Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Estímulos olfativos envolvidos na busca hospedeira por larvas de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) em milho

Franciele dos Santos

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestra em Ciências. Área de
concentração: Entomologia

Piracicaba
2013

Franciele dos Santos
Licenciado em Ciências Biológicas

Estímulos olfativos envolvidos na busca hospedeira de larvas de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) em milho

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ MAURICIO SIMÕES BENTO**

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestra em Ciências. Área de
concentração: Entomologia

**Piracicaba
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Santos, Franciele dos

Estímulos olfativos envolvidos na busca hospedeira por larvas de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) em milho / Franciele dos Santos.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013. 60 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Larva-alfinete 2. Pragas de solo 3. Voláteis de plantas 4. Interação inseto-planta
I. Título

CDD 632.76
S237e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte -O autor"

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Moacir e Izaura, e tias Noemia e Eliza.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Moacir e Izaura e tias Noemia e Eliza por todo apoio amor e empenho na coleta de Diabroticas para que fosse possível o término deste trabalho.

Ao Prof. José Mauricio Simões Bento agradeço imensamente por todas as oportunidades, pela orientação, compreensão, apoio e paciência nestes quase três anos.

Ao Dr. Leonardo R. Barbosa por todos puxões de orelha, incentivo e principalmente por sua amizade.

A Professora Cristiane Nardi pela amizade e ajuda de sempre, principalmente nas horas de “desespero”.

A M. Fernanda Penãflor, por toda ajuda, paciência, carinho, amizade e companheirismo acadêmico.

Ao Alexandre Diniz pelo grande amigo que é, pelas inúmeras e incansáveis conversas, e por todo seu carinho e atenção.

A Angela Lima, Rizia e Ana Cristina e Fernando Sujimoto, pela amizade e sinceridades recíprocas.

Aos colegas de Laboratório agradeço pela companhia e por todo aprendizado que me proporcionaram com nosso convívio, pelos cafés (chás e afins): Luiza, Camila, Welinton, André, Renata, Rejane, F. Sujimoto, Aline, Lucila, M. Fernanda, Mariana, Cris Nardi e Arodi.

A Michelle Mascarenhas por toda ajuda na criação dos insetos e montagem dos experimentos. Agradeço imensamente por toda sua atenção e dedicação.

Aos amigos Tayron Amaral, Gustavo Rodrigues, Talita Silveira e Amanda Campos pela amizade, noites culinárias, risadas, e tudo mais que passamos juntos.

A Lucila Watt e Aline Kamiya pelas armadilhas insuportavelmente divertidas.

Ao capitão/super-herói/pequeno príncipe Pedro Kamiya Chagas pelo carinho de criança que sempre me fez tão bem.

Aos colegas e amigos que me receberam tão bem quando cheguei a Piracicaba: Luiza Zazyki, Oderlei e Daniel Bernardi, Rodrigo Sorgato, Diogo Araujo, Odimar e Marcio.

Ao professor Euzébio (Universidade Federal de Alagoas), por me receber com tanta gentileza e atenção em seu laboratório.

Aos colegas da Universidade Federal de Alagoas, Mariana, Isis, Daniel Lira, e Wanderson Barbosa, pela ajuda, risadas e todo apoio no mês que passei com vocês.

Ao professor Mário Massayuki Inomoto por disponibilizar da estrutura de seu laboratório.

Ao professor Luis Reynaldo Ferraciú Alleoni do Dep. de Solos por disponibilizar a utilização de seu laboratório e ao técnico Luiz por me atender e auxiliar com tanta simpatia e boa vontade apesar de sua correria.

Ao Professor Angelo Pedro Jacomino do Dep. de Pós colheita, agradeço não apenas por disponibilizar a utilização dos equipamentos de seu laboratório mas principalmente por sua gentileza e atenção de sempre. Ao técnico Marcos agradeço imensamente por toda ajuda com minhas análises de etileno.

Ao professor Wesley Godoy, por dispender diversas vezes de seu tempo para conversas e esclarecimentos acadêmicos.

“ Não se pode duvidar de que todos os nossos conhecimentos começam com a experiência, porque, com efeito, como haveria de exercitar-se a faculdade de se conhecer, se não fosse pelos objetos que, excitando os nossos sentidos, de uma parte, produzem por si mesmos representações, e de outra parte, impulsionam a nossa inteligência a compará-los entre si, a reuni-los ou separá-los, e deste modo à elaboração da matéria informe das impressões sensíveis para esse conhecimento das coisas que se denomina experiência?

No tempo, pois, nenhum conhecimento precede a experiência, todos começam por ela.”

Immanuel Kant

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Busca hospedeira por organismos edafícolas	19
2.2 Voláteis induzidos: Sistema radicular	20
2.3 Plantas mediando interações entre insetos radiculares e foliares	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Criação dos Insetos	25
3.2 Cultivo das plantas.....	25
3.3 Indução das plantas.....	27
3.4 Atratividade de larvas de <i>Diabrotica speciosa</i> em olfatômetro de solo.....	27
3.5 Metodologia para estudos comportamentais com larvas de 1º ínstar de <i>Diabrotica speciosa</i>	29
3.6 Coleta e análise dos voláteis radiculares.....	30
3.7 Análise estatística	32
4 RESULTADOS	35
4.1 Escolha hospedeira de larvas de 1º ínstar de <i>Diabrotica speciosa</i>	35
4.2 Escolha hospedeira de larvas de 2º e 3º ínstar de <i>Diabrotica speciosa</i>	35
4.3 Voláteis emitidos por raízes de milho	37
4.3.1 Análise dos componentes principais (PCA)	40
5 DISCUSSÃO.....	43
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
REFERÊNCIAS	51
ANEXOS.....	59

RESUMO

Estímulos olfativos envolvidos na busca hospedeira de larvas de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) em milho

Apesar da importância dos herbívoros de solo na estruturação da comunidade e também como pragas agrícolas, nosso entendimento sobre a ecologia química de suas interações com a planta hospedeira é limitado comparado à vasta literatura sobre os herbívoros que se alimentam de órgãos aéreos das plantas. O presente estudo teve como objetivo identificar os estímulos olfativos envolvidos na busca hospedeira de *Diabrotica speciosa*. Larvas de 1º. ínstar de *D. speciosa* foram capazes de localizar plantas hospedeiras de milho, mas sem distinguir plantas não induzidas das induzidas pela herbivoria radicular e/ou foliar. Já larvas de 2º e 3º ínstar apresentaram preferência por plantas sem indução frente a plantas induzidas pela herbivoria radicular. No entanto, estas larvas preferiram plantas induzidas pela herbivoria foliar em detrimento a plantas sem indução. Na situação em que plantas sem indução foram confrontadas com plantas induzidas pela herbivoria foliar + radicular não houve preferência destas larvas. A análise do perfil de voláteis juntamente com o PCA ('Análise dos Componentes Principais') revelaram semelhança entre os voláteis emitidos por plantas induzidas pela herbivoria radicular e foliar + radicular, bem como entre plantas sem indução e induzidas pela herbivoria foliar. Estas diferenças nos perfis de voláteis não foram suficientes para explicar o comportamento de busca hospedeira de larvas de 2º e 3º ínstar, sugerindo a possibilidade de outras pistas químicas associadas com a busca hospedeira de larvas de *D. speciosa*.

Palavras-chave: Larva-alfinete; Pragas de solo; Voláteis de plantas; Interação inseto-planta

ABSTRACT

Olfactory stimuli associated with host search by *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) in corn

Despite the importance of soil herbivores in community structure and their status as pests, our understanding about the chemical ecology of their interactions is still limited compared to the vast literature on aboveground herbivores. The current study aimed at identifying the olfactory stimuli used in host search by *Diabrotica speciosa*. First-instar larvae of *D. speciosa* were able to find corn host plants; however, they did not distinguish between herbivore-induced and non-induced plants (control). Second-and-third-instar larvae preferred non-induced over root-herbivore induced plants. Nevertheless, second-and-third-instar larvae preferred leaf-herbivore induced plants, inflicted by *D. speciosa* adults, over non-induced plants. When larvae were exposed to non-induced and leaf + root-herbivore induced plants, they did not show preference. Volatile profile analysis together with PCA (Principal Component Analysis) revealed similarity between volatiles emitted by root-herbivore induced and leaf + root-herbivore induced plants as well as between non-induced and leaf-herbivore induced plants. These differences in plant volatile profile were not sufficient to explain host search behavior of second-and-third instar larvae, suggesting the possibility of other chemical cues are associated with host search of *D. speciosa* larvae.

Keywords: Curcubit beetle; Soil pests; Plant volatiles; Insect-plant interaction

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GLM	Modelo linear generalizado (Generalized Linear Model)
HR	Herbívoria radicular
HF	Herbívoria foliar
HFR	Herbívoria foliar e radicular
PCA	Análise dos componentes principais (Principal Components Analysis)
SI	Planta sem indução (Controle)

1 INTRODUÇÃO

Cerca de 500 mil insetos e outros artrópodes vivem no solo, e um número considerável destes organismos alimenta-se de raízes (SCHOONHOVEN; VAN LOON; DICKE, 2005). Diferente dos organismos que se alimentam das estruturas aéreas das plantas, insetos rizófagos não possuem pistas visuais, localizando seu hospedeiro, exclusivamente, por meio de pistas químicas (JOHNSON; GREGORY, 2006).

Apesar da importância dos herbívoros de solo na estrutura das comunidades e na manutenção do equilíbrio ecológico, nosso entendimento sobre a ecologia química de suas interações com a planta hospedeira é limitada comparada ao que já sabemos sobre os herbívoros que se alimentam de partes aéreas das plantas (JOHNSON; NIELSEN, 2012).

Até a década de 90, acreditava-se que o comportamento de busca hospedeira destes organismos fosse mediado unicamente pelo dióxido de carbono (CO_2) liberado pelas raízes (BRANSON et al., 1969; DOANE et al., 1975; BRANSON, 1981; STRNAD et al., 1986; STRNAD; BERGMAN, 1987 a, b; BERNKLAU; BJOSTAD, 1998a, b; STRNAD; DUNN, 1990). Entretanto, a liberação de CO_2 pelos órgãos subterrâneos é comum a todas as plantas e, portanto, não representam pistas confiáveis do seu hospedeiro. Assim, outras substâncias do metabolismo secundário das raízes devem constituir sinais químicos mais específicos do seu hospedeiro e, por isso, utilizados pelas larvas na localização e reconhecimento do alimento adequado (VAN TOL et al., 2001; RASMANN et al., 2005; RASMANN; TURLINGS, 2007; ROBERT et al., 2012 a).

Plantas mediam uma complexidade de interações multitróficas que podem ser influenciadas por mudanças fisiológicas nas plantas. A herbivoria, por exemplo, induz respostas defensivas nas plantas, como a produção de uma ampla gama de compostos orgânicos voláteis, que regulam novas interações com a comunidade de insetos. Os inimigos naturais utilizam esses sinais voláteis como pistas na busca do hospedeiro/presa a longas distâncias (TURLINGS et al., 1991), do mesmo modo, herbívoros também exploram tais pistas para encontro de seu hospedeiro (BERNAYS; CHAPMAN, 1994).

