

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**METODOLOGIA DE PESQUISA, CATEGORIAS E
MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM MILHO A *Diabrotica
speciosa* (GERMAR) E *Oligonychus pratensis* (BANKS)**

**Eduardo Neves Costa
Engenheiro Agrônomo**

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**METODOLOGIA DE PESQUISA, CATEGORIAS E
MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM MILHO A *Diabrotica
speciosa* (GERMAR) E *Oligonychus pratensis* (BANKS)**

Eduardo Neves Costa

Orientador: Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Júnior

Coorientadora: Profa. Dra. Sarah Natalie Zukoff

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Entomologia Agrícola)**

2016

C837m Costa, Eduardo Neves
Metodologia de pesquisa, categorias e mecanismos de
resistência em milho a *Diabrotica speciosa* (Germar) e *Oligonychus
pratensis* (Banks) / Eduardo Neves Costa. – – Jaboticabal, 2016
vi, 121 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: Arlindo Leal Boiça Júnior
Coorientadora: Sarah Natalie Zukoff
Banca examinadora: Francisco Jorge Cividanes, Daniel Junior de
Andrade, Marina Robles Angelini, Flávio Gonçalves de Jesus
Bibliografia

1. *Zea mays*. 2. Antibiose. 3. Antixenose. 4. Tolerância. 5.
Barreiras morfológicas. 6. Larva-alfinete. I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 595.76:633.15

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: METODOLOGIA DE PESQUISA, CATEGORIAS E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM MILHO A *Diabrotica speciosa* (GERMAR) E *Oligonychus pratensis* (BANKS)

AUTOR: EDUARDO NEVES COSTA

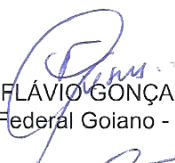
ORIENTADOR: ARLINDO LEAL BOIÇA JUNIOR

CO-ORIENTADORA: SARAH NATALIE ZUKOFF

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. ARLINDO LEAL BOIÇA JUNIOR
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. FLÁVIO GONÇALVES DE JESUS
Instituto Federal Goiano - IFG / Campus de Urutaí, GO



Prof. Dr. DANIEL JUNIOR DE ANDRADE
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. FRANCISCO JORGE CIVIDANES
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. MARINA ROBLES ANGELINI
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro / Uberlândia/MG

Jaboticabal, 26 de julho de 2016

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

EDUARDO NEVES COSTA – Filho de Élcio Francisco Costa e Maria Neves Gonçalves Costa, natural de São Paulo, SP, nascido no dia 15 de julho de 1986. Graduado no curso de Engenharia Agrônômica do Centro Universitário Moura Lacerda, Ribeirão Preto, SP, onde realizou estágios nas áreas de Manejo Ecológico de Pragas e Controle Biológico de Insetos Pragas. Em março de 2011, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Entomologia Agrícola, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal, SP, atuando em pesquisas de resistência de plantas a insetos pragas e inseticidas botânicos, sob orientação do Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Júnior, sendo bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq. Em março de 2013, iniciou o curso de Doutorado em Entomologia Agrícola pela mesma instituição, sendo bolsista do CNPq, e orientado pelo Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Júnior. No terceiro ano do curso de Doutorado, realizou estágio de Doutorado Sanduíche em Kansas State University – KSU, nas cidades de Manhattan e Garden City, KS, EUA, entre janeiro a setembro de 2015, sob a supervisão do Prof. Dr. Charles Michael Smith e da Dra. Sarah Natalie Zukoff, com auxílio da CAPES, através do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior – PDSE/CAPES. Possui, atualmente, como resultado de atividade científica junto à sua equipe de laboratório, 23 artigos publicados em periódicos a nível nacional e internacional, com destaque para três artigos classificados como “A2” e nove artigos classificados como “B1” (QUALIS CAPES 2015).

“Sem Deus, o universo não é explicável satisfatoriamente”

“A ciência sem a religião é parálitica. E a religião sem a ciência é cega...”

Albert Einstein

Dedico

Aos meus pais, Élcio Francisco Costa e Maria Neves Gonçalves Costa, e aos meus irmãos, Evilásio Neves Costa e Elaine Neves Costa, pela companhia, pelos ensinamentos, e pelo amor, fundamentais em nossa vida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar... a Deus. Ele sempre está ao nosso lado, Ele é fiel!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Júnior, pela orientação e sua forma aberta ao discutir a presente Tese em todas suas fases, com o objetivo de se conseguir o melhor trabalho possível.

Aos professores estrangeiros, Dra. Sarah Natalie Zukoff e Dr. Charles Michael Smith, por terem me recebido na “Kansas State University”, fornecendo-me condições para o desenvolvimento de meu estágio de Doutorado Sanduíche.

À Profa. Dra. Durvalina Maria Mathias dos Santos, do Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária, da FCVA/UNESP, e ao Prof. Dr. Helder Louvandini, do Laboratório de Nutrição Animal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), pelas análises realizadas em seus respectivos laboratórios.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, pela oportunidade da realização do Curso de Doutorado em Entomologia Agrícola, e à “Kansas State University”, por ter aberto suas portas para a realização do meu estágio de Doutorado Sanduíche.

Aos professores do curso de pós-graduação em Entomologia Agrícola, por terem transmitido conhecimento e experiência adquiridos em suas respectivas áreas, que obtive através das disciplinas cursadas, cursos, e bancas.

Aos professores Dr. Francisco Jorge Cividanes, Dra. Nilza Maria Martinelli, Dr. Daniel Junior de Andrade, e Dr. Raphael de Campos Castilho, pela participação e contribuição no meu exame geral de qualificação.

Aos professores Dr. Flávio Gonçalves de Jesus, Dra. Marina Robles Angelini, Dr. Francisco Jorge Cividanes, e Dr. Daniel Junior de Andrade, pela participação na minha defesa de Tese de Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado.

À CAPES, pela concessão da bolsa de Doutorado Sanduíche, proveniente do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE-CAPES).

Aos colegas do Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos: Bruno Henrique Sardinha de Souza, Zulene Antonio Ribeiro, Luciano Nogueira, Wellington

Ivo Eduardo, Renato Franco Oliveira de Moraes, Mirella Marconato Di Bello, Marcelo Muller de Freitas, e Carlos Alessandro de Freitas.

Ao Sr. André Emilio Jantara, da ASPTA – Agricultura Familiar e Agroecologia, de Palmeira, Paraná, por ter gentilmente nos concedido as sementes de milho crioulo.

Aos colegas dos demais laboratórios do curso de pós-graduação em Entomologia Agrícola.

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade, Lígia Dias Fiorezzi, Roseli Pessoa, Celso de Deus Sant'Anna, e José Altamiro de Souza.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1. Introdução	1
2. Revisão de literatura	3
2.1. A cultura do milho	3
2.2. <i>Diabrotica speciosa</i>	6
2.3. <i>Oligonychus pratensis</i>	8
2.4. Resistência de plantas a artrópodes	11
2.4.1. Defesas diretas e indiretas de plantas a artrópodes	12
2.4.2. Processos morfológicos na defesa da planta contra artrópodes	12
2.4.3. Processos químicos na defesa da planta contra artrópodes	13
2.4.4. Marcadores moleculares na resistência de plantas a artrópodes	14
3. Referências	15
CAPÍTULO 2 – Fatores associados à expressão de antibiose a <i>Diabrotica speciosa</i> (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) em cultivares de milho crioulo	27
RESUMO.....	27
1. Introdução	29
2. Material e Métodos	30
2.1. Criação de insetos	31
2.2. Aspectos biológicos de <i>Diabrotica speciosa</i> alternando-se a proporção do número de larvas por plantas de milho	32
2.3. Aspectos biológicos de <i>Diabrotica speciosa</i> alimentada com raízes de plantas de milho crioulo na fase larval.....	33
2.4. Período de oviposição, fecundidade e fertilidade de ovos de <i>Diabrotica</i> <i>speciosa</i> alimentada em raízes de cultivares de milho crioulo na fase larval	34
2.5. Barreiras morfológicas e fenóis totais em raízes de plantas de milho com ou sem infestação de larvas de <i>Diabrotica speciosa</i>	35
2.6. Análise estatística	35
3. Resultados	36

3.1. Aspectos biológicos de <i>Diabrotica speciosa</i> alternando-se a proporção do número de larvas por plantas de milho	36
3.2. Aspectos biológicos de <i>Diabrotica speciosa</i> alimentada com raízes de plantas de milho crioulo na fase larval	36
3.3. Período de oviposição, fecundidade e fertilidade de ovos de <i>Diabrotica speciosa</i> alimentada em raízes de cultivares de milho crioulo na fase larval	38
3.4. Barreiras morfológicas e fenóis totais em raízes de plantas de milho com ou sem infestação de larvas de <i>Diabrotica speciosa</i>	43
4. Discussão	44
5. Agradecimentos	48
6. Referências	49
CAPÍTULO 3 – Metodologia para avaliação de tolerância em cultivares de milho crioulo a larvas de <i>Diabrotica speciosa</i> (Germar) e efeitos de compostos associados com a fisiologia da planta	55
RESUMO	55
1. Introdução	57
2. Material e Métodos	59
2.1. Procedimentos gerais	59
2.2. Número de larvas de <i>Diabrotica speciosa</i> por planta de milho	59
2.3. Influência da idade da planta na suscetibilidade de milho ao ataque de larvas de <i>Diabrotica speciosa</i>	60
2.4. Tolerância de cultivares de milho crioulo ao ataque de larvas de <i>Diabrotica speciosa</i>	60
2.5. Teores de clorofila, carotenóides, glicina betaína e prolina em folhas de plantas de milho	61
2.6. Análise estatística	63
3. Resultados	64
3.1. Número de larvas de <i>Diabrotica speciosa</i> por planta de milho	64
3.2. Influência da idade da planta na suscetibilidade de milho ao ataque de larvas de <i>Diabrotica speciosa</i>	64
3.3. Tolerância de cultivares de milho crioulo ao ataque de larvas de <i>Diabrotica speciosa</i>	66
3.4. Teores de clorofila, carotenóides, glicina betaína e prolina em folhas de plantas de milho	67
4. Discussão	69

5. Referências	73
CAPÍTULO 4 – Metodologia para avaliação da antixenose para oviposição de <i>Diabrotica speciosa</i> (Germar) em cultivares de milho crioulo	78
RESUMO.....	78
1. Introdução	80
2. Material e Métodos.....	81
2.1. Informações gerais.....	81
2.2. Influência da presença da planta hospedeira na oviposição de <i>Diabrotica speciosa</i>	82
2.3. Número de casais de <i>Diabrotica speciosa</i> por planta de milho.....	83
2.4. Efeitos da fonte alimentar e de diferentes idades de plantas de milho na oviposição de <i>Diabrotica speciosa</i>	83
2.5. Oviposição de <i>Diabrotica speciosa</i> em diferentes cultivares de milho crioulo	84
2.6. Análise estatística	85
3. Resultados	85
3.1. Influência da presença da planta hospedeira na oviposição de <i>Diabrotica speciosa</i>	85
3.2. Número de casais de <i>Diabrotica speciosa</i> por planta de milho.....	86
3.3. Efeitos da fonte alimentar e de diferentes idades de plantas de milho na oviposição de <i>Diabrotica speciosa</i>	87
3.4. Oviposição de <i>Diabrotica speciosa</i> em diferentes cultivares de milho crioulo	88
4. Discussão.....	89
5. Referências	93
CAPÍTULO 5 – Antibiose e tolerância a <i>Oligonychus pratensis</i> (Banks) (Acari: Tetranychidae) em híbridos de milho resistentes à seca	96
RESUMO.....	96
1. Introdução	98
2. Material e Métodos.....	100
2.1. Informações gerais.....	100
2.2. Criação do ácaro <i>Oligonychus pratensis</i>	101
2.3. Desenvolvimento e sobrevivência de <i>Oligonychus pratensis</i> em folhas confinadas de híbridos de milho resistentes à seca.....	101
2.4. Efeitos da infestação de <i>Oligonychus pratensis</i> em plantas de híbridos de milho resistentes à seca.....	102

2.5. Condutância estomática e conteúdo de clorofila em folhas de híbridos de milho resistentes à seca.....	103
2.6. Marcadores moleculares associados à resistência de plantas a artrópodes	103
2.7. Análise estatística	105
3. Resultados	105
3.1. Desenvolvimento e sobrevivência de <i>Oligonychus pratensis</i> em folhas confinadas de híbridos de milho resistentes à seca.....	105
3.2. Efeitos da infestação de <i>Oligonychus pratensis</i> em plantas de híbridos de milho resistentes à seca.....	106
3.3. Condutância estomática e conteúdo de clorofila em folhas de híbridos de milho resistentes à seca.....	109
3.4. Marcadores moleculares associados à resistência de plantas a artrópodes	109
4. Discussão	110
5. Referências	114
CAPÍTULO 6 – Considerações finais	120

METODOLOGIA DE PESQUISA, CATEGORIAS E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM MILHO A *Diabrotica speciosa* (GERMAR) E *Oligonychus pratensis* (BANKS)

RESUMO – O inseto *Diabrotica speciosa* (Germar) e o ácaro *Oligonychus pratensis* (Banks) representam uma das principais pragas da cultura do milho, no Brasil e nos EUA, respectivamente. Essas pragas são controladas principalmente via aplicação de inseticidas químicos; contudo, há alternativas para tornar o manejo dessas pragas menos impactante, como o uso de plantas resistentes. Assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar: (1) a resistência de cultivares de milho crioulo a *D. speciosa*; (2) a resistência de híbridos de milho resistentes à seca ao ácaro *O. pratensis*; (3) os mecanismos relacionados com a resistência a essas pragas; e (4) definir, através de testes de metodologia de pesquisa, a melhor forma para a condução dos ensaios. Desse modo, o presente trabalho é constituído por quatro pesquisas. Na primeira pesquisa, foi avaliada a antibiose em 19 cultivares de milho crioulo a *D. speciosa*, investigando se a expressão dessa categoria de resistência estava associada com algum mecanismo morfológico (lignina, celulose, fibras, e hemicelulose) ou químico (fenóis totais). No segundo trabalho, estudou-se a tolerância em seis cultivares de milho crioulo, previamente selecionados no teste de antibiose. A tolerância foi correlacionada com alguns componentes que participam do metabolismo primário vegetal, como a clorofila, os carotenoides, a glicina betaína, e a prolina. Em um terceiro experimento, foi avaliada a oviposição de *D. speciosa* nas seis cultivares selecionadas, discutindo os resultados quanto ao comportamento do inseto. No quarto ensaio, estudou-se a antibiose e a tolerância a *O. pratensis* em híbridos de milho resistentes à seca. Nessa pesquisa, foi avaliado se marcadores moleculares associados com resistência a estresses bióticos amplificariam o DNA de plantas resistente e suscetível, e se seria visualizado polimorfismos nos padrões de banda do DNA quando examinados em gel de agarose. As cultivares de milho crioulo Pérola, Fortuna e Palha Roxa manifestaram antibiose a *D. speciosa*, sendo isso observado no desenvolvimento e na sobrevivência (Pérola e Fortuna), e na fertilidade (Palha Roxa) do inseto. Observou-se que as cultivares resistentes exibiram as menores perdas de lignina, celulose, fibras e hemicelulose nas raízes de milho injuriadas por larvas de *D. speciosa*. A cultivar Azteca, que foi a mais suscetível em teste de antibiose, se destacou como a mais tolerante ao ataque da praga, além de apresentar os maiores teores de clorofilas e carotenoides. No que diz respeito à preferência para oviposição, as fêmeas de *D. speciosa* ovipositaram igualmente em cultivares resistentes e suscetíveis. O ácaro *O. pratensis* encontrou dificuldades para se desenvolver e sobreviver no híbrido de milho resistente à seca Artesian. Seis genes relacionados com resistência a estresses bióticos foram encontrados nesse híbrido, enquanto que no híbrido Droughtgard, que foi suscetível ao ácaro, nenhum daqueles genes foi observado. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram o potencial da resistência de plantas de milho para o controle de pragas agrícolas, fornecendo informações à respeito de alguns dos mecanismos envolvidos na resistência dos materiais estudados, contribuindo, assim, para o desenvolvimento do Manejo Integrado de Pragas.

Palavras-chave: *Zea mays* L., antibiose, antixenose, tolerância, barreiras morfológicas, larva-alfinete

RESEARCH METHODOLOGY, CATEGORIES AND MECHANISMS OF RESISTANCE IN MAIZE TO *Diabrotica speciosa* (GERMAR) AND *Oligonychus pratensis* (BANKS)

ABSTRACT – The insect *Diabrotica speciosa* (Germar) and the mite *Oligonychus pratensis* (Banks) represent one of the major maize crop pests, in Brazil and in the USA, respectively. These pests are controlled primarily through the application of chemical insecticides; however, there are alternatives to make the management of these pests less impactful, as the use of resistant plants. Thus, this work aimed: (1) to determine, through testing research methodologies, the best way to conduct the assays; to evaluate (2) the resistance of maize landraces to *D. speciosa* and (3) the resistance of drought resistant maize hybrids to the mite *O. pratensis*; and lastly, (4) to reveal the mechanisms associated with the resistance to these pests. Thereby, the present work is constituted by four researches. In the first research, the antibiosis to *D. speciosa* was assessed in 19 maize landraces, investigating whether the expression of this resistance category was related with some morphological (lignin, cellulose, fibers, and hemicellulose) or chemical (total phenols) mechanism. In the second work, the tolerance was studied in six maize landraces previously selected in the antibiosis test. The tolerance was correlated with some compounds which participate in the primary metabolism of plants, as the chlorophyll, the carotenoids, the glycine betaine, and the proline. In a third experiment, the oviposition of *D. speciosa* was assessed on the six cultivars selected, discussing the results regarding the insect behavior. In the fourth assay, the antibiosis and tolerance were assessed to *O. pratensis* in drought resistant maize hybrids. This research aimed also to evaluate whether molecular markers associated with resistance to biotic factors would amplify the DNA of resistant and susceptible plants, and if it would be visualized polymorphisms in the banding patterns of the DNA when examined in agarose gel. The maize landraces Pérola, Fortuna, and Palha Roxa manifested antibiosis to *D. speciosa*, and it was observed on the development and survival (Pérola and Fortuna), and on the fertility (Palha Roxa) of the insect. The resistant cultivars exhibited the lowest losses of lignin, cellulose, fibers, and hemicellulose in the injured maize roots by *D. speciosa* larvae. Interestingly, the cultivar Azteca, which was the most susceptible in the antibiosis test, stood out as the most tolerant to the pest attack, besides showing the highest amounts of chlorophyll and carotenoids. With regards to the oviposition preference, the *D. speciosa* females laid eggs equally on the resistant and susceptible cultivars. The mite *O. pratensis* found difficulties for the development and survival on the Artesian drought resistant maize hybrid. Six genes associated with resistance to biotic stresses were found in this hybrid, whereas in the susceptible hybrid, Droughtgard, no one gene was noted. The results obtained in this work displays the potential of the maize plant resistance for the control of agricultural pests, providing information as to some mechanisms involved in the resistance of the materials studied, contributing, thus, for the development of the Integrated Pest Management.

Keywords: *Zea mays* L., antibiosis, antixenosis, tolerance, morphological barriers, corn rootworm

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. Introdução

O milho (*Zea mays* L.) é alvo de diversas pragas, que podem atacar diferentes estruturas da planta, como o sistema radicular (CABRERA WALSH, 2001; FURLAN, 2014) e a parte aérea (SHIVAJI et al., 2010; BYNUM et al., 2015). Entre as pragas que atacam raízes de plantas de milho, a larva de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) é a mais disseminada e abundante na América do Sul (CHRISTENSEN, 1943; CABRERA WALSH, 2003). A injúria causada pela alimentação de larvas de *D. speciosa* em plantas de milho pode causar atraso no desenvolvimento e aumentar a suscetibilidade das mesmas ao acamamento (BOFF; GANDIN, 1992; MARQUES; ÁVILA; PARRA, 1999).

No que se refere às pragas da parte aérea, o ácaro *Oligonychus pratensis* (Banks) (Acari: Tetranychidae), que é uma praga nativa dos Estados Unidos da América (STICKNEY; BARNES; SIMMONS, 1950), destaca-se por provocar danos em algumas gramíneas, inclusive milho, em diversas regiões dos continentes Americano e Africano (PEAIRS, 2014a). Suas colônias são constituídas por ovos, larvas, ninfas e adultos, e são encontradas comumente na região abaxial das folhas, eventualmente matando a folha e deixando-a com uma aparência chamuscada ou queimada (PEAIRS, 2014b).

O controle de ambas as pragas mencionadas acima é realizado através da aplicação de inseticidas químicos sintéticos, sendo através de tratamento de sementes ou aplicação no sulco de plantio para o controle de larvas de *D. speciosa* (ARRUDA-GATTI; VENTURA, 2003), e aplicação foliar de acaricidas para o controle do ácaro *O. pratensis* (BYNUM; ARCHER, 2002). Devido ao uso de poucos ingredientes ativos para o controle destas pragas, o que implica em poucos modos de ação, o surgimento de indivíduos resistentes pode ser um problema grave no que se refere ao manejo de pragas e ao meio ambiente (BYNUM; ARCHER, 2002; MAPA, 2016).

Por isso, a resistência de plantas é uma importante tática de controle de pragas, sendo definida por Smith (2005) como a soma das qualidades constitutivas herdadas

geneticamente, que resulta em uma planta de uma cultivar ou espécie ser menos danificada do que outra suscetível. Atualmente a resistência de plantas é classificada em antibiose, antixenose ou não-preferência, e tolerância. De acordo com Smith (2005), a antibiose se caracteriza pela expressão de efeitos negativos na sobrevivência e desenvolvimento do artrópode, enquanto que a antixenose implica em efeitos negativos no comportamento do artrópode, seja para alimentação, oviposição, ou abrigo. Boiça Júnior et al. (2015) definiu a tolerância como a capacidade das plantas de suportar ou recuperar-se das injúrias causadas por um inseto, e no final, apresentar produtividade semelhante de plantas não atacadas.

Uma planta pode expressar resistência devido à presença de características morfológicas, químicas, ou físicas (BOIÇA JÚNIOR et al., 2015). No que se refere aos fatores morfológicos, paredes celulares de plantas fortalecidas pela deposição de macromoléculas, tais como celulose, lignina, suberina, e calose, além de fibras esclerenquimáticas, tornam uma planta resistente à injúria mecânica, assim como à ação de corte das mandíbulas, ou a penetração dos aparatos bucais de insetos sugadores, e oviposidores de insetos herbívoros (COLEY, 1983; SCHOONHOVEN; VAN LOON; DICKE, 2005).

Quanto às características químicas, em particular, a tolerância pode ser determinada pela presença de diferentes compostos envolvidos no metabolismo primário das plantas. Existe uma relação entre a tolerância e a fotossíntese, na qual as clorofilas apresentam importante papel por promover maior crescimento e acumulação de matéria seca, assim como ao auxiliar a adaptação da planta ao ambiente (ENGEL; POGGIANI, 1991). Os carotenoides também apresentam importância na tolerância de plantas, porque além de se apresentarem como componentes essenciais do aparato fotossintético, são pigmentos de plantas que funcionam como antioxidantes e precursores de hormônios (HOWITT; POGSON, 2006).

A glicina betaína é um composto quaternário de amônio, abundante principalmente no cloroplasto onde ela desempenha um papel vital no ajuste e proteção da membrana do tilacoide, desse modo mantendo a eficiência fotossintética (GENARD et al., 1991), levando a planta a tolerar diferentes tipos de estresses ambientais, principalmente abióticos (HUANG et al., 2000). Glicina betaína não atua

na remoção direta das espécies reativas a oxigênio (ROS), como radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila ($OH^{\cdot}$) e oxigênio singleto ($^1O_2$), as quais são tóxicas às plantas quando em altas concentrações. Entretanto, a glicina betaína atenua os efeitos prejudiciais do estresse oxidativo de outras formas, como na ativação ou estabilização de enzimas que removem as ROS (CHEN; MURATA, 2008).

A acumulação do aminoácido proteinogênico prolina pode influenciar na tolerância de plantas aos estresses ambientais de diversas formas. Diversos estudos têm atribuído uma característica antioxidante à prolina, sugerindo a atividade de remoção das ROS (MATYSIK; BHALU; MOHANTY, 2002), exercendo também a função de chaperona molecular, protegendo a integridade da proteína e otimizando as atividades de diferentes enzimas (RAJENDRAKUMAR; REDDY; REDDY, 1994).

Desse modo, diante da importância das pragas *D. speciosa* e *O. pratensis*, no Brasil e nos Estados Unidos, respectivamente, a presente pesquisa teve como objetivo a identificação de genótipos resistentes a essas pragas, assim como tentar correlacionar a resistência nas diferentes categorias com diversas causas morfológicas e químicas, avaliando-se ainda genes importantes na expressão da resistência em milho a *O. pratensis*.

2. Revisão de literatura

2.1. A cultura do milho

A cadeia produtiva do milho é uma das mais importantes do agronegócio brasileiro, correspondendo a 37% da produção nacional de grãos, quando considerando apenas a produção primária (CALDARELLI; BACCHI, 2012). O Brasil é classificado atualmente como o terceiro maior produtor mundial de milho, com uma produção de 78,98 milhões de toneladas na safra 2015/2016 (CONAB, 2016). A importância econômica do milho é caracterizada pelas diferentes opções de seu uso, que pode ser destinado para diversos fins, como a alimentação animal e a indústria de alta tecnologia. O uso do milho em grão para alimentação animal representa a maior parte do consumo desse cereal, o que equivale a 70% da produção mundial.

Nos Estados Unidos, aproximadamente 50% é destinado para esse fim, enquanto que no Brasil varia entre 60 a 80% (DUARTE; MATTOSO; GARCIA, 2016).

O milho é uma espécie monocotiledônea, diplóide e alógama, pertencente à família Poaceae, Subfamília Panicoideae, gênero *Zea* e espécie *Zea mays* L. É herbácea, monóica, com os dois sexos na mesma planta em inflorescências diferentes (PATERNIANI; CAMPOS, 1999), completa seu ciclo em quatro a cinco meses, caracterizando uma planta anual (PONS; BRESOLIN, 1981). É uma espécie originária da América do Norte, com centro de origem genética no México, geralmente consumida *in natura* para alimentação humana. Assim, caracteriza-se como um dos cereais mais cultivados no planeta devido ao seu alto potencial produtivo e ao seu valor nutritivo (ANDRADE et al., 2006).

A diversidade genética presente no milho possibilita o seu cultivo nos mais diversos ambientes. O milho é cultivado desde a latitude 58°N até 40°S, desenvolvendo-se desde o nível do mar até 3.800 m de altitude (HALLAUER; MIRANDA FILHO, 1988). Ademais, o milho é a espécie vegetal geneticamente mais estudada e, conseqüentemente, a herança de inúmeros caracteres e o seu genoma são bem conhecidos. Sua importância econômica, estrutura genética, o número de cromossomos, o tipo de reprodução, a facilidade para realizar polinizações manuais e a possibilidade de gerar diferentes tipos de progênies, são fatores que muito contribuíram no sentido de tornar este cereal um modelo para as espécies alógamas (NASS; PATERNIANI, 2000).

O germoplasma de milho é constituído por raças crioulas (locais), populações adaptadas e materiais exóticos introduzidos, sendo caracterizado por uma extensa variabilidade genética. A demanda constatada junto aos melhoristas de plantas por conhecimentos mais abrangentes, tanto qualitativos como quantitativos, sobre o germoplasma de milho no Brasil é cada vez mais intensa (NASS; PELLICANO; VALOIS, 1993), o que pode ser verificado pela grande competitividade existente no mercado pelo desenvolvimento de novas cultivares (ARAÚJO; NASS, 2002). Essa grande diversidade genética encontrada no milho é considerada um modelo de evolução, uma vez que a evolução corresponde a transformações nas frequências gênicas ao longo das gerações (GARBUGLIO et al., 2007).

Plantas crioulas não apresentam modificação pela biotecnologia ou por outros processos de melhoramento (MOURÃO, 2004). Zeven (1998), em uma revisão sobre definições para cultivares crioulas, concluiu que a melhor definição seria “uma variedade nativa com uma alta capacidade de tolerar estresses bióticos e abióticos resultando em alta estabilidade de produção e um nível intermediário de produção sob um sistema agrícola com baixo investimento”. A adaptabilidade de cultivares de milho crioulo às diferentes condições ambientais tem criado variação para características agronômicas e de qualidade, incluindo resistência aos estresses bióticos e abióticos (MAHAR et al., 2009). Esses materiais podem ser explorados na tentativa de se encontrar genes responsáveis pela expressão da resistência, e assim incorporar os mesmos nos germoplasmas atuais via transgenia (HAKE; ROSS-IBARRA, 2015), devido sua variabilidade genética (LIA et al., 2009).

No Brasil, as cultivares crioulas são cultivadas por agricultores familiares e comunidades rurais, que em sua maioria, praticam uma agricultura com menos acesso à tecnologia (JANTARA; SILVA, 2012). Nessas condições, essas cultivares podem apresentar uma produtividade similar ao das cultivares comerciais, uma vez que apresentam elevado potencial de adaptação e rusticidade, podendo ser exploradas na busca por genes que conferem resistência a diferentes estresses ambientais, como os insetos-praga (ARAÚJO; NASS, 2002).

As cultivares crioulas apresentam ampla diversidade genética, podendo-se adaptar a diferentes habitats. Essas características foram adquiridas como resultado da seleção natural combinada com a pressão de seleção imposta pela ação de sucessivas gerações de agricultores no ambiente local, através do cruzamento de variedades ou pela seleção intrapopulacional de plantas mais adaptadas aos seus sistemas de cultivo (FERREIRA; MOREIRA; HIDALGO, 2009).

Nos Estados Unidos, ultimamente tem se dado atenção ao melhoramento de plantas de milho visando a resistência à seca. Em alguns anos, a produção pode ser significativamente reduzida por limitações temporárias de água, que podem variar em relação ao momento, a duração e a severidade. No entanto, uma seca disseminada e prolongada, que provoca reduções na produção de grãos sobre uma ampla área, pode ocorrer em alguns anos, sendo 2012 a ocorrência mais recente (BOYER et al., 2013).

Tem se observado que alguns híbridos de milho resistentes à seca também apresentam resistência contra ácaros-praga (BYNUM, 2012).

Em relação ao aspecto social, o milho é extremamente importante nos sistemas vinculados à agricultura familiar. Esses produtores possuem pouca tecnologia e capital para investimento, não têm grandes extensões de terras, e utilizam as cultivares crioulas, que podem ser reutilizadas nas safras seguintes preservando o seu potencial produtivo, desde que seja conservada a pureza genética. Algumas delas se destacam e têm demonstrado potencial produtivo igual ou superior ao de cultivares melhoradas de alto rendimento, confirmando a importância das cultivares locais, sobretudo como fonte de germoplasma na busca por genes com resistência, tolerância e/ou eficiência em relação aos estresses bióticos e abióticos (ARAÚJO; NASS, 2002; CRUZ, et al., 2011).

2.2. *Diabrotica speciosa*

O gênero *Diabrotica* Chevrolat abrange 15 espécies e subespécies identificadas como pragas de 61 tipos de plantas cultivadas. Neste contexto, *D. speciosa* é a espécie mais conhecida, apresentando ampla distribuição na América do Sul (KRYSAN, 1986), e encontra-se estabelecida em diversos estados brasileiros (LAUMANN et al., 2003), normalmente se apresentando junto com outras espécies dos gêneros *Diabrotica*, *Cerotoma* Olivier e *Acalymma* Barber, formando assim um complexo de espécies-praga (ÁVILA, 1999). É um crisomelideo polífago, causando danos em várias espécies de plantas olerícolas (SILVA et al., 1968), além das culturas de milho, soja [*Glycine max* (L.) Merr.], feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), amendoim (*Arachis hypogaea* L.) e batata (*Solanum tuberosum* L.) (LAUMANN et al., 2003).

Os adultos de *D. speciosa* são de coloração esverdeada, possuindo três manchas amarelas em cada élitro; as tíbias e tarsos são negros e a cabeça marrom, sendo esse inseto popularmente conhecido como “patriota”, “brasileirinho” ou “vaquinha verde-amarela”. Medem cerca de 6 mm de comprimento, sendo os machos menores do que as fêmeas (ÁVILA; MILANEZ, 2004). A longevidade dos adultos, o ritmo de postura e a fecundidade dependem do tipo de alimento nas fases larval e adulta (MILANEZ, 1995).

As fêmeas de *D. speciosa* realizam a oviposição no solo, ao redor das plantas. Os ovos são amarelos e medem 0,5 mm de diâmetro. O período de incubação varia de 6 a 8 dias. A fase larval passa por três instares e a larva atinge 10 mm de comprimento, apresentando coloração esbranquiçada, cabeça marrom e tem uma placa quitinizada escura no último segmento abdominal. O período médio larval é de 18 dias. Os crisomelídeos, após completarem a fase larval, se dirigem ao solo onde constroem uma câmara para se transformarem em pré-pupa e pupa. O período médio pré-pupal é de 5 dias e o pupal é de 7 dias. O ciclo de vida varia de 24 até 40 dias. A temperatura é um fator meteorológico que afeta a taxa de desenvolvimento das fases imaturas, bem como a longevidade de adultos e a reprodução (MILANEZ; PARRA, 2000; ÁVILA; PARRA, 2001).

Como resultado do ataque de larvas de *D. speciosa*, na cultura do milho, o prejuízo causado tem sido expressivo nos estados do sul e em algumas áreas das regiões sudeste e centro-oeste do Brasil. No sul, em áreas onde os solos são geralmente ricos em matéria orgânica, e também mais úmidos, o desenvolvimento e a sobrevivência desse inseto são favorecidos. Em áreas irrigadas das regiões sudeste e centro-oeste do Brasil, onde várias culturas hospedeiras são cultivadas em sucessão, os danos têm sido representativos. As larvas alimentam-se das raízes, reduzindo a capacidade das plantas em absorver água e nutrientes, tornando-as menos produtivas e sujeitas ao acamamento, além de causar perdas quando a colheita é realizada mecanicamente (VIANA, 2010).

Alguns métodos de controle são relatados para *D. speciosa*, na literatura, destacando-se o controle biológico, por ser uma tática promissora para o manejo da praga. Vários inimigos naturais são descritos atacando adultos da vaquinha, sendo de ocorrência mais frequente as espécies de parasitoides *Celatoria bosqi* Blanchard (Diptera: Tachinidae), *Centistes gasseni* Shaw (Hymenoptera: Braconidae), além dos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok. e *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. O controle de larvas, especialmente com fungos, tem grande potencial para ser implementado em condições de campo (ÁVILA; MILANEZ, 2004).

Diversos trabalhos têm demonstrado que a isca de “taiuiá”, *Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn. (Cucurbitaceae), e outras cucurbitáceas com o mesmo nome popular,

podem ser utilizadas para o controle comportamental de *D. speciosa*, associando-as ao controle biológico, como exemplo esporos dos entomopatógenos *B. bassiana* e *M. anisopliae* (DAOUST; PEREIRA, 1986a; DAOUST; PEREIRA, 1986b), e também associando ao controle químico, com a utilização de inseticidas (KOCH, 1981).

