encontrado foi bastante semelhante entre ambas. Em relação à análise quantitativa, não houve diferenças significativas entre os compostos voláteis emitidos por entre as duas fontes de odores produzidas. As implicações dos resultados encontrados são discutidas.

Palavras chave: Voláteis, tomate, GC-MS, *Tetranychus evansi*, *Tetranychus urticae*

CHAPTER 2

IDENTIFICATION OF TOMATO VOLATILES COMPOUNDS ATTACKED BY PHYTOPHAGOUS MITES

ABSTRACT

Plants under attack by herbivores release a variety of organic volatile compounds, which are involved in the attraction of natural enemies of herbivores. The knowledge of these volatile compounds is extremely important for a better understanding of insect-plant interactions mediating the third trophic level. In this study, we identify the volatiles emitted by tomato plants infested with the red spider mite *Tetranychus evansi*, with the two spotted-spider mite *Tetranychus urticae* and clean tomato plants. The compounds were identified by aeration of the plants and by using a GCMS. The results show that when comparing plants infested with *T. evansi* or *T. urticae* with clean plants it were found a greater amount of volatile compounds from infested plants than from clean plants. When we compared plants infested with *T. evansi* and plants infested with *T. urticae*, the profile of volatile compounds was found to be very similar between the both. Regarding the quantitative analysis, we found no significant differences between the volatile compounds emitted by the two sources of odors produced. It is expected that through these results it is possible to understand how it is the mutualistic interactions between plants and natural enemies in this food web of tomato. The implications of these results are discussed.

Key Words: Volatile, tomato, GC-MS, *Tetranychus evansi*, *Tetranychus urticae*

INTRODUÇÃO

Plantas sob o ataque de herbívoros liberam uma variedade de compostos orgânicos voláteis, os quais estão envolvidos na atração dos inimigos naturais desses herbívoros (Agrawal *et al.*, 2002; Agrawal, 2007; van Wijk *et al.*, 2010; Sznajder *et al.*, 2011; van Wijk *et al.*, 2011). Esses voláteis consistem de uma mistura complexa de compostos induzidos por herbivoria e compostos não induzidos (van Wijk *et al.*, 2010). Inimigos naturais dos herbívoros como ácaros predadores e coccinelídeos, por exemplo, são capazes de explorar esses voláteis para localizar suas presas, usando-os como sinais químicos da presença do alimento (Kessler & Baldwin, 2001; van Wijk *et al.*, 2008; Sarmiento *et al.*, 2007; van Wijk *et al.*, 2010; Sznajder *et al.*, 2011). Predadores podem responder a um ou a alguns dos compostos induzidos por reconhecerem individualmente tais voláteis na mistura ou podem ainda responder à mistura de odores como um todo (van Wijk *et al.*, 2008).

O conhecimento dos compostos químicos que mediam a localização de plantas infestadas com herbívoros pelos inimigos naturais é importante para uma melhor compreensão da interação inseto-planta influenciando o terceiro nível trófico (van Wijk *et al.*, 2008; van Wijk *et al.*, 2011), com aplicações práticas para o controle biológico (Yoneya *et al.*, 2009; van Wijk *et al.*, 2011).

Plantas de tomate sob o ataque de herbívoros como ácaros, por exemplo, produzem um conjunto de compostos voláteis como os terpenos que provavelmente servem como agentes de defesa contra herbívoros, funcionando como uma defesa indireta da planta, atraindo os inimigos naturais (Ament *et al.*, 2004; Bleeker *et al.*, 2009; Ament *et al.*, 2010; Proffit *et al.*, 2011; Copolovici *et al.*, 2012).

Neste trabalho, nós identificamos os compostos voláteis emitidos por plantas de tomate infestadas com o ácaro-vermelho *Tetranychus evansi*, com o ácaro rajado *Tetranychus urticae* e de plantas de tomate limpas.

