



**MARINA CHAVES DE OLIVEIRA**

**A herbivoria de insetos sugadores em milho influencia a colonização  
por heteroespecíficos?**

**LAVRAS – MG**

**2019**

**MARINA CHAVES DE OLIVEIRA**

**A herbivoria de insetos sugadores em milho influencia a colonização por heteroespecíficos?**

Monografia apresentada à  
Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Curso  
de Ciências Biológicas, para a  
obtenção do título de Bacharel.

Ms. Patrícia Pereira  
Coorientadora

Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Fernanda G. V. Peñaflo  
Orientadora

**LAVRAS-MG**

**2019**

**MARINA CHAVES DE OLIVEIRA**

**A herbivoria de insetos sugadores em milho influencia a colonização por heteroespecíficos?**

**Does herbivory of sucking insects in corn influence colonization by heterospecifics?**

Monografia apresentada à  
Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Curso  
de Ciências Biológicas, para a  
obtenção do título de Bacharel.

**Ms. Patrícia Pereira**

**(Coorientadora)**

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Fernanda G. V. Peñaflo**  
**(Orientadora)**

**LAVRAS – MG**

**2019**

A Deus, por me sustentar até aqui.

Dedico

## **Agradecimentos**

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Programa de Iniciação Científica – UFLA, pela concessão da bolsa de iniciação científica.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela oportunidade de estudo e de pesquisa, especialmente ao Departamento de Entomologia.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Fernanda G. V. Peñaflores, pela concessão do projeto e pelos ensinamentos de todos esses anos de laboratório.

A todos do laboratório de Ecologia Química das Interações inseto-planta, por todo conhecimento compartilhado, amizade e diversão.

Aos meus avós Lidenbeg (em memória) e Maria, Maria (em memória) e Luís, por todo amor e carinho. Aos meus pais Louís e Adryana.

Aos meus Tios que sempre acreditaram e auxiliaram para buscar o melhor de mim. Aos meus primos e toda família Chaves e Oliveira.

Ao Luciano, por toda paciência, apoio e suporte nesses anos de UFLA. E todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para que eu chegasse aqui.

**MUITO OBRIGADA**

## RESUMO

A cultura do milho (*Zea mays* L.) tem grande importância econômica, sendo um dos cereais mais consumidos e cultivados no mundo, e grande parte da produção é destinada à alimentação animal. Durante todo seu ciclo de vida, a planta de milho é sujeita a herbivoria por insetos, uma vez que muitos hospedeiros usam sua folha como fonte de alimento, como o pulgão do milho, *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) (Hemiptera: Aphididae) e a cigarrinha do milho, *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae). Em geral, as plantas quando são atacadas por insetos herbívoros têm os níveis de ácido jasmônico (AJ) e ácido salicílico (AS) aumentados, pois esses hormônios são responsáveis pela modulação de defesas da planta. Os insetos sugadores frequentemente manipulam as defesas das plantas através da via sinalizada pelo do ácido salicílico (AS) que interage antagonicamente com o AJ, tornando a planta suscetível a outros insetos, pelo aumento do AS e a queda do AJ. Assim, no presente trabalho, investigou-se o efeito da herbivoria sobre a preferência hospedeira de *D. maidis* em plantas induzidas pela herbivoria do pulgão do milho ou plantas não infestadas e sobre a preferência hospedeira de *R. maidis* frente a plantas induzidas pela cigarrinha do milho ou plantas não infestadas. Os experimentos foram conduzidos em laboratório com plantas cultivadas em casa de vegetação até o estágio fenológico V7. As plantas foram induzidas com *D. maidis* ou *R. maidis* por 7 dias. Em placas de petri, foram feitos dois cortes de aproximadamente (2cmx5cm), para a passagem das folhas das plantas de milho (uma folha previamente infestada e outra não infestada), observando o comportamento dos insetos em diferentes tempos (5 a 240min) e contabilizados. Nos testes de preferência alimentar por *R. maidis* ( $\chi^2_{(1,8)} = 76,86$ ,  $P < 0,001$ ) e *D. maidis* ( $\chi^2_{(1,8)} = 22,396$ ,  $P < 0,001$ ) foram encontrados maior preferência hospedeira por plantas induzidas, comparado a plantas não infestadas ao longo do tempo. Dessa forma, os resultados indicam que possivelmente há uma influência na colonização por heteroespecíficos, na escolha hospedeira desses insetos.

**Palavras-chave:** Milho, Pulgão do milho, Cigarrinha do milho.

## ABSTRACT

Corn (*Zea mays* L.) is of great economic importance, being one of the most consumed and cultivated cereals in the world, and much of its production is for animal feed. Throughout its life cycle, the maize plant is subject to herbivory by insects, as many hosts use its leaf as a food source, such as the corn aphid, *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) (Hemiptera: Aphididae) and leafhopper. of corn, *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae). In general, plants when attacked by herbivorous insects have increased levels of jasmonic acid (AJ) and salicylic acid (AS), as these hormones are responsible for modulating plant defenses. Sucking insects often manipulate plant defenses via the pathway signaled by the salicylic acid (AS) that interacts with AJ, making the plant susceptible to other insects by increasing AS and falling AJ. Thus, in the present work, we investigated the effect of herbivory on *D. maidis* dietary preference in maize aphid herbivory-induced plants or non-infested plants and on *R. maidis* dietary preference in relation to leafhopper-induced plants. uninfested corn or plants. The experiments were carried out in a laboratory with greenhouse plants until the phenological stage V7. Plants were induced with *D. maidis* or *R. maidis* for 7 days. In petri dishes, two cuts of approximately (2cmx5cm) were made for the passage of the leaves of the corn plants (one previously infested and one not infested), observing the behavior of the insects at different times (5 to 240min) and accounted for. In the food preference tests by *R. maidis* ( $\chi^2 (1.8) = 76.86$ ,  $P < 0.001$ ) and *D. maidis* ( $\chi^2 (1.8) = 22.396$ ,  $P < 0.001$ ) we found higher host preference for plants. compared to non-infested plants over time. Thus, the results indicate that there is possibly an influence on heterospecific colonization, on the host choice of these insects.