No que diz respeito ao controle químico, diversos produtos estão registrados para o controle de larvas de *D. speciosa* em milho, como inseticidas à base de fipronil, bifentrina, e terbufós, os quais são aplicados no sulco de plantio para o controle da praga (MAPA, 2016). O impacto econômico na agricultura e o montante de recursos gastos para o controle de *D. speciosa* no Brasil não foram ainda estimados, embora se aplique anualmente uma expressiva quantidade de ingredientes ativos para o controle tanto de adultos como de larvas dessa praga, especialmente nas culturas de milho, feijão e batata, principalmente nas regiões sul e sudeste do País (ÁVILA; SANTANA, 2011).

Poucos trabalhos foram realizados com a finalidade de se avaliar a resistência de plantas de milho a larvas de *D. speciosa*. Tokarski et al. (2013) avaliaram as injúrias provocadas por larvas de *D. speciosa* em raízes de milho, e observaram que os híbridos Pioneer 30F53H e P2530 apresentaram menores porcentagens de injúria do que os híbridos Pioneer 30R50H e DKB240PRO. Entretanto, pesquisas em resistência de plantas a essa praga foram realizadas em outras culturas de importância econômica. Em um trabalho com genótipos de soja, Costa et al. (2014a) relataram que os genótipos PI 227687, DM 339, e PI 274454 foram os menos preferidos para oviposição de *D. speciosa*, sendo posteriormente esses mesmos genótipos os mais resistentes na categoria antibiose (COSTA et al., 2014b). Boiça Júnior et al. (2015) concluíram que a cultivar de feijoeiro Ônix manifestou antixenose e tolerância a *D. speciosa*, se destacando entre 10 cultivares.

2.3. *Oligonychus pratensis*

Oligonychus pratensis é uma espécie de ácaro nativa dos EUA (STICKNEY; BARNES; SIMMONS, 1950), e apresenta uma ampla distribuição neste País (JEPPSON; KEIFER; BAKER, 1975). Essa praga é encontrada provocando danos em

algumas gramíneas, como milho, sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], e trigo (*Triticum aestivum* L.), em diversas regiões da América e da África (PEAIRS, 2014a).

Indivíduos de *O. pratensis* produzem uma grande quantidade de teia, com a finalidade de proteger suas colônias de algumas ameaças, como os predadores (GANJISAFFAR; PERRING, 2015). Essas colônias são constituídas por ovos, larvas, ninfas e adultos, e são encontradas comumente na região abaxial das folhas, eventualmente matando a folha e deixando-a com uma aparência chamuscada ou queimada (PEAIRS, 2014b).

Os adultos de *O. pratensis* são minúsculos (menor que 0,80 mm), de formato oval, e variam em coloração, dependendo de fatores como a alimentação, podendo ser verde, amarelo, marrom-avermelhado a quase preto. Os machos são levemente menores e menos arredondados do que as fêmeas (UNL, 2016). Os ovos são esféricos e inicialmente transparentes, mas escurecem antes da eclosão das larvas. Posteriormente à eclosão, que ocorre entre 3 a 10 dias após a oviposição (BREWER, 1995), os ácaros passam por vários estágios de desenvolvimento, sendo que a larva eclode com seis pares de pernas, enquanto que os estádios ninfais e os adultos apresentam oito pares de pernas. Essa espécie de ácaro entra em diapausa na forma de fêmeas adultas e ninfas, e a atividade é retomada assim que a temperatura começa a subir na primavera (UNL, 2016). Há múltiplas gerações por ano, e cada geração pode ser completada em 10 dias nas condições do verão (BREWER, 1995).

As infestações de *O. pratensis* iniciam-se na região inferior da planta, e gradualmente os ácaros se movem em direção ascendente para colonizar as folhas da parte superior das plantas (PEAIRS, 2014b). Diversos fatores influenciam o nível de infestação desse ácaro, incluindo estresse à seca, temperaturas elevadas, baixa precipitação, baixa umidade, ausência de ácaros competidores, como *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), ausência de inimigos naturais, e o uso de inseticidas (PEAIRS, 2014b).

Oligonychus pratensis, de forma similar a outros ácaros tetraniquídeos, perfura as células da planta e se alimenta do conteúdo celular que extravasa. Em consequência dessa alimentação, as folhas tornam-se cobertas com pontos cloróticos. Com a continuação da alimentação, mais injúrias ocorrem, e a folha inteira pode perecer (BREWER, 1995).

Archer e Bynum (1990) relataram que *O. pratensis* pode provocar, na cultura do milho, uma perda de produtividade de cerca de 0,2% para cada 1% de folha de milho infestada com esse herbívoro, entre o final do período vegetativo até o estágio reprodutivo R5 (grão farináceo-duro). Peairs (2014b) afirmou que no estado do Colorado, EUA, as perdas na produção de milho devido à alimentação desse ácaro podem chegar a 40% quando o material é cultivado para silagem.

O controle de *O. pratensis* é feito principalmente com o uso de acaricidas químicos. Entretanto, essa prática vem selecionando indivíduos com resistência a diversos ingredientes ativos, como bifentrina, dimetoato e amitraz (BYNUM; ARCHER, 2002), e os níveis de resistência dependem de fatores como localidade e ano de cultivo (PEAIRS, 2014b).

Uma alternativa ao controle químico é a liberação de ácaros predadores. Ganjisaffar e Perring (2015) notaram que a liberação do ácaro predador *Galendromus flumenis* (Chant) (Acari: Phytoseiidae) é viável para o controle de *O. pratensis*. Esses autores observaram que aquele fitoseídeo prefere preda ovos de *O. pratensis*, e as liberações inundativas devem ser realizadas no início da colonização dessa praga para se obter um controle eficiente.

Nos últimos anos, tem se observado que alguns híbridos de milho resistentes à seca apresentam também resistência contra ácaros-praga (BYNUM, 2012). No entanto, o cultivo de milho resistente à seca é uma prática muito recente nos EUA (TOLLEFSON, 2011), e consequentemente, até o momento não há na literatura trabalhos abordando esse tema. Não diferentemente, trabalhos avaliando a resistência ou tolerância em genótipos de milho a *O. pratensis* são escassos. Stiefel e Margolies (1992) avaliaram a razão sexual de *O. pratensis* sob diferentes condições, entre estas, plantas de milho e sorgo. Não houve diferenças em relação à proporção sexual de descendentes de fêmeas criadas em milho híbrido Pioneer 3377, ou uma linhagem resistente (SC-599-6) de sorgo, ou uma variedade suscetível (Wheatland) de sorgo. Archer et al. (1990) avaliaram a infestação desse ácaro em cultivares de sorgo com diferentes níveis de metabolismo do nitrogênio, e concluíram que o menor número de ácaros foi encontrado na cultivar SC325-12, classificada como uma cultivar que apresenta eficiência no metabolismo do nitrogênio; em contrapartida, altas infestações de *O. pratensis* foram observadas nas cultivares R6956, 77CS1, e SC630-

11E, que são cultivares ineficientes no metabolismo do nitrogênio. Perring et al. (1982) ao avaliar diversas características de sorgo granífero que poderiam estar associadas com a resistência a *O. pratensis*, relataram que um número similar de indivíduos de *O. pratensis* foi encontrado em cultivares de maturação precoce e tardia, mas o dano do ácaro foi menor nas cultivares de maturação tardia, sugerindo tolerância à alimentação dessa praga. No que diz respeito a senescência, Perring et al. (1982) notaram que houve maior número de ácaros e maior dano em plantas senescentes do que em plantas não senescentes.

2.4. Resistência de plantas a artrópodes

Há aproximadamente 11.000 anos atrás, os agricultores envolvidos na prática inicial da agricultura na Crescente Fértil (região do Oriente Médio) e outras regiões do mundo, possivelmente notaram que as plantas que eles selecionavam para propósitos agrícolas divergiam na suscetibilidade a pragas (HOLDEN; PEACOCK; WILLIAMS, 1993; PANDA; KHUSH, 1995). No entanto, cultivares resistentes a artrópodes foram cultivadas muito tempo depois, durante o início dos estudos em entomologia aplicada nos séculos XVIII e XIX. Um marco histórico na resistência de plantas a artrópodes foi a enxertia de variedades de videira (*Vitis vinifera* L.) europeias em porta-enxertos americanos resistentes ao pulgão *Daktulosphaira vitifoliae* (Fitch) (Hemiptera: Phylloxeridae), o que restaurou a rentabilidade da indústria vinícola francesa (SMITH, 1989; PANDA; KHUSH, 1995), devido à redução nas injúrias provocadas nas raízes das plantas (WALKER, 1992).

O primeiro livro sobre resistência de plantas a artrópodes, *Insect Resistance in Crop Plants*, foi escrito por Reginald H. Painter (PAINTER, 1951), o fundador desta área de pesquisa nos EUA. Três tipos de resistência de plantas a artrópodes são referidos na literatura. Esses tipos de resistência foram originalmente definidos por Painter (1951) como mecanismos, e foram mais tarde denominados de forma mais precisa como categorias, quais sejam antibiose, antixenose ou não-preferência, e tolerância (HORBER, 1980). Smith (2005) citou que por definição, uma categoria é uma classe geral ou grupo. De forma contrária, um mecanismo está relacionado a um fundamento físico ou um processo químico envolvido em uma ação, reação, ou outro

fenômeno natural. Diferentemente, o termo base se refere ao fundamento ou ao componente principal de algo. Assim, o termo categoria se refere à forma que um grupo de itens são classificados, enquanto que os termos base e mecanismo denotam o processo principal que governa um fenômeno natural (SMITH, 2005). Os mecanismos de resistência, por sua vez, podem ser de origem química, morfológica, ou física (SMITH; CLEMENT, 2012).

2.4.1. Defesas diretas e indiretas de plantas a artrópodes

Ao longo do tempo, as plantas desenvolveram características para a manifestação de mecanismos de resistência, que podem atuar de forma direta e indireta, a fim de reduzir o ataque dos artrópodes. As defesas diretas incluem barreiras morfológicas (também conhecidas como estruturais), como a rigidez do tecido, a pubescência da planta, e tricomas glandulares e não glandulares. As defesas diretas também incluem aleloquímicos em tecidos de plantas, que provocam efeitos antialimentar, tóxico, ou repelente aos artrópodes, como exemplo os inibidores de enzimas digestivas, as lectinas, os glucosinolatos, os alcaloides, e os terpenoides (SADASIVAM; THAYUMANAVAN, 2003; SMITH, 2010).

As defesas indiretas consistem de compostos orgânicos voláteis liberados por plantas injuriadas por artrópodes-praga, que atraem predadores ou parasitoides, ou que repelem a oviposição de artrópodes-praga (KESSLER; BALDWIN, 2002).

2.4.2. Processos morfológicos na defesa da planta contra artrópodes

As características morfológicas que impõe uma barreira ao ataque dos artrópodes, que incluem a rigidez dos tecidos (devido à presença de componentes como lignina e celulose), as ceras na superfície da epiderme, os tricomas, e a arquitetura da planta, são expressões finais de processos bioquímicos regulados geneticamente (SCHOONHOVEN; VAN LOON; DICKE, 2005).

Paredes celulares das plantas fortalecidas pela deposição de algumas macromoléculas, como a celulose, a lignina, a suberina, e a calose, além de fibras esclerenquimáticas, tornam uma planta resistente à injúria mecânica, assim como à

ação de corte das mandíbulas, ou a penetração dos aparatos bucais de insetos sugadores, e ovipositores de insetos herbívoros (COLEY, 1983; SCHOONHOVEN; VAN LOON; DICKE, 2005).

A lignina, assim como outros tipos de fibras alimentares, promovem resistência a artrópodes. Duas possíveis causas para esse fenômeno são (1) aumento na densidade de massa do alimento, que consequentemente implica em menores teores de nutrientes (BUENDGEN et al., 1990; BEEGHLY; COORS; LEE, 1997) e (2) aumento na rigidez dos tecidos da epiderme das plantas, causado por uma alta concentração de lignina e outros componentes da parede celular (BERGVINSON et al., 1994), como aqueles citados acima.

2.4.3. Processos químicos na defesa da planta contra artrópodes

As plantas possuem, de forma geral, substâncias químicas divididas em dois grandes grupos: metabólitos primários e metabólitos secundários. Os principais grupos de metabólitos primários da planta, que abrange proteínas, carboidratos, e lipídeos envolvidos em processos fisiológicos fundamentais da planta, formam nutrientes essenciais para o desenvolvimento dos herbívoros. Por essa razão, uma variação qualitativa e quantitativa nos compostos primários da planta podem ter efeitos profundos no desempenho e preferência do herbívoro (BERENBAUM, 1995).

Os metabólitos secundários de plantas podem ser definidos como 'compostos de plantas que não são universalmente encontrados em plantas superiores, mas são restritos para um certo grupo de plantas, ou ocorrem em determinado grupo de plantas em concentrações muito superiores do que outras, e apresenta nenhuma função, ao menos aparente, no metabolismo primário' (SCHOONHOVEN; VAN LOON; DICKE, 2005). Em razão de seu papel ecológico, os metabólitos secundários podem ser classificados como aleloquímicos. Um aleloquímico é definido como uma 'substância química não nutricional, produzida por um indivíduo de uma espécie, que afeta o crescimento, a saúde, o comportamento, ou a biologia da população de uma outra espécie (WHITTAKER, 1970).

Os fenóis de plantas apresentam-se em grande número e em forma variada, e estão representados em quase todas as classes de metabólitos secundários (SMITH,

1976). Numa interação inseto-planta, muitas espécies de planta que apresentam tecidos injuriados por herbívoros, exibem no local injuriado a síntese de fenóis de defesa, assim como a oxidação de fenóis endógenos pré-formados por polifenol oxidases, o que posteriormente conduz à produção de quinonas que reduzem o valor de proteínas alimentares no sistema digestivo do artrópode (SMITH, 2005).

2.4.4. Marcadores moleculares na resistência de plantas a artrópodes

Nos últimos 30 anos, a área da biologia molecular tem trazido grandes avanços para a resistência de plantas a artrópodes. O surgimento e o contínuo desenvolvimento de ferramentas moleculares tem tornado mais rápido o processo de desenvolvimento de genótipos resistentes através da seleção de genes diretamente relacionados com a expressão de resistência a artrópodes (SMITH, 2004; SMITH, 2005). Um dos avanços mais significantes que ocorreram nessa época para o desenvolvimento de cultivares melhoradas foi o uso de marcadores moleculares para se identificar e localizar genes de interesse (TANKSLEY; MCCOUCH, 1997).

Diversos marcadores moleculares relacionados com a resistência de plantas a artrópodes já foram relatados. Como exemplo, cita-se a família do gene *mir* (“maize insect resistance” = resistência de milho a inseto), específico da planta de milho, que consiste de ao menos cinco homólogos, três dos quais são agrupados no cromossomo 6 em uma região que confere resistência a insetos (JIANG et al., 1995). Classificados como cisteína proteases, esses genes foram diferencialmente expressos em tecido foliar de milho exposto à alimentação de artrópodes, como *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), onde a maior expressão foi associada com os mais altos níveis de resistência (PECHAN et al., 2000). Pechan et al. (2002) relataram que a linhagem de milho Mp708, resistente a alimentação de algumas espécies de lepidópteros, produz uma cisteína protease de 33-kDa em resposta à alimentação desses herbívoros. A acumulação dessa cisteína protease em folhas de milho foi correlacionada com uma significativa redução no crescimento das lagartas que resultou da ineficiente utilização de nutrientes, devido a severa injúria provocada na matriz peritrófica de lagartas que se alimentaram de plantas de milho resistente.

As enzimas peroxidases (POD) também podem estar presentes no genoma do milho, representadas por diversos genes homólogos, como *POX1*, *POX2*, e *POX3*, regulando diversos processos que têm efeitos diretos ou indiretos na defesa da planta, incluindo lignificação, suberização, metabolismo da auxina, e a cicatrização de feridas (HENG-MOSS et al., 2004; SETHI et al., 2009; HE et al., 2011). A associação entre radicais oxidativos produzidos pelas POD com os fenóis causa deterrência alimentar em insetos e/ou produzem toxinas que reduzem a digestibilidade da planta, e por conseguinte resulta na deficiência nutricional de insetos com efeitos severos em seu crescimento e desenvolvimento (ZHANG; HAU; ZHANG, 2008; CHEN; NI; BUNTIN, 2009).

Christensen et al. (2013) mostraram que produtos e sinais derivados de uma única lipoxigenase (LOX) de milho, *ZmLOX10*, são cruciais para defesas diretas e indiretas das plantas contra herbivoria. Além disso, esses autores observaram que o gene *ZmLOX8* está envolvido nas vias de biossíntese de jasmonatos.

3. Referências

ANDRADE, R. V.; NETTO, D. A. M.; SOUZA, F. R. S.; LEITE, C. E. P. Recursos Genéticos de Milho: BAG Milho. **Embrapa Milho e Sorgo**. Sete Lagoas - MG, 2006. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/milho/bagmilho/bagmilho.php>>. Acesso em: 23 dez. 2015.

ARAÚJO, P. M.; NASS, L. L. Caracterização e avaliação de populações de milho crioulo. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 3, p. 589-593, 2002.

ARCHER, T. L.; BYNUM JR., E. D. Economic injury level for the Banks grass mite (Acari: Tetranychidae) on corn. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 83, n. 3, p. 1069-1073, 1990.

ARCHER, T. L.; ONKEN, A. B.; BYNUM, E. D.; PETERSON, G. C. Banks grass mite (*Oligonychus pratensis*) abundance on sorghum cultivars with different levels of nitrogen use and metabolism efficiency. **Experimental & Applied Acarology**, Amsterdam, v. 9, n. 3-4, v. 177-182, 1990.

ARRUDA-GATTI, I. C.; VENTURA, M. U. Iscas contendo cucurbitacinas para o manejo de *Diabrotica* spp. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 331-336, 2003.

ÁVILA, C. J. **Técnica de criação e influência do hospedeiro e da temperatura no desenvolvimento de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) Coleoptera: Chrysomelidae**. 1999. 102 f. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

ÁVILA, C. J.; MILANEZ, J. M. Larva-alfinete. In: SALVADORI, J. R.; ÁVILA, C. J.; SILVA, M. T. B. (Eds.). **Pragas de solo no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo; Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz Alta: Fundacep Fecotriga, 2004. p. 345-378.

ÁVILA, C. J.; PARRA, J. R. P. Influência da temperatura na fecundidade e longevidade de adultos de *Diabrotica speciosa*. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 76, n. 3, p. 392-399, 2001.

ÁVILA, C. J.; SANTANA, A. G. Larva-alfinete. In: VIANA, P. A. (Ed.). **Principais pragas subterrâneas do milho no Brasil**. Documentos 129. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2011. p. 21-31.

BEEGHLY, H. H.; COORS, J.G.; LEE, M. Plant fiber composition and resistance to European corn borer in four maize populations. **Maydica**, Bergamo, v. 42, n. 3, p. 297-303, 1997.

BERENBAUM, M. R. Turnabout is fair play: secondary roles for primary compounds. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 21, n. 7, p. 925-940, 1995.

BERGVINSON, D. J.; ARNASON, J. T.; HAMILTON, R. I.; MIHM, J. A.; JEWELL, D. C. Determining leaf toughness and its role in maize resistance to the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 87, n. 6, p. 1743-1748, 1994.

BOFF, M. I. C.; GANDIN, E. C. L. Principais pragas da cultura da melancia e seu controle. **Agropecuário Catarinense**, Florianópolis, v. 5, p. 39-41, 1992.

BOIÇA JÚNIOR, A. L.; COSTA, E. N.; SOUZA, B. H. S.; RIBEIRO, Z. A.; CARBONELL, S. A. M. Antixenosis and tolerance to *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) in common bean cultivars. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 98, n. 2, p. 464-472, 2015.

BOIÇA JÚNIOR, A. L.; SOUZA, B. H. S.; RIBEIRO, Z. A.; MORAES, R. F. O.; EDUARDO, W. I.; NOGUEIRA, L. A defesa das plantas ao ataque dos insetos. In: BUSOLI, A. C.; CASTILHO, R. C.; ANDRADE, D. J.; ROSSI, G. D.; VIANA, D. L.; FRAGA, D. F.; SOUZA, L. A. (Eds.). **Tópicos em Entomologia Agrícola – VIII**. 1. ed. Jaboticabal: Maria de Lourdes Brandel, 2015. cap. 15, p. 161-180.

BOYER, J. S.; BYRNE, P.; CASSMAN, K. G.; COOPER, M.; DELMER, D.; GREENE, T.; GRUIS, F.; HABBEN, J.; HAUSMANN, N.; KENNY, N.; LAFITTE, R.; PASZKIEWICZ, S.; PORTER, D.; SCHLEGEL, A.; SCHUSSLER, J.; SETTER, T.; SHANAHAM, J.; SHARP, R. E.; VYN, T. J.; WARNER, D.; GAFFNEY, J. The US drought of 2012 in perspective: a call to action. **Global Food Security**, Washington, v. 2, n. 3, p. 139-143, 2013.

BREWER, M. J. **Banks Grass Mite, *Oligonychus pratensis***. University of Wyoming: Laramie, 1995. 2 p.

BUENDGEN, M. R.; COORS, J. G.; GROMBACHER, A. W.; RUSSELL, W. A. European corn borer resistance and cell wall composition of three maize populations. **Crop Science**, Madison, v. 30, n. 3, p. 505-510, 1990.

BYNUM, E. D. Spider mite damage to drought resistant corn affected by irrigation levels. **The Vindicator**, Texas, 31 ago. 2012. Disponível em: <http://www.thevindicator.com/news/article_90296d62-f386-11e1-b48b001a4bcf887a.html>. Acesso em: 03 mai. 2012.

BYNUM, E. D.; ARCHER, T. L. Susceptibility of populations of Banks grass mites (Acari: Tetranychidae) suspected of developing bifenthrin resistance from three maize fields. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 27, p. 303-312, 2002.

BYNUM, E. D.; MICHELS, J. J.; MACDONALD, J. C.; BIBLE, J. B. Impact of Banks Grass Mite damage to yield and quality of maize silage. **Southwestern Entomologist**, Weslaco, v. 40, n. 2, p. 251-262, 2015.

CABRERA WALSH, G. J. Laboratory rearing and vital statistics of *Diabrotica speciosa* and *Diabrotica viridula* (Coleoptera: Chrysomelidae), two species of South American pest rootworms. **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**, Buenos Aires, v. 60, p. 239-248, 2001.

CABRERA WALSH, G. J. Host range and reproductive traits of *Diabrotica speciosa* (Germar) and *Diabrotica viridula* (F.) (Coleoptera: Chrysomelidae), two species of south American pest rootworms, with notes on other species of Diabroticina. **Environmental Entomology**, College Park, v. 32, n. 2, p. 276-285, 2003.

CALDARELLI, C. E.; BACCHI, M. R. P. Fatores de influência no preço do milho no Brasil. **Nova Economia**, Belo Horizonte, v. 22, n. 1, p. 141-164, 2012.

CHEN, T. H.; MURATA, N. Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 13, n. 9, p. 499-505, 2008.

CHEN, Y.; NI, X.; BUNTIN, G. D. Physiological, nutritional, and biochemical bases of corn resistance to foliage-feeding fall armyworm. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 35, n. 3, p. 297-306, 2009.

CHRISTENSEN, J. R. Estudio sobre el género *Diabrotica* Chev. en la Argentina. **Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria**, Buenos Aires, v. 10, p. 464-516, 1943.

CHRISTENSEN, S. A.; NEMCHENKO, A.; BORREGO, E.; MURRAY, I.; SOBHY, I. S.; BOSAK, L.; DEBLASIO, S.; ERB, M.; ROBERT, C. A. M.; VAUGHN, K. A.; HERRFURTH, C.; TUMLINSON, J.; FEUSSNER, I.; JACKSON, D.; TURLINGS, T. C. J.; ENGELBERTH, J.; NANSEN, C.; MEELEY, R.; KOLOMIETS, M. V. The maize lipoxygenase, *ZmLOX10*, mediates green leaf volatile, jasmonate and herbivore-induced plant volatile production for defense against insect attack. **The Plant Journal**, Oxford, v. 74, n. 1, p. 59-73, 2013.

COLEY, P. D. Herbivory and defensive characteristics of tree species in a lowland tropical forest. **Ecological Monographs**, Lawrence, v. 53, n. 2, p. 209-233, 1983.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos - Safra 2014/2015**. Disponível: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 24 mai. 2016.

COSTA, E. N.; RIBEIRO, Z. A.; SARDINHA, B. H. S.; BOIÇA JÚNIOR, A. L. Oviposition preference assessment of *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) for different soybean genotypes. **International Journal of Pest Management**, London, v. 60, n. 1, p. 52-58, 2014a.

COSTA, E. N.; SOUZA, B. H. S.; BARBOSA, J. C.; BOIÇA JÚNIOR, A. L. Antibiosis resistance of soybean genotypes to *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae). **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 9, n. 14, p. 1130-1134, 2014b.

CRUZ, J. C.; FILHO, I. A. P.; PIMENTEL, M. A. G.; COELHO, A. M.; KARAM D.; CRUZ, I.; GARCIA, J. C.; MOREIRA, J. A. A.; OLIVEIRA, M. F.; NETO, M. M. G.; ALBUQUERQUE, P. E. P.; VIANA, P. A.; MENDES, S. M.; COSTA, R. V.; ALVARENGA, R. C.; MATRANGOLO, W. J. R. **Produção de milho na agricultura familiar**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2011. 42 p.

DAOUST, R. A.; PEREIRA, R. M. Stability of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on beetle attracting tubers and cowpea foliage in Brazil. **Environmental Entomology**, Maryland, v. 15, n. 6, p. 1237-1243, 1986a.

DAOUST, R. A.; PEREIRA, R. M. Survival of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Moniliales) conidia on cadavers of cowpea pests stored outdoors and in laboratory in Brazil. **Environmental Entomology**, Maryland, v. 15, n. 3, p. 642-647, 1986b.

DUARTE, J. O.; MATTOSO, M. J.; GARCIA, J. C. **Milho: Importância socioeconômica**. Agência Embrapa de Informação Tecnológica, 2016. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONTAG01_8_168200511157.html>. Acesso em: 24 mai. 2016.

ENGEL, V. L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e no espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 3, n. 1, p. 39-45, 1991.

FERREIRA, J. M.; MOREIRA, R. M. P.; HIDALGO, J. A. F. Capacidade combinatória e heterose em populações de milho crioulo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 2, p. 332-339, 2009.

FURLAN, L. IPM thresholds for *Agriotes* wireworm species in maize in Southern Europe. **Journal of Pest Science**, Berlin, v. 87, n. 4, p. 609-617, 2014.

GANJISAFFAR, F.; PERRING, T. M. Prey stage preference and functional response of the predatory mite *Galendromus flumenis* to *Oligonychus pratensis*. **Biological Control**, Orlando, v. 82, p. 40-45, 2015.

GARBUGLIO, D. D.; GERAGE, A. C.; ARAÚJO, P. M.; FONSECA JUNIOR, N. S.; SHIOGA, P. S. Análise de fatores e regressão bissegmentada em estudos de estratificação ambiental e adaptabilidade em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 2, p. 183-191, 2007.

GENARD, H.; SAOS, J. L.; HILLARD, J.; TREMOLIERES, A.; BOUCAUD, J. Effect of salinity on lipid composition, glycine betaine content and photosynthetic activity in chloroplasts of *Suaeda maritima*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 29, n. 5, p. 421-427, 1991.

HAKE, S.; ROSS-IBARRA, J. Genetic, evolutionary and plant breeding insights from the domestication of maize. **The Natural History of Model Organisms**, Cambridge, 4:e05861, 2015.

HALLAUER, A. R.; MIRANDA FILHO, J. B. **Quantitative genetics in maize breeding**. Ames: Iowa University Press, 1988. 468 p.

HE, J.; CHEN, F.; CHEN, S.; GUOSHENG, L.V.; DENG, Y.; FANG, W.; LIU, Z.; GUAN, Z.; HE, C. Chrysanthemum leaf epidermal surface morphology and antioxidant and defense enzyme activity in response to aphid infestation. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 168, n. 7, p. 687-693, 2011.

HENG-MOSS, T. M.; SARATH, G.; BAXENDALE, F.; NOVAK, D.; BOSE, S.; NI, X.; QUISENBERRY, S. Characterization of oxidative enzyme changes in buffalograsses challenged by *Blissus occiduus*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 97, n. 3, p. 1086-1095, 2004.

HOLDEN, J.; PEACOCK, J.; WILLIAMS, T. **Genes, Crops and the Environment**. Cambridge/New York: Cambridge University Press, 1993. 162 p.

HORBER, E. Types and classification of resistance. In: MAXWELL, F. G.; JENNINGS, P. R. (Eds.). **Breeding Plants Resistant to Insects**. New York: John Wiley, 1980. p. 15-21.

HOWITT, C. A.; POGSON, B. J. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 435-445, 2006.

HUANG, J.; HIRJI, R.; ADAM, L.; ROZWADOWSKI, K. L.; HAMMERLINDL, J. K.; KELLER, W. A.; SELVARAJ, G. Genetic engineering of glycinebetaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. **Plant Physiology**, Washington, v. 122, n. 3, p. 747-756, 2000.

JANTARA, A. E.; SILVA, F. J. P. Sementes crioulas: Estratégias para assegurar renda com autonomia na agricultura familiar camponesa. In: PATERNIANI, M. E. A. G. Z.; DUARTE, A. P.; TSUNECHIRO, A. **Diversidade e inovações na cadeia produtiva de milho e sorgo na era dos transgênicos**. Campinas: Instituto Agrônômico; Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2012. p. 79-94.

JEPPSON, L. R.; KEIFER, H. H.; BAKER, E. W. **Mites Injurious to Economic Plants**. Berkeley: University of California Press, 1975. 614 p.

JIANG, B.; SIREGAR, U.; WILLEFORD, K. O.; LUTHE, D. S.; WILLIAMS, W. P. Association of a 33-kilodalton cysteine proteinase found in corn callus with the inhibition of fall armyworm larvae growth. **Plant Physiology**, Washington, v. 108, n. 4, p. 1631-1640, 1995.

KESSLER, A.; BALDWIN, I. T. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, n. 1, p. 299-328, 2002.

KOCH, N. Tayuyá: controle biológico da vaquinha do feijoeiro. **Revista Brasileira de Extensão Rural**, Brasília, v. 2, p. 3, 1981.

KRYSAN, L. J. Introduction: biology, distribution and identification of pest *Diabrotica*. In: KRYSAN, J. L.; MILLER, T. A. (Eds.). **Methods for the study of pest *Diabrotica***. New York: Springer-Verlag, 1986. p. 1-23.

LAUMANN, R.; NEIVA, P. R.; PIRES, C. S. S.; SCHMIDT, F. G. V.; BORGES, M. **Ritmos diários de atividades comportamentais de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) relacionados à temperatura**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 6 p.

LIA, V. V.; POGGIO, L.; CONFALONIERI, V. A. Microsatellite variation in maize landraces from Northwestern Argentina: genetic diversity, population structure and racial affiliations. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 119, n. 6, p. 1053-1067, 2009.

MAHAR, K. S.; AGRAWAL, P. K.; BABU, B. K.; GUPTA, H. S. Assessment of genetic diversity among the elite maize (*Zea mays* L.) genotypes adapted to North-Western Himalayan region of India using microsatellite markers. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, New Delhi, v. 18, n. 2, p. 217-220, 2009.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 29 mai. 2016.

MARQUES, G. B. C.; ÁVILA, C. J.; PARRA, J. R. P. Damages caused by larvae and adults of *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) in corn. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 11, p. 1983-1986, 1999.

MATYSIK, J.; BHALU, B.; MOHANTY, P. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. **Current Science**, Bangalore, v. 82, n. 5, p. 525-532, 2002.

MILANEZ, J. M. **Técnicas de criação e bioecologia de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae)**. 1995. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.

MILANEZ, J. M.; PARRA, J. R. P. Preferência de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) para oviposição em diferentes tipos e umidade de solos. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 155-158, 2000.

MOURÃO, C. (2004) A volta da crioula. **O Eco**, 17 jun. 2016. Disponível em: <http://www.oeco.org.br/reportagens/814-oeco_10214/>. Acesso em: 17 jun. 2016.

NASS, L. L.; PATERNIANI, E. Pre-breeding: a link between genetic resources and maize breeding. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.57, n. 3, p. 581-587, 2000.

NASS, L. L.; PELLICANO, I. J.; VALOIS, A. C. C. Utilization of genetic resources for maize and soybean breeding in Brazil. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 16, n. 4, p. 983-988, 1993.

PAINTER, R. H. **Insect Resistance in Crop Plants**. Lawrence: University of Kansas Press., 1951. 520 p.

PANDA, N.; KHUSH, G.S. **Host Plant Resistance to Insects**. Wallingford: CABI/IRRI, 1995. 431p.

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. Melhoramento do milho. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora UFV, 1999. p. 429-485.

PEAIRS, F. B. **Mites in wheat**. Colorado: Colorado State University: Extension, 2014a. 2 p.

PEAIRS, F. B. **Spider mites in corn**. Colorado: Colorado State University: Extension, 2014b. 2 p.

PECHAN, T.; COHEN, A.; WILLIAMS, W. P.; LUTHE, D. S. Insect feeding mobilizes a unique plant defense protease that disrupts the peritrophic matrix of caterpillars. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 20, p. 13319-13323, 2002.

PECHAN, T.; YE, L.; CHANG, Y. M.; MITRA, A.; LIN, L.; DAVIS, F. M.; WILLIAMS, W. P.; LUTHE, D. S. A unique 33-kD cysteine proteinase accumulates in response to larval feeding in maize genotypes resistant to fall armyworm and other Lepidoptera. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 7, p. 1031-1040, 2000.

PERRING, T. M.; ARCHER, T. L.; JOHNSON, J. W.; PHILLIPS, J. M. Evaluation of several grain sorghum characteristics for resistance to the banks grass mite. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 75, n. 2, p. 257-260, 1982.

PONS, A.; BRESOLIN, M. A cultura do milho. **Trigo e Soja**, Porto Alegre, n. 57, p. 6-31, 1981.

RAJENDRAKUMAR, C. S. V; REDDY, B. V. B.; REDDY, A. R. Proline-protein interactions: protection of structural and functional integrity of M4 lactate dehydrogenase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 201, n. 2, p. 957-963, 1994.

SADASIVAM, S.; THAYUMANAVAN, B. **Molecular Host Plant Resistance to Pests**. New York: Marcel Dekker, 2003. 479 p.

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

SETHI, A.; MCAUSLANE, H. J.; RATHINASABAPATHI, B.; NUESSELY, G. S.; NAGATA, R. T. Enzyme induction as a possible mechanism for latex-mediated insect resistance in romaine lettuce. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 35, n. 2, p. 190-200, 2009.

SHIVAJI, R.; CAMAS, A.; ANKALA, A.; ENGELBERTH, J.; TUMLINSON, J. H.; WILLIAMS, W. P.; WILKINSON, J. R.; LUTHE, D. S. Plants on constant alert: elevated levels of jasmonic acid and jasmonate-induced transcripts in caterpillar-resistant maize. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 36, p. 179-191, 2010.

SILVA, A. G. D. A.; GONÇALVES, C. R.; GALVÃO, D. M.; GONÇALVES, A. J. L.; GOMES, J.; SILVA, M. N.; SIMONI, L. **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil, seu parasitas e predadores**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1968. 622 p. (Parte 2).

SMITH, C. M. **Plant Resistance to Insects: A Fundamental Approach**. New York: Wiley, 1989. 286 p.

SMITH, C. M. Plant resistance against pests: issues and strategies. In: KOUL, O.; DHALIWAL, G. S.; CUPERUS, G. W. (Eds.). **Integrated Pest Management: Potential, Constraints and Challenges**. Wallingford/Cambridge: CABI, 2004. p. 147-67.

