

RESPUESTA DE *Phytoseiulus macropilis* Banks A VOLÁTILES PRODUCIDOS POR PLANTAS DE FRESA ATACADAS POR *Tetranychus urticae* Koch ASPERJADOS CON AZADIRACHTINA*

Alberto Soto ^{G1}, Angelo Pallini², Felipe Lemos³

Resumen

El control biológico a través de predadores es observado como una alternativa promisoriosa al control químico de plagas. *Phytoseiulus macropilis* se ha encontrado asociado a poblaciones del ácaro rayado *Tetranychus urticae* en plantaciones de fresa en el estado de Minas Gerais, Brasil. En este trabajo se evaluó a través de experimento de olfatometría los efectos subletales de la azadirachtina sobre la capacidad de *P. macropilis* en detectar volátiles de plantas de fresa infestadas con *T. urticae*. Los resultados muestran que el ácaro predador *P. macropilis* puede diferenciar entre olores de plantas de fresa no atacadas y plantas de fresa atacadas por *T. urticae*. La azadirachtina en la concentración de 0,31 mg i.a/L no interfirió en la respuesta olfativa de *P. macropilis* alimentado de presas asperjadas.

Palabras clave: volátiles de plantas, olfatometro, azadirachtina, ácaros..

RESPONSE OF *Phytoseiulus macropilis* Banks TO VOLATILES PRODUCED BY STRAWBERRY PLANTS ATTACKED BY *Tetranychus urticae* Koch SPRINKLED WITH AZADIRACHTINA

Abstract

The biological control through predators is seen as a promising alternative to chemical insect pest control. *Phytoseiulus macropilis* has been found associated with populations of the striped mite, *Tetranychus urticae* in strawberry plantations in the state of Minas Gerais, Brazil. In this work, the sublethal effects of azadirachtina on the natural ability of *P. macropilis* to detect volatile compounds from strawberry plants infested with *T. urticae* was evaluated by using olfactometry assays. The results show that *P. macropilis* predatory mite can distinguish odors from non-attacked strawberry plants and those from strawberry plants attacked by *T. urticae*. Azadirachtina at a concentration of 0.31 mg i.a/L did not interfere in the olfactory response of *P. macropilis* fed with sprinkled striped mites.

Key words: volatile plant, olfactometer, azadirachtina, mites.

* FR: 4-VIII-2013. 16-IX-2013.

¹ I.A., M.Sc., Ph.D. Departamento de Produção Agropecuária. Universidade de Caldas. E-mail: alberto.soto@ucaldas.edu.co

² I.A., M.Sc., Ph.D. Universidade Federal de Viçosa. E-mail: pallini@ufv.br

³ I.A., M.Sc. Universidade Federal de Viçosa. E-mail: felipe.lemos@ufv.br

INTRODUCCIÓN

Entre las sustancias químicas que median las relaciones bióticas, los metabolitos secundarios desempeñan un papel significativo, y son objeto de exhaustivos estudios por su gran número de aplicaciones en la industria agrícola. En la última década ha surgido interés por los metabolitos secundarios volátiles debido a sus propiedades como atrayentes de polinizadores, y como señales para ubicar fuentes de comida, anidación, cría, recompensa, feromonas, etc. (KLUDSEN *et al.*, 1993; MARÍN & CÉSPEDES, 2007). Estos volátiles están altamente involucrados en las relaciones planta-herbívoro y planta-planta, y son producidos principalmente en las flores, pero también se encuentran en los frutos, tallos, hojas y raíz (CHEN *et al.*, 2004; STEEGHS *et al.*, 2004).

Después de haber sido atacada por un herbívoro, la planta libera volátiles de las estructuras secretoras internas y externas donde los sintetiza y almacena. Otros compuestos volátiles son formados al momento del daño (aldehídos y alcoholes) o sintetizados de nuevo a horas o días después del daño (generalmente terpenos) (ROSE *et al.*, 1996). Los inducidos horas o días después de iniciado el daño están ligados con la defensa indirecta, porque atraen parasitoides y depredadores de los herbívoros que la están consumiendo, al funcionar como señales de comunicación en interacciones tritróficas que aumentan el éxito de la búsqueda de alimento por parte de los carnívoros y facilitan el control de las poblaciones de herbívoros por la planta (KEESLER & BALDWIN, 2001)