**Keywords:** Corn, Corn aphid, Corn leafhopper.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>09</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Interações inseto-planta .....</b>	<b>11</b>
<b>2.2</b>	<b>A cultura do milho .....</b>	<b>12</b>
<b>2.3</b>	<b><i>Rhopalosiphum maidis</i>.....</b>	<b>14</b>
<b>2.4</b>	<b><i>Dalbulus maidis</i>.....</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>16</b>
<b>4</b>	<b>HIPÓTESES .....</b>	<b>16</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
<b>5.1</b>	<b>Criação do inseto <i>Dalbulus maidis</i>.....</b>	<b>17</b>
<b>5.2</b>	<b>Criação de <i>Rhopalosiphum maidis</i>.....</b>	<b>18</b>
<b>5.3</b>	<b>Cultivo de plantas .....</b>	<b>19</b>
<b>5.4</b>	<b>Tratamentos .....</b>	<b>19</b>
<b>5.5</b>	<b>Preferência hospedeira do pulgão <i>R. maidis</i>.....</b>	<b>20</b>
<b>5.6</b>	<b>Preferência hospedeira da cigarrinha <i>D. maidis</i>.....</b>	<b>21</b>
<b>5.7</b>	<b>Análise dos dados .....</b>	<b>21</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>21</b>
<b>6.1</b>	<b>Preferência hospedeira do pulgão <i>R. maidis</i>.....</b>	<b>21</b>
<b>6.2</b>	<b>Preferência hospedeira da cigarrinha <i>D. maidis</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>25</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>26</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A classe Insecta contém cerca de 80% da vida animal conhecida e são os principais consumidores da produção vegetal primária terrestre (THOMAZINI, 2000), apresentando ao longo de sua vida, pelo menos uma fase que se alimenta de tecidos vegetais. Além disso, alguns insetos são importantes como polinizadores, parasitoides, predadores, entre outros.

As plantas, em contrapartida, evoluíram ao longo dos anos desenvolvendo uma grande variedade de estratégias, visando reduzir ou minimizar os impactos causados por herbívoros. Essas estratégias de defesa das plantas podem ser classificadas como constitutivos, quando estão presentes nos tecidos vegetais, ou induzidos, quando são sintetizados apenas após a herbivoria. Essas defesas podem agir de forma direta, modificando o comportamento/fisiologia do herbívoro ou indireta, através do recrutamento de inimigos naturais (DUDAREVA et al., 2006).

Os estudos sobre as interações ecológicas entre plantas e herbívoros têm avançado nos últimos anos, visando compreender os mecanismos envolvidos nas interações através de compostos químicos produzidos pelo metabolismo secundário das plantas (DUDAREVA et al., 2006). Conforme Voelckel (2004), a defesa indireta consiste na produção e emissão de voláteis (HIPVs) que são liberados quando a planta sofre algum dano, como a herbivoria, essas estratégias podem atrair os inimigos naturais do herbívoro e parasitoides, ocasionando uma interação tritrófica, para beneficiar a planta contra os ataques dos herbívoros.

Os compostos induzidos pela herbivoria são geralmente formados por álcoois, ésteres, aldeídos e terpenoides (DUDAREVA et al., 2006), apresentando grande variabilidade. Atualmente existem muitos compostos químicos relacionados com as interações entre plantas e insetos, (PINTO-ZEVALLOS et al., 2013) dentre eles (*E*)-2-hexenal, (*Z*)-3-hexen-1-ol e acetato de (*Z*)-3-hexen-1-ila], jasmonato de metila (MeJA), salicilato de metila (MeSA) e etileno (*ET*).

De acordo com a literatura (PINTO-ZEVALLOS et al., 2013), os insetos sugadores manipulam as defesas das plantas através de compostos sinalizadores, como ácido jasmônico (AJ) e ácido salicílico (AS). As rotas metabólicas do AJ e AS atuam de maneira antagonista, ou seja, quando é ativado a rota do AS, pode ocorrer um declínio na concentração de AJ e vice-versa. Este *crosstalk* negativo entre as vias funcionam

como uma estratégia da planta para direcionar suas respostas em defesa contra herbívoros (PIETERSE et al., 2009). Com o contato íntimo e de longa duração, os insetos sugadores, ativam a rota do AS, causando um aumento na concentração deste hormônio e conseqüentemente um declínio na concentração de AJ. O AJ, um dos principais hormônios sinalizadores (PIETERSE et al., 2009), preparando a planta para ataques futuros, com a sua queda, a planta se torna mais suscetível a herbivoria por outros insetos em geral (MARTINEZ et al., 2000). Já o AS atua como regulador de crescimento, além de atuar como sinalizador, ativando respostas da planta principalmente à infecção de patógenos (MARTINEZ et al., 2000). Assim, herbívoros sugadores possuem uma relação mais íntima com a célula vegetal ativando respostas de defesa que dependem do AS.

A cultura do milho (*Zea mays* L.) tem grande importância econômica, sendo um dos cereais mais consumidos e cultivados no mundo, no entanto, a maior parte da produção é destinada à alimentação animal (EMBRAPA, 2011). Ao longo do seu ciclo de vida, a planta de milho está sujeita a ação herbivoria dos insetos, uma vez que muitos hospedeiros usam sua folha como fonte de alimento. Alguns insetos pragas atacam a cultura do milho causando danos severos a lavoura e com isso podendo gerar perda na produção e conseqüente prejuízo econômico. Dentre as principais pragas da cultura do milho, podemos citar a cigarrinha do milho, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) e o pulgão do milho *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) (Hemiptera: Aphididae) (EMBRAPA, 2015), que podem infestar a mesma planta em campo, conforme observações pessoais (Figura 1).



**Figura 1 - Ocorrência de *R. maidis* e *D. maidis* em campo (Arquivo pessoal).**

*R. maidis*, conhecido popularmente como pulgão do milho, é considerado como praga secundária dessa cultura (WALQUIL et al., 1999). Os danos mais comuns

causados pelo mesmo, resultam na perda econômica, pela falha na polinização, transmissão de vírus fitopatogênicos, como o vírus do mosaico comum (PEREIRA; SALVADORI, 2006). A cigarrinha do milho *D. maidis* é importante por transmitir três fitopatógenos durante o processo de alimentação: o vírus da risca do milho (*Maize rayado fino virus*- MRFV), *Spiroplasma kunkelli* Whitcomb et al. (*Corn stunt spiroplasma*- CSS) e um fitoplasma (*Maize bushy stunt phytoplasma*- MBSP) (NAULT, 1980, 1990).