Foi descoberto recentemente que plantas de tomate atacadas pelo ácaro-vermelho *Tetranychus evansi* promove uma supressão na defesa da planta que em caso contrário é induzida através de duas principais rotas de sinalização bioquímica, as rotas do ácido salicílico e do ácido jasmônico. (Sarmiento *et al.*, 2011). Foi observado que genes responsáveis pela ativação da rota bioquímica do ácido jasmônico e do ácido salicílico (WIPI II, PR-P6 e GGPS1) não são expressos em plantas danificadas por *T. evansi*. Entretanto, em plantas danificadas por outro herbívoro, o ácaro rajado *T. urticae*, ocorre a expressão desses genes após a herbivoria (Sarmiento *et al.*, 2011). Com isso, compostos de defesa direta como inibidores de proteases são reduzidos durante o ataque por *T. evansi* (Sarmiento *et al.*, 2011). Quanto à defesa indireta, foi observado que dois compostos, TMTT e β -mirceno, foram emitidos por plantas infestadas com *T. evansi* em quantidades muito inferiores quando comparado a plantas infestadas com *T. urticae* (Sarmiento *et al.*, 2011).

Entretanto, apesar do desligamento de genes relacionados com o sistema de defesa do tomateiro, as plantas continuam atrativas a ácaros predadores como *Phytoseiulus longipes* e *Phytoseiulus macropilis* e joaninhas da espécie *Cycloneda sanguinea* (Sarmiento *et al.*, 2007; Sarmiento *et al.*, 2008; Sarmiento *et al.*, 2011). Adicionalmente, os mesmos predadores nesta situação testada, não são capazes de discriminar entre voláteis de plantas infestadas com o ácaro-vermelho e com o ácaro rajado *Tetranychus urticae*. Além do mais, é curioso que quando dada a escolha entre plantas de tomate atacadas por *T. evansi* e *T. urticae*, o predador *P. macropilis* não

mostra preferência por nenhuma dessas plantas. No entanto, este predador se desenvolve bem em uma dieta somente com *T. urticae* e não se desenvolve em uma dieta somente de *T. evansi* (Moraes & McMurtry, 1985).

Com base nesses fatos, o principal objetivo deste trabalho foi identificar os compostos voláteis do tomateiro infestado por *T. evansi*, *T. urticae* e plantas limpas. A idéia é que por meio dessa identificação, seja possível explicar o porquê desses predadores não discriminarem entre plantas infestadas entre *T. evansi* e *T. urticae*.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção das plantas de tomate

Sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) da variedade Santa Clara I-5300 foram semanalmente semeadas em uma casa de vegetação. Estas foram semeadas em bandejas de isopor (8 x 16 células) utilizando um substrato comercial para mudas (Bioplant®, Bioplant Misturadora Agrícola LTDA), sendo mantidas em casa de vegetação e regadas diariamente até atingirem a idade para o transplântio. Ao atingir os 20 dias de semeadura, as mudas foram então transplantadas para vasos plásticos de 2 L contendo o mesmo substrato para mudas utilizado na semeadura. Feito isso, elas foram acondicionadas dentro de gaiolas (1,0 x 1,0 x 4,0 m) com estrutura feita de canos de PVC e revestida por tecido de organza. Semanalmente, foi realizada uma fertirrigação com uma mistura de 30 g de superfosfato simples e 30 g de NPK (20-5-20), misturados a 15 L de água. A solução nutritiva foi então usada para a adubação via solo das plantas adultas. As plantas foram fornecidas para a criação dos ácaros ou para a realização dos experimentos, onde foram utilizadas plantas de mesma idade fenológica e com 4 folhas perfeitamente desenvolvidas.

