

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

Interações planta-herbívoro-parasitóides de ovos mediadas por voláteis de milho (*Zea mays* L.) e odores de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)

Maria Fernanda Gomes Villalba Peñaflor

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

Piracicaba
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Maria Fernanda Gomes Villalba Peñafior

Bióloga

**Interações planta-herbívoro-parasitóides de ovos mediadas por voláteis de milho
(*Zea mays* L.) e odores de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)**

Orientador:

Prof. Dr. **JOSÉ MAURÍCIO SIMÕES BENTO**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

**Piracicaba
2010**

*Dedico aos meus pais, M. de Fátima e Carlos Emmanuel, que são
pessoas maravilhosas que me incentivam e me apoiam incondicionalmente*

Agradeço a Deus por me dar forças e manter a minha fé em concluir esse doutorado

“La vie, c’est ce qui arrive quand on est occupé à d’autres projets” John Lennon

C’est fini!

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço aos colaboradores diretos desse trabalho:

Ao meu orientador Prof. Dr. José Maurício Simões Bento, pela orientação, imenso incentivo, ensinamentos, paciência e bom-humor únicos;

Ao Prof. Dr. José Roberto Postali Parra, pelo seu exemplo de ética e solidariedade que sempre dispôs das dependências e equipamentos do seu laboratório para o nosso uso ;

Ao Prof. Dr. Ted Turlings, pela importante oportunidade oferecida, orientação e exemplo;

Ao Matthias Erb, pela contribuição, ajuda e incentivo nesse trabalho. Além de tudo, a agradável companhia e amizade;

À Andrea Werneburg (Bins), pela sua ajuda preciosa em todas as etapas desse trabalho, colaboração nos experimentos, e à amizade;

À Mariana Sarmiento, pela sua ajuda nas criações e nos experimentos desse trabalho;

À Lívia Atauri, pela colaboração no projeto e amizade;

Ao Cherre, por ser, antes de qualquer coisa, um amigo maravilhoso, e um grande pesquisador pronto para discussões e para ajudar na elaboração dos experimentos;

À Christelle Robert e Elvira de Lange, o Girlie chocolate Office, pela ajuda na condução dos experimentos e das análises, além de ter me proporcionado momentos de total descontração, overdoses de chocolates e uma amizade sem igual;

À Débora e a Ângela, pela ajuda nas análises estatísticas;

À Cristiane Nardi, pelas sugestões valiosas no deliniamento dos experimentos e na escrita

Ao Prof. Dr. Paulo H. G. Zarbin, pelo incentivo e ajuda na tradução dos nomes das moléculas químicas;

Ao Fábio Dossi, pelo precioso auxílio na microscopia eletrônica;

Ao Prof. Dr. Elliot W. Kitajima, Prof. Dr. Francisco Tanaka e Renato Salaroli (NAP/MEPA) pela disposição do laboratório e equipamentos de MEV;

À FAPESP, pela concessão da bolsa e financiamento do projeto;

E aos colaboradores indiretos, que enriquecem a minha vida com a sua amizade e amor

Aos queridos amigos do laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos, Ana

Lia, Nancy, Ohana, Alberto, Cristiane, Newton, André (Siña), Laura, Weliton, Isabel, Renata, Rejane K., Rejane L., Luiza, Ana Cristina, Lucila, Mayra, Marcy, Andrea e Vitor, pela agradável convivência e momentos de discussão sobre ciência e afins .

À **Marcy**, pela ajuda nas referências bibliográficas.

À **Daniela Queija**, pela colaboração na arte de algumas fotos;

Aos amigos Anahí Espindola, Sarah Kenyon, Matthias Borer, Matthias Held, George ,

Greg, Natalie, que se tornaram amigos maravilhosos. Obrigada pelos 20 kg de chocolates que vocês me ofereceram durante a minha estadia!

Às **espetaculares mafaldetes**, as irmãs que eu nunca tive: Babi, Fer Bueno e, em especial, à

Deborê e Gel, que estando mais próximas, me apoiaram e me animaram em todos os momentos que precisei

À **Juliana Aquino**, igualmente uma irmã para mim, companheira e sempre amiga, que torce muito por mim.

À **Priscila**, outra irmã, pelo seu carinho, exemplo de coragem e determinação, e também por ter revisado a escrita desse trabalho.

Ao Siddhartha, pelo carinho e por ter acompanhado parte desse doutorado.

Aos membros da minha família, em especial, Madrinha Tide e Padrinho Josias, Kátia, Tia

Linda, Alessandra & Diogo, Tia Olímpia, Tia Tércia e Gabriela & Daniel

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
Referências	18
2 Efeito da idade do hospedeiro no parasitismo, preferência e arrestamento de <i>Telenomus remus</i> Nixon (Hymenoptera: Scelionidae)	27
Resumo	27
Abstract.....	28
2.1 Introdução.....	29
2.2 Material e Métodos.....	30
2.2.1 Criação dos Insetos.....	30
2.2.2 Ensaios de preferência.....	30
2.2.2.1 Testes sem chance de escolha.....	30
2.2.2.2 Testes com chance de escolha.....	31
2.2.3 Ensaios de arrestamento.....	31
2.2.4 Análise dos dados.....	31
2.3 Resultados.....	31
2.4 Discussão.....	37
Referências	39
3 A planta de milho emite voláteis induzidos pela oviposição de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)?.....	45
Resumo	45
Abstract.....	46
3.1 Introdução.....	47
3.2 Material e Métodos.....	48
3.2.1 Cultivo das plantas e criação dos insetos.....	48
3.2.2 Bioensaios em olfatômetro.....	49
3.2.3 Coleta e Identificação dos voláteis.....	52
3.2.4 Microscopia eletrônica de varredura.....	53
3.2.5 Análise dos dados.....	53
3.3 Resultados.....	54
3.4 Discussão.....	58
Referências	60
4 Resposta de um parasitóide de ovos generalista e especialista aos voláteis induzidos pela herbivoria de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae).....	63
Resumo	63
Abstract.....	64
4.1 Introdução.....	65
4.2 Material e Métodos.....	66
4.2.1 Cultivo das plantas e criação dos insetos.....	66
4.2.2 Bioensaios de preferência de oviposição de <i>S. frugiperda</i>	67
4.2.3 Bioensaios em olfatômetro.....	67

4.2.4 Coleta e Identificação dos voláteis.....	70
4.2.5 Análise dos dados.....	72
4.3 Resultados	72
4.4 Discussão	80
Referências.....	86
5 A oviposição de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) altera as defesas diretas e indiretas do milho?	93
Resumo	93
Abstract	94
5.1 Introdução	95
5.2 Material e Métodos	96
5.2.1 Cultivo das plantas e criação dos insetos	96
5.2.2 Plantas induzidas pela oviposição.....	97
5.2.3 Experimentos de defesas diretas	97
5.2.3 Experimento de defesas indiretas.....	100
5.2.4 Coleta e Identificação dos voláteis.....	100
5.2.5 Análise dos dados.....	101
5.3 Resultados	102
5.4 Discussão	108
Referências.....	111

RESUMO

Interações planta-herbívoro-parasitóides de ovos mediadas por voláteis de milho (*Zea mays* L.) e odores de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)

O ataque de insetos herbívoros induz a emissão de voláteis pelas plantas que constituem sinais químicos importantes para os inimigos naturais em busca do hospedeiro/presa. Essas interações tritróficas mediadas pelos voláteis das plantas têm sido bem estudadas em sistemas que envolvem parasitóides larvais. Por outro lado, pouco se sabe a respeito do papel desses odores na localização hospedeira dos parasitóides de ovos. Dessa maneira, o presente estudo teve como objetivos: (i) avaliar o parasitismo, a preferência e o arrestamento de ovos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) de diferentes idades para o parasitóide *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Scelionidae); (ii) verificar se ocorre a indução de voláteis induzidos pela oviposição de *S. frugiperda* na planta de milho atraentes ao parasitóide *T. remus*; (iii) avaliar o papel dos voláteis induzidos pela herbivoria de *S. frugiperda* no comportamento do parasitóide especialista *T. remus* e generalista *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae); e (iv) verificar se a oviposição de *S. frugiperda* altera as defesas diretas e indiretas induzidas pela herbivoria no milho. Os resultados desse trabalho mostraram que *T. remus* teve preferência em parasitar ovos de 1 e 2 dias de idade em relação aos 3 dias. Entretanto, a emergência dos parasitóides foi reduzida em ovos de 2 e 3 dias. Todos os extratos hexânicos dos ovos exerceram efeito arrestante sobre *T. remus* em relação ao solvente, porém o tempo de permanência dos parasitóides foi maior em extratos de ovos de 1 e 2 dias em comparação ao de 3 dias. De acordo com esses resultados, foi avaliado se a planta de milho emite voláteis induzidos pela oviposição de *S. frugiperda* atraentes ao parasitóide *T. remus* nos intervalos 1, 2 e 3 dias. Os bioensaios comportamentais e a coleta de voláteis não mostraram que ocorre a indução de voláteis induzidos pela oviposição atraentes ao parasitóide, mas que a oviposição promoveu a supressão da emissão do linalol. Já os voláteis induzidos pela herbivoria do *S. frugiperda* constituem pistas químicas importantes para os parasitóides de ovos. O parasitóide especialista *T. remus* não apresentou o comportamento inato de atração pelos voláteis, porém, após a experiência com os mesmos, *T. remus* passou a ser atraído tanto por misturas compostas majoritariamente por voláteis de folhas verdes (VFVs), que são emitidas logo após o dano; como por misturas mais complexas, compostas por terpenos, emitidas algumas horas após a indução. Já *T. pretiosum* apresentou um comportamento de atração inato pelos VFVs, embora seja também capaz de aprender misturas compostas por terpenos. A oviposição de *S. frugiperda* não alterou as defesas diretas do milho, avaliadas pelo peso da lagarta alimentada na planta, porém, provocou a diminuição da liberação de terpenos induzidos pela herbivoria. Os resultados desse trabalho sugerem que a oviposição do herbívoro pode ter implicações relevantes nas interações tritróficas, pois promovem a supressão de voláteis do milho. Além disso, os voláteis induzidos pela herbivoria desempenham um papel importante no comportamento de parasitóides de ovos.

Palavras-chave: Interações tritróficas, Ecologia química, Inimigos naturais, Atração, Estímulos químicos, Localização hospedeira

ABSTRACT

Interactions plant-herbivore-egg parasitoids mediated by maize volatiles (*Zea mays* L.) and odors from *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)

Attack of insect herbivores induces emission of plant volatiles that play an important role as chemical signals to natural enemies in host search. Tritrophic interactions mediated by plant volatiles have been well studied in systems that involve larval parasitoids. By contrast, little is known about the role of these odors in host searching by egg parasitoids. Thus, the current study aimed to: (i) assess parasitism, preference and arrestment of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) eggs with different ages to the parasitoid *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Scelionidae); (ii) verify if *S. frugiperda* oviposition induces attractive maize volatiles to the parasitoid *T. remus*; (iii) assess the role of herbivore-induced maize volatiles elicited by *S. frugiperda* to the specialist parasitoid *T. remus* and the generalist *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae); and (iv) verify if *S. frugiperda* oviposition alters direct and indirect herbivore-induced defenses on maize. Results showed that *T. remus* preferred to parasitize 1- and 2-day-old eggs in relation to 3-day-old. However, parasitoid emergence was reduced in 2- and 3-day-old eggs. All hexanic egg extracts promoted arrestment response for *T. remus* when compared to the solvent, although residence time was longer in 1- and 2-day –old egg extracts in comparison with 3-day old. In view of these results, it was assessed if maize plant emits attractive oviposition-induced volatiles elicited by *S. frugiperda* to the egg parasitoid *T. remus*. Behavioral bioassays and volatile collection did not show that maize emits oviposition-induced volatiles elicited by *S. frugiperda* that are attractive to *T. remus*. Surprisingly, oviposition suppressed the emission of linalool. Herbivore-induced maize volatiles comprise important chemical cues for egg parasitoids. Specialist parasitoid *T. remus* was not innately attracted by herbivore-induced volatiles, though experienced wasps responded to blends comprised predominantly by green leaf volatiles (GLVs), which are emitted immediately after damage, or to more complex blends comprised by terpenes, emitted some hours after damage. While *T. pretiosum* showed an innate behavior towards VFVs, but wasps were also able to learn terpene blend. Oviposition of *S. frugiperda* did not alter direct defenses on maize, which were assessed by larval weight fed on the plant, however, it decreased emissions of herbivore-induced terpenes. These results suggest that herbivore oviposition can have relevant considerations in tritrophic interactions and herbivore-induced volatiles play an important role in egg parasitoid behavior.

Keywords: Tritrophic interactions; Chemical ecology; Natural enemies; Attraction; Chemical stimuli

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que existam cerca de 1 milhão de espécies de insetos, sendo 45% deles herbívoros que atacam os mais diversos órgãos vegetais (STRONG; LAWTON; SOUTHWOOD, 1984). Em contrapartida, as plantas desenvolveram ao longo do tempo a habilidade de reconhecer e responder defensivamente ao ataque dos insetos (HOWE; JANDER, 2008). Essas defesas podem afetar diretamente os herbívoros por meio de compostos com propriedades tóxicas ou repelentes que alteram a biologia ou o comportamento dos mesmos, e que, portanto, são denominadas defesas diretas; ou indiretamente, por meio de mecanismos que atraem os inimigos naturais dos herbívoros. Parasitóides e predadores podem ser atraídos pelas plantas em busca de suprimento nutricional fornecido pelos nectários extra-florais, ou de alojamento provido pelas domáceas, que são estruturas que servem de abrigo principalmente a formigas predadoras (KARBAN; BALDWIN, 1997; OLIVEIRA, 1997; TURLINGS; WÄCKERS, 2004). Outro mecanismo de defesa indireta das plantas estudado nos últimos anos é a emissão de compostos voláteis induzidos pela herbivoria que atuam como atraentes para os parasitóides e predadores.

Na busca pelo hospedeiro, os parasitóides guiam-se principalmente por pistas químicas, detectadas pelo contato ou olfato (VET; GROENEWOLD, 1990). O processo de localização do hospedeiro pelo parasitóide é dividido em etapas comportamentais que, em geral, finalizam na oviposição. Estas etapas consistem na seguinte ordem: localização do habitat e da comunidade do hospedeiro, localização do hospedeiro, reconhecimento e aceitação do hospedeiro (VINSON, 1976, 1984).

Assim, por ser um processo complexo, a localização do hospedeiro depende de diferentes pistas químicas presentes no ambiente. Até a década de 80, os pesquisadores acreditavam que os odores dos hospedeiros, provenientes das escamas das asas, dos *pellets* fecais, da seda produzida pelas lagartas e dos feromônios, seriam os principais mediadores na localização do hospedeiro pelo inimigo natural (AUGER et al., 1989; LEWIS; JONES; SPARKS, 1972; LEWIS et al. 1979; NEALIS, 1986; VINSON, 1976). No entanto, os estudos conduzidos por Price et al. (1980) e Dicke e Sabelis (1988) provaram que os compostos voláteis emitidos pelas plantas sob o ataque dos herbívoros exerciam papel importante na localização do hospedeiro/presa pelos inimigos naturais.

A partir disso, Vet e Dicke (1992) propuseram que o uso de pistas químicas na localização do hospedeiro depende da sua detectabilidade no ambiente e da precisão da informação quanto à

presença do hospedeiro/presa. Portanto, de acordo com essa teoria, os odores provenientes das plantas sob o ataque de um herbívoro devem atuar a longas distâncias. Contudo, devido à alta variabilidade das misturas de voláteis, essas pistas não devem indicar com precisão a presença do seu hospedeiro, embora alguns estudos provem o contrário (DE MORAES et al., 1998; TAKABAYASHI et al., 1995). Por outro lado, os odores emitidos pelos hospedeiros/presas são pouco detectáveis e, por isso, devem atuar a curtas distâncias, principalmente no reconhecimento e na localização do hospedeiro sobre a planta (SHU; SWEDENBORG; JONES, 1990; STRAND; VINSON, 1982, 1983; VET; DICKE, 1992; VET; WÄCKERS; DICKE, 1991).

Após essas descobertas, numerosos estudos investigaram a ação dos odores emitidos pelas plantas na resposta comportamental dos parasitóides e predadores, revelando a natureza dessas interações em diversos sistemas e os mecanismos de indução dessas defesas na planta (DICKE, 1999; DICKE et al. 1990a; STEINBERG; DICKE; VET, 1993; TURLINGS; TUMLINSON, 1991; TURLINGS et al., 1991a, b).

Posteriormente, foi descoberto que os voláteis de plantas induzidos pela herbivoria mediam interações mais complexas com a comunidade atuando também na comunicação entre plantas e, ainda, em interações com os próprios herbívoros, podendo ter ação repelente ou atraente (DE MORAES; MESCHER; TUMLINSON, 2001, ENGELBERTH et al., 2004; KESSLER; BALDWIN, 2001). Além disso, os voláteis de plantas podem exercer uma ação generalizada sobre outros organismos como nematóides entomopatogênicos (RASMANN et al., 2005), plantas parasíticas (RUNYON; MESCHER; DE MORAES, 2006), pássaros (MÄNTYLÄ et al., 2008) e a esporulação de fungos entomopatogênicos (HOUNTONDJI et al., 2005).

A detecção precisa do ataque de um herbívoro pela planta evita que as defesas sejam desencadeadas desnecessariamente. Um dos primeiros estudos com fins de esclarecer o modo como a indução ocorre mostrou que o dano físico no tecido foliar causado pela herbivoria não é o principal responsável (TURLINGS et al., 1993), mas sim componentes ativos presentes na secreção oral dos herbívoros que entram em contato com o interior do tecido vegetal durante a alimentação e ativavam as rotas bioquímicas (TURLINGS et al., 2000). A maior parte dos componentes ativos já identificados refere-se a diferentes espécies de lepidópteros e tratam-se de enzimas (MATTIACCI; DICKE; POSTHUMUS, 1995) ou conjugados de ácidos-gráxos e aminoácidos (ALBORN et al., 1997, HALITSCHKE et al., 2001, PARÉ et al., 2005).

Após o início do ataque, os componentes ativos presentes na secreção oral do herbívoro entram em contato com o interior da célula vegetal, conectando-se aos receptores na membrana plasmática da célula. Em alguns minutos, ocorre a despolarização da membrana celular devido às mudanças da concentração do Cálcio do citosol da célula (MAFFEI et al., 2007). O aumento de Cálcio no interior da célula provoca ativação das proteínas quinases envolvidas na regulação de genes de produção do ácido jasmônico (AJ) e ácido salicílico (AS), que são os principais fitohormônios na ativação das defesas nas plantas.

A planta é capaz de diferenciar os danos causados por herbívoros com diferentes modos de alimentação, como os mastigadores e sugadores, cujo dano induz diferentes padrões de expressão gênica (HEIDEL; BALDWIN, 2004). Em geral, o AJ está relacionado, principalmente, à indução da resistência contra insetos mastigadores, enquanto que o AS à resistência a fitopatógenos e pode atuar conjuntamente com o AJ na defesa contra os insetos sugadores (DE BOER; DICKE, 2004; MORAN; THOMPSON, 2001).

A planta sob o ataque de herbívoros libera uma mistura complexa de voláteis que pode compreender dezenas de compostos (D'ALESSANDRO; TURLINGS, 2005) divididos em dois grupos básicos quanto à natureza bioquímica das moléculas: os voláteis de folhas verdes (VFs) e os terpenóides (DUDAREVA; PICHERSKY; GERSHENZON, 2004). Os VFs compreendem aldeídos, alcoóis e seus ésteres de 6 carbonos na cadeia, que são produtos da degradação dos ácidos linoléico e linolênico, emitidos imediatamente após a indução. Já a produção dos terpenóides é mais tardia, uma vez que são produtos de rotas bioquímicas mais complexas e que envolvem a indução de genes relacionados à biossíntese dos fitohormônios AJ e AS, principais responsáveis pela coordenação da indução dos voláteis, e de etileno, que tem um papel modulador (VON DAHL; BALDWIN, 2006).

A emissão de voláteis não é restrita somente ao local danificado pelo herbívoro, mas ela também ocorre nos tecidos não danificados das plantas, caracterizando uma indução sistêmica que fornece uma maior proteção à planta (TURLINGS; TUMLINSON, 1992; DICKE et al., 1990b). O mecanismo pelo qual a resposta se torna sistêmica na planta ainda é muito discutido. Alguns autores acreditam que o AJ é a molécula sinalizadora responsável por tornar a emissão de voláteis sistêmica (WASTERACK et al., 2006), porém, outros estudos mostram que os próprios voláteis funcionam como mensageiros do ataque para as partes não danificadas da planta, que as

detectam externamente, provocando o desencadeamento da produção sistêmica (FROST et al., 2007).

A composição das misturas de voláteis induzidos pela herbivoria pode ser variável tanto quantitativamente quanto qualitativamente em função de diversos fatores bióticos (variedade da planta, órgão atacado, infecção por fitopatógenos, a espécie e o estágio do herbívoro, e a herbivoria simultânea de outras espécies) e abióticos (luminosidade, temperatura, nutrientes, humidade) e, por conseqüência, prejudicar o reconhecimento da mistura de voláteis induzidos pela herbivoria do hospedeiro (DE BOER et al., 2008; DE MORAES et al., 1998; ERB et al., 2008; GEERVLiet et al., 1997; GOUINGUENÉ; TURLINGS, 2002; KÖLLNER et al., 2004; ROSTÁS et al., 2006; TAKABAYASHI et al., 1995, 2006). Entretanto, mesmo frente a essa variabilidade, os parasitóides são capazes de aprender novas composições de mistura de voláteis ou a discriminar alguns voláteis específicos e, assim, contornar esses problemas (VET; LEWIS; CARDÉ, 1995).

A identificação do(s) composto(s)-chave da mistura na atração dos inimigos naturais é uma tarefa complexa (D'ALESSANDRO; TURLINGS, 2005). Em raros casos, a atração deve-se somente a um composto da mistura (RASMANN et al., 2005). Em geral, a atração depende da composição da mistura (MEINERS; WÄCKERS; WALLACE, 2003; D'ALESSANDRO et al., 2006), que, às vezes, pode ser difícil de ser determinada quimicamente devido a presença em quantidades muito pequenas desses compostos (D'ALESSANDRO et al., 2009).

Além da herbivoria, foi demonstrado que a oviposição dos insetos herbívoros também pode provocar a indução de defesas na planta e a produção de voláteis que atraem parasitóides de ovos (HILKER; MEINERS, 2002). Diferentemente da defesa desencadeada pela herbivoria, que é um fenômeno que ocorre em diversas espécies de plantas, a oviposição como estímulo na produção de químicos nas plantas atraentes ou arrestantes aos parasitóides foi reportado, por enquanto, em apenas três sistemas tritróficos (FATOUROS et al., 2005; HILKER et al., 2002; MEINERS; HILKER, 1997). Nesse caso, a substância que desencadeia a resposta defensiva da planta está presente na secreção adesiva que prende os ovos à superfície vegetal (HILKER; et al., 2005), ou pode ser o composto anti-afrodisíaco do macho depositado na fêmea durante a cópula (FATOUROS et al., 2008).