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a herbivoria por um dos insetos sugadores na planta de milho facilita a colonização subsequente de uma segunda espécie. Utilizando *D. maidis* e *R. maidis* como modelo de herbivoria, em sequências diferentes de colonização e se esta sequência irá alterar a atratividade destes heteroespecíficos.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Interações inseto-planta**

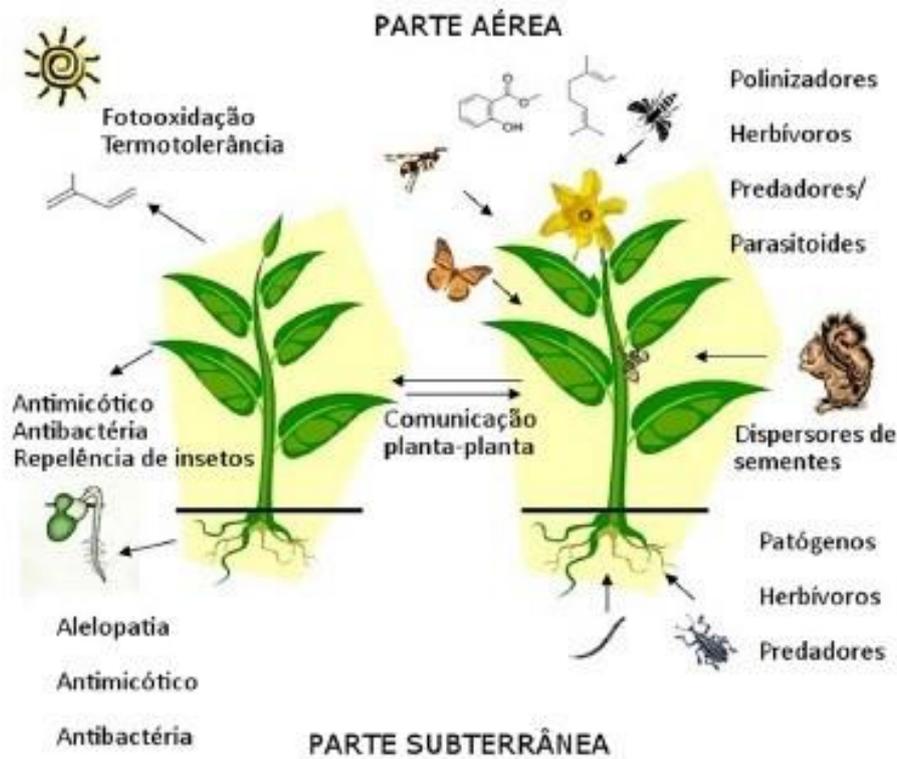
A herbivoria é uma relação interespecífica, na qual um inseto se alimenta de partes ou todo o vegetal, como folhas, caules e flores. Um processo dinâmico e complexo em que a planta sofre prejuízo e o herbívoro é beneficiado, ocasionando um impacto prejudicial ao desenvolvimento da planta, assim, deverá investir seus recursos em defesa contra a herbivoria, limitando sua energia para a produção de frutos e sementes (BOEGE & MARQUIS, 2005).

Para suportar ou evitar o ataque de herbívoros, as plantas ao longo da evolução desenvolveram diferentes estratégias de defesa, controladas pela expressão de características defensivas das plantas, como a produção de metabólitos secundários, que reduzem a incidência de herbivoria, conhecidos como defesas indiretas das plantas, ou com a presença de espinhos, dentre outras estruturas como defesa direta contra esses ataques (ALMEIDA-CORTEZ, 2005).

Para Voelckler e Baldwin (2004), a defesa indireta consiste da produção de voláteis de plantas induzidos pela herbivoria (HIPVs) uma das estratégias das plantas

quando sofrem algum dano causado pelo herbívoro e podem atrair predadores ou parasitoides. Esses compostos induzidos pela herbívora são geralmente formados por álcoois, ésteres, aldeídos e terpenoides (DUDAREVA et al.,2006). As defesas induzidas por herbivoria são essenciais no sistema defensivo das plantas, quando atacadas pelos mesmos (DICKE; SABELIS, 1988) (Figura 2), podendo variar qualitativamente e quantitativamente dependendo das espécies que estão se relacionando, o tipo de hábito alimentar (aparelho bucal) do inseto, a planta hospedeira a ser estudada, entre outros.

Atualmente os estudos sobre essas interações ecológicas entre plantas e herbívoros, tem obtido um avanço visando compreender o papel das substâncias químicas na comunicação desses seres vivos, especificamente na defesa das plantas contra herbívoros, (DUDAREVA et al.,2006).



**Figura 2 - Funções eco fisiológicas dos voláteis emitidos constitutivamente e induzidamente pelas plantas (DUDAREVA et al.,2006)**

## 2.2 A cultura do milho

Devido a sua ampla finalidade, o milho é o cereal de maior volume de produção no mundo (EMBRAPA, 2011). Apresentando elevada importância econômica, por ser

um dos cereais mais consumidos na alimentação animal e cultivados no mundo, e também por grande parte da produção ser destinada à alimentação animal. (GARCIA et al., 2006).

Segundo o Instituto de Economia Agrícola (IEA), no Brasil, os municípios de Jataí (GO) e Sorriso (MT), são os maiores produtores de milho, contando com um total de 50 municípios brasileiros produtores de milho. Ambos com participação de 11,5% na produção deste grão. A Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) confirmou a safra brasileira de grãos para essa temporada 2019/2020 deve chegar a 245,8 milhões de toneladas, 1,6% maior que a colheita de 2018/2019 (CONAB, 2019).