Já é bem conhecido que nematoides entomopatogênicos utilizam sinais químicos radiculares induzidos pela herbivoria para encontrar o seu hospedeiro (RASMANN et al., 2005), contudo, pouco se sabe sobre o papel dessas pistas para os herbívoros que vivem nos solos, que devem explorar tais pistas para avaliar a adequação da planta hospedeira,

em termos de qualidade nutricional e presença de competidores (ROBERT et al., 2012a, b).

Diabrotica speciosa (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae), comumente encontrada em países da América Latina é uma das principais pragas da cultura do milho (MARQUES et al., 1999; PICANÇO et al., 2003). Sua fase larval é caracterizada, principalmente, pelo hábito edafícola, tendo nos últimos anos adquirido status de praga-chave na cultura, devido aos sérios danos causados pela herbivoria radicular (WAQUIL; MENDES; MARUCCI, 2010).

Os voláteis da planta de milho constituem importantes pistas químicas para as fêmeas de *D. speciosa* no encontro de um hospedeiro ideal para a oviposição (NARDI, 2010). No entanto, permanece incerto se após a eclosão, as larvas se deslocam na busca de uma planta hospedeira ideal para seu desenvolvimento, ou, se permanecem na mesma planta escolhida pelas mães.

Além disso, o comportamento de seleção hospedeira pode mudar de acordo com a fase de desenvolvimento do inseto (HIBBARD et al., 2004) e, apesar de larvas neonatas serem muito frágeis e possuírem uma reserva de energia limitada, são ainda capazes de se deslocar em busca de hospedeiros mais adequados nutricionalmente (SCHOONHOVEN; VAN LOON; DICKE, 2005).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar a preferência de larvas recém-eclodidas e de 2º e 3º ínstar de *D. speciosa* em relação a plantas intactas e infestadas por coespecíficos na parte aérea e/ou radicular. Como os estímulos olfativos provindos da planta hospedeira são as principais pistas utilizadas pelos insetos de solo, avaliou-se também o papel dos voláteis emitidos pelas raízes das plantas de milho na preferência larval por plantas intactas e atacadas pela herbivoria.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Busca hospedeira por organismos edafícolas

Insetos rizófagos baseiam-se unicamente em pistas químicas para a localização da planta hospedeira (JOHNSON; GREGORY, 2006). O gradiente de concentração de dióxido de carbono (CO₂) emitido pelas raízes das plantas representa uma pista importante na busca hospedeira por insetos no solo (KLINGLER et al., 1958¹ *apud* JOHNSON; NIELSEN, 2012; DOANE et al., 1975), chegando-se a recomendar a sua aplicação para controle por meio da desorientação de larvas de *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae), impossibilitando assim o encontro do hospedeiro pelas larvas (BERNKLAU; BJOSTAD, 1998 a, b).

Por muito tempo, acreditou-se que a busca hospedeira destes organismos dava-se exclusivamente por influência do CO₂ liberado pelas raízes das plantas (DOANE et al., 1975; BRANSON, 1982; STRNAD; BERGMAN; FULTON, 1986; STRNAD; BERGMAN, 1987 a, b; STRNAD; DUNN, 1990). Entretanto, todas as plantas liberam CO₂ no solo a partir do processo de respiração celular e, por isso, outras pistas olfativas provavelmente estão envolvidas na busca hospedeira por organismos de solo (PEREIRA et al., 2005).

Larvas de *D. speciosa* são atraídas pelo CO₂, tendo preferência por determinadas plantas hospedeiras em detrimento de outras, indicando que, além do CO₂, sinais específicos liberados pelas raízes influenciam a escolha (PEREIRA et al., 2005). Estudos sugerem que larvas de *D. v. virgifera* são capazes de discriminar hospedeiros infestados por coespecíficos e se realocar para outro hospedeiro quando o nível de competição intraespecífica é alto (HIBBARD et al., 2004). Desta forma, é possível que pistas químicas específicas liberadas pelas raízes indiquem a qualidade e o nível de infestação da planta hospedeira aos insetos rizófagos. Enquanto raízes de um hospedeiro não danificado liberam poucos sinais para os herbívoros, raízes danificadas pela herbivoria emitem uma gama distinta de compostos que são exploradas pelos insetos rizófagos para avaliar a qualidade do hospedeiro (REINECKE; MULLER; HILKER, 2008).

Além de diferenciar plantas atacadas por coespecíficos de plantas intactas, larvas de *D. v. virgifera* são capazes de avaliar o nível de infestação da planta por meio de um

¹ KLINGLER, J. Die Bedeutung der Kohlendioxyd-Ausscheidung der Wurzeln für die Orientierung der Larven von *Otiorrhynchus sulcatus* F. und anderer bodenbewohnender phytophager Insektenarten. **Mitteilungen der Schweizerischen entomologischen Gesellschaft**, Basel, v. 31, p. 205-269. 1958.

composto conhecido como (*E*)- β -cariofileno, que é emitido em maiores concentrações em função da maior densidade de larvas nas raízes de milho (ROBERT et al., 2012 a, b). Dessa maneira, as larvas podem evitar plantas que apresentem alto nível competitivo.

Evidências acerca da presença de pistas químicas envolvidas na busca hospedeira de organismos de solo vem sendo investigadas não apenas por influenciar a escolha de herbívoros do solo, mas também por mediar interações com inimigos naturais subterrâneos. Assim, a alimentação de insetos rizófagos induz a emissão de diversos compostos atrativos para nematoides entomopatogênicos em coníferas (VAN TOL et al., 2001), milho (RASMANN et al., 2005) e citros (ALI; ALBORN; STALINSKI, 2010).

Johnson e Gregory (2006) desenvolveram um modelo conceitual para explicar a localização e seleção da planta hospedeira por insetos rizófagos mediada pelos compostos químicos liberados pelas plantas. Neste modelo, os insetos provavelmente iniciam o seu movimento no solo de forma aleatória, no entanto, após a detecção de sinais não específicos, como o CO₂, seu movimento deixa de ser aleatório e passa a ser direcionado, resultando em uma maior eficiência na busca hospedeira. Em um segundo momento, de acordo com os autores, os insetos usam semioquímicos liberados pelas raízes para reconhecer seu hospedeiro a certa distância, e distinguir entre hospedeiros adequados ou não nutricionalmente. Ao encontrarem a superfície das raízes, pistas quimiorreceptoras estimulariam ou repeliriam a alimentação destes insetos.

Apesar de se tratar de um modelo baseado em diversos trabalhos com insetos rizófagos, o modelo proposto por Johnson e Gregory (2006) vem sendo bem aceito entre os pesquisadores, uma vez que, diversos trabalhos têm comprovado o modelo.

2.2 Voláteis induzidos: sistema radicular

Embora o solo seja uma matriz de menor escala e maior complexidade, ele proporciona um ambiente que protege as substâncias contra a degradação pela oxidação e luz, tornando os sinais liberados pelas raízes mais estáveis e possivelmente mais confiáveis do que aqueles liberados pelos órgãos aéreos das plantas (HILTPOLD; TURLINGS, 2008).

Sob uma perspectiva evolutiva, o sistema radicular sempre esteve sobre menor pressão de seleção que os órgãos aéreos das plantas, que estão mais expostos a danos mecânicos e a uma maior diversidade de herbívoros (ERB; GLAUSER; ROBERT, 2012). Por estar mais suscetíveis aos danos de diversas naturezas, os órgãos aéreos das

plantas devem ter desenvolvido mecanismos de reconhecimento da herbivoria que especificamente induz a síntese de defesas contra a herbivoria, de maneira a reduzir os custos de um “falso alarme”. Raízes, no entanto, estão expostas a poucos eventos abióticos de dano mecânico, e desta forma, um simples ferimento pode ser suficientemente confiável para indicar a presença de um herbívoro (ERB; GLAUSER; ROBERT, 2012).

A liberação de compostos em resposta à herbivoria do sistema radicular é em geral menos intensa do que em órgãos aéreos da planta. Em milho, por exemplo, a emissão de voláteis radiculares é basicamente limitada a um único sesquiterpeno dominante, o (*E*)- β -Cariofileno (HILTPOLD; TURLINGS, 2008), enquanto que, a mesma planta libera uma gama muito maior de moléculas em resposta à herbivoria nas folhas (TURLINGS et al. 1998).

A síntese de voláteis induzidos pela herbivoria requer um considerável investimento de recursos energéticos, mas, a estratégia de produzir defesas somente após o ataque dos herbívoros parece ser adaptativa, uma vez que o gasto energético em mecanismos de defesa ocorre somente sob ameaça (AGRAWAL, 1998;1999).

A difusão dos voláteis das raízes varia em função da difusão no solo e, por isso, nem todos os compostos liberados pelas raízes mediam interações com a comunidade de organismos do solo. Hiltpold e Turlings (2008) verificaram que entre os voláteis induzidos pela herbivoria emitidos pelas raízes de milho, o β -copaeno tem maior potencial de difusão em relação ao (*E*)- β -cariofileno, α -humuleno e óxido de Cariofileno. No entanto, o (*E*)- β -cariofileno é o volátil mais conhecido pelas suas funções ecológicas em mediar interações com organismos edáficos (RASMANN ET AL., 2005; ROBERT et al.; 2012a, b). Apesar da menor capacidade de difusão do (*E*)- β -cariofileno em relação ao β -copaeno, por exemplo, o gasto energético da síntese é nove vezes menor (Hiltpold; Turlings, 2008). Assim, mesmo que a difusão do (*E*)- β -cariofileno tenha a metade da eficiência do β -copaeno, é menos custoso para as plantas produzir (*E*)- β -cariofileno em maiores quantidades.

Diversos trabalhos têm demonstrado a importância do (*E*)- β -Cariofileno nas interações tróficas da comunidade edáfica (RASMANN et al., 2005; RASMANN; TURLINGS, 2007; RASMANN; TURLINGS, 2008; DEGEHARDT et al., 2009; HILTPOLD et al., 2010, 2011; ROBERT et al., 2012a, b). No entanto, outros compostos liberados pelas raízes também tem efeito sobre o comportamento de organismos de solo. Na

ausência do (E)- β -cariofileno, Robert et al. (2012 b) verificaram que larvas de *D. v. virgifera*, aparentemente, utilizam os níveis de etileno liberado pelas raízes na orientação até hospedeiros mais suscetíveis.

Raízes de citros vêm sendo estudados por emitirem voláteis induzidos pela herbivoria de larvas de *Diaprepes abbreviatus* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). Tais compostos aparentemente atuam como atraente de nematoides entomopatogênicos. Neste sistema, o composto candidato responsável pela atração são os sesquiterpenos pregeijerene e seu produto de degradação gieijerene (ALI; ALBORN; STALINSKI, 2010, 2011).