De acordo com Vinson (1998) os parasitóides de ovos enfrentam duas dificuldades no processo de seleção hospedeira. Uma delas refere-se ao pequeno tamanho do ovo e que, por isso,

é pouco aparente no ambiente e emite poucos compostos químicos detectáveis. A segunda é que os ovos estão presentes no ambiente por um curto intervalo de tempo, restringindo, portanto, o tempo viável para o parasitismo. Por isso, voláteis provenientes das plantas ou de outros estágios do hospedeiro, que são mais detectáveis e abundantes no ambiente, devem consistir em importantes pistas na busca pelo hospedeiro.

Há muitos estudos que relatam a importância de odores provenientes dos estágios não alvo do hospedeiro para os parasitóides de ovos (COLAZZA; ROSI; CLEMENTE, 1997). Porém, poucos trabalhos tratam do papel dos voláteis de plantas induzidos pela herbivoria na localização hospedeira dos parasitóides de ovos (LOU; MA; CHENG, 2005; MORAES et al., 2005, 2009; REDDY; HOLOPAINEN; GUERRERO, 2002).

O conhecimento a respeito dos voláteis de plantas sob o ataque dos herbívoros abre perspectivas interessantes para o seu emprego no campo em estratégias de Manejo Integrado de Pragas (MIP), por meio da manipulação da abundância e da distribuição dos inimigos naturais no campo. Devido a sua ação sobre os herbívoros, que pode ser atraente ou repelente dependendo do composto, os voláteis de plantas podem ser utilizados para orientar os herbívoros para locais específicos, ou afugentá-los das plantações (BERNASCONI et al., 1998; CAMELO; LANDOLT; ZACK, 2007; KHAN et al., 2008; LOUGHRIN; POTTER; HAMILTON-KEMP, 1995).

A implementação destas estratégias empregando os voláteis das plantas pode ser realizada por meio de compostos sintéticos (JAMES, 2005), aplicação de substâncias indutoras que ativam a produção de voláteis pela planta (THALER et al., 2002), ou pela manipulação genética da planta, que implica na ativação ou silenciamento dos genes responsáveis pela biossíntese dos voláteis (YU; UTSUMI, 2009).

Assim, visando entender melhor os odores importantes no forrageamento dos parasitóides de ovos e as interações mediadas pelos voláteis induzidos pelo ataque de herbívoros, o presente trabalho estudou o sistema tritrófico composto pelo milho (*Zea mays*), a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e os parasitóides de ovos *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Scelionidae) e *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Os objetivos do trabalho foram:

- avaliar a preferência e o parasitismo do parasitóide especialista de ovos *T. remus* em ovos de *S. frugiperda* de diferentes idades e verificar se a distinção entre as idades de ovos deve-se aos cairomônios presentes na superfície dos ovos;

- investigar se o milho emite voláteis desencadeados pela oviposição de *S. frugiperda* que seriam atraentes ao parasitóide *T. remus*;
- avaliar a resposta olfativa do parasitóide de ovos especialista *T. remus* e generalista *T. pretiosum* aos voláteis do milho induzidos pela herbivoria de *S. frugiperda*, em diferentes intervalos de indução, assim como determinar as misturas de voláteis liberadas pelo milho;
- avaliar se a oviposição de *S. frugiperda* na planta altera as defesas diretas e indiretas induzidas pela herbivoria. Nesse estudo, buscou-se avaliar a hipótese de que a planta, após receber posturas do herbívoro, prepara as suas defesas para o ataque futuro dos imaturos que irão eclodir.

Referências

- ALBORN, H.T.; TURLINGS, T.C.J.; JONES, T.H.; STENHAGEN, G.; LOUGHRIN, J.H.; TUMLINSON, J.H. An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. **Science**, Washington, v. 276, p. 945-949, 1997.
- AUGER, J.; LECOMTE, C.; PARIS, J.; THIBOUT, E. Identification of leek-moth and diamondback-moth frass volatiles that stimulate parasitoid, *Diadromus pulchellus*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 15, p. 1391-1398, 1989.
- BERNASCONI, M.L.; TURLINGS, T.C.J.; AMBROSETTI, L.; BASSETTI, P.; DORN, S. Herbivore-induced emissions of maize volatiles repel the corn-leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Edinburgh, v. 87, p. 133-142, 1998.
- CAMELO, L.A.; LANDOLT, P.J.; ZACK, R.S. A kairomone based attract-and-kill system effective against alfalfa looper (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 100, p. 366-374, 2007.
- COLAZZA, S., ROSI, M.C.; CLEMENTE, A. Response of egg parasitoid *Telenomus busseolae* to sex pheromone of *Sesamia nonagrioides*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 23, p. 2437-2444, 1997.
- COLAZZA, S.; FUCARINO, A.; PERI, E.; SALERNO, G.; CONTI, E.; BINI, F. Insect oviposition induces volatile emission in herbaceous plants that attracts egg parasitoids. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 207, p. 47-53, 2004.
- D'ALESSANDRO, M.; TURLINGS, T.C.J. *In situ* modification of herbivore-induced plant odors: a novel approach to study the attractiveness of volatile organic compounds to parasitic wasps. **Chemical Senses**, Oxford, v. 30, p. 739-753, 2005.

D'ALESSANDRO, M.; BRUNNER, V.; VON MÉREY, G.; TURLINGS, T.C.J. Strong attraction of the parasitoid *Cotesia marginiventris* towards minor volatile compounds of maize. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 35, p. 999-1008, 2009.

D'ALESSANDRO, M.; HELD, M.; TRIPONEZ, Y.; TURLINGS, T.C.J. The role of indole and other shikimic acid derived maize volatiles in the attraction of two parasitic wasps. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 32, p. 2733-2748, 2006.

DE BOER, J.G.; DICKE, M. Thee role of methyl salicylate in prey searching behavior of the predatory mite *Phytoseiulus persimilis*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 30, p. 255-271, 2004.

DE BOER, J.G.; HORDIJK, C.A.; POSTHUMUS, M.A.; DICKE, M. Prey and non-prey arthropods sharing a host plant: effects on induced volatile emission and predator attraction. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 34, p. 281-290, 2008.

DE MORAES, C. M.; MESCHER, M.C.; TUMLINSON, J. H. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. **Nature**, London, v. 410, p. 577-580, 2001.

DE MORAES, C.M.; LEWIS, W.J.; PARE, P.W.; ALBORN, H.T.; TUMLINSON, J.H. Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. **Nature**, London, v. 393, p. 570-573, 1998.

DICKE, M. Are herbivore-induced plant volatiles reliable indicators of herbivore identity to foraging carnivorous arthropods? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Edinburgh, v.91, p. 131-142, 1999.

DICKE, M.; SABELIS, M.W. How plants obtain predatory mites as bodyguards. **Netherlands Journal of Zoology**, Leiden, v. 38, p. 148-165, 1988.

DICKE, M.; VAN BAARLEN, P.; WESSELS, R.; DIKMAN, H. Herbivory induces systemic production of plant volatiles that attract predators of the herbivore: extraction of endogenous elicitor. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 19: 581-599, 1990b.

DICKE, M.; SABELIS, M.W., TAKABAYASHI, J.; BRUIN, J.; POSTHUMUS, M.A. Plant strategies of manipulating predator prey interactions through allelochemicals: prospects for application in pest control. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 16, p. 3091-3118, 1990a.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**, Rockville, v. 135, p. 1893-1902, 2004.

ENGELBERTH, J.; ALBORN, H.T.; SCHMELZ, E.A.; TUMLINSON, J.H. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, New York, v. 101, p. 1781-1787, 2004.

ERB, M.; JURRIAAN, T.; DEGENNHARDT, J.; TURLINGS, T.C.J. Interactions between arthropod-induced aboveground and belowground defenses in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 146, p. 867-874, 2008.

FATOUROS, N.E.; BUKOVINSZKINE' KISS, G.; KALKERS, L.A.; GAMBORENA, R.S. DICKE, M.; HILKER, M. Oviposition-induced plant cues: do they arrest *Trichogramma* wasps during host location? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Edinburgh, v. 115, p. 207-215, 2005.

FATOUROS, N.E.; BROEKGAARDEN; BUKOVINSZKINE' KISS, G.; van LOON, J.J.A.; MUMM, R.; HUIGENS, M.E.; DICKE, M.; HILKER, M. Male-derived butterfly anti-aphrodisiac mediates induced indirect plant defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, New York, v. 105, p. 10033-10038, 2008.

FROST, C.J.; APPEL, H.M.; CARLSON, J.E.; DE MORAES, C.M.; MESCHER, M.C. & SCHULTZ, J.C. Within-plant signaling via volatiles overcomes vascular constraints on systemic signaling and primes responses against herbivores. **Ecology Letters**, Malden, v. 10, p. 490-498, 2007.

GEERVLIET, J.B.F.; POSTHUMUS, M.A.; VET, L.E.M.; DICKE, M. Comparative analysis of headspace volatiles from different caterpillar-infested or uninfested food plants of *Pieris* species. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 23, p. 2935-2954, 1997.

GOUNGUENE, S.P.; TURLINGS, T.C.J. The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, p. 1296-1307, 2002.

HALITSCHKE, R.; SCHITTKO, U.; POHNERT, G.; BOLAND, W.; BALDWIN, I.T. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. III Fatty acid-amino acid conjugates in herbivore oral secretions are necessary and sufficient for herbivore specific plant responses. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, p. 711-717, 2001.

HEIDEL, A.J.; BALDWIN, I.T. Microarray analysis of salicylic acid- and jasmonic acid-signaling in responses of *Nicotiana attenuata* to attack by insects from multiple feeding guilds. **Plant, Cell and Environment**, Malden, v. 27, p. 1362-1373, 2004.

HILKER, M.; MEINERS, T. **Chemoecology of insect eggs and egg deposition**. Berlin: Blackwell Publishing, 2002. 390p.

_____. How do plants "notice" attack by herbivorous arthropods? **Biological Reviews**, Malden, v. 85, p. 267-280, 2009.

HILKER, M.; KOBBS, C.; VARAMA, M.; SCHRANK, K. Insect egg deposition induces *Pinus* to attract egg parasitoids. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 205, p. 455-461, 2002.

- HILKER, M.; STEIN, C.; SCHROEDER, R.; VARAMA, M.; MUMM, R. Insect egg deposition induces defense responses in *Pinus sylvestris*: characterization of the elicitor. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 208, p. 1849-1854, 2005.
- HOUNTONDJI, F.C.C.; SABELIS, M. W.; HANNA, R.; JANSSEN, A. Herbivore-induced plant volatiles trigger sporulation in entomopathogenic fungi: the case of *Neozygites tanajoae* infecting the cassava green mite. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 31, p. 1003-1021, 2005.
- HOWE, G.A.; JANDER, G. Plant immunity to insect herbivores. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 41-66, 2008.
- JAMES, D.G. Further field evaluation of synthetic herbivore-induced plant volatiles as attractants for beneficial insects. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 31, p. 481-494, 2005.
- KARBAN, R.; BALDWIN, I. T. **Induced responses to herbivory**. Chicago: The University of Chicago Press, 1997. 319 p.
- KESSLER, A.; BALDWIN, I.T. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. **Science**, Washington, v. 291, p. 2141-2144, 2001.
- KHAN, Z.R.; JAMES, D.G.; MIDEGA, C.A.O.; PICCKET, J.A. Chemical ecology and conservation biological control. **Biological Control**, San Diego, v. 45, p. 210-224, 2008.
- KÖLLNER, T.G.; SCHEENE, C.; GERSHENZON, J.; DEGENHARDT, J. The sesquiterpene hydrocarbons of maize (*Zea mays*) form five groups with distinct developmental and organ-specific distributions. **Phytochemistry**, Oxford, v. 65, p. 1895-1902, 2004.
- LEWIS, W.J.; JONES, R.L.; SPARKS, A.N. A host-seeking stimulant for the egg parasite *Trichogramma evanescens*. Its source and a demonstration of its laboratory and field activity. **Annals of Entomological Society of America**, Lanham, v. 65, p. 1087-1089, 1972.
- LEWIS W.J.; BEEVERS, M.; NORLUND, D.A.; GROSS JR, H.R.; HAGEN, K.S. Kairomones and their use for management of entomophagous insects. IX. Investigations of various kairomone-treatment patterns for *Trichogramma* spp. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 5, p. 673-680, 1979.
- LOU, Y.G.; MA, B.; CHENG, J.A. Attraction of the parasitoid *Anagrus nilaparvatae* to rice volatiles induced by the rice brown planthopper *Nilaparvata lugens*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 31, p. 2357-2372, 2005.
- LOUGHRIN, J.H.; POTTER, D.A.; HAMILTON-KEMP, T.R. Volatile compounds induced by herbivory act as aggregation kairomones for the Japanese beetle (*Popilia japonica* Newman). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 2, p. 1457-1467, 1995.

MAFFEI, M.E.; MITHÖFER, A.; BOLAND, W. Before gene expression: early events in plant-insect interaction. **Trends in Plant Science**, London, v. 12, p. 310-316, 2007.

MÄNTYLÄ, E.; ALESSIO, G.A.; BLANDE, J.D.; HEIJARI, J.; HOLOPAINEN, J.K.; LAAKSONEN, T.; PIIRTOLA, P.; KLEMOLA, T. From plants to birds: higher avian predation rates in trees responding to insect herbivory. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 3, p. 1-8, 2008.

MATTIACCI, L.; DICKE, M.; POSTHUMUS, M.A. β -Glucosidase: an elicitor of herbivore induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasp. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 92, p. 2036-2040, 1995.

MEINERS, T.; HILKER, M. Host location in *Oomyzus gallerucae* (Hymenoptera: Eulophidae), an egg parasitoid of the elm leaf beetle *Xanthogaleruca luteola* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Oecologia**, Heidelberg, v. 112, p. 87-93, 1997.

MEINERS, T.; WÄCKERS, F.; WALLACE, J.L. Associative learning of complex odours in parasitoid host location. **Chemical Senses**, Oxford, v. 28, p. 231-236, 2003.

MORAES, M.C.B.; LAUMANN, R.; SUJII, E.R.; PIRES, C.; BORGES, M. Induced volatiles in soybean and pigeon pea plants artificially infested with the neotropical brown stink bug, *Euchistus heros*, and their effect on the egg parasitoid, *Telenomus podisi*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Edinburgh, v. 115, p. 227-237, 2005.

MORAES, M.C.B.; LAUMANN, R.; PAREJA, M.; SERENO, F.T.P.S.; MICHEREFF, M.F.F.; BIRKETT, M.A.; PICKETT, J.A.; BORGES, M. Attraction of the stink bug egg parasitoid *Telenomus podisi* to defence signals from soybean activated by treatment with cis-jasmone. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Edinburgh, v. 131, p. 178-188, 2009.

MORAN, P.J.; THOMPSON, G.A. Molecular responses to aphid feeding in *Arabidopsis* in relation to plant defense pathways. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, p. 1074-1085, 2001.

NEALIS, V.G. Responses to host kairomones and foraging behavior of the insect parasite *Cotesia rubecula* (Hymenoptera, Braconidae). **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 64, p. 2393-2398, 1986.

OLIVEIRA, P.S. The ecological function of extrafloral nectarines: herbivore deterrence by visiting ants and reproductive output in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae). **Functional Ecology**, Oxford, v. 11, p. 323-330.

PARÉ, P.W.; FARAG, M.A.; KRISHNAMACHARI, V.; ZHANG, H.; RYU, C.M.; KLOPPER, J.W. Elicitors and priming agents initiate plant defense responses. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 85, p. 149-159, 2005.

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

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

REDDY, G.V.P.; HOLOPAINEN, J.K.; GUERRERO, A. Olfactory responses of *Plutella xylostella* natural enemies to host pheromone, larval frass, and green leaf cabbage volatiles. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 28, p. 131-143, 2002.

ROSTÁS, M.; TON, J.; MANI, B.M.; TURLINGS, T.C.J. Fungal infection reduces herbivore-induced plant volatiles of maize but does not affect naïve parasitoids. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 32, p. 1987-1909, 2006.

RUNYON, J.B.; MESCHER, M.C.; DE MORAES, C.M. Volatile chemical cues guide host location and host selection by parasitic plants. **Science**, Washington, v. 313, p. 1964-1967, 2006.

SHU, S.; SWEDENBORG, P.D.; JONES, R.L. A kairomone effect on the behavior of *Trichogramma nubilale* Ertle & Davis (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Isolation, identification and synthesis. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 16, p. 521-529, 1990.

STEINBERG, S.; DICKE, M.; VET, L.E.M. Relative importance of infochemicals from the first and second trophic level in long-range host location by the larval parasitoid *Cotesia glomerata*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 21, p. 525-539, 1993.

STRAND, M.R.; VINSON, S.B. Analysis of an egg recognition kairomone of *Telenomus heliothidis* (Hymenoptera: Scelionidae). Isolation and host fuction. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 9, p. 423-432, 1983.

_____. Source and characterization of an egg recognition kairomone of *Telenomus heliothidis*, a parasitoid of *Heliothis virescens*. **Physiological Entomology**, London, v. 7, p. 83–90, 1982.

STRONG, D.R.; LAWTON, J.H.; SOUTHWOOD, T.R.E. **Insects on Plants: Community Patterns and Mechanisms**. Oxford: Blackwell Science, 1984.313 p.

TAKABAYASHI, J.; TAKAHASHI, S.; DICKE, M.; POSTHUMUS, M.A. Developmental stage of herbivore *Pseudaletia separata* affects production of herbivore-induced synomone by corn plants. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 21: p.273-287, 1995.

TAKABAYASHI, J.; SABELIS, M.W.; JANSSEN, A.; SHIOJIRI, K.; VAN WIJK, M. Can plants betray the presence of multiple herbivore species to predators and parasitoids? The role of learning in phytochemical information networks. **Ecological Research**, Tokyo, v. 21, p. 3-8, 2006.

THALER, J.S.; FARAG, M.A.; PARÉ, P.W.; DICKE, M. Jasmonate-deficient plants have reduced direct and indirect defenses against herbivores. **Ecology Letters**, Malden, v. 5, p. 764-774, 2002.

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

_____. Systemic chemical signaling by herbivore-injured corn. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, New York, v.89, p. 8399-8402, 1992.

TURLINGS, T.C.J.; WÄCKERS, F. Recruitment of predators and parasitoids by herbivore-injured plants. In: CARDÉ, R.T.; MILLAR, J.G. (Ed.) **Advances in insect chemical ecology**. Cambridge: Cambridge University Press, 2004. p. 21-74.

TURLINGS, T.C.J.; ALBORN, H.T.; LOUCHRIN, J.H.; TUMLINSON, J.H. Volicitin, an elicitor of maize volatiles in oral secretion of *Spodoptera exigua*: isolation and bioactivity. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 26, p. 189-202, 2000.

TURLINGS, T.C.J.; McCALL, P.J.; ALBORN, H.T.; TUMLINSON, J.H. An elicitor in caterpillar oral secretions that induces corn seedlings to release parasitoid attractants. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 19, p. 411-425, 1993.

TURLINGS, T.C.J.; TUMLINSON, J.H.; ELLER, F.J.; LEWIS, W.J. Larval-damaged plants: source of volatile synomones that guide the parasitoid *Cotesia marginiventris* to the microhabitat of its hosts. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Edinburgh, v.58, p. 75-82, 1991a.

TURLINGS, T.C.J.; TUMLINSON, J.H.; HEATH, R.R.; PROVEAUX, A.T.; DOOLITTLE, R.E. Isolation and identification of allelochemicals that attract the larval parasitoid, *Cotesia marginiventris* (Cresson), to the microhabitat of one of its hosts. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 17, p. 2235-2251, 1991b

VET, L.E.M.; DICKE, M. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 37, p. 141-172, 1992.

VET, L.E.M. ; GROENEWOLD, A.W. Semiochemicals and learning in parasitoids. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 16, p. 3119-3135, 1990.

VET, L.E.M.; LEWIS, W.J.; CARDÉ, R.T. Parasitoid foraging and learning. In: CARDÉ, R.T.; BELL, W.J. (Ed.) **Chemical ecology of insects 2**. New York: Chapman & Hall, 1995. p.65-101.

VET, L.E.M.; WACKERS, T.A.; DICKE, M. How to hunt for hiding hosts: The reability-detectability problem in foraging parasitoids. **Netherlands Journal of Zoology**, Leiden, v. 41, p. 202-213, 1991.

VINSON, S.B. Host selection by insect parasitoids. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 21, p. 109-134, 1976.

_____. Parasitoid-host relationships. In: BELL, W.J.; CARDÉ, R.T. (Ed.) **Chemical ecology of insects**. London: Chapman and Hall, 1984. p. 205-233.

_____. The general host selection behavior of parasitoid Hymenoptera and a comparison of initial strategies utilized by larvaphagous and oophagus species. **Biological Control**, San Diego, v. 11, p. 79-96, 1998.

VON DAHL, C.C.; BALDWIN, I.T. Deciphering the role of ethylene in plant-herbivore interactions. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 26, p. 201-209, 2007.

WASTERNAK, C.; STENZEL, I.; HAUSE, B.; HAUSE, G.; KUTTER, C.; MAUCHER, H.; NEUMERKEL, J.; FEUSSNER, I. ; MIERSCH, O. The wound response in tomato- Role of Jasmonic Acid. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 163, p. 297-306, 2006.

YU, F.N.A.; UTSUMI, R. Diversity, regulation, and genetic manipulation of plant mono- and sesquiterpenoid biosynthesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Nara, v.66, p.3043-3052, 2009.

2 EFEITO DA IDADE DO HOSPEDEIRO NO PARASITISMO, PREFERÊNCIA E ARRESTAMENTO DE *Telenomus remus* NIXON (HYMENOPTERA: SCELIONIDAE)

Resumo

A idade dos ovos do hospedeiro pode ser um aspecto limitante no parasitismo. Dessa maneira, é esperado que ovos de idade mais avançada sejam menos preferidos pelos parasitóides, e que possam ser discriminados pelos seus cairomônios. O objetivo do presente trabalho foi estudar o parasitismo, preferência e o arrestamento dos cairomônios de ovos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) de diferentes idades pelo parasitóide *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Scelionidae). Para tanto, foi avaliado o parasitismo, em testes com e sem chance de escolha, assim como a emergência e a razão sexual dos adultos de *T. remus* desenvolvidos em ovos com 1, 2 e 3 dias de idade. O efeito de arrestamento dos cairomônios dos ovos foi avaliado em função do tempo de permanência do parasitóide sobre extratos hexânicos dos ovos incorporados em papel filtro. Os resultados mostraram que *T. remus* preferiu parasitar ovos de 1 e 2 dias de idade em relação aos ovos de 3 dias. Entretanto, a emergência dos parasitóides foi reduzida em ovos de 2 e 3 dias, enquanto que a razão sexual não foi alterada em ovos de diferentes idades. Todos os extratos hexânicos dos ovos exerceram efeito arrestante sobre o parasitóide em relação ao controle (solvente), porém o tempo de permanência dos parasitóides foi maior em extratos de ovos de 1 e 2 dias em comparação ao de 3 dias. De acordo com esses resultados, conclui-se que o parasitismo assim como a preferência de *T. remus* foram alterados em função da idade dos ovos de *S. frugiperda*. É possível que os cairomônios presentes nos ovos seja, em parte, responsáveis pela preferência de ovos de idade menos avançada.