Los insectos son los seres vivos que más utilizan los olores en las actividades relacionadas a la sobrevivencia y reproducción (BERNAYS & CHAPMAN, 1994). De esta manera, el olfato es fundamental para la selección de la planta hospedera o presa, atracción sexual y escogencia del lugar de oviposición (LANDOLT & PHILLIPS, 1997). Para mayor eficacia de los programas de control biológico es necesario que se entienda como ocurre el proceso de búsqueda de esos enemigos naturales en el agroecosistema. Se sabe que los efectos indirectos pueden mediar las interacciones entre plantas, herbívoros y sus enemigos naturales (PRICER *et al.*, 1980; SABELIS *et al.*, 1999; VAN ZANDT & AGRAWAL, 2004). Muchas plantas presentan sistema de defensa indirecto eficiente, activado cuando hay presencia del herbívoro si se alimenta de la planta. Por la alimentación, ocurre el estímulo fisiológico en la planta que acentúa la producción de compuestos volátiles que pueden servir como pistas para enemigos naturales (TAKABAYASHI & DICKE, 1996; DE MORAES *et al.*, 1998; VENZON *et al.*, 1999; ARIMURA *et al.*, 2000).

En este trabajo fue estudiado el efecto de dosis subletales del producto Organic Neem (3262 ppm de azadirachtina) en la respuesta olfativa del ácaro predador *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae) a olores de plantas de fresa no atacadas y atacadas con el ácaro fitófago *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae).

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en los laboratorios de Acarología y de Olfatometría del Departamento de Biología Animal de la Universidad Federal Viçosa, Viçosa, Brasil. Fue evaluado el efecto de la azadirachtina sobre la capacidad de búsqueda

del ácaro predador *P. macropilis* por volátiles provenientes de plantas de fresa infestadas por *T. urticae*. El producto Organic Neem (3,3 mg/L de azadirachtina) fue aplicado en dosis de 0,3 mg i.a/L, valor este definido previamente por el análisis de Probit y que corresponde a CL_{56} , o sea a cuando la tasa instantánea de crecimiento poblacional $r_i = 0,1$ para el predador *P. macropilis* (SOTO, 2009; SOTO *et al.*, 2011).

El producto fue pulverizado en discos ($\varnothing = 3,0$ cm) de hojas de fresa, acondicionados en caja de Petri, a través de torre de Potter, Burkard, Rickmansworth, UK (POTTER, 1952), sobre la presión de 5lb/pul² y con la aplicación de un volumen igual a 2,5mL por dosis, lo que corresponde a un depósito de $1,70 \pm 0,07$ mg/cm², sobre la superficie tratada. Esta cantidad aplicada está de acuerdo con lo recomendado por la IOBC/WPRS (Internacional Organization for Biological Control of Noxious Animals and Plants/ West Palearctic Regional Section) (OVERMEER & VAN ZON, 1982) y representa lo que ocurre en situación de campo (REIS *et al.* 1998). Para la fijación del disco en la placa, fue preparada una solución de carragenina (30g/300mL de agua) siendo que el disco fue colocado antes que la solución se solidificara. Los discos pulverizados fueron expuestos al ambiente por 1 hora para el secado del producto. Posteriormente, veinte hembras del ácaro *T. urticae* fueron colocadas sobre cada disco y en seguida fueron confinadas ocho hembras adultas de *P. macropilis* de 8 - 10 días de edad durante 24h. Los discos de hojas tratados y los ácaros sobrevivientes fueron mantenidos en cámara climatizada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ HR y 13h de luz).

El bioensayo relativo a la respuesta olfativa de hembras *P. macropilis* a los volátiles de la planta hospedera infestada con *T. urticae* asperjados con azadirachtina fue evaluado en olfatómetro tipo "Y" (diámetro interno de 0,5 cm y el largo de los brazos de 5 cm) (PALLINI *et al.*, 1997). El aparato está constituido por un tubo de vidrio en forma de "Y", siendo que cada brazo está conectado por una manguera a dos cajas de vidrio transparentes (50 x 36 x 43 cm). El flujo de aire fue producido por una bomba de vacío conectada a la base del tubo de vidrio, formando una corriente de aire uniforme en los dos brazos del aparato. La velocidad de la corriente de aire al interior del olfatómetro fue de 0,45 m/s en cada brazo, medida por fluxómetros digitales y calibrada por registro manual. Las hembras fueron colocadas en la extremidad basal del olfatómetro, contra la corriente de aire formada en el interior del aparato. Fueron consideradas en el análisis aquellas hembras que respondieron y llegaron al punto de unión del tubo en donde realizaron escogencia por una de las fuentes, considerándose una respuesta positiva la llegada de la hembra hasta la extremidad de uno de los brazos del olfatómetro.