SMITH, C. M. **Plant resistance to arthropods: Molecular and Conventional Approaches**. Springer: Dordrecht, 2005. 423 p.

SMITH, C. M. Biochemical plant defenses against herbivores: from poisons to spices. In: DUBINSKY, Z.; SECKBACH, J. (Eds.). **All Flesh is Grass, Plant-Animal Interrelationships Series: Cellular Origins, Life in Extreme Habitats and Astrobiology**. Berlin: Springer, 2010. p. 1-20.

SMITH, C. M.; CLEMENT, S. L. Molecular bases of plant resistance to arthropods. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 57, p. 309-328, 2012.

SMITH, P. M. **The chemotaxonomy of plants**. Londres: Edward Arnold, 1976. 313 p.

STICKNEY, F. S.; BARNES, D. F.; SIMMONS, P. **Data palm insects in the United States**. Washington: USDA Circular, 1950. 57 p.

STIEFEL, V. L.; MARGOLIES, D. C. Do components of colonization – dispersal cycles affect the offspring sex ratios of Banks grass mites (*Oligonychus pratensis*)? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 64, n. 2, p. 161-166, 1992.

TANKSLEY, S. D.; MCCOUCH, S. R. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. **Science**, Washington, v. 277, n. 5329, p. 1063-1066, 1997.

TOKARSKI, A.; TOMEN, A.; ANDERLE, T. C. Z.; HYCZY, R. C.; SPECHT, A. P. S.; SANTOS, R. C.; WOBETTO, C.; NARDI, C. Danos ocasionados por larvas de *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) em raízes de milho. In: XIII Reunião Brasileira sobre Pragas de Solo, 2013, Rondonópolis. **Resumos...** Rondonópolis: Fundação Mato Grosso, 2013.

TOLLEFSON, J. Drought-tolerant maize gets US debut. **Nature**, London, v. 469, n. 7329, p. 144, 2011.

UNL - University of Nebraska-Lincoln. Turfgrass – Spider Mites. **Institute of Agriculture and Natural Resources (Department of Entomology)**, Lincoln, 30 mai. 2016. Disponível em: < <http://entomology.unl.edu/turfent/documnts/spmites.shtml>>. Acesso em: 30 mai. 2016.

VIANA, P. A. **Manejo de *Diabrotica speciosa* na Cultura do Milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. 6 p.

WALKER, M. A. Future directions of rootstock breeding. In: ROOTSTOCK SEMINAR, 1992, Reno, EUA. **Proceedings...** Reno, EUA: The American Society for Enology and Viticulture, 1992.

WHITTAKER, R. H. The biochemical ecology of higher plants. In: SONDHEIMER, E.; SIMEONE, J. B. (Eds.). **Chemical ecology**. New York: Academic Press, 1970. p. 43-70.

ZEVEN, A. C. Landraces: A review of definitions and classifications. **Euphytica**, Wageningen, v. 104, n. 2, p. 127-139, 1998.

ZHANG, S. Z.; HAU, B. Z.; ZHANG, F. Induction of the activities of antioxidative enzymes and the levels of malondialdehyde in cucumber seedlings as a consequence of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) infestation. **Arthropod-Plant Interactions**, Dordrecht, v. 2, n. 4, p. 209-213, 2008.

CAPÍTULO 2 – Fatores associados à expressão de antibiose a *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) em cultivares de milho crioulo

RESUMO – Resistência a insetos-praga pode ser encontrada em plantas crioulas, uma importante alternativa aos métodos de controle convencionais. Esse estudo teve como objetivos: investigar se (1) os aspectos biológicos de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) são influenciados pela proporção larvas por planta e cultivares de milho crioulo e (2) fenóis totais e barreiras morfológicas nas raízes estão relacionadas com a resistência das plantas ao ataque larval. Inicialmente foi realizado um ensaio de metodologia de pesquisa, a fim de encontrar a melhor proporção larvas por planta. Em seguida, foi conduzido um estudo de antibiose com 19 cultivares de milho crioulo, avaliando diferentes variáveis após a emergência dos adultos. Posteriormente, foram selecionadas oito cultivares para avaliar o período de oviposição de *D. speciosa* criada nestas cultivares, estudando ainda o número de ovos e larvas eclodidas por tratamento. Amostras de raízes destas cultivares foram analisadas quanto aos valores de fenóis totais, fibras, lignina, hemicelulose, e celulose. Considerando as variáveis avaliadas após emergência dos adultos, destacaram-se as cultivares Pérola e Fortuna, por prolongar o período de desenvolvimento dos insetos, assim como pela baixa sobrevivência apresentada pelos mesmos. Em relação ao número de larvas eclodidas, menor número foi observado na cultivar Palha Roxa, caracterizando um efeito adverso na fertilidade de ovos. A presença em maior quantidade de fibras, lignina, e celulose em raízes de cultivares resistentes injuriadas pelo herbívoro indica relação na manifestação da resistência. As cultivares classificadas como resistentes nessa pesquisa podem ser consideradas no melhoramento genético vegetal, visando obter cultivares resistentes ao ataque de *D. speciosa*.

Palavras-chave: *Zea mays* L., resistência nativa, resistência de plantas a insetos, larva-alfinete, pragas de solo, manejo integrado de pragas

CHAPTER 2 - Factors associated with the antibiosis expression to *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) in maize landraces

ABSTRACT – Resistance to insect pests can be found in landrace plants, one important alternative to the conventional control methods. This study aimed to investigate if (1) the biological aspects of *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) are influenced by larvae per plant ratio and maize landraces and (2) total phenols and morphological barriers in the roots are correlated with the plant resistance to the larval attack. Initially, a research methodology test was carried out, in order to find the most suitable larvae per plant ratio. Afterwards, an antibiosis assay using 19 maize landraces was set up, assessing different variables after adults' emergence. Thereafter eight cultivars were selected to evaluate the oviposition period of *D. speciosa* bred in those cultivars, reporting also the number of eggs and hatched larvae in each treatment. Root samples of those cultivars were analyzed regarding the contents of total phenols, fibers, lignin, hemicellulose, and cellulose. Considering the variables assessed after adults' emergence, stood out the cultivars Pérola and Fortuna, for prolonging the development period of the insects, as well as for provoking low survival on them. Regarding the larvae hatching, lower number was reported on the cultivar Palha Roxa, characterizing an adverse effect on fertility. The higher amounts of fibers, lignin, and cellulose in the roots of the resistant cultivars injured by the herbivores indicate relationship with the resistance expression. The cultivars classified as resistant may be considered in the plant breeding, aiming to develop resistant cultivars to the larval attack of *D. speciosa*.

Keywords: *Zea mays* L., native resistance, plant resistance to insects, rootworm, soil pests, integrated pest management

1. Introdução

O milho (*Zea mays* L.) é alvo de diversas pragas, que atacam o sistema radicular (CABRERA WALSH, 2001; FURLAN, 2014) e a parte aérea (SHIVAJI et al., 2010; BURKNESS et al., 2010) das plantas. Entre as pragas que atacam raízes de plantas de milho, a larva de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) é a mais disseminada e abundante na América do Sul (CHRISTENSEN, 1943; CABRERA WALSH, 2003). A injúria causada pela alimentação de larvas desse inseto em plantas de milho pode causar atraso no desenvolvimento e aumentar a suscetibilidade das mesmas ao acamamento (BOFF; GANDIN, 1992; MARQUES; ÁVILA; PARRA, 1999).

No Brasil, o controle de *D. speciosa* tem sido realizado principalmente utilizando inseticidas químicos sintéticos (ARRUDA-GATTI; VENTURA, 2003). No entanto, diversos casos de resistência de outra espécie do gênero *Diabrotica* vêm sendo relatados, como por exemplo, *Diabrotica virgifera virgifera* (LeConte, 1868), a qual é uma das principais pragas da cultura do milho nos EUA, apresentando resistência a diferentes inseticidas químicos sintéticos (MEINKE et al., 1998; PARIMI et al., 2006).

O uso de cultivares resistentes é um método de controle pouco considerado para o controle de *D. speciosa* na cultura do milho, no Brasil (VIANA, 2010). Por definição, resistência de plantas a artrópodes é a soma das qualidades constitutivas herdadas geneticamente, que resulta em uma planta de uma cultivar ou espécie ser menos danificada do que outra suscetível (SMITH, 2005). Atualmente, a resistência de plantas é dividida em três categorias, quais sejam antibiose (efeitos adversos no desenvolvimento e sobrevivência da praga), antixenose (efeitos adversos no comportamento da praga), e tolerância (recuperação da planta ao ataque do herbívoro) (STOUT, 2013; BOIÇA JÚNIOR et al., 2015). Na antibiose, os efeitos de uma planta resistente variam de moderado a letal, e podem resultar de fatores tanto químicos como morfológicos (SMITH, 2005).

Resistência é comumente identificada em plantas selvagens, não domesticadas ou crioulas, as quais podem ter relações apenas taxonômicas distantes com as espécies cultivadas (SMITH, 2005). Não é incomum para estas plantas possuírem baixo rendimento, arquitetura indesejável, ou suscetibilidade a doenças.

Alguns destes problemas podem ser eliminados com a adaptação e uso das técnicas de resgate de embriões, e de cultura de tecidos de plantas. Para a maioria dos casos, a incorporação da resistência de plantas selvagens em plantas domesticadas é um processo de longo prazo (SMITH, 2005).

Plantas crioulas não apresentam modificação pela biotecnologia ou por outros processos de melhoramento (MOURÃO, 2004). Zeven (1998) em uma revisão sobre definições para cultivares crioulas, concluiu que a melhor definição seria “uma variedade nativa com uma alta capacidade de tolerar estresses bióticos e abióticos resultando em alta estabilidade de produção e um nível intermediário de produção sob um sistema agrícola com baixo investimento”. A adaptabilidade de cultivares de milho crioulo às diferentes condições ambientais tem criado variação para características agrônômicas e de qualidade, incluindo resistência aos estresses bióticos e abióticos (MAHAR et al., 2009). Esses materiais podem ser explorados na tentativa de se encontrar genes responsáveis pela expressão da resistência, e assim incorporar os mesmos nos germoplasmas atuais via transgenia (HAKE; ROSS-IBARRA, 2015), devido sua variabilidade genética (LIA et al., 2009).

Nogueira (2015) avaliou a resistência de cultivares de milho crioulo a *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), e observou que a cultivar Pérola apresentou resistência moderada nas categorias não preferência para alimentação e oviposição, e antibiose. Além disso, Nogueira (2015) concluiu que as cultivares Caatingueiro e Maia foram moderadamente resistentes na categoria não preferência para oviposição em teste com chance de escolha.

Dessa forma, a presente pesquisa teve por objetivo investigar se: (1) os aspectos biológicos de *D. speciosa* são influenciados pela proporção larvas por planta e cultivares de milho crioulo; (2) fenóis totais e barreiras morfológicas nas raízes estão relacionadas com a resistência das plantas ao ataque larval.

2. Material e Métodos

A criação de *D. speciosa*, assim como todas as pesquisas descritas a seguir, foram conduzidas no Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos, do Departamento de Fitossanidade, da Universidade Estadual Paulista (FCAV/UNESP),

Campus de Jaboticabal, sob condições climáticas de 25 ± 2 °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$, e fotoperíodo de 12:12 (L:E). A vermiculita utilizada como substrato para plantas e insetos foi esterilizada em estufa, a 120 °C, por 2 horas. As sementes de milho foram tratadas com o fungicida carbendazim + thiram (Derosal Plus®), aplicando-se 200 mL do produto comercial para cada 100 kg de sementes.

2.1. Criação de insetos

A forma de condução da criação de *D. speciosa* utilizada nesta pesquisa foi realizada de acordo com metodologia proposta por Ávila et al. (2000). Cerca de 150 adultos de *D. speciosa* foram coletados em lavoura de feijão, situada na fazenda experimental da FCAV/UNESP, e posteriormente acondicionados em gaiolas de vidro, formato retangular, de 40 cm de comprimento $\times$ 30 cm de largura $\times$ 30 cm de altura, sendo utilizadas raízes de plantas da cultivar de milho comercial Cativerde 02 para a alimentação dos insetos na fase larval, e folhas da cultivar de feijoeiro Pérola para a alimentação dos adultos.

Para a obtenção de ovos de *D. speciosa* foram utilizadas placas de Petri de 14 cm de diâmetro $\times$ 2 cm de altura, contendo, ao fundo, algodão hidrófilo umedecido e, sobre este, gaze de coloração preta, simulando a cor do solo, o que estimula a oviposição do inseto. Os ovos foram retirados do substrato de oviposição lavando-se a gaze em água corrente sobre um tecido tipo *voile*, onde os ovos ficaram retidos. Para evitar a contaminação por microrganismos durante o período de incubação, os ovos foram tratados com solução de sulfato de cobre (CuSO_4) a 1%, durante dois minutos, e em seguida, transferidos para placas de Petri de 9 cm de diâmetro $\times$ 1 cm de altura, forradas com papel filtro umedecido (ÁVILA et al., 2000).

A infestação inicial de larvas neonatas foi realizada em recipientes plásticos redondos de 17 cm de diâmetro $\times$ 9 cm de altura, os quais tiveram o fundo preenchido por 40 g de vermiculita de granulometria fina, umedecida com 50 g de água deionizada, onde posteriormente foram colocadas 70 plantas de milho ($\pm$ 5 dias de idade), e liberadas 70 larvas neonatas de *D. speciosa* com auxílio de pincel de cerdas macias. Após inoculação das larvas, as mesmas medidas de água e vermiculita foram acrescentadas no recipiente, a fim de cobrir as raízes das plantas de milho. Estes

recipientes foram cobertos por tecido *voile*, sobre o qual foi colocada uma tampa plástica de diâmetro igual ao dos recipientes plásticos, com abertura de 9 cm de diâmetro no centro para permitir ventilação.

A transferência das larvas para recipientes maiores e retangulares (27 cm de comprimento × 16 cm de largura × 9,5 cm de altura) foi realizada 10 dias após infestação. Nessa fase, as quantidades de vermiculita, água deionizada, e plantas de milho foram dobradas, a fim de se oferecer maior espaço e quantidade de alimento para o desenvolvimento larval e pupal de *D. speciosa*. A vermiculita usada na fase anterior foi reaproveitada visando a mínima manipulação das larvas. Os recipientes foram cobertos por tecido *voile*, sobre o qual foi colocada uma tampa plástica de tamanho igual ao dos recipientes, com abertura no centro de 12 cm de comprimento × 8 cm largura, para permitir ventilação.

A emergência dos adultos ocorreu a partir dos 12 dias após transferência, com pico geralmente entre 15-17 dias. Os adultos eram acondicionados nas gaiolas de vidro acima mencionadas. Coleta de adultos em campo foi realizada a cada 2 meses, e estes eram adicionados à colônia do laboratório.

2.2. Aspectos biológicos de *Diabrotica speciosa* alternando-se a proporção do número de larvas por plantas de milho

Esse trabalho foi realizado utilizando-se recipientes plásticos redondos de 14 cm diâmetro × 9,5 cm altura, com volume de 1L. O fundo dos recipientes foi preenchido por 40 g de vermiculita fina umedecida por 50 g de água deionizada, assim como a porção utilizada na cobertura das raízes. Na infestação inicial, plantas de milho cv. Cativerde 02 de cinco dias de idade foram colocadas sobre a vermiculita e infestadas por larvas neonatas de *D. speciosa*. Na transferência, os mesmos recipientes foram utilizados, reaproveitando a mesma vermiculita usada na fase anterior com o fim de evitar manuseio das larvas que pode causar mortalidade, sendo a diferença a idade das larvas (10 dias criadas na fase anterior) e plantas por recipiente. Os tratamentos analisados foram: (1) 5 larvas/5 plantas na infestação inicial e 5 larvas/10 plantas na transferência; (2) 10 larvas/10 plantas na infestação inicial e 10 larvas/20 plantas na transferência; (3) 5 larvas/5 plantas na infestação inicial e 5 larvas/5 plantas na

transferência; (4) 10 larvas/10 plantas na infestação inicial e 10 larvas/10 plantas na transferência. As mesmas metodologias descritas na seção anterior para infestação e transferência foram adotadas. Os recipientes foram cobertos por tecido *voile*, sobre o qual foi colocada uma tampa plástica de diâmetro igual ao dos recipientes plásticos, com abertura de 7 cm de diâmetro no centro para permitir aeração.

Após a emergência dos adultos, as seguintes variáveis foram avaliadas: período de larva a adulto (dias), peso (mg), longevidade sem alimento (dias), razão sexual, e porcentagem de sobrevivência total dos insetos. Foram estudados quatro tratamentos, realizando-se cinco repetições (recipientes plásticos).

2.3. Aspectos biológicos de *Diabrotica speciosa* alimentada com raízes de plantas de milho crioulo na fase larval

As sementes utilizadas neste estudo foram fornecidas pela AS-PTA Agricultura Familiar e Agroecologia, unidade localizada no município de Palmeira, estado do Paraná, Brasil. As dezenove cultivares utilizadas foram: Amarelão, Azteca, Aztecão, Aztequinha AM Sabugo Fino, Branco Antigo – FNP, Branco Gielinski, Caatingueiro, Caiano, Carioca, Composto, Encantilado, Fortuna, Maia, Milho Branco – Antigo, Nutricional, Palha Roxa, Pérola, São Pedro, e 14 Variedades.

A metodologia utilizada foi idêntica àquela descrita nos itens anteriores, no que se refere ao tamanho de recipientes, quantidade de vermiculita e água, e os procedimentos gerais de infestação e transferência de larvas. Nesta fase, porém, foi utilizada a proporção larvas por planta selecionada no teste anterior. Em cada recipiente plástico foram liberadas 10 larvas de *D. speciosa*, e oferecidas 10 e 20 plantas para as mesmas, por ocasião da infestação inicial e transferência, respectivamente, com a finalidade de se estudar o maior número de insetos, e fornecer alimento em maior quantidade.

Após a emergência dos adultos, as seguintes variáveis foram avaliadas: período larval a adulto (dias), peso (mg), longevidade sem alimento (dias), razão sexual, e porcentagem de sobrevivência dos insetos. Foram utilizadas 19 cultivares, perfazendo-se 10 repetições (recipientes plásticos).

2.4. Período de oviposição, fecundidade e fertilidade de ovos de *Diabrotica speciosa* alimentada em raízes de cultivares de milho crioulo na fase larval

Os insetos foram sexados de acordo com metodologia proposta por White (1977), que determina que os machos possuem uma placa adicional no final do abdômen, pigídio, o qual a fêmea não possui, sendo o abdômen desta mais pontegudo.

Os insetos utilizados neste ensaio foram criados em uma das oito cultivares de milho crioulo selecionada de acordo com os níveis de resistência (Azteca [suscetível], Encantado [suscetível], Fortuna [resistente], Milho Branco – Antigo [suscetível], Palha Roxa [suscetível], Pérola [resistente], São Pedro [suscetível], e 14 Variedades [suscetível]). Após a emergência dos adultos, um casal de *D. speciosa* foi introduzido em gaiolas plásticas de 11 cm de diâmetro × 11 cm de altura, as quais foram cobertas por tecido *voile*, e este preso à gaiola por um elástico, para evitar a fuga dos insetos. Dentro dessas gaiolas, foi colocado um tubo de ensaio de 2,5 cm diâmetro × 8,5 cm de altura, sendo este preenchido por água, no qual foi introduzida uma planta de feijoeiro de aproximadamente 10 dias de idade, como recurso alimentar dos adultos, a qual foi repostada a cada 1-2 dias. Além disso, um recipiente plástico de 3,0 cm de diâmetro × 0,5 cm de altura, forrado com algodão hidrófilo umedecido com água deionizada, e este coberto com gaze de cor preta, foi introduzido na gaiola como local de oviposição, e umedecido diariamente.

Uma vez que os insetos estavam acondicionados nas gaiolas, foi registrado o período de pré-oviposição de cada fêmea, em cada uma das oito cultivares de milho crioulo selecionada. Após o início da oviposição, foi quantificado semanalmente o número de ovos por casal (fecundidade), assim como de larvas eclodidas (fertilidade). Com a finalidade de se obter dados concisos também sobre fertilidade, observou-se os ovos de *D. speciosa* por um período de 10 dias após a coleta semanal, para assegurar que houve tempo suficiente para eclosão das larvas. Os ovos de *D. speciosa* foram coletados através de lavagem do tecido gaze de cor preta em água corrente, sendo os ovos retidos dentro de um pedaço de tecido *voile*, que foi colocado numa peneira para acondicionamento. Em seguida, o número de ovos foi avaliado utilizando-se microscópio estereoscópio de 40 × aumento (Modelo SZ40, Olympus).

O número de ovos e larvas foi avaliado em tratamentos que tinham três repetições (casais) ou mais.

2.5. Barreiras morfológicas e fenóis totais em raízes de plantas de milho com ou sem infestação de larvas de *Diabrotica speciosa*

Cento e quarenta plantas de milho de cada uma das oito cultivares selecionadas foram cultivadas em recipientes plásticos retangulares de 27 cm de comprimento × 16 cm de largura × 9,5 cm de altura, preenchidos por vermiculita fina e água deionizada, conforme as medidas citadas na seção “criação de insetos”. Amostras de raízes de plantas (140 plantas por recipiente = uma amostra) de 15 dias de idade, infestadas ou não por larvas de *D. speciosa*, foram lavadas em água corrente, secas à temperatura ambiente, e em seguida passaram por secagem em estufa (Modelo AS200S, QUIMIS, Diadema, São Paulo, Brasil) a 35 °C, por sete dias. As plantas que foram infestadas por larvas neonatas tinham cinco dias de idade, passando um período de infestação de 10 dias.

As amostras foram quimicamente analisadas no Laboratório de Nutrição Animal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP, usando os métodos padronizados da Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC, 2011) para fibra em detergente neutro (FDN) (ID 973.18), fibra em detergente ácido (FDA) (ID 2002.04), e lignina (ID 973.18). O valor de hemicelulose foi obtido pela fórmula (FDN-FDA), e celulose por (FDA-lignina). Fenóis totais foi analisado de acordo com metodologia proposta por Makkar et al. (2006).

2.6. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade de variância (Bartlett). Se de acordo com as pressuposições estatísticas acima mencionadas, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F, e as médias comparadas pelo teste de Skott-Knott ou Tukey ($\alpha = 0,05$). Quando os dados não foram normalizados por quaisquer transformações, os mesmos foram submetidos ao teste não-paramétrico de

Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$). Os dados de número de ovos de *D. speciosa* foram submetidos à análise de regressão.

3. Resultados

3.1. Aspectos biológicos de *Diabrotica speciosa* alternando-se a proporção do número de larvas por plantas de milho

Diferenças significativas não foram observadas para nenhuma das variáveis avaliadas, quais foram: período larval a adulto ($H = 3,70$; gl = 3, 157; $P = 0,2953$) (24,96 – 25,58 dias), peso ($F = 1,02$; gl = 3, 157; $P = 0,3849$) (9,46 – 10,03 mg), longevidade ($H = 0,55$; gl = 3, 157; $P = 0,9088$) (3,30 – 3,52 dias), razão sexual ($H = 7,81$; gl = 3, 157; $P = 0,0501$) (0,36 – 0,65), e sobrevivência ($H = 1,95$; gl = 3, 296; $P = 0,5827$) (50 – 62%) (dados não apresentados).

3.2. Aspectos biológicos de *Diabrotica speciosa* alimentada com raízes de plantas de milho crioulo na fase larval

O período de desenvolvimento de larva a adulto de *D. speciosa* foi mais longo quando os insetos foram criados nas cultivares Carioca, Encantilado, Fortuna, Maia, Milho Branco – Antigo, Nutricional, Palha Roxa, Pérola, São Pedro, e 14 Variedades ($F = 3,22$; gl = 18, 171; $P < 0,0001$) (Tabela 1). Os adultos apresentaram menor peso, quando na fase larval foram alimentados nas cultivares Amarelão, Azteca, Aztecão, Aztequinha AM Sabugo Fino, Branco Gielinski, Caatingueiro, Caiano, e Encantilado ($F = 1,80$; gl = 18, 171; $P = 0,0284$) (Tabela 1). Menores porcentagens de sobrevivência de insetos foram observadas nas cultivares Pérola e Fortuna ($H = 49,20$; gl = 18, 171; $P < 0,0001$) (Fig. 1), o que representa uma diferença de 38 e 29%, respectivamente, em relação a cultivar suscetível Azteca. Diferenças significativas não foram observadas para longevidade sem alimento ($F = 0,81$; gl = 18, 171; $P = 0,6904$), que em média foi de três dias, e razão sexual ($H = 20,48$; gl = 18, 171; $P = 0,3066$), a qual variou de 0,40 a 0,63 (dados não apresentados).

Tabela 1. Período de desenvolvimento de larva a adulto e peso de adultos (média $\pm$ EP) de *Diabrotica speciosa* criados em diferentes cultivares de milho crioulo

Cultivar	Período larval a adulto(dias) ^a	Peso (mg) ^b
Amarelão	25,68 $\pm$ 0,65 b	8,75 $\pm$ 0,20 b
Azteca	24,99 $\pm$ 0,63 b	8,95 $\pm$ 0,19 b
Aztecão	24,74 $\pm$ 0,66 b	8,41 $\pm$ 0,44 b
Aztequinha AM Sabugo Fino	25,22 $\pm$ 0,70 b	8,58 $\pm$ 0,26 b
Branco Antigo – FNP	24,75 $\pm$ 0,54 b	9,47 $\pm$ 0,30 a
Branco Gielinski	24,60 $\pm$ 0,70 b	8,75 $\pm$ 0,28 b
Caatingueiro	24,96 $\pm$ 0,62 b	8,49 $\pm$ 0,32 b
Caiano	25,01 $\pm$ 0,64 b	8,81 $\pm$ 0,37 b
Carioca	26,47 $\pm$ 0,54 a	9,32 $\pm$ 0,19 a
Composto	25,92 $\pm$ 0,50 b	9,54 $\pm$ 0,18 a
Encantiliado	26,60 $\pm$ 0,64 a	8,89 $\pm$ 0,38 b
Fortuna	26,10 $\pm$ 0,55 a	9,24 $\pm$ 0,50 a
Maia	26,31 $\pm$ 0,56 a	9,52 $\pm$ 0,30 a
Milho Branco – Antigo	26,67 $\pm$ 0,56 a	9,34 $\pm$ 0,23 a
Nutricional	26,71 $\pm$ 0,52 a	9,54 $\pm$ 0,26 a
Palha Roxa	26,52 $\pm$ 0,50 a	9,24 $\pm$ 0,14 a
Pérola	28,44 $\pm$ 0,75 a	9,41 $\pm$ 0,28 a
São Pedro	27,27 $\pm$ 0,81 a	9,64 $\pm$ 0,30 a
14 Variedades	28,13 $\pm$ 0,74 a	9,39 $\pm$ 0,23 a

^a Médias seguidas por mesma letra na coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade. ^b Médias seguidas por mesma letra na coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

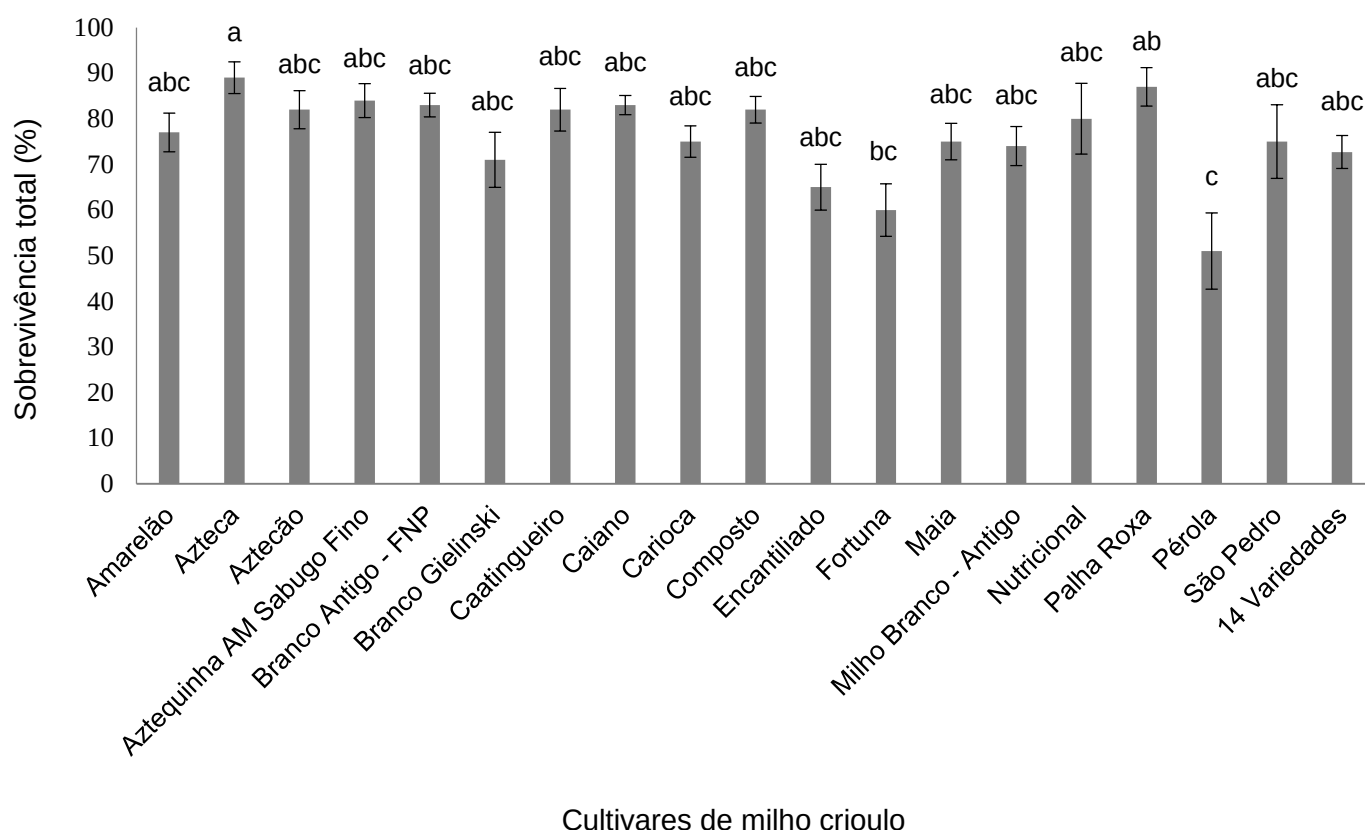


Fig. 1. Sobrevivência total (média $\pm$ EP) de *Diabrotica speciosa* criada em diferentes cultivares de milho crioulo. Médias seguidas por mesma letra acima das barras não diferem significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

3.3. Período de oviposição, fecundidade e fertilidade de ovos de *Diabrotica speciosa* alimentada em raízes de cultivares de milho crioulo na fase larval

As fêmeas de *D. speciosa* iniciaram a oviposição entre 6,77 a 8,20 dias ($H = 5,15$; gl = 7,70; $P = 0,6411$) após emergência, não havendo diferenças significativas entre cultivares (dados não apresentados). A quantidade de ovos colocada por fêmeas de *D. speciosa* também foi igual ($F = 0,24$; gl = 7, 69; $P = 0,2353$), quando considerando a somatória de ovos por todo o período de oviposição do inseto (Fig. 2a). Entretanto, houve diferenças ao considerar o número de larvas eclodidas, destacando a cultivar Palha Roxa pelo menor número ($F = 2,30$; gl = 7, 69; $P = 0,0367$), ao contrário da cultivar Azteca, a qual propiciou maior eclosão, sendo a quantidade

de larvas eclodidas nesta cultivar 4,75 vezes superior em relação a cultivar Palha Roxa (Fig. 2b).

A distribuição de ovos de *D. speciosa* ao longo do período de oviposição difere em relação às cultivares de milho. Nas cultivares Fortuna ($F = 54,23$; $gl = 1, 65$; $P < 0,0001$) (Fig. 3a), Milho Branco – Antigo ($F = 5,19$; $gl = 1, 47$; $P = 0,0270$) (Fig. 3b), Palha Roxa ($F = 5,07$; $gl = 1, 46$; $P = 0,0290$) (Fig. 3c), e São Pedro ($F = 24,34$; $gl = 1, 64$; $P < 0,0001$) (Fig. 3d), foi observado o maior número de ovos logo no início da oviposição, e a variação dos dados é explicada pelo modelo de regressão linear simples.

Fêmeas de *D. speciosa* que emergiram das cultivares Azteca ($F = 6,09$; $gl = 1, 60$; $P < 0,0001$) (Fig. 4a) e Encantado ($F = 11,80$; $gl = 1, 60$; $P = 0,0010$) (Fig. 4b), no início colocaram poucos ovos, aumentando progressivamente até atingir um pico, na terceira e quarta semana após emergência, respectivamente, que mais tarde teve seu declínio. A variação dos dados destas cultivares se ajustou ao modelo de regressão polinomial quadrática.

Quando criada na cultivar 14 Variedades ($F = 4,04$; $gl = 1, 62$; $P = 0,0490$), *D. speciosa* apresentou uma distribuição singular de ovos no decorrer das semanas, ocorrendo dois picos, na terceira e décima primeira semana, e a variação dos dados foi significativa pela regressão polinomial cúbica (Fig. 4c).

Os dados da cultivar Pérola ($F = 0,04$; $gl = 1, 33$; $P = 0,8470$), uma das mais resistentes encontrada nesta pesquisa, não se encaixou em nenhuma equação de regressão (Fig. 4d). Além disso, nesta cultivar avaliou-se a oviposição somente até a sétima semana após emergência dos insetos, devido à alta mortalidade dos mesmos.