Palavras-chave: Parasitóide de ovos; Idade do hospedeiro; Lagarta-do-cartucho; Controle biológico

Abstract

Age of host eggs can be a limiting factor in parasitism. Thus, it is expected that older eggs are less preferred by egg parasitoids, which can discriminate by egg kairomones. The aim of the current work was to study the parasitism, preference and arrestment of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) eggs of different ages for the parasitoid *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Scelionidae). In order to that, parasitism was measured in tests with and without choice as well as emergence and sexual ratio of *T. remus* adults developed on 1-, 2- and 3-day-old eggs. Arrestment effect of egg kairomones were assessed based on residence time of wasps on filter papers incorporated with hexanic egg extracts. Results showed that *T. remus* preferred to parasitize 1- and 2-day old eggs comparing with 3-day-old eggs. However, emergence of parasitoids was reduced in 2- and 3-day-old eggs while sexual ratio was not altered in eggs of different ages. All hexanic egg extracts elicited arrestment on parasitoid behavior in relation to the control (solvent), but residence time was higher on 1- and 2-day old egg extracts in comparison with 3-day-old. In view of these results, it was concluded that parasitism as well as preference of *T. remus* were changed depending on age of *S. frugiperda* eggs. It is possible that egg kairomones can be partly responsible for preference of younger eggs.

Key-words: Egg parasitoid, Host age, Fall armyworm, Biological control

2.1 Introdução

A seleção do hospedeiro pelos parasitóides é um processo que pode ser dividido nas seguintes etapas comportamentais: localização do habitat do hospedeiro, localização do próprio hospedeiro, reconhecimento e aceitação (VINSON, 1976, 1984). Para isso, os parasitóides utilizam pistas químicas e/ou físicas provenientes do hospedeiro, da planta ou da interação herbívoro-planta (BORGES et al., 1999; HILKER; MEINERS, 2002).

Os parasitóides de ovos devem ser eficientes no processo de localização do seu hospedeiro, pois a duração do estágio de ovo é geralmente curta (BAVARESCO et al., 2002; BUSATO et al., 2005). Além disso, a idade dos ovos é um parâmetro importante da qualidade do hospedeiro e pode afetar a biologia do parasitóide, como a taxa de parasitismo, o tempo de desenvolvimento (DA ROCHA et al. 2006), a emergência (BRUCE; SCHULTHESS; MUEKE, 2009), o tamanho corporal e a razão sexual (RUBERSON E KRING, 1993); ou o seu comportamento, como a preferência e a aceitação dos ovos. Esses efeitos são normalmente negativos com a idade mais avançada do hospedeiro e devem-se às alterações na composição química ou físicas do ovo, uma vez que os nutrientes vão sendo gradualmente consumidos pelo embrião do hospedeiro e o cório se torna rígido (BAI et al. 1992; BARRET; SCHMIDT, 1991).

Com base nos caracteres do ovo que modificam ao longo do tempo, o parasitóide pode discriminar hospedeiros de idade adequada ao desenvolvimento e essa preferência pode prover uma prole mais numerosa e vigorosa, incrementando, dessa forma, o *fitness* da espécie (PYKE; PULLIAM; CHARNOV, 1977; SCHMIDT; SMITH, 1985; STRAND; VINSON, 1983; VINSON, 1976, 1998).

Assim, o presente estudo teve como objetivos estudar a preferência e o desenvolvimento do parasitóide de ovos *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Scelionidae) em ovos de diferentes idades do seu hospedeiro preferencial, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (SCHWARTZ; GERLING, 1974). Como complemento desse estudo, foi investigado também se o parasitóide discrimina a idade do ovo em função dos compostos superficiais dos ovos do hospedeiro, em testes de arrestamento.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Criação dos Insetos

Os insetos utilizados nos experimentos foram provenientes de criações mantidas em uma sala a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, UR de $70\pm 10\%$ e 12 h de fotofase, no Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos, ESALQ/USP.

A população de *S. frugiperda* foi proveniente da criação do Laboratório de Biologia de Insetos, ESALQ/USP, e foi criada em dieta artificial (GREENE; LEPPLA; DICKERSON, 1976), de acordo com a metodologia descrita por Parra (2001).

Para a criação do parasitóide de ovos *T. remus*, posturas de *S. frugiperda* foram coladas em cartelas brancas de 2,5 cm de largura por 5 cm de altura e colocadas em tubos de vidro de 9 cm de altura e 3 cm de diâmetro, fechados em sua extremidade com filme plástico PVC, contendo os parasitóides. Apenas uma cartela de ovos por dia foi oferecida em cada tubo de vidro após 2-3 dias da emergência dos parasitóides, sendo retirada após um período de 5 horas. Logo após a emergência dos adultos, gotículas de mel puro foram colocadas na parede interna dos tubos para a alimentação dos parasitóides (GAUTAM, 1986). Em todos os bioensaios foram utilizadas fêmeas de *T. remus* com 3-4 dias de idade, alimentadas e sem experiência prévia ao parasitismo de *S. frugiperda*. A discriminação entre os sexos foi baseada nas características das antenas descritas por Picho (1987).

2.2.2 Ensaios de preferência

2.2.2.1 Testes sem chance de escolha

Nos ensaios sem chance de escolha, foi avaliada a preferência com base nas características biológicas do parasitóide *T. remus* em ovos de *S. frugiperda* com 1, 2 e 3 dias de idade, referentes à 2, 3 e 4ª postura das fêmeas.

Previamente, os ovos foram gentilmente individualizados utilizando um pincel embebido com água destilada. Foram feitas cartelas de 1cm^2 com 50 ovos de cada tratamento, e colocadas no fundo de um tubo de vidro. Em cada tubo, foi colocada uma fêmea de *T. remus*, que permaneceu por 2h, durante a fotofase. Os tubos foram transferidos para câmaras climatizadas a $28\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e UR de $70\pm 10\%$, durante o fotoperíodo. Após 2h, as fêmeas foram retiradas dos

tubos, que permaneceram nas câmaras até a emergência dos parasitóides. Duas vezes ao dia, as lagartas provenientes dos ovos não parasitados foram removidas e contabilizadas.

Registrou-se o número de machos e fêmeas emergidos, assim como o número de ovos parasitados que não deram origem a adultos (ovos escuros e murchos). Avaliaram-se a taxa de parasitismo, a viabilidade (% de emergência) e a razão sexual dos adultos emergidos (fêmea/fêmea + macho).

2.2.2.2 Testes com chance de escolha

Em ensaios com chance de escolha, foi avaliada a preferência de *T. remus* por ovos de 1, 2 e 3 dias de idade de *S. frugiperda*. Foram confeccionadas 3 cartelas de 1 cm² com 50 ovos de cada idade e coladas em uma tira de papelão, em seqüências ao acaso para evitar tendência devido ao posicionamento. Cada conjunto foi colocado em um tubo de vidro de fundo chato, de 9 cm de altura e 3 cm de diâmetro, no qual foi introduzida uma fêmea do parasitóide, que permaneceu por um período de 4h, em câmaras climatizadas a 28±0,5°C e UR de 70±10%, durante o período da fotofase.

Após o parasitismo, as cartelas de ovos de 1, 2 e 3 dias de idade de cada repetição foram separadas e individualizadas em tubos de vidro. Os tubos permaneceram em câmaras climatizadas a 28±0,5°C, UR de 70±10% e 12h de luz durante todo o ensaio. Duas vezes ao dia, as lagartas provenientes dos ovos não parasitados foram removidas e contabilizadas. Após um período de 10 dias, os machos emergiram algumas horas antes das fêmeas. Após 2 dias, todos os parasitóides encontravam-se mortos, pois não foram alimentados com mel, o que diminuiu drasticamente a sua longevidade. A preferência foi avaliada baseando-se na porcentagem de parasitismo de ovos de cada idade.

2.2.3 Ensaios de arrestamento

Os ensaios de arrestamento foram baseados em Gazit, Lewis e Tumlinson (1996). Os testes observacionais consistiram na avaliação do tempo de permanência do parasitóide sobre um papel de filtro incorporado com extrato hexânico dos ovos. A preparação desses extratos foi realizada pesando ovos de *S. frugiperda*, que foram transferidos para frascos de vidro limpos e adicionado

o solvente hexano no volume equivalente à concentração 60 mg/ml. Após 3h, o extrato foi transferido para um outro frasco e levado ao freezer -20°C. Posteriormente, as amostras foram concentradas em N₂ gasoso para a redução do volume de solvente para 200µL, resultando na concentração de 150 mg/ml. Os testes foram conduzidos em uma sala climatizada a 25±2°C, UR e 60±10% sob a luz vermelha. Dez minutos anteriormente ao ensaio, um quadrado de 1 cm² de papel de filtro foi incorporado com 20 µl de extrato. Esse papel foi transferido para uma placa de Petri de vidro de 14,2 cm de diâmetro, limpa previamente com acetona e etanol. Cada observação consistiu na contagem do tempo de permanência da fêmea de *T. remus* por um período máximo de 5 min. Caso a fêmea saísse do papel de filtro e permanecesse fora dessa área por um período superior a 20 segundos, a repetição era considerada encerrada. Porém, se a fêmea retornasse nesse intervalo ao papel de filtro, o teste continuava, sem interrupção. Como controle, foi utilizado o hexano. Cada tratamento consistiu, no mínimo, de 20 repetições e cada inseto foi testado apenas uma vez.

Primeiramente, foram testados extratos de ovos provenientes de fêmeas com diferentes idades, referentes a 2, 4, 5, 6 e 7^a postura. Esse teste foi um controle para verificar se a idade da fêmea influenciaria no teste com extratos de ovos de 1, 2 e 3 dias. De acordo com os dados (Figura 2.5), foram utilizados ovos provenientes da 2^a a 5^a posturas para a preparação dos extratos de ovos de 1, 2 e 3 dias de idade, sem interferência da idade da fêmea.

2.2.4 Análise dos dados

Sempre que as premissas da ANOVA não foram violadas, os dados foram analisados pela ANOVA One-way e as médias de cada tratamento comparadas pelo teste de Duncan ($\alpha=0,05$). Para os demais casos, foi empregado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, sendo as médias comparadas pelo método de Dunn ($\alpha=0,05$).

2.3 Resultados

No ensaio sem chance de escolha, observou-se parasitismo médio de 92 e 96%, respectivamente, para ovos com 1 e 2 dias de idade (Figura 2.1), taxas superiores às observadas sobre ovos de 3 dias de idade, cuja a média foi de 66% (Kruskal-Wallis; $H=17,11$; $P<0,01$;Dunn

$P < 0,05$). De forma semelhante, no teste com chance de escolha, o parasitismo foi menor em ovos de 3 dias de idade, cuja média foi de 36%, em relação aos ovos de 1 e 2 dias de idade que apresentaram parasitismo de 60 e 56%, respectivamente (Figura 2.2, ANOVA $F=3,581$ $P=0,037$; Duncan $P < 0,05$).

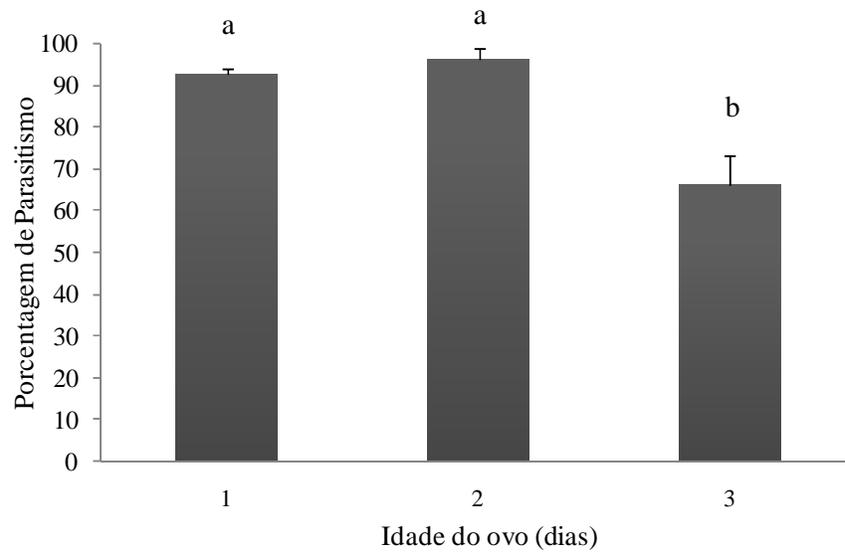


Figura 2.1 – Porcentagem de parasitismo de *Telenomus remus* em ovos de *Spodoptera frugiperda* com 1, 2 e 3 dias de idade em ensaio sem chance de escolha. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($n=10$; Dunn $P < 0,05$)

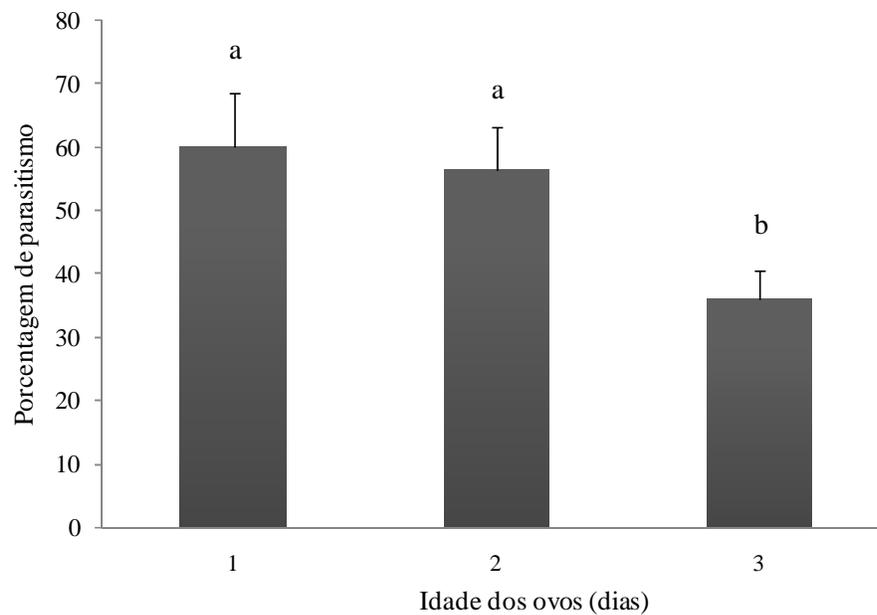


Figura 2.2 – Porcentagem de parasitismo de *Telenomus remus* em ovos de *Spodoptera frugiperda* com 1, 2 e 3 dias de idade em ensaio com chance de escolha. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($n=15$; Duncan $P < 0,05$)

A porcentagem média de emergência dos parasitóides diminuiu conforme a idade do ovo, sendo significativamente maior no ovo mais novo, de 1 dia de idade (74%), em relação às idades de 2 e 3 dias, que foram, respectivamente, de 54 e 13% (Figura 2.3; ANOVA $F=49,935$; $P<0,001$; Duncan $P<0,05$). A emergência em ovos de 2 dias de idade foi significativamente superior aos de 3 dias (Duncan $P<0,05$). Por outro lado, a razão sexual apresentou uma sutil diminuição com a idade avançada do ovo (1dia: 0,86; 2 dias: 0,79; 3 dias: 0,74), porém não diferiu entre as diferentes idades (Figura 2.4; Kruskal-Wallis $H=0,324$; $P=0,850$).

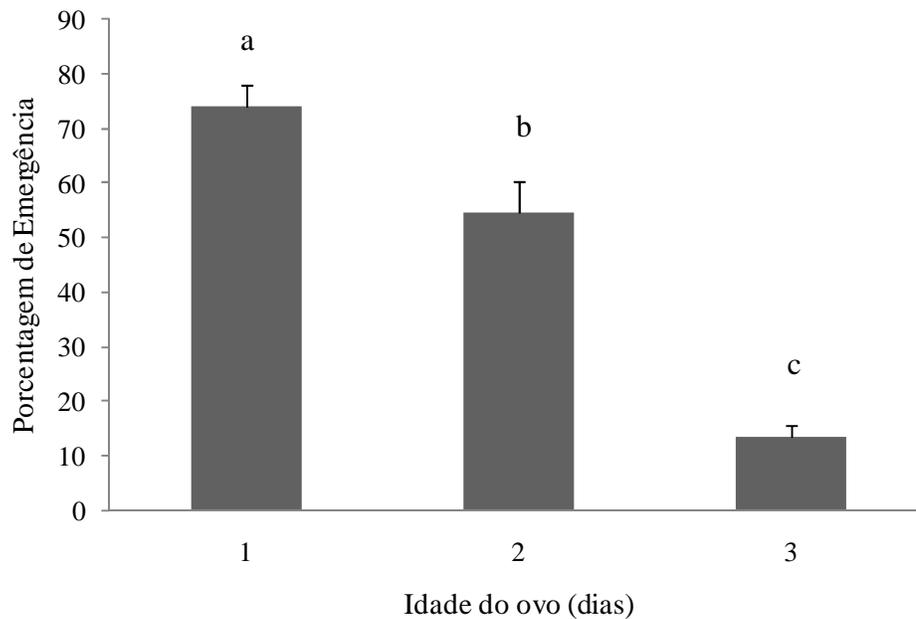


Figura 2.3 – Porcentagem de emergência de *Telenomus remus* em ovos de *Spodoptera frugiperda* com 1, 2 e 3 dias de idade em ensaio sem chance de escolha. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($n=10$; Duncan $P<0,05$)

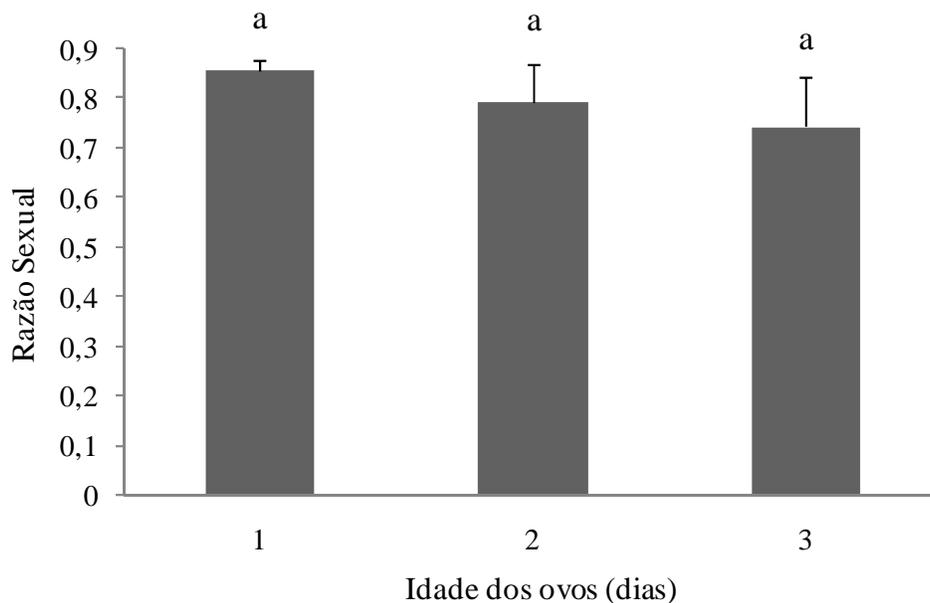


Figura 2.4 – Razão sexual de *Telenomus remus* desenvolvido em ovos de *Spodoptera frugiperda* com 1, 2 e 3 dias de idade em ensaio sem chance de escolha. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos (n=10; Kruskal-Wallis $P>0,05$)

Nos testes em que se verificou o efeito da idade da fêmea de *S. frugiperda* sobre o arrestamento dos extratos dos ovos, *T. remus* permaneceu, em média, por 22s, sobre o papel de filtro incorporado apenas com o hexano (controle) (Figura 2.5), que foi semelhante ao efeito arrestante produzido pelos extratos hexânicos da 7ª postura de *S. frugiperda*, cujo tempo médio de permanência foi de 62s (Dunn $P>0,05$). Entretanto, o tempo de permanência nestes dois tratamentos foi significativamente menor quando comparado aos dos extratos da 2ª, 3ª, 5ª e 6ª posturas, que foram, em média, de 174, 140, 156 e 132s, respectivamente (Kruskal-Wallis $H=48,87$; $P<0,001$; Dunn $P<0,05$). Dessa maneira, foi possível utilizar ovos da 2ª a 6ª postura de *S. frugiperda* para a preparação de extratos do ensaio de idade do ovo.

No ensaio de arrestamento em que se testou a idade do ovo, os parasitóides permaneceram, em média, por 44s em papéis de filtro incorporados com o solvente hexano, um tempo significativamente menor em relação a todos os extratos de ovos, independentemente da idade (Figura 2.6; ANOVA $F=10,337$; $P<0,001$). As fêmeas, no entanto, permaneceram por um tempo significativamente superior sobre o papel de filtro quando incorporado com extrato de ovos de 1 dia de idade em relação ao de 3 dias, cujo tempo médio reduziu de 204 para apenas 125s (Duncan $P<0,05$). O tempo médio de permanência do parasitóide sobre o extrato de ovos de 2 dias de idade foi de 195s que exerceu um efeito arrestante semelhante ao de 1 e ao de 3 dias ($P>0,05$).