Criação dos ácaros fitófagos

Os ácaros fitófagos *Tetranychus evansi* e *Tetranychus urticae*, obtidos em 2002 em casa de vegetação na Universidade Federal de Viçosa, foram transferidos para folhas de tomate da criação. As folhas com os ácaros foram acondicionadas com seu pecíolo dentro de tubos de acrílico (3 cm de Ø por 10 cm de altura) contendo água. Os tubos juntamente com as folhas já infestadas foram colocados em bandejas plásticas (40 x 20 x 10 cm), contendo uma mistura de água e detergente para evitar que as folhas fossem contaminadas com outras espécies de fitófagos. As bandejas foram colocadas em estantes dentro de uma sala de criação com fotoperíodo controlado (12:12, L:E) e foram devidamente identificadas. As criações de *T. evansi* e *T. urticae* foram usadas para o fornecimento de indivíduos para a realização dos experimentos e para a manutenção da criação massal.

Extração dos compostos voláteis liberados por tomateiro infestado com *Tetranychus evansi*, *Tetranychus urticae* e plantas limpas

Para a extração dos compostos voláteis do tomateiro infestado com *Tetranychus evansi*, *Tetranychus urticae* e plantas limpas foram feitas as aerações das plantas. Para isso, plantas de tomate de mesma idade fenológica e com 4 folhas perfeitamente desenvolvidas foram infestadas com *T. evansi* ou *T. urticae* com aproximadamente 300 ácaros por folha, que permaneceram incubados por um período de sete dias, ou não foram infestadas (plantas limpas). Essas plantas foram mantidas dentro de gaiolas feitas com estrutura de madeira e revestidas com organza (1,0 x 0,7 x 0,7 m) em casa de vegetação para evitar a infestação com outros artrópodes. Após os sete dias de infestação, foi testada a atratividade das plantas em um olfatômetro de tubo em Y, utilizando os predadores *Phytoseiulus longipes*,

Phytoseiulus macropilis e *Cycloneda sanguinea*. Após os testes no olfatômetro, as plantas foram levadas para uma sala e acondicionadas em câmpulas de vidro, para que pudesse ser feita a aeração.

Foram conectados a estas câmpulas de vidro, os filtros de carvão ativado para a limpeza do ar que entra nos tubos e os filtros de resina Super Q (80/100 mesh; Alltech, Deerfield, IL, USA), onde os compostos orgânicos voláteis ficaram adsorvidos. A aeração foi feita com o auxílio de um compressor que empurra o ar fazendo com que este passe pelo filtro de carvão ativado, e de uma bomba de vácuo que faz a sucção deste ar passando pelas plantas dentro das câmpulas. Este processo permite que ocorra o carreamento dos compostos voláteis que ficaram adsorvidos à resina Super Q no filtro de saída. A aeração das plantas foi realizada com diferentes tempos, tendo no mínimo 17 horas de aeração, utilizando-se um fluxo de ar de 150 mL/min. Todo o material de vidro utilizado foi aquecido a 280 °C durante 8 horas antes da utilização. Após a aeração, o compressor e a bomba a vácuo foram desligados e os compostos orgânicos voláteis foram extraídos dos filtros de resina Super Q com a lavagem dos mesmos com 400 µL de n-hexano (Sigma Aldrich, USA), coletados com um tubo de vidro e armazenados em freezer a -20 °C.

Identificação dos compostos voláteis

Para a identificação dos compostos, inicialmente o volume das amostras foi reduzido a 5 – 10 µl, à temperatura ambiente em vidros de Francke-vials e foi adicionado a essas amostras um padrão interno (n-heptil acetato). Este padrão interno é conhecido por ser separável dos demais compostos e não estar presente na amostra, servindo como um parâmetro de comparação.

As amostras diluídas em hexano foram então analisadas em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa (GC-MS, Shimadzu, Modelo QP2010), por meio da injeção manual de 1 µl do extraído de hexano. O GC-MS utilizado está equipado com uma coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) revestida com Rtx-5MS (df = 0,25 µm; J & W Scientific Folsom, CA, USA), utilizando o hélio como gás carreador (1 mL/min.). A temperatura da coluna iniciou-se a 35° C, permanecendo por 5 minutos, elevou-se a uma taxa de 8° C/min., até atingir 280° C, permanecendo por mais 5 minutos, totalizando um tempo de análise de 40,63 min. As análises foram realizadas em modo splitless.