Los tratamientos correspondieron a la exposición de los ácaros predadores a agua destilada (control) y a residuos de azadirachtina (Organic Neem 0,3 mg i.a/L). Como fuentes de olores fueron utilizadas plantas de fresa con 5-10 hojas no infestadas y plantas infestadas con cerca de 1000 formas inmaduras y adultos de *T. urticae* por planta. Hembras de *P. macropilis* fueron liberadas individualmente en el olfatómetro y evaluadas una a una, en un total de 20 ácaros por repetición, totalizando tres repeticiones por tratamiento. A cada 5 hembras evaluadas, las posiciones de las fuentes de olores fueron invertidas, y al final de cada repetición las hojas de fresa fueron trocadas con el fin de evitar la pseudorepetición (RAMIREZ *et al.*, 2000). Las diferencias entre los números de ácaros que escogieron para cada

una de las fuentes de olores fueron evaluadas utilizando la prueba estadística Replicated Goodness of Fit (SOKAL & ROHLF, 1995) considerando una frecuencia esperada de 0,5 para cada fuente de olor (PALLINI *et al.*, 1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los análisis de olfatómetro, el predador *P. macropilis* pulverizado con agua prefirió los olores de plantas de fresa infestadas con *T. urticae* a olores de plantas no infestadas ($G_p = 32,45$; g.l.= 1; $p < 0,0001$) (Figura 1). De estos ácaros, 85% prefirieron plantas de fresa infestadas con *T. urticae* a plantas no infestadas. Estos resultados muestran una fuerte evidencia de que volátiles de la planta hospedera atacada por *T. urticae* tienen un papel relevante en la localización de la presa por parte de *P. macropilis*.

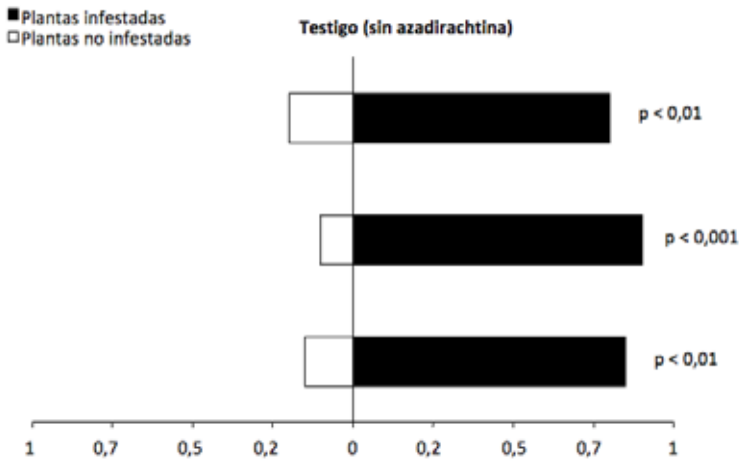


Figura 1. Respuesta del predador *P. macropilis* a los olores de plantas no infestadas y plantas de fresa infestadas por *T. urticae* en olfactómetro tipo “Y”. Cada barra corresponde a una repetición (n= 20 ácaros). ($G_p = 32,45$; g.l.= 1; $p < 0,0001$)

Cuando *T. urticae* fue pulverizado con la dosis subletal de azadirachtina, el predador *P. macropilis* expuesto a residuos de azadirachtina continuó prefiriendo los olores de plantas de fresa infestadas con *T. urticae* a los de plantas no infestadas ($G_p = 44,16$; g.l.= 1; $p < 0,0001$) (Figura 2). De estos ácaros, 90% prefirieron plantas de fresa infestadas con *T. urticae* y pulverizadas con azadirachtina, lo que indica que en la dosis subletal aplicada de azadirachtina el producto no afecta la capacidad de búsqueda de *P. macropilis*.