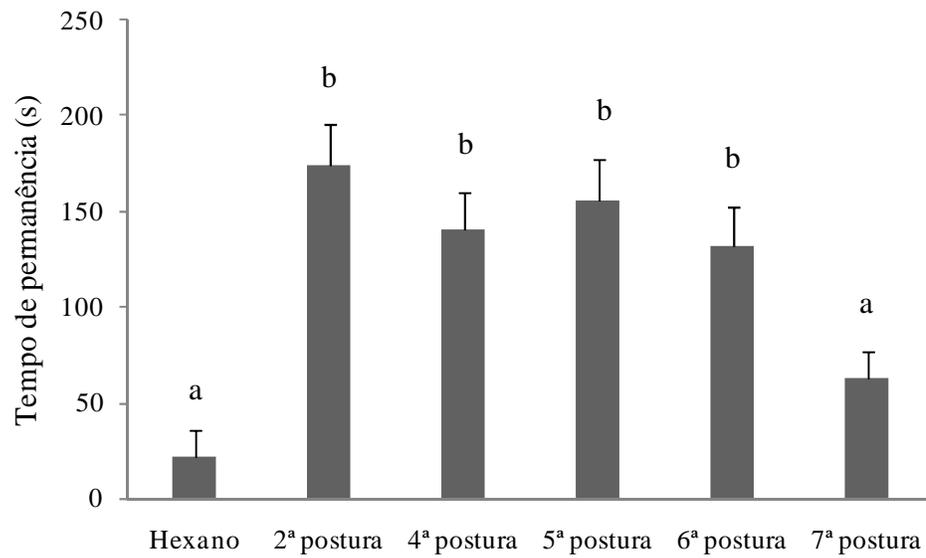


Figura 2.5 – Tempo de permanência de *Telenomus remus* sobre papel de filtro incorporado com hexano (controle), e extratos hexânicos de ovos de *Spodoptera frugiperda* de diferentes idades. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos (n=20; Dunn $P < 0,05$)

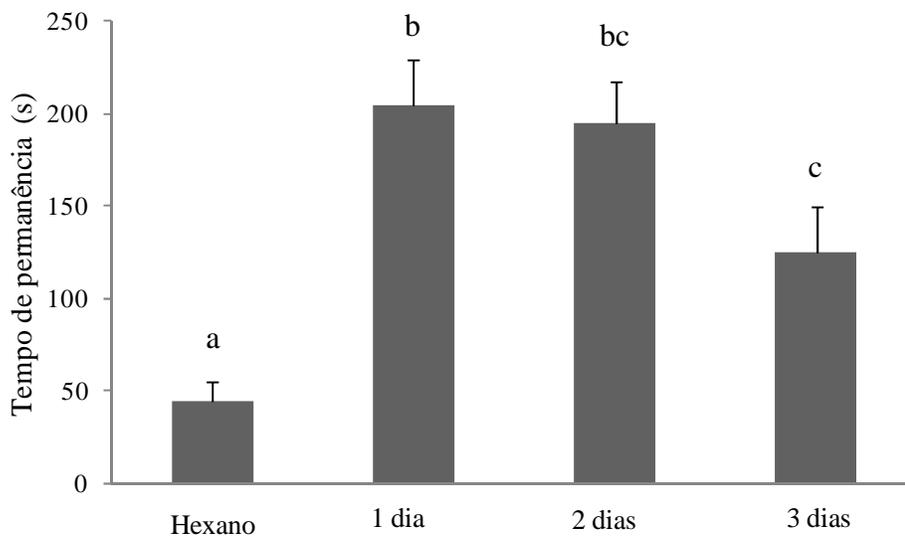


Figura 2.6 – Tempo de permanência de *Telenomus remus* sobre papel de filtro incorporado com hexano (controle), e extratos hexânicos de ovos de *Spodoptera frugiperda* com 1, 2 e 3 dias de idade. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos (n=20; Duncan $P < 0,05$)

2.4 Discussão

A qualidade do hospedeiro para os parasitóides de ovos consiste basicamente em dois fatores: a espécie e a idade do ovo (LIU; ZHANG; ZHANG, 1998). Este último é limitante, pois o desenvolvimento do embrião do hospedeiro demanda os nutrientes estocados nos ovos e, por isso, ovos de idade mais avançada são geralmente hospedeiros de baixa qualidade nutricional. Além disso, a larva do parasitóide não é capaz de digerir a cutícula do hospedeiro, impossibilitando a utilização dos nutrientes a partir do embrião em estágio de desenvolvimento avançado (STRAND; MEOLA; VINSON, 1986).

Dessa maneira, a seleção de ovos mais jovens para o parasitismo implica em uma melhor qualidade nutricional para o desenvolvimento da progênie. A maior parte dos estudos retrata que a idade mais avançada do ovo influencia negativamente em algum parâmetro biológico da progênie (SOUZA; SPENCE, 2001; TUNÇBILEK; AYVAZ, 2003). Entretanto, há trabalhos que indicam que ovos mais velhos não produzem qualquer efeito sobre o parasitismo ou ao desenvolvimento (JACOB; JODER; BATCHELOR, 2006; PAK et al. 1986).

Os resultados do presente estudo mostraram que o parasitóide *T. remus* tem preferência por ovos mais novos, de 1 e 2 dias de idade, sendo os ovos de 3 dias menos parasitados (Figuras 2.1 e 2.2). No entanto, a análise dos parâmetros de desenvolvimento da progênie revelou que a emergência dos parasitóides é maior em ovos de 1 dia em relação ao de 2 e 3 dias de idade (Figura 2.3). Esses resultados sugerem que a preferência e a ampla aceitação dos ovos de 2 dias para o parasitismo não condizem com um melhor desenvolvimento da progênie, contrariando a teoria do forrageamento ótimo (PYKE; PULLIAM; CHARNOV, 1977). Ruberson e Kring (1993) mostraram resultados semelhantes do parasitóide de ovos *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) que parece não discriminar ovos de idade inadequada para o desenvolvimento da progênie.

Outras espécies de parasitóides também preferem ovos novos e de idade intermediária para o parasitismo (MONJE; ZEBITZ; OHNERSORGE, 1999; MORENO; PÉREZ-MORENO; MARCO, 2009; REZNIK; UMAROVA, 1990). Em outras espécies de Scelionidae, foi igualmente verificada a preferência por ovos novos (DA ROCHA et al., 2006; ROMEIS; SHANOWER; MADHURI, 2000).

Em relação aos demais parâmetros, a razão sexual de *T. remus* não foi alterada em função da idade do ovo (Figura 2.4), assim como o tempo de desenvolvimento, que foi de 11 dias em todos os tratamentos (dados não apresentados). Embora a alteração na razão sexual desviada para uma proporção de machos seja bem conhecida em ovos de idade avançada (SOUSA; SPENCE, 2001), o mesmo não foi constatado em outras espécies da família Scelionidae, como em *Gryon gallardoi* (Brethes) (DA ROCHA et al., 2006) e *Telenomus isis* (Hymenoptera: Scelionidae) (BRUCE; SCHULTHESS; MUEKE, 2009).

A idade do ovo adequada depende da espécie de hospedeiro, já que o desenvolvimento embrionário varia entre as espécies (CHABI-OLAYE et al. 2001; MONJE; ZEBITZ; OHNESORGE, 1999; PAK et al.; 1986). Outros trabalhos que estudaram o parasitismo de *T. remus* em ovos de outras espécies de *Spodoptera* revelaram resultados diferentes dos obtidos nesse trabalho. (DASS; PARSHAD, 1983; GERLING; SCHWARTZ, 1974).

Os compostos químicos superficiais dos ovos de *S. frugiperda* apresentaram efeito arrestante para o parasitóide *T. remus* (Figuras 2.6), que se manteve no papel de filtro, caminhando em círculos, ou parado, vibrando as antenas sobre a superfície. Por vezes, o parasitóide saiu da área do papel de filtro, mas retornou em poucos segundos. Após algumas repetições desse breve movimento, o parasitóide caminhou a uma distância maior do papel de filtro, retornando dentro de 20s, ou desistindo.

Entre os diferentes tratamentos (idade do ovo), os extratos de ovos de 1 e 2 dias de idade foram mais arrestantes para o parasitóide do que o de 3 dias (Figura 2.6). É possível que tenha ocorrido uma significativa redução ou alteração nos cairomônios presentes nas posturas de idade mais avançada, e que, por isso, os extratos de 3 dias exerceram menor arrestamento sobre os parasitóides.

Gazit, Lewis e Tumlinson (1996) realizaram testes semelhantes com o parasitóide *T. remus* utilizando extratos hexânicos de ovos de *S. frugiperda*, porém, avaliaram outros parâmetros, como a idade da fêmea e dose dos extratos. Nesse trabalho, os autores demonstraram que, igualmente aos extratos dos ovos, os extratos do corpo da fêmea e do macho adultos, assim como o composto majoritário do feromônio sexual do hospedeiro promoveram efeito arrestante. Dessa maneira, não é claro se o efeito arrestante dos extratos dos ovos deve-se aos compostos próprios das posturas, ou das escamas que cobrem as posturas e ao feromônio que pode ficar impregnado.

No presente estudo, tomou-se o cuidado de remover o máximo possível das escamas das posturas antes da preparação dos extratos. As posturas com escamas em excesso não foram utilizadas. Mesmo assim, não se pode descartar que pelo menos parte do efeito arrestante dos extratos dos ovos deve-se aos compostos das escamas, comprovadamente importante para diversas espécies de parasitóides de ovos (JONES et al., 1973; SHU; SWEDENBORG; JONES, 1990; GROSS et al. 1984; FILHO; LIMA, 2003).

Outro aspecto importante e limitante no parasitismo de ovos mais velhos é o endurecimento do cório, que dificulta a penetração do ovipositor (LEIBEE; PASS; YEARGAN, 1979; IRVIN; HODDLE, 2005). Portanto, é possível que o baixo parasitismo de ovos de idade mais avançada seja decorrente de outra razão que não a atração e o arrestamento exercido pelos cairomônios dos ovos.

A habilidade de parasitar um amplo intervalo de idade dos ovos deve ser um atributo que confere um maior potencial do parasitóide em controlar a praga em campo. No caso de *T. remus*, os resultados sugerem que a localização dos ovos de *S. frugiperda* pode ser crítica em ovos com mais de 2 dias de idade, assim como o parasitismo e a emergência são também limitados. Assim, esse parasitóide deve ser eficiente na busca de ovos para manter a sua população, pois os ovos adequados ao seu parasitismo e progênie estão restritos à idade e abrangem um curto intervalo de tempo.

Além disso, os resultados apresentados nesse trabalho são extremamente relevantes para a criação dos parasitóides *T. remus* em laboratório, pois mostram que para obter indivíduos de boa qualidade e também manter a criação em altos níveis de produtividade, é necessário utilizar ovos de *S. frugiperda* de 1 dia de idade.

Referências

- BAI, B.; LUCK, R.F.; FORSTER, L.; STEPHENS, B.; JANSSEN, J.A.M. The effect of host size on quality attributes of the egg parasitoid, *Trichogramma pretiosum*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Edinburgh, v. 64, p. 37-48, 1992.
- BARRET, M.; SCHIMDT, J.M. A comparison between the amino acid composition of na egg parasitoid wasp and some of its hosts. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Edinburgh, v. 59, p. 29-41, 1991.

BAVARESCO, A.; GARCIA, M.S.; GRÜTZMACHER, A.D.; FORESTI, J.; RINGENBERG, R. Biologia e exigências térmicas de *Spodoptera cosmioides* (Walk.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, p. 49-54, 2002.

BORGES, M.; COSTA, M.L.M.; SUJII, E.R.; CAVALCANTI, M.; REDÍGOLO, G.F.; RESCK, T.S.; VILELA, E.F. Semiochemical and physical stimuli involved in host recognition by *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae) toward *Euchistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). **Physiological Entomology**, London, v. 24, p. 227-233, 1999.

BRUCE, A.Y.; SCHULTHESS, F.; MUEKE, J. Host acceptance, suitability, and effects of host deprivation on the west African egg parasitoid *Telenomus isis* (Hymenoptera: Scelionidae) reared on east African stem borers under varying temperature and humidity regimens. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 38, p. 904-919, 2009.

BUSATO, G.R.; GRÜTZMACHER, A.D.; GARCIA, M.S.; GIOLO, F.P.; ZOTTI, M.J.; STEFANELLO JÚNIOR, G.J. Biologia comparada de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) em folhas de milho e arroz. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, p. 743-750, 2005.

CHABI-OLAYE, A.; SCHULTHESS, F.; POEHLING, H.M.; BORGEMEINSTER, C. Factors affecting the biology of *Telenomus isis* (Polaszek) (Hymenoptera: Scelionidae), an egg parasitoid of Cereal stem borers in West Africa. **Biological Control**, San Diego, v. 21, p. 44-54, 2001.

DA ROCHA, L.; KOLBERG, R.; MENDONÇA JR., M.S.; REDAELLI, L.R. Effects of egg age of *Spartocera denticentris* (Berg) (Hemiptera: Coreidae) on parasitism by *Gryon gallardoi* (Brethes) (Hymenoptera: Scelionidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, p. 654-659, 2006.

DASS, R.; PARSHAD, B. Rearing of important lepidopterous pests on known artificial diet and screening for preferred hosts of parasite, *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Scelionidae). **Journal of Entomological Research**, New Delhi, v. 8, p. 89-92, 1983.

FILHO, M.L.; LIMA, J.O.G. Efeito de escamas de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) na produção de *Trichogramma galloi* Zucchi criado em ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller). **Revista Universidade Rural**, Série Ciências da Vida, Seropédica, v. 22, p.23-31, 2003.

GAUTAM, R.D. Limitations in mass-multiplication of scelionid, *Telenomus remus* Nixon, a potential egg-parasitoid of *Spodoptera litura* (Fabricius). **Journal of Entomological Research**, New Delhi, v. 11, p. 6-9, 1986.

GAZIT, Y.; LEWIS, W.J.; TUMLINSON, J.H. Arrestment of *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae) by a kairomone associated with eggs of its host, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**, San Diego, v. 6, p. 283-290, 1996.

GERLING, D.; SCHWARTZ, A. Host selection by *Telenomus remus*, a parasite of *Spodoptera littoralis* eggs. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Edinburgh, v. 17, p. 391-396, 1974.

REENE, G.L.; LEPPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar. A rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 69, p. 447-448, 1976.

GROSS, H.R.; LEWIS, W.J.; BEEVERS, M.; NORLUND, D.A. *Trichogramma pretiosum*: effect of augmented densities and distributions of *Heliothis zea* host eggs and kairomones on field performance. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 13, p. 981-985, 1984.

HILKER, M.; MEINERS, T. **Chemoecology of insect eggs and egg deposition**. Berlin: Blackwell Publishing, 2002. 390p.

IRVIN, N.A.; HODDLE, M.S. Determination of *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae) egg ages suitable for oviposition by *Gonatocerus ashmeadi*, *Gonatocerus triguttatus*, and *Gonatocerus fasciatus* (Hymenoptera: Mymaridae). **Biological Control**, San Diego, v. 32, p. 391-400, 2005.

JACOB, H.S.; JODER, A.; BATCHELOR, K.L. Biology of *Stethynium* sp. (Hymenoptera: Mymaridae), a native parasitoid of an introduced weed biological control agent. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 35, p. 630-636, 2006.

JONES, R.L.; LEWIS, W.J.; BEROZA, M.; BIERL, B.A.; SPARKS, A.N. Host-seeking stimulants (kairomones) for the egg parasite, *Trichogramma evanescens*. **Journal of Animal Ecology**, Malden, v. 6, p. 298-317, 1973.

LEIBEE, G.L.; PASS, P.C.; YEARGAN, K.V. Development rates of *Patasson lameerei* (Hym.: Mymaridae) and the effect of host egg age on parasitism. **Entomophaga**, Paris, v. 24, p. 345-348, 1979.

LIU, S.S.; ZHANG, G.M.; ZANG, F. Factors influencing parasitism of *Trichogramma dendrolimi* on eggs of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*. **BioControl**, Amsterdam, v. 43, p. 273-287, 1998.

MONJE, J.C.; ZEBITZ, C.P.; OHNESORGE, B. Host and host age preference of *Trichogramma galloi* and *T. pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) reared on different hosts. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 92, p. 97-103, 1999.

MORENO, F., PÉREZ-MORENO, I.; MARCO, V. Effects of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) egg age, density, and UV treatment on parasitism and development of *Trichogramma cacoeciae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Environmental Entomology**, Lanham, v. 38, p. 1513-1520, 2009.

NORDLUND, D. A.; STRAND, M. R.; LEWIS, W. J.; VINSON, S.B. Role of kairomones from host accessory gland secretion in host recognition by *Telenomus remus* and *Trichogramma pretiosum*, with partial characterization. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Edinburgh, v. 44, p. 37-43, 1987.

PAK, G.A.; BUIS, C.E.M.; HECK, I.C.C.; HERMANS, M.L.G. Behavioural variations among strains of *Trichogramma* spp.: Host-age selection. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Edinburgh, v. 40, p. 247-258, 1986.

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

PICHO, H.G. Biologia de *Telenomus remus* Nixon (Hym.: Scelionidae). **Revista Peruana de Entomologia**, Lima, v. 30, p. 29-32, 1987.

PYKE, G.H.; PULLIAM, H.R.; CHARNOV, E.L. Optimal foraging: a selective review of theory and tests. **The Quarterly Review of Biology**, Chicago, v. 52, p. 137-154, 1977.

REZNIK, S.Y.; UMAROVA, T.Y. The influence of host's age on the selectivity of parasitism and fecundity of *Trichogramma*. **Entomophaga**, Paris, v. 35, p. 31-37, 1990.

ROMEIS, J.; SHANOWER, T.G.; MADHURI, K. Biology and field performance of *Gryon clavigrallae* (Hymenoptera: Scelionidae), an egg parasitoid of *Clavigralla* spp. (Hemiptera: Coreidae) in India. **Bulletin of Entomological Research**, New Delhi, v. 90, p. 253-263, 2000.

RUBERSON, J.R.; KRING, T.J. Parasitism of developing eggs by *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae): host age preference and suitability. **Biological Control**, San Diego, v.3, p.39-46, 1993.

SCHMIDT, J.M.; SMITH, J.J.B. Host volume measurement by the parasitoid wasp *Trichogramma minutum*: the roles of curvature and surface area. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Edinburgh, v. 39, p. 213-221, 1985.

SCHWARTZ, A.; GERLING, D. Adult biology of *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae) under laboratory conditions. **Entomophaga**, Paris, v. 19, p. 482-492, 1974.

SHU, S.; SWEDENBORG, P.D.; JONES, R.L. A kairomone effect on the behavior of *Trichogramma nubilale* Ertle & Davis (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Isolation, identification and synthesis. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 16, p. 521-529, 1990.

SOUZA, J.M.; SPENCE, J.R. Host age and parasitism by *Tiphodytes gerriphagus* (Hymenoptera: Scelionidae), an egg parasitoid of water striders (Heteroptera: Gerridae). **Annals of the Entomological Society of America**, Lexington, v. 94, p. 681-685, 2001.

STRAND, M.R.; VINSON, S.B. Analysis of an egg recognition kairomone of *Telenomus heliothidis* (Hymenoptera: Scelionidae). Isolation and host function. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 9, p. 423-432, 1983.

STRAND, M.R.; MEOLA, S.M.; VINSON, S.B. Correlating pathological symptoms in *Heliothis virescens* eggs with development of the parasitoid *Telenomus heliothidis*. **Journal of Insect Physiology**, Tel Aviv, v. 32, p. 389-402, 1986.

TUNÇBILEK, A.S.; AYVAZ, A. Influences of host age, sex ratio, population density, and photoperiod on parasitism by *Trichogramma evanescens* Westw. (Hym., Trichogrammatidae). **Journal of Pest Science**, Heidelberg, v. 76, p. 176-180, 2003.

VINSON, S.B. Host selection by insect parasitoids. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 21, p. 109-134, 1976.

_____. **Parasitoid-host relationships**. In: BELL, W.J.; CARDÉ, R.T. (Ed.) *Chemical Ecology of Insects*. London: Chapman and Hall, 1984. p. 205-233.

VINSON, S.B.; BIN, F.; VET, L.E.M. Critical issues in host selection by insect parasitoids. **Biological Control**, San Diego, v. 11, p. 77-78, 1998.

3 A PLANTA DE MILHO EMITE VOLÁTEIS INDUZIDOS PELA OVIPOSIÇÃO DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)?

Resumo

A indução de voláteis na planta pela herbivoria tem sido comumente descrita em plantas das mais diversas famílias. A oviposição dos herbívoros também induz na planta a emissão de voláteis atraentes aos parasitóides de ovos, no entanto, essa interação foi descrita em apenas dois sistemas. O presente trabalho investigou se a planta de milho emite voláteis induzidos pela oviposição de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) por meio da avaliação da resposta comportamental do parasitóide especialista *Telenomus remus* (Hymenoptera: Noctuidae) e pela coleta e identificação dos odores emitidos pelas plantas em diferentes intervalos de tempo (1, 2 e 3 dias). Adicionalmente, foi observada a superfície foliar do milho sob microscopia eletrônica de varredura. Os resultados dos bioensaios e da coleta de voláteis não mostram que a oviposição de *S. frugiperda* induz a emissão de voláteis no milho atraentes ao parasitóide *T. remus*. Contudo, a oviposição promoveu um efeito de supressão da emissão do volátil orgânico linalol. A imagem de MEV mostrou que as marcas deixadas nas folhas pela remoção das posturas de *S. frugiperda* devem-se à deposição da secreção do oviduto e, aparentemente, não ocorre dano na superfície foliar ocasionadas pela oviposição. De acordo com esses resultados, a oviposição de *S. frugiperda* não induz a produção *de novo* de voláteis no milho, mas suprime a liberação de linalol.

Palavras-chave: Parasitóide de ovos, Atração, Voláteis de planta, Oviposição, Linalol

Abstract

Herbivore-induced plant volatiles have commonly been reported in plants of several families. Herbivore oviposition also elicits emission of attractive plant volatiles for egg parasitoids though this interaction was only reported in two systems. The current work investigated if maize plant emits oviposition-induced volatiles elicited by *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) by assessing behavioral response of the specialist egg parasitoid *Telenomus remus* (Hymenoptera: Noctuidae) and by volatile collection and identification of odors emitted by oviposition-induced plants at different time intervals (1, 2 and 3 days). Additionally, it was observed maize leaf surface by scanning electron microscopy. Bioassay results and volatile collection do not show that *S. frugiperda* oviposition induces the emission of attractive volatiles for the parasitoid *T. remus*. However, oviposition promoted a suppression effect on the emission of linalool, a volatile organic compound. SEM image revealed that the marks left on the leaves after removing *S. frugiperda* egg masses are due to deposition of oviduct secretion and, apparently, there was no damage inflicted by oviposition on leaf surface. In view of these results, *S. frugiperda* oviposition does not induce *de novo* production of volatiles on maize, but rather suppresses release of linalool.

Key-words: Egg parasitoid, Attraction, Plant volatiles; Oviposition; Linalool

3.1 Introdução

No processo de localização do hospedeiro, os parasitóides larvais são guiados principalmente por compostos voláteis emitidos pela planta sob o ataque de seus hospedeiros (McCALL et al., 1993). Essa interação entre os inimigos naturais e plantas mediada pelos voláteis induzidos pelo ataque de herbívoros foi intensamente estudada desde a década de 1990, sendo comprovada em diversas espécies de plantas (DICKE; VAN LOON, 2000). São raros os casos de plantas que não emitem voláteis induzidos pela herbivoria de insetos (TOOKER; DE MORAES, 2007a).

Mais recentemente, foi demonstrado que a oviposição dos herbívoros também pode induzir a emissão de voláteis nas plantas capazes de atrair seletivamente parasitóides de ovos. No entanto, desde o primeiro relato, a indução de voláteis de plantas desencadeada exclusivamente pela oviposição foi comprovada em apenas duas espécies vegetais. O primeiro sistema descrito refere-se à oviposição do besouro *Xanthogaleruca luteola* Muller (Coleoptera: Chrysomelidae) na planta *Ulmus minor* (Miller) e a conseqüente emissão de voláteis para a atração do parasitóide de ovos *Oomyzus gallerucae* (Fonscolombe) (Hymenoptera: Eulophidae) (MEINERS; HILKER 1997; MEINERS; WESTERHAUS; HILKER, 2000). O segundo trata da oviposição de *Diprion pini* (L.) (Hymenoptera: Diprionidae) em *Pinus silvestris* (L.), atraindo *Chrysonotomyia ruforum* Krausse (Hymenoptera: Eulophidae) (HILKER et al., 2002; MUMM et al., 2005). Há ainda um terceiro sistema em que o feijão *Phaseolus vulgaris* L. emite voláteis atraentes ao parasitóide de ovos *Trissolcus basalus* (Wollaston) (Hymenoptera: Scelionidae) quando danificado pela oviposição e herbivoria do percevejo verde *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) (COLAZZA et al., 2004; COLAZZA; MCELFRISH; MILLAR, 2004), entretanto, neste caso, a oviposição, isoladamente, não promove o mesmo efeito sobre os parasitóides.