Os dados foram analisados pelo programa GCMS solutions (Shimadzu Corporation) e a identificação baseou-se na comparação dos espectros de massa de cada composto com o banco de dados das bibliotecas NIST08 MS e Wiley. Com os tempos de retenção dos compostos e dos padrões de hidrocarbonetos (C7 – C30), foram calculados os índices de Kovats (KI). A partir dessas informações, foram identificados os compostos das amostras tendo como base os índices de Kovats tabelados por Adams (2007). A identificação de alguns compostos foi confirmada por comparação com os espectros de massa e tempos de retenção de padrões injetados.

Para uma análise quantitativa dos compostos, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) com cada variável resposta sendo analisada separadamente (Crawley, 2007).

RESULTADOS

Foram encontrados um total de 25 compostos voláteis com a aeração das plantas limpas e plantas infestadas com *Tetranychus evansi* e *Tetranychus urticae* (Tabela 1). Nas plantas com *T. evansi* foram encontrados 23 compostos voláteis, dos quais 16 foram identificados e 7 não identificados. Nas plantas com *T. urticae* foram encontrados 25 compostos, sendo 17 compostos identificados e 8 não identificados. Já nas plantas limpas foram encontrados apenas 7 compostos voláteis, dos quais todos foram identificados (Tabela 1).

Com relação à análise quantitativa, foi feita uma ANOVA para cada composto com o objetivo de se verificar diferenças na concentração dos compostos voláteis entre plantas infestadas com *T. evansi* e *T. urticae*. Não foram encontradas diferenças significativas na análise de cada composto separadamente, com todos os valores de $P > 0,05$. Não houve também diferenças significativas entre cada composto de plantas infestadas com o ácaro-vermelho e com o ácaro rajado.

Tabela 1: Análise da produção de voláteis de plantas de tomate limpas, plantas de tomate infestadas com *Tetranychus urticae* e plantas infestadas com *Tetranychus evansi*. Média e desvio padrão das concentrações dos compostos voláteis nas plantas por hora de aeração em (ng/μL).

Compostos	KI ^c	Planta Limpa (n ^d = 1) Conc. (ng/μL/h)	Planta com <i>T. evansi</i> (n = 4) Conc. (ng/μL/h)	Planta com <i>T. urticae</i> (n = 4) Conc. (ng/μL/h)
Monoterpenos				
α-Pinene ^{a b}	939	-	0,018 ± 0,004	0,039 ± 0,012
β-Pinene ^{a b}	979	-	0,002 ± 0,018	0,006 ± 0,050
2-Carene ^{a b}	1002	0,015	0,164 ± 0,095	0,314 ± 0,435
α-Phellandrene ^{a b}	1002	-	0,062 ± 0,040	0,080 ± 0,103
α-Terpinene ^{a b}	1017	-	0,014 ± 0,012	0,026 ± 0,038
β-Phellandrene ^{a b}	1029	0,431	0,939 ± 0,552	1,464 ± 1,779
Sesquiterpenos				
α-Copaene ^{a b}	1376	0,042	0,047 ± 0,039	0,050 ± 0,052
β-Caryophyllene ^{a b}	1428	-	0,082 ± 0,031	0,121 ± 0,129