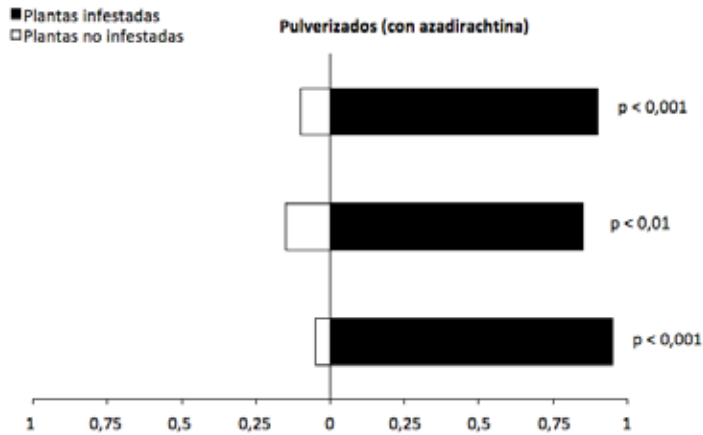


Figura 2. Respuesta olfativa de hembras del predador *P. macropilis* a los olores de plantas no infestadas y plantas de fresa infestadas por *T. urticae* con aplicación de azadirachtina en olfatometro tipo “Y”. Cada barra corresponde a una repetición (n= 20 ácaros). (Gp = 44,16; g.l.= 1; p< 0,0001)

La percepción de volátiles provenientes del complejo planta-herbívoro por el predador *P. macropilis* indica que este artrópodo utiliza esas sustancias volátiles en la localización de presas. Los resultados muestran que *P. macropilis* puede diferenciar entre olores de plantas de fresa no atacadas y plantas de fresa atacadas por *T. urticae*. La azadirachtina en la concentración de 0,31 mg i.a/L (equivalente a la concentración cuando $r_i = 0,1$ para el predador) no interfirió en la respuesta olfativa de *P. macropilis* alimentado de presas pulverizadas, pudiendo discriminar entre plantas infestadas por *T. urticae* y plantas no infestadas. De esta manera *P. macropilis* puede aumentar la eficiencia en la localización de presas, pudiendo reducir el tiempo necesario para localizarlas.

VENZON *et al.* (1999) observó en experimentos de invernadero que el predador *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anthocoridae) prefirió significativamente plantas de pepino infestadas por el ácaro *T. urticae* que plantas no atacadas por estos herbívoros. TEODORO (2003) estudio la interferencia de los acaricidas fenibutatina y azufre sobre la capacidad de búsqueda del ácaro predador *Iphiseiodes zuluagai* (Acari: Phytoseiidae) a olores de plantas no atacadas y atacadas por los ácaros fitófagos *Oligonychus ilicis* y *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tetranychidae, Tenuipalpidae), encontrando que los acaricidas en concentraciones subletales interfirieron en la capacidad de búsqueda del ácaro predador.

La olfatometría es utilizada para estudiar la respuesta olfativa de ácaros predadores a olores de larga distancia, o sea, plantas no atacadas y plantas atacadas, así como colonias de ácaros fitófagos dentro de la planta. Por tanto, *P. macropilis* expuesto a concentraciones subletales de azadirachtina en el campo, al conseguir encontrar sus presas, no compromete el control biológico natural ejercido sobre *T. urticae*. Especies del género *Phytoseiulus*, cuando están asociadas a *T. urticae*, presentan mayor tasa de oviposición, mayor tiempo de búsqueda y mayor tasa de predación en relación a la densidad (ZHANG *et al.*, 1992; ZHANG & SANDERSON, 1993, FADINI, 2005).