A razão para a descrição de poucos sistemas com esse tipo de defesa induzida pela oviposição parece estar relacionado ao comportamento particular de oviposição dos insetos na planta. Antes de depositarem seus ovos, tanto *X. luteola* quanto *D. pini* danificam a superfície foliar com o aparelho bucal ou o ovipositor, respectivamente. Esse dano físico é essencial para o contato da substância elicitadora presente na secreção do oviduto com o interior do tecido vegetal (MEINERS; HILKER, 2000; MUMM et al., 2003). Porém, é possível também que, por se tratar

de uma descoberta recente, mais estudos precisem ser conduzidos a fim de investigar a ocorrência dessas defesas em outras espécies vegetais.

A detecção de ovos na superfície da planta pode também ocorrer devido ao contato persistente com a superfície foliar ou por substâncias da secreção do oviduto que colam os ovos à superfície cerosa e acabam penetrando no seu interior (HILKER; MEINERS, 2006; HILKER; MEINERS, 2009). Outro fato interessante que pode ser responsável pelo desencadeamento de defesas após a oviposição é a presença de ácido jasmônico (AJ) e ácido salicílico (AS) nos ovos que, por serem moléculas sinalizadoras da defesa na planta, induzem as rotas bioquímicas e a transcrição de genes envolvidos na produção das defesas (TOOKER; DE MORAES, 2005, 2007b).

Acredita-se que a capacidade de emissão de voláteis pelas plantas na atração de parasitóides de ovos seja uma adaptação evolutiva mais vantajosa do que a observada para os parasitóides larvais, visto que esses últimos necessitam de sinais químicos induzidos pelo ataque do herbívoro, ao passo que os primeiros são atraídos antes da eclosão das larvas (HILKER; 2002; MUMM et al., 2005). Sendo assim, espera-se que um maior número de espécies vegetais do que as reportadas tenham desenvolvido esse tipo de defesa para as espécies de herbívoros que exercem pressão do intenso ataque.

O presente trabalho investigou se a planta de milho *Zea mays* L. emite voláteis induzidos pela oviposição de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) por meio da avaliação da resposta comportamental do parasitóide especialista *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Noctuidae) e pela coleta dos odores das plantas induzidas pela oviposição, em diferentes intervalos de tempo. Adicionalmente, foi observada a superfície foliar do milho sob microscopia eletrônica de varredura para verificar como ocorre a interação dos ovos com a folha.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Cultivo das plantas e criação dos insetos

As plantas de milho (*Zea mays* var. Delprim) foram cultivadas no substrato comercial Basiplant[®] e mantidas em casa-de-vegetação. Foram utilizadas plantas com 8-10 dias após a emergência, contendo 3 folhas.

A população de *S. frugiperda* foi proveniente da criação do Laboratório de Biologia de Insetos, ESALQ/USP, e foi criada em dieta artificial (GREENE; LEPPLA; DICKERSON, 1976), de acordo com a metodologia descrita por PARRA, (2001).

Para a criação do parasitóide de ovos *T. remus*, posturas de *S. frugiperda* com até 24 horas de idade foram coladas em cartelas brancas de 2,5 cm de largura por 5 cm de altura e colocadas em tubos de vidro de 9 cm de altura e 3 cm de diâmetro, fechados em sua extremidade com filme plástico PVC, contendo os parasitóides. Apenas uma cartela de ovos por dia foi oferecida em cada tubo de vidro após 2-3 dias da emergência dos parasitóides e a mesma foi retirada após um período de 5 horas. Logo após a emergência dos adultos, gotículas de mel puro foram colocadas na parede interna dos tubos para a alimentação dos parasitóides (GAUTAM, 1986). As fêmeas para os bioensaios foram separadas com base nas características das antenas descritas por Picho (1987).

Todas as criações foram mantidas em uma sala a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, UR de $70\pm 10\%$ e 12 h de fotofase, no Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos, ESALQ/USP.

3.2.2 Bioensaios em olfatômetro

A resposta olfativa das fêmeas de *T. remus* alimentadas, com 3-4 dias de idade e sem experiência de parasitismo, foi avaliada em um olfatômetro em Y para discriminar a preferência do inseto quando exposto a dois odores.

Os ensaios foram conduzidos em uma sala climatizada mantida a $25,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ e $60,0 \pm 10,0\%$ UR e fotofase de 12 h. O olfatômetro utilizado era constituído de um tubo de vidro bifurcado, de 2,5 cm de diâmetro, e braços de 9,0 cm de comprimento. Os tratamentos foram acondicionados em câmaras de vidros conectadas a duas extremidades do olfatômetro. À porção distal do braço principal (na qual os insetos foram liberados) foi ligada uma mangueira conectada à bomba a vácuo que succionou o ar do ambiente para o interior do sistema. O ar, anteriormente à passagem nas câmaras com os tratamentos, foi purificado ao passar por um filtro de carvão ativado, e umidificado (Figura 3.1). Fluxômetros conectados à entrada do ar permitiram calibrar o fluxo de ar dentro do sistema, que foi de 300 ml/min.

Para avaliar o efeito dos odores das plantas induzidas e dos ovos de *S. frugiperda*, foram realizados bioensaios com as seguintes combinações de tratamentos: (i) Planta Intacta ('PI') vs.

Planta Induzida pela Oviposição ('PIO'); (ii) Planta Induzida pela Oviposição ('PIO') vs. Ovos ('O'); e (ii) Planta Induzida pela Oviposição ('PIO') vs. Planta Intacta+Ovos ('PI+O'). Todos os tratamentos foram testados nos intervalos de tempo: dia 1, 2 e 3; considerando-se que os voláteis induzidos pela oviposição, diferentemente da indução pela herbivoria, são emitidos após períodos mais longos (HILKER et al., 2002; TURLINGS et al. 1998).

Para a obtenção de posturas de *S. frugiperda* nas plantas, três fêmeas com idade aproximada de três dias, ou seja, em início de oviposição (ESCALDANTE, 1974), provenientes da criação de laboratório, foram colocadas em gaiolas de *voile* acopladas às plantas de milho por uma noite. No dia seguinte, as plantas contendo 2 a 3 posturas médias foram separadas para o tratamento 'PIO' (Figura 3.2). Dessa maneira, nos bioensaios, foi utilizado o mesmo número de posturas de *S. frugiperda* para os tratamentos 'O' e 'PI+O', equivalente ao que continha na 'PIO'.

Os ensaios foram realizados durante a manhã (10:00-12:00h). Em cada repetição, uma fêmea de *T. remus*, sem experiência de oviposição, foi introduzida no braço central do olfatômetro e observada por um período máximo de cinco minutos, em que foi registrada a escolha por um dos tratamentos. A escolha do parasitóide por um dos tratamentos foi considerada após o cruzamento de uma linha que divide a metade do comprimento do braço lateral e a permanência nesse local por pelo menos 20 segundos.

O olfatômetro foi trocado a cada 5 repetições e o lado do tratamento invertido a cada 2 repetições. Cada bioensaio consistiu de, no mínimo, 30 repetições, conduzidas em 4 dias diferentes. Após cada bioensaio, o olfatômetro e as câmaras de tratamento foram lavados com Extran® a 10%, água destilada, acetona (93%) e álcool (90%), e secos em estufa a 160°C por 1 hora.

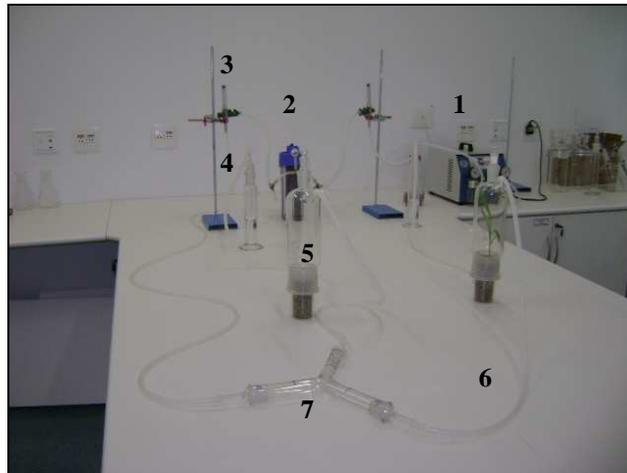


Figura 3.1 - Sistema de olfatometria. (1): bomba a vácuo; (2): filtro de carvão ativado; (3): fluxômetro; (4): umidificador; (5): câmara de vidro; (6): mangueira de silicone; (7): olfatômetro em Y



Figura 3.2 – Planta de milho que foi induzida pela oviposição de *Spodoptera frugiperda* (tratamento ‘PIO’). As setas em vermelho indicam as posturas de *S. frugiperda*

3.2.3 Coleta e Identificação dos voláteis

Os voláteis das plantas de milho sem oviposição (planta intacta) e aquelas induzidas pela oviposição de *S. frugiperda* foram coletados nos dias 1 e 2 por um período de 4h, e durante 12h na noite entre os dias 1 e 2, para verificar a produção *de novo* de algum composto.

O sistema de coleta de voláteis e a metodologia empregada foram descritos detalhadamente por Turlings et al. (1998). Para a realização da coleta de voláteis as plantas foram acondicionadas em câmaras de vidro acopladas ao sistema de aeração, cujo fluxo de entrada foi de 1,1 L/min (Figura 3.3 A). Para o bombeamento de ar no interior do sistema, utilizou-se uma bomba a vácuo que succionou o ar a 0,8 L/min e foi conectada aos filtros de coleta dos voláteis acoplados às câmaras contendo as plantas. Os filtros consistiram de um tubo de vidro fino com 25 mg de polímero adsorvente Super-Q® em seu interior (Figura 3.3 B).



Figura 3.3 - A: câmaras de vidro com as plantas de milho, conectadas ao sistema de coleta de voláteis; B: filtro de tubo de vidro com o polímero adsorvente Super-Q® sendo eluído com solvente diclorometano

Os filtros de Super-Q® expostos aos odores das plantas foram lavados com 150 μ l de solvente diclorometano e o extrato foi armazenado em frascos de vidro vedados mantidos em um freezer a -86°C , até a análise. A cada amostra, foi adicionado 10 μ l de uma solução de 200 ng de n-octane e nonyl acetate, como padrão interno.

As análises foram realizadas em um equipamento CG Agilent 78901 com o injetor ajustado em splitless, detector de ionização de chama (FID) e Hélio como gás de arraste (24 cm/s). De cada amostra, foi injetada uma alíquota de 3 µl em uma coluna capilar apolar EC-1 (30 m de comprimento 0,25mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura de parede). Após a injeção, a temperatura da coluna foi mantida a 40°C por 3 min, elevada a uma velocidade de 8°C/min até atingir 100°C e depois reduzida para 5°C/min até 220°C. O sinal do detector foi processado com o software MSD ChemStation. Para a identificação, os espectros de massa dos compostos dados pelo equipamento EM Agilent VLMSD 59956 foram comparados com as bibliotecas “Plantvol.1”(específica para voláteis de milho) e “NIST05a”.

3.2.4 Microscopia eletrônica de varredura

Secções do tecido foliar da ‘PI’ e ‘PIO’ com as posturas removidas foram transferidas para tubos do tipo eppendorf® contendo solução fixadora (3% glutaraldeído + 3% paraformaldeído em tampão cacodilato 50 mM, pH 7,2, contendo 5mM de CaCl₂), onde permaneceram até a preparação das amostras. Posteriormente, o material vegetal foi lavado em tampão cacodilato 50 mM, pH 7,2 + 5mM de CaCl₂ (3x10 min), pós fixado em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão e desidratado em concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%), antes da secagem em ponto crítico (CPD-030 Balzers, BAL-TEC), montagem em “stubbs” e metalização em ouro (SDC-050 Sputter Coater, BAL-TEC). A Análise e o registro fotográfico foram realizados em microscópio eletrônico de varredura Zeiss LEO.

3.2.5 Análise dos dados

Os dados de escolha dos bioensaios em olfatômetro em Y foram analisados pelo teste de qui-quadrado, ao nível de 5 e 1% de probabilidade. Os parasitóides que não responderam dentro dos 5 min foram desconsiderados da análise.

A quantidade estimada de voláteis emitidos pelas plantas induzidas pela oviposição foram analisados pelo teste t, a 5 e 1% de probabilidade. Essas análises foram realizadas utilizando o software SigmaStat (Versão 2.03).

3.3 Resultados

O parasitóide *T. remus* não mostrou preferência por odores de plantas de milho intactas ('PI') ou induzidas pela oviposição ('PIO') no dia 1 (Figura 3.4; qui-quadrado; $P>0,05$). No entanto, um número significativamente maior de fêmeas de *T. remus* escolheu o tratamento 'PIO' nos dias 2 e 3 (qui-quadrado; $P<0,05$).

O mesmo efeito de 'PIO' não foi constatado quando testou estes odores frente aos do tratamento 'PI+O', pois o parasitóide não apresentou preferência pelos odores de 'PIO' ou 'PI+O' em nenhum dos dias (Figura 3.5; qui-quadrado; $P>0,05$).

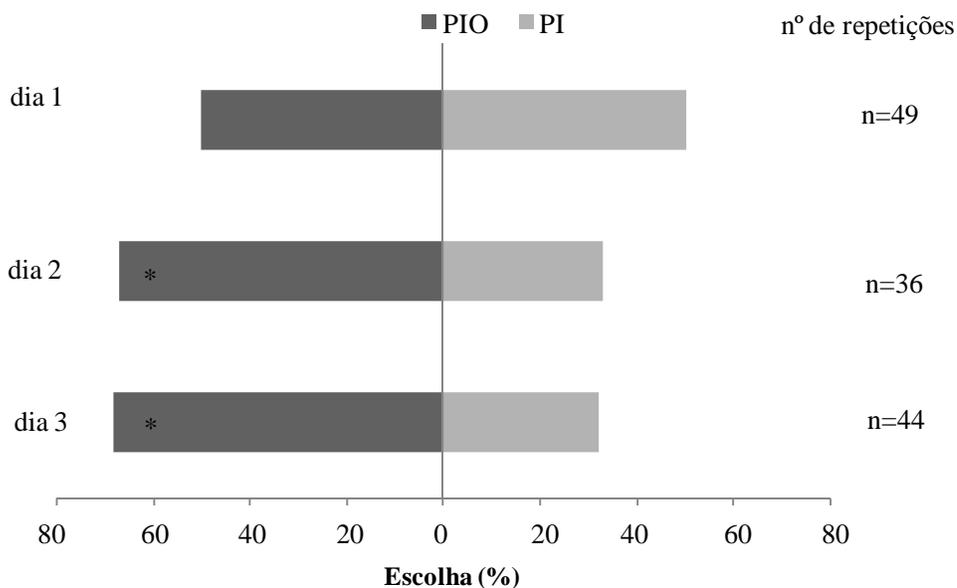


Figura 3.4 – Porcentagem de escolha do parasitóide *Telenomus remus*, sem experiência, frente aos odores da planta de milho de milho intacta ('PI') e a planta induzida pela oviposição de *Spodoptera frugiperda* ('PIO') nos dias 1, 2 e 3. * 5% de significância pelo teste de qui-quadrado

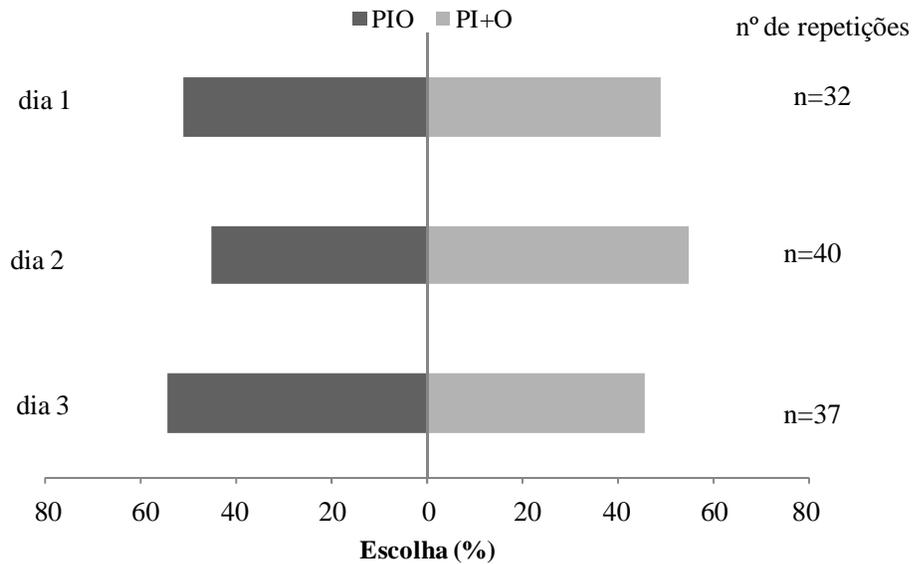


Figura 3.5 – Porcentagem de escolha do parasitóide *Telenomus remus*, sem experiência, frente aos odores da planta de milho induzida pela oviposição de *Spodoptera frugiperda* ('PIO') e planta de milho intacta+ovos ('PI+O') nos dias 1, 2 e 3

Os tratamentos 'PI' e 'PIO' no dia 1 emitiram β -mirceno em quantidades semelhantes (Figura 3.6; teste t; $t=0,843$; $P=0,424$). Entretanto, linalol e acetato de geranila foram emitidos em quantidades menores pela 'PIO' em relação à emissão da 'PI' (linalol: $t=4,513$ e $P=0,002$; acetato de geranila $t=2,409$ e $P=0,043$).

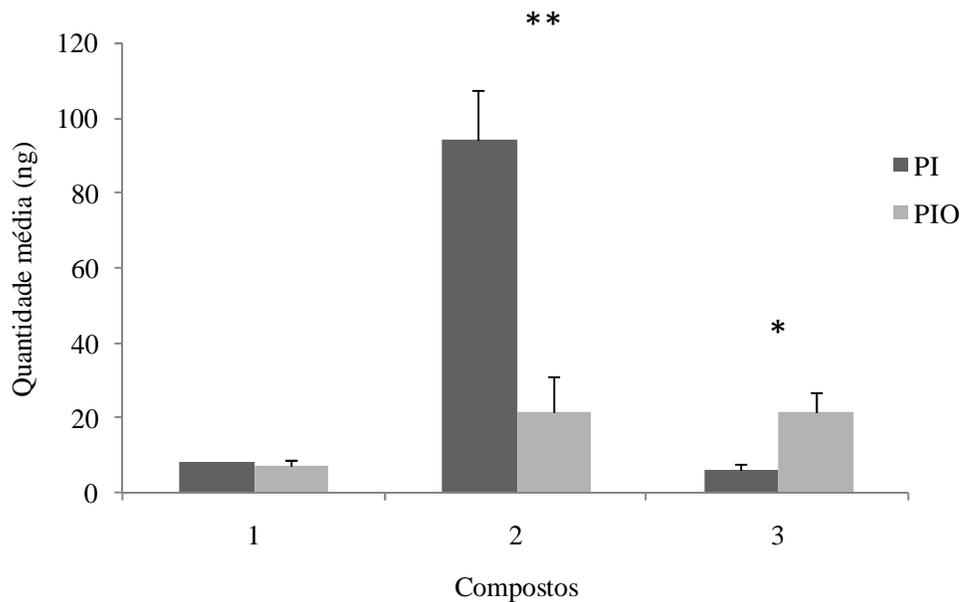


Figura 3.6 – Emissão de voláteis (ng±EP) pela planta de milho induzida pela oviposição de *Spodoptera frugiperda* ('PIO') e pela planta intacta ('PI') no dia 1 (n=5). Compostos: 1- β -mirceno; 2- linalol; 3- acetato de geranila.

* 5% de significância pelo teste t; ** 1% de significância pelo teste t

No período entre os dias 1 e 2, a emissão de β -mirceno foi semelhante em 'PI' e 'PIO' (Figura 3.7; $t=0,013$ e $P=0,990$), porém, a quantidade de linalol emitida foi significativamente maior em 'PI', uma vez que não foi detectada a emissão desse composto em 'PIO' ($t=4,221$; $P=0,004$). No dia 2, 'PIO' e 'PI' emitiram β -mirceno e linalol em quantidades semelhantes (Figura 3.8; β -mirceno: $t=0,023$ e $P=0,982$; linalol $t=0,964$ e $P=0,372$).

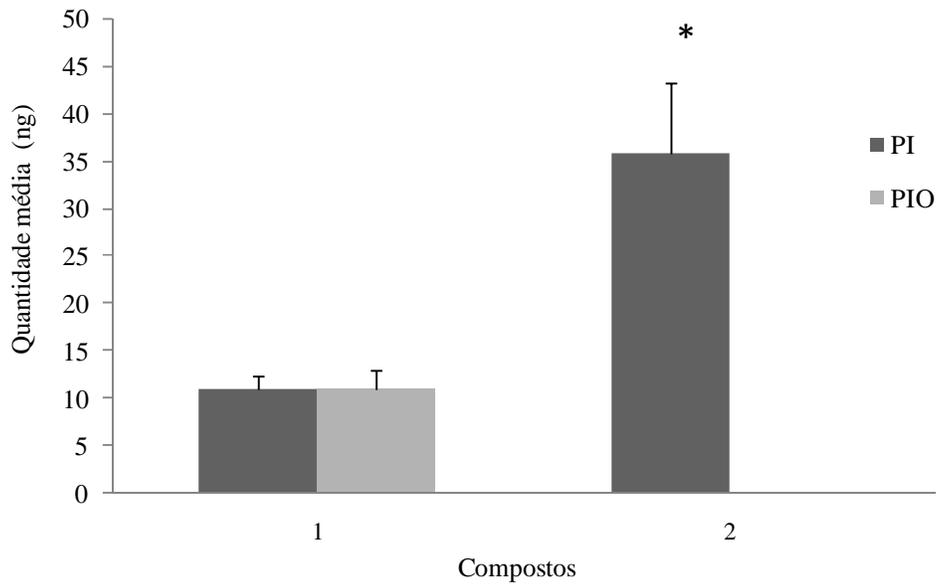


Figura 3.7 – Emissão de voláteis (ng±EP) pela planta de milho induzida pela oviposição de *Spodoptera frugiperda* ('PIO') e pela planta intacta ('PI') na noite entre os dias 1 e 2 (n=4). Compostos: 1- β-mirceno; 2- linalol.

* 5% de significância pelo teste t

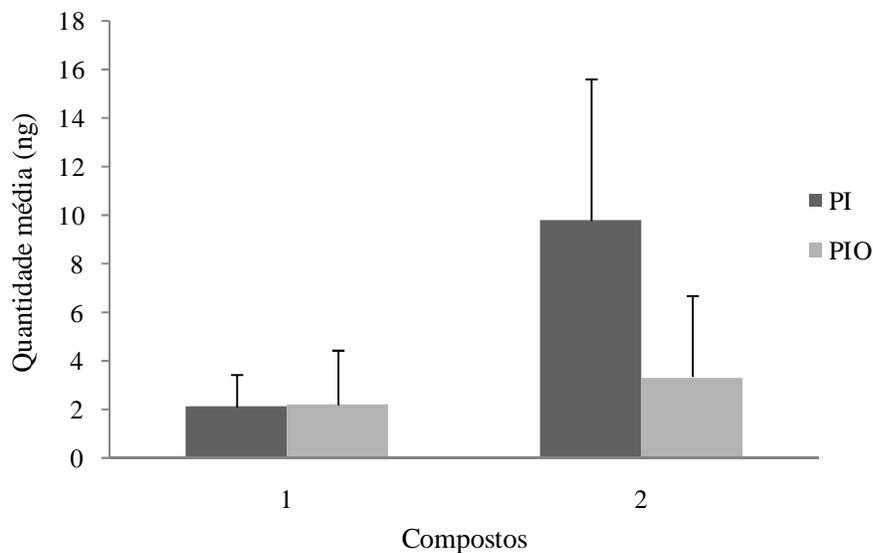


Figura 3.8 – Emissão de voláteis (ng±EP) pela planta de milho induzida pela oviposição de *Spodoptera frugiperda* ('PIO') e pela planta intacta ('PI') no dia 2 (n=4). Compostos: 1- β-mirceno; 2- linalol.