Poucas culturas ainda são estudadas com relação aos voláteis radiculares induzidos, principalmente pela dificuldade em se trabalhar com tal sistema. Entretanto, avanços nos estudos que visem entender melhor as interações no solo podem elucidar não apenas as interações ecológicas ocorridas abaixo do solo, mas também ajudar no desenvolvimento de estratégias de manejo para diversas pragas de solo.

2.3 Plantas mediando interações entre insetos rizófagos e filófagos

Apesar de separados espacialmente, os organismos presentes nos órgãos aéreos e subterrâneos das plantas podem interagir de forma direta, pela predação (SOLER et al., 2007; PIERRE et al., 2011), ou indireta, via mudanças na biomassa e qualidade nutricional do hospedeiro (BARDGETT; WARDLE, 2003).

Sabe-se que as respostas de defesa induzida das plantas podem ser limitadas ao sítio de ataque (“local da indução”), ou ser expressas em áreas distintas da planta (“Indução sistêmica”) (KARBAN; BALDWIN, 1997; BEZEMER; VAN DAM, 2005). Assim, a herbivoria radicular pode conduzir mudanças na concentração e composição de compostos primários e secundários nos órgãos aéreos da planta, do mesmo modo que, danos em folhas e caule também podem desencadear alterações químicas e fisiológicas nas raízes (KOSTENKO et al., 2012).

Até a metade da década de 80, interações entre insetos consumidores de folhas e de raízes em um mesmo hospedeiro não haviam sido estudadas em detalhe, apesar de muitos estudos tratarem dos dois sistemas separadamente (DOANE et al., 1975; PRICE et al., 1980; BRANSON, 1982; STRNAD; BERGMAN; FULTON, 1986; STRNAD; BERGMAN, 1987a, b; STRNAD; DUNN, 1990).

Trabalhos pioneiros que tratam das interações entre herbívoros rizófagos-filófagos mostram que, a herbivoria foliar geralmente provoca efeitos negativos sobre os herbívoros radiculares. A sucção foliar por afídeos provoca alterações na fisiologia da planta, aumentando a resistência da planta contra afídeos que se alimentam das raízes (MORAN; WHITHAM, 1990). De forma semelhante, Masters e Brown (1992) verificaram que a herbivoria foliar por larvas *Chromatomyia syngenesiae* Hardy (Diptera: Agromyzidae) reduziu substancialmente a biomassa radicular, afetando significativamente o desenvolvimento de larvas do *Phyllopertha horticola* (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae). Por outro lado, quando a planta foi atacada inicialmente pelas larvas do besouro, o desempenho do herbívoro foliar melhorou, pois a herbivoria radicular levou a realocação de aminoácidos e açúcares para folhas e caule.

Diferentemente dos resultados de Masters e Brown (1992), outros estudos têm reportado aumento nos níveis de defesa nos tecidos foliares em resposta a herbivoria radicular. Em algodão, a herbivoria radicular por larvas de *Agriotes lineatus* (L.) (Coleoptera: Elateridae) elevou o nível de néctar extrafloral (WÄCKERS; BEZEMER, 2003), e de terpenóides nas folhas (BEZEMER et al., 2003, 2004). Van Dam, Raaijmakers e Van der Putten (2005) verificaram um aumento nos níveis de glucosinolatos e compostos fenólicos em folhas de *Brassica nigra* (L.) (Brassicaceae) quando expostas a herbivoria radicular por *Delia radicum* (L.) (Diptera: Anthomyiidae). Adicionalmente, a herbivoria radicular reduziu o desempenho larval e a viabilidade das pupas de *Pieris rapae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae) nos órgãos aéreos do hospedeiro.

A herbivoria foliar, por sua vez, pode ter efeitos neutros sobre compostos de defesa das raízes, ou aumento da resistência contra organismos rizófagos (BEZEMER et al., 2003, 2004; HOL; MACEL; VAN VEEN; VAN DER MEIJDEN, 2004; VAN DAM; QUI; HORDJK; VET, 2010).

Muitas das pesquisas sobre interações entre herbívoros foliares e radiculares compartilhando um mesmo hospedeiro são em sua maioria limitadas a dois níveis tróficos (MORAN; WHITHAM, 1990; MASTERS; BROWN, 1992, 1993; SOLER et al., 2005). Contudo, diversos trabalhos tem reportado a importância destas interações em um terceiro e até mesmo quarto nível trófico, envolvendo parasitoides e hiperparasitoides, respectivamente. A herbivoria de *Delia radicum* (L.) (Diptera: Anthomyiidae) em *Brassica nigra* (L.) (Brassicaceae), apesar de aumentar o desempenho das larvas de *Pieris brassicae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae), afeta significativamente o tamanho do parasitoide

Cotesia glomerata Cresson (Hymenoptera: Braconidae) e de seu hiperparasitóide *Lysibia nana* Gravenhorst (Hymenoptera: Ichneumonidae) (SOLER et al., 2005). Estudos mostram ainda que a herbivoria radicular pode influenciar o comportamento de oviposição do parasitóide de *P. brassicae*, *C. glomerata*, por meio de mudanças nos perfis de voláteis utilizados pelas plantas (SOLER et al., 2007).

Considerando a diferença espacial entre dois insetos fitófagos, *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lepidoptera: Noctuidae) e *D. v. virgifera*, e seus respectivos inimigos naturais, *Cotesia marginiventris* Cresson (Hymenoptera: Braconidae) e *Heterorhabditis megidis* Poinar, Jackson & Klein 1987 (Rhabditida: Heterorhabditidae), Rasmann e Turlings (2007) verificaram que, em infestações isoladas, ambos inimigos naturais são atraídos para seus respectivos hospedeiros, porém em situação de dupla infestação (aérea e subterrânea simultaneamente), a atração foi reduzida. Os autores também verificaram que, apesar do efeito negativo na atração dos inimigos naturais, não foi detectada nenhuma modificação no perfil de voláteis liberado pelas plantas sob o ataque simultâneo, enquanto que (*E*)- β -cariofileno liberado pelas raízes foi suprimido.

Em plantas de *Brassica* spp. Pierre et al. (2011) verificaram que a herbivoria radicular provocou um forte efeito supressor da emissão de salicilato de metila. Tal supressão deve levar a alterações nas interações mediadas por esse composto, principalmente por ser conhecido seu envolvimento na atração de inimigos naturais neste sistema.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Criação dos Insetos

Adultos de *D. speciosa* foram coletados em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (cv. Carioca) do campo e transportados para o laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos. Seguindo a metodologia proposta por Milanez (1995) e Ávila et al. (2000), larvas e adultos foram alimentados com raízes seminais de milho pipoca (*Zea mays* L.) e folhas de feijão, respectivamente. Os adultos foram mantidos em gaiola de acrílico (40 x 30 x 40 cm) contendo alimento e substrato para oviposição, constituído de um recipiente circular (10 x 1,5 cm) forrado com gaze de coloração preta umedecida.

Em intervalos de dois dias, realizou-se a coleta de ovos, por meio da lavagem do tecido em água corrente sobre uma peneira de inox com malha de 400 mesh, posteriormente, os ovos foram tratados com solução de sulfato de cobre (CuSO_4) a 1% por dois minutos, então transferidos para placas de Petri (9,0 x 1,0 cm), onde permaneceram até a eclosão.

As larvas recém-eclodidas foram inoculadas em sementes de milho pré-germinadas em vermiculita esterilizada e. Após 10 dias de desenvolvimento, os imaturos foram transferidos para novos recipientes contendo o mesmo substrato e alimento, permanecendo neste até a emergência dos adultos. Os insetos foram mantidos em sala climatizada com temperatura ($25 \pm 3^\circ\text{C}$), umidade relativa do ar ($70 \pm 10\%$) e fotofase de 14 horas.

3.2 Cultivo das plantas

Sementes de milho da variedade Delprin (Delley Semences et Plantes SA) foram plantadas em vasos (250 mL) contendo substrato comercial Basiplant[®], e mantidas em casa de vegetação sem controle de temperatura. As plantas utilizadas em todos os experimentos apresentavam duas folhas parcialmente desdobrada e a terceira em início de brotação. As plantas que foram usadas nos bioensaios de olfatometria foram transferidas para as câmaras de vidro adaptadas ao olfatômetro de 6 vias quando apresentavam uma folha aberta e a segunda em início de brotação (Figura 1A). Neste momento, essas plantas foram retiradas do substrato, o sistema radicular lavado cuidadosamente e então inseridas em sacos confeccionados em “voil” (8,0 x 14,0 cm) que

foram acondicionados nas câmaras de vidro adaptadas ao olfatômetro de 6 vias (250 ml) contendo areia e pedriscos na proporção 2:1, e umedecidas com 10% de água (Figura 1B-C), e retornadas à casa de vegetação até os bioensaios. Diariamente, as câmaras contendo as plantas foram pesadas para calcular o volume de água reduzido, que foi repostado para manter 10% de umidade no substrato (Figura 1D).

A transferência das plantas foi realizada três dias antes dos bioensaios para que as raízes penetrassem no novo substrato, e também para evitar qualquer influência da manipulação sobre a emissão de voláteis (HILTPOLD; TURLINGS, 2008).

Figura 1 – Sistema utilizado na preparação das plantas de milho da variedade Delprin para os bioensaios em olfatômetro de 6 vias. (A) Plântula de milho com dois folíolos abertos e o terceiro em fase de brotação; (B) plântula de milho após a remoção do substrato e lavagem das raízes; (C) plântula de milho acondicionada em saco de “voil”; (D) plântula de milho após ter sido transplantada para câmara de vidro que será posteriormente acoplada a arena central do olfatômetro de 6 vias

As plantas usadas na coleta dos voláteis radiculares foram mantidas em casa de vegetação por todo o período nos mesmos vasos até apresentarem duas folhas abertas e a terceira em início de brotação (9 ± 1 dias de idade).

3.3 Indução das plantas

As plantas de milho foram submetidas aos seguintes tratamentos pela herbivoria de *D. speciosa*: i) plantas induzidas pela herbivoria radicular (danificadas por larvas); ii) plantas induzidas pela herbivoria foliar (danificadas por adultos); iii) plantas induzidas pela herbívora foliar + radicular (danificadas por larvas e adultos); e iv) plantas sem indução (controle).

Para indução pela herbivoria radicular, 10 larvas de 2° e 3° ínstar de *D. speciosa* foram colocadas na superfície do substrato, próximo à base da planta. Para a herbivoria foliar, os danos nas folhas foram ocasionados colocando-se 10 adultos de *D. speciosa* em câmaras de vidro (8,0 cm de diâmetro x 38,0 cm de altura) e acoplado à planta inteira (Figura 3A). Plantas com herbivoria foliar + radicular, por sua vez, foram induzidas colocando-se simultaneamente, 10 larvas nas raízes e 10 adultos nas folhas. Os adultos e larvas foram colocados em contato com a planta 24 horas antes dos bioensaios, e não foram removidos para os testes de olfatometria, somente para a coleta dos voláteis radiculares, momentos antes do corte das raízes.