Pertence a família Poaceae, apresentando ciclo anual, a cultura do milho, apresenta suas peculiaridades. Fatores bióticos, temperatura, luz, umidade e água afetam diretamente o crescimento desta cultura. De forma geral, nas regiões sul, sudeste e centro-oeste é recomendado o plantio entre setembro e novembro de cada ano. Na região nordeste e partes da região norte, o plantio é recomendado nos meses de março a abril. Portanto, o plantio em outros meses pode ser efetuado, e são denominados como “milho safrinha”, no entanto é preciso conhecimento do produtor para uma melhor produção (EMBRAPA, 2011). A temperatura ideal para o desenvolvimento deste vegetal é de 24° a 30°, no entanto o milho consegue germinar com temperaturas entre 10° e 42° (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000). O milho apresenta alta sensibilidade a estiagens, com a redução do aporte hídrico, ocasiona uma redução no rendimento final desta cultura. Na fase reprodutiva é observado maior efeito, onde o estresse hídrico causa danos a formação do zigoto e enchimento de grãos (CARVALHO et al., 2013). É recomendado aproximadamente 650mm de água (BERGAMASCHI et al., 2001), cerca de 7mm diários para um ciclo entre 110 a 140 dias.

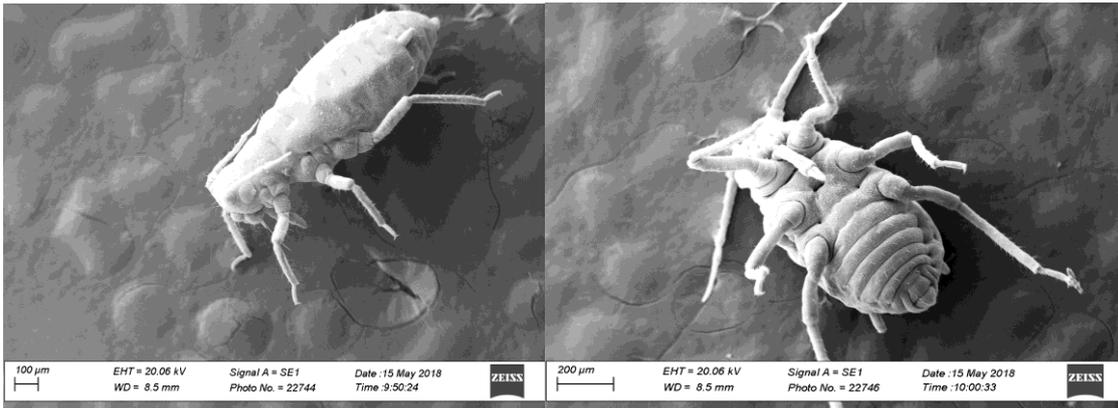
A planta de milho, em todo seu desenvolvimento, desde o plantio até o final do seu ciclo, sofre diversos ataques de insetos. (CRUZ et al., 1996). Seus hospedeiros utilizam a planta de milho como fonte alimentar, dentre os quais se sobressaem os besouros, as cigarrinhas, os pulgões e as lagartas, que comumente são controlados por inseticidas químicos (ALBUQUERQUE et al., 2006; MICHELOTTO et al., 2011).

### **2.3 *Rhopalosiphum maidis***

*Rhopalosiphum maidis* (Fitch) (Hemiptera: Aphididae), também conhecido como pulgão do milho (Figura 3), é representado por insetos com (alados) ou sem asas, de corpo alongado azul-esverdeado, com um tamanho entre 0,9 e 2,2 mm de comprimento (EMBRAPA, 2006). Seu hábito é preferencialmente por gramíneas, vivendo em colônias, a qual é composta por adultos e ninfas, sendo ápteros ou alados. O ciclo biológico do pulgão do milho varia entre 20 e 30 dias, seu período reprodutivo dura em torno de 12 dias, com alta capacidade de proliferação, reproduzindo por viviparidade e partenogênese, podem originar até 10 ninfas/fêmea/dia. (Maia et al., 2006). Possuem aparelho bucal do tipo picador-sugador, se desenvolvem melhor em temperaturas de 20°C, em locais e períodos com baixa umidade e ventos de baixa velocidade. Os alados são responsáveis pela dispersão da espécie nas lavouras, quando em condições desfavoráveis, falta de alimento ou com o auxílio dos ventos, são levados aos redores (EMBRAPA, 2006).

Os pulgões tanto jovens (ninfas) quanto os adultos, se alimentam da seiva da planta, causando danos prejudiciais a cultura. Esses danos podem ser através da sucção, atuando como vetores de viroses como o mosaico comum, por implicar no processo de polinização colonizando as estruturas reprodutivas do vegetal, além de dificultar o processo fotossintético da planta nas regiões colonizadas. A substância açucarada, denominada por *honeydew* é excretada pelos pulgões e favorece o desenvolvimento da “fumagina”, uma doença causada por fungos de coloração escura, caracterizada pelo crescimento de uma crosta na superfície da folha, que resulta em dificuldade na respiração e na fotossíntese do vegetal (HAVES, 1922; WAQUIL et al., 1986; GAHUKAR, 1993).

Contudo, os danos causados por esse inseto sugador resultam em perda econômica e biológica da cultura, por resultar em menor eficiência de polinização, tendo como resultado espigas malformadas, plantas estéreis, clorose ou encarquilhamento nas folhas, entre outras consequências na cultura infestada.



**Figura 3 - Imagem do pulgão do milho *Rhopalosiphum maidis* em microscopia eletrônica de varredura (Arquivo pessoal).**

#### **2.4 *Dalbulus maidis***

A cigarrinha do milho *Dalbulus maidis* (DeLong; Wolcott, 1923) (Hemiptera: Cicadellidae), um inseto sugador, causador de danos diretos ao sugar a seiva em plantas de milho (WALQUIL et al., 1999). Em regiões tropicais e subtropicais não apresentam diapausa, ou seja, podem se desenvolver durante o ano todo, com alimento disponível e temperaturas ideais para seu desenvolvimento (EMBRAPA, 2017). O inseto adulto é caracterizado pela sua cor amarelada e asas transparentes, seu tamanho é cerca de 3mm de comprimento por 1mm de largura. Seus ovos são depositados geralmente na nervura central da folha de milho, medindo cerca de 1mm, apresentando coloração esbranquiçada, sendo depositados de 400 a 600 ovos por postura. O ciclo de vida é cerca de 25 a 30 dias em condições ideais. Distribui-se por todo continente americano, sobrevivendo apenas no milho. No Brasil até o momento tem sido observado apenas a ocorrência do gênero *Dalbulus*, pertencentes a espécie *maidis*. Tem sido constatado uma maior incidência dessa praga na região Sudeste e Centro Oeste do Brasil (WAQUIL et al., 1999), com picos populacionais entre os meses de março e abril.