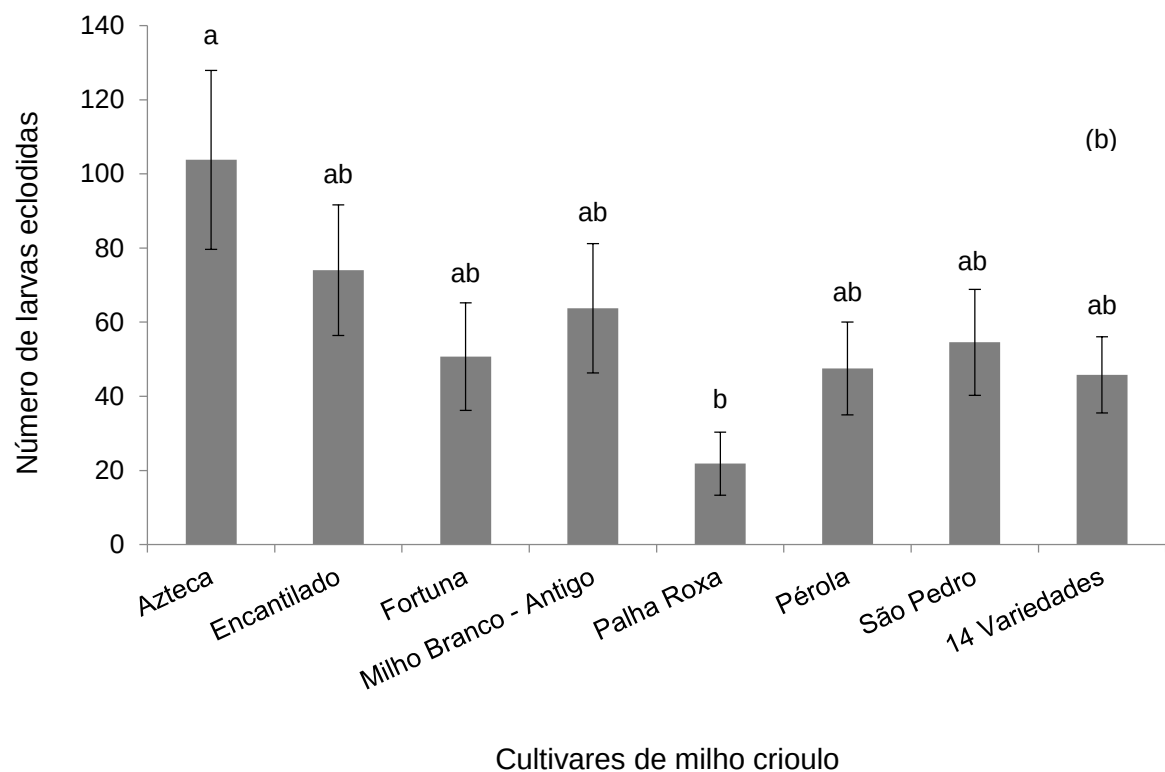
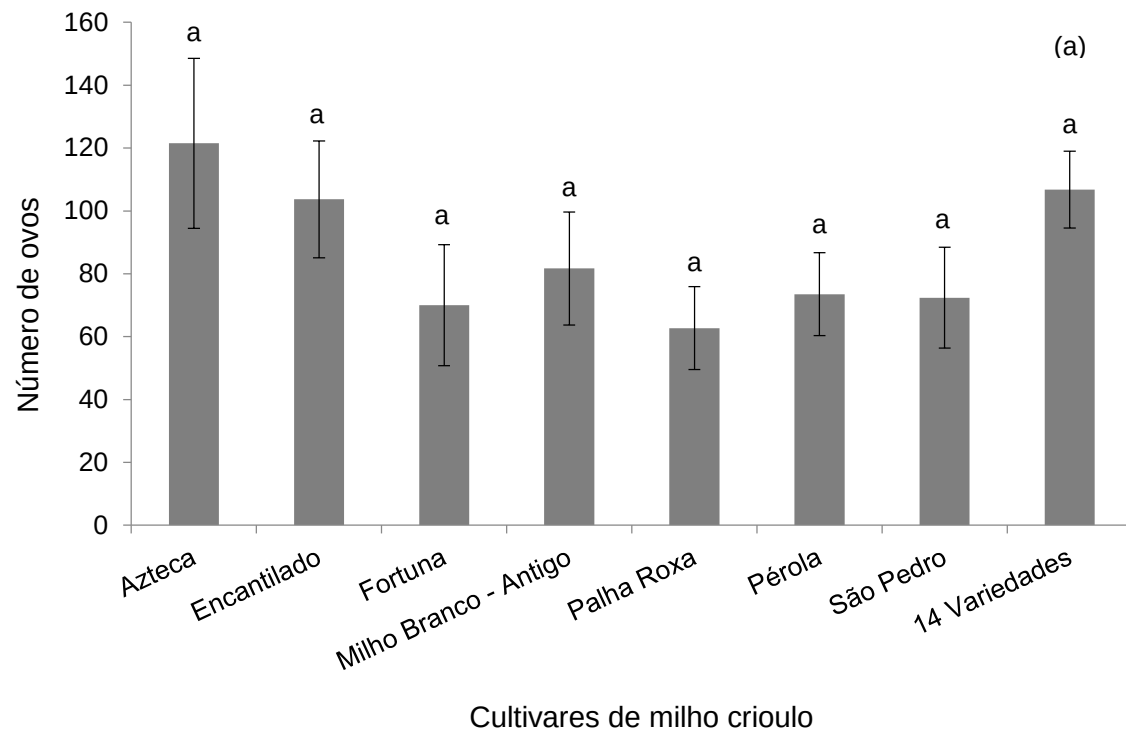


Fig. 2. Número de ovos (a) e larvas eclodidas (b) (média ± EP) descendentes de fêmeas de *Diabrotica speciosa* criadas em diferentes cultivares de milho crioulo. Médias seguidas por mesma letra acima das barras não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

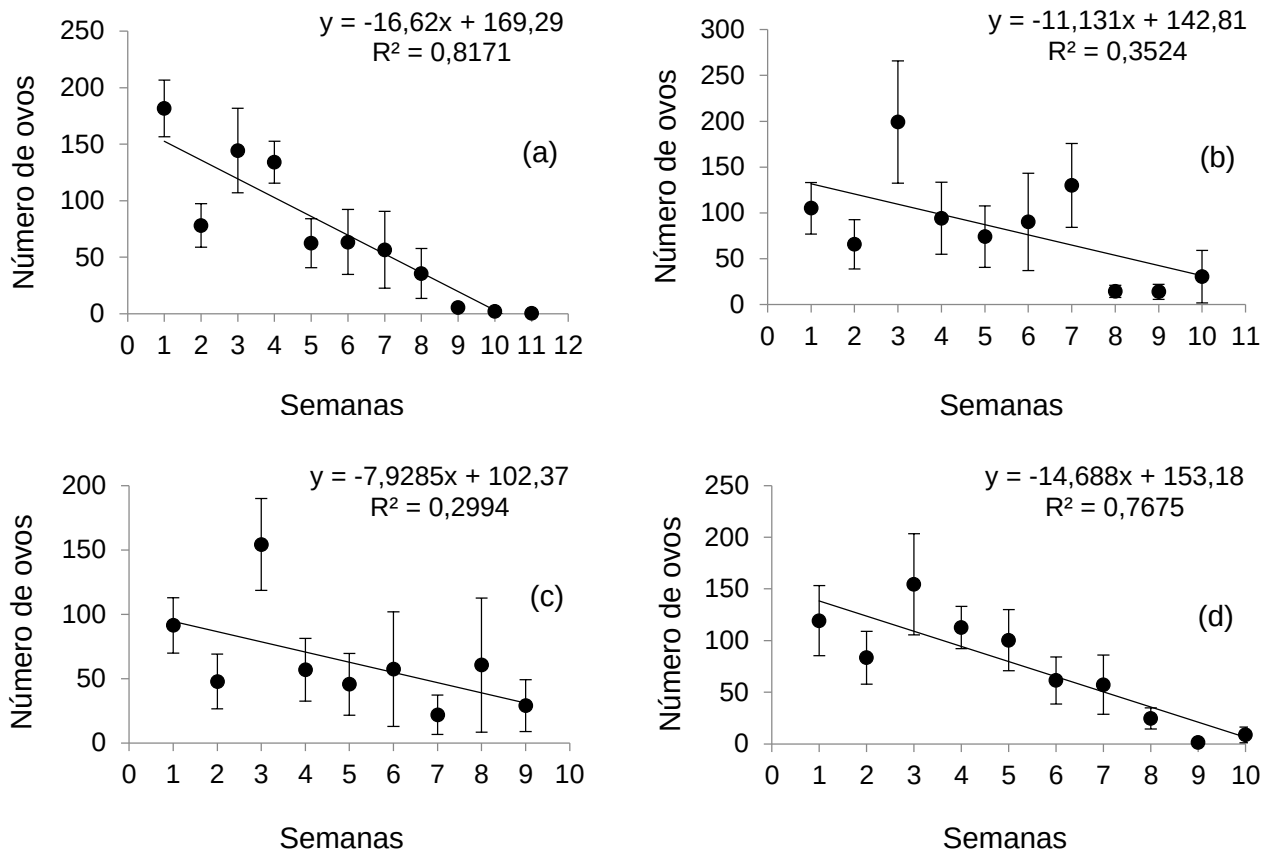


Fig. 3. Número de ovos (média $\pm$ EP) de *Diabrotica speciosa* em diferentes cultivares de milho crioulo, ao decorrer de semanas após emergência dos adultos, e que se ajustaram ao modelo de regressão linear simples. Legenda: (a) Fortuna; (b) Milho Branco – Antigo; (c) Palha Roxa; (d) São Pedro

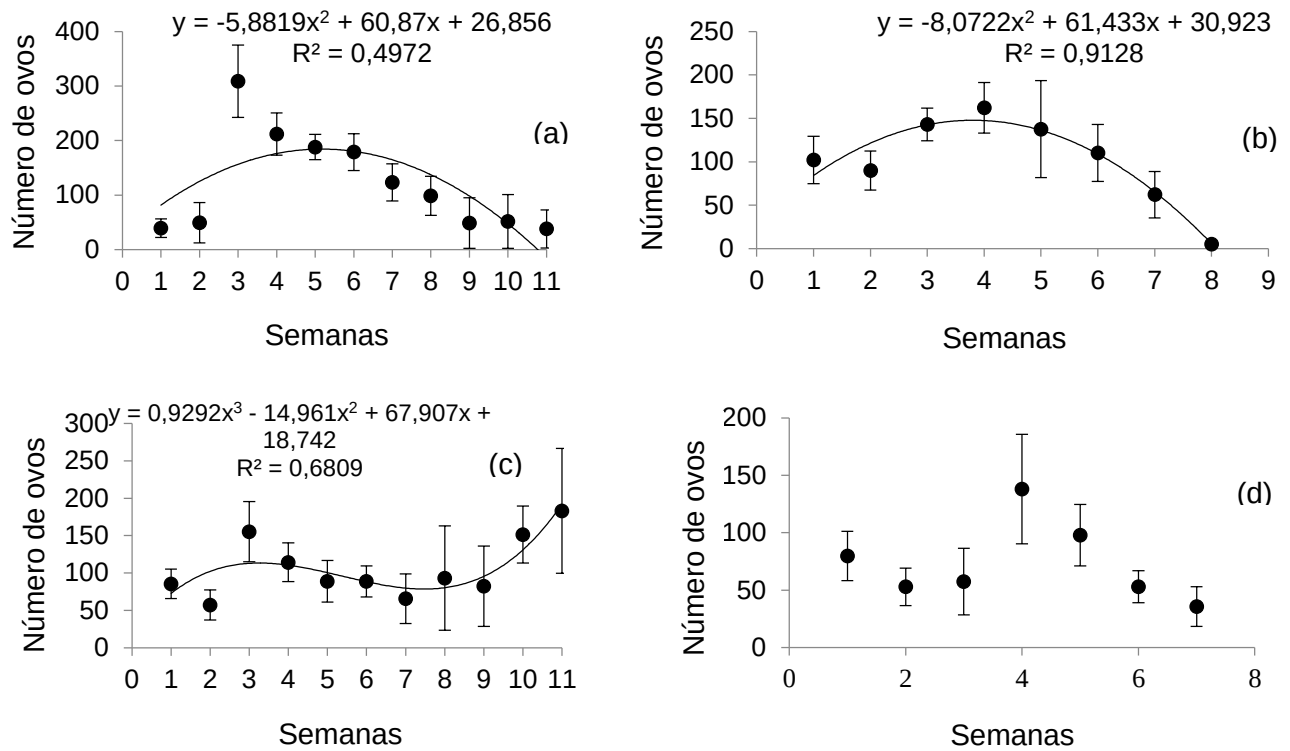


Fig. 4. Número de ovos (média $\pm$ EP) de *Diabrotica speciosa* em diferentes cultivares de milho crioulo, no decorrer de semanas após emergência dos insetos, e que se ajustaram aos modelos de regressão polinomial quadrática (a) e (b), e cúbica (c). Cultivar Pérola (d) não se ajustou à nenhuma equação de regressão. Legenda: (a) Azteca; (b) Encantilado; (c) 14 Variedades; (d) Pérola

3.4. Barreiras morfológicas e fenóis totais em raízes de plantas de milho com ou sem infestação de larvas de *Diabrotica speciosa*

Maiores quantidades de FDN e FDA foram encontradas nas raízes da cultivar Azteca, quando não infestada com larvas de *D. speciosa* (Tabela 2). Contudo, nas raízes infestadas, as plantas que tiveram as menores perdas de FDN e FDA foram da cultivar Pérola. Esta mesma cultivar, apesar de não ter os maiores valores de celulose quando sem infestação, após ser infestada, foi aquela que menos perdeu teor deste componente estrutural (Tabela 2).

Em relação à lignina, os maiores valores em plantas não infestadas foram observados em Azteca, Encantado, e 14 Variedades. No entanto, ao serem infestadas, a quantidade de lignina foi reduzida naquelas cultivares em 49,35%, 57,55%, e 39,57%, respectivamente. De forma oposta, as cultivares Palha Roxa e Fortuna não apresentaram elevados teores de lignina quando mantidas sem infestação. Porém, ao serem infestadas, tiveram as menores perdas, quais sejam 15,26% e 11,19, respectivamente (Tabela 2).

Fenóis totais foram encontrados em grandes quantidades em cultivares suscetíveis, como Azteca, Fortuna, e Milho Branco – Antigo, ao contrário da cultivar resistente Pérola, na qual foi reportada uma pequena quantidade destas substâncias químicas (Tabela 2).

Tabela 2. Fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), lignina, hemicelulose, celulose, e fenóis totais (FT) presentes em raízes de plantas de cultivares de milho crioulo, com ou sem a infestação de larvas de *Diabrotica speciosa*.

Tratamento	FDN ^a	FDA ^a	Lignina ^a	Hemicelulose ^a	Celulose ^a	FT ^b
SEM INFESTAÇÃO						
Azteca	915,00	574,14	125,02	340,86	449,12	12,23
Encantilado	886,22	530,42	106,51	355,80	423,91	8,94
Fortuna	874,86	510,07	92,32	364,79	417,75	17,74
Milho Branco – Antigo	870,12	526,99	96,13	343,14	430,16	11,11
Palha Roxa	861,13	514,47	97,99	346,65	416,48	10,37
Pérola	844,41	488,27	102,84	356,15	385,42	7,78
São Pedro	834,41	488,78	100,16	345,63	388,62	8,28
14 Variedades	886,19	556,64	113,91	329,56	442,72	8,19
COM INFESTAÇÃO						
Azteca	735,00	375,82	63,33	359,18	312,48	- ^c
Encantilado	745,73	347,63	45,21	398,10	302,42	-
Fortuna	754,34	407,05	81,99	347,29	325,06	-
Milho Branco – Antigo	755,69	389,03	71,61	366,66	317,42	14,89
Palha Roxa	784,28	408,04	83,04	376,23	325,01	-
Pérola	821,28	437,08	85,21	384,20	351,87	-
São Pedro	779,95	430,32	88,34	349,63	341,98	12,95
14 Variedades	736,87	376,61	68,84	360,25	307,78	-

^a Valores expressos em g/kg de matéria seca

^b Valores expressos em equivalente grama de ácido tânico / kg de matéria seca

^c Quantidade de amostra insuficiente para análise

4. Discussão

Inicialmente uma metodologia de pesquisa foi realizada com a finalidade de avaliar se a quantidade de alimento fornecida e o espaço ocupado pelas raízes de milho da cultivar comercial (não crioula) Cativerde 02 teria alguma influência no desenvolvimento e sobrevivência de *D. speciosa*. Esse teste foi feito porque no início da criação do inseto observou-se que utilizando 100 plantas de milho no recipiente de infestação inicial e o dobro no recipiente de transferência, havia deformações nas asas dos insetos, assim como os insetos apresentavam tamanho reduzido. Devido a esses

problemas, reduziu-se o número para 70 plantas no recipiente de infestação inicial, e o dobro dessa quantidade no recipiente de transferência, o que tornou possível manter uma criação de *D. speciosa* adequada para utilizar nos ensaios. No experimento realizado na presente pesquisa, recipientes plásticos de 1 L de volume foram adequados para criar os insetos liberando cinco ou 10 larvas, assim como a quantidade de alimento fornecido e o espaço disponibilizado para as larvas.

Insetos criados na cultivar comercial Cativerde 02 tiveram valores iguais em relação aos insetos criados nas cultivares crioulas suscetíveis no que diz respeito ao período larval a adulto (24,96 – 25,58 dias) e peso (9,46 – 10,03 mg), porém os valores de sobrevivência total foram iguais ao dos insetos criados nas cultivares crioulas resistentes (50 – 62%).

Na seleção inicial, 19 cultivares de milho crioulo foram utilizadas para criar *D. speciosa*. Depois da emergência dos adultos, alguns aspectos biológicos foram avaliados, sendo esta a primeira parte do teste de antibiose. Dentro desse grupo, destacaram-se as cultivares Pérola e Fortuna, por prolongar o período de desenvolvimento dos insetos, assim como pela baixa sobrevivência apresentada pelos mesmos. Muito pouco se conhece sobre a resistência de cultivares de milho crioulo frente ao ataque de insetos do gênero *Diabrotica*. Moeser (2003) relatou que indivíduos de *D. v. virgifera* criados na cultivar de milho crioulo Marano apresentaram menor peso na fase adulta do que insetos que foram criados em outras cultivares. Khishen et al. (2009) estudando a resistência de algumas cultivares de milho nativo a *D. v. virgifera*, concluíram que larvas alimentadas nas cultivares SUM2162 e SUM2068 foram significativamente menores em termos de largura da capsula cefálica e peso médio do que larvas que se alimentaram nas cultivares suscetíveis, indicando que antibiose é uma categoria de resistência expressa pelos híbridos acima mencionados.

Smith e Clement (2012) ressaltaram que os efeitos adversos de uma planta resistente pela categoria antibiose podem ser manifestados na sobrevivência, desenvolvimento, ou fecundidade de um artrópode. Dessa forma, foram selecionadas oito cultivares para um teste de período de oviposição, fecundidade e fertilidade, das quais duas foram adotadas como padrões de resistência, Pérola e Fortuna. Assim, observou-se que a cultivar Palha Roxa, que foi suscetível quando avaliando o

desenvolvimento e a sobrevivência de *D. speciosa* (Tabela 1; Fig. 1), foi resistente quando investigado os efeitos na fertilidade de ovos, onde o número de larvas eclodidas foi quase cinco vezes inferior do que aquele observado na cultivar suscetível Azteca (Fig. 2b). Esse foi o único caso de efeito adverso na fertilidade de ovos de *D. speciosa*. Apesar do baixo peso apresentado pelos insetos ao serem criados na cultivar suscetível Azteca (Tabela 1), as fêmeas que emergiram desta cultivar colocaram maior número de ovos férteis em relação à cultivar Palha Roxa (Fig. 2b).

Dados sobre número de ovos e larvas eclodidas provenientes dos insetos que emergiram da cultivar Pérola foram registrados até a sétima semana após a emergência dos insetos, devido à alta mortalidade dos mesmos, podendo ser esta a causa do não ajuste a nenhuma equação de regressão. Muito provavelmente, as raízes das cultivares de milho crioulo diferem em composição não apenas de lignina, celulose, e fibras, mas também em nutrientes, entre outros possíveis fatores, o que pode influenciar no desenvolvimento e sobrevivência dos insetos (SMITH, 2005).

No presente trabalho, avaliou-se a presença de fenóis totais nas raízes das plantas de milho, os quais não parecem estar associados à expressão de resistência das cultivares de milho crioulo a *D. speciosa*. Compostos fenólicos são comuns em plantas (HARBORNE, 1994; WATERMAN; MOLE, 1994), sendo um exemplo a faseolina, que está entre os mais potentes deterrentes alimentares já registrados (CALLAWAY, 2002).

Também foi avaliada a presença de algumas barreiras morfológicas que auxiliam no enrijecimento das raízes. Paredes celulares das plantas fortalecidas pela deposição de macromoléculas tais como celulose, lignina, suberina, e calose, além de fibras esclerenquimáticas, tornam uma planta resistente à injúria mecânica, assim como à ação de corte das mandíbulas, ou a penetração dos aparatos bucais de insetos sugadores, e ovipositores de insetos herbívoros (COLEY, 1983; SCHOONHOVEN; VAN LOON; DICKE, 2005).

Ao avaliar o conteúdo dos diferentes fatores morfológicos, esperava-se que as cultivares resistentes apresentassem um acréscimo daqueles compostos, como uma defesa da planta ao ataque do herbívoro. Johnson et al. (2009) mencionaram que a síntese de lignina parece ser induzida por herbivoria ou ataque de patógenos. Vélez-Bermúdez et al. (2015) afirmaram que a lignificação é induzida por fatores externos

como ferimento, mencionando que a indução do gene *myb11* ocorre 1 h após a injúria em vários estágios do desenvolvimento do milho, tanto em raízes como na parte aérea da planta, e que a proteína MYB11 participa na lignificação induzida por ferimento ao interagir com a proteína ZML2. De forma contrária, Meihls et al. (2012) afirmaram que características morfológicas como teor de lignina são constitutivas, e tipicamente não mudam em resposta à alimentação dos insetos. Entretanto, na presente pesquisa observou-se que as cultivares resistentes não apresentaram aumento daquelas estruturas, e tampouco ficaram inalteradas, mas se destacaram por terem as menores perdas, quando comparadas às cultivares suscetíveis.

A cultivar Pérola se destacou por possuir elevadas quantidades de fibras e celulose nas raízes, mesmo após ataque larval por um período de 10 dias. A cultivar Palha Roxa, que expressou antibiose em ovos de *D. speciosa* diminuindo a eclosão das larvas, teve alto valor de lignina, mesmo após ataque da praga. Smith (2005) mencionou que barreiras morfológicas adicionais na epiderme da planta exercem efeitos antibióticos, e que a rigidez de tecido é também um componente mecânico de antibiose em milho contra lepidópteros broqueadores de haste. Experimentos conduzidos com linhagens de milho por Buendgen et al. (1990) e Beeghly, Coors e Lee (1997), demonstraram significantes correlações entre o broqueamento causado por lagartas de *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) e a presença de FDN, FDA, e lignina nas hastes das plantas.

Lignina e fibras alimentares promovem resistência a insetos possivelmente por aumentar a densidade de massa da raiz, o que reduz a disponibilidade de nutrientes e energia (BERNAYS, 1986; BEEGHLY; COORS; LEE, 1997) ou devido ao aumento na rigidez do material causado por uma alta concentração de lignina e outros componentes da parede celular (BERGVINSON et al., 1994).

O objetivo da presente pesquisa ao avaliar a presença dos materiais acima mencionados com a presença da praga não foi detectar tolerância em cultivares de milho, mas sim investigar a existência daqueles materiais em plantas de milho injuriadas pela praga, para que assim fosse possível afirmar que determinado composto estava realmente envolvido na manifestação da resistência. De fato, algumas cultivares apresentaram elevadas quantidades de determinados compostos, mas após alimentação larval, os valores caíram abruptamente. A cultivar Encantilado

teve uma redução de quase 60% de lignina após sofrer ataque de larvas de *D. speciosa* (Tabela 2).

A área de biotecnologia tem lançado nos últimos anos algumas cultivares de milho que expressam resistência a *D. speciosa*, como milho Bt com a proteína Cry3Bb1 (MALVESTITI et al., 2008), e a *D. v. virgifera*, como milho Bt piramidado (HIBBARD et al., 2011) e RNA interferente (RNAi) (KHAJURIA et al., 2015). Entretanto, a agricultura não pode depender apenas de algumas poucas táticas de controle, devido ao desenvolvimento de resistência por parte dos insetos (FABRICK et al., 2014), e neste contexto, as cultivares de milho crioulo aparecem como importantes alternativas, devido a sua constituição genética, e a preservação das mesmas é de suma importância.

Assim, a presente pesquisa revelou cultivares resistentes pela categoria antibiose com efeitos negativos em adultos que se alimentaram de raízes de suas plantas na fase larval (Pérola e Fortuna), assim como a cultivar Palha Roxa, que prejudicou a eclosão de larvas de *D. speciosa* cujas progenitoras se alimentaram de suas raízes quando na fase larval. Além disso, verificou-se que algumas barreiras morfológicas, como fibra, celulose, e lignina, podem estar associadas com a resistência das cultivares de milho crioulo estudadas. É necessário, em uma próxima etapa, estudar as cultivares resistentes encontradas nesta pesquisa em casa de vegetação e em campo, a fim de que a partir destes resultados, somados aos da presente pesquisa, as cultivares resistentes possam ser consideradas no melhoramento genético vegetal, visando obter cultivares resistentes ao ataque de *D. speciosa*, aumentando assim o número de opções de ferramentas para o controle dessa praga.

5. Agradecimentos

Agradecemos ao Sr. André Emílio Jantara, assessor técnico da AS-PTA Agricultura Familiar e Agroecologia, pelo fornecimento das sementes de milho crioulo, ao Prof. Dr. Helder Louvandini, do Laboratório de Nutrição Animal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), pela realização das análises de fenóis totais e barreiras morfológicas em raízes de milho crioulo, e ao Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo (processo: 140589/2013-9) que possibilitou a realização desta pesquisa.

6. Referências

AOAC. AOAC Official methods of analysis of the association of official analytical chemists international. Gaithersburg: Pharmabooks, 2011.

ARRUDA-GATTI, I. C.; VENTURA, M. U. Iscas contendo cucurbitacinas para o manejo de *Diabrotica* spp. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 331-336, 2003.

ÁVILA, C. J.; TABAI, A. C. P.; PARRA, J. R. P. Comparação de técnicas para criação de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) em dietas natural e artificial. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 29, p. 257-267, 2000.

BEEGHLY, H. H.; COORS, J. G.; LEE, M. Plant fiber composition and resistance to European corn borer in four maize populations. **Maydica**, Bergamo, v. 42, n. 3, p. 297-303, 1997.

BERGVINSON, D. J.; ARNASON, J. T.; HAMILTON, R. I.; MIHM, J. A.; JEWELL, D. C. Determining leaf toughness and its role in maize resistance to the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 87, n. 6, p. 743-748, 1994.

BERNAYS, E. A. Diet-induced head allometry among foliage chewing insects and its importance for graminivores. **Science**, Washington, v. 231, n. 4737, p. 495-497, 1986.

BOFF, M. I. C.; GANDIN, E. C. L. Principais pragas da cultura da melancia e seu controle. **Agropecuário Catarinense**, Florianópolis, v. 5, p. 39-41, 1992.

BOIÇA JÚNIOR, A. L.; SOUZA, B. H. S.; RIBEIRO, Z. A.; MORAES, R. F. O.; EDUARDO, W. I.; NOGUEIRA, L. A defesa das plantas ao ataque dos insetos. In: BUSOLI, A. C.; CASTILHO, R. C.; ANDRADE, D. J.; ROSSI, G. D.; VIANA, D. L.; FRAGA, D. F.; SOUZA, L. A. **Tópicos em Entomologia Agrícola – VIII**. 1. ed. Jaboticabal: Maria de Lourdes Brandel, 2015. cap. 15, p. 161-180.

BUENDGEN, M. R.; COORS, J. G.; GROMBACHER, A. W.; RUSSELL, W. A. European corn borer resistance and cell wall composition of three maize populations. **Crop Science**, Madison, v. 30, n. 3, p. 505-510, 1990.

BURKNESS, E. C.; DIVELY, G.; PATTON, T.; MOREY, A. C.; HUTCHISON, W. D. Novel Vip3A *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize approaches high-dose efficacy against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) under field conditions: Implications for resistance management. **GM Crops**, Austin, v. 1, n. 5, p. 337-343, 2010.

CABRERA WALSH, G. J. Laboratory rearing and vital statistics of *Diabrotica speciosa* and *Diabrotica viridula* (Coleoptera: Chrysomelidae), two species of South American pest rootworms. **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**, Buenos Aires, v. 60, p. 239-248, 2001.

CABRERA WALSH, G. J. Host range and reproductive traits of *Diabrotica speciosa* (Germar) and *Diabrotica viridula* (F.) (Coleoptera: Chrysomelidae), two species of south American pest rootworms, with notes on other species of Diabroticina. **Environmental Entomology**, College Park, v. 32, n. 2, p. 276-285, 2003.

CALLAWAY, R. M. The detection of neighbors by plants. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 17, n. 3, p. 104-105, 2002.

CHRISTENSEN, J. R. Estudio sobre el género *Diabrotica* Chev. en la Argentina. **Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria**, Buenos Aires, v. 10, p. 464-516, 1943.

COLEY, P. D. Herbivory and defensive characteristics of tree species in a lowland tropical forest. **Ecological Monographs**, Lawrence, v. 53, n. 2, p. 209-233, 1983.

FABRICK, J. A.; PONNURAJ, J.; SINGH, A.; TANWAR, R. K.; UNNITHAN, G. C.; YELICH, A. J.; LI, X.; CARRIÈRE, Y.; TABASHNIK, B. E. Alternative splicing and highly variable cadherin transcripts associated with field-evolved resistance of pink bollworm to Bt cotton in India. **PloS ONE**, San Francisco, 9:e97900, 2014.

FURLAN, L. IPM thresholds for *Agriotes* wireworm species in maize in Southern Europe. **Journal of Pest Science**, Berlin, v. 87, n. 4, p. 609-617, 2014.

HAKE, S.; ROSS-IBARRA, J. Genetic, evolutionary and plant breeding insights from the domestication of maize. **The Natural History of Model Organisms**, Cambridge, 4:e05861, 2015.

HARBORNE, J. B. Phenolics. In: MANN, J.; DAVIDSON, R. S.; HOBBS, J. B.; BANTHORPE, D. V.; HARBORNE, J. B. (Eds.). **Natural products**: Their chemistry and biological significance. Harlow: Longman, 1994. p. 362-388.

HIBBARD, B. E.; FRANK, D. L.; KURTZ, R.; BOUDREAU, E.; ELLERSIECK, M.; ODHIAMBO, J. F. Mortality impact of Bt transgenic maize roots expressing eCry3.1Ab, mCry3A, and eCry3.1Ab Plus mCry3A on western corn rootworm larvae in the field. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 104, n. 5, p. 1584-1591, 2011.

JOHNSON, M. T. J.; SMITH, S. D.; RAUSHER, M. D. Plant sex and the evolution of plant defenses against herbivores. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 106, n. 43, p. 18079-18084, 2009.

KHAJURIA, C.; VÉLEZ, A. M.; RANGASAMY, M.; WANG, H.; FISHILEVICH, E.; FREY, M. L. F.; CARNEIRO, N. P.; GANDRA, P.; NARVA, K. E.; SIEGFRIED, B. D. Parental RNA interference of genes involved in embryonic development of the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 63, p. 54-62, 2015.

KHISHEN, A. A. E.; BOHN, M. O.; PRISCHMANN-VOLDSETH, D. A.; DASHIELL, K. E.; FRENCH, B. W.; HIBBARD, B. E. Native resistance to west corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) larval feeding: characterization and mechanisms. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 102, n. 6, p. 2350-2359, 2009.

LIA, V. V.; POGGIO, L.; CONFALONIERI, V. A. Microsatellite variation in maize landraces from Northwestern Argentina: genetic diversity, population structure and racial affiliations. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 119, n. 6, p. 1053-1067, 2009.

MAHAR, K. S.; AGRAWAL, P. K.; BABU, B. K.; GUPTA, H. S. Assessment of genetic diversity among the elite maize (*Zea mays* L.) genotypes adapted to North-Western Himalayan region of India using microsatellite markers. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, New Delhi, v. 18, n. 2, p. 217-220, 2009.

MAKKAR, H. P. S.; BLÜMMEL, M.; BOROWY, N. K.; BECKER, K. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 61, n. 2, p. 161-165, 2006.

MALVESTITI, G. S.; TAGLIAFERRO, F. S.; OLIVEIRA, W. S.; MARTINELLI, S. Biotecnologia de plantas como alternativa para o manejo integrado de *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) na cultura do milho. In: XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 2008, Uberlândia. **Anais eletrônicos...** Uberlândia: UFV, UFU, Embrapa Milho e Sorgo, 2008. Disponível em: <[http://www.seb.org.br/eventos/cbe/xxiicbe/verartigo.asp?cod=P1524&titulo=BIOTECNOLOGIA%20DE%20PLANTAS%20COMO%20ALTERNATIVA%20PARA%20O%20MANEJO%20INTEGRADO%20DE%20%3CI%3EDIABROTICA%20SPECIOSA%3C/I%3E%20\(COLEOPTERA:%20CHRYSOMELIDAE\)%20NA%20CULTURA%20DO%20MILHO](http://www.seb.org.br/eventos/cbe/xxiicbe/verartigo.asp?cod=P1524&titulo=BIOTECNOLOGIA%20DE%20PLANTAS%20COMO%20ALTERNATIVA%20PARA%20O%20MANEJO%20INTEGRADO%20DE%20%3CI%3EDIABROTICA%20SPECIOSA%3C/I%3E%20(COLEOPTERA:%20CHRYSOMELIDAE)%20NA%20CULTURA%20DO%20MILHO)>. Acesso em: 16 Fev. 2016.

MARQUES, G. B. C.; ÁVILA, C. J.; PARRA, J. R. P. Damages caused by larvae and adults of *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) in corn. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 11, p. 1983-1986, 1999.

MEIHLS, L. N.; KAUR, H.; JANDER, G. Natural variation in maize defense against insect herbivores. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, New York, v. 77, p. 269-283, 2012.

MEINKE, L. J.; SIEGFRIED, B. D.; WRIGHT, R. J.; CHANDLER, L. D. Adult susceptibility of Nebraska western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) populations to selected insecticides. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 91, n. 3, p. 594-600, 1998.

MOESER, J. **Nutritional ecology of the invasive maize pest *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte in Europe**. 2003. 90 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade de Göttingen, Göttingen, 2003.

MOURÃO, C. (2004) A volta da crioula. **O Eco**, 17 jun. 2016. Disponível em: <http://www.oeco.org.br/reportagens/814-oeco_10214/>. Acesso em: 17 jun. 2016.

NOGUEIRA, L. **Categorias e níveis de resistência de genótipos de milho crioulo a *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2015. 101 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2015.

PARIMI, S.; MEINKE, L. J.; FRENCH, B. W.; CHANDLER, L. D.; SIEGFRIED, B. D. Stability and persistence of aldrin and methyl-parathion resistance in western corn rootworm populations (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 25, n. 3, p. 269-274, 2006.

SCHOONHOVEN, L. M.; VAN LOON, J. J. A.; DICKE, M. **Insect-plant biology**. Oxford: New York, 2005. 421 p.

SHIVAJI, R.; CAMAS, A.; ANKALA, A.; ENGELBERTH, J.; TUMLINSON, J. H.; WILLIAMS, W. P.; WILKINSON, J. R.; LUTHE, D. S. Plants on constant alert: elevated levels of jasmonic acid and jasmonate-induced transcripts in caterpillar-resistant maize. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 36, n. 2, p. 179-191, 2010.

SMITH, C. M. **Plant resistance to arthropods: Molecular and Conventional Approaches**. Springer: Dordrecht, 2005. 423 p.

SMITH, C. M.; CLEMENT, S. L. Molecular bases of plant resistance to arthropods. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 57, p. 309-328, 2012.

STOUT, M. J. Reevaluating the conceptual framework for applied research on host-plant resistance. **Insect Science**, Beijing, v. 20, n. 3, p. 263-272, 2013.

VÉLEZ-BERMÚDEZ, I. S.; SALAZAR-HENAO, J. E.; FORNALÉ, S.; LÓPEZ-VIDRIERO, I.; FRANCO-ZORRILLA, J. M.; GROTEWOLD, E.; GRAY, J.; SOLANO, R.; SCHMIDT, W.; PAGÉS, M.; RIERA, M.; CAPARROS-RUIZ, D. A MYB/ZML complex regulates wound-induced lignin genes in maize. **The Plant Cell**, Rockville, v. 27, n. 11, p. 3245-3259, 2015.

VIANA, P. A. **Manejo de *Diabrotica speciosa* na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. 6 p.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**. Blackwell: Oxford, 1994. 248 p.