BIBLIOGRAFÍA

- ARIMURA, G., OZAWA, R., SHIMODA, T., NISHIOKAI, T., BOLAND, W. & TAKABAYASHI, J., 2000.- Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature*. 406: 512-515.
- BERNAYS, A. & CHAPMAN, R., 1994.- Behavior: The process of host-plant selection. Pag. 95-205 in A. Bernays y R. Chapman, editors. *Host-plant selection by phytophagous insects*. Chapman & Hall New York, USA.
- CHEN, F., RO, D.K., PETRI, J., GERSHENSON, J., BOHLMANN, J., PICHERSKY, E. & THOLL, D., 2004. Characterisation of root-specific Arabidopsis terpene synthase responsible for the formation of the volatile monoterpene 1,8- cineole. *Plant Physiol*. 135: 1956-1966.
- DE MORAES, C.M., LEIWS, W.J., PARE, P.W., ALBORN, H.T. & TUMLINSON, J.H., 1998.- Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature*, 393: 570-573.
- FADINI, M.A.M., 2005.- Interações em teias alimentares de ácaros no morangueiro (*Fragaria x ananassa*). Tese doutorado. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 78p.
- KEESLER, A. & BALDWIN, I.T., 2001.- Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* 291: 2141-2144
- KLUDSEN, J.T., TOLISTEN, L. & BERGSTRON, L.G., 1993.- Floral scents- a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. *Phytochemistry*. 33: 253-280
- LANDOLT, T.P.J. & PHILLIPS, T.W., 1997.- Host plant influence on sex pheromone behaviour. *Ann. Rev. Entomol*. 42: 371-391.
- MARIN, J.C. & CESPEDES, C.L., 2007.- Compuestos volátiles de plantas. Origen, emisión, efectos, análisis y aplicaciones al agro. *Rev. Fitotec. Mex*. 30 (4): 327-351.
- OVERMEER, W.P.J. & VAN ZON, A.Q., 1982.- A standardized method for testing the side effect of pesticides on the predaceous mite, *Amblyseius potentillae* (Acari: Phytoseiidae). *Entomophaga* 27: 357-364.
- PALLINI, A., JANSSEN, A. & SABELIS, M.W., 1997.- Odour- mediated responses phytophagous mites to conspecific and heterospecific competitors. *Oecologia* 110: 179-185.
- POTTER, C., 1952.- An improved laboratory apparatus for applying direct sprays and surface films, with data on the electrostatic charge on atomized spray films. *Annals of Applied Biology* 39: 1-29.
- PRICER, P.W., BOUTON, C.E., GROSS, P., McPHERON, B.A., THOMPSON, J.N. & WEIS, A.E., 1980.- Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 11: 41-65.
- RAMIREZ, C.C., FUENTES, E., RODRÍGUEZ, L.C. & NIEMEYER, H.M., 2000.- Pseudoreplication and its frequency in olfatometric laboratory studies. *Journal of Chemical Ecology* 26: 1423- 1431.
- REIS, P.R., CHIAVEGATO, L.G., MORAES, G.J., ALVES, E.B. & SOUSA, E.O., 1998.- Seletividade de agroquímicos ao ácaro predador *Iphiseiodes zuluagai* Denmark & Muma (Acari: Phytoseiidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 27: 265-274.
- ROSE, U.S.R., MANUKIAN, A., HEATH, R.R. & TUMLINSON, J.H., 1996.- Volatile semiochemicals released from undamaged cotton leaves. *Plant Physiol*. 111: 487-495.
- SABELIS, M.W., VAN BAALEN, M., BAKKER, F.M., BRUIN, J., DRUKKER, B., EGAS, M., JANSSEN, A.R.M., LESNA, I.K., PELS, B., VAN RIJN, P.C.J. & SCUTAREANU, P., 1999.- The evolution of direct and indirect plant defence against herbivorous arthropods. In: *Herbivores: between Plants and Predators*, H. Olff, V.K. Brown & R.H. Drent (eds), Blackwell Scientific Publications, Oxford . pp 109-166.
- SOKAL, R.R. & ROHLF, F.J., 1995.- *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. 3rd edition. W.H. Freeman, New York. 887p.
- SOTO, A., 2009.- Manejo alternativo de ácaros em morango e tomate. Dissertação de doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil. 128p.
- SOTO, A.; VENZON, M. & PALLINI, A., 2011.- Integración de control biológico y de productos alternativos contra *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Revista U.D.C.A. Actualidad y Divulgación Científica*, 14 (1): 23- 29.
- STEEGHS, M., BAIS, H.P., DE GOUW, J., GOLDAN, P., KUSTER, W., NORTHWAY, M., FALL, R. & VIVANCO, J.M., 2004.- Proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS) as a new tool for real time analysis of root-secreted volatile organic compounds (VOCs) in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol*. 135: 47-58
- TAKABAYASHI, J. & DICKE, M., 1996.- Plant-carnivore mutualism through herbivore-induced carnivore attractants. *Plant Science*. 1: 109-113.
- TEODORO, A.V., 2003.- Interferências subletais de acaricidas em uma teia alimentar de cafeeiro. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 60p.
- ZHANG, Z.Q., SANDERSON, J.P. & NYROP, J.P., 1992.- Foraging time and spatial patterns of predation in experimental populations. A comparative study of three mite predator prey systems (Acari: Phytoseiidae, Tetranychidae). *Oecologia* 90: 185-196.
- ZHANG, Z.Q. & SANDERSON, J.P., 1993.- Behavioral responses to prey density by three acarine predator species with different degrees of polyphagy. *Oecologia* 96: 147-156.
- VAN ZANDT, P.A. & AGRAWAL, A.A., 2004.- Specificity of induced plant responses to specialist herbivores of the common milkweed *Asclepias syriaca*. *Oikos*, 104: 401-409.
- VENZON, M., JANSSEN, A. & SABELIS, M.W., 1999.- Attraction of a generalist predator towards herbivore-infested plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 93: 305-314.