A cigarrinha do milho apresenta aparelho bucal sugador e causa danos diretos às plantas de milho, conseqüentes de sua alimentação da seiva da planta. Os enfezamentos do milho são causados por dois microrganismos da classe Mollicutes, popularmente conhecido como mollicutes, que são um espiroplasma – enfezamento pálido (*Spiroplasma kunkelii*), e fitoplasma – enfezamento vermelho, e o vírus da risca do

milho (Maize Rayado Fino Virus - MRFV), procariotos e sem parede celular, são os principais microrganismos responsáveis pelo enfezamento do milho, causando encurtamento dos entrenós, definhamento da planta, estrias de coloração amarelada nas folhas e reduz a sua produção (EMBRAPA, 2017). A praga é a principal espécie vetora desses fitopatógenos, transmitindo-os de maneira persistente e propagativa (NAULT, 1980), ocasionando a redução de aproximadamente 70% da produção de grãos da planta doente quando comparada a uma planta sadia (EMBRAPA, 2017).

Em razão da importância das doenças transmitidas pela cigarrinha do milho, o controle deste inseto vetor é de importância significativa para o desenvolvimento da cultura do milho, visando uma maior e melhor produção final.

### **3 OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar se a herbivoria de *D. maidis* ou *R. maidis* na planta de milho facilita a colonização subsequente pela outra espécie.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- a) Verificar a preferência hospedeira da cigarrinha-do-milho *D. maidis* por plantas de milho não infestadas ou infestadas por *R. maidis*.
- b) Avaliar a preferência hospedeira do pulgão-do-milho *R. maidis* por plantas de milho não infestadas ou plantas infestadas por *D. maidis*.

### **4 HIPÓTESES**

- a) A infestação do pulgão-do-milho *R. maidis* torna a planta de milho mais suscetível à cigarrinha-do-milho *D. maidis* comparadas a plantas não infestadas.
- b) A infestação com ninfas de cigarrinha-do-milho *D. maidis* torna a planta mais suscetível à alimentação pelo pulgão-do-milho *R. maidis* quando comparada a plantas não infestadas.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos do presente trabalho foram conduzidos no Laboratório de Ecologia Química das Interações Inseto-Planta – LEQIIP, localizado no Departamento de Entomologia – DEN, da Universidade Federal de Lavras – UFLA.

### 5.1 Criação de *D. maidis*

Para a condução dos experimentos foi iniciada a criação da cigarrinha-do-milho *D. maidis* no Laboratório de Ecologia Química das Interações Inseto-Planta – LEQIIP, no Departamento de Entomologia. A colonização de insetos sadios foi obtida a partir de plantas de milho contendo posturas de adultos *D. maidis* doadas pelo laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Federal de Lavras. As cigarrinhas foram mantidas em gaiolas de acrílico (30x30x60cm) (Figura 4), fechadas com tecido do tipo *voile* para permitir a ventilação. Em cada gaiola foram colocados de três a cinco vasos pequenos (com capacidade de 1L) com três plantas de milho sadias por vaso, que constituem a fonte alimentar das cigarrinhas. Os vasos foram trocados duas vezes por semana, onde era retirado as plantas deterioradas e colocado plantas sadias no lugar. A metodologia de criação de *D. maidis* está descrita detalhadamente em Oliveira Lopes (2004).



**Figura 4 - Criação de cigarrinha do milho *Dalbulus maidis* – DEN/UFLA  
(Arquivo pessoal).**

## 5.2 Criação de *R. maidis*

Foi coletado no campus experimental da UFLA, uma colônia de *R. maidis*, em cultivo de milho. Os insetos foram identificados e usados para iniciar a criação no LEQIIP, em condições controladas (temperatura  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ ; UR  $70\pm 10\%$ ; e fotofase de 12 horas). A criação dos afídeos foi realizada utilizando a metodologia adaptada de Cabette (1992). Após a retirada das folhas de milho encontradas no campo, colocamos as folhas infestadas em contato com folhas lavadas com água corrente e sem a presença de herbívoros, cortadas em seções de 15 cm de comprimento, e foram mantidas em copos de polietileno (25 mL de capacidade) preenchidos com água, sendo trocados duas vezes por semana (Figura 5). Pelo contato da folha colonizada com a nova folha os afídeos eram transferidos de forma natural, no dia seguinte a folha mais velha era removida. Foi utilizado uma barreira física de poliestireno para evitar o contato pulgões com a água, assim evitou a queda dos afídeos dentro do recipiente.



**Figura 5 - Criação de pulgão do milho *Rhopalosiphum maidis*– Departamento de Entomologia/UFLA (Arquivo pessoal).**

### 5.3 Cultivo das plantas

Semente de milho do híbrido convencional 30F53 (Pioneer) foram cultivadas em vasos de polietileno (2 L de capacidade) contendo 1,5 Kg de solo (latossolo vermelho escuro) (Figura 6). Para a sementeira, cada vaso recebeu uma única semente de milho. As plantas foram mantidas e cultivadas em casa de vegetação da Universidade Federal de Lavras – UFLA, sendo regadas em dias intercalados até o desenvolvimento da sétima folha (estádio fenológico V7), quando foram usadas nos experimentos. Plantas de milho de mesmo híbrido, foram cultivadas em vasos de polietileno (2 L de capacidade) contendo 1,5 Kg de solo (latossolo vermelho escuro), contendo uma semente por vaso, para a manutenção da criação de *R. maidis*. O mesmo, porém, em vasos de polipropileno (com capacidade de 800ml) para a manutenção da criação de *D. maidis*.