WHITE, R. Sexual characters of species of *Diabrotica* (Chrysomelidae: Coleoptera). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 70, n. 2, p. 168-168, 1977.

ZEVEN, A. C. Landraces: A review of definitions and classifications. **Euphytica**, Wageningen, v. 104, n. 2, p. 127-139, 1998.

CAPÍTULO 3 – Metodologia para avaliação de tolerância em cultivares de milho crioulo a larvas de *Diabrotica speciosa* (Germar) e efeitos de compostos associados com a fisiologia da planta

RESUMO – O impacto econômico na agricultura e o montante de recursos gastos para o controle de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) no Brasil não foram ainda estimados, embora se aplique anualmente uma expressiva quantidade de ingredientes ativos em diversas culturas para o controle de larvas e adultos desta praga. Este estudo foi conduzido com o objetivo de investigar metodologias adequadas para posteriormente realizar ensaios de tolerância de cultivares de milho crioulo a *D. speciosa*, e também, correlacionar com parâmetros fisiológicos da planta. Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação, no município de Jaboticabal, estado de São Paulo, Brasil. Foram estudadas seis cultivares de milho crioulo previamente selecionadas com diferentes níveis de resistência na categoria antibiose, avaliando-se o crescimento das plantas de milho, mediante altura, número de folhas, e massa seca da parte aérea e de raízes. A liberação de seis larvas por planta foi suficiente para causar danos em milho, e a idade de plantas mais adequada foi de 10 dias. De forma geral, a cultivar Azteca se destacou por ser a mais tolerante, apresentando menores reduções de massa seca da planta. Esta cultivar também apresentou os maiores teores de pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenóides), o que indica que existe uma correlação entre a tolerância da cultivar Azteca a *D. speciosa* e os altos teores daquelas substâncias. Os osmólitos compatíveis, glicina betaína e prolina parecem não estar associados à tolerância de milho crioulo a *D. speciosa*. Ainda, essa pesquisa mostrou que explorar cultivares tolerantes no melhoramento genético vegetal parece ser mais vantajoso que cultivares resistentes por antibiose. Entretanto, estudos em condições de campo são necessários para posteriormente indicar a cultivar Azteca ao melhoramento genético vegetal.

Palavras-chave: *Zea mays* L., resistência de plantas a insetos, clorofilas, carotenóides, glicina betaína, prolina, manejo integrado de pragas

CHAPTER 3 - Methodology for evaluating tolerance in maize landraces to *Diabrotica speciosa* (Germar) larvae and effects of compounds associated with plant physiology

ABSTRACT – The economical impact in the agriculture and the amount of funds spent for the controlling of *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) in Brazil were not estimated yet, although an expressive amount of active ingredients is applied annually in many crops to control larvae and adults of this pest. This study was conducted aiming to investigate suitable methodologies for later to perform tolerance assays of maize landraces to *D. speciosa*, and also to correlate tolerance with plant physiological parameters. The assays were conducted in greenhouse, in the municipality of Jaboticabal, state of São Paulo, Brazil. Six maize landraces were studied, which were previously screened according to their different levels in the antibiosis-resistance category, evaluating the maize plants growth, through the height, number of leaves, and dry matter of the aerial part and roots. The release of six larvae per plant was sufficient to cause damages in maize, and the most suitable plant age was of 10 days. Overall, the cultivar Azteca stood out as the most tolerant, displaying lower reductions of plant dry matter. This cultivar also showed the highest contents of photosynthetic pigments (chlorophylls and carotenoids), what indicates a correlation between the tolerance of cultivar Azteca to *D. speciosa* and the highest amounts of those substances. The compatible osmolytes glycine betaine and proline do not seem to be associated with the tolerance of maize landraces to *D. speciosa*. Furthermore, this research showed that exploring tolerant cultivars in plant breeding seems to be more advantageous than using antibiosis-resistant cultivars. However, study in field condition is a next step needed for posteriorly indicating the cultivar Azteca for plant breeding.

Keywords: *Zea mays* L., host plant resistance to insects, chlorophyll, carotenoids, glycine betaine, proline, integrated pest management

1. Introdução

Tolerância é caracterizada pela habilidade de uma planta suportar ou se recuperar da injúria causada por populações de artrópodes-praga, e sua expressão é determinada por qualidades genéticas herdadas por uma planta que a possibilitam superar essa infestação ou recuperar-se e iniciar novo crescimento após danos nos tecidos das plantas (SMITH, 2005; BOIÇA JÚNIOR et al., 2015). Em uma perspectiva agrônômica, as plantas de uma cultivar tolerante produzem maior quantidade de biomassa do que plantas não tolerantes. Além disso, as populações de artrópodes não são reduzidas quando expostas a plantas tolerantes como acontece em plantas expressando antibiose ou antixenose (SMITH, 2005).

Possivelmente a tolerância é resultado da ativação de meristemas dormentes, mudanças na arquitetura da planta, partição de assimilados, relação fonte-dreno para alocação de recursos ou capacidade fotossintética (SCHWACHTJE; BALDWIN, 2008). No que diz respeito à relação entre tolerância e fotossíntese, as clorofilas exercem importante função por participar significativamente deste processo resultando em maior crescimento e acumulação de massa seca, assim como a adaptação da planta ao ambiente (ENGEL; POGGIANI, 1991). Também, os carotenoides, pigmentos acessórios essenciais para o aparato fotoquímico, apresentam importância na tolerância de plantas como antioxidantes e precursores de hormônios, e.g. ácido abscísico, hormônio antiestresse (HOWITT; POGSON, 2006).

Dentre diferentes osmólitos que ocorrem em plantas em resposta aos estresses ambientais, a amina quaternária glicina betaína tem sido estudada extensivamente (IQBAL, ASHRAF, e ASHRAF 2005; CHEN; MURATA, 2008; ASHRAF, 2009; ALI; ASHRAF, 2011). Glicina betaína é abundante principalmente no cloroplasto onde desempenha vital função de proteção da membrana do tilacóide e assim, mantendo a eficiência fotossintética (GENARD et al., 1991), conduzindo o vegetal a tolerar diferentes tipos de estresses ambientais, principalmente abióticos (HUANG et al., 2000). Glicina betaína não atua na remoção direta das espécies reativas a oxigênio (ROS), como radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila ($OH^{\cdot}$) e oxigênio singlete ($^1O_2$), as quais são tóxicas às plantas quando em

altas concentrações. Entretanto, a glicina betaína atenua os efeitos prejudiciais do estresse oxidativo de outras formas, como na ativação ou estabilização de enzimas que removem as ROS (CHEN; MURATA, 2008).

A prolina é um aminoácido proteinogênico com uma excepcional rigidez conformacional, e é essencial para o metabolismo primário (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010). Desde o primeiro relato sobre acumulação de prolina em azevém perene murcho, *Lolium perenne* L. (KEMBLE; MACPHERSON, 1954), diversos estudos têm demonstrado que ocorre acúmulo de prolina em plantas sob diferentes estresses ambientais (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010). A acumulação de prolina pode influenciar na tolerância de plantas aos estresses ambientais em diversas formas, como antioxidante na remoção das ROS (MATYSIK et al. 2002) e na função de chaperona molecular, protegendo a integridade da proteína e otimizando as atividades de diferentes enzimas (RAJENDRAKUMAR et al., 1994).

Cultivares de milho (*Zea mays* L.) crioulo usualmente apresentam um fenótipo bem adaptado a seus locais de cultivo resultante de uma variabilidade genética peculiar, positivamente interagindo com fatores bióticos, como pragas e doenças (UARROTA; SEVERINO; MARASCHIN, 2011). A espécie *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) causa prejuízos à cultura do milho, devido ao ataque de suas larvas nas raízes da planta (VIANA, 2010). O impacto econômico na agricultura e o montante de recursos gastos para o controle desta praga no Brasil não foram ainda estimados, embora se aplique anualmente uma expressiva quantidade de ingredientes ativos em diversas culturas para o controle de larvas e adultos (ÁVILA; SANTANA, 2011).

Assim, essa pesquisa teve como objetivos (i) estudar metodologias visando obter as condições mais adequadas para realização de testes de tolerância em cultivares de milho crioulo a *D. speciosa* e (ii) avaliar a tolerância de cultivares de milho crioulo a essa praga e sua relação com teores de diferentes compostos que participam na fisiologia da planta.

2. Material e Métodos

2.1. Procedimentos gerais

Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação do Departamento de Fitossanidade, da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. Os insetos utilizados nessa pesquisa foram criados com metodologia adaptada de Ávila, Tabai e Parra (2000).

Vasos plásticos de 770 mL, com abertura de cerca de 2,0 cm no fundo para evitar acúmulo de água da irrigação, foram utilizados para cultivo das plantas, e os mesmos foram preenchidos com solo (latossolo vermelho escuro eutrófico) (CENTURION et al., 1995), adubo orgânico (esterco bovino), e areia, proporção 3:1:1. Três sementes foram semeadas por recipiente, e as plantas foram irrigadas sempre que necessário.

Para avaliação dos diferentes parâmetros relativos às plantas, no final do ensaio as mesmas foram cuidadosamente retiradas do vaso plástico para não danificar as raízes, lavadas em água corrente, e ainda frescas avaliadas quanto à altura e número de folhas. Posteriormente, as plantas foram secas à temperatura ambiente, e em seguida em estufa (Modelo AS200S, QUIMIS, Diadema, SP), onde passaram por processo de secagem a 60 °C por 48 horas. Ao final desse processo, as plantas foram pesadas em balança (Modelo AS1000C, Marte, São Paulo, SP) para posterior avaliação da massa seca da parte aérea e do sistema radicular.

Os cálculos de porcentagem de redução foram feitos de acordo com Reese et al. (1994): $X = (PC - PT)/PC \times 100$, para avaliar a porcentagem de redução das variáveis acima mencionadas, onde $X = \%$ de redução; PC = valor do parâmetro na testemunha (sem infestação do inseto); PT = Valor do parâmetro no tratamento (com infestação do inseto).

2.2. Número de larvas de *Diabrotica speciosa* por planta de milho

Três sementes de milho da cultivar comercial Cativerde 02 foram semeadas nos vasos plásticos de 770 mL. O desbaste foi realizado aproximadamente cinco dias

após a emergência, mantendo apenas uma planta, e aos 10 dias as mesmas foram infestadas, com auxílio de pincel de cerdas macias, com três, seis, ou 12 larvas neonatas de *D. speciosa*. Aos 18 dias após a liberação das larvas, foram avaliados os seguintes parâmetros relativos às plantas: porcentagem de redução da altura (cm), do número de folhas, da massa seca da parte aérea e do sistema radicular. Foram realizadas 30 repetições por tratamento, em um delineamento inteiramente casualizado.

2.3. Influência da idade da planta na suscetibilidade de milho ao ataque de larvas de *Diabrotica speciosa*

Este experimento foi realizado com o objetivo de investigar a idade em que a planta de milho (cv. Cativerde 02) seria mais suscetível ao ataque de larvas de *D. speciosa*, assim como avaliar a adequação dos vasos plásticos de 770 mL para o desenvolvimento de plantas de milho que tinham cinco, 10 ou 20 dias de idade no início dos testes. A semeadura para cada tratamento ocorreu de forma escalonada, de forma que no momento da infestação as plantas apresentassem as diferentes idades mencionadas.

O experimento foi dividido em duas partes, liberando seis e 12 larvas de *D. speciosa* por planta de milho, para determinar qual seria o número de larvas suficiente para causar danos nas plantas, considerando as três diferentes idades de plantas de milho. Aos 18 dias após a liberação das larvas, os seguintes parâmetros das plantas foram avaliados: porcentagem de redução da altura (cm), do número de folhas, da massa seca da parte aérea e do sistema radicular. Foram realizadas 20 repetições, em um delineamento inteiramente casualizado.

2.4. Tolerância de cultivares de milho crioulo ao ataque de larvas de *Diabrotica speciosa*

Preliminarmente, seis cultivares de milho crioulo foram selecionadas de um total de 19 cultivares, de acordo com os níveis de resistência apresentados em teste

de antibiose, quais sejam: Azteca (suscetível), Encantado (suscetível), Fortuna (resistente), Palha Roxa (resistente), Pérola (resistente), e 14 Variedades (suscetível).

De acordo com os resultados obtidos nos testes de metodologia de pesquisa, seis larvas de *D. speciosa* foram liberadas em plantas de milho de 10 dias de idade. Os mesmos materiais e procedimentos descritos nos itens 2.1, 2.2, e 2.3 foram adotados para a elaboração deste ensaio. Aos 18 dias após a liberação das larvas, os seguintes parâmetros das plantas foram avaliados: porcentagem de redução da altura (cm), do número de folhas, da massa seca da parte aérea e do sistema radicular. O ensaio foi repetido duas vezes, perfazendo 10 repetições em cada um dos ensaios, em um delineamento inteiramente casualizado.

2.5. Teores de clorofila, carotenóides, glicina betaína e prolina em folhas de plantas de milho

As análises descritas a seguir foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, da Universidade Estadual Paulista (UNESP/FCAV).

Plantas das seis cultivares de milho crioulo foram cultivadas em casa de vegetação, com ou sem infestação (12 tratamentos) por larvas neonatas de *D. speciosa*. As plantas infestadas apresentaram 10 dias de idade no momento da infestação, e aos 28 dias de idade as folhas das plantas de cada um dos tratamentos foram cortadas com auxílio de tesoura e utilizadas frescas para análises de clorofilas e carotenóides. Folhas de outras plantas dos respectivos tratamentos foram congeladas em nitrogênio líquido (NL₂) para avaliação de prolina, e outras plantas tiveram suas folhas secas em estufa (Modelo 320-SE, Fanem, São Paulo, SP) para análise de glicina betaína.

Para análise das clorofilas *a* e *b*, e carotenóides (caroteno + xantofila), três discos foliares de 0,49 cm de diâmetro (média) foram coletados por repetição usando um vazador, e posteriormente acondicionados em Eppendorf® revestido com papel alumínio para evitar a fotooxidação dos pigmentos, e pesados em balança analítica de precisão (Modelo AA-200, Denver Instrument Company, Bohemia, NY), apresentando 0,025 g a 0,030 g de massa fresca. Após pesagem da massa fresca,

foram adicionados 2 mL de acetona P.A. A seguir, as amostras foram colocadas em incubadora-agitadora (Modelo G25, New Brunswick, New Jersey) e agitadas por 48 horas a 60 $\times g$ em 4 °C. Posteriormente, a densidade ótica dos filtrados foi lida em espectrofotômetro (Modelo DU 640, Beckman, Fort Collins, CO) a 663, 645, 652, e 470 nm, para clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total (*a* + *b*) e carotenoides, respectivamente (ARNON, 1949; LICHTENTHALER, 1987). Foram realizadas quatro repetições para todas as cultivares, exceto para Azteca sem infestação e Fortuna com infestação, para as quais foram testadas três repetições.

Os teores de glicina betaína nas folhas das cultivares de milho foram analisadas de acordo com a metodologia de Grieve e Grattan (1983). Utilizaram-se 25 mg de massa seca em estufa (Modelo 320-SE, Fanem, São Paulo, SP) a 60 °C por 72 horas, colocando-se esse material em tubos Eppendorf de 2 mL. Em seguida, foram adicionados no tubo Eppendorf 2 mL de água destilada, agitando-se em incubadora-agitadora (Modelo G25, New Brunswick, New Jersey) por 4 horas a 25 °C. Posteriormente os tubos foram centrifugados a 10.000 $\times g$ por 10 minutos a 25 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado para obtenção do extrato aquoso. Em tubos Eppendorf de 2 mL, colocou-se 250 μ L do extrato aquoso e 250 μ L de H₂SO₄ 2N, sendo este material esfriado em banho de gelo por 60 minutos em geladeira a 0 °C. Em seguida, foram adicionados 200 μ L do reagente KI-I₂ (solução iodo-iodeto de potássio) resfriado, e a baixa temperatura foi mantida ao guardar os tubos em geladeira, em um banho de gelo de 16 horas em 0 °C.

Após o processo descrito acima, os tubos foram centrifugados (Avanti-J25, Beckman, Fort Collins, CO) a 10.000 $\times g$ por 15 minutos, descartando o sobrenadante ao fim da centrifugação. Assim, o precipitado foi lavado duas vezes com 2 mL de H₂SO₄ 1N resfriado com centrifugações a 10.000 $\times g$ por 5 minutos, a 0 °C. Depois de finalizadas as lavagens, o precipitado foi dissolvido em 3 mL de 1,2-dicloroetano, agitando-se vigorosamente. Depois de duas horas do término destes procedimentos, foi realizada leitura em espectrofotômetro, a 365 nm (GRIEVE; GRATTAN, 1983). Foram realizadas quatro repetições, exceto para as cultivares Fortuna com infestação, Palha Roxa sem infestação e Pérola com infestação, para as quais foram realizadas três repetições.

A determinação do conteúdo de prolina foi realizada de acordo com metodologia de Bates, Waldren, e Teare (1973). Para tanto, utilizou-se 0,5 g de massa fresca de folhas de milho por repetição, o qual foi macerado em almofariz com o auxílio de NL_2 e pistilo. Em seguida, foram acrescentados 10 mL de ácido sulfosalicílico 3% ao material macerado, e posteriormente o extrato foi filtrado duas vezes e armazenado. A seguir, 1 mL do extrato foi transferido para um tubo de ensaio, acrescentando-se também 1 mL de ácido acético e 1 mL de ninhidrina, sendo posteriormente homogeneizado em agitador de tubos (AT 56A, Phoenix, Rochester, NY). Subsequentemente, as soluções (dentro do tubo de ensaio) foram submetidas ao banho termostático a 100 °C por 1 hora. Após este período, os tubos de ensaio foram armazenados em gelo, até esfriamento, para posteriormente serem acrescentados 2 mL de tolueno, sendo os tubos de ensaio agitados novamente. Os teores de prolina livre foram determinados em espectrofotômetro, a 520 nm, e três repetições foram realizadas por tratamento.

2.6. Análise estatística

Os dados foram analisados quanto à normalidade de resíduos (Cramér-von Mises) e homogeneidade de variância (Levene). Dados referentes às porcentagens de redução não foram normais, e por isso foram analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$). Dados referentes às análises químicas apresentaram normalidade de resíduos e homogeneidade de variância, não necessitando de transformação. Estes foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para verificar os efeitos principais das cultivares (C), da infestação (I), e da interação entre cultivares $\times$ infestação ($C \times I$), em esquema fatorial 6×2 . Quando diferenças significativas foram observadas, as médias foram separadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

3. Resultados

3.1. Número de larvas de *Diabrotica speciosa* por planta de milho

Plantas submetidas ao ataque de 12 larvas tiveram maior porcentagem de redução de altura ($F = 19,07$; $gl = 2, 87$; $P < 0,0001$) e massa seca do sistema radicular ($H = 15,59$; $gl = 2, 87$; $P < 0,0001$) em comparação com plantas submetidas ao ataque de três e seis larvas, e estes dois últimos tratamentos diferiram entre si, com maiores valores de porcentagem de redução para plantas submetidas ao ataque de seis larvas de *D. speciosa* (Tabela 1).

Diferenças significativas também foram observadas para porcentagem de redução do número de folhas ($H = 6,17$; $gl = 2, 87$; $P < 0,0001$) (Tabela 1). Plantas atacadas por 12 larvas tiveram redução do número de folhas maior que aquele encontrado em plantas atacadas por seis larvas, porém não diferindo de plantas atacadas por três larvas. Em contrapartida, não foi observada diferença entre os tratamentos no que se refere à redução da massa seca da parte aérea ($H = 4,48$; $gl = 2, 87$; $P = 0,1063$).

Tabela 1. Porcentagem de redução (média $\pm$ erro padrão) da altura, do número de folhas e do peso seco da parte aérea e da raiz de plantas de milho atacadas por diferentes números de larvas de *Diabrotica speciosa*

Número de larvas	Altura (cm)	Folhas	Peso seco (g)	
			Parte aérea	Raiz
3 larvas	6,22 $\pm$ 1,40 c	3,73 $\pm$ 1,24 ab	0,83 $\pm$ 0,60 a	9,45 $\pm$ 3,32 c
6 larvas	15,95 $\pm$ 2,52 b	2,11 $\pm$ 1,09 b	5,38 $\pm$ 2,34 a	17,08 $\pm$ 3,39 b
12 larvas	25,27 $\pm$ 2,44 a	5,75 $\pm$ 1,31 a	4,99 $\pm$ 2,14 a	27,06 $\pm$ 3,40 a

Médias seguidas por mesma letra na coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade

3.2. Influência da idade da planta na suscetibilidade de milho ao ataque de larvas de *Diabrotica speciosa*

Ao liberar seis larvas de *D. speciosa* por planta de milho, diferenças significativas foram observadas na redução da altura ($H = 10,78$; $gl = 2, 57$; $P < 0,0001$)

e massa seca de raízes ($H = 21,32$; $gl = 2, 57$; $P < 0,0001$) (Tabela 2). Plantas com 10 dias de idade tiveram redução de altura quase três vezes superior do que plantas de cinco e 20 dias de idade. Em relação à massa seca das raízes, as maiores porcentagens de redução foram encontradas em plantas de 10 e 20 dias de idade, as quais diferiram significativamente de plantas de cinco dias de idade, com porcentagem de redução 12,5 e 9,0 vezes superior às plantas de cinco dias de idade, respectivamente.

Quando as plantas foram infestadas com 12 larvas de *D. speciosa*, diferenças significativas foram encontradas para porcentagem de redução de altura ($H = 9,41$; $gl = 2, 57$; $P < 0,0001$), número de folhas ($H = 27,58$; $gl = 2, 57$; $P < 0,0001$), e massa seca de raízes ($H = 41,88$; $gl = 2, 57$; $P < 0,0001$) (Tabela 2). A maior redução de altura foi observada em plantas com 10 dias de idade, diferindo-se de plantas com cinco e 20 dias de idade. No que diz respeito à redução do número de folhas, maiores valores foram registrados para plantas de cinco e 10 dias de idade, contudo nenhuma redução foi observada em plantas com 20 dias de idade. Por outro lado, para redução da massa seca de raízes, o maior valor foi encontrado em plantas de 20 dias de idade, com redução seis vezes superior quando comparando com plantas de cinco dias de idade, e 14 vezes superior em relação a plantas de 10 dias de idade (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de redução (média $\pm$ erro padrão) da altura, número de folhas e peso seco da parte aérea e da raiz de plantas de milho de diferentes idades, submetidas ao ataque de seis ou 12 larvas de *Diabrotica speciosa*

TESTE COM 6 LARVAS				
Idade da planta	Altura (cm)	Folhas	Peso seco (g)	
			Parte aérea	Raiz
5 dias	2,65 $\pm$ 1,17 b	5,69 $\pm$ 1,96 a	9,41 $\pm$ 3,02 a	1,98 $\pm$ 1,70 b
10 dias	7,57 $\pm$ 1,91 a	4,81 $\pm$ 0,81 a	10,64 $\pm$ 2,73 a	24,78 $\pm$ 3,96 a
20 dias	2,75 $\pm$ 1,74 b	3,64 $\pm$ 1,02 a	7,95 $\pm$ 2,99 a	17,73 $\pm$ 4,07 a
TESTE COM 12 LARVAS				
Idade da planta	Altura (cm)	Folhas	Peso seco (g)	
			Parte aérea	Raiz
5 dias	2,06 $\pm$ 2,05 b	9,23 $\pm$ 1,82 a	12,33 $\pm$ 3,49 a	7,52 $\pm$ 3,25 b
10 dias	2,92 $\pm$ 1,16 a	6,82 $\pm$ 1,46 a	12,56 $\pm$ 3,27 a	3,55 $\pm$ 2,08 b
20 dias	0,48 $\pm$ 0,39 b	0,00 $\pm$ 0,00 b	5,53 $\pm$ 2,16 a	49,66 $\pm$ 2,44 a

Médias seguidas por mesma letra na coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade

3.3. Tolerância de cultivares de milho crioulo ao ataque de larvas de *Diabrotica speciosa*

No primeiro ensaio, houve diferença significativa apenas para a massa seca de raízes ($H = 13,25$; gl = 5, 53; $P = 0,0211$). Plantas da cultivar Azteca se destacaram pela menor redução da massa seca de raízes, diferindo significativamente da cultivar Fortuna, cujas plantas tiveram redução da massa seca de raízes sete vezes superior que Azteca (Tabela 3).

No segundo ensaio, observou-se menor redução da massa seca da parte aérea ($H = 11,32$; gl = 5, 50; $P = 0,0453$) na cultivar Azteca, diferindo da cultivar Fortuna. Esta última cultivar teve redução seis vezes superior que a cultivar Azteca (Tabela 3). Considerando a redução da massa seca de raízes, a cultivar Encantilado apresentou menor valor, diferindo da cultivar Fortuna, por esta ter tido redução quase seis vezes maior do que a cultivar Encantilado.

Tabela 3. Porcentagem de redução (média $\pm$ erro padrão) da altura, número de folhas e peso seco da parte aérea e da raiz de diferentes cultivares de milho crioulo submetidas ao ataque de larvas de *Diabrotica speciosa*

ENSAIO 1 (Set – Out 2014)				
Cultivar	Altura (cm) ^a	Folhas	Peso seco (g)	
			Parte aérea	Raiz
Azteca	5,74 $\pm$ 3,08 a	1,67 $\pm$ 1,67 a	10,97 $\pm$ 5,63 a	3,77 $\pm$ 1,93 b
Encantilado	6,45 $\pm$ 4,21 a	2,96 $\pm$ 1,21 a	12,81 $\pm$ 6,41 a	26,24 $\pm$ 7,19 ab
Fortuna	10,41 $\pm$ 3,79 a	5,13 $\pm$ 1,28 a	15,22 $\pm$ 5,50 a	28,01 $\pm$ 6,33 a
Palha Roxa	2,35 $\pm$ 1,13 a	3,87 $\pm$ 1,79 a	5,16 $\pm$ 3,30 a	6,73 $\pm$ 4,71 ab
Pérola	5,73 $\pm$ 2,60 a	6,14 $\pm$ 2,05 a	6,10 $\pm$ 2,69 a	12,78 $\pm$ 5,93 ab
14 Variedades	7,13 $\pm$ 2,69 a	2,79 $\pm$ 1,71 a	16,14 $\pm$ 5,30 a	16,58 $\pm$ 6,11 ab
ENSAIO 2 (Out – Nov 2014)				
Cultivar	Altura (cm) ^a	Folhas	Peso seco (g)	
			Parte aérea	Raiz
Azteca	11,82 $\pm$ 3,19 a	6,84 $\pm$ 2,38 a	4,48 $\pm$ 3,07 b	12,60 $\pm$ 6,93 ab
Encantilado	3,94 $\pm$ 1,70 a	8,31 $\pm$ 2,60 a	6,08 $\pm$ 3,15 ab	6,75 $\pm$ 3,40 b
Fortuna	20,22 $\pm$ 7,24 a	3,05 $\pm$ 2,03 a	30,36 $\pm$ 9,63 a	39,58 $\pm$ 9,59 a
Palha Roxa	7,25 $\pm$ 2,85 a	3,35 $\pm$ 1,67 a	11,58 $\pm$ 4,18 ab	19,50 $\pm$ 7,32 ab
Pérola	14,63 $\pm$ 2,62 a	5,72 $\pm$ 3,16 a	10,87 $\pm$ 4,70 ab	27,03 $\pm$ 5,03 ab
14 Variedades	8,15 $\pm$ 3,56 a	1,54 $\pm$ 1,03 a	3,34 $\pm$ 2,30 ab	10,17 $\pm$ 5,81 ab

Médias seguidas por mesma letra na coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade

3.4. Teores de clorofila, carotenóides, glicina betaína e prolina em folhas de plantas de milho

Diferenças significativas dos teores de clorofila *a* foram encontradas para os tratamentos ($F = 5,00$; $gl = 5, 34$; $P = 0,0015$), mas não para infestação ($F = 0,25$; $gl = 1, 34$; $P = 0,6203$) e nem para interação tratamento $\times$ infestação ($F = 1,20$; $gl = 5, 34$; $P = 0,3318$) (Tabela 4). Maior quantidade de clorofila *a* foi encontrada na cultivar Azteca, diferindo significativamente das cultivares Palha Roxa, Pérola, e 14 Variedades. Os teores de clorofila *a* na cultivar Azteca foi 1,87 vezes maior que os encontrados na cultivar Pérola.

Para clorofila *b*, diferenças significativas foram observadas para tratamento ($F = 5,04$; $gl = 5, 34$; $P = 0,0015$), porém não ocorreram diferenças para infestação ($F = 0,15$; $gl = 1, 34$; $P = 0,7049$) e para a interação tratamento $\times$ infestação ($F = 1,31$; $gl = 5, 34$; $P = 0,2859$) (Tabela 4). Valor superior de clorofila *b* foi observado na cultivar Azteca, diferindo significativamente das cultivares Palha Roxa, Pérola, e 14 Variedades. A quantidade de clorofila *b* na cultivar Azteca foi 1,81 vezes maior do que nas cultivares Palha Roxa e Pérola.

Ao avaliar clorofila total (clorofilas *a* + *b*), verificou-se diferenças para tratamento ($F = 5,02$; $gl = 5, 34$; $P = 0,0015$), não sendo observadas diferenças para infestação ($F = 0,21$; $gl = 1, 34$; $P = 0,6484$) nem na interação tratamento $\times$ infestação ($F = 1,23$; $gl = 5, 34$; $P = 0,3169$) (Tabela 4). A maior quantidade do total de clorofilas *a* e *b* foi encontrada na cultivar Azteca, a qual diferiu significativamente das cultivares Palha Roxa, Pérola, e 14 Variedades. A cultivar Azteca teve valor total de clorofila 1,84 vezes maior do que a cultivar Pérola.

Na análise de carotenóides, as diferenças significativas foram evidenciadas também apenas para tratamento ($F = 5,35$; $gl = 5, 34$; $P = 0,0010$), não ocorrendo para infestação ($F = 0,26$; $gl = 1, 34$; $P = 0,6147$) e nem para interação tratamento $\times$ infestação ($F = 1,19$; $gl = 5, 34$; $P = 0,3366$) (Tabela 4). Na cultivar Azteca houve maior teor de carotenóides, sendo diferente significativamente das cultivares Palha Roxa, Pérola, e 14 Variedades. O valor encontrado em Azteca foi 1,83 vezes superior àquele observado para cultivar Pérola.

Os teores de glicina betaína não foram estatisticamente diferentes considerando tratamento ($F = 1,87$; $gl = 5, 32$; $P = 0,1270$), infestação ($F = 1,73$; $gl = 1, 32$; $P = 0,1984$) e a interação tratamento $\times$ infestação ($F = 1,39$; $gl = 5, 34$; $P = 0,2538$) (dados não apresentados), e os valores variaram entre 2,08 a 3,38 μg de glicina betaína g^{-1} de massa seca para tratamento. Também não houve diferenças significativas dos teores de prolina quanto ao tratamento ($F = 1,32$; $gl = 5, 24$; $P = 0,2875$), a infestação ($F = 0,00$; $gl = 1, 24$; $P = 0,9534$), e a interação tratamento $\times$ infestação ($F = 1,94$; $gl = 5, 24$; $P = 0,1251$) (dados não apresentados), e os teores variaram entre 0,04 a 0,14 μmol de prolina g^{-1} de massa fresca.

Tabela 4. Teores (média $\pm$ erro padrão) de clorofilas e carotenoides (caroteno + xantofila) expressos em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ em diferentes cultivares de milho crioulo

Cultivar	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila total (a + b)	Carotenoides
Azteca	8,13 $\pm$ 0,44 a	3,22 $\pm$ 0,18 a	11,35 $\pm$ 0,62 a	7,50 $\pm$ 0,38 a
Encantilado	6,10 $\pm$ 0,79 ab	2,40 $\pm$ 0,31 ab	8,50 $\pm$ 1,10 ab	5,53 $\pm$ 0,70 ab
Fortuna	5,67 $\pm$ 1,01 ab	2,24 $\pm$ 0,40 ab	7,92 $\pm$ 1,40 ab	5,28 $\pm$ 0,91 ab
Palha Roxa	4,47 $\pm$ 0,45 b	1,73 $\pm$ 0,17 b	6,20 $\pm$ 0,62 b	4,15 $\pm$ 0,40 b
Pérola	4,42 $\pm$ 0,33 b	1,76 $\pm$ 0,13 b	6,18 $\pm$ 0,46 b	4,09 $\pm$ 0,27 b
14 Variedades	4,95 $\pm$ 0,47 b	2,01 $\pm$ 0,19 b	6,97 $\pm$ 0,66 b	4,48 $\pm$ 0,41 b

Médias seguidas por mesma letra na coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

4. Discussão

Inicialmente foram realizados testes metodológicos com a finalidade de se investigar qual seria o número de larvas por planta e a idade da planta mais adequados para ensaios de tolerância de cultivares de milho crioulo ao ataque larval de *D. speciosa*. O uso de seis larvas de *D. speciosa* por planta foi suficiente para observar diferenças em porcentagem de redução de altura e massa seca de raízes em plantas de 10 dias de idade. As plantas infestadas por 12 larvas também apresentaram diferenças, porém os dados não foram consistentes, uma vez que houve maior porcentagem de redução da massa seca de raízes em plantas de 20 dias, mas isto não se refletiu na altura, número de folhas, e massa seca da parte aérea das plantas desta idade. Além disso, plantas de 10 dias de idade tiveram uma das menores porcentagens de redução de massa seca de raízes quando infestadas por 12 larvas, mas apresentaram maiores reduções de altura e número de folhas.

Experimentos metodológicos são justificados devido à escassez de estudos sobre danos de *D. speciosa* em milho. De acordo com Viana (2010), infestações a partir de 4,5 larvas de *D. speciosa* são suficientes para causar redução acentuada no peso de grãos por planta de milho. Na presente pesquisa, observou-se que ao liberar seis larvas de *D. speciosa* por planta de milho houve 30,36% de redução na massa seca da parte aérea de plantas da cultivar Fortuna, assim como 39,58% de redução da massa seca de raízes. Em contrapartida, Marques, Ávila, e Parra (1999) relataram que acima de 40 larvas de *D. speciosa* causam sérios danos em plantas de milho.

Entretanto, este valor parece ser muito superestimado, pois os referidos autores usaram apenas uma cultivar (G-85), e resultados diferentes podem ocorrer ao avaliar outras cultivares, como apresentado na presente pesquisa.

As plantas foram avaliadas quanto à idade em que as mesmas seriam mais suscetíveis ao ataque de larvas de *D. speciosa*. Segundo Smith e Clemente (2012) é importante conhecer o período em que as plantas são mais suscetíveis ao ataque de uma determinada praga. Marques, Ávila, e Parra (1999) usaram plantas de milho, cultivar G-85, com sete dias de idade para avaliar danos de *D. speciosa*, idade próxima àquela estudada na presente pesquisa, 10 dias.

Após o término dos ensaios metodológicos, iniciaram-se os testes com as cultivares de milho crioulo. Este experimento foi repetido duas vezes, de setembro a novembro de 2014. Azteca foi a cultivar mais tolerante ao ataque de larvas de *D. speciosa*. Os resultados obtidos no primeiro ensaio demonstraram que esta cultivar teve a menor perda de massa seca de raízes, embora não tenha havido diferenças significativas para as outras variáveis avaliadas. No segundo ensaio a cultivar Azteca também se destacou, desta vez por possuir a menor redução da massa seca da parte aérea, apesar de ter redução da massa seca de raízes igual das cultivares suscetíveis. Assim, a cultivar Azteca diferiu significativamente, em ambos os ensaios, da cultivar Fortuna, a qual foi a mais suscetível ao ataque da praga.