3.4 Liberação das larvas de *Diabrotica speciosa* em olfatômetro de solo

Para investigar a hipótese de que os voláteis induzidos pela herbivoria radicular, foliar, e foliar + radicular em plantas de milho afetam o comportamento de seleção hospedeira de larvas de *D. speciosa*, bioensaios foram realizados em olfatômetro de vidro de seis vias (RASMANN et al, 2005). Este dispositivo experimental é constituído de uma câmara central de vidro (10,0 cm de diâmetro x 8,0 cm de altura) com seis aberturas laterais equidistantes, preenchido com uma mistura de areia e pedra na proporção de 2:1 (10% de umidade). A cada abertura lateral foi conectada uma via horizontal (“arena”) (3,0 cm diâmetro e 5,0 cm comprimento) contendo os tratamentos a serem testados. Neste tipo de olfatômetro ocorre a difusão passiva do ar, simulando as condições reais do solo, dispensando desta forma a utilização de bombas de fluxo de ar.

Primeiramente, a fim de caracterizar a viabilidade do sistema e algum tipo de tendência no direcionamento das larvas no olfatômetro, foram realizados bioensaios controle confrontando: i) planta sem indução vs planta sem indução (controle positivo); e ii) branco vs branco (areia + pedra umedecida - controle negativo) (Anexo 1).

Os tratamentos envolvendo plantas induzidas pela herbivoria (foliar, radicular ou foliar + radicular) foram sempre combinados com o tratamento controle (plantas sem

indução). Dessa forma, foram utilizadas as seguintes combinações: i) planta sem indução vs planta induzida por herbivoria foliar; ii) planta sem indução vs planta induzida por herbivoria radicular; iii) planta sem indução vs planta induzida por herbivoria foliar + radicular; e iv) planta sem indução (controle) vs câmaras contendo apenas areia umedecida (branco). Em cada bioensaio, sempre foram utilizados três vias por tratamento no olfatômetro de 6 vias. Para cada combinação de tratamentos foram realizadas 8 repetições.

Anteriormente ao início de cada bioensaio, 30 larvas recém-eclodidas (Figura 2A) ou de 2º e 3º ínstar (Figura 2B, C) de *D. speciosa* foram liberadas na câmara central do olfatômetro (Figura 3C). Após 24h, as vias laterais foram desconectadas da câmara central, retirando-se cuidadosamente o substrato, o qual foi lavado em conjunto de peneiras granulométricas com malhas de 20 e 400 mesh (vide item 3.5).

Figura 2 – Diferenças no tamanho de larvas de *Diabrotica speciosa*. Larva recém-eclodida (A), e de 2º (B) e 3º ínstar (C). (Escala = 2,0 mm)

Nos experimentos com larvas de 1º ínstar, a escolha hospedeira foi avaliada utilizando-se adaptação metodológica descrita no item 3.5. Já para os experimentos com larvas de 2º e 3º ínstar, a escolha hospedeira foi avaliada por meio de coleta manual dos insetos encontrados em cada tratamento.

Larvas que não foram encontradas nos compartimentos do olfatômetro contendo os tratamentos (plantas, e/ou o branco) foram consideradas “sem escolha”. Após o término

de cada avaliação no olfatômetro, todo o substrato foi autoclavado e seco em estufa a 150°C para o próximo bioensaio.

Figura 3 – Olfatômetro de solo de 6 vias com plantas de milho submetidas à indução por *Diabrotica speciosa*. (A) Olfatômetro mais as câmaras de vidro cobrindo as plantas de milho e com presença de adultos de *D. speciosa*; (B) olfatômetro sem a presença de câmaras de vidro utilizada na herbivoria radicular; (C) liberação de larvas de *D. speciosa* na arena central do olfatômetro para escolha entre plantas induzidas e sem indução (controle).

3.5 Metodologia para estudos comportamentais com larvas de 1º ínstar de *Diabrotica speciosa*

De acordo com Branson (1982) larvas recém eclodidas não são influenciadas pela pré-alimentação, sendo ideais para estudos de busca hospedeira. Entretanto, devido a seu tamanho diminuto e a dificuldade em encontrá-las no substrato, para a avaliação do número de larvas nos ensaios de olfatometria (vide item 3.4), foi necessário criar uma metodologia adaptando as técnicas de centrifugação com solução de sacarose proposta por Jenkins (1964), e a de flutuação em água usada por Branson (1982), visando a separação destas larvas do solo.

Para tanto, 24h após a liberação das larvas na arena central (vide item 3.4), as vias laterais foram desconectadas e o substrato de cada uma das seis vias foi removido e lavado em água corrente sobre duas peneiras de inox (20 e 400 mesh) (Figura 4A, B).

O conteúdo retido na peneira de 400 mesh foi então transferido para copos de plástico (250 ml) com solução de sacarose (454g açúcar/L água). Os copos foram manualmente agitados e mantidos em refrigerador (4°C) por cerca de 5min. Como as larvas possuem uma menor densidade que a solução de sacarose, as larvas tendem a flutuar na superfície (Figura 4E), possibilitando a avaliação do experimento. Baseando-se em ensaios preliminares, o bioensaio foi considerado válido, quando 20 ou mais larvas foram encontradas nas 6 vias laterais, provenientes das 30 larvas liberadas inicialmente na arena central (vide item 3.4).

Após o termino da avaliação de cada olfatômetro, todo o substrato foi autoclavado e seco em estufa a 150°C para o próximo bioensaio.

Figura 4 – Metodologia para estudos comportamentais com larvas de 1º ínstar de *Diabrotica speciosa*. (A, B) Separação do substrato em peneiras granulométricas com 60 e 400 mesh; (C) transferência do conteúdo da peneira de 400 mesh para copos plásticos; (D) substrato com solução de sacarose; (E) larvas flutuando no sobrenadante devido à diferença entre sua densidade e a sacarose

3.6 Coleta e análise dos voláteis radiculares

Para determinar os perfis de voláteis liberados pelas raízes de milho não danificadas (controle) e induzidas pela herbivoria foliar, radicular e foliar + radicular

usando larvas e adultos de *D. speciosa* por 24h, as plantas de milho foram cortadas e as raízes lavadas em água corrente, envolvidas em papel alumínio, e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido (Figura 5A). As raízes foram mantidas em freezer (-30°C) até o momento das análises (DEGENHARDT et al, 2009).

Para a extração dos voláteis, as raízes foram removidas do freezer e transferidas para o nitrogênio líquido para evitar o seu descongelamento. As raízes foram retiradas do papel alumínio e maceradas em um cadinho contendo um pouco de nitrogênio líquido até formarem um pó (Figura 5C). Cerca de 30g desse conteúdo macerado foi transferido para um frasco de 4 mL de tampa com septo por onde a seringa de SPME (PDMS) 100- μ m polydimethylsiloxane (Supelco) foi inserida. As fibras absorventes foram expostas às amostras por 60min à 25°C (RASMANN et al., 2005) (Figura 5D).

Imediatamente após as coletas, as fibras foram injetadas no GC-MS (modelo Varian 4000), contendo coluna capilar HP5-MS (JeW Scientific, Folsom, Califórnia; 30m x 0,25mm x 0,25 μ m) e Hélio como gás de arraste. Para tanto as fibras foram inseridas manualmente no injetor (250°C) e mantidas por 5 minutos para a eluição dos compostos. Após a injeção, a temperatura da coluna foi mantida em 40°C por cinco minutos, elevada até 150°C e mantida por mais um minuto, então elevada novamente até atingir 250°C, temperatura correspondendo ao fim do programa.

Figura 5 – Metodologia utilizada para a extração dos voláteis radiculares em milho. (A, B) Raízes de milho congeladas; (C) maceração da amostra radicular em nitrogênio líquido; (D) pó resultante da maceração das raízes; (E) exposição da fibra de SPME (micro extração em fase sólida) sobre 30g de raízes de milho maceradas para a coleta dos voláteis

3.7 Análise estatística

A normalidade e variância dos dados coletados nos ensaios de olfatométrica e da análise da quantidade total de voláteis emitidos pelas raízes foram analisadas pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene. Posteriormente, os valores obtidos em cada tratamento foram submetidos à análise estatística por GLM (Modelo Linear Generalizado – ‘*Generalized Linear Model*’) de regressão log-linear indicado para dados de contagem (BIRCH, 1963² *apud* TURKMAN, 2000), e ajustados para ‘*over-dispersion*’ (CRAWLEY, 2007). Para tanto, utilizou-se o software estatístico R (versão 2.1.8), considerando apenas as larvas de *D. speciosa* que escolheram um dos tratamentos testados.

Os dados de quantidade relativa (área de pico) dos voláteis emitidos pelos diferentes tratamentos foram avaliados por uma análise exploratória, a análise dos componentes principais (ACP ou PCA – ‘*Principal Component Analysis*’), usando o

² BIRCH, M. W. Maximum likelihood in three-way contingency tables. **Journal of the Royal Statistical Society**, London, v. 52, p. 220-233. 1963.

software estatístico XLSTAT (versão 7.0). O PCA foi inicialmente executado sobre os dados, pois, compostos voláteis individuais dentro de uma mistura não são independentes (HARE, 2011).

O PCA é um método de projeção dos dados (ERIKSSON et al., 2001), onde estes são correlacionados de acordo com sua máxima variância. Nesta análise, a variação contida nos dados (variáveis) originais é condensada em um número menor de dados com uma perda mínima de informação, denominados de componentes principais (OLIVEIRA, 2007). Como usualmente os dados apresentam variâncias numéricas substanciais, que podem influenciar umas nas outras, é indicado que os dados sejam normalizados (BRUINSMA et al, 2010). As áreas de pico de cada composto, corrigidas pelo peso das amostras maceradas, foram transformadas por $\log_{10}$, para então serem analisadas pelo PCA. Para satisfazer os casos onde os valores eram iguais a zero, o valor de um (1) foi adicionado a todos estes dados antes da transformação (TOOKER; DE MORAES, 2007).

O PCA calcula também uma matriz de correlação com as variáveis, indicando por meio desta o grau de correlação entre estas. O coeficiente de correlação (r) varia entre 1 e -1, assim, quanto mais próximos destes valores forem os valores de r de cada variável (tratamento) maior é a correlação existente.

A quantidade total (soma de todas as áreas de pico) de voláteis liberados por plantas induzidas e sem indução foi analisada pela análise da variância paramétrica (ANOVA) e as comparações de pares pelo teste *post hoc* Tukey's HSD. A análise multivariada de variância (MANOVA), após $\log_{10}$ transformação, foi utilizada para analisar o efeito dos tratamentos na emissão de voláteis. Resultados significativos da MANOVA foram analisados pela ANOVA para determinar quais compostos foram afetados pelo tratamento (SCHEINER, 2001³ *apud* SOANA; POLASHOCK; MALO, 2013).

³ SCHEINER, S.M. MANOVA: multiple response variables and multispecies interactions. In: Design and Analysis of Ecological Experiments, 2eds, SCHEINER, S.M.; GUREVITCH, J. New York: Oxford University Press, 2001.p. 99-155.