**Figura 6 - Cultivo de plantas de milho em casa de vegetação – UFLA (Arquivo pessoal).**

### 5.4 Tratamentos

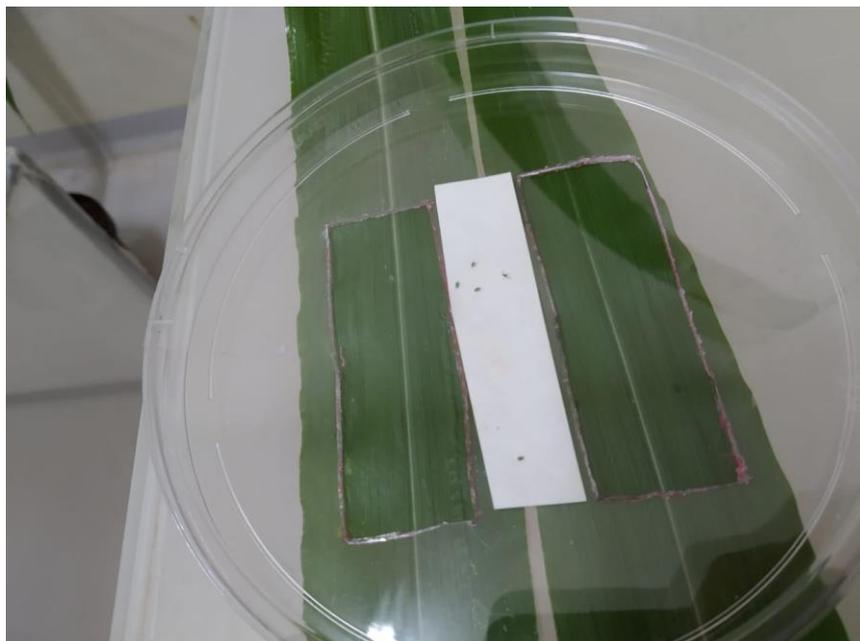
No dia anterior à infestação, as plantas foram transferidas da casa de vegetação ao laboratório, para aclimatação. No dia posterior metade das plantas foram infestadas com um inseto sugador, denominadas como plantas infestadas e a outra metade não receberam nenhum tipo de herbívoro, denominadas como plantas não infestadas. Os

tratamentos foram: *i*) plantas infestadas com *D. maidis* (PID), *ii*) plantas infestadas com *R. maidis* (PIR), *iii*) plantas não infestadas (PNI).

Foram infestadas dez plantas de milho com aproximadamente 150 pulgões (PIR) em cada, para o teste de preferência hospedeira de *D. maidis*. E outras dez plantas com 15 ninfas de 3º e 4º instar de cigarrinhas do milho (PID) em cada, para o teste de preferência hospedeira de *R. maidis*. Todas as plantas foram envolvidas com um tecido do tipo *voile* e permaneceram por 7 dias até a realização dos experimentos.

### 5.5 Preferência hospedeira do pulgão *R.maidis*

A preferência hospedeira do pulgão foi avaliada por meio da contagem do número de indivíduos presente nas folhas das plantas de milho de cada tratamento. Após o período de infestação foi realizado o experimento, que contou com 10 repetições e foi conduzido no laboratório em condições controladas. Em placas de petri (90 x 15mm) contendo duas aberturas (2x5cm) onde foram inseridas as folhas de milho de cada tratamento (PID e PNI). Foram colocadas 20 ninfas de *R. maidis* em idades variadas no centro da placa (Figura 7) e avaliado a sua escolha após 5, 15, 30, 60, 90, 120 e 240 min.



**Figura 7 - Teste de preferência hospedeira de *R. maidis* (Arquivo pessoal)**

## 5.6 Preferência hospedeira da cigarrinha *D. maidis*

A preferência hospedeira da cigarrinha do milho foi avaliada por meio da contagem do número de indivíduos presente nas folhas das plantas de milho de cada tratamento. Após o período de infestação foi realizado o experimento, que contou com 10 repetições e foi conduzido no laboratório em condições controladas de temperatura, umidade e luz ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  de UR e 12h de fotofase). Em placas de petri (90x15mm), contendo duas aberturas (2x5cm) para a quarta folha de cada planta de milho (PIR e PNI). Foram liberados 5 adultos de *D. maidis*, sem separação de sexo, com 7 dias de idade, no centro da placa e avaliado a sua escolha após 5, 15, 30, 60, 90, 120 e 240 min.

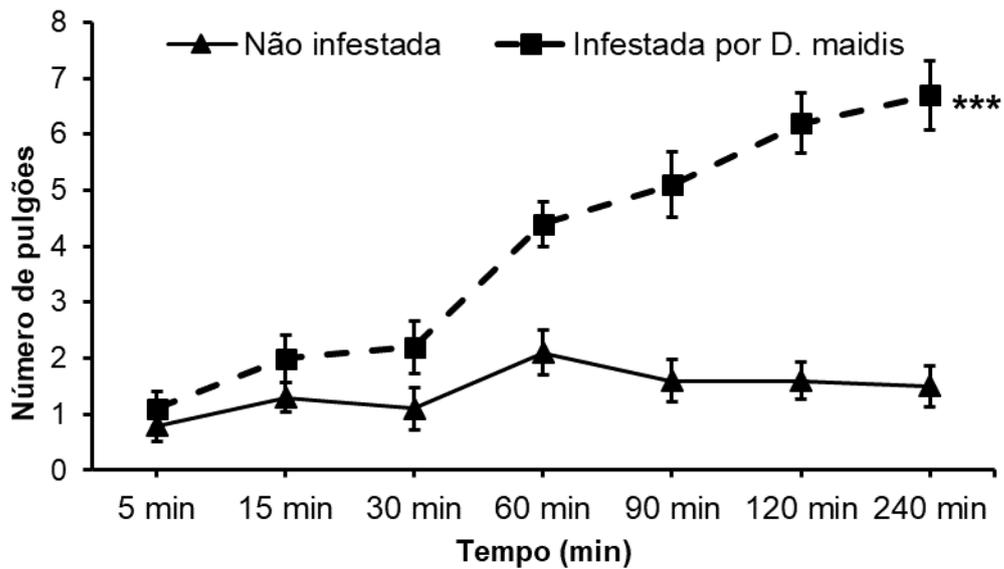
## 5.7 Análises dos dados

Para a análise dos testes de preferência alimentar de *R. maidis* e *D. maidis*, foi realizado um modelo linear generalizado misto (GLMM), com distribuição *Poisson*, sendo o tempo como a variável aleatória e tratamento como a variável fixa.