A cultivar Azteca possuiu os maiores teores de clorofila *a*, *b*, clorofila total (*a* + *b*), e carotenóides, observando-se uma correlação positiva entre o alto teor destes pigmentos fotossintéticos e a menor redução da massa seca da parte aérea. Turan et al. (2009) avaliaram efeitos do estresse salino no crescimento e na concentração de clorofila de plantas de milho, e encontraram uma correlação entre a maior redução da massa seca das plantas e o decréscimo no teor de clorofila, devido aos efeitos negativos causados por aquele estresse abiótico. As clorofilas estão intimamente envolvidas em todos os aspectos dos eventos primários da fotossíntese: a captação de luz, transferência de energia, e conversão da energia da luz. Portanto, a produção final de biomassa depende da eficiência com que as folhas convertem energia radiante em energia química pelo processo fotossintético (ASSIS; MENDES, 1989).

Os carotenóides, também presentes em maior quantidade na cultivar tolerante Azteca, desempenham diversas funções essenciais no sistema da fotossíntese.

Primeiro, eles são os pigmentos acessórios na captação e absorção de luz, transferindo energia ao pigmento clorofila especial oxidável (centro de reação), pois a maioria dos complexos de antena contém carotenoides conferindo fotoproteção ao centro de reação (BLANKENSHIP, 2014). Os carotenóides rapidamente dissipam moléculas de clorofila em seu estado excitado tripleto, antes que elas possam reagir com oxigênio para formar o altamente reativo e nocivo oxigênio no estado excitado singleto. Carotenoides também dissipam o oxigênio singleto se ele é de alguma maneira formado. Por último, recentemente tem se relatado que os carotenóides estão envolvidos na regulação da transferência de energia no complexo antenas. Este processo, o qual é denominado ciclo xantofila, evita a super excitação do sistema fotossintético por seguramente dissipar o excesso de energia (BLANKENSHIP, 2014).

Dessa forma, observa-se que as clorofilas e os carotenóides, que são substâncias pigmentares participativas do metabolismo primário das plantas, podem estar envolvidas na manifestação da tolerância da cultivar Azteca sob ataque de larvas de *D. speciosa*, em razão do sistema fotossintético mais eficiente, e também pela ação antioxidante promovida também pelos carotenóides, o que levou Azteca a apresentar as menores reduções de massa seca da planta. Baseando-se nos resultados encontrados no presente trabalho, onde não houve diferenças significativas na quantidade de clorofila e carotenoides entre as cultivares de milho crioulo quando considerando a infestação, conclui-se que não houve aumento no teor destas substâncias como consequência do ataque da praga, ou seja, os maiores teores ocorreram na cultivar Azteca de forma constitutiva, não sendo induzida pelo ataque de larvas de *D. speciosa*.

Azteca foi a cultivar mais suscetível em teste preliminar de antibiose a *D. speciosa* entre 19 cultivares de milho crioulo. A categoria de resistência antibiose é caracterizada por provocar redução na fertilidade, tamanho ou longevidade, e aumento na mortalidade do inseto-praga (SCHOONHOVEN; VAN LOON; DICKE, 2005). Portanto, é possível considerar que a cultivar Azteca expressa tolerância, devido à menor redução no crescimento da planta e por não afetar os aspectos biológicos de *D. speciosa*, como observado em trabalho prévio. Em contrapartida, as cultivares Palha Roxa, Fortuna e Pérola, que foram selecionadas naquele mesmo teste de antibiose por apresentarem resistência ao ataque da praga, na presente

pesquisa, foi verificado que estas cultivares não são tolerantes ao ataque de larvas de *D. speciosa*, exibindo as maiores reduções de massa seca da parte aérea no segundo ensaio. Assim, é possível inferir que, possivelmente, os mecanismos envolvidos na manifestação da tolerância não estão relacionados com os mecanismos que permitem que uma planta expresse antibiose.

Os resultados obtidos nesta pesquisa parecem estar de acordo com a hipótese do balanço da diferenciação do crescimento (HBDC). A HBDC indica que as partes da planta que apresentam crescimento lento possuem mais recursos disponíveis para defesa e assim terão níveis de defesa superiores aos tecidos que apresentam crescimento rápido (BARTO; CIPOLLINI, 2005). Possivelmente este fenômeno ocorreu neste estudo, porque as cultivares Palha Roxa, Fortuna e Pérola parecem investir mais energia na defesa contra o inseto, fato este observado no teste preliminar de antibiose, e também porque estas cultivares não foram capazes de evitar reduções de massa seca da planta, isto é, usaram menos energia para o crescimento da planta. De forma contrária, a cultivar Azteca, a qual possuiu maiores teores de clorofila e carotenóides, parece ter investido mais energia para reduzir a perda de massa seca da planta, mediante o processo fotossintético, sendo reforçado pelo fato desta cultivar ter sido a mais suscetível em teste de antibiose, não alocando energia para produzir metabólitos secundários que interferem no desenvolvimento, sobrevivência, fecundidade, e fertilidade do inseto.

Esta pesquisa revelou que a amina quaternária glicina betaína e o aminoácido prolina não estão envolvidos na atenuação do estresse biótico, isto é, na manifestação da tolerância de cultivares de milho crioulo ao ataque de larvas de *D. speciosa*, por não ocorrer acúmulo que os identificassem como osmólitos compatíveis participantes do ajuste osmótico após ataque larval da praga. Na literatura há referências para ambos compostos em relação sua ação na tolerância de plantas de milho sob diferentes estresses abióticos. A glicina betaína tem sido relatada em milho auxiliando na tolerância ao frio (FAROOQ et al., 2008), seca, e salinidade (CHEN; MURATA, 2008). No que se refere a prolina, é relatada a importante função de atenuar os efeitos da deficiência hídrica (RAYMOND; SMIRNOFF, 2002), tolerância ao calor (LI; DING; DU, 2013), na produtividade de plantas sob diferentes localidades e genótipos de

plantas (ŠPOLJAREVIĆ et al., 2011), e até mesmo desenvolvendo importante função na regulação da síntese de proteínas (WANG et al., 2014).

Assim, a presente pesquisa mostrou que a tolerância manifestada pela cultivar Azteca está, provavelmente, associada com eficiente sistema fotossintético, devido à presença de maiores quantidades de clorofilas e carotenóides. Desta forma, o conhecimento adquirido nesta pesquisa surge como uma importante ferramenta para o melhoramento genético vegetal, porque esta técnica poderá ser aplicada para produzir cultivares de milho tolerantes às larvas de *D. speciosa*. Entretanto, testes em condições de campo são necessários antes de se investir no melhoramento genético vegetal. Além disso, constatou-se que glicina betaína e prolina não são compostos a serem focalizados no melhoramento genético vegetal para produção de cultivares tolerantes a *D. speciosa*. É muito importante, ao realizar uma seleção de genótipos, avaliar também a tolerância, porque uma cultivar que é classificada como suscetível num teste de antixenose (efeitos adversos de uma planta hospedeira no comportamento do inseto) ou antibiose, pode expressar tolerância à praga a ser estudada, como mostrado nesta pesquisa, não descartando assim cultivares mais promissoras.

5. Referências

ALI, Q.; ASHRAF, M. Exogenously applied glycinebetaine enhances seed and seed oil quality of maize (*Zea mays* L.) under water deficit conditions. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 71, n. 2, p. 249-259, 2011.

ARNON, D. I. Cooper enzymes in isolated chloroplast polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 24, n. 1, p. 1-15, 1949.

ASHRAF, M. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, n. 1, p. 84-93, 2009.

ASSIS, F. N.; MENDEZ, M. E. G. Relação entre radiação fotossinteticamente ativa e radiação global. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 2, n. 7, p. 797-800, 1989.

ÁVILA, C. J.; SANTANA, A. G. Larva-alfinete. In: VIANA, P. A. (Ed.). **Principais pragas subterrâneas do milho no Brasil**. Documentos 129. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2011. p. 21-31.

ÁVILA, C. J.; TABAI, A. C. P.; PARRA, J. R. P. Comparação de técnicas para criação de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) em dietas natural e artificial. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 29, n. 2, p. 257-267, 2000.

BARTO, E. K.; CIPOLLINI, D. Testing the optimal defense theory and the growth-differentiation balance hypothesis in *Arabidopsis thaliana*. **Oecologia, Berlin**, v. 146, n. 2, p. 169-178, 2005.

BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil**, The Hague, v. 39, n. 1, p. 205-207, 1973.

BLANKENSHIP, R. E. **Molecular mechanisms of photosynthesis**. Wiley Blackwell: West Sussex, UK, 2014. 296 p.

BOIÇA JÚNIOR, A. L.; SOUZA, B. H. S.; RIBEIRO, Z. A.; MORAES, R. F. O.; EDUARDO, W. I.; NOGUEIRA, L. A defesa das plantas ao ataque dos insetos. In: BUSOLI, A. C.; CASTILHO, R. C.; ANDRADE, D. J.; ROSSI, G. D.; VIANA, D. L.; FRAGA, D. F.; SOUZA, L. A. **Tópicos em Entomologia Agrícola – VIII**. 1. ed. Jaboticabal: Maria de Lourdes Brandel, 2015. cap. 15, p. 161-180.

CENTURION, J. F.; ANDRIOLI, I.; MARQUES JÚNIOR, J.; MARCGIORI, D. G. Características de latossolos roxos desenvolvidos de rochas alcalinas e básicas de Jaboticabal, SP. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 52, n. 2, p. 226-232, 1995.

CHEN, T. H.; MURATA, N. Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 13, n. 9, p. 499-505, 2008.

ENGEL, V. L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e no espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 3, n. 1, p. 39-45, 1991.

FAROOQ, M.; AZIZ, T.; HUSSAIN, M.; REHMAN, H.; JABRAN, K.; KHAN, M. B. Glycinebetaine improves chilling tolerance in hybrid maize. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Berlin, v. 194, n. 2, p. 152-160, 2008.

GENARD, H.; SAOS, J. L.; HILLARD, J.; TREMOLIERES, A.; BOUCAUD, J. Effect of salinity on lipid composition, glycine betaine content and photosynthetic activity in chloroplasts of *Suaeda maritima*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 29, n. 5, p. 421-427, 1991.

GRIEVE, C. M.; GRATTAN, S. R. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. **Plant and Soil**, The Hague, v. 70, n. 2, p. 303-307, 1983.

HOWITT, C. A.; POGSON, B. J. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 435-445, 2006.

HUANG, J.; HIRJI, R.; ADAM, L.; ROZWADOWSKI, K. L.; HAMMERLINDL, J. K.; KELLER, W. A.; SELVARAJ, G. Genetic engineering of glycinebetaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. **Plant Physiology**, Washington, v. 122, n. 3, p. 747-756, 2000.

IQBAL, N.; ASHRAF, M. Y.; ASHRAF, M. Influence of water stress and exogenous glycinebetaine on sunflower achene weight and oil percentage. **International Journal of Environmental Science and Technology**, Heidelberg, v. 2, n. 2, p. 155-160, 2005.

KEMBLE, A. R.; MACPHERSON, H. T. Liberation of amino acids in perennial ray grass during wilting. **Biochemical Journal**, Londres, v. 58, n. 1, p. 46-59, 1954.

LI, Z. G.; DING, X. J.; DU, P. F. Hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide improved heat tolerance in maize and involvement of proline. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 170, n. 8, p. 741-747, 2013.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, New York, v. 148, p. 350-382, 1987.

MARQUES, G. B. C.; ÁVILA, 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.

MATYSIK, J.; BHALU, B.; MOHANTY, P. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. **Current Science**, Bangalore, v. 82, n. 5, p. 525-532, 2002.

RAJENDRAKUMAR, C. S. V; REDDY, B. V. B.; REDDY, A. R. Proline-protein interactions: protection of structural and functional integrity of M4 lactate dehydrogenase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 201, n. 2, p. 957–963, 1994.

RAYMOND, M. J.; SMIRNOFF, N. Proline metabolism and transport in maize seedlings at low water potential. **Annals of Botany**, London, v. 89, n. 7, p. 813-823, 2002.

REESE, J. C.; SCHWENKE, J. R.; LAMONT, P. S.; ZEHR, D. D. Importance and quantification of plant tolerance in crop pest management programs for aphids: greenbug resistance in sorghum. **Journal of Agricultural Entomology**, Clemson, v. 11, n. 3, p. 255-270, 1994.

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

SCHWACHTJE, J; BALDWIN, I. T. Why does herbivore attack reconfigure primary metabolism? **Plant Physiology**, Washington, v. 146, n. 3, p. 845-851, 2008.

SMITH, C. M. **Plant resistance to arthropods, Molecular and Conventional Approaches**. Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2005. 423 p.

SMITH, C. M.; CLEMENT, S. L. Molecular bases of plant resistance to arthropods. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 57, p. 309-328, 2012.

ŠPOLJAREVIĆ, M.; AGIĆ, D.; LISJAK, M.; GUMZE, A.; WILSON, I. D.; HANCOCK, J. T.; TEKLIĆ, T. The relationship of proline content and metabolism on the productivity of maize plants. **Plant Signaling & Behavior**, Seattle, v. 6, n. 2, p. 251-257, 2011.

SZABADOS, L; SAVOURÉ, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 15, n. 2, p. 89-97, 2010.

TURAN, M. A.; ELKARIM, A. H. A.; TABAN, N.; TABAN, S. Effect of salt stress on growth, stomatal resistance, proline and chlorophyll concentrations on maize plant. **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 4, n. 9, p. 893-897, 2009.

UARROTA, V. G.; SEVERINO, R. B.; MARASCHIN, M. Maize landraces (*Zea mays* L.): A new prospective source for secondary metabolite production. **International Journal of Agricultural Research**, Maulvibazar, v. 6, n. 3, p. 218-226, 2011.

VIANA, P. A. **Manejo de *Diabrotica speciosa* na Cultura do Milho**, 2010. Disponível em <<https://www.embrapa.br/documents/1344498/2767891/manejo-de-diabrotica-speciosa-na-cultura-do-milho.pdf/a0ec3a33-2864-47b3-ac6e-b2fc63d4fa02>>. Acesso em: 26 Jul. 2016.

WANG, G.; ZHANG, J.; WANG, G.; FAN, X.; SUN, X.; QIN, H.; XU, N.; ZHONG, M.; QIAO, Z.; TANG, Y.; SONG, R. *Proline responding1* Plays a Critical Role in Regulating General Protein Synthesis and the Cell Cycle in Maize. **Plant Cell**, Rockville, v. 26, p. 2582-2600, 2014.

CAPÍTULO 4 – Metodologia para avaliação da antixenose para oviposição de *Diabrotica speciosa* (Germar) em cultivares de milho crioulo

RESUMO – *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) é uma praga de importância econômica para diversas culturas em países das Américas do Sul e Central. Esse trabalho foi realizado com a finalidade de estudar metodologias para a posterior avaliação da antixenose para oviposição de *D. speciosa* em cultivares de milho crioulo. As plantas foram conduzidas em casa de vegetação, e para o início dos ensaios elas foram transportadas para o laboratório. Avaliou-se a capacidade de reconhecimento da presença da planta hospedeira, o número de casais, a idade de plantas mais preferida para oviposição, a influência do recurso alimentar dos adultos, e antixenose para oviposição de *D. speciosa* em milho crioulo, usando cultivares previamente selecionadas de acordo com os diferentes níveis de resistência na categoria antibiose. Fêmeas de *D. speciosa* conseguem identificar a localização da planta de milho para oviposição, comparando com um local onde não há presença da planta. Entretanto, quando diferentes cultivares de milho crioulo são avaliadas, as fêmeas não conseguem discernir qual o melhor hospedeiro para o desenvolvimento e sobrevivência de sua prole. Observou-se que plantas de feijoeiro melhoram a capacidade de postura de *D. speciosa*, e se os insetos adultos não têm uma planta adequada para sua alimentação, como feijoeiro, uma alta mortalidade ocorre nos ensaios. O presente trabalho mostrou que nem sempre uma cultivar que expressa antibiose será repelente ou deterrente para a oviposição (antixenose), e que em alguns casos não há nenhuma correlação entre estas duas categorias de resistência. **Palavras-chave:** *Zea mays* L., resistência de plantas a insetos, não preferência, herbivoria, praga de solo, manejo integrado de pragas

CHAPTER 4 – Methodology to evaluate the antixenosis to the oviposition of *Diabrotica speciosa* (Germar) in maize landraces

ABSTRACT – *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) is a pest of economic importance to several crops in countries of South and Central America. This work was performed aiming to study methodologies to the posterior evaluation of antixenosis to the oviposition of *D. speciosa* in maize landraces. Plants were grown in greenhouse and afterwards transferred to the laboratory to initiate the assays. It was evaluated the recognition capability of the host plant presence, the number of couples, the most preferred age for oviposition, the effect of the adults' feeding source, and antixenosis to the oviposition of *D. speciosa* in maize landraces, using cultivars previously selected according with the different levels of antibiosis resistance. *Diabrotica speciosa* females can identify the localization of the maize plant for oviposition, comparing with a place where there is no plant. However, when different maize landraces are evaluated the females cannot discern which is the best host for the development and survival of their offspring. It was noticed that bean plants enhance the oviposition capacity of *D. speciosa*, and if the adult insects do not have a suitable host plant for their feeding, as beans, high mortality occurs in the assays. The current research has shown that not always a cultivar which express antibiosis will be repellent or deterrent for oviposition (antixenosis), and that in some cases there is no correlation between these two resistance categories.

Keywords: *Zea mays* L., host plant resistance to insects, non-preference, herbivory, soil pest, integrated pest management

1. Introdução

Diabrotica speciosa (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) é uma praga economicamente importante em diversas culturas da região Neotropical e representa um risco de quarentena para regiões Neárticas e Paleárticas (NARDI et al. 2012). O impacto econômico na agricultura e o montante de recursos gastos para o controle de *D. speciosa* no Brasil não foram ainda estimados, embora se aplique anualmente uma expressiva quantidade de ingredientes ativos para o controle, tanto de adultos como de larvas dessa praga, especialmente nas culturas de milho (*Zea mays* L.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), e batata (*Solanum tuberosum* L.), principalmente nas regiões sudeste e sul do País (ÁVILA; SANTANA, 2011).

Em condições naturais, as fêmeas de *D. speciosa* realizam a postura no solo, sendo as propriedades químicas, físicas e biológicas do substrato determinantes no comportamento de oviposição do inseto (MILANEZ; PARRA, 2000). As fêmeas de insetos, ao aceitarem uma planta para ovipositar fazem uma escolha que é de crucial importância para as chances de sobrevivência de sua descendência, porque a mobilidade e as reservas de energia de muitas larvas de primeiro instar são tão limitadas que suas oportunidades de encontrar um hospedeiro adequado por conta própria são mínimas (STÄDLER, 2002; SCHOONHOVEN; VAN LOON; DICKE, 2005).

Antixenose é um termo derivado da palavra grega *xeno* que descreve a inabilidade de uma planta em servir como hospedeira a um artrópode. Se esta situação existe numa interação planta-artrópode, uma determinada praga escolhe selecionar uma planta hospedeira alternativa para oviposição e/ou alimentação (SMITH 2005). A ocorrência de antixenose indica a presença de fatores químicos, físicos, ou morfológicos da planta que adversamente alteram o comportamento do artrópode, resultando na seleção de uma planta hospedeira alternativa (BOIÇA JÚNIOR et al., 2015). Barreiras morfológicas como camadas epidérmicas mais espessas da planta, depósito de ceras em folhas, caules e frutos, ou uma mudança na densidade de tricomas podem forçar os insetos-praga a abandonar seus esforços para consumir, ingerir ou ovipositar em uma planta que apresente essas características. Além disso, plantas que apresentam antixenose provavelmente

possuem fitoquímicos que deterrem ou repelem herbívoros ao se alimentar ou ovipositar (SMITH 2005).

Diversas cultivares de milho crioulo têm sido cultivadas há décadas por comunidades indígenas e pequenos agricultores. De maneira geral, as populações crioulas são menos produtivas que as cultivares modernas, embora apresentem uma complexa estrutura genética (ANDRADE; FILHO, 2008). Por isso, essas populações são importantes fontes de variabilidade na busca por genes responsáveis pela tolerância ou resistência aos fatores bióticos ou abióticos (ARAÚJO; NASS, 2002).

Nogueira (2015) investigou a resistência de cultivares de milho crioulo a *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), e verificou que a cultivar Pérola apresentou resistência moderada nas categorias não preferência para alimentação e oviposição, e antibiose. Além disso, Nogueira (2015) concluiu que as cultivares Caatingueiro e Maia foram moderadamente resistentes na categoria não preferência para oviposição em teste com chance de escolha.

A presente pesquisa teve como objetivo a avaliação de diferentes testes metodológicos para subsequentemente investigar uma possível manifestação da resistência pela categoria antixenose para oviposição a *D. speciosa* em diferentes cultivares de milho crioulo, contribuindo com mais informações a respeito das diferentes cultivares de milho crioulo aqui avaliadas, assim como correlacionar os resultados apresentados com dados de antibiose já identificadas previamente nestas cultivares.

2. Material e Métodos

2.1. Informações gerais

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos, do Departamento de Fitossanidade, da Universidade Estadual Paulista, UNESP-Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

As plantas de milho (cv. Cativerde 02) usadas nos ensaios foram cultivadas em casa de vegetação, em vasos plásticos de 770 mL, com abertura de aproximadamente de 2,0 cm de comprimento na parte inferior lateral para evitar acúmulo de água da

irrigação, e preenchidos por solo (latossolo vermelho escuro eutrófico) (CENTURION et al., 1995), areia e adubo orgânico, numa proporção 3:1:1.

Três sementes foram semeadas por vaso, irrigando sempre que necessário. Aos cinco dias após a emergência das plantas, foi realizado o desbaste, mantendo-se apenas uma planta por vaso. No momento em que as plantas completaram a idade pré-estabelecida para iniciar os experimentos, as mesmas foram transportadas da casa de vegetação ao laboratório. Em seguida, o solo foi coberto por algodão umedecido por água, e sobre o algodão foram colocadas camadas de gaze preta. Os adultos de *D. speciosa*, de aproximadamente 20 dias de idade, foram separados quanto ao sexo de acordo com metodologia de White (1977) que caracteriza os machos por possuírem uma placa adicional no final do abdômen, denominada pigídio. Esse procedimento foi realizado usando um microscópio estereoscópio de 40 × aumento (Modelo SZ40, Olympus, São Paulo, SP).

Para a quantificação do número de ovos, as camadas de tecido gaze de cada tratamento foram retiradas e lavadas em água corrente (torneira), e os ovos foram recolhidos em tecido *voile*. Em seguida, o número de ovos foi avaliado usando um microscópio estereoscópio.

2.2. Influência da presença da planta hospedeira na oviposição de *Diabrotica speciosa*

Antes de realizar os ensaios metodológicos e com as cultivares de milho crioulo, foi necessário realizar um teste para comprovar que *D. speciosa* era atraída por plantas de milho em condições de laboratório.

Plantas de 10 dias de idade foram usadas nesse ensaio, e os tratamentos testados foram (1) planta com solo coberto com disco de papel cartão preto, o qual impede que a oviposição seja feita no solo; (2) planta com solo forrado por camadas de algodão hidrófilo umedecido, e coberto por cinco camadas de gaze preta; e (3) placa de Petri (Modelo P 0074, Inlab®) de 8,0 cm de diâmetro forrada com algodão umedecido e coberta por cinco camadas de gaze preta (sem presença de qualquer planta). No tratamento 1, os insetos foram impedidos de entrar em contato com o solo. No tratamento 2, os insetos tiveram acesso à gaze como substrato de oviposição. No

tratamento 3, os insetos também tiveram acesso à gaze como substrato de oviposição, e as placas de Petri foram colocadas na mesma altura dos outros tratamentos.

Os tratamentos foram dispostos de modo equidistante em gaiolas de vidro de 40 cm comprimento × 30 cm altura × 30 cm largura. Três casais de *D. speciosa* foram liberados por gaiola, e uma planta de feijoeiro cv. Pérola foi oferecida como fonte alimentar extra (ÁVILA; PARRA, 2002), mantida em tubo de ensaio preenchido por água e vedado com papel filme. O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos e sete repetições. O número de ovos foi avaliado às 48, 72, e 96 horas após liberação dos insetos.

2.3. Número de casais de *Diabrotica speciosa* por planta de milho

Para a realização desse teste, as plantas foram cultivadas nas mesmas condições mencionadas nos itens anteriores. Assim que as plantas chegaram ao laboratório, após serem transportadas da casa de vegetação, as mesmas foram colocadas sobre bancada. Após forrar o solo com algodão umedecido e cinco camadas de gaze preta, em cada vaso plástico foi inserida uma vara de bambu de 50 cm de comprimento como suporte para o saco de tecido *voile* de 55 cm de altura × 35 cm de largura, o qual foi fechado em sua extremidade inferior com um elástico para evitar a fuga dos insetos. Além disso, uma planta de feijoeiro de 10 dias de idade foi anexada à planta de milho como fonte alimentar extra para os adultos, sendo substituída geralmente a cada 1-2 dias. As plantas foram infestadas por um, dois, ou quatro casais de *D. speciosa*, em um delineamento inteiramente casualizado, perfazendo-se 30 repetições. A quantificação do número de ovos foi realizada às 48, 72, e 96 horas após liberação dos insetos.

2.4. Efeitos da fonte alimentar e de diferentes idades de plantas de milho na oviposição de *Diabrotica speciosa*

Foram realizados testes com e sem chance de escolha, usando plantas de cinco, 10, ou 20 dias de idade para avaliar a oviposição de *D. speciosa*. No teste com

chance de escolha as plantas e os insetos (três casais/gaiola, de acordo com teste anterior) foram colocados nas gaiolas de vidro descritas no penúltimo item, e no teste sem chance de escolha os materiais e procedimentos foram idênticos àqueles descritos no último item.

Também foi avaliado os efeitos do uso da planta de feijoeiro de 10 dias de idade como fonte alimentar adicional para os insetos. No teste com chance de escolha a planta de feijoeiro foi colocada no centro da gaiola, e teve ao seu redor as plantas de milho que foram submetidas ao teste de oviposição, conforme as idades descritas acima. No ensaio sem chance de escolha, as plantas de feijoeiro foram amarradas às plantas de milho usando fita plástica. Testes com e sem chance de escolha também foram conduzidos sem o uso da planta de feijoeiro como fonte alimentar extra.

Os ensaios foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, com sete repetições por tratamento. Além do número de ovos, avaliado às 48, 72 e 96 horas após liberação dos insetos, foi avaliado a mortalidade dos insetos nos tempos pré-estabelecidos.

2.5. Oviposição de *Diabrotica speciosa* em diferentes cultivares de milho crioulo

Nesse trabalho foram utilizadas seis cultivares de milho crioulo pré-selecionadas em teste de antibiose, de acordo com os diferentes níveis de resistência expressos nesta categoria, quais sejam: Azteca (suscetível), Encantado (suscetível), Fortuna (resistente), Palha Roxa (resistente), Pérola (resistente), e 14 Variedades (suscetível). Esses estudos foram conduzidos de acordo com os resultados obtidos nos testes metodológicos, liberando-se um casal de *D. speciosa* por planta (= seis casais/gaiola), e oferecendo-se plantas de milho de 10 dias de idade. Foi mantido o uso de uma planta de feijoeiro como fonte alimentar adicional. Foram realizados ensaios com e sem chance de escolha, com sete repetições por tratamento. O número de ovos foi avaliado às 48, 72, e 96 horas após liberação dos casais.

2.6. Análise estatística

Os dados obtidos nos diferentes ensaios foram submetidos aos testes de normalidade de resíduos (Cramér-von Mises) e homogeneidade de variância (Levene). Os dados que não foram normais nem homocedásticos foram submetidos ao teste não paramétrico de Wilcoxon ($\alpha = 0,05$) quando avaliando apenas duas categorias (tratamentos), e acima de duas categorias os mesmos foram submetidos aos testes de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$) quando as categorias foram independentes, e ao teste de Friedman ($\alpha = 0,05$) quando analisando categorias dependentes, conforme realizado por Golab e Snieguila (2012) e corroborado por Mello (2015).

3. Resultados

3.1. Influência da presença da planta hospedeira na oviposição de *Diabrotica speciosa*

Foram observadas diferenças significativas do número de ovos em relação à presença ou não da planta hospedeira às 48 ($W = 9,82$; $gl = 1, 12$; $P = 0,0017$), 72 ($W = 6,55$; $gl = 1, 12$; $P = 0,0105$), e 96 horas ($W = 9,89$; $gl = 1, 12$; $P = 0,0017$) após a liberação dos adultos de *D. speciosa*. O número total de ovos também diferiu nos diferentes tratamentos ($W = 9,80$; $gl = 1, 12$; $P = 0,0017$) (Tabela 1). Claramente as fêmeas preferiram ovipositar no tratamento “planta + gaze”, do que no tratamento “placa de Petri + gaze”, com uma diferença superior a oito vezes às 96 horas, e seis vezes maior no número total de ovos. Nenhum ovo foi encontrado no tratamento “planta com solo coberto”.

Tabela 1. Número de ovos (média $\pm$ erro padrão) de *Diabrotica speciosa* em diferentes tratamentos e tempos após liberação dos insetos

Tratamento	Número de ovos			Total
	48 h	72 h	96 h	
planta + gaze	151,86 $\pm$ 24,29 a	46,14 $\pm$ 10,29 a	95,29 $\pm$ 23,56 a	293,29 $\pm$ 39,71 a
placa de Petri + gaze	24,00 $\pm$ 5,71 b	8,14 $\pm$ 2,46 b	11,43 $\pm$ 3,70 b	43,57 $\pm$ 6,26 b

Médias seguidas por letras diferentes na coluna são significativamente diferentes pelo teste de Wilcoxon a 5% de probabilidade

3.2. Número de casais de *Diabrotica speciosa* por planta de milho

Maior número de ovos foi encontrado em plantas infestadas com quatro casais às 48 ($H = 17,77$; gl = 2, 87; $P < 0,0001$) e 96 horas ($H = 9,90$; gl = 2, 87; $P < 0,0001$) após a liberação dos adultos (Tabela 2). Também houve diferenças significativas no que diz respeito ao número total de ovos ($H = 17,95$; gl = 2, 87; $P < 0,0001$) (Tabela 2). Na avaliação de 48 horas observou-se que os tratamentos foram totalmente diferentes. Em contrapartida, às 96 horas e no número total de ovos, o tratamento “quatro casais” diferiu significativamente dos tratamentos “um casal” e “dois casais”, enquanto que estes tratamentos foram iguais. No que se refere ao número total de ovos, o valor encontrado no tratamento “quatro casais” foi 2,75 vezes superior do que aquele encontrado no tratamento “um casal”. Entretanto, considerando o número de ovos por casal, o tratamento “um casal” se destacou pelo maior valor, porque ao dividir o número de ovos por casal, nota-se que o tratamento “quatro casais” possuiu valor inferior do que o primeiro tratamento, com 35,73 ovos.

Tabela 2. Número de ovos (média $\pm$ erro padrão) de *Diabrotica speciosa* por diferentes números de casais e tempos após liberação dos insetos

Número de casais	Tempos			Total
	48 h	72 h	96 h	
Um casal	7,23 $\pm$ 2,04 c	16,23 $\pm$ 3,55 a	28,50 $\pm$ 6,09 b	51,97 $\pm$ 7,29 b
Dois casais	16,10 $\pm$ 3,91 b	20,27 $\pm$ 4,43 a	27,97 $\pm$ 5,32 b	64,33 $\pm$ 8,20 b
Quatro casais	45,43 $\pm$ 10,84 a	39,07 $\pm$ 8,49 a	58,43 $\pm$ 8,86 a	142,93 $\pm$ 19,15 a

Médias seguidas por letras diferentes na coluna são significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade

3.3. Efeitos da fonte alimentar e de diferentes idades de plantas de milho na oviposição de *Diabrotica speciosa*

Não houve diferenças significativas na oviposição de *D. speciosa* considerando a idade das plantas de milho em testes com chance de escolha, seja oferecendo as folhas das plantas de feijoeiro como fonte alimentar extra para os insetos (número total de ovos: $\chi^2 = 1,77$; gl = 2, 18; $P = 0,2125$), quanto no ensaio em que os insetos tiveram apenas folhas das plantas de milho para se alimentar (número total de ovos: $\chi^2 = 0,95$; gl = 2, 18; $P = 0,4861$) (Tabela 3). Entretanto, a quantidade de ovos observada no teste em que os insetos se alimentaram com folhas de feijoeiro foi 3,67; 3,03; e 4,06 vezes superior do que no ensaio onde os insetos não tiveram esse alimento extra, em plantas de cinco, 10, e 20 dias de idade, respectivamente.

No ensaio sem folhas de feijoeiro os insetos tiveram alta mortalidade, o que explica em parte o baixo número de ovos, não sendo possível fazer análise estatística para a avaliação de 96 horas (Tabela 3). Mortalidade de insetos não foi observada no experimento em que os insetos tiveram folhas de feijoeiro, porém no teste sem folhas de feijoeiro houve mortalidade (acumulada) de 11,90; 16,67; e 38,10% às 48, 72 e 96 horas, respectivamente. A mortalidade total foi de 66,67% (dados não apresentados).

Em teste sem chance de escolha, diferenças significativas foram encontradas somente às 48 horas ($H = 6,10$; gl = 2, 87; $P = 0,0473$) depois da liberação dos casais (Tabela 4). Nessa avaliação o maior número de ovos foi notado em plantas de 20 dias de idade, diferindo de plantas de cinco dias de idade, porém sendo igual ao valor observado para plantas de 10 dias de idade.

Tabela 3. Número de ovos (média $\pm$ erro padrão) de *Diabrotica speciosa* em plantas de milho cv. Cativerde 02 de diferentes idades e em diferentes tempos, com ou sem folhas de feijoeiro como recurso alimentar extra, em teste com chance de escolha

COM FOLHAS DE FEIJOEIRO				
Idade da planta	Tempos			Total
	48 h	72 h	96 h	
5 dias idade	0,57 $\pm$ 0,57 a	2,86 $\pm$ 2,39 a	24,86 $\pm$ 14,67 a	28,29 $\pm$ 16,56 a
10 dias idade	7,14 $\pm$ 7,14 a	10,71 $\pm$ 7,70 a	12,86 $\pm$ 4,82 a	30,71 $\pm$ 7,97 a
20 dias idade	10,71 $\pm$ 7,52 a	18,57 $\pm$ 7,48 a	20,57 $\pm$ 6,02 a	49,86 $\pm$ 8,64 a
SEM FOLHAS DE FEIJOEIRO				
Idade da planta	Tempos			Total
	48 h	72 h	96 h	
5 dias idade	7,43 $\pm$ 7,10 a	0,29 $\pm$ 0,18 a	-	7,71 $\pm$ 7,06 a
10 dias idade	7,71 $\pm$ 3,34 a	2,29 $\pm$ 1,84 a	0,14 $\pm$ 0,14	10,14 $\pm$ 4,22 a
20 dias idade	12,29 $\pm$ 5,02 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	-	12,29 $\pm$ 5,02 a

Médias seguidas por letras iguais na coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Friedman a 5% de probabilidade

Tabela 4. Número de ovos (média $\pm$ erro padrão) de *Diabrotica speciosa* em plantas de milho de diferentes idades e em diferentes tempos, em teste sem chance de escolha

Idade da planta	Tempos			Total
	48 h	72 h	96 h	
5 dias idade	5,00 $\pm$ 2,41 b	11,27 $\pm$ 2,62 a	10,37 $\pm$ 2,47 a	26,63 $\pm$ 4,04 a
10 dias idade	9,43 $\pm$ 3,97 ab	13,60 $\pm$ 4,51 a	11,87 $\pm$ 2,68 a	34,90 $\pm$ 6,38 a
20 dias idade	13,43 $\pm$ 4,43 a	14,43 $\pm$ 3,66 a	18,33 $\pm$ 4,15 a	46,20 $\pm$ 7,77 a

Médias seguidas por letras diferentes na coluna são significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade

3.4. Oviposição de *Diabrotica speciosa* em diferentes cultivares de milho crioulo

No teste com chance de escolha, houve diferenças significativas no número de ovos somente às 72 horas após liberação dos insetos ($\chi^2 = 11,52$; gl = 5, 36; $P = 0,0421$) (Tabela 5). Menor número de ovos foi encontrado na cultivar Encantilado, diferindo significativamente da cultivar Palha Roxa, a qual apresentou o maior número de ovos. A quantidade de ovos encontrada na cultivar Palha Roxa foi quatro vezes mais alto do que em Encantilado. Em teste sem chance de escolha, diferenças

significativas não foram observadas, inclusive no número total de ovos ($H = 9,99$; $gl = 5$, 35; $P = 0,0754$) (Tabela 5).