Tabela 1: Continuação

Compostos	KI^c	Planta Limpa (n=1) Conc. (ng/μL/h)	Planta com <i>T. evansi</i> (n = 4) Conc. (ng/μL/h)	Planta com <i>T. urticae</i> (n = 4) Conc. (ng/μL/h)
Hidrocarbonetos				
Mesitylene ^b	995	0,039	0,142 ± 0,223	0,144 ± 0,240
Pseudocumene ^b	1025	-	0,034 ± 0,068	0,051 ± 0,103
Indane ^b	1048	-	0,019 ± 0,038	0,028 ± 0,056
Não Identificado 1	-	-	0,122 ± 0,151	0,899 ± 1,400
Não Identificado 2	-	-	0,047 ± 0,094	0,015 ± 0,030
Não Identificado 3	-	-	0,025 ± 0,050	0,026 ± 0,053
Não Identificado 4	-	-	0,039 ± 0,078	0,069 ± 0,139
Não Identificado 5	-	-	0,050 ± 0,100	0,072 ± 0,144
Não Identificado 6	-	-	0,024 ± 0,049	0,063 ± 0,126
Não Identificado 7	-	-	-	0,061 ± 0,122
Não Identificado 8	-	-	0,046 ± 0,092	0,043 ± 0,087

Tabela 1: Continuação

Compostos	KI ^c	Planta Limpa (n=1) Conc. (ng/μL/h)	Planta com <i>T. evansi</i> (n = 4) Conc. (ng/μL/h)	Planta com <i>T. urticae</i> (n = 4) Conc. (ng/μL/h)
Cetonas				
6-Methyl-5-Hepten-2-one ^{a b}	985	-	0,024 ± 0,027	0,020 ± 0,039
2-Undecanone ^b	1294	-	0,044 ± 0,056	0,035 ± 0,070
2-Tridecanone ^b	1496	0,485	0,631 ± 0,723	0,352 ± 0,591
Aldeídos				
n-Nonanal ^{a b}	1100	0,111	0,150 ± 0,181	0,212 ± 0,278
n-Decanal ^{a b}	1201	0,112	0,139 ± 0,165	0,181 ± 0,248
Álcool				
Geranyl Linalool ^b	2027	-	-	0,035 ± 0,071

^a Identificação de acordo com os tempos de retenção e espectros de massa, em comparação com os padrões.

^b Identificação de acordo com os espectros de massa e índices de Kovats (KI) em comparação com as bibliotecas de referência e comparação do KI em colunas semelhantes.

^c Índice de Kovats.

^d Número de plantas.

DISCUSSÃO

Neste trabalho, podemos observar que existe uma diferença no perfil de compostos voláteis emitidos por plantas de tomate limpas e plantas infestadas por *T. evansi* ou *T. urticae*. As plantas infestadas pelos ácaros fitófagos emitiram um maior número de compostos químicos voláteis em relação às plantas limpas. Foram encontrados e identificados 7 compostos voláteis nas plantas limpas enquanto que nas plantas infestadas com *T. evansi* foram observados a produção de 23 compostos (Tabela 1). Já nas plantas infestadas com *T. urticae*, foram encontrados 25 compostos químicos que compõem a mistura de compostos voláteis dessas plantas (Tabela 1). Dentre os compostos químicos que compõem a mistura de voláteis das plantas infestadas tanto por *T. evansi* quanto por *T. urticae*, 7 também estão presentes nas plantas limpas. Estes resultados mostram que existe uma diferença grande no perfil de compostos voláteis emitidos por plantas limpas e plantas infestadas tanto por *T. evansi* quanto por *T. urticae*.

Em resposta ao ataque de herbívoros, as plantas liberam uma mistura de compostos orgânicos voláteis, os quais têm sido interpretados como sinais das plantas aos inimigos naturais dos herbívoros (Allison & Hare, 2009). Muitos estudos têm sido realizados com relação à identificação destes compostos voláteis (Bleeker *et al.*, 2009; Proffitt *et al.*, 2011; Copolovici *et al.*, 2012), visando o melhor entendimento do complexo planta-herbívoro na atração dos inimigos naturais (van Wijk *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; van Wijk *et al.*, 2010; Sznajder *et al.*, 2011; van Wijk *et al.*, 2011). Os resultados obtidos aqui podem explicar a maior atração dos predadores *Phytoseiulus longipes*, *Phytoseiulus macropilis* e *Cycloneda sanguinea* a odores de plantas infestadas com o ácaro-vermelho ou com o ácaro rajado a plantas limpas.