# 6 RESULTADOS

## 6.1 Preferência hospedeira do pulgão *R.maidis*

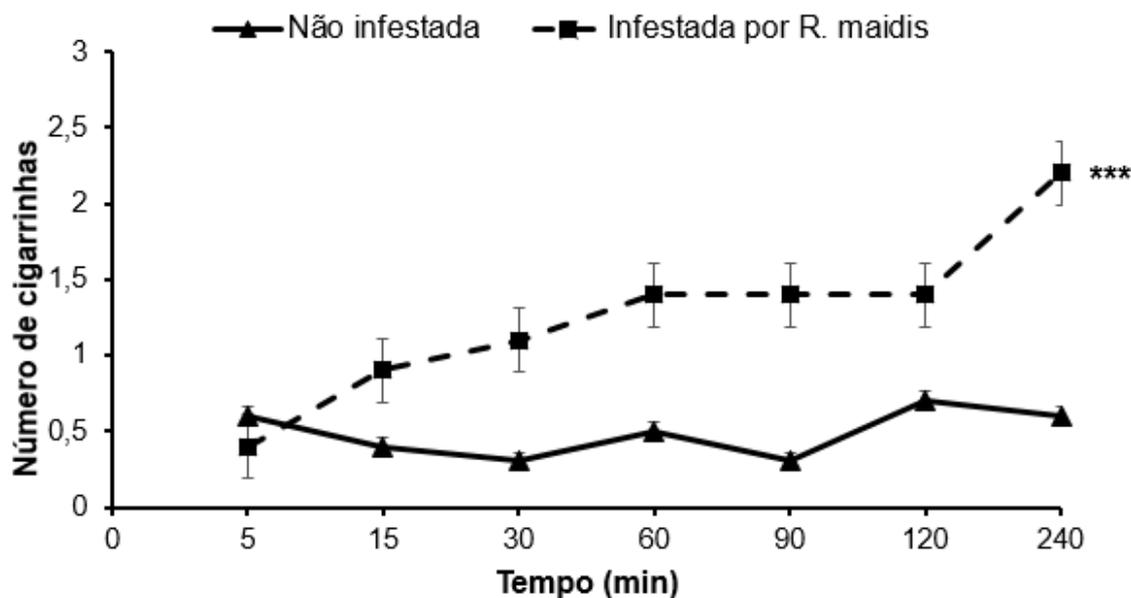
Foi encontrado um número significativamente maior de pulgões nas plantas induzidas com *D. maidis* (PID) ( $\chi^2_{(1,8)} = 76,86$ ,  $P < 0,001$ ), em relação as plantas não infestadas (PNI), nos intervalos de 5 a 240 minutos. Ao longo do tempo, notou-se que o número de afídeos no tratamento de plantas não infestadas se manteve relativamente constante comparado ao tratamento de plantas induzidas com herbivoria (Figura 8).



**Figura 8 - Preferência hospedeira de *R. maidis* entre plantas de milho não infestadas e plantas infestadas com *D. maidis*.**

### 6.2 Preferência hospedeira da cigarrinha do milho *D. maidis*

Foi encontrado um número significativamente maior de cigarrinhas nas plantas induzidas com *R. maidis* (PIR) ( $\chi^2_{(1,8)} = 22,396$ ,  $P < 0,001$ ), em relação as plantas não infestadas (PNI), nos intervalos de 5 a 240 minutos. Ao longo do tempo, notou-se que o número de cigarrinhas no tratamento de plantas intactas se manteve reativamente constante, comparado ao tratamento de plantas induzidas com herbivoria (PIR) que resultou em um crescimento ao longo do tempo (Figura 9).



**Figura 9 - Preferência hospedeira de *D. maidis* entre plantas de milho não infestadas e plantas infestadas com *R. maidis*.**

## 7 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que a herbivoria de um inseto sugador possivelmente influencia a colonização por heteroespecíficos. Podemos observar nos resultados que ao liberar os insetos para a escolha entre plantas não infestadas e plantas infestadas, observamos a preferência dos insetos colonizadores subsequentes à plantas de milho infestadas. A escolha por plantas infestadas teve um crescimento ao longo do tempo, diante a preferência de ambos insetos sugadores, comparado as plantas não infestadas, onde apresentou uma média relativamente constante durante todo o experimento. Dessa forma, confirmamos a nossa hipótese de que a infestação por insetos sugadores como *D. maidis* e *R. maidis* torna a planta mais suscetível ao ataque de insetos heteroespecíficos, comparado a plantas não infestadas. De acordo com observações pessoais, essa co-infestação é também observada em campo, relatos dessas pragas encontradas de formas simultâneas em culturas de milho, sustentam nossa hipótese, de que insetos sugadores como *D. maidis* e *R. maidis* manipulam as defesas das plantas, tornando-as mais suscetíveis a infestação de outras pragas, com a manipulação de suas estratégias de defesas contra a herbivoria. De maneira semelhante, a Louis et al., (2015), afirma que as respostas das plantas mediadas por

ataques de herbívoros ocasionam ajustes nas redes de sinalização entre vários fito-hormônios, relatando a combinação sinérgica de etileno e ácido jasmônico. Semelhante a Bernasconi et al., (1998) afirmando que a preferência dos herbívoros por plantas induzidas frente a plantas não infestadas pode ter sido mediada pelos voláteis liberados pelas plantas.

Podemos observar que os afídeos liberados, optaram por plantas que foram induzidas, mantendo esse resultado ao longo do experimento. Tzin et al., (2015) afirma que ao induzir plantas de milho com o pulgão *R. maidis*, houve um efeito predominante nas rotas metabólicas do ácido salicílico, ocasionando um aumento na concentração de ácido salicílico e induções prolongadas de oxilipinas (compostos derivados de ácidos graxos livres, reguladores de respostas ao estresse nos vegetais), embora não necessariamente o ácido jasmônico, ocasionando uma queda na produção de progênie dos pulgões.

Análises comparativas em resposta a insetos sugadores, como o pulgão e a mosca branca, foram feitas por Dubey et al., (2013), notou-se que apesar de danos mínimos causados as culturas, os insetos sugadores alteram a expressão gênica das plantas em 2h de infestação, afetando os genes que são regulados por vários fito-hormônios, induzindo o metabolismo da síntese de aminoácidos, ou mesmo envolvidos no desenvolvimento de resistência das plantas, suprimindo suas defesas e conseqüentemente facilitando a infestação, beneficiando insetos colonizadores subsequentes aquela planta.