Tabela 5. Número de ovos (média $\pm$ erro padrão) de *Diabrotica speciosa* em diferentes cultivares de milho crioulo e tempos após liberação dos insetos

COM CHANCE DE ESCOLHA [†]				
Cultivar	Número de ovos			
	48 h	72 h	96 h	Total
Azteca	83,00 $\pm$ 37,95 a	45,14 $\pm$ 15,08 ab	86,29 $\pm$ 19,31 a	214,43 $\pm$ 31,35 a
Encantilado	174,28 $\pm$ 40,70 a	36,14 $\pm$ 11,29 b	112,00 $\pm$ 19,90 a	322,43 $\pm$ 48,81 a
Fortuna	112,00 $\pm$ 18,05 a	75,85 $\pm$ 34,87 ab	97,86 $\pm$ 19,92 a	285,71 $\pm$ 49,37 a
Palha Roxa	54,00 $\pm$ 19,89 a	157,42 $\pm$ 35,72 a	119,29 $\pm$ 18,61 a	330,71 $\pm$ 48,98 a
Pérola	120,28 $\pm$ 24,10 a	91,71 $\pm$ 44,91 ab	101,86 $\pm$ 31,30 a	313,86 $\pm$ 83,90 a
14 Variedades	114,42 $\pm$ 31,85 a	48,28 $\pm$ 15,60 ab	73,00 $\pm$ 20,06 a	235,71 $\pm$ 37,90 a
SEM CHANCE DE ESCOLHA [‡]				
Cultivar	Número de ovos			
	48 h	72 h	96 h	Total
Azteca	44,33 $\pm$ 8,33 a	31,17 $\pm$ 11,18 a	89,67 $\pm$ 17,66 a	165,17 $\pm$ 23,53 a
Encantilado	56,50 $\pm$ 13,97 a	24,83 $\pm$ 7,39 a	152,17 $\pm$ 24,30 a	233,50 $\pm$ 24,85 a
Fortuna	17,33 $\pm$ 5,26 a	26,33 $\pm$ 12,78 a	88,50 $\pm$ 15,66 a	132,17 $\pm$ 21,58 a
Palha Roxa	46,00 $\pm$ 14,68 a	38,00 $\pm$ 11,37 a	98,00 $\pm$ 9,98 a	182,00 $\pm$ 20,41 a
Pérola	53,67 $\pm$ 13,51 a	21,67 $\pm$ 10,64 a	121,33 $\pm$ 19,49 a	196,67 $\pm$ 19,04 a
14 Variedades	39,50 $\pm$ 11,34 a	9,00 $\pm$ 2,60 a	86,50 $\pm$ 15,59 a	135,00 $\pm$ 26,00 a

Médias seguidas por letras diferentes na coluna são significativamente diferentes pelo teste de Friedman[†] ou Kruskal-Wallis[‡] a 5% de probabilidade

4. Discussão

Observou-se que em alguns casos as fêmeas de *D. speciosa* possuem a capacidade de reconhecer o local em que será favorecido o desenvolvimento de sua prole, ao colocar maior número de ovos em substrato (gaze preta) no qual se desenvolve uma planta hospedeira, ovipositando em menor quantidade no tratamento “placa de Petri + gaze” (sem a presença de qualquer planta). Esse ensaio foi necessário para comprovar que as fêmeas de *D. speciosa* ao menos reconhecem onde a planta hospedeira se encontra para efetuar a oviposição. As fêmeas de *D. speciosa* não colocaram ovos em plantas com solo coberto com disco de papel cartão

preto, porque em papel cartão não é possível a inserção do ovipositor, como as fêmeas fazem no solo ou na gaze preta.

Ao avaliar o número mais adequado de casais de *D. speciosa* por planta de milho, escolheu-se liberar um casal por planta porque esse tratamento não diferiu do tratamento “dois casais”, e também devido ao fato de que para usar quatro casais por planta seria necessário diminuir o número de repetições usado no ensaio, devido ao número de insetos obtidos rotineiramente na criação mantida em laboratório. Costa et al. (2014a) avaliaram os mesmos números de casais de *D. speciosa* por planta de soja, e não encontraram diferenças significativas. Provavelmente, na presente pesquisa houve diferenças significativas devido ao fornecimento de folhas de feijoeiro como recurso alimentar extra, o que aumenta a capacidade de postura dos insetos de forma significativa quando comparando com insetos alimentados em folhas de soja ou milho (ÁVILA; PARRA, 2002).

No que diz respeito à idade das plantas, Smith (2005) cita a importância de se conhecer o período em que as plantas hospedeiras são mais suscetíveis ao ataque de uma determinada praga, antes de iniciar ensaios com os genótipos de interesse. Entretanto, de forma geral, na presente pesquisa não houve diferenças significativas quanto a preferência para oviposição de *D. speciosa* por plantas de milho em diferentes idades no estágio vegetativo. Portanto, plantas de 10 dias de idade foram escolhidas por não serem facilmente quebradas durante o transporte, porque seu tamanho se encaixou perfeitamente nas gaiolas usadas nesta pesquisa, e além de possibilitar a realização dos ensaios no início do desenvolvimento das plantas, diminuindo o tempo para os cuidados na sua condução.

Uma vez analisadas as informações dos ensaios metodológicos, foram realizados os experimentos de antixenose para oviposição a *D. speciosa* em cultivares de milho crioulo. Diferenças entre cultivares foram observadas apenas em teste com chance de escolha, às 72 horas após liberação dos casais, não havendo diferenças no número total de ovos. Na presente pesquisa os insetos tiveram tempo suficiente para interagir com as plantas, 96 horas, tempo utilizado para testar a preferência para oviposição de *D. speciosa* em genótipos de soja (COSTA et al. 2014a).

Ensaio de preferência para oviposição com outras espécies de insetos foram realizadas em tempo até mesmo inferior a 96 horas. Borg e Ekbom (1996) avaliaram

a oviposição de *Meligethes aeneus* (Fabricius) (Coleoptera: Nitidulidae) em folhas de quatro diferentes espécies da família Brassicaceae, com término do ensaio às 48 horas após infestação das plantas. Khan et al. (2007) estudaram a preferência para oviposição de *Busseola fusca* Füller (Lepidoptera: Noctuidae) em variedades de milho e capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum) cv. Napier, finalizando o ensaio também às 48 horas.

Oviposição pode ser influenciada por diversos fatores, como sinais visuais, voláteis (WENNINGER; STELINSKI; HALL, 2009), metabólitos secundários, tamanho da planta (TALSMA et al. 2008) e textura da planta (PONTES et al., 2010). De acordo com os resultados obtidos no primeiro ensaio desta pesquisa, as fêmeas de *D. speciosa* são capazes de reconhecer o local em que a planta de milho está se desenvolvendo, e possivelmente usa alguns dos fatores mencionados acima para localizar a planta hospedeira. Entretanto, ao oferecer as cultivares de milho crioulo as fêmeas não demonstraram preferência para oviposição por nenhuma delas, apesar de ter sido feito uma seleção prévia, escolhendo cultivares com diferentes níveis de resistência na categoria antibiose, que é definida por Smith e Clement (2012) como os efeitos adversos de uma planta resistente na sobrevivência, desenvolvimento, ou fecundidade de um artrópode.

Os resultados desta pesquisa demonstram que *D. speciosa* é capaz de reconhecer se em determinado recipiente há presença de planta de milho, mas quando os insetos têm a opção de ovipositar em plantas de milho de diferentes cultivares, adequadas ou não para o desenvolvimento e/ou sobrevivência de sua prole, as fêmeas não apresentam capacidade de escolher a mais adequada para seus descendentes. De forma contrária, Costa et al. (2014a) relataram que fêmeas de *D. speciosa* conseguem discernir o genótipo de soja mais adequado para sua descendência (COSTA et al., 2014b). Folhas de soja são mais adequadas para a alimentação de adultos de *D. speciosa* do que folhas de milho (MARQUES; ÁVILA; PARRA, 1999).

O perfil de voláteis liberados por plantas injuriadas geralmente difere daquele liberado por plantas não injuriadas. Por exemplo, os voláteis liberados por plantas de milho injuriadas por *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) foram mais atrativos para larvas desta espécie do que voláteis liberados por plantas não

injurizadas (CARROLL et al. 2006). Assim, provavelmente as fêmeas de *D. speciosa* apresentam esse mesmo comportamento, porque as folhas de milho no presente ensaio foram muito pouco injurizadas, liberando, possivelmente, uma pequena quantidade de voláteis, diferentemente do que aconteceu no ensaio com genótipos de soja conduzido por Costa et al. (2014a), onde os insetos se alimentaram apenas em folhas de soja, onde uma maior quantidade de voláteis pode ter sido liberada pelas plantas, atraindo, dessa forma, as fêmeas para efetuar a oviposição.

Em interações inseto-planta, a relação entre a escolha materna da planta hospedeira para sua prole e a consequente sobrevivência e desenvolvimento da descendência tem sido frequentemente considerada no contexto da hipótese da preferência pelo desempenho (CLARK; HARTLEY; JOHNSON, 2011), anteriormente definida como teoria da oviposição ótima (JAENIKE 1978). A hipótese da preferência pelo desempenho afirma que as fêmeas de insetos irão preferencialmente ovipositar em plantas que maximizem a sobrevivência e desenvolvimento de suas larvas. Em particular, esta hipótese se refere a insetos cujas larvas têm pouca ou nenhuma habilidade para se deslocar, e são assim dependentes da escolha da planta hospedeira feita pela mãe (CLARK; HARTLEY; JOHNSON, 2011), como no caso de *D. speciosa*. Contudo, com base nos resultados encontrados na presente pesquisa, assim como por Costa et al. (2014a, 2014b), fica evidente que a aplicação daquela hipótese não pode ser generalizada, porque resultados diferentes podem ocorrer para uma mesma espécie de inseto, quando avaliando diferentes espécies de plantas hospedeiras.

O presente trabalho mostrou que nem sempre uma cultivar que expressa antibiose será repelente ou deterrente para a oviposição (antixenose), e que em alguns casos não há nenhuma correlação entre estas duas categorias de resistência. Apesar das hipóteses anteriormente discutidas, não se deve totalmente descartar a possibilidade da ocorrência de antixenose para oviposição a *D. speciosa* em milho crioulo, porque existem mais cultivares a serem avaliadas, inclusive no grupo composto por 19 cultivares de onde foram selecionadas as seis cultivares usadas neste estudo. Ademais, outros fatores podem estar envolvidos na manifestação de antixenose para oviposição além dos voláteis aqui hipotetizados.

5. Referências

ANDRADE, J. A. C.; FILHO, J. B. M. Quantitative variation in the tropical maize population, ESALQ-PB1. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 2, p. 174-182, 2008.

ARAÚJO, P. M.; NASS, L. L. Caracterização e avaliação de milho crioulo. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 3, p. 589-593, 2002.

ÁVILA, C. J.; PARRA, J. R. P. Desenvolvimento de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) em diferentes hospedeiros. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 5, p. 739-743, 2002.

ÁVILA, C. J.; SANTANA, A. G. Larva-alfinete. In: VIANA, P. A. (Ed.). **Principais pragas subterrâneas do milho no Brasil**. Documentos 129. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2011. p. 21-31.

BOIÇA JÚNIOR, A. L.; SOUZA, B. H. S.; RIBEIRO, Z. A.; MORAES, R. F. O.; EDUARDO, W. I.; NOGUEIRA, L. A defesa das plantas ao ataque dos insetos. In: BUSOLI, A. C.; CASTILHO, R. C.; ANDRADE, D. J.; ROSSI, G. D.; VIANA, D. L.; FRAGA, D. F.; SOUZA, L. A. (Eds.). **Tópicos em Entomologia Agrícola – VIII**. 1. ed. Jaboticabal: Maria de Lourdes Brandel, 2015. cap. 15, p. 161-180.

BORG, A.; EKBOM, B. Characteristics of oviposition behavior of the pollen beetle, *Meligethes aeneus* on four different hosts. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 81, p. 277-284, 1996.

CARROLL, M. J.; SCHMELZ, E. A.; MEAGHER, R. L.; TEAL, P. E. A. Attraction of *Spodoptera frugiperda* larvae to volatiles from herbivore-damaged maize seedlings. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 32, n. 9, p. 1911-1924, 2006.

CENTURION, J. F.; ANDRIOLI, I.; MARQUES JÚNIOR, J.; MARCGIORI, D. G. Características de latossolos roxos desenvolvidos de rochas alcalinas e básicas de Jaboticabal, SP. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 52, n. 2, p. 226-232, 1995.

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, p. 117-124, 2011.

COSTA, E. N.; RIBEIRO, Z. A.; SARDINHA, B. H. S.; BOIÇA JÚNIOR, A. L. Oviposition preference assessment of *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) for different soybean genotypes. **International Journal of Pest Management**, London, v. 60, n. 1, p. 52-58, 2014a.

COSTA, E. N.; SOUZA, B. H. S.; BARBOSA, J. C.; BOIÇA JÚNIOR, A. L. Antibiosis resistance of soybean genotypes to *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae). **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 9, n. 14, p. 1130-1134, 2014b.

GOLAB, M. J.; SNIEGUILLA, S. Changes in reproductive behavior in adult damselfly *Calopteryx splendens* (Odonata: Calopterygidae) in response to flood. **Entomological Science**, Tóquio, v. 15, p. 280-287, 2012.

JAENIKE, J. (1978) On optimal oviposition behaviour in phytophagous insects. **Theoretical Population Biology**, New York, v. 14, n. 3, p. 350-356, 1978.

KHAN, Z. R.; MIDEGA, C. A. O.; WADHAMS, L. J.; PICKETT, J. A.; MUMUNI, A. Evaluation of Napier grass (*Pennisetum purpureum*) varieties for use as trap plants for the management of African stemborer (*Busseola fusca*) in a push-pull strategy. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 124, p. 201-211, 2007.

MARQUES, G. B. C.; ÁVILA, 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.

MELLO, M. A. R. **Qual teste estatístico devo usar?**, 2015. Disponível em <<https://marcoarmello.files.wordpress.com/2012/05/qual-teste-estatistico-marco-mellov3.jpg>> Acesso em: 23 Mar. 2016.

MILANEZ, J. M.; PARRA, J. R. P. Biologia e exigências térmicas de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) em laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 23-29, 2000.

NARDI, C.; LUVIZOTTO, R. A.; PARRA, J. R. P.; BENTO, J. M. S. Mating behavior of *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 41, n. 3, p. 562-570, 2012.

NOGUEIRA, L. **Categorias e níveis de resistência de genótipos de milho crioulo a *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2015.101 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2015

PONTES, W. J. T.; LIMA, E. R.; CUNHA, E. G.; ANDRADE, P. M. T.; LÔBO, A. P.; BARROS, R. Physical and chemical cues affect oviposition by *Neoleucinodes elegantalis*. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 35, n. 2, p. 134-139, 2010.

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

SMITH, C. M. **Plant resistance to arthropods, Molecular and Conventional Approaches**. Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2005. 423 p..

SMITH, C. M.; CLEMENT, S. L. Molecular bases of plant resistance to arthropods. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 57, p. 309-328, 2012.

STÄDLER, E. Plant chemical cues important for egg deposition by herbivorous insects. In: HILKER, M.; MEINERS, T. (Eds.). **Chemoecology of insect eggs and egg deposition**. Berlin: Blackwell, 2002. p. 171-204.

TALSMA, J. H. R.; BIERI, A.; HARVEY, J. A.; VAN NOUHUYS, S. Oviposition cues for a specialist butterfly-plant chemistry and size. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 34, n. 9, p. 1202-1212, 2008.

WENNINGER, E. J.; STELINSKI, L. L.; HALL, D. G. Roles of olfactory cues, visual cues, and mating status in orientation of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) to four different host plants. **Environmental Entomology**, College Park, v. 38, n. 1, p. 225-234, 2009.

WHITE, R. Sexual characters of species of *Diabrotica* (Chrysomelidae: Coleoptera). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 70, n. 2, p. 168-168, 1977.

CAPÍTULO 5 – Antibiose e tolerância a *Oligonychus pratensis* (Banks) (Acari: Tetranychidae) em híbridos de milho resistentes à seca

RESUMO – Anualmente, lavouras de milho da região das Altas Planícies (que compreende os estados do oeste e parte do centro-oeste dos EUA) são infestadas por *Oligonychus pratensis* (Banks) em níveis que podem causar danos econômicos. Essa pesquisa foi desenvolvida para determinar se híbridos de milho resistentes à seca expressam antibiose ou tolerância a essa praga; investigar se há correlação entre uma possível tolerância das plantas com a condutância estomática e o conteúdo de clorofilas; e analisar se marcadores moleculares relacionados com a resistência a um estresse biótico estão envolvidos com a resistência de híbridos de milho a *O. pratensis*. Experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, avaliando-se o número de ácaros em diferentes fases de seu ciclo biológico e o seu efeito em plantas de milho. O híbrido Artesian se destacou pelos menores números de colônias, ninfas, e adultos de *O. pratensis*. Além de genes que conferem resistência à seca, Artesian possui seis genes relacionados com a resistência de plantas a estresses bióticos, quais sejam: *LOX1* (lipoxigenase1), *mir2* (resistência de milho a inseto 2), *PX3* (peroxidase3), *glossy15*, *KN1* (Knotted1), e *SEE2a* (senescência melhorada 2a). Tolerância não foi observada nos materiais testados, podendo ser devido ao número de ácaros liberados por planta, ou porque os híbridos não expressam essa categoria de resistência. Provavelmente, o híbrido Artesian é beneficiado pela ação conjunta entre os seis genes relacionados com a resistência a estresses bióticos, e os genes relacionados com a resistência à seca. As informações geradas são bastante úteis também no que se refere ao manejo integrado de pragas, tendo-se em vista que foi revelado que a infestação do ácaro diverge entre os híbridos avaliados. Por isso, se táticas adicionais de controle são necessárias, estas podem ser adotadas levando-se em consideração essas diferenças.

Palavras-chave: *Zea mays* L., resistência de plantas a artrópodes, manejo integrado de pragas, ácaros, pragas agrícolas, transgênicos

CHAPTER 5 – Antibiosis and tolerance to *Oligonychus pratensis* (Banks) (Acari: Tetranychidae) in drought resistant maize hybrids

ABSTRACT – Maize crops cultivated in the High Plains (which encompasses the states of Western and part of Midwest of USA) have been annually infested by *Oligonychus pratensis* (Banks) in levels that may cause economic damages. This research was carried out to determine whether the drought resistant maize hybrids express antibiosis or tolerance to this pest; investigate if there is correlation between a possible plant tolerance with the stomatal conductance and chlorophyll content; analyze if molecular markers associated with the resistance to a biotic stress are involved with the resistance of maize hybrids to *O. pratensis*. Experiments were conducted in greenhouse, and evaluations were done on different variables concerning the number of mites in different phases of their biological cycle and its effect on maize plants. The hybrid Artesian stood out for the lower number of colonies, nymphs, and adults of *O. pratensis*. Besides the genes that confer drought resistance, Artesian possesses six genes linked with the plant resistance to biotic factors, which are: *LOX1* (lipoxygenase1), *mir2* (maize insect resistance 2), *PX3* (peroxidase3), *glossy15*, *KN1* (Knotted1), and *SEE2a* (senescence enhanced 2a). Tolerance was not observed in the tested hybrids, and it may be due to the number of mites released per plant, or because the hybrids do not express this resistance category. Perhaps the hybrid Artesian is benefited by the joint action between the six genes aforementioned that are associated with the resistance to a biotic stress, and the genes related with the drought resistance. The information generated are also very useful with regards to the integrated pest management, considering it was revealed that the infestation of mites diverges between the hybrids assessed. Therefore, if additional control tactics are needed, they can be adopted taking into account these differences.

Keywords: *Zea mays* L., plant resistance to arthropods, integrated pest management, mites, agricultural pest, transgenic

1. Introdução

Oligonychus pratensis (Banks) (Acari: Tetranychidae) é uma praga nativa dos Estados Unidos da América (STICKNEY; BARNES; SIMMONS, 1950), e apresenta uma ampla distribuição neste País (JEPPSON; KEIFER; BAKER, 1975). Esse ácaro é encontrado provocando danos em algumas gramíneas, como milho (*Zea mays* L.), sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], e trigo (*Triticum aestivum* L.), em diversas partes dos continentes Americano e Africano (PEAIRS, 2014a).

Indivíduos de *O. pratensis* produzem uma grande quantidade de teia, com a finalidade de proteger suas colônias de ameaças, como os predadores (GANJISAFFAR; PERRING, 2015). Essas colônias são constituídas por ovos, larvas, ninfas e adultos, e são encontradas comumente na região abaxial das folhas, eventualmente matando-a e deixando-a com uma aparência chamuscada ou queimada (PEAIRS, 2014b).

As lavouras de milho das Altas Planícies (composta pelos estados do oeste e parte do centro-oeste dos EUA), são anualmente sujeitas a infestações de *O. pratensis* que podem causar danos econômicos (BYNUM et al., 2015). Archer e Bynum (1990) relataram uma perda de produtividade de 0,2% para cada 1% de folha de milho infestada com esse herbívoro entre o final do período vegetativo até o penúltimo estágio reprodutivo, R5 (grão farináceo-duro). Peairs (2014b) afirmou que no estado do Colorado, EUA, as perdas na produção de milho devido à alimentação desse ácaro podem chegar a 40%, quando o material é destinado para silagem (massa seca).

O controle de *O. pratensis* é feito principalmente com o uso de acaricidas químicos. Entretanto, essa prática vem selecionando indivíduos resistentes a diversos ingredientes ativos, como bifentrina, dimetoato e amitraz (BYNUM; ARCHER, 2002), e os níveis de resistência dependem de fatores como localidade e ano de cultivo (PEAIRS, 2014b).

Desse modo, a resistência de plantas a artrópodes pode exercer um papel fundamental no manejo de ácaros-praga. Stout (2013) propôs que a resistência é manifestada devido a algumas características da planta, que reduzem a extensão da injúria (ex.: remoção de fotossintatos) causada numa planta por um herbívoro, e essas

características podem apresentar natureza química, morfológica ou física (BOIÇA JÚNIOR et al., 2015). Dentre as categorias de resistência, a antibiose se caracteriza pela expressão de efeitos negativos na sobrevivência, desenvolvimento, e/ou fecundidade do artrópode (SMITH, 2005). A tolerância, uma outra categoria de resistência, abrange as características da planta ou processos fisiológicos que diminuem a quantidade de dano (perda de produtividade) resultante por unidade de injúria (STOUT, 2013).

A resistência genética da planta a ácaros-praga pode ser uma ferramenta viável para o manejo integrado de pragas (BYNUM; XU; ARCHER, 2004a). A disponibilidade comercial de híbridos resistentes a estes ácaros seria muito útil em um sistema de manejo integrado. Cruzamentos têm sido realizados com germoplasma de milho com o objetivo de incorporar genes que conferem resistência a ácaros em germoplasmas com resistência a *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) e tolerância a estresse hídrico (BYNUM; XU; ARCHER, 2004b).

Nos últimos anos tem se observado que alguns híbridos de milho resistentes à seca também apresentam resistência contra ácaros-praga (BYNUM, 2012). Resistência à seca é classificada como uma característica quantitativa, sendo bastante influenciada pelo ambiente e na maioria dos casos controlada por um grande número de genes. Alguns dos fatores ambientais que podem afetar a resistência à seca incluem o momento e o tempo do estresse hídrico, o tipo de solo, a temperatura, e a umidade (LATHROP; NAMUTH, 2011). Todos esses fatores influenciam características como a profundidade que as raízes alcançam no solo, e o controle estomático na epiderme das folhas, processos que podem ser diferencialmente afetados pelos genes relacionados com a resistência à seca. Raízes maiores permitem a captação de água em profundidades não comumente alcançadas, e os estômatos quando abertos permitem a entrada de dióxido de carbono para a posterior produção de açúcares para o crescimento da planta, aumentando a transpiração e produção de proteínas (LATHROP; NAMUTH, 2011).

Assim, a presente pesquisa teve por objetivo (1) avaliar se os diferentes híbridos de milho resistentes à seca expressam antibiose e/ou tolerância ao ácaro *O. pratensis*; (2) investigar se há correlação entre uma possível tolerância das plantas com a condutância estomática e o conteúdo de clorofilas; (3) analisar se marcadores

moleculares relacionados com a resistência a um estresse biótico amplificariam diferencialmente o DNA de híbridos de milho selecionados de acordo com os níveis de resistência ao ácaro, e se seria visualizado polimorfismos nos padrões de banda do DNA quando examinados em gel de agarose.

2. Material e Métodos

2.1. Informações gerais

Os experimentos de antibiose e tolerância a *O. pratensis* em híbridos de milho resistentes à seca foram conduzidos na “Southeast Research-Extension Center”, da “Kansas State University”, Garden City, estado de Kansas, EUA.

Os estudos foram realizados em casa de vegetação com temperatura controlada, com média de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os híbridos de milho resistentes à seca utilizados nessa pesquisa foram escolhidos por serem um dos mais plantados na região do Cinturão do Milho dos EUA, a saber: (1) o transgênico Droughtgard® da companhia Monsanto, que expressa o gene que codifica a proteína B de choque frio, da bactéria *Bacillus subtilis* (Cohn, 1872), que age como uma chaperona (proteína protetora) para outras proteínas mais sensíveis como RNA (CASTIGLIONI et al., 2008; HARRIGAN et al., 2009), e sua respectiva isolinha; e dois híbridos que utilizam genes nativos e seleção assistida por marcadores (MAS), quais sejam (2) Artesian® e sua isolinha, pertencentes à companhia Syngenta; e (3) Aquamax® e sua isolinha, da companhia Pioneer.

As sementes de milho dos híbridos acima mencionados foram semeados em vasos plásticos de 3,79 litros (1 galão), os quais foram preenchidos com solo (solo franco silte-arenoso= solo textura média) (NORMAN; CAMPBELL, 2013) e com o substrato de cultivo Pro-Mix®, numa proporção 2:1. Cada vaso plástico foi colocado sobre um prato plástico, com a finalidade de reter a água da irrigação. Os tratamentos foram colocados sobre uma bancada de 183,0 cm comprimento × 90,0 cm largura, e as plantas foram irrigadas de acordo com o planejamento estabelecido para cada ensaio.

As plantas de milho foram infestadas com 25 ninfas de *O. pratensis* no estágio vegetativo V2, caracterizado pela presença de duas lâminas foliares totalmente expandidas (RITCHIE; HANWAY; BENSON, 1993). A partir de então, os ácaros tiveram 14 dias para se alimentar e se reproduzir nos diferentes híbridos de milho.

2.2. Criação do ácaro *Oligonychus pratensis*

Para a criação de *O. pratensis* os indivíduos foram confinados em gaiolas de 75,0 cm de comprimento × 115,0 cm de altura × 75,0 cm de largura (malha fina= 160 micrômetros), oferecendo-se plantas de milho orgânico para a alimentação e reprodução dos ácaros. Para a implantação dessa criação, ácaros foram inicialmente coletados em lavoura de milho, em Finney County, KS. As plantas usadas para criação de *O. pratensis* foram irrigadas cuidadosamente, para não faltar água e também não encharcar os vasos plásticos, com a finalidade de se evitar uma possível epizootia na população de ácaros como consequência do ataque de algum fungo potencialmente inimigo natural.

Dois ensaios foram realizados para avaliar a antibiose em híbridos de milho a *O. pratensis*, sendo que em um deles também foi possível de se avaliar a tolerância, em duas metodologias distintas que são descritas a seguir.

2.3. Desenvolvimento e sobrevivência de *Oligonychus pratensis* em folhas confinadas de híbridos de milho resistentes à seca

Esse ensaio foi realizado na estação de inverno, no ano de 2015. Os híbridos utilizados foram Droughtgard e Artesian, e suas respectivas isolinhas. Em cada vaso plástico foram cultivadas duas plantas de milho de um mesmo híbrido, sendo uma planta denominada testemunha, sem infestação de ácaros. A planta de milho vizinha à testemunha teve a sua primeira lâmina foliar aprisionada em gaiolas de 0,95 cm de largura × 10 cm de diâmetro, as quais eram revestidas por malha fina de 160 micrômetros para evitar a fuga dos ácaros. Uma gaiola era formada por dois compartimentos iguais, como descrito acima, que eram fechados usando cliques de metal. No interior das gaiolas, foi aberto um frasco de vidro que continha 25 ninfas de

O. pratensis, para que estas realizassem o processo de colonização da folha inserida na gaiola. Após a infestação, as plantas foram cobertas por gaiolas de malha fina de 90 cm de altura × 30 cm de largura, a fim de se evitar a entrada de algum herbívoro ou inimigo natural que poderia comprometer os resultados da pesquisa.

Os tratamentos foram divididos em “plantas sob estresse hídrico” e “plantas bem irrigadas”. Em geral, as plantas submetidas ao estresse hídrico foram irrigadas diariamente com 50 mL de água, e apresentaram folhas enroladas durante o ensaio, o que caracteriza esse tipo de estresse. De forma contrária, as plantas bem irrigadas foram submetidas a um regime diário de irrigação de 200 mL, e não apresentaram folhas enroladas no decorrer do ensaio.

Ao término dos ensaios, avaliou-se o número de ovos, larvas, ninfas e adultos de *O. pratensis*, com auxílio de um microscópio estereoscópio (Modelo OM2300S-GX4, OMANO, Virgínia, EUA). A tolerância não pode ser avaliada, porque por ocasião da fuga dos ácaros algumas plantas testemunhas foram colonizadas. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com oito tratamentos e sete repetições.

2.4. Efeitos da infestação de *Oligonychus pratensis* em plantas de híbridos de milho resistentes à seca

Esse ensaio foi realizado na estação de verão, no ano de 2015. Os híbridos utilizados foram Droughtgard, Artesian, e Aquamax, e suas respectivas isolinhas. As plantas testemunhas foram cultivadas em vasos plásticos separados daqueles destinados às plantas infestadas pelos ácaros. Logo após a emergência das plantas, gaiolas de formato triangular foram utilizadas para cobrir as plantas. Essas gaiolas foram constituídas por dois lados de malha fina (160 micrômetros) × um lado de vinil, com 90 cm de altura × 30 cm de largura cada lado, possuindo na região mediana da parte vinil uma abertura de 20 cm de comprimento para permitir fácil visualização e manuseio, e com Velcro® para possibilitar a abertura e o fechamento da gaiola. A região inferior das gaiolas foi fechada com auxílio de barbante.

Vinte e cinco ninfas de *O. pratensis* foram liberadas nas plantas de milho no estágio vegetativo V2, abrindo-se cuidadosamente os frascos de vidro nos quais as

ninfas estavam abrigadas, e escorando-os no caule das plantas, permitindo assim que as ninfas saíssem dos frascos e iniciassem o processo de colonização das plantas.

Nesse experimento, as plantas foram bem irrigadas, observando-se seu desenvolvimento através da fácil visualização das plantas pelo lado vinil (transparente) da gaiola.

Depois do encerramento desse ensaio, avaliou-se o número de ovos, larvas, ninfas e adultos do ácaro, usando um microscópio estereoscópio. Avaliou-se também alguns parâmetros das plantas testemunhas e das plantas infestadas com *O. pratensis*, como número total de folhas, número de folhas mortas, peso seco (g), e estágio vegetativo. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos e seis repetições.

2.5. Condutância estomática e conteúdo de clorofila em folhas de híbridos de milho resistentes à seca

A condutância estomática foi avaliada usando um porômetro foliar portátil (Modelo SC-1, Decagon, Pullman, WA), nos períodos de 9:00 às 12:00 horas, e 14:00 às 16:00 horas, tempo médio necessário para que todas as repetições fossem avaliadas. Duas avaliações foram realizadas, sendo a primeira um dia antes do início do experimento, e a segunda um dia antes da finalização do experimento. A folha bandeira foi adotada para as leituras com finalidade de padronização.

Para as avaliações de clorofila, realizadas antes do término do experimento, utilizou-se um medidor de clorofila portátil, sendo a leitura executada no período das 9:00 às 11:00 horas, adotando-se a folha bandeira como unidade amostral.

2.6. Marcadores moleculares associados à resistência de plantas a artrópodes

Essa análise foi conduzida no Laboratório de Resistência de Plantas a Artrópodes, do Departamento de Entomologia da “Kansas State University”, Manhattan, estado de Kansas, EUA.

Essa análise teve como objetivo determinar se marcadores moleculares relacionados à resistência a um estresse biótico amplificariam diferencialmente o DNA

das isolinhas dos híbridos Artesian e Droughtgard, e se seria visualizado polimorfismos nos padrões de banda do DNA dos dois híbridos quando examinados em gel de agarose. Os materiais transgênicos Artesian e Droughtgard se destacaram por apresentar características de resistência e suscetibilidade, respectivamente, ao ataque do ácaro *O. pratensis*, e divergem das isolinhas devido à presença de genes envolvidos na expressão de resistência à seca (LATHROP; NAMUTH, 2011).

Uma planta de milho de cada híbrido foi cultivada em casa de vegetação, e quando no estágio V4 sua folha bandeira foi cortada, lavada com água destilada, seca com papel toalha, e coberta por papel alumínio para ser posteriormente seca em estufa a 35 ± 1 °C por um período de cinco dias. Cada amostra foi moída usando um moinho de bola.