Quando as plantas de milho foram induzidas pela oviposição de *S. frugiperda*, foi possível visualizar as marcas deixadas na superfície foliar após a remoção dos ovos (Figura 3.9 A). A microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelou que essas pontuações deixadas pelos ovos

constituem regiões concêntricas mais elétron-densas (Figura 3.9 B). A cobertura esbranquiçada na superfície e ao redor dos ovos é, provavelmente, a secreção do oviduto que atua como adesivo dos ovos.

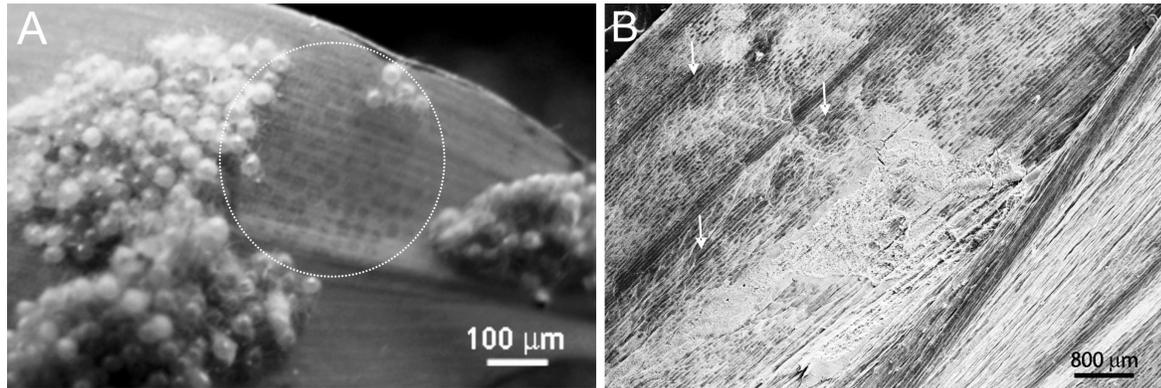


Figura 3.9 – Face abaxial da folha da planta de milho induzida pela oviposição (‘PIO’) com destaque das impressões deixadas pela remoção das posturas (A:círculo; B: setas). A: imagem no aumento de 10x; B: imagem do microscópio eletrônico de varredura (25x)

3.4 Discussão

A resposta comportamental de *T. remus* frente aos odores emitidos pela planta de milho induzida pela oviposição (‘PIO’) e a planta intacta (‘PI’) nos dias 2 e 3 mostrou que poderia haver algum(ns) composto(s) atraente(s) específico(s) alterando o comportamento do parasitóide (Figura 3.4). No entanto, esse mesmo efeito não foi verificado quando os odores de ‘PIO’ foram confrontados com a planta intacta+ovos (‘PI+O’) indicando que a atração do parasitóide poderia estar relacionada a uma combinação dos odores da planta induzida pela postura de *S. frugiperda* e dos ovos que permaneceram sobre a planta (Figura 3.5).

A oviposição de *S. frugiperda* pode induzir uma maior produção de acetato de geranila somente no dia 1 (Figura 3.6). Embora em menor quantidade, esse composto também foi emitido pela ‘PI’. Dessa maneira, é possível que ‘PIO’ tenha emitido o acetato de geranila em maiores quantidades devido à manipulação da planta que foi submetida a um maior estímulo físico (procedimento de indução pela oviposição, mariposas, remoção das gaiolas).

Por outro lado, a oviposição suprimiu a liberação do composto orgânico volátil linalol, comumente liberado pela planta de milho (D’ALESSANDRO; TURLINGS, 2006), no dia 1 e na noite entre os dias 1 e 2 (Figuras 3.6 e 3.7). O linalol parece ser o principal volátil na atração de

S. frugiperda (JÖNSSON; ANDERSON, 1999). Assim, a supressão do linalol promovida pela oviposição de *S. frugiperda* pode constituir uma estratégia que previne que outros indivíduos ovipositarem na planta, evitando competidores.

Trabalhos recentes mostram que a oviposição de insetos pode reduzir as taxas fotossintéticas da planta (SCHRÖDER; FORSTREUTER; HILKER, 2005; VELIKOVA et al., 2010). Sendo assim, a produção de voláteis, que é dependente da fotossíntese (PARÉ; TUMLINSON, 1997), pode ser conseqüentemente afetada, como foi observado na emissão do linalol.

De acordo com esses resultados, a planta de milho não deve produzir voláteis induzidos pela oviposição de *S. frugiperda*. É provável que esse tipo de indução seja particular a alguns sistemas tritróficos, diferentemente daqueles mediados pelos voláteis induzidos pela alimentação de um herbívoro que desde o primeiro relato foi reportada em plantas pertencentes a diversas famílias (DICKE, 2009).

Considerando que os sistemas tritróficos já descritos envolvendo a atração dos parasitóides de ovos mediada por voláteis da planta induzidos pela oviposição do herbívoro foram bem caracterizados (BEYAERT et al., 2010; HILKER et al., 2002, 2005; MEINERS; HILKER, 2000; MEINERS et al., 2005; MUMM; HILKER, 2005; MUMM et al., 2003, 2004a, b; SCHRÖDER et al., 2007 WEGENER et al., 2001), as suas principais particularidades são: especificidade das interações e dano pelo herbívoro associado à oviposição.

Analisando essas características, no sistema em estudo, há especificidade na interação entre o parasitóide de ovos e o hospedeiro (*T. remus* e *S. frugiperda*), entretanto, o mesmo não ocorre na interação entre o herbívoro e a planta (*S. frugiperda* e *Z. mays*). Além disso, *S. frugiperda* parece não danificar a superfície foliar na oviposição (Figura 3.9). Embora Hilker e Meiners (2009) sugeriram que o contato persistente dos ovos deve desencadear mecanismos de defesa da planta, a indução de voláteis no milho neste estudo não foi constatada. Ao contrário, a oviposição de *S. frugiperda* promoveu um efeito supressor da emissão do linalol pela planta de milho. É possível que a presença de ácido salicílico (AS) nos ovos (TOOKER; DE MORAES, 2007b) seja responsável pela supressão, pois esse fitohormônio pode atuar negativamente na rota do ácido jasmônico (AJ), principal molécula indutora da resistência contra a herbivoria (PRESTON et al., 1999). Entretanto, o mecanismo pelo qual ocorre essa supressão do linalol em função da oviposição deve ainda ser melhor explorado.

Referências

- BEYAERT, I.; WÄSCHKE, N.; SCHOLZ, A.; VARAMA, M.; REINECKE, A.; HILKER, M. Relevance of resource-indicating key-volatiles and habitat odour for insect orientation. **Animal Behavior**, London, v. 79, p. 1077-1086, 2010.
- COLAZZA, S.; McELFRESH, J.S. ; MILLAR, J.G. Identification of volatiles synomoes, induced by *Nezara viridula* feeding and oviposition on bean spp./ that attract the egg parasitoid *Trissolcus basalus*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 30, p. 945-964, 2004.
- COLAZZA, S.; FUCARINO, A.; PERI, E.; SALERNO, G.; CONTI, E.; BIN., F. Insect oviposition induces volatile emission in herbaceous plants that attracts egg parasitoids. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 207, p. 47-53, 2004.
- D’ALESSANDRO, M.; TURLINGS, T.C.J. Advances and challenges in the identification of volatiles that mediate interactions among plants and arthropods. **The Analyst**, Instambul, v.131, p. 24-32, 2006.
- DICKE, M. Behavioural and community ecology of plants that cry for help. **Plant, Cell and Environment**, Malden, v. 32, p. 654-665, 2009.
- DICKE, M.; VAN LOON, J.J.A. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Edinburgh, v. 97, p. 237-249, 2000.
- ESCALDANTE, J.A.G. Contribución al conocimiento de la biología de *Heliothis zea* y *Spodoptera frugiperda*, em el Cusco. **Revista Peruana de Entomologia**, Lima, v. 17, p. 121-122, 1974.
- FATOUROS, N.E.; DICKE, M.; MUMM, R.; MEINERS, T.; HILKER, M. Foraging behavior of egg parasitoids exploiting chemical information. **Behavioral Ecology**, Cardiff, v. 19, p.677-689, 2008.
- GAUTAM, R.D. Variations in amino acids in fertile and unfertile eggs od *Spodoptera litura* (Fabr.) contribute towards parasitism by *Telenomus remus* Nixon (Scelionidae: Hymenoptera). **Journal of Entomological Resarch**, New Delhi, v. 10, p. 161-165, 1986.
- GREENE, G.L.; LEPPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar. A rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 69, p. 447-448, 1976.
- HILKER, M.; MEINERS, T. Early herbivore alert: Insect eggs induce plant defense. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 26, p. 1379-1397, 2006.
- _____. Induction of plant responses to oviposition and feeding by herbivorous arthropods: a comparison. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Edinburgh, v. 104, p. 181-192, 2002.

HILKER, M.; KOBBS, C.; VARAMA, M.; SCHRANK, K. Insect egg deposition induces *Pinus* to attract egg parasitoids. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 205, p. 455-461, 2002.

HILKER, M.; STEIN, C.; SCHROEDER, R.; VARAMA, M.; MUMM, R. Insect egg deposition induces defense responses in *Pinus sylvestris*: characterization of the elicitor. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 208, p. 1849-1854, 2005.

JÖNSSON, M.; ANDERSON, P. Electrophysiological response to herbivore-induced host plant volatiles in the moth *Spodoptera littoralis*. **Physiological Entomology**, London, v. 24, p. 377-385, 1999.

McCALL, P.J.; TURLINGS, T.C.J.; LEWIS, W.J.; TUMLINSON, J.H. Role of plant volatiles in host location by the specialist parasitoid *Microplitis croceipes* Cresson (Braconidae: Hymenoptera). **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 6, p. 625-639, 1993.

MEINERS, T.; HILKER, M. Host location in *Oomyzus gallerucae* (Hymenoptera: Eulophidae), an egg parasitoid of the elm leaf beetle *Xanthogaleruca luteola* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Oecologia**, Heidelberg, v. 112, p. 87-93, 1997.

_____. Induction of plant synomones by oviposition of a phytophagous insect. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 26, p. 221-232, 2000.

MEINERS, T.; WESTERHAUS, C.; HILKER, M. Specificity of chemical cues used by a specialist egg parasitoid during host location. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Edinburgh, v. 95, p. 151-159, 2000.

MEINERS, T.; HACKER, N.K.; ANDERSON, P.; HILKER, M. Response of the elm leaf beetle to host plants induced by oviposition and feeding: the infestation rates matters. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Edinburgh, v.115, p. 171-177, 2005.

MUMM, R.; HILKER, M. The significance of background odor for an egg parasitoid to detect plants with host eggs. **Chemical Senses**, Oxford, v. 30, p. 337-343, 2005.

MUMM, R.; TIEMANN, T.; SCHULZ, S.; HILKER, M. Analysis of volatiles from black pine (*Pinus nigra*): significance of wounding and egg deposition by a herbivorous sawfly. **Phytochemistry**, Oxford, v. 65, p. 3221-3220, 2004a

MUMM, R.; TIEMANN, T.; VARAMA, M.; HILKER, M. Choosy egg parasitoids: Specificity of oviposition-induced pine volatiles exploited by an egg parasitoid of pine sawflies. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Edinburgh, v. 115, p. 217-225, 2005.

MUMM, R.; SCHRANK, K.; WEGENER, R.; SCHULZ, S.; HILKER, M. Chemical analysis of volatiles emitted by *Pinus sylvestris* after induction by insect oviposition. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 29, p. 1235-1252, 2003.

PARÉ, P.W.; TUMLINSON, J. *De novo* biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 114, p. 1161-1167, 1997.

PARRA, J.R.P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. Piracicaba: FEALQ, 2001.137 p.

SCHRÖDER, R.; FORSTREUTER, M.; HILKER, M. A plant notices insect eggs deposition and changes its rate of photosynthesis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 138, p. 470-477, 2005.

SCHRÖDER, R.; CRISTESCU, S.M.; HARREN, F.J.M.; HILKER, M. Reduction of ethylene emission from Scots pine elicited by insect egg secretion. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 1835-1842, 2007.

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

TOOKER, J.F.; DE MORAES, C.M. Jasmonate in Lepidoptera eggs and neonates. **Journal of Chemical Ecology**. New York, v. 31, p. 2753-2759, 2005.

_____. Feeding by hessian fly [*Mayetiola destructor* (Say)] larvae does not induce indirect defences. **Ecological Entomology**, Malden, v. 32, p. 153-161, 2007a.

_____. Jasmonate, salicylate, and benzoate in insect eggs. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 33, p. 331-343, 2007b.

VELIKOVA, V.; SALERNO, G.; FRATI, F.; PERI, E.; CONTI, E.; COLAZZA, S.; LORETO, F. Influence of feeding and oviposition by phytophagous pentatomids on photosynthesis of herbaceous plants. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 36, p. 629-641, 2010.

VINSON, S.B. Host selection by insect parasitoids. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 21, p. 109-134, 1976.

_____. Parasitoid-host relationships. In: BELL, W.J.; CARDÉ, R.T. (Ed.) *Chemical Ecology of Insects*. London: Chapman and Hall, 1984. p. 205-233.

WEGENER, R.S.; SCHULTZ, S.; MEINERS, T.; HADWICH, K.; HILKER, M. Analysis of volatiles induced by oviposition of the elm leaf beetle *Xanthogaleruca luteola* on *Ulmus minor*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 27, p. 499-515, 2001.

4 RESPOSTA DE UM PARASITÓIDE DE OVOS GENERALISTA E ESPECIALISTA AOS VOLÁTEIS INDUZIDOS PELA HERBIVORIA DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Resumo

As plantas, quando danificadas pela herbivoria, emitem substâncias voláteis que constituem importantes pistas químicas para os inimigos naturais na busca pelo seu hospedeiro. A oviposição do herbívoro na planta pode induzir a emissão de voláteis que atraem parasitóides de ovos, entretanto, essa defesa parece estar restrita a algumas espécies vegetais. Considerando-se que os ovos são inconspícuos e emitem poucos odores, os parasitóides de ovos devem empregar outras pistas químicas na localização do hospedeiro. Dessa maneira, esse trabalho buscou investigar o papel dos voláteis da planta de milho induzidos pela herbivoria de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) na localização do hospedeiro por um parasitóide de ovos especialista, *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Scelionidae), e um generalista, *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Os ensaios em olfatômetro em 'Y' e a identificação dos voláteis emitidos pelas plantas revelaram que *T. remus* não apresentou o comportamento inato de atração pelos odores das plantas induzidas. Porém, após a experiência com os voláteis, *T. remus* passou a ser atraído tanto por misturas compostas majoritariamente por voláteis de folhas verdes (VFVs), que são emitidas logo após o dano; como por misturas mais complexas, compostas por terpenos, emitidas algumas horas após a indução. Enquanto que *T. pretiosum* apresenta um comportamento de atração inato pelos VFVs, porém, é também capaz de aprender misturas compostas por terpenos. Esses resultados mostram que os parasitóides de ovos com diferentes graus de especialização apresentam estratégias distintas no uso dos voláteis de plantas induzidos pela herbivoria, que devem orientá-los na localização da comunidade do hospedeiro.

Palavras-chave: *Telenomus remus*, *Trichogramma atopovirilia*, Voláteis de folhas verdes, Terpenos

Abstract

Herbivore-damaged plants emit volatile compounds which are used by natural enemies as chemical cues for host finding. Herbivore oviposition on the plant can induce the emission of attractive volatiles for egg parasitoids, though this type of defense seems not to be widespread in plants. Given that eggs are inconspicuous and emit low amount of odors, egg parasitoids might exploit other chemical cues for host finding. Thus, this work aimed to investigate the role of herbivore-induced maize volatiles elicited by *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in host finding behavior of the specialist egg parasitoid, *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Scelionidae), and the generalist, *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Y-tube olfactometer bioassays and identification of volatiles emitted by plants revealed that *T. remus* did not show an innate attraction response towards induced plant odors. Nevertheless, after experience with induced plant volatiles, *T. remus* was attracted by blends predominantly comprised by green leaf volatiles (GLVs), which are emitted by fresh-damaged leaves, as well as by blends comprised by terpenes, emitted some hours after induction. While *T. pretiosum* was innately attracted by GLVs, although it is also able to learn terpene blends. These results show that egg parasitoids with different host breath use different strategies of exploiting herbivore-induced plant volatiles, which orient them for locating host community.

Keywords: *Telenomus remus*, *Trichogramma atopovirilia*, Green leaf volatiles, Terpenes

4.1 Introdução

Os voláteis liberados pelas plantas sob o ataque de insetos herbívoros são importantes pistas químicas para os parasitóides e predadores na localização do hospedeiro/presa (DICKE et al., 1990; TURLINGS; TURLISON, 1991). Este mecanismo de defesa indireta ocorre em diversas famílias de plantas e a atração dos voláteis induzidos pela herbivoria foi comprovada em diversas espécies de parasitóides larvais bem como predadores artrópodes (DUDAREVA et al., 2006; KESSLER; BALDWIN, 2001; MATTIACCI; DICKE; POSTHUMUS, 1995; NGI SONG et al., 1996).

Além da herbivoria, a oviposição dos insetos herbívoros nas plantas também induz a produção de defesas na planta, entre elas a produção de voláteis (HILKER et al., 2002; MEINERS; HILKER, 1997). Diferentemente dos voláteis induzidos pela herbivoria, este mecanismo de defesa desencadeado exclusivamente pela oviposição do inseto foi reportado em apenas dois sistemas tritróficos e, portanto, não deve ser um mecanismo comumente encontrado nas plantas (HILKER et al., 2002; MEINERS; HILKER, 2000).

A orientação dos parasitóides de ovos por odores derivados do próprio estágio alvo do hospedeiro poderia ser uma estratégia bem sucedida na localização. Entretanto, os ovos emitem poucos odores, que devem atuar somente a curtas distâncias. Além disso, os ovos, geralmente, são inconspícuos e depositados em locais protegidos, dificultando ainda mais a sua localização (VINSON, 1998). Assim, os parasitóides de ovos frequentemente utilizam outras pistas químicas no processo de localização do hospedeiro, como pistas associadas aos estágios larval e adulto do hospedeiro, que são ativos e emitem odores em maior quantidade, detectáveis a média e longa distâncias, como os feromônios e compostos das escamas (COLAZZA; ROSSI; CLEMENTE, 1997; SHU; JONES, 1989).

Estes odores provindos dos estágios não alvos constituem pistas indiretas, pois não indicam com precisão a presença do estágio-alvo do hospedeiro, o ovo. Entretanto, a busca guiada por eles parece ser um comportamento adaptativo, principalmente, para espécies foréticas de parasitóides de ovos (BRUNI et al., 2000), e de parasitóides cujos hospedeiros são multivoltinos.

Apesar da grande importância que os voláteis de plantas induzidos pela herbivoria, poucos estudos tratam do seu papel no comportamento de localização hospedeira de parasitóides de ovos (LOU; MA; CHENG, 2005; MORAES et al., 2005). Assim, no presente trabalho, avaliou-se a

resposta de duas espécies de parasitóides de ovos de lepidópteros, uma considerada generalista, *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (ZUCCHI; MONTEIRO, 1997), e a outra especialista *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Scelionidae), cujo hospedeiro natural restringe-se ao gênero *Spodoptera* (SCHWARTZ; GERLING, 1974), aos voláteis da planta de milho induzidos pela herbivoria de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae).

A fim de averiguar se a atração dos parasitóides de ovos pelos voláteis induzidos pela herbivoria das lagartas pode não só guiá-los à comunidade do hospedeiro, mas também às plantas contendo ovos do seu hospedeiro, o presente trabalho verificou se fêmeas grávidas de *S. frugiperda* preferem ovipositar em plantas atacadas, ou não, pelas lagartas da mesma espécie.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Cultivo das plantas e criação dos insetos

As plantas de milho (*Zea mays* var. Delprim) foram cultivadas no substrato comercial Basiplant[®] e mantidas em casa-de-vegetação. Foram utilizadas plantas com 8-10 dias após a emergência, contendo 3-4 folhas.

Os parasitóides de ovos *T. remus* e *T. pretiosum* foram multiplicados em posturas de *S. frugiperda* com até 1 dia de idade. Para o parasitismo, as posturas foram coladas em cartelas brancas de 2,5 cm de largura por 5 cm de altura e inseridos em tubos de vidro de 9 cm de altura e 3 cm de diâmetro, fechados em sua extremidade com filme plástico PVC, contendo os parasitóides. Apenas uma cartela de ovos por dia foi oferecida em cada tubo de vidro após 2-3 dias da emergência dos parasitóides *T. remus* e *T. pretiosum*, sendo retirada após um período de 5 e 24 horas, respectivamente, e colocada em um tubo de vidro. Logo após a emergência dos adultos, gotículas de mel puro foram colocadas na parede interna dos tubos para a alimentação dos parasitóides (GAUTAM, 1986). A separação as fêmeas dos parasitóides para os bioensaios foi baseada nas características das antenas de *T. remus* e *T. pretiosum* descritas por Picho (1987) e Pinto (1997), respectivamente.

A população do hospedeiro *S. frugiperda* foi proveniente da criação do Laboratório de Biologia de Insetos, ESALQ/USP, e foi criada em dieta artificial (GREENE; LEPPLA;

DICKERSON, 1976), de acordo com a metodologia descrita por Parra (2001). As criações foram mantidas em uma sala a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, UR de $70\pm 10\%$ e 12 h de fotofase.

4.2.2 Bioensaios de preferência de oviposição de *S. frugiperda*

Foram realizados testes de preferência de oviposição de *S. frugiperda* frente a plantas de milho não danificadas e induzidas pela herbivoria de lagartas da mesma espécie. Para a indução da planta pela herbivoria das lagartas (PIL), 10 lagartas de 2º instar foram colocadas no cartucho às 10:00h e permaneceram até o início do bioensaio, às 18:00h. Os tratamentos PND e PIL foram posicionados cada uma em uma extremidade da gaiola, confeccionada em tecido tule de 55 cm de altura, 60 cm de comprimento e 10 cm de largura (Figura 4.1), no qual foram liberadas 5 fêmeas grávidas de *S. frugiperda* com 3 dias de idade. O bioensaio foi conduzido em uma sala com condições controladas ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$; $60\pm 10\%$ UR; fotofase de 12h) e teve duração de uma noite. No dia seguinte, durante a manhã, as posturas foram removidas e o número de ovos em cada uma delas foi contabilizado.