4 RESULTADOS

4.1 Escolha hospedeira de larvas de 1º ínstar de *Diabrotica speciosa*

Larvas de primeiro instar de *D. speciosa* foram atraídas por odores das raízes de plantas de milho sem indução (controle) em detrimento aos odores de apenas areia umedecida (branco) ($n=8$; $F_{(1, 4)} = 686,17$; $P < 0,001$; Figura 6). Entretanto, as larvas não foram capazes de distinguir entre os voláteis radiculares liberados por plantas de milho sem indução (SI) frente a plantas induzidas pela herbivoria radicular (HR), ($n=8$; $F_{(1, 4)} = 0,0393$; $P = 0,8458$; Figura 6), herbivoria foliar (HF) ($n=8$; $F_{(1, 4)} = 2,445$; $P = 0,1402$; Figura 6), ou plantas induzidas pela herbivoria foliar + radicular (HFR) (por adultos e larvas) ($n=8$; $F_{(1, 4)} = 15,128$; $P = 1$; Figura 6).

Figura 6 – Número médio de larvas ($\pm EP$) de primeiro ínstar de *Diabrotica speciosa* encontradas em plantas de milho sem indução (controle) ou em plantas induzidas pela herbivoria foliar; radicular; e foliar + radicular ($n=8$; $**P < 0,01$;). Gráficos à direita representam a proporção de larvas que não foram encontradas nos compartimentos dos tratamentos, e por isso, consideradas “sem escolha”

4.2 Escolha hospedeira de larvas de 2º e 3º ínstar de *Diabrotica speciosa*

Assim como larvas recém-eclodidas, larvas de segundo e terceiro ínstar também usaram odores liberados pelas raízes para localização hospedeira. Quando confrontados com o branco, contendo apenas areia, as larvas direcionaram-se quase que

exclusivamente para as raízes das plantas de milho sem indução (SI) (Controle) (n=8; $F_{(1, 4)} = 503,7$; $P < 0,001$; Figura 7).

Os voláteis radiculares liberados por plantas de milho induzidas tiveram efeito sobre a escolha hospedeira de larvas de 2º e 3º ínstar de *D. speciosa*. As larvas preferiram os odores liberados pelas raízes de plantas SI frente a odores de plantas induzidas pela HR (n=8; $F_{(1, 4)} = 14,616$; $P = 0,001$; Figura 7).

Figura 7 – Número médio de larvas ($\pm$ EP) de segundo e terceiro ínstar de *Diabrotica speciosa* encontradas em plantas de milho sem indução (controle) ou induzidas pela herbivoria foliar, radicular, e foliar + radicular (n=8; ** $P < 0,01$);. Gráficos à direita representam a proporção de larvas que não foram encontradas nos compartimentos dos tratamentos, e por isso, consideradas “sem escolha”

Já em bioensaios em que se testou o efeito dos voláteis liberados pelas raízes de milho submetidas à HF por adultos de *D. speciosa*, as larvas tiveram preferência por plantas induzidas pela HF em relação às plantas SI (n=8; $\chi^2_{(1, 14)} = 22,877$, $P = 0,009$; Figura 7).

Por outro lado, quando as plantas foram induzidas pela HFR, as larvas não tiveram qualquer preferência entre os odores liberados pelas plantas induzidas pela HFR ou SI, direcionando-se igualmente para ambos os tratamentos (n=8; $F_{(1, 4)} = 0,9683$; $P = 0,3418$; Figura 7).

4.3 Voláteis emitidos por raízes de milho

A análise do total de compostos emitidos pelas raízes de milho revelou diferença entre os tratamentos SI/HF e HR/HFR (Figura 8). Foram identificados 11 compostos liberados pelas raízes das plantas de milho submetidas, ou não, a indução: alfa-copaeno, beta-cariofileno, tetradeceno, germacreno-D, decanal, delta-cadineno, hexacosano, pentadecanal, 6-10-dimetil-5-9-undecadein-2-ona e alfa-humuleno.

Figura 8 – Média relativa ($\pm$ EP) do total de voláteis emitidos pelas raízes de plantas de milho sem indução ($n=10$), ou induzidas pela herbivoria foliar ($n=10$), radicular ($n=10$) e foliar + radicular ($n=9$) por larvas e adultos de *Diabrotica speciosa*. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos. ANOVA seguida de Tukey's HSD ($P<0,001$)

A análise multivariada de variância (MANOVA) mostrou diferenças entre o perfil de voláteis radiculares liberados por plantas SI e plantas induzidas pela HR (Wilks' $\lambda=0,0095$; $F_{(1,11)}=75,64$; $P<0,0008$; Figura 9b) e HFR (Wilks' $\lambda=0,0024$; $F_{(1,11)}=263,41$; $P<0,00004$; Figura 9C). Por outro lado, os perfis de voláteis liberados por plantas SI e plantas induzidas pela HF não foram diferentes entre si (Wilks' $\lambda=0,41$; $F_{(1,11)}=1,31$; $P>0,35$; Figura 9A).

Raízes de milho infestadas com larvas de *D. speciosa* liberaram maiores concentrações de (*E*)- β -cariofileno ($F_{(1,18)}=7,04$; $P<0,05$), copaeno ($F_{(1,18)}=8,17$; $P<0,05$),

óxido de cariofileno ($F_{(1,18)} = 78,02$; $P < 0,001$) e pentadecanal ($F_{(1,18)} = 6,38$; $P < 0,05$) que plantas SI (Figura 9B).

Do mesmo modo, plantas induzidas pela HFR também emitiram maiores concentrações de (*E*)- β -cariofileno ($F_{(1,17)} = 7,84$; $P < 0,05$), copaeno ($F_{(1,17)} = 4,77$; $P < 0,05$), tetradeceno ($F_{(1,17)} = 9,30$; $P < 0,01$), óxido de cariofileno ($F_{(1,17)} = 2195,7$; $P < 0,001$) e pentadecanal ($F_{(1,17)} = 5,80$; $P < 0,05$) que plantas SI (Figura 9C).

Figura 9 – Média relativa ($\pm$ EP) dos voláteis emitidos pelas raízes de plantas de milho sem indução, ou induzidas pela herbivoria de larvas e adultos de *Diabrotica speciosa*. (A) Plantas sem indução (n=10) vs plantas induzidas pela herbivoria foliar (n=10); (B) plantas sem indução (n=10) vs plantas induzidas pela herbivoria radicular (n=10); (C) plantas sem indução (n=10) vs plantas induzidas pela herbivoria foliar + radicular (n=9). Barras acompanhadas de asterisco (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$) representam os compostos responsáveis pela diferença estatística verificada pela MANOVA seguida de ANOVA.

4.3.1 Análise dos componentes principais (PCA)

O resultado do PCA mostrou que os dois primeiros componentes, PC1 e PC2, representaram 99,63% do total da variância (53,54 e 46,09% respectivamente). O primeiro componente foi positivamente correlacionado com os tratamentos SI e HF. O segundo componente, por sua vez, apesar da positiva correlação com todas as variáveis, agrupou os tratamentos SI e HF em um grupo, e HR e HFR em outro, de acordo com suas similaridades, (Figura 10B). Esta correlação entre os tratamentos foi também evidenciada pelos coeficientes ($P < 0,05$) dados pela matriz de correção de Pearson (Tabela 1).

Tabela 1 - Matriz de correlação (coeficiente de correlação de Pearson) considerando os perfis de voláteis radiculares de plantas de milho sem indução (SI); induzidas pela herbivoria foliar (HF); radicular (HR) e foliar + radicular (HFR) por *Diabrotica speciosa*

Variáveis	SI	HF	HR	HF+R
SI	1			
HF	0,999	1		
HR	-0,067	-0,048	1	
HF+R	-0,102	-0,081	0,985	1

*Valores próximos de 1 indicam que há correlação entre os tratamentos ($P < 0,05$).

O 'plot' das observações foi usado para identificar quais compostos melhor contribuíram para a separação dos tratamentos (Figura 10C). O primeiro componente que agrupou os tratamentos SI e HF foi negativamente correlacionado com os compostos (*E*)- β -cariofileno e óxido de cariofileno. Estes terpenos foram liberados em baixas concentrações ((*E*)- β -cariofileno), ou não emitidos pelas raízes de milho SI e induzidas pela HF (óxido de cariofileno) (Figura 10C). Os demais compostos, apesar de serem positivamente correlacionados com o PC1, estão localizados próximos de zero, indicando uma baixa influência sobre a separação dos tratamentos (Figura 10C).

Figura 10 – Análise dos componentes principais (PCA), primeiro e segundo componente principal com 53,54 e 46,09% do total de variação respectivamente. (A) Representação da associação entre os 4 tratamentos analisados (variáveis): herbivoria foliar (HF), herbivoria radicular (HR), herbivoria foliar + radicular (HFR), e planta sem indução (SI) por *Diabrotica speciosa*; (B) distribuição dos 11 compostos voláteis (observações) liberados por raízes de milho; (C) sobreposição da associação e distribuição das variáveis e observações revelada pelo PCA

O segundo componente principal foi positivamente correlacionado com o (*E*)-β-cariofileno, agrupando os tratamentos que produziram altas quantidades deste composto (HR e HFR) e os tratamentos que emitiram baixa quantidade deste composto (SI e HF). O óxido de cariofileno, por sua vez, apresentou correlação negativa com este componente (Figura 10C).

O óxido de cariofileno foi o composto que apresentou altas concentrações nos tratamentos HR e HFR, porém não foi detectado em SI e HF (Figura 9A). Assim esta alta

significância (positiva e negativa) não permitiu a separação de todos que se correlacionam pelo segundo componente principal (Figura 10C).

5 DISCUSSÃO

Insetos de solo estão privados de pistas visuais e guiam-se essencialmente por pistas de natureza química para localizar o seu hospedeiro. Explorar pistas químicas emitidas pelo hospedeiro de modo a localizar uma planta apropriada para o seu desenvolvimento pode garantir o sucesso reprodutivo da espécie.

O presente estudo mostrou que larvas recém-eclodidas de *Diabrotica speciosa*, apesar de se orientarem por pistas químicas até sua planta hospedeira, não foram capazes de distinguir entre voláteis das raízes de plantas sem indução ou induzidas pela herbivoria (Figura 6). Do mesmo modo, larvas de *D. virgifera virgifera*, logo após sua eclosão, também são incapazes de explorar os voláteis liberados pelas plantas na localização hospedeira (STRNAD; BERGMAN, 1987 a).

Nesse grupo de insetos, as larvas ao eclodirem, são muito frágeis e necessitam se alimentar em um breve período de tempo. Larvas neonatas morrem se não localizarem alimento em três dias após sua eclosão, e a sobrevivência na fase adulta, é significativamente reduzida, se a busca por uma planta hospedeira adequada durar mais que 24h (STRNAD; BERGMAN, 1987 a; BRANSON, 1989). Assim, o período entre a eclosão e a localização das raízes pelas larvas é o momento mais vulnerável do ciclo de vida destes insetos (DANTHANARAYANA, 1969), e a escolha de uma planta hospedeira feita pelas mães na hora da oviposição é, muitas vezes, uma estratégia altamente benéfica para insetos cujos imaturos possuem capacidade de locomoção limitada (VALLADARES; LAWTON, 1991; THOMPSON, 1988; BAUR et al., 1996a, b; DEGEN; STADLER; ELLIS, 1999; JOHONSON; BIRCH; GREGORY; MURRAY, 2006).