Resposta semelhante foi encontrada por Sarmento *et al.* (2011), onde foi observado que voláteis de plantas de tomate atacadas por *T. evansi* são atrativos para os ácaros predadores *P. longipes* e *P. macropilis* em relação a voláteis de plantas não infestadas.

Kant *et al.* (2004) mostraram também que o aumento na produção de compostos voláteis de plantas de tomate infestadas com *T. urticae* coincidiu com a preferência crescente do ácaro predador *Phytoseiulus persimilis* para plantas infestadas a plantas limpas.

O TMTT é um dos principais voláteis produzidos por tomates infestados com ácaros, e também pode ser um dos principais compostos na formação de misturas reconhecíveis pelos inimigos naturais (Kant *et al.*, 2004). Vários autores têm relatado a presença deste composto em plantas quando atacadas por ácaros fitófagos (Maeda & Takabayashi, 2001; Kant *et al.*, 2004; van Wijk *et al.*, 2008; van Wijk *et al.*, 2010; Sarmento *et al.*, 2011). No entanto, este composto não foi identificado em nenhuma das amostras usadas neste trabalho. Por outro lado, alguns compostos identificados neste estudo, como os monoterpenos e sesquiterpenos, tem sido também relatados em alguns trabalhos (Kant *et al.*, 2004; Proffit *et al.*, 2011; Copolovici *et al.*, 2012).

É conhecido que a mistura de produtos voláteis liberados a partir de plantas danificadas são frequentemente específicos, dependendo do tipo de herbívoro e sua idade, abundância e tipo de alimentação (Yoneya *et al.*, 2009; McCormick *et al.*, 2012). No entanto, entre os diferentes grupos de plantas é possível observar os mesmos grupos de compostos químicos que compõem a mistura, como por exemplo, os monoterpenos e os sesquiterpenos. (Turlings *et al.*, 1998; Arimura *et al.*, 2004). De acordo com McCormick *et al.* (2012), as quantidades relativas destes compostos podem variar entre as plantas, o que pode contribuir para a especificidade do

predador. van Wijk *et al.* (2010) testaram diferentes misturas contendo dois compostos em diferentes concentrações, afim de observar a resposta do predador *P. persimilis* a estas fontes de odores. Os resultados obtidos mostraram que em diferentes concentrações a resposta do predador variou, podendo causar uma maior atratividade ou repelência.

Quando comparamos plantas infestadas com *T. evansi* e plantas infestadas com *T. urticae*, os 23 compostos voláteis encontrados nas plantas infestadas com o ácaro-vermelho foram também encontrados nas plantas infestadas com o ácaro rajado (Tabela 1). Apenas 2 compostos foram encontrados somente nas plantas infestadas com o ácaro rajado (Geranyl Linalool e um composto não identificado (7)) (Tabela 1). Podemos observar através desses resultados que o perfil de compostos voláteis emitidos a partir de plantas de tomate atacadas por essas duas espécies de herbívoros é muito similar qualitativamente. Quantitativamente, não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações dos compostos voláteis de plantas infestadas com *T. evansi* ou *T. urticae*. Isso poderia explicar a não preferência dos predadores *P. longipes*, *P. macropilis* e *C. sanguinea* por plantas infestadas com o ácaro-vermelho ou com o ácaro rajado.

Com os resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que o ácaro-vermelho *T. evansi*, que tem a capacidade de suprimir o sistema de defesa direto de plantas de tomate, parece não interferir negativamente com o sistema de defesa indireto destas plantas.