4.2.3 Bioensaios em olfatômetro

4.2.3.1 Insetos

Foram utilizadas fêmeas de *T. remus* com 3-4 dias de idade e *T. pretiosum* com 2-3 dias, alimentadas com mel com ou sem experiência ao parasitismo de *S. frugiperda*. A experiência dos parasitóides consistiu no parasitismo de ovos de *S. frugiperda* e a exposição simultânea aos odores da planta induzida, no interior de um tubo (8cm x 3cm). Após 15 min, com um pincel, foram coletados, cuidadosamente, os parasitóides que estavam em cima das posturas. Somente no dia seguinte os insetos foram utilizados nos bioensaios.

4.2.3.2 Procedimento

A resposta olfativa dos parasitóides de ovos (Figura 4.2) foi avaliada em um olfatômetro em Y para discriminar a preferência do inseto quando exposto a dois odores, ou somente um odor e um branco.

Os ensaios foram conduzidos em uma sala climatizada mantida a $25,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ e $60,0 \pm 10,0\%$ UR e fotofase de 12 h. O olfatômetro utilizado era constituído de um tubo de vidro bifurcado, de 2,5 cm de diâmetro, e braços de 9,0 cm de comprimento. Os tratamentos foram acondicionados em câmaras de vidros conectadas a duas extremidades do olfatômetro. À porção distal do braço principal (onde os insetos foram liberados) foi ligada uma mangueira conectada à bomba a vácuo que succionou o ar do ambiente para o interior do sistema. O ar, anteriormente à passagem nas câmaras com os tratamentos, foi purificado ao passar por um filtro de carvão, e umidificado (Figura 4.3). Fluxômetros conectados à entrada do ar permitiram calibrar o fluxo de ar dentro do sistema, que foi de 300 ml/min.

Para avaliar os efeitos dos voláteis induzidos pela alimentação, foram realizados bioensaios com as seguintes combinações de tratamentos: (i) Planta Não Danificada (PND) vs. Planta Induzida pela herbivoria das Lagartas (PIL), que consistiu na indução pela alimentação de 10 lagartas de 3º instar de *S. frugiperda* durante uma noite (Figura 4.3A); (ii) PND vs. Planta Induzida pelo Regurgito (PIR) nos intervalos 0-1, 2-3, 6-7 e 12-13h. O regurgito foi extraído manualmente das lagartas de *S. frugiperda* de 3º-4º instar alimentadas no milho por dois dias (Figuras 4.4C e 4.5). Para induzir a planta, foram raspadas as 2ª e 3ª folhas (aproximadamente 1 cm² de área de cada folha) e 10µL do regurgito foi aplicado no local. Esse método é frequentemente utilizado para padronizar a indução pela herbivoria nas plantas, visto que é difícil controlar e padronizar o dano causado pelas lagartas na planta e, conseqüentemente, testar diferentes composições de voláteis liberados pela planta de acordo com o padrão temporal (TURLINGS et al., 1998).

Os ensaios foram conduzidos em uma sala com iluminação homogênea e mantida a $25,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$; $60,0 \pm 10,0\%$ UR e fotofase de 14 h, durante a manhã e tarde (8:00 - 18:00 h), uma vez que os parasitóides encontram-se mais ativos nesses períodos.

Em cada repetição, uma fêmea de *T. remus* ou de *T. pretiosum*, com ou sem experiência prévia, foi introduzida no braço central do olfatômetro e observada por um período máximo de cinco minutos, em que foi registrada a escolha por um dos tratamentos. A escolha pelo parasitóide por um dos tratamentos foi considerada após o cruzamento de uma linha que divide a metade do comprimento do braço lateral e a permanência nesse local por pelo menos 20 segundos. Após o término da repetição, o parasitóide utilizado foi descartado. A cada bioensaio,

o olfatômetro e as câmaras de tratamento foram lavados com Extran® a 10%, água destilada e acetona, e secos em estufa a 160°C por 1 hora.



Figura 4.1 – Gaiola utilizada nos testes de preferência de oviposição de *Spodoptera frugiperda* (dimensões: 55 cm de altura, 60 cm de comprimento e 10 cm de largura).

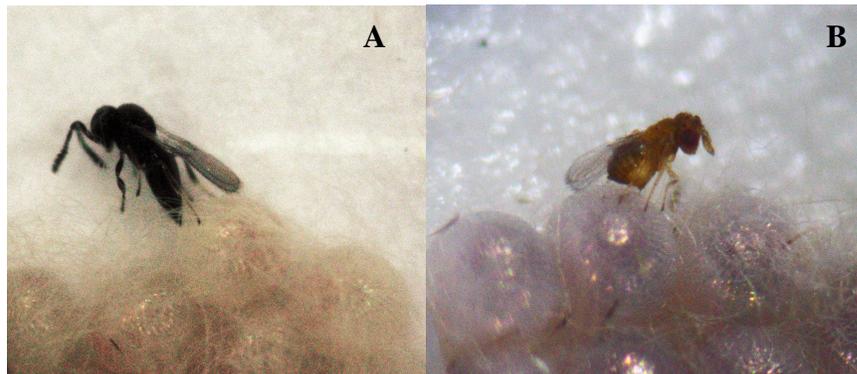


Figura 4.2 - A: Parasitóide especialista *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Scelionidae); B: Parasitóide generalista *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Aumento: 20 vezes

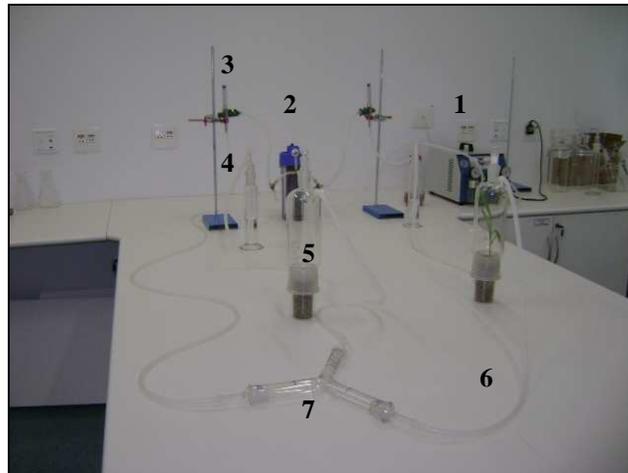


Figura 4.3 - Sistema de olfatometria. (1): bomba a vácuo; (2): filtro de carvão ativado; (3): fluxômetro; (4): umidificador; (5): câmara de vidro; (6): mangueira de silicone; (7): olfatômetro em Y



Figura 4.4 – A: planta de milho induzida pela herbivoria de lagartas de *Spodoptera frugiperda* durante uma noite (tratamento PIL); B: planta de milho danificada mecanicamente pela raspagem com lâmina (tratamento PDM); C: planta de milho danificada com a lâmina e induzida pela aplicação do regurgito no local (tratamento PIR)



Figura 4.5 - Extração do regurgito da lagarta de *Spodoptera frugiperda* de 3º instar alimentada em milho

4.2.4 Coleta e Identificação dos voláteis

Foram coletados os voláteis emitidos pelos tratamentos testados nos bioensaios com os parasitóides: PND, PIL, PIR) nos intervalos 2-3, 6-7 e 12-13h

O sistema de coleta de voláteis e a metodologia empregada foram descritos detalhadamente por Turlings et al. (1998). Para a realização da coleta de voláteis, as plantas foram acondicionadas em câmaras de vidro acopladas ao sistema de aeração, cujo fluxo de entrada foi de 1,1 L/min (Figura 4.6 A). Para o bombeamento de ar no interior do sistema, utilizou-se uma bomba a vácuo que succionou o ar a 0,8 L/min e foi conectada aos filtros de coleta dos voláteis acoplados às câmaras contendo as plantas. Os filtros consistiram de um tubo de vidro fino com 25 mg de polímero adsorvente Super-Q® em seu interior (Figura 4.6 B).

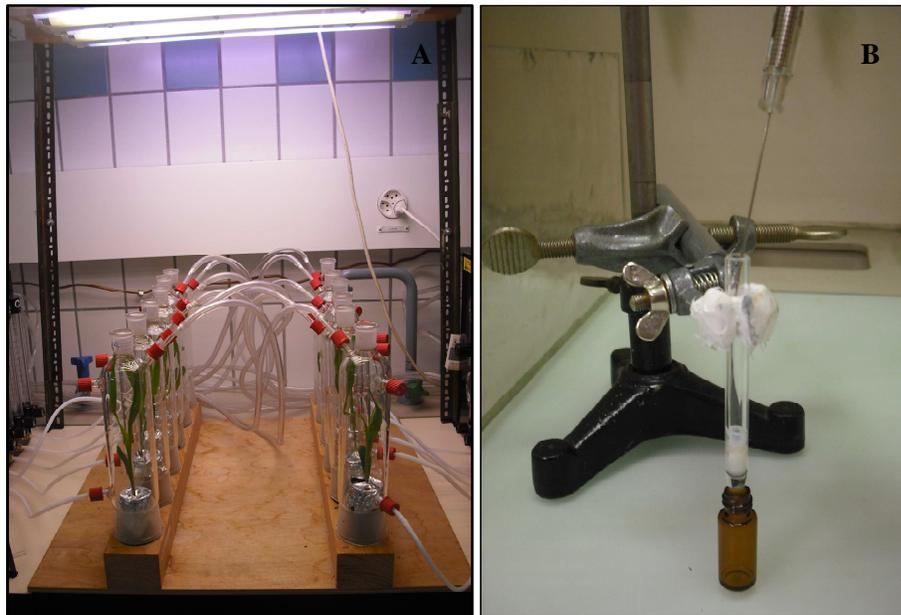


Figura 4.6- A: câmaras de vidro com as plantas de milho, conectadas ao sistema de coleta de voláteis; B: filtro de tubo de vidro com o polímero adsorvente Super-Q® sendo eluído com solvente diclorometano

Os filtros de Super-Q® expostos aos odores das plantas foram lavados com 150 μ l de solvente diclorometano e o extrato foi armazenado em frascos de vidro vedados mantidos em um freezer a -86°C , até a análise. A cada amostra, foi adicionado 10 μ l de uma solução de 200 ng de n-octane e nonyl acetate, como padrão interno.

As análises foram realizadas em um equipamento CG Agilent 78901 com o injetor ajustado em splitless, detector de ionização de chama (FID) e Hélio como gás de arraste (24 cm/s). De cada amostra, foi injetada uma alíquota de 3 μ l em uma coluna capilar apolar EC-1 (30 m de comprimento 0,25mm de diâmetro e 0,25 μ m de espessura de parede). Após a injeção, a temperatura da coluna foi mantida a 40°C por 3 min, elevada a uma velocidade de $8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até atingir 100°C e depois reduzida para $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 220°C . O sinal do detector foi processado com

o software MSD ChemStation. Para a identificação, os espectros de massa dos compostos dados pelo equipamento EM Agilent VLMSD 59956 foram comparados com as bibliotecas “Plantvol.1”(específica para voláteis de milho) e “NIST05a”.

4.2.5 Análise dos dados

Os dados de escolha dos bioensaios em olfatômetro em Y foram analisados pelo teste de qui-quadrado, ao nível de 5 e 1% de probabilidade. Os parasitóides que não responderam dentro dos 5 min foram desconsiderados da análise.

Na análise dos dados dos ensaios de preferência de oviposição das mariposas foi empregado o teste t pareado. Essas análises foram realizadas utilizando o software SigmaStat (Versão 2.03)

4.3 Resultados

As fêmeas de *S. frugiperda* depositaram, em média, 331 e 224 ovos nas plantas não danificadas (PND) e nas plantas induzidas pela herbivoria das lagartas (PI), respectivamente, (Figura 4.6), não havendo diferença significativa entre os tratamentos (Figura 4.6; teste t; $t=0,768$; $p=0,462$).

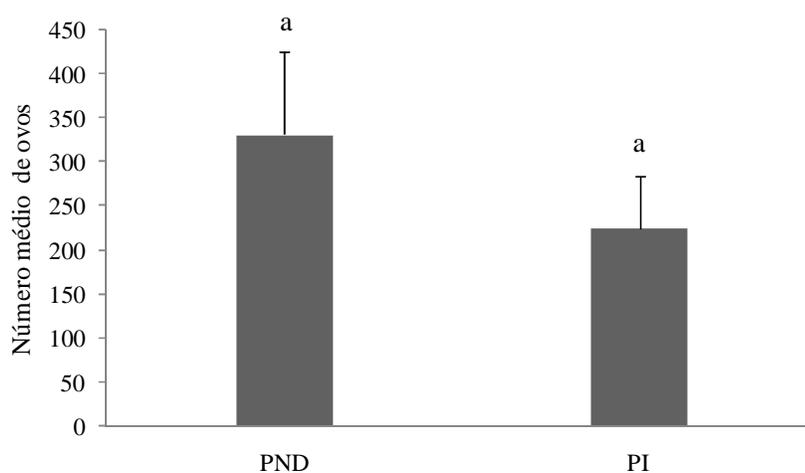


Figura 4.6 - Número médio de ovos de *S. frugiperda* depositados na planta de milho não danificada (PND-controle) e na planta de milho induzida pelas lagartas da mesma espécie (PI) (teste t; $n=10$; $p=0,462$)

Os parasitóides *T. remus* e *T. pretiosum* sem experiência não foram atraídos pelos odores emitidos pelas plantas de milho não danificadas (PND), cuja emissão foi constituída majoritariamente pelo volátil linalol, e outros compostos que foram encontrados em menores concentrações (Figura 4.7 e Tabela 4.1). Dessa forma, nos bioensaios seguintes, a PND representou o controle.

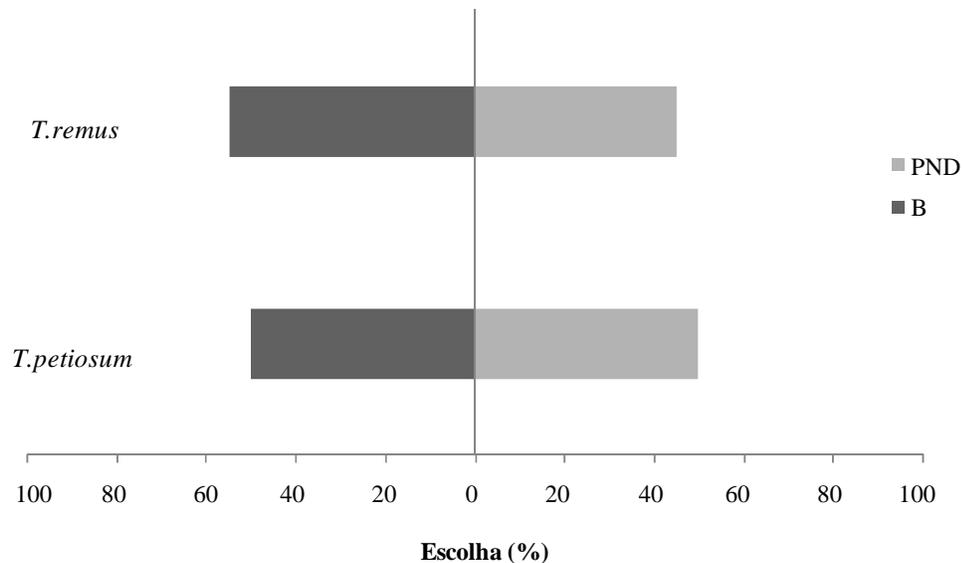


Figura 4.7 – Porcentagem de escolha dos parasitóides *Telenomus remus* e *Trichogramma pretiosum*, sem experiência, pela planta de milho não danificada (PND) e o controle branco (B)

A resposta do parasitóide especialista *T. remus*, sem experiência, pelos odores emitidos pela PI 0-1h foi de 62%, não diferindo da porcentagem de escolha pela PND (Figura 4.8; qui-quadrado; $P > 0,05$). Entretanto, a PI 0-1h foi atraente ao parasitóide *T. remus* após a experiência, cuja resposta foi de 87% (qui-quadrado; $P < 0,01$). Já o parasitóide generalista *T. pretiosum*, sem experiência, apresentou um comportamento inato de atração aos voláteis da PI 0-1h, com 65% de resposta (Figura 4.8; qui-quadrado; $P < 0,05$). Entretanto, a experiência com os voláteis de PI 0-1h não alterou a intensidade da resposta de *T. pretiosum*, que foi de 68%, diferindo ao nível de 5% da escolha pela PND ($P < 0,05$).

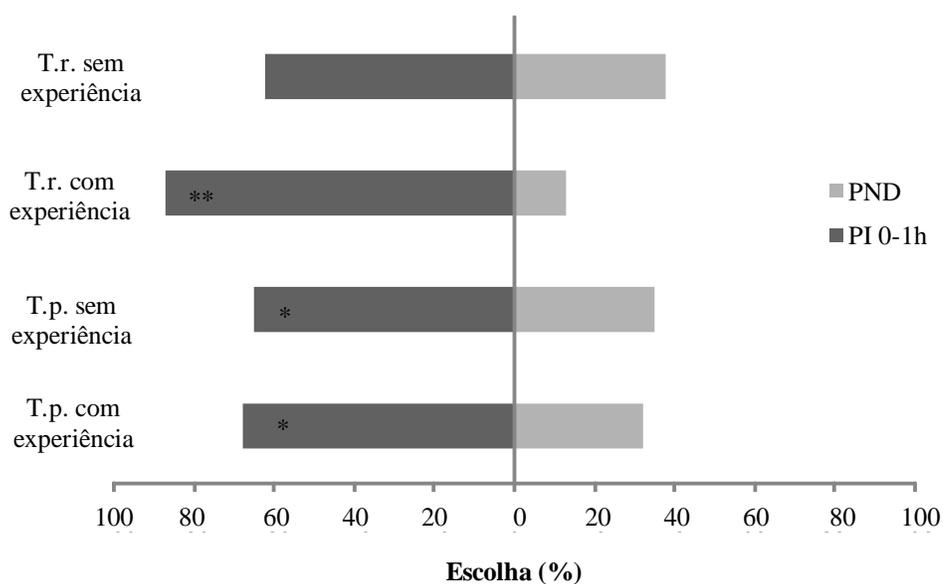


Figura 4.8 – Porcentagem de escolha dos parasitóides *Telenomus remus* e *Trichogramma pretiosum*, com e sem experiência frente aos voláteis induzidos, pelos odores da planta de milho não danificada (PND) e a planta induzida com o regurgito de *Spodoptera frugiperda* após 0-1h (PI 0-1h). T.r.=*T. remus*; T.p.=*T. pretiosum*. * significativo a 5% pelo teste de qui-quadrado; ** significativo a 1% pelo teste de qui-quadrado

De maneira semelhante, no intervalo seguinte, os odores da PI 2-3h não foram atraentes aos parasitóides *T. remus* sem experiência, cuja escolha a esses odores foi de 42%, enquanto que as fêmeas experientes escolheram os mesmos odores em 74% (Figura 4.9; qui-quadrado; $P < 0,05$), mostrando que essa espécie foi capaz de aprender os voláteis liberados pela PI 2-3h. Os parasitóides *T. pretiosum*, com e sem experiência, foram atraídos pelos odores da PI 2-3h em 84 e 80%, respectivamente, diferindo da escolha pela PND e mostrando, portanto, uma resposta inata dessa espécie a esses voláteis (Figura 4.9; qui-quadrado $P < 0,01$).

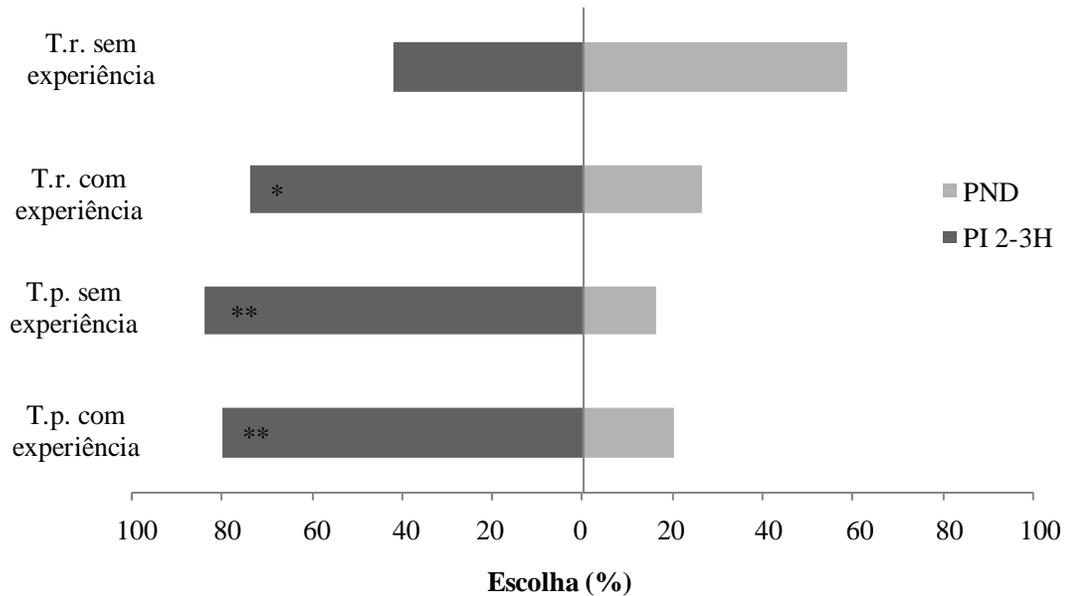


Figura 4.9 – Porcentagem de escolha dos parasitóides *Telenomus remus* e *Trichogramma pretiosum*, com e sem experiência frente aos voláteis induzidos, pelos odores da planta de milho não danificada (“PND”) e a planta de milho induzida com o regurgito de *Spodoptera frugiperda* após 2-3h (“PI 2-3h”). T.r.=*T. remus*; T.p.= *T. pretiosum*. * significativo a 5% pelo teste de qui-quadrado; ** significativo a 1% pelo teste de qui-quadrado

Nos bioensaios com as plantas induzidas pelo regurgito após 6-7h (tratamento PI 6-7h), *T. remus* e *T. pretiosum* apresentaram uma resposta semelhante frente aos voláteis, sendo atraídos pelos voláteis somente após a experiência prévia, em 78 e 79% dos casos, respectivamente (Figura 4.10; qui-quadrado; $P < 0,05$).