Sabe-se que fêmeas grávidas de *D. speciosa* tem preferência por ovipositarem em plantas sem indução (não atacadas), pois garantem um melhor desenvolvimento à sua prole (NARDI, 2010). Esses resultados, juntamente com os obtidos no presente trabalho, revelam, portanto, que a escolha materna tem grande importância no *fitness* da espécie.

Diferente das larvas recém eclodidas, larvas de 2º e 3º instar preferiram plantas sem indução à plantas induzidas pela herbivoria radicular (Figura 7). É possível que a preferência larval por plantas sem indução esteja relacionada aos menores níveis de defesa destas quando comparadas a plantas atacadas (ERB; GLAUSER; ROBERT, 2012). Ademais, a ausência de competidores nestas plantas, sugere maior garantia para o seu desenvolvimento (NARDI, 2010; ROBERT et al., 2012a).

Sob o ataque de larvas de *D. speciosa*, as raízes de plantas de milho emitiram grandes quantidades de (*E*)- β -cariofileno e óxido de cariofileno (Figura 9B). Em *D. v. virgifera* o sesquiterpeno (*E*)- β -cariofileno foi também liberado pelas raízes de milho após o ataque de suas larvas (RASMANN et al., 2005). Este composto tem um papel fundamental nas interações com a comunidade do solo, atuando na busca hospedeira de nematoides entomopatogênicos (RASMANN et al., 2005; RASMANN; TURLINGS, 2008), assim como de herbívoros (ROBERT et al., 2012a, b).

Já, o óxido de cariofileno, apesar de ter sido emitido exclusivamente por plantas atacadas no sistema radicular, não parece ter qualquer papel em mediar interações, pois apresentam uma difusão no solo insignificante (HILTPOLD; TURLINGS, 2008). Além desses dois terpenos, plantas infestadas com larvas de *D. speciosa* também emitiram altas concentrações de α -copaeno e pentadecanal, porém, não há relatos de interações ecológicas mediadas por essas moléculas, o que ainda carece de maiores estudos.

O perfil de voláteis radiculares induzidos pela herbivoria foliar por adultos de *D. speciosa*, por outro lado, foi semelhante ao perfil de voláteis emitidos pelas raízes das plantas sem indução (Figura 9A). No entanto, as larvas de *D. speciosa* de 2º e 3º instar preferencialmente selecionaram raízes de milho induzidas pela herbivoria foliar frente a plantas sem indução. Desta maneira, não foi possível detectar nenhum composto candidato responsável pela atração das larvas por plantas induzidas pelos adultos, sendo possível que compostos de baixo peso molecular, somente detectados usando métodos específicos de coleta, tal como o etileno (CRISTESCU et al., 2012), possam ter alguma participação nesta atração, o que ainda precisa ser melhor explorado.

Alguns trabalhos mostram que o etileno, além de ser um fitohormônio volátil envolvido no crescimento e desenvolvimento das raízes (BURG, 1973; TANIMOTO; ROBERTS; DOLAN, 1995), apresenta também um importante papel na escolha hospedeira por organismos de solo. Robert et al. (2012a) verificaram que o ataque nas folhas por lagartas de *S. frugiperda* provocou uma supressão da emissão do etileno pelas raízes, que fez com que larvas de *D. v. virgifera* preferissem plantas sem indução.

Considerando que a herbivoria por diferentes espécies de insetos pode desencadear respostas defensivas distintas nas plantas (DE MORAES et al., 1998), é possível que, ao contrário da supressão de etileno resultante da herbivoria foliar por *S. frugiperda* observada por Robert et al. (2012a), a herbivoria pelos adultos de *D. speciosa* promova uma maior liberação de etileno pelas raízes em comparação às plantas sem

indução, tornando-as mais atraente às larvas de *D. speciosa*. É possível ainda, que larvas de *D. speciosa* usem sinais induzidos por coespecíficos adultos, que podem indicar um hospedeiro nutricionalmente adequado.

A herbivoria foliar pode alterar a quantidade e qualidade de exsudatos radiculares, atraindo insetos, bactérias e nematoides até as raízes (BEZEMER; VAN DAM, 2005). Diversos ácidos graxos (WEISSTEINER; SCHÜTZ, 2006), ácidos fenólicos (CLARK et al., 2011; ROBERT et al., 2012c), constituintes comuns de exsudatos, tem sido identificados como potenciais atrativos de diversas espécies de insetos de solo. Outros trabalhos ainda reportam a importância dos níveis de CO₂ emitidos pelas raízes como um fator complementar a outras pistas no solo para o encontro de um hospedeiro de alta qualidade pelos insetos edáficos (DOANE et al., 1975; BERNKLAU; BJOSTAD, 1998b; PEREIRA; VENTURA; MARQUES, 2005), e parece agir como um estímulo para iniciar o forrageamento (JOHNSON; GREGORY, 2006).

Nos ensaios em que se testou a seleção hospedeira de larvas de 2º e 3º instar de *D. speciosa* frente a plantas induzidas pela herbivoria foliar + radicular e plantas sem indução, as larvas não apresentaram preferência por nenhum dos tratamentos, apesar dos perfis de voláteis liberados pelas raízes de milho dos dois tratamentos diferirem significativamente (Figura 9C).

A herbivoria foliar + radicular induziu uma mistura de voláteis similar à herbivoria radicular (Figura 8; Anexo 2), caracterizada principalmente pela alta concentração de (*E*)-β-cariofileno. Por essa razão, esperava-se que plantas induzidas pela herbivoria foliar + radicular desencadeassem uma resposta comportamental nas larvas de *D. speciosa* semelhante ao observado nos experimentos com plantas submetidas à herbivoria radicular vs planta sem indução (Figura 7).

A emissão de altas concentrações de (*E*)-β-cariofileno pelas raízes de milho é conhecida por ter efeito repelente à larvas de *D. v. virgifera*. Para esta espécie, a concentração de (*E*)-β-cariofileno está intimamente relacionada com a intensidade de coespecíficos presente nas raízes do hospedeiro (ROBERT et al., 2012a, b), além de indicar a possível presença de inimigos naturais (RASMANN et al. 2005). Entretanto, plantas induzidas pela herbivoria foliar + radicular, mesmo emitindo altas concentrações do mesmo terpeno, foi igualmente atrativa a plantas sem indução. Assim, outras pistas químicas, além dos voláteis induzidos pela herbivoria emitidos pelas raízes da planta de milho, devem estar envolvidas na escolha hospedeira das larvas de *D. speciosa*.

Considerando que, além dos voláteis induzidos pela herbivoria radicular, conhecidos por sua natureza repelente em altas concentrações à larvas de *Diabrotica* (ROBERT et al., 2012b), a herbivoria foliar provocada por adultos de *D. speciosa* induza a liberação de pistas que sejam atrativas a larvas desta espécie (Figura 7), é possível que plantas induzidas pela herbivoria foliar + radicular, liberem um conjunto de sinais que causem confusão na orientação larval, resultando na não preferência de larvas de *D. speciosa* entre plantas sem indução e induzidas pela herbivoria foliar + radicular.

Sabe-se que pistas olfativas provindas do hospedeiro podem ocasionalmente conduzir os herbívoros a plantas inadequadas para seu desenvolvimento e sobrevivência (LOUGHRIN; POTTER; HAMILTON-KEMP; BYERS, 1996; MAUCK et al., 2010). Este comportamento pode ocorrer quando a percepção de um composto químico é inibida ou alterada por outro componente da mistura de voláteis (DUCHAMP-VIRET; DUCHAMP; CHAPUT, 2003), ou quando duas moléculas conectam-se a um mesmo receptor olfativo, podendo uma molécula ativar uma resposta enquanto a outra a inibe (DE BRUYNE; FOSTER; CARLSON, 2001). Entretanto, sob uma perspectiva evolutiva, permanece incerto se estratégias de defesa das plantas mascaram compostos atrativos, ou se, limitações sensoriais dos herbívoros contribuem para esta incompatibilidade entre a preferência e a localização do hospedeiro a longa distância e a adequação alimentar (REINECKE; MULLER; HILKER, 2008).

Baseando-se nos resultados aqui apresentados, logo após a eclosão, larvas de *D. speciosa* não são capazes de discriminar hospedeiros de baixa ou alta qualidade nutricional, que segundo Nardi (2010) são plantas de milho com ou sem indução por herbivoria, respectivamente. Por isso, a escolha materna por um hospedeiro adequado para o desenvolvimento da prole parece ser o fator mais importante para o sucesso reprodutivo da espécie. Apesar da escolha hospedeira para o início do desenvolvimento ser feita pela mãe, larvas de *D. speciosa* de 2º e 3º ínstar são capazes de escolher hospedeiros mais adequados para o término de seu desenvolvimento. No entanto, em situação de múltipla herbivoria (indução folia + radicular), larvas de *D. speciosa* não foram capazes de distinguir entre hospedeiros de alta e baixa qualidade.

A análise dos voláteis emitidos pelas raízes do milho após herbivoria revelou que o (*E*)- β -cariofileno foi o composto majoritário e que, a indução foliar não influenciou na emissão dos voláteis pelas raízes, mesmo em combinação com a herbivoria radicular (Figura 9C). Aparentemente, este terpeno pode ser uma pista olfativa importante na busca