REFERÊNCIAS

- Adams P R (2007). Identification of essential Oil Components by gas Chromatography/ Mass Spectrometry. 4 th Edition, 804 p.
- Agrawal A A (2007). Macroevolution of plant defense strategies. Trends in Ecology & Evolution, 22, 103-109.
- Agrawal A A, Janssen A, Bruin J, Posthumus M A & Sabelis M W (2002). An ecological cost of plant defense: attractiveness of bitter cucumber plants to natural enemies of herbivores. Ecology Letters, 5:3, 377-385.
- Allison J D, Hare J D (2009). Learned and naïve natural enemy responses and the interpretation of volatile organic compounds as cues or signals. New Phytologist, 184, 768-782.
- Ament K, Krasikov V, Allmann S, Rep M, Takken F L W, Schuurink R C (2010). Methyl salicylate production in tomato affects biotic interactions. The Plant Journal, 62, 124-134.
- Ament K, Kant M R, Sabelis M W, Haring M A, Schuurink R C (2004). Jasmonic acid is a key regulator of spider mite-induced volatile terpenoid and methyl salicylate emission in tomato. Plant Physiology, 135, 2025-2037.
- Arimura G. *et al.*, (2004). Forest tent caterpillars (*Malacosoma disstria*) induce local and systemic diurnal emissions of terpenoid volatiles in hybrid poplar (*Populus trichocarpa* x *deltoides*): cDNA cloning, functional characterization, and patterns of gene expression of (-)-germacrene D synthase, PtdTPS1. Plant J. 37, 603–616.
- Bleeker P M, Diergaarde P J, Ament K, Guerra J, Weidner M, Schutz S, de Both M T J, Haring M A, Schuurink R C (2009). The role of specific tomato volatiles in tomato-whitefly interaction. Plant Physiology, 151, 925-935.

- Copolovici L, Kannaste A, Pazouki L, Niinemets U (2012). Emissions of green leaf volatiles and terpenoids from *Solanum lycopersicum* are quantitatively related to the severity of cold and heat shock treatments. *Journal of Plant Physiology*, 169, 664-672.
- Crawley M J (2007). *The R Book*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK.
- de Moraes G J & McMurtry J A (1985). Comparison of *Tetranychus evansi* and *Tetranychus urticae* [Acari: Tetranychidae] as prey for eight species of Phytoseiidae mites. *Entomophaga*, 30, 393-397.
- Furtado I P, de Moraes G J, Kreiter S, Tixier M S, Kanpp M (2007). Potential of a Brazilian population of the predatory mite *Phytoseiulus longipes* as a biological control agent of *Tetranychus evansi* (Acari: Phytoseiidae: Tetranychidae). *Biological Control*. 42, 139-147.
- Janssen A (1999). Plants with spider-mite prey attract more predatory mites than clean plants under greenhouse conditions. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 90, 191-198.
- Kessler A & Baldwin I T (2001). Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*, 291, 2141-2144.
- Maeda T, Takabayashi J (2001). Production of herbivore-induced plant volatiles and their attractiveness to *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae) with changes of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) density on a plant. *Applied Entomology and Zoology (Jpn)*, 36, 47-52.
- McCormick A C, Unsicker S B, Gershenson J (2012). The specificity of herbivore-induced plant volatiles in attracting herbivore enemies. *Trends in Plant Science*, 17:5, 303-309.
- Oliveira E E, Oliveira C L, Sarmiento R A, Rezende L M, Fadini M A M (2005). Biological aspects of the predator *Cycloneda sanguinea* Linnaeus, 1763

(Coleoptera: Coccinellidae) fed with *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard, 1960 (Acari: Tetranychidae) and *Macrosiphum euphorbiae* Thomas, 1878 (Homoptera: Aphididae). *Bioscience Journal*, 21, 33-39.

Proffitt M, Birgersson G, Bengtsson M, Jr R R, Witzgall P, Lima E (2011). Attraction and oviposition of *Tuta absoluta* females in response to tomato leaf volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, 37, 565-574.

Sarmiento R A, Lemos F, Bleeker P M, Schuurink R C, Pallini A, Oliveira M G A, Lima E R, Kant M, Sabelis M W, Janssen A (2011). A herbivore that manipulates plant defence. *Ecology Letters*, 14, 229-236.