Por fim, podemos observar que as interações ocorridas entre insetos sugadores heteroespecíficos estudados nestes experimentos, possivelmente são capazes de modificar quimicamente as rotas metabólicas das plantas de milho e conseqüentemente a respostas dos insetos frente a estes tratamentos.

## 8 CONCLUSÃO

A colonização por insetos sugadores, possivelmente influencia a colonização por heteroespecíficos em plantas de milho.

Os pulgões *R. maidis* preferiram, como hospedeiras, plantas que foram induzidas com herbivoria pela cigarrinha do milho *D. maidis*, comparado a plantas não infestadas

As cigarrinhas do milho *D. maidis* preferiram, como hospedeira, plantas induzidas pelo pulgão do milho *R. maidis*, comparado a plantas não infestadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, F. A. et al. Eficiência de inseticidas aplicados em tratamento de sementes e em pulverização, no controle de pragas iniciais do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 5, n. 1, p. 15-25, 2006.

ALMEIDA-CORTEZ, J. S. **Herbivoria e mecanismos de defesa vegetal**. In: NOGUEIRA, R. J. M. C.; ARAÚJO, E. L.; WILLADINO, L. G.; CALVALCANTE, U. M. T. (eds.). Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas. Recife: UFRPE/Imprensa Universitária, 2005, p.389-396.

BERGAMASCHI, Homero et al. Deficit hídrico e produtividade na cultura do milho. **Pesq. agropec. bras.** [online]. 2006, vol.41, n.2 [cited 2019-11-12], pp.243-249. Available from: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-204X2006000200008&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2006000200008&lng=en&nrm=iso)>.ISSN0100-204X. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2006000200008>. Acesso em 19/10/2019 às 15:32

BERNASCONI, M. L. et al. Herbivore-induced emissions of maize volatiles repel the corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, p. 133-142, 1998.

BEZERRA, RANNA HEIDY SANTOS. Voláteis induzidos por herbivoria em plantas de mandioca e atratividade a ácaros (Acari: Tetranychidae: Phytoseiidae). 2017. 67 f. Dissertação (Pós-Graduação em Ecologia e Conservação) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, 2017.

BOEGE, K.; MARQUIS, R. J. Facing herbivory as you grow up: the ontogeny of resistance in plants. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 20, p. 441-448, 2005.

CABETTE, HELENA S. R. Técnicas para criação e isolamento de pulgões (Homoptera, Aphididae) em soro, no laboratório e no campo. **Acta Biológica Paraense**, p. 31-36, 1992.

CONAB (ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA DE GRÃOS), Safra 2016/17, v. 4 -, n. 12 - Décimo segundo levantamento, 2017.

DE AGRO/ FIESP-DEPARTAMENTO DO AGRONEGOCIO. Safra Mundial de Milho 2017/18 - 6º Levantamento do USDA, 2017. Acesso em: 19/11/2019 às 10:20

CARVALHO, I. Q. de et al. Espécies de cobertura de inverno e nitrogênio na cultura do milho em sistema de plantio direto. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 8, n. 2, p. 179-184, 2007.

CRUZ, I.; OLIVEIRA, L. J.; VASCONCELOS, C. A. Efeito do nível de saturação de alumínio em solo ácido sobre os danos de *Spodoptera frugiperda* (Smith) em milho. **Anais... Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 25, p. 293-297, 1996.

DUDAREVA, N. et al. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Sciences**, p. 417-440, 2006.

DUBEY, NK, Goel, R., Ranjan, A. et al. **Análise comparativa do transcriptoma de *Gossypium hirsutum* L. em resposta a insetos sugadores de seiva: pulgão e mosca branca.** BMC Genomics 14, 241 doi: 10.1186 / 1471-2164-14-241 (2013)

FANCELLI, A. L.; Dourado Neto, D. **Produção de Milho.** Guaíba: Agropecuária, 360 p. 2000.

GARCIA, J. C. et al. Aspectos Econômicos da Produção e Utilização do Milho. **EMBRAPA (Circular técnica, 74)**, 2006.

MARTINEZ, C. et al. Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 122, p. 757-766, 2000.

NAULT, L.R. Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogens host ranges, and vectors. **Phytopathology** 70:659-662. 1980. NAULT, L.R. Evolution of insect pest: maize and leafhopper, a case study. **Maydica** 35:165-175. 1990.

PARRA, J. R. P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico.** FEALQ: Piracicaba, p. 137, 2001.

PEREIRA FILHO, I.; CRUZ, J.C. Cultivo do milho. Sistemas de Produção. **EMBRAPA**, 2011.

PEREIRA, P. R. V. da S.; SALVADORI, J. R. Guia para identificação de corós rizófagos (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae) comumente encontrados em cereais de inverno, milho e soja no norte do Rio Grande do Sul. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2006. 12 p. html. (**Embrapa Trigo**. Comunicado Técnico Online, 204).

PICHERSKY, E.; NOEL J. P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, p. 808-811, 2006.

PIETERSE, C.M.J. et al. Networking by small-molecules hormones in plant immunity. **Nature Chemical Biology**, New York, v.5, p. 308-316, 2009.

PINTO-ZEVALLOS, et al. **Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros.** Quim. Nova, Vol. 36, No. 9, 1395-1405, 2013

Thomazini, M.J., Thomazini, A.B.P.W. (2000) A fragmentação florestal e a diversidade de insetos nas florestas tropicais úmidas. Rio Branco: **Embrapa Acre**, 57: 21p.

TZIN et al. **Dynamic Maize Responses to Aphid Feeding Are Revealed by a Time Series of Transcriptomic and Metabolomic Assays** Plant Physiol. Nov 2015; 169 (3): 1727-43. doi: 10.1104 / pp.15.01039. Epub 2015 Set 16.

VOELCKEL, C; BALDWIN, I. T. Herbivore-induced plant vaccination. Part II. Array-studies reveal the transience of herbivore-specific transcriptional imprints and a

distinct imprint from stress combinations. **The Plant Journal**, v. 38, n. 4, p. 650-663, 2004.