hospedeira por larvas de *D. speciosa*, assim como demonstrado para *D. v. virgifera*. Contudo, outras pistas químicas, além dos voláteis induzidos pela herbivoria podem igualmente, desempenhar um papel importante na busca hospedeira pelas larvas de *D. speciosa*, como o etileno (ROBERT et al., 2012b) e o CO₂ (DOANE et al., 1975; STRNAD et al, 1986; STRNAD; BERGMAN, 1987; BERNKLAU; BJOSTAD, 1988a, b; STRNAD; DUNN, 1990; PEREIRA; VENTURA; MARQUES, 2005; REINECKE; MULLER; HILKER, 2008), e a interação entre estes sinais ainda precisa ser melhor explorado.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo mostrou que larvas neonatas de *Diabrotica speciosa* não foram capazes de distinguir os melhores hospedeiros para o seu desenvolvimento, sugerindo que a escolha do local de oviposição pelas mães é a estratégia mais benéfica para os insetos cujos imaturos possuem limitada capacidade de locomoção (VALLADARES; LAWTON, 1991; THOMPSON, 1988; BAUR et al., 1996a, b; DEGEN; STADLER; ELLIS, 1999; JOHONSON; BIRCH; GREGORY; MURRAY, 2006). Larvas de 2º e 3º ínstar, por outro lado, apresentaram grande capacidade de escolha hospedeira, com notável preferência por plant sem indução à plantas induzidas pela herbivoria radicular, possivelmente devido aos menores níveis de defesa (ERB, GLAUSER, ROBERT, 2012), e a ausência de competidores (NARDI, 2010; ROBERT et al., 2012a), nas plantas não atacadas. Adicionalmente, estas larvas também apresentaram preferência por plantas induzidas pela herbivoria foliar a plantas não induzidas. Os compostos voláteis emitidos pelas raízes de milho e identificados neste trabalho, não foram suficientes para elucidar o mecanismo de busca hospedeira de larvas desta espécie. Aparentemente, outras pistas químicas, isoladamente ou em conjunto com as que foram identificadas, possam estar envolvidas com a busca hospedeira de *D. speciosa*, o que necessita ainda ser melhor explorado.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, A.A. Induced responses to herbivory and increased plant performance. **Science**, Washington, v. 279, p. 1201-1202, 1998.
- AGRAWAL, A.A. Induced responses to herbivory in wild radish Effects on several herbivores and plant fitness. **Ecology**, New York, v. 80, p. 1713-1723, 1999.
- ALI, J.G.; ALBORN, H.T.; STELINSKI, L.L. Subterranean herbivore induced volatiles released by Citrus roots upon feeding by *Diaprepes abbreviatus* recruit Entomopathogenic nematode. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 36, p. 361-368, 2010.
- ALI, J.G.; ALBORN, H.T.; STELINSKI, L.L. Constitutive and induced subterranean plant volatiles attract both entomopathogenic and plant parasitic nematodes. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 99, n.1, p. 26-35, 2011.
- ÁVILA, C.J.; MILANEZ, J.M. Larva alfinete. In: SALVADORI, J.R.; ÁVILA, C.J.; SILVA, M. T.B. **Pragas de solo no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2004. p. 345-378.
- BARDGETT, R.D; WARDLE, D.A. Herbivore-mediated linkages between aboveground and belowground communities. **Ecology**, Oxford, v. 84, p. 2258-2268, 2003.
- BAUR, R.; KOŠTÁL, V.; PATRIAN, B.; STÄDLER, E. Preference for plants damaged by conspecific larvae in ovipositing cabbage root flies: influence of stimuli from leaf surface and roots. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 81, p. 353-364, 1996a.
- BAUR, R.; KOŠTÁL, V.; STÄDLER, E. Root damage by conspecific larvae induces preference for oviposition in cabbage root flies. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 80, p. 224-227, 1996b.
- BERNAYS, E.A.; CHAPMAN, R.F. **Hostplant Selection by Phytophagous Insects**. New York:Chapman & Hall, 1994. 312p.
- BERNKLAU E.J.; BJOSTAD L.B. Reinvestigation of host location by western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae): CO₂ is the only volatile attractant. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.91, n.6, p. 1331-1340, 1998a.
- BERNKLAU, E.J.; BJOSTAD, L.B. Behavioral responses of first-instar western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae): to carbon dioxide in a glass bead bioassay. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.91, n.2, p. 445-456, 1998b.
- BEZEMER, T.M.; WAGENAAR, R.; VAN DAM, N.M.; WÄCKERS. F.L. Interactions between above- and belowground insect herbivores as mediated by the plant defense system. **Oikos**, Copenhagen, v. 101, n.3, p. 555-562, 2003.
- BEZEMER, T.M.; WAGENAAR, R.; VAN DAM, N.M.; VAN DER PUTTEN, WÄCKERS. F.L. Above- and below-ground terpenoid aldehyde induction in cotton, *Gossypium herbaceum*, following root and leaf injury. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 30, n. 1, p. 53-67, 2004.

- BEZEMER, T.M.; VAN DAM, N.M. Linking aboveground and belowground interactions via induced plant defenses. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 20, n. 11, p. 617-624, 2005.
- BRANSON, T.F. Olfactory response of larvae of *Diabrotica virgifera virgifera* to plant roots. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v.31, p. 303-1307, 1982.
- BRANSON, T.F.; KRYSAN, J.L. Feeding and oviposition behavior and life cycle strategies of *Diabrotica*: an evolutionary view with implications for pest management. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 10, n.6, p. 826-831, 1981.
- BRANSON, T.F.; GUSS, P.L.; ORTMAN, E.E. Toxicity of sorghum roots to larvae of western corn rootworm. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 62, n.1, p. 1375-1378, 1969.
- BRUINSMA, M.; BROEKHOVER, S.V.; POELM, E.H.; POSTHUMUS, M.A.; MULLER, M.J.; VAN LOON, J.J.A.; DICKE, M. Inhibition of lipoxygenase affects induction of both direct and indirect plant defenses against herbivorous insects. **Oecologia**, Heidelberg, v. 162, p. 393-404, 2010.
- BURG, S.P. Ethylene in plant Growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, New York, v. 70, n.2, p. 591-597, 1973.
- CLARK, K.E.; HARTLEY, S.E.; JOHNSON, S.N. Does mother know best? The preference–performance hypothesis and parent–offspring conflict in aboveground–belowground herbivore life cycles. **Ecological Entomology**, London, v. 36, n.2, p. 117-124, 2011.
- CRAWLEY, M.J. **The R Book**. West Sussex: John Wiley, 2007. 942p.
- CRISTESCU, S.M.; MANDON, J.; ARSLANOV, D.; DE PESSEMIER, J.; HERMANS, C.; HARREN, J.M. Current methods for detecting ethylene in plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 111, n.3, 347-360, 2012.
- DANTHANARAYANA, W. Populations dynamics of the weevil *Sitona regensteinsis* (Hbst.) on broom. **Journal animal Ecology**, Malden, v. 38, p. 1-18, 1969.
- DE BRUYNE, M.; FOSTER, K.; CARLSON, J.R. Odor coding in the *Drosophila* antenna. **Neuron**, St. Louis, v. 30, p. 537-552, 2001.
- DEGEHARDT, J.; HILTPOLD, I.; KÖLLNER, T.G.; FREY, M.; GIERL, A.; GERSHENZON, J.; HIBBARD, B.E.; ELLESIECK, M.R.; TRLINGS, T.C.J. Restoring a maize root signal that attracts insect-killing nematodes to control a major pest. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, New York, v. 106, n.32, p. 13213-13218, 2009.
- DE MORAES, C.M.; LEWIS, W.J.; PARE, P.W.; ALBORN, H.T.; TUMLINSON, J.H. Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. **Nature**, London, v. 393, p. 570-573, 1998.

DEGEN, T.; STADLER, E.; ELLIS, P.R. Host-plant susceptibility to the carrot fly, *Psila rosae*. 3. The role of oviposition preferences and larval performance. **Annals of Applied Biology**, Malden, v. 134, p. 27-34, 1999.

DOANE, J.F.; LEE, Y.W.; KLINGER, J.; WESTCOTT, N.D. The orientation response of *Ctenicera destructor* and other wireworms (Coleoptera: Elateridae) to germinating grain and to carbon dioxide. **Canadian Entomology**, Lanham, v. 9, p. 1233-1252, 1975.

DUCHAMP-VIRET, P.; DUCHAMP, A.; CHAPUT, M.A. Single olfactory sensory neurons simultaneously integrate the components of an odour mixture. **European Journal of Neuroscience**, Malden, v. 18, p. 2690-2696, 2003.

ERB, M.; GLAUSER, G.; ROBERT, C. Induced immunity against belowground insect herbivores- activation of defenses in the absence of a jasmonate burst. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 38, n.6, p. 629-640, 2012.

ERIKSSON, L.; JOHANSSON, E.; KETTANEH-WOLD, N.; WOLD, S. **Multi- and Megavariate Data Analysis: Principles and Applications**. Umea: Umetrics Academy, 2001. 426p.

HARE J.D. Ecological role of volatiles produced by plants in response to damage by herbivorous insects. **Annual Review Entomology**, Palo Alto, v. 56, p. 161-180, 2011.

HIBBARD, B.E.; BJOSTAD, L.B. Behavioral responses of western corn rootworm larvae to volatile semiochemicals from corn seedlings. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 14 n.6, p. 1523-1539, 1988.

HIBBARD, B.E.; BJOSTAD, L.B. Isolation of corn semiochemicals attractive and repellent to western corn rootworm larvae, **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 16, n.12, p. 3425-3439, 1990.

HIBBARD, B.E.; HOGDON, M.L.; DURAN, D.P.; SCHWEIKERT, Y.M.; ELLERSIECK, M. R. Role of egg density on establishment and plant-to-plant movement by western corn rootworm larvae (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 97, n.3, p. 871-882, 2004.

HILTPOLD, I.; TURLINGS, T.C.J. Belowground chemical signaling in maize: when simplicity rhymes with efficiency. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 34, n. 5, p. 628-635, 2008.

HILTPOLD, I.; ERB, M.; ROBERT, C.A.M.; TURLINGS, T.C.J. Systemic root signalling in a belowground, volatile-mediated tritrophic interaction. **Plant, Cell and Environment**, Melden, v. 34, n.8, p. 1267-1275, 2011.

HILTPOLD, I.; BARONI, M.; TOEPFER, S.; KUHLMANN, U.; TURLINGS, T.C.J. Selective breeding of entomopathogenic nematodes for enhanced attraction to a root signal did not reduce their establishment or persistence after field release. **The journal of Experimental Biology**, London, v. 10, n.11, p. 2417-2423, 2010.

HOL, W.H.G.; MACEL, M.; VAN VEEN, J.A.; VAN DER MEIJDEN, E. Root damage and aboveground herbivory change concentration and composition of pyrrolizidine alkaloids of *Senecio jacobaea*. **Basic and Applied Ecology**, Jena, v. 5, n. 3, p. 253-260, 2004.

JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, New York, v. 48, p. 492, 1964.

JOHNSON, S.N.; GREGORY, P.J. Chemically mediated host-plant location and selection by root-feeding insects. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 1-13, 2006.

JOHNSON, S.N.; BIRCH, A.N.E.; GREGORY, P.J.; MURRAY, P.J. The 'mother knows best' principle: should soil insects be included in the preference – performance debate? **Ecological Entomology**, London, v. 31, n. 4, p. 395-401, 2006.

JOHNSON, S.N.; NIELSEN, U.N. Foraging in dark chemically mediated host plant location by belowground insect herbivores. **Journal Chemical Ecology**, New York, v. 38 n.6, p. 604-614, 2012.

KARBAN, R.; BALDWIN, I.T. **Induced responses to herbivory**. Chicago, Illinois: University of Chicago Press, 1997. 330p.

KOSTENKO, O.; VAN DE VOORDE, T.F.J.; MULDER, P.P.J.; VAN DER PUTTEN, W.H.; BEZEMER, T.M. Legacy effects of aboveground-belowground interactions. **Ecology**, New York, v. 15, n. 8, p. 813-821, 2012.

LOUGRIN, J.A.; POTTER, D.A.; HAMILTON-KEMP, T.R.; BYERS, M.E. Volatiles compounds from crabapple (*Mallus* spp.) cultivars differing in susceptibility to the japanese beetle (*Popillia japonica* Newman). **Journal Chemical Ecology**, New York, v. 22, p. 1295-1305, 1996.