Sarmiento R A, de Lemos F, Dias C R, Pallini A, Venzon M (2008). Infoquímicos induzidos por herbivoria mediando a comunicação entre plantas de tomate e o predador *Cycloneda sanguinea* (Coleoptera: Coccinellidae). *Revista Ceres*, 55(5), 439-444.

Sarmiento R A, Venzon M, Pallini A, Oliveira E E, Janssen A (2007). Use of odours by *Cycloneda sanguinea* to assess patch quality. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 124, 313-318.

Sznajder B, Sabelis M W, Egas M. (2011). Innate responses of the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* to a herbivore-induced plant volatile (2011). *Experimental and Applied acarology*, 54, 125-138.

Turlings T C J *et al.*, (1998). The induction of volatile emissions in maize by three herbivore species with different feeding habits: possible consequences for their natural enemies. *Biol. Control*, 11, 122-129.

van Wijk M, Bruijn P J A, Sabelis M W (2011). Complex odor from plants under attack: Herbivore's enemies react to the whole, not its parts. *PLoS One* 6(7): e21742. doi:10.1371/journal.pone.0021742.

- van Wijk M, Bruijn P J A, Sabelis M W (2010). The predatory mite *Phytoseiulus persimilis* does not perceive odor mixtures as strictly elemental objects. *Journal of Chemical Ecology*, 36, 1211-1225.
- van Wijk M, Bruijn P J A, Sabelis M W (2008). Predatory mite attraction to herbivore-induced plant odors is not a consequence of attraction to individual herbivore-induced plant volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, 34, 791-803.
- Yoneya K, Kugimiya S, Takabayashi J (2009). Can herbivore-induced plant volatiles inform predatory insect about the most suitable stage of its prey? *Physiological Entomology*, 34, 379 – 386.
- Zhang P J, Zheng S J, van Loon J J A, Bolland W, David A, Mumm R, Dicke M (2009). Whiteflies interfere with indirect plant defense against spider mites in lima bean. *PNAS*, 106:50, 21202-21207.

CONCLUSÕES GERAIS

Os predadores *Phytoseiulus longipes*, *Phytoseiulus macropilis* e *Cycloneda sanguinea* são capazes de distinguir entre os voláteis de plantas de tomate infestadas com os ácaros *Tetranychus evansi* ou *Tetranychus urticae* e voláteis de plantas de limpas. Isso mostra que o complexo planta-herbívoro libera uma mistura de odores atraentes a estes inimigos naturais. Entretanto, quando dada à escolha entre plantas infestadas com *T. evansi* e plantas infestadas com *T. urticae*, os predadores não são capazes de distinguir, na situação testada, entre as duas fontes de odores produzidas. Este resultado sugere que o perfil de compostos voláteis emitidos pelas plantas atacadas por essas duas espécies de herbívoros pode ser muito similar.

Com a análise qualitativa dos compostos voláteis que foram coletados das plantas limpas e plantas infestadas pelos dois ácaros fitófagos, foi possível encontrar uma diferença significativa na composição destes compostos entre plantas de tomate limpas e plantas infestadas. Isso pode explicar a maior atratividade dos predadores testados nos experimentos de olfatômetro pelas plantas infestadas, seja por *T. evansi* ou por *T. urticae*. No entanto, quando fazemos uma comparação entre plantas infestadas com o ácaro-vermelho e com o ácaro rajado, observamos que o perfil de voláteis emitido por essas duas fontes de odores foi bastante similar. Em uma análise quantitativa destes compostos, não encontramos diferenças significativas quando analisamos cada composto separadamente. Estes resultados também podem explicar a não preferência dos predadores por nenhuma das duas fontes de odores produzidas.

Logo, o ácaro-vermelho *T. evansi* que tem a capacidade de suprimir o sistema de defesa direto de plantas de tomate, parece não interferir negativamente com o sistema de defesa indireto destas plantas.