A técnica adotada para isolar o DNA das plantas foi CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) (USDA, 2015). Os genes e respectivos marcadores microssatélites (SSR) escolhidos para serem investigados nessa pesquisa, devido sua relação com a resistência de plantas a fatores bióticos foram: *glossy15* (p-nc134F; p-nc134R) e (p-umc1688F; p-umc1688R); *Bx7*, síntese de benzoxazinona 7 (CM37F; CM37R) e (T232F; T232R); *mir 2*, resistência de milho a inseto 2 (umc1178F; umc1178R); *LOX1*, lipoxigenase1 (p-umc1539F; p-umc1539R); *LOX2*, lipoxigenase2 (p-umc1311F; p-umc1311R); *LOX3*, lipoxigenase3 (p-umc1082F; p-umc1082R) e (p-umc1431F; p-umc1431R); *PX3*, peroxidase3 (p-umc1412F; p-umc1412R) e (p-umc2333F; p-umc2333R); *PR1*, flavonóide 3'- hidrolase (p-umc1155F; p-umc1155R); *PEP1*, fosfoenolpiruvato carboxilase (p-umc2337F; p-umc2337R) e (p-umc1599F; p-umc1599R); *PAL2*, fenilalanina amônia liase (p-phi109642F; p-phi109642R); *SEE2a*, senescência melhorada 2a (p-umc1340F; p-umc1340R); *SEE2b*, senescência melhorada 2b (p-bnlg1496F; p-bnlg1496R) e (p-umc1641F; p-umc1641R); e *KN1*, Knotted1 (p-umc2189F; p-umc2189R) e (p-umc2149F; p-umc2149R) (LAWRENCE et al., 2008).

Foi realizada uma PCR (reação em cadeia da polimerase) em um volume de reação de 25-μL em um termociclador (Modelo MJ 100, MJ Research, Waltham, MA). Os produtos de amplificação passaram pelo processo de eletroforese a 80 V por 45 min em gel agarose a 2%. Os procedimentos gerais adotados estão descritos numa base de dados específica para genômica de *Z. mays* (LAWRENCE et al., 2008).

2.7. Análise estatística

Os dados foram submetidos aos testes de normalidade de resíduos (Cramér-von Mises) e homogeneidade de variância (Levene). Se os dados não foram normais, os mesmos foram transformados segundo o lambda mais conveniente conforme indicado pelo teste Box-Cox no software SAS 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, 2003). Com os dados normais e homocedásticos, realizou-se a análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) (SAS Institute Inc., Cary, NC, 2003). Dados referentes a número de folhas mortas, condutância estomática e clorofila, foram analisados num esquema fatorial 6×2 , analisando-se os efeitos principais dos híbridos (H), da infestação (I), e da interação entre $H \times I$. Dados que não se adequaram aos pressupostos estatísticos, foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$).

3. Resultados

3.1. Desenvolvimento e sobrevivência de *Oligonychus pratensis* em folhas confinadas de híbridos de milho resistentes à seca

Não houve diferenças significativas no número total de ácaros encontrados nas folhas envolvidas por gaiola ($F = 1,23$; gl = 3, 52; $P = 0,3078$) (dados não apresentados), com uma variação de 8,00 a 16,64 ácaros. Em contrapartida, os híbridos de milho divergiram ($H = 39,75$; gl = 3, 52; $P < 0,0001$) quanto ao número de colônias de *O. pratensis* presentes nas plantas, resultado da fuga dos ácaros que foram inicialmente liberados nas gaiolas (Tabela 1). Contrastes foram notados, como a não presença de colônias no híbrido Artesian, não diferindo de sua respectiva isolinha. Diferentemente, os maiores números de colônias foram observados no híbrido Droughtgard e sua isolinha.

Tabela 1. Número de colônias de *Oligonychus pratensis* (média $\pm$ erro padrão) por planta de híbridos de milho resistentes à seca, em ensaio com folha envolvida por gaiola

Híbrido	Número de colônias
Artesian	0,00 $\pm$ 0,00 b
Antesian Isolinha	0,14 $\pm$ 0,10 b
Droughtgard	1,50 $\pm$ 0,14 a
Droughtgard Isolinha	1,21 $\pm$ 0,19 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade

3.2. Efeitos da infestação de *Oligonychus pratensis* em plantas de híbridos de milho resistentes à seca

Diferenças não foram observadas para número de ovos ($F = 1,11$; gl = 5, 30; $P = 0,3773$) e larvas ($H = 3,80$; gl = 5, 30; $P = 0,5780$) de *O. pratensis* em plantas dos híbridos de milho (Tabela 2). Contudo, os híbridos divergiram no que diz respeito ao número de ninfas ($F = 3,91$; gl = 5, 30; $P = 0,0076$) e adultos ($F = 3,30$; gl = 5, 30; $P = 0,0172$) que colonizaram as plantas. O híbrido Artesian apresentou um número de ninfas 18 vezes inferior do que aquele observado em Droughtgard, não diferindo dos outros híbridos. Artesian também obteve destaque pelo número de adultos de *O. pratensis* 29 vezes menor do que Droughtgard, e 42 vezes menor do que a isolinha de Droughtgard (Tabela 2).

Tabela 2. Número de *Oligonychus pratensis* (média $\pm$ erro padrão) em diferentes fases do ciclo biológico em híbridos de milho resistentes à seca, em ensaio com plantas inteiras

Híbrido	Ovos [†]	Larvas [‡]	Ninfas [†]	Adultos [†]
Droughtgard	309,67 $\pm$ 125,25 a	14,50 $\pm$ 5,45 a	52,67 $\pm$ 19,17 a	14,67 $\pm$ 5,28 a
Artesian	26,17 $\pm$ 21,93 a	11,67 $\pm$ 8,72 a	2,83 $\pm$ 1,38 b	0,50 $\pm$ 0,34 b
Aquamax	119,33 $\pm$ 54,64 a	5,50 $\pm$ 2,50 a	10,83 $\pm$ 5,67 ab	5,17 $\pm$ 2,71 ab
Droughtgard Isolinha	398,17 $\pm$ 197,24 a	22,50 $\pm$ 11,92 a	28,17 $\pm$ 7,84 ab	21,17 $\pm$ 10,23 a
Artesian Isolinha	87,50 $\pm$ 55,52 a	15,00 $\pm$ 7,37 a	18,00 $\pm$ 11,36 ab	4,17 $\pm$ 2,86 ab
Aquamax Isolinha	213,00 $\pm$ 50,50 a	12,50 $\pm$ 5,18 a	20,00 $\pm$ 6,69 ab	12,67 $\pm$ 5,23 ab

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey[†] ou Kruskal-Wallis[‡] a 5% de probabilidade

Os híbridos não diferiram quando foi analisada a soma do número de larvas, ninfas e adultos ($F = 2,51$; gl = 5, 30; $P = 0,0515$), com uma variação de 15,00 a 81,83 (dados não apresentados), possivelmente devido a entrada dos dados relacionados ao número de larvas, que isoladamente não tiveram diferenças.

Os híbridos de milho não parecem expressar tolerância, ao menos ao liberar 25 ninfas de *O. pratensis* por planta de milho no estágio vegetativo V2, numa infestação com duração de 14 dias (estádio vegetativo V4). Não houve porcentagem de redução no número de folhas ($F = 2,42$; gl = 5, 30; $P = 0,0585$), que apresentou variação de 0,00 a 11,90%, peso seco da parte aérea ($F = 1,71$; gl = 5, 30; $P = 0,1632$), com reduções de 0,69 a 22,08%, e no estágio de crescimento ($H = 4,14$; gl = 5, 30; $P = 0,5289$), com amplitude de 2,69 a 16,67% (dados não apresentados).

Na análise fatorial sobre a quantidade de folhas mortas por planta, observou-se diferenças significativas somente para o fator híbrido (H) (Tabela 3). Considerando os híbridos de uma forma global (com e sem infestação), Artesian, Artesian Isolinha, e Aquamax possuíram as menores porcentagens de folhas mortas, diferindo de Droughtgard e Droughtgard Isolinha (Tabela 4). Esses mesmos híbridos não diferiram no que se refere ao número total de folhas ($H = 9,31$; gl = 5, 66; $P = 0,0973$) de plantas não infestadas (Tabela 4).

Tabela 3. Dados estatísticos de um delineamento fatorial sobre o número de folhas mortas de híbridos de milho resistentes à seca com ou sem infestação de *Oligonychus pratensis* (ensaio com plantas inteiras)

Tratamento	<i>F</i>	Gl	<i>P</i>
Híbrido (H)	9,30	5, 60	< 0,0001
Infestação (I)	0,31	1, 60	0,5811
H × I	0,92	5, 60	0,4761

Tabela 4. Número total de folhas e folhas mortas (média $\pm$ erro padrão) de híbridos de milho resistentes à seca não considerando a infestação (dados de plantas infestadas e não infestadas foram somados – ensaio com plantas inteiras)

Híbrido	Número total de folhas	Folhas mortas (%)
Droughtgard	6,67 $\pm$ 0,31 a	25,30 $\pm$ 2,11 a
Artesian	7,42 $\pm$ 0,29 a	8,00 $\pm$ 2,08 bc
Aquamax	7,00 $\pm$ 0,12 a	6,15 $\pm$ 2,82 c
Droughtgard Isolinha	7,25 $\pm$ 0,18 a	19,63 $\pm$ 2,62 ab
Artesian Isolinha	6,92 $\pm$ 0,19 a	7,05 $\pm$ 2,64 c
Aquamax Isolinha	6,50 $\pm$ 0,23 a	13,74 $\pm$ 2,81 abc

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

3.3. Condutância estomática e conteúdo de clorofila em folhas de híbridos de milho resistentes à seca

Os híbridos de milho não apresentaram diferenças significativas em relação a condutância estomática, seja antes de infestar as plantas de milho com *O. pratensis* [Híbrido ($F = 0,99$; gl = 5, 58; $P = 0,4304$), Infestação ($F = 0,03$; gl = 1, 58; $P = 0,8671$), Híbrido $\times$ Infestação ($F = 0,68$; gl = 5, 58; $P = 0,4304$)], assim como antes de finalizar o experimento [Híbrido ($F = 1,94$; gl = 5, 60; $P = 0,1015$), Infestação ($F = 0,03$; gl = 1, 60; $P = 0,8610$), Híbrido $\times$ Infestação ($F = 0,84$; gl = 5, 60; $P = 0,5265$)] (dados não apresentados).

Os híbridos também apresentaram conteúdos iguais de clorofila uma dia antes finalizar o ensaio [Híbrido ($F = 2,30$; gl = 5, 58; $P = 0,0568$); Infestação ($F = 1,60$; gl = 1, 58; $P = 0,2112$); Híbrido $\times$ Infestação ($F = 0,70$; gl = 5, 58; $P = 0,6232$)] (dados não apresentados).

3.4. Marcadores moleculares associados à resistência de plantas a artrópodes

Ao analisar os padrões de banda das isolinhas de Artesian e Droughtgard, identificou-se seis genes presentes na isolinha de Artesian; entretanto, nenhum gene investigado foi detectado na isolinha de Droughtgard. Os genes presentes no DNA da isolinha de Artesian foram: *LOX1* (lipoxigenase1), *Mir2* (resistência de milho a inseto

2), *PX3* (peroxidase3), *glossy15*, *KN1* (Knotted1), e *SEE2a* (senescência melhorada 2a).

4. Discussão

Dois ensaios foram realizados com o objetivo de se avaliar antibiose a *O. pratensis* em híbridos de milho resistentes à seca, sendo avaliada também a tolerância no segundo ensaio. No primeiro ensaio, os ácaros se alimentaram e se reproduziram, inicialmente, na primeira lâmina foliar, a qual foi confinada numa gaiola. Entretanto, as gaiolas não foram eficientes no que diz respeito ao confinamento dos ácaros, e estes fugiram e foram encontrados em outras folhas da planta, anotando-se assim o número de colônias por planta. Acreditava-se que os ácaros tinham escapado em diversos tratamentos de forma aleatória; porém, na verdade 95% das colônias foram encontradas no híbrido Droughtgard e sua isolinha, e uma porcentagem muito pequena foi encontrada em Artesian e sua isolinha, provavelmente devido à resistência que esse híbrido expressa, e que foi confirmado no experimento subsequente. Esse ensaio foi realizado em plantas bem irrigadas e plantas com estresse hídrico, mas esse fator ambiental não influenciou na resistência das plantas ao ácaro.

No segundo ensaio, os ácaros foram liberados com o auxílio de um pequeno frasco de vidro escorado na região basal da haste da planta, para que dessa forma pudessem posteriormente colonizar a planta. Observou-se que essa metodologia é a mais adequada para a execução de experimentos que visam explorar a interação ácaro-planta, porque os ácaros não fogem da unidade amostral, a planta, e possuem mais espaço para a alimentação e reprodução.

O híbrido Artesian se destacou nos dois ensaios realizados devido ao baixo número de ácaros encontrados, divergindo do híbrido Droughtgard em todas as variáveis em que houve diferenças significativas, quais sejam os números de colônias, ninfas, e adultos de *O. pratensis*. O híbrido Artesian também diferiu da isolinha do híbrido Droughtgard, nas variáveis número de colônias e número de adultos. A isolinha de Artesian diferiu de Droughtgard e sua respectiva isolinha apenas no primeiro ensaio, ao considerar o número de colônias por planta.

O cultivo de milho resistente à seca é uma prática muito recente nos EUA (TOLLEFSON, 2011). Assim, até o momento, o presente trabalho é o primeiro a avaliar os efeitos da interação ácaro-praga versus híbridos de milho resistentes à seca. Não diferentemente, o número de trabalhos avaliando a resistência ou tolerância em genótipos de milho a *O. pratensis* é muito escasso. Stiefel e Margolies (1992) avaliaram a razão sexual de *O. pratensis* sob diferentes condições, entre estas, plantas de milho e sorgo. Não houve diferenças em relação à proporção sexual de descendentes de fêmeas criadas em milho híbrido Pioneer 3377, ou uma linhagem resistente (SC-599-6) de sorgo, ou uma variedade suscetível (Wheatland) de sorgo.

Como a diferença entre os híbridos transgênicos e suas respectivas isolinhas é a presença de genes relacionados com a resistência à seca (LATHROP; NAMUTH, 2011), as isolinhas dos híbridos Artesian e Droughtgard foram escolhidas para se determinar se marcadores moleculares relacionados com a resistência a um estresse biótico amplificariam seu DNA, e se seria visualizado polimorfismos nos padrões de banda do DNA dos dois híbridos quando examinados em gel agarose. Identificou-se a presença dos genes *LOX1* (lipoxigenase1), *mir2* (resistência de milho a inseto 2), *PX3* (peroxidase3), *glossy15*, *KN1* (Knotted1), e *SEE2a* (senescência melhorada 2a) nas bandas relacionadas à isolinha do híbrido Artesian. A função de cada gene e sua relação com a resistência de plantas a artrópodes são discutidas a seguir.

As lipoxigenases (LOX) são um grupo de enzimas antioxidantes envolvidas na defesa da planta contra muitos tipos de estresse (BRUINSMA et al., 2009). Um dos aspectos mais importantes das LOX na defesa das plantas é a oxidação do ácido linolênico na via de sinalização do ácido jasmônico (JA), o qual desenvolve um papel muito importante na ativação da defesa da planta, tanto diretamente pela produção de enzimas oxidantes e inibidores de protease (MAO et al., 2007), como indiretamente através da produção de compostos orgânicos voláteis (VOC) que atraem os inimigos naturais de insetos-praga (BRUINSMA et al., 2009). Hildebrand et al. (1986) mostraram uma relação entre LOX e resistência a ácaros, com a atividade de LOX em soja [*Glycine max* (L.) Merrill] aumentando de acordo com que se elevava os níveis de infestação de outro ácaro tetraniquídeo, *Tetranychus urticae* Koch.

A família do gene *mir* foi previamente associada com a resistência de plantas através do uso de análise proteômica. Essa família consiste de ao menos cinco

homólogos, três dos quais são agrupados no cromossomo 6 em uma região que confere resistência a insetos (JIANG et al., 1995). Classificados como cisteína proteases, esses genes foram diferencialmente expressos em tecido foliar de milho exposto à alimentação de artrópodes, como *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), onde a maior expressão foi associada com os mais altos níveis de resistência (PECHAN et al., 2000). Pechan et al. (2002) relataram que a linhagem de milho Mp708, resistente a alimentação de algumas espécies de lepidópteros, produz uma cisteína protease de 33-kDa em resposta à alimentação desses herbívoros. A acumulação dessa cisteína protease em folhas de milho foi correlacionada com uma significativa redução no crescimento das lagartas que resultou da ineficiente utilização de nutrientes, devido a severa injúria provocada na matriz peritrófica de lagartas que se alimentaram de plantas de milho resistente.

As enzimas peroxidases (POD) regulam diversos processos que têm efeitos diretos ou indiretos na defesa da planta, incluindo lignificação, suberização, metabolismo da auxina, e a cicatrização de feridas (HENG-MOSS et al., 2004; SETHI et al., 2009; HE et al., 2011). A associação entre radicais oxidativos produzidos pelas POD com os fenóis causa deterrência alimentar em insetos e/ou produzem toxinas que reduzem a digestibilidade da planta, e por conseguinte resulta na deficiência nutricional de insetos com efeitos severos em seu crescimento e desenvolvimento (ZHANG; HAU; ZHANG, 2008; CHEN; NI; BUNTIN, 2009). Hildebrand et al. (1986) observaram um aumento na atividade de POD em plantas de soja de acordo com o aumento do número de ácaros da espécie *T. urticae*.

O gene *Glossy15* (*Gl15*) codifica um suposto fator de transcrição que promove a expressão de características epidérmicas de folha juvenil, como a presença de ceras, e reprime a diferenciação precoce de células da epiderme de folhas adultas, como o surgimento de tricomas proeminentes (MOOSE; SISCO, 1996). A transição prematura de folhas de milho do estágio juvenil ao estágio adulto reduziu as taxas de sobrevivência e crescimento dos artrópodes *S. frugiperda* e *Diatraea grandiosella* Dyar (Lepidoptera: Crambidae) (WILLIANS et al., 1998). Na presente pesquisa, como o gene *Gl15* foi encontrado somente na isolinha do híbrido Artesian, não foi possível comparar o tamanho desse gene, em pares de base, com a isolinha do híbrido Droughtgard, com a finalidade de verificar se teria ocorrido uma possível mutação no

gene *G15* de Artesian, o que poderia inibir o funcionamento normal desse gene, e consequentemente influenciar na resistência do híbrido Artesian a *O. pratensis*.

Em meristemas de plantas de milho, é comum a expressão do gene *Knotted1* (*Kn1*), o qual é importante para a manutenção do estado meristemático das células (HAKE, 1992; KERSTETTER et al., 1997). Esse gene possui também a função de inibir a senescência prematura das folhas após injúria (LUO et al., 2006). De forma semelhante, o gene *SEE2a* (*senescence enhanced 2a*) está relacionado com o retardamento da senescência de folhas de milho (ROBSON et al., 2004). Por conseguinte, a presença desses genes pode contribuir com a resistência e tolerância de plantas a artrópodes, devido à não ocorrência de senescência prematura, e à emissão de novos tecidos, após herbivoria. Isso está de acordo com o que foi observado na presente pesquisa, porque o híbrido Artesian e sua isolinha tiveram os menores números de folhas mortas, provavelmente influenciados pelos genes mencionados.

Os seis genes relacionados com a resistência de plantas a artrópodes descritos acima, parecem atuar em conjunto com os genes relacionados com a resistência à seca, porque o híbrido Artesian expressou antibiose, não ocorrendo o mesmo em sua isolinha, que não possui genes de resistência à seca. Assim, os seis genes relacionados com estresses bióticos identificados nessa pesquisa parecem contribuir com a resistência de plantas denominada poligênica ou horizontal, que é expressa por diferentes genes e determina diferentes características que em conjunto tornam uma planta resistente ao ataque de um artrópode (SMITH, 2005).

Os híbridos de milho não manifestaram tolerância a *O. pratensis*, talvez porque uma infestação com 25 ninfas não foi suficiente para causar danos nas plantas. Entretanto, diferenças não foram encontradas no que diz respeito ao conteúdo de clorofila e a condutância estomática de folhas de milho, que poderiam favorecer a tolerância, devido melhora na eficiência fotossintética (BAKER, 2008; XU; ZHOU, 2008). Todavia, um número maior de ácaros por planta pode ser testado no futuro (> 25 ninfas), a fim de se investigar se os híbridos Pioneer e Droughtgard expressam tolerância nessas condições, uma vez que eles foram suscetíveis no teste de antibiose a *O. pratensis*, apresentando nenhum efeito no desenvolvimento ou sobrevivência da praga, requisito necessário para classificar uma planta como tolerante (SMITH, 2005).

As informações geradas nessa pesquisa são bastante úteis no que se refere ao manejo integrado de pragas, tendo em vista que a infestação do ácaro diverge entre os híbridos avaliados. Por isso, se táticas adicionais de controle são necessárias, estas podem ser adotadas levando-se em conta essas diferenças. Um importante passo a se alcançar no futuro é uma melhor compreensão dos mecanismos resultantes da interação dos diferentes genes que tornam o híbrido Artesian resistente à referida praga. Além disso, testes com os híbridos em diferentes condições ambientais são necessários para se verificar a eficiência dos materiais de uma forma geral.

5. Referências

ARCHER, T. L.; BYNUM JR., E. D. Economic injury level for the Banks grass mite (Acari: Tetranychidae) on corn. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 83, n. 3, p. 1069-1073, 1990.

BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 89-113, 2008.

BOIÇA JÚNIOR, A. L.; SOUZA, B. H. S.; RIBEIRO, Z. A.; MORAES, R. F. O.; EDUARDO, W. I.; NOGUEIRA, L. A defesa das plantas ao ataque dos insetos. In: BUSOLI, A. C.; CASTILHO, R. C.; ANDRADE, D. J.; ROSSI, G. D.; VIANA, D. L.; FRAGA, D. F.; SOUZA, L. A. (Eds.). **Tópicos em Entomologia Agrícola – VIII**. 1. ed. Jaboticabal: Maria de Lourdes Brandel, 2015. cap. 15, p. 161-180.

BRUINSMA, M.; POSTHUMUS, M. A.; MUMM, R.; MUELLER, M. J.; VAN LOON, J. J. A.; DICKE, M. Jasmonic acid-induced volatiles of *Brassica oleracea* attract parasitoids: effects of time and dose, and comparison with induction by herbivores. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 9, p. 2575-2587, 2009.

BYNUM, E. D. Spider mite damage to drought resistant corn affected by irrigation levels. **The Vindicator**, Texas, 31 ago. 2012. Disponível em: <http://www.thevindicator.com/news/article_90296d62-f386-11e1-b48b001a4bcf887a.html>. Acesso em: 03 mai. 2012.

BYNUM, E. D.; ARCHER, T. L. Susceptibility of populations of Banks grass mites (Acari: Tetranychidae) suspected of developing bifenthrin resistance from three maize fields. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 27, p. 303-312, 2002.

BYNUM, E. D.; MICHELS, J. J.; MACDONALD, J. C.; BIBLE, J. B. Impact of Banks Grass Mite damage to yield and quality of maize silage. **Southwestern Entomologist**, Weslaco, v. 40, n. 2, p. 251-262, 2015.

BYNUM, E. D.; XU, W.; ARCHER, T. L. Diallel analysis of spider mite resistant maize inbred lines and F₁ crosses. **Crop Science**, Madison, v. 44, n. 5, p. 1535-1541, 2004a.

BYNUM, E. D.; XU, W.; ARCHER, T. L. Potential efficacy of spider mite-resistant genes in maize testcrosses. **Crop Protection**, Guildford, v. 23, n. 7, p. 625-634, 2004b.

CASTIGLIONI, P.; WARNER, D.; BENSON, R. J.; ANSTROM, D. C.; HARRISON, J.; STOECKER, M.; ABAD, M.; KUMAR, G.; SALVADOR, S.; D'ORDINE, R.; NAVARRO, S.; BACK, S.; FERNANDES, M.; TARGOLLI, J.; DASGUPTA, S.; BONIN, C.; LUETHY, M. H.; HEARD, J. E. Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions. **Plant Physiology**, Washington, v. 147, n. 2, p. 446-455, 2008.

CHEN, Y.; NI, X.; BUNTIN, G. D. Physiological, nutritional, and biochemical bases of corn resistance to foliage-feeding fall armyworm. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 35, n. 3, p. 297-306, 2009.

GANJISAFFAR, F.; PERRING, T. M. Prey stage preference and functional response of the predatory mite *Galendromus flumenis* to *Oligonychus pratensis*. **Biological Control**, Orlando, v. 82, p. 40-45, 2015.

HAKE, S. Unraveling the knots in plant development. **Trends in Genetics**, London, v. 8, n. 3, p. 109-114, 1992.

HARRIGAN, G. G.; RIDLEY, W. P.; MILLER, K. D.; SORBET, R.; RIORDAN, S. G.; NEMETH, M. A.; REEVES, W.; PESTER, T. A. The forage and grain of MON 87460, a drought-tolerant corn hybrid, are compositionally equivalent to that of conventional corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 20, p. 9754-9763, 2009.

HE, J.; CHEN, F.; CHEN, S.; GUOSHENG, L.V.; DENG, Y.; FANG, W.; LIU, Z.; GUAN, Z.; HE, C. Chrysanthemum leaf epidermal surface morphology and antioxidant and defense enzyme activity in response to aphid infestation. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 168, n. 7, p. 687-693, 2011.

HENG-MOSS, T. M.; SARATH, G.; BAXENDALE, F.; NOVAK, D.; BOSE, S.; NI, X.; QUISENBERRY, S. Characterization of oxidative enzyme changes in buffalograsses challenged by *Blissus occiduus*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 97, n. 3, p. 1086-1095, 2004.

HILDEBRAND, D. F.; RODRIGUEZ, J. G.; BROWN, G. C.; LUU, K. T.; VOLDEN, C. S. Peroxidative responses of leaves in two soybean genotypes injured by twospotted spider mites (Acari: Tetranychidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 79, n. 6, p. 1459-1465, 1986.

JEPPSON, L. R.; KEIFER, H. H.; BAKER, E. W. **Mites Injurious to Economic Plants**. Berkeley: University of California Press, 1975. 614 p.

JIANG, B.; SIREGAR, U.; WILLEFORD, K. O.; LUTHE, D. S.; WILLIAMS, W. P. Association of a 33-kilodalton cysteine proteinase found in corn callus with the inhibition of fall armyworm larvae growth. **Plant Physiology**, Washington, v. 108, n. 4, p. 1631-1640, 1995.

KERSTETTER, R. A.; LAUDENCIA-CHINGCUANCO, D.; SMITH, L. G.; HAKE, S. Loss-of-function mutations in the maize homeobox gene, *knotted1*, are defective in shoot meristem maintenance. **Development**, Cambridge, v. 124, n. 16, p. 3045-3054, 1997.

LATHROP, A.; NAMUTH, D. Development of drought tolerant corn hybrids. **University of Nebraska-Lincoln**, Nebraska, 22 set. 2011. Disponível em: <<http://cropwatch.unl.edu/development-drought-tolerant-corn-hybrids-unl-cropwatch-sept-22-2011>>. Acesso em: 03 mai. 2016.

LAWRENCE, C. J.; HARPER, L. C.; SCHAEFFER, M. L.; SEN, T. Z.; SEIGFRIED, T. E.; CAMPBELL, D. A. MaizeGDB: The maize model organism database for basic, translational, and applied research. **International Journal of Plant Genomics**, London, v. 2008, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2008/496957>>.

LUO, K.; DENG, W.; XIAO, Y.; ZHENG, X.; LI, Y.; PEI, Y. Leaf senescence is delayed in tobacco plants expressing the maize knotted1 gene under the control of a wound-inducible promoter. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, p. 1246-1254, 2006.

MAO, Y. B.; CAI, W. J.; WANG, J. W.; HONG, G. J.; TAO, X. Y.; WANG, L. J.; HUANG, Y. P.; CHEN, X. Y. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. **Nature Biotechnology**, New York, v. 25, p. 1307-1313, 2007.

MOOSE, S. P.; SISCO, P. H. *Glossy15*, an *APETALA2*-like gene from maize that regulates leaf epidermal cell identity. **Genes and Development**, Cold Spring Harbor, v. 10, p. 3018–3027, 1996.

NORMAN, J. M.; CAMPBELL, G. Application of a plant-environment model to problems in irrigation. In: HILLEL, D. **Advances in irrigation**. Vol. 2. New York: Academic Press, 2013. Cap. 4. p. 155-187.

PEAIRS, F. B. **Mites in wheat**. Colorado: Colorado State University: Extension, 2014a. 2 p.

PEAIRS, F. B. **Spider mites in corn**. Colorado: Colorado State University: Extension, 2014b. 2 p.

PECHAN, T.; COHEN, A.; WILLIAMS, W. P.; LUTHE, D. S. Insect feeding mobilizes a unique plant defense protease that disrupts the peritrophic matrix of caterpillars. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 20, p. 13319-13323, 2002.

PECHAN, T.; YE, L.; CHANG, Y. M.; MITRA, A.; LIN, L.; DAVIS, F. M.; WILLIAMS, W. P.; LUTHE, D. S. A unique 33-kD cysteine proteinase accumulates in response to larval feeding in maize genotypes resistant to fall armyworm and other Lepidoptera. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 7, p. 1031-1040, 2000.

RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; BENSON, G. O. **How a corn plant develops**. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1993. 26 p.

ROBSON, P. R. H.; DONNISON, I. S.; WANG, K.; FRAME, B.; PEGG, S. E.; THOMAS, A.; THOMAS, H. Leaf senescence is delayed in maize expressing the *Agrobacterium IPT* gene under the control of a novel maize senescence-enhanced promoter. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 2, p. 101-112, 2004.

SAS Version 9.0 [computer program]. Cary, NC: SAS Institute, 2003.

SETHI, A.; MCAUSLANE, H. J.; RATHINASABAPATHI, B.; NUESSELY, G. S.; NAGATA, R. T. Enzyme induction as a possible mechanism for latex-mediated insect resistance in romaine lettuce. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 35, n. 2, p. 190-200, 2009.

SMITH, C. M. **Plant resistance to arthropods, Molecular and Conventional Approaches**. Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2005. 423 p.

STICKNEY, F. S.; BARNES, D. F.; SIMMONS, P. **Data palm insects in the United States**. Washington: USDA Circular, 1950. 57 p.

STIEFEL, V. L.; MARGOLIES, D. C. Do components of colonization – dispersal cycles affect the offspring sex ratios of Banks grass mites (*Oligonychus pratensis*)? **Entomologia Experimentalis Et Applicata**, Dordrecht, v. 64, p. 161-166, 1992.

STOUT, M. J. Reevaluating the conceptual framework for applied research on host-plant resistance. **Insect Science**, Beijing, v. 20, n. 3, p. 263-272, 2013.

TOLLEFSON, J. Drought-tolerant maize gets US debut. **Nature**, London, v. 469, p. 144, 2011.

USDA (United States Department of Agriculture). High throughput DNA isolation from leaves using CTAB & 4mM TCEP in plates. **USDA**, St. Amand, KS, 24 set. 2014. Disponível em: <hwwwgenotyping.ksu.edu/.../USDA-KSU%20Robot-C...>. Acesso em: 18 dez. 2015.

WILLIAMS, W. P.; DAVIS, F. M.; BUCKLEY, P. M.; HEDIN, P. A.; BAKER, G. T.; LUTHE, D. S. Factors associated with resistance to fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) and southwestern corn borer (Lepidoptera: Crambidae) in corn at different vegetative stages. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 91, n. 6, p. 1471-1480, 1998.

XU, Z.; ZHOU, G. Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 12, p. 3317-3325, 2008.

ZHANG, S. Z.; HAU, B. Z.; ZHANG, F. Induction of the activities of antioxidative enzymes and the levels of malondialdehyde in cucumber seedlings as a consequence of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) infestation. **Arthropod-Plant Interactions**, Dordrecht, v. 2, n. 4, p. 209-213, 2008.

CAPÍTULO 6 – Considerações finais

A Resistência de Plantas a Artrópodes é uma das bases do Manejo Integrado de Pragas, uma vez que a planta pode se defender do ataque de um artrópode, seja por possuir constitutivamente eficientes mecanismos de resistência (barreiras morfológicas, químicas, ou físicas) que inibem a alimentação e oviposição do artrópode e/ou interfere no seu desenvolvimento ou sobrevivência; ou devido à produção de substâncias de defesa para contra-atacar a investida da praga (resistência induzida); ou ainda por tolerar a herbivoria, ao emitir novas estruturas afim de repor aquelas que foram removidas durante à alimentação da praga, tendo como consequência a não necessária adoção de outras táticas de controle por parte do produtor, desde que a praga não atinja o nível de controle.

Os resultados obtidos na presente pesquisa esclarecem, ao menos em parte, quais são os diferentes mecanismos envolvidos na resistência de cultivares de milho crioulo ao inseto *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae), e de híbridos de milho resistentes à seca ao ácaro *Oligonychus pratensis* (Banks) (Acari: Tetranychidae).

Em cultivares de milho crioulo, constatou-se a expressão de resistência a *D. speciosa* nas categorias antibiose e tolerância. As cultivares Pérola, Fortuna, e Palha Roxa se destacaram por apresentar resistência na categoria antibiose, afetando o desenvolvimento ou sobrevivência dos insetos. Observou-se que as cultivares resistentes não apresentaram acréscimo, após herbivoria, de estruturas morfológicas (ex.: lignina, celulose, fibras), mas se destacaram pelos menores decréscimos, uma vez que a maioria das cultivares suscetíveis tiveram grandes perdas nos teores destas estruturas. No que diz respeito à tolerância, o destaque foi a cultivar Azteca, que em teste de antibiose tinha sido classificado como a mais suscetível dentre 19 cultivares. A cultivar Azteca, além de apresentar características de planta tolerante, possuiu os maiores teores de clorofilas e carotenoides, que contribuem para maior produção de biomassa, além da ação antioxidante também exercida pelos carotenoides. Dessa forma, é importante ressaltar que a resistência de plantas precisa ser avaliada de uma forma ampla, em suas três categorias, para que não se descarte materiais que podem ser importantes no melhoramento genético.

Nos EUA, há relatos de que híbridos de milho resistentes à seca também expressam resistência aos principais ácaros-praga da cultura do milho; entretanto, até o momento não há na literatura informações sobre qual, ou quais híbridos têm manifestado essa resistência. Verificou-se nesta pesquisa, que o híbrido Artesian apresentou resistência na categoria antibiose a *O. pratensis*, diferentemente dos híbridos Droughtgard e Aquamax, que foram suscetíveis. Numa análise genômica, observou-se que seis marcadores moleculares relacionados com resistência a estresses bióticos amplificaram o DNA do híbrido Artesian, visualizando polimorfismos nos padrões de banda do DNA ao comparar com o híbrido suscetível Droughtgard, examinado em gel de agarose.

O presente trabalho apresenta resultados inéditos à respeito da resistência de genótipos de milho às diferentes pragas estudadas. Com o conhecimento gerado, é possível afirmar que as cultivares de milho crioulo representam fontes promissoras para o melhoramento genético de plantas, para que a médio ou longo prazo possam ser utilizadas para gerar plantas de milho com resistência a *D. speciosa*. Do mesmo modo, o híbrido de milho Artesian é promissor para o desenvolvimento de plantas de milho resistentes à *O. pratensis*, devido aos genes identificados nesse material. É importante ressaltar, que o híbrido Artesian teve um desempenho melhor do que sua isolinha, indicando que possivelmente há uma interação sinérgica entre os genes que conferem resistência à seca, que atenuam os efeitos adversos do estresse hídrico, com os genes associados com a resistência a fatores bióticos.

Espera-se que esse trabalho possa contribuir com o avanço no estabelecimento de uma agricultura sustentável, cooperando com o desenvolvimento de novas cultivares ou novos híbridos resistentes às pragas mencionadas, assim como auxiliar na diminuição do uso indiscriminado de inseticidas e acaricidas, os quais contaminam o meio ambiente como um todo, acarretando em prejuízos ainda não mensuráveis.