MARQUES, G.B.C.; AVILA, C.J.; PARRA, J.R.P. Danos causados por larvas e adultos de *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n.11, p. 1983-1986, 1999.

MASTERS, J.G.; BROWN. Plant-mediated interactions between two spatially separated insects. **Functional Ecology**, United Kingdom, v. 6, p. 175-179, 1992.

MASTERS, J.G.; BROWN, V.K.; GANGE, A.C. Plant mediated interactions between above and belowground insects herbivores. **Oikos**, Copenhagen, v. 66, n.1, p. 148-151, 1993.

MAUCK, K.E.; DE MORAES, C.M.; MESCHER, M.C. 2010. Deceptive chemical signals induced by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, New York, v. 107, p. 3600-3605, 2010.

MORAN, N.A.; WHITHAM, T.G. Interspecific competition between root-feeding and leaf-galling aphids mediated by host-plant resistance. **Ecology**, New York, v. 71, n.3, p. 1050-1058, 1990.

NARDI, C. **Estímulos olfativos envolvidos no comportamento sexual e na seleção hospedeira de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae)**. 2010. 105p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

OLIVEIRA, R.C.S. **Deteção de adulteração de café torrado e moído com cevada pelo perfil cromatográfico de voláteis**. 2007. 196p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

PEREIRA, T.; VENTURA, M.U.; MARQUES, F.A. Comportamento de larvas de *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) em resposta ao CO₂ e a plântulas de espécies cultivadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n.5, p.981-985, 2005.

PICANÇO, M.C.; MOURA, M.F.; MOREIRA, M.D.; ANTÔNIO, A.C. Biologia, identificação e manejo de mosca - branca em fruteiras. In: ZAMBOLIN, L. (Ed.). **Manejo integrado: produção integrada, fruteiras tropicais, doenças e pragas**. Viçosa: UFV, 2003. p. 243-284.

PIERRE, P.S.; JANSEN, J.J.; HORDIJK, C.A.; VAN DAM, N.M.; CORTESERO, A.M.; DUGRAVOT, S. Differences in Volatile Profiles of Turnip Plants Subjected to Single and Dual Herbivory Above- and Belowground. **Journal Chemical Ecology**, New York, v. 37 n.4, p. 368-377, 2011.

PRICE, P.W.; BOUTON, C.E.; GROSS, P.; MCPHERON, B.A.; THOMPNDON, J.N.; WEIS, A.E. Interactions among three trophic levels: Influence of plants on interactions between insects herbivores and natural enemies. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 11, p. 41-65, 1980.

RASMANN, S.; TURLINGS, T.C.J. Simultaneous feeding by aboveground and belowground herbivores attenuates plant-mediated attraction of their respective natural enemies. **Ecology Letters**, Oxford, v. 10, n.10, p. 926-936, 2007.

RASMANN, S.; TURLINGS, T.C.J. First insights into specificity of belowground tritrophic interactions. **Oikos**, Copenhagen, v. 117, n.3, p. 362-369, 2008.

RASMANN, S.; KÖLLNER, T.G.; DEGENHARDT, J. HILTPOLD, I.; TOEPFER, S.; KUHLMANN, U.; GERSHENZON, J.; TURLINGS, T.C.J. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect damaged maize roots. **Nature**, London, v. 434, p. 732-737, 2005.

REINECKE, A.; MULLER, F.; HILKER, M. Attractiveness of CO₂ release by root respiration fades on the background of root exudates. **Basic and Applied Ecology**, Jena, v. 9, p. 568-576, 2008.

ROBERT, C.A.M.; ERB, M.; DUPLOYER, M.; ZWAHLEN, C.; DOYEN, G.R.; TURLINGS, T.C.J. Herbivory- induced plant volatiles mediate host selection by a root herbivore. **New Phytologist**, Cambridge, v. 194, n.4, p. 1061-1069, 2012a.

ROBERT, C.A.M.; ERB, M.; HIBBARD, B.E.; FRENCH, B.W.; ZWAHLEN, C.; TURLINGS, T.C.J. A specialist root herbivore reduces plant resistance and uses an induced plant volatile to aggregate in a density-dependent manner. **Functional Ecology**, Oxford, v. 26 n.6, p. 1429-1440, 2012b.

ROBERT, C.A.M.; VEYRAT, N.; GLAUSER, G.; MARTI, G.; DOYEN, G.R.; VILLARD, N.; GAILLAND, M.; KÖLLNER, T.; GIRON, D.; BODY, M.; BABST, B.; FERRIERI, R.; TURLINGS, T.C.J.; ERB, M. A specialist root herbivore exploits defensive metabolites to locate nutritious tissues. **Ecology Letters**, Oxford, v.15, p. 55-64, 2012c.

SCHOONHOVEN, L.M.; VAN LOON, J.J.A.; DICKE, M. **Insect-Plant Biology**, Oxford: University Press, 2005. 421p.

SOANA, C.R.R.; POLASHOCK, J.; MALO, E.A. Jasmonate mediated induced volatiles in American cranberry, *Vaccinium macrocarpon*: from gene expression to organismal interactions. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, p. 115-117, 2013.

SOLER, R.; BEZEMER, T.M.; CORTESERO, A.M.; VAN DER PUTTEN, W.H.; VET, L.E.M.; HARVEY, J.A. Impact of foliar herbivory on the development of a root-feeding insect and its parasitoid. **Oecologia**, Berlin, v. 152, n.2. p. 257-264, 2007.

STRNAD, S.P.; DUNN, P.E. Host search behaviour of neonate western rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). **Journal of Insect Physiology**, Columbus, v. 36, n.3, p. 201-205, 1990.

SOLER, R.; BEZEMER, T.M.; VAN DER PUTTEN, W.H.; VET, L.E.M.; HARVEY, J.A. Root herbivore effects on above-ground herbivore, parasitoid and hyperparasitoid performance via changes in plant quality. **Journal of animal Ecology**, Malden, v. 74, n.6, p. 1121-1133, 2005.

SOLER, R.; HARVEY, J.A.; KAMP, A.F.D.; VET, L.E.M.; VAN DER PUTTEN, W. H.; VAN DAM, N.M.; STUEFER, J.F.; GOLS, R.; HORDIJK, C.A.; BEZEMER, T.M. Root herbivores influence the behaviour of an aboveground parasitoid through changes in plant-volatile signals. **Oikos**, Copenhagen, v. 116, p. 367-376, 2007.

STRNAD, S.P.; BERGMAN, M.K. Movement of first-instar western corn rootworms (Coleoptera: Chrysomelidae) in soil. **Environmental Entomology**, College Park, v. 16, n.4, p. 975-978, 1987a.

STRNAD, S.P.; BERGMAN, M.K. Distribution and orientation of western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) larvae in corn roots. **Environmental Entomology**, College Park, v. 16, n.5, p. 1193-1198, 1987b.

STRNAD, S.P.; BERGMAN, M.K.; FULTON, W.C. First-instar western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) response to carbon dioxide. **Environmental Entomology**, College Park, v. 15, n.4, p. 839-842, 1986.

TANIMOTO, M.; ROBERTS, K.; DOLAN, L. Ethylene is a positive regulator of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 8, n. 6, p. 943-948, 1995.

THOMPSON, J.N. Evolutionary ecology of the relationship between oviposition preference and performance of offspring in phytophagous insects. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 47, p. 3-14, 1988.

TOOKER, J.F.; DE MORAES, C.M. Feeding by Hessian fly *Mayetiola destructor* (Say) larvae does not induce plant indirect defenses. **Ecological Entomology**, Malden, v. 32, p. 153-161, 2007.

TURKMAN, M.A.A. Modelos lineares generalizados: da teoria à prática. Universidade de Lisboa, 2000. 151p.

TURLINGS, T.C.J.; TUMLINSON, J.H. Do parasitoids use herbivore induced plant chemicals defenses to locate hosts? **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 74, p. 42-50, 1991.

TURLINGS, T.C.J.; LENGWILER, U.B.; BERNASCINI, M.L.; WECHSLER, D. Timing of induced volatiles emissions in maize seedlings. **Planta**, Berlin, v. 207, p. 146-152, 1998.

VALLADARES, G.; LAWTON, J. H. Host-plant selection in the holly leaf-miner does mother know best? **Journal of Animal Ecology**, London, v. 60, n.1, p. 227-240, 1991.

VAN DAM, N.M.; RAAIJMAKERS, C.E.; VAN DER PUTTEN, W.H. Root herbivory reduces growth and survival of the shoot feeding specialist *Pieris rapae* on *Brassica nigra*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v.115, n.1, p.161-170, 2005.

VAN DAM, N.M.; QUI, B.A.; HORDIJK, A.A.; VET, L.E.M.; HANSEN, J.J. Identification of biologically relevant compounds in aboveground and belowground induced volatiles blends. **Journal Chemical Ecology**, New York, v. 36, n.9, p. 1006-1016, 2010.

VAN TOL, R.W.H.M.; VAN DER, A.T.C.; BOFF, M.I.C.; VAN BEZOOIJEN, J.; SABELIS, M.W.; SMITS, P.H. Plants protect their roots by alerting the enemies of grubs. **Ecology Letters**, Oxford, v. 4, n.4, p. 292-294, 2001.

WACKERS, F.L.; BEZEMER, T.M. Root herbivory induces an above-ground indirect defense. **Ecology Letters**, Oxford, v. 6, p. 9-12, 2003.

WAQUIL, J.M; MENDES, S.M; MARUCCI, R.C. Ocorrência de espécies de *Diabrotica* em milho no Brasil: qual a predominante, *Diabrotica speciosa* ou *Diabrotica viridula*?. Sete Lagoas. Embapa, 2010. 5p. (Comunicado técnico, 178).

WEISSTEINER, S.; SCHÜTZ, S. 2006. Are different volatile pattern influencing host plant choice of belowground living insects. **Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Allgemeine und Angewandte Entomologie**, Berlin, v. 15, p. 51-55, 2006.

ANEXOS

ANEXO 1 – Número médio de larvas ($\pm$ EP) de primeiro (A) e de segundo e terceiro ínstar (B) de *Diabrotica speciosa* encontradas em plantas de milho sem indução (controle) ou em potes contendo apenas areia + pedra umedecida (Branco) (n=8). Gráficos à direita representam a proporção de larvas que não foram encontradas nos compartimentos dos tratamentos, e por isso, consideradas “sem escolha”

ANEXO 2 – Média relativa ($\pm$ EP dos voláteis emitidos por raízes de plantas de milho sem indução ($n=10$), ou induzidas pela herbivoria foliar ($n=10$), radicular ($n=10$), e foliar + radicular ($n=9$) por larvas e adultos de *Diabrotica speciosa*. Voláteis coletados em micro extração em fase sólida (Solid-phase-micro-extraction - SPME) e analisados em cromatografo gasosos acoplado a espectrômetro de massas (GC-MS). MANOVA (Wilks' $\lambda= 0,019$; $F_{(1,11)}=6,37$; $P<0,01$)