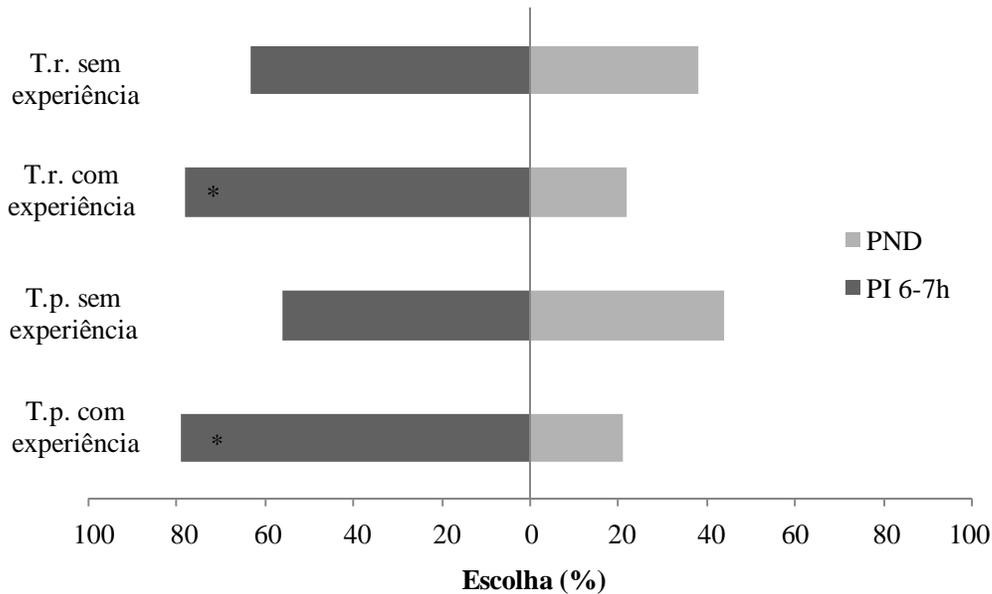


Figura 4.10 – Porcentagem de escolha dos parasitóides *Telenomus remus* e *Trichogramma pretiosum*, com e sem experiência frente aos voláteis induzidos, pelos odores da planta de milho não danificada (PND) e a planta induzida com o regurgito de *Spodoptera frugiperda* após 6-7h (PI 6-7h). T.r.=*T. remus*; T.p.=*T. pretiosum* * significativo a 5% pelo teste de qui-quadrado

Diferentemente dos bioensaios anteriores, no intervalo 12-13h, a planta de milho induzida pelo regurgito (PI 12-13h) não foi atraente para nenhuma das espécies, mesmo após a experiência com os odores (Figura 4.11; qui-quadrado; $P > 0,05$). O parasitóide *T. remus* sem e com experiência respondeu aos voláteis da PI 12-13h em 48 e 53%, respectivamente, enquanto que as respostas de *T. pretiosum* foram de 60 e 42%.

Os voláteis pelas plantas induzidas pela herbivoria das lagartas de *S. frugiperda* pelo período de uma noite (tratamento PIL) não foram atraentes aos parasitóides de *T. remus* e *T. pretiosum* sem experiência, cujas respostas foram de 49 e 52%, respectivamente (Figura 4.12; qui-quadrado $P > 0,05$). No entanto, após a experiência, *T. remus* passou a responder a esses voláteis, apresentando a resposta de 69% (qui-quadrado; $P < 0,05$), e *T. pretiosum* não foi capaz de aprender a mistura liberada pela PIL, pois a escolha foi de apenas 51% ($P > 0,05$).

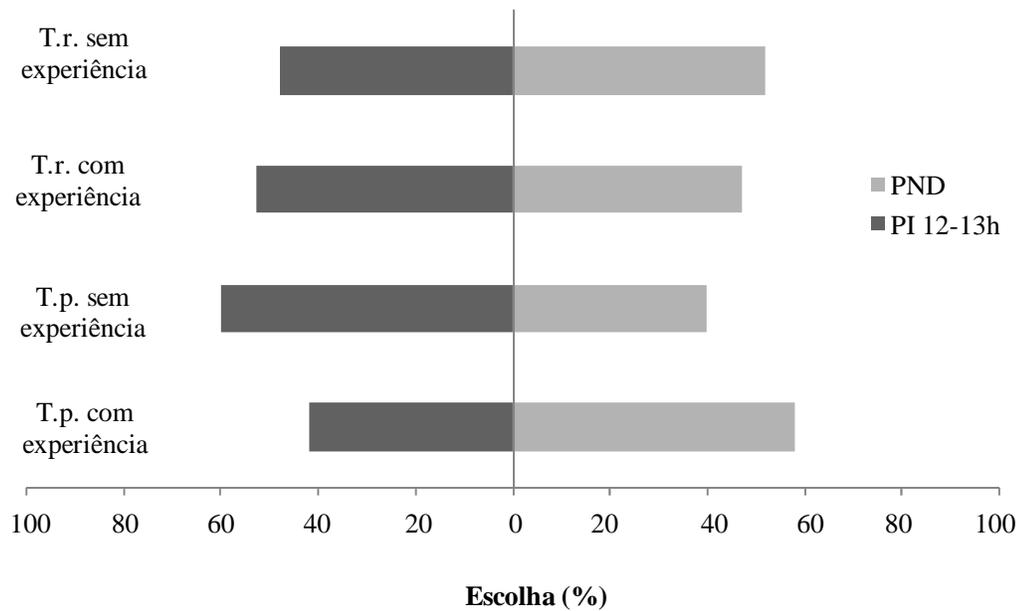


Figura 4.11 – Porcentagem de escolha dos parasitóides *Telenomus remus* e *Trichogramma pretiosum*, com e sem experiência frente aos voláteis induzidos, pelos odores da planta de milho não danificada (PND) e a planta induzida com o regurgito de *Spodoptera frugiperda* após 12-13h. T.r.=*T. remus*; T.p.= *T. pretiosum*.

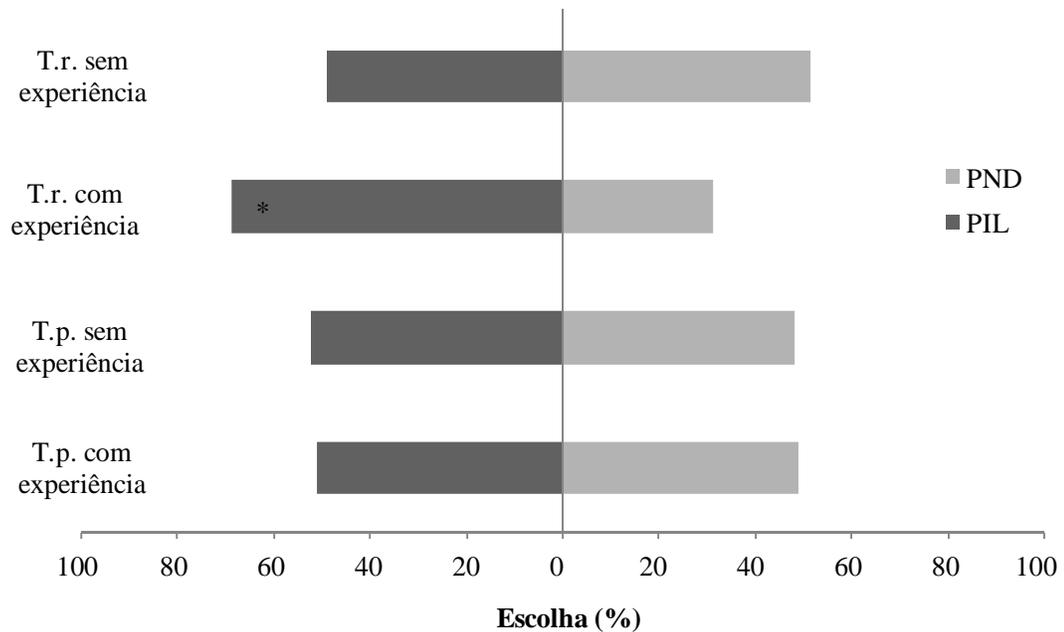


Figura 4.12 – Porcentagem de escolha dos parasitóides *Telenomus remus* e *Trichogramma pretiosum*, com e sem experiência frente aos voláteis induzidos, pelos odores da planta de milho não danificada (PND) e a planta induzida pela herbivoria das lagartas de *Spodoptera frugiperda* após uma noite (PIL). T.r.=*T. remus*; T.p.= *T. pretiosum*. * 5% de significância pelo teste de qui-quadrado

A composição e concentração das misturas de voláteis liberados por todos os tratamentos testados nos bioensaios estão apresentados na Tabela 4.1 e as proporções na mistura na Figura 4.13. Observa-se que os VFVs ((*Z*)-3-hexenal, (*E*)-2-hexenal, (*E*)-3-hexen-1-ol e acetato de (*Z*)-3-hexenila) predominaram na mistura emitida pela PI 0-1h e, em menores quantidades, estavam presentes compostos monoterpênicos, como o linalol e o β -mirceno (Figura 4.13). No intervalo seguinte, a PI 2-3h passou a emitir, em maiores quantidades, monoterpênicos, aromáticos (acetato de fenetila, acetato de benzila, acetato de geranila e indol) e o homoterpeno (*3E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (DMNT), que predominou na mistura (Figura 4.13). Além disso, nesse intervalo de tempo, deu-se início a emissão de sesquiterpenos. Por outro lado, a emissão de VFVs praticamente cessou, sendo liberado apenas o acetato de (*Z*)-3-hexenila, em baixas quantidades.

Já na mistura liberada pela PI 6-7h, os sesquiterpenos (*E*)- β -cariofileno, (*E*)- α -bergamoteno e (*E*)- β -farneseno foram emitidos em altas quantidades e predominaram na mistura (Figura 4.11). Todos os compostos aromáticos (exceto o acetato de benzila), o DMNT e os monoterpênicos também compunham a mistura, porém, representaram juntos menos de 50% da mistura. Neste intervalo de tempo, não houve mais emissão de VFVs.

A composição dos voláteis emitidos pela PI 12-13h, que foi induzida noturnamente, foi semelhante à mistura liberada pela PI 6-7h, com exceção do acetato de geranila, que estava ausente. Além disso, no intervalo 12-13h, houve a predominância dos sesquiterpenos (76%), contudo, a proporção do homoterpeno (DMNT) foi reduzida, e os monoterpênicos apresentaram maiores proporções do que no intervalo 6-7h (Figura 4.13). Em geral, as quantidades de todos os compostos emitidos foram reduzidas no intervalo 12-13h, em relação à emissão da PI 6-7h, com exceção do (*E*)- β -cariofileno que, dentre os três sesquiterpenos, foi o composto majoritário, e o β -mirceno.

O ataque contínuo das lagartas de *S. frugiperda* durante uma noite (tratamento PIL) provocou a emissão de uma complexa mistura de voláteis, constituída simultaneamente por todas as classes químicas de voláteis detectados na emissão da planta de milho: voláteis de folhas verdes (VFVs), aromáticos, homoterpenos, monoterpênicos, e sesquiterpenos. Esses grupos estiveram presentes na mistura da PIL em proporções melhores distribuídas do que nos demais tratamentos (Figura 4.13), sendo o VFV, o grupo predominante (33%), seguido do homoterpeno DMNT (31%), sesquiterpenos (18%), monoterpênicos (14%) e aromáticos (4%).

Tabela 4.1 – Padrão quantitativo (ng±EP) e qualitativo das misturas de voláteis produzidos pelas plantas de milho induzidas pelo regurgito das lagartas de *Spodoptera frugiperda*, divididos de acordo com as classes químicas correspondentes

Compostos Voláteis	PI				PIL
	PND	0-1h	2-3h	6-7h	
Voláteis de Folhas Verdes (VFVs)					
(Z)-3-hexenal		26,28 ± 6,13			122,52 ± 25,11
(E)-2-hexenal		103,94 ± 14,86			18,41 ± 2,65
(E)-3-hexen-1-ol		10,00 ± 2,35			22,19 ± 2,55
Acetato de (Z)-3-hexenila		93,91 ± 12,31	5,48 ± 1,52		64,14 ± 10,90
Aromáticos					
Acetato de benzila			1,99 ± 0,85		5,28 ± 1,99
Acetato de fenetila			4,14 ± 1,32	6,99 ± 5,19	5,35 ± 2,19
Indol			77,74 ± 36,52	69,42 ± 28,99	193,25 ± 78,71
Acetato de geranila	6,48 ± 1,25		6,82 ± 2,42	13,88 ± 8,32	8,77 ± 2,53
Monoterpenos					
β -mirreno	8,71 ± 0,30	4,45 ± 0,38	4,02 ± 1,16	2,01 ± 1,35	6,66 ± 0,70
linalol	93,97 ± 13,39	18,45 ± 4,97	33,29 ± 9,55	59,21 ± 34,13	93,94 ± 25,25
Homoterpenos					
(3E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno			180,59 ± 51,09	160,96 ± 78,81	30,44 ± 5,98
Sesquiterpenos					
(E)- β -cariofileno			2,65 ± 1,00	13,53 ± 2,84	62,33 ± 6,23
(E)- α -bergamoteno			14,25 ± 3,86	132,04 ± 55,81	24,74 ± 5,55
(E)- β -farneseno			27,31 ± 9,34	282,19 ± 119,75	39,59 ± 12,47

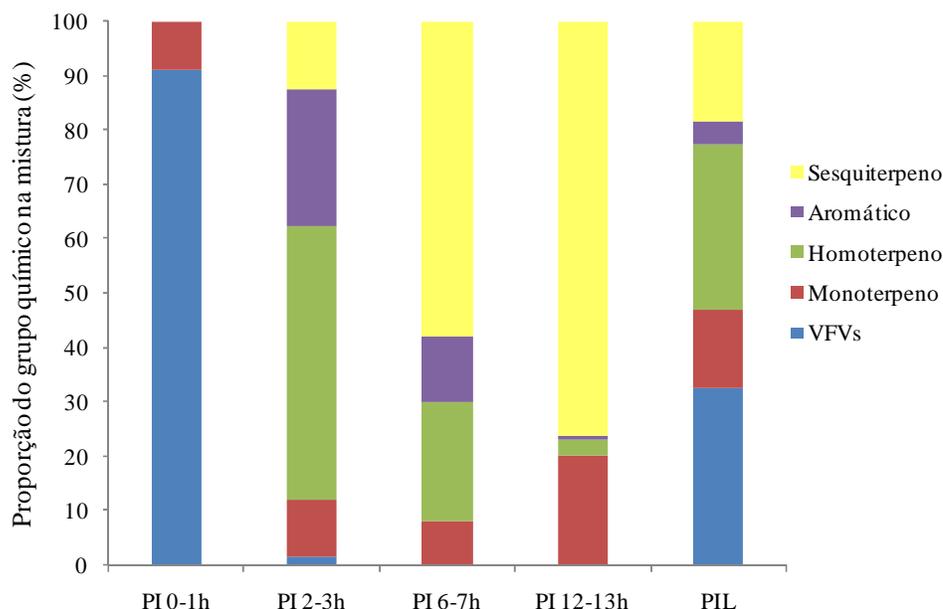


Figura 4.13 - Proporções em porcentagem de cada classe química presente na mistura liberada pela planta de milho induzida pelo regurgito de *Spodoptera frugiperda* após 0-1h (PI 0-1h), 2-3h (PI 2-3h), 6-7h (PI 2-3h), 12-13h (PI 12-13h) e induzida pela herbivoria das lagartas de *S. frugiperda* por uma noite (PIL)

4.4 Discussão

Os voláteis das plantas induzidas pelo ataque dos herbívoros são sinais químicos que podem ser detectados a longas distâncias pelos inimigos naturais (VET; DICKE, 1992), que os utilizam como importantes pistas na localização de seu hospedeiro. A mistura de voláteis emitidos pelas plantas atacadas pode também fornecer uma série de informações aos inimigos naturais, indicando a localização de sua presa, a espécie, o estágio de desenvolvimento, além do tipo de ataque (DE MORAES et al. 1998; MUMM et al., 2005; TAKABAYASHI et al., 1995).

Nesse sentido, o presente trabalho traz contribuições para um melhor entendimento dos sinais químicos utilizados pelos parasitóides de ovos na busca do seu hospedeiro a longas distâncias. Os resultados apresentados revelam que duas espécies de parasitóides de ovos, especialista e a outra generalista em relação a gama de hospedeiros, utilizam de maneira diferente os odores liberados pelas plantas sob o ataque do estágio não-alvo do seu hospedeiro, as lagartas.

O parasitóide de ovos especialista do gênero *Spodoptera*, *T. remus* não apresentou como comportamento inato a atração pelos voláteis liberados pela planta de milho induzidos pelo regurgito (PI 0-1, 2-3 e 6-7h) ou pela herbivoria das lagartas de *S. frugiperda* (PIL). No entanto,

após a experiência, ou seja, o parasitismo de ovos viáveis do hospedeiro associado aos odores da planta induzida pelas lagartas, *T. remus* foi capaz de aprender a associar os odores emitidos pela planta com a presença do seu hospedeiro.

O aprendizado só não ocorreu somente quando o parasitóide foi exposto aos odores da planta induzida pelo regurgito após 12-13h (PI 12-13h). Neste intervalo de tempo, a quantidade total e individual dos voláteis emitidos são menores em relação aos tempos anteriores, com exceção dos compostos (*E*)- β -cariofileno e β -mirceno (Tabela 4.1). Comparado com o intervalo 6-7h, os sesquiterpenos também predominam na mistura de 12-13h, porém em uma quantidade total inferior.

Por outro lado, o parasitóide generalista, que parasita uma gama diversa de espécies de lepidópteros, *T. pretiosum*, apresentou o comportamento inato de atração aos voláteis emitidos pela PI 0-1h e 2-3h. Essas misturas assemelham-se quanto à presença de VFVs, predominante em PI 0-1h, e de monoterpenos. A PI 2-3h, além desses compostos, emite o homoterpeno DMNT, assim como aromáticos e sesquiterpenos. É possível que os compostos responsáveis pela atração inata de *T. pretiosum* seja algum composto em comum presente em ambas as misturas, como o VFV acetato de (*Z*)-3-hexenila e os monoterpenos β -mirceno e linalol, ou ainda a combinação de ambos. Entre os dois monoterpenos, os receptores das antenas do parasitóide generalista *Trichogramma chilonis* Ishii (Hymenoptera: Trichogrammatidae) respondem mais intensamente ao linalol do que ao β -mirceno, mas também aos voláteis de folhas verdes (SEN et al., 2005). Essa mesma espécie é atraída pelo acetato (*Z*)-3-hexenila sintético em bioensaios em olfatômetro (REDDY; HOLOPAINEN; GUERRERO, 2002). De acordo com Romeis et al. (2005), os VFVs são importantes odores para os parasitóides generalistas *Trichogramma* spp. por serem comuns a diversas espécies de plantas e liberados independente da espécie do hospedeiro, porém, devem exercer um efeito arrestante e não de atração, pois, no ambiente natural, os parasitóides dificilmente são capazes de voar direcionados à fonte de odor por longas distâncias devido ao seu pequeno tamanho. Nesse trabalho, foi considerado o termo atração, pois os parasitóides mostraram um comportamento de locomoção direcionado à fonte de odor nos testes de olfatômetro (GAZIT; LEWIS; TUMLINSON, 1996).

De maneira semelhante ao parasitóide *T. remus*, *T. pretiosum* foi capaz de aprender a associar os odores liberados pela PI 6-7h com a presença do hospedeiro, mas o mesmo não ocorreu com os voláteis da PI 12-13h. Já, a PIL, cujos odores foram atraentes para os indivíduos

experientes de *T. remus*, não exerceu efeito sobre *T. pretiosum*, mesmo após a experiência. Embora os VFVs, que são atraentes para *T. pretiosum* inexperientes, estavam presentes em grandes quantidades na mistura liberada por PIL, os parasitóides não foram capazes de reconhecê-los provavelmente devido a alta diversidade e quantidade de terpenos na mistura que pode ter “mascarado” os VFVs.

Segundo a teoria clássica proposta por Vet e Dicke (1992), é esperado que os parasitóides especialistas sejam atraídos de forma inata aos voláteis liberados pelas plantas atacadas por seus hospedeiros. Enquanto que os generalistas não apresentam a atração inata a esses odores, porém, são mais aptos a aprendê-los. Após esse trabalho, muitos estudos buscaram comparar as estratégias de forrageamento de parasitóides larvais generalistas e especialistas empregando os voláteis de plantas (DICKENS, 1999; GOUINGUENÉ et al. 2005; HOBALLAH; TURLINGS, 2005; SHIOJIRI et al., 2000; SMID et al., 2002). A maioria desses trabalhos, no entanto, contraria a teoria de Vet e Dicke (1992) no que se trata da resposta inata, pois mostram que ocorre igualmente nos parasitóides generalistas. Quanto ao aprendizado, ele é mais comum em parasitóides generalistas, mas pode ocorrer também em algumas espécies especialistas (STEIDLE; VAN LOON, 2003).

De acordo com os resultados deste trabalho, o parasitóide de ovos especialista *T. remus* não apresentou atração inata por voláteis de plantas atacadas pelas lagartas, porém foi capaz de aprendê-los. Por outro lado, o parasitóide generalista *T. pretiosum* mostrou um comportamento inato de atração pelos voláteis liberados nas primeiras horas após o ataque das lagartas e foi também capaz de aprender.

O comportamento inato do parasitóide *T. pretiosum* corrobora com os trabalhos realizados com parasitóides larvais generalistas que são geralmente atraídos pelos VFVs antes de terem experiência de oviposição (HOBALLAH; TURLINGS, 2005; NGUMBI; CHEN; FADAMIRO, 2009; SHIOJIRI et al., 2006). O uso de VFVs por parasitóides larvais e predadores generalistas deve ser um comportamento de busca adaptativo, pois esse grupo de voláteis constituído por alcoóis, cetonas e ésteres de 6 carbonos na cadeia (BATE; ROTHSTEIN, 1998) são altamente detectáveis e indicam a presença de um hospedeiro em potencial (DICKENS, 1999). No caso do parasitóide de ovos, a atração por VFVs, ou pelo menos, o arrestamento (ROMEIS et al., 2005), mantém o parasitóide em áreas infestadas por herbívoros, onde provavelmente, ele encontrará ovos.

Outros estudos mostram que *T. remus* e *T. pretiosum* apresentam o comportamento inato de atração pelos feromônios sexuais e escamas do corpo de seus hospedeiros (BEEVERS et al., 1981; NORLUND; LEWIS; GUELDNER, 1983; NOLDUS; LEWIS; TUMLINSON, 1990; GAZIT; LEWIS; TUMLINSON, 1996). A resposta inata a esses compostos constitui um comportamento adaptativo do parasitóide, pois os feromônios sexuais, por mediarem comunicação intraespecífica, devem apresentar composição pouco variável. Estes odores, igualmente aos voláteis induzidos pela herbivoria, constituem pistas indiretas dos ovos, guiando-os para o local onde se encontra a comunidade do hospedeiro.

Como *S. frugiperda* é um herbívoro generalista, o aprendizado com os voláteis induzidos pela herbivoria permite ao parasitóide *T. remus* explorar os odores das diferentes plantas hospedeiras. Além disso, a planta de milho apresenta uma grande variabilidade quantitativa e qualitativa na composição dos voláteis induzidos pela herbivoria entre os diferentes genótipos (DEGEN et al., 2004; GOUINGUENÉ et al., 2001), sendo o aprendizado a melhor estratégia para usar os voláteis na localização do seu hospedeiro.

Estes resultados obtidos para o parasitóide especialista *T. remus* assemelham-se aos do trabalho de Manrique et al. (2005), que estudaram o parasitóide de ovos especialista *Anaphes iole* Girault (Hymenoptera: Mymaridae). Este parasitóide desenvolve-se exclusivamente em hospedeiros do gênero *Lygus* spp. (Hemiptera: Miridae) que, por sua vez, são herbívoros polípagos. Os parasitóides foram atraídos pelos voláteis liberados por diversas espécies vegetais atacadas por fêmeas ou machos adultos, entretanto, esse comportamento somente foi observado após a experiência de oviposição frente a esses odores. A indução da planta com espécies não hospedeiras, mesmo após a experiência, não provocou a atração de *A. iole*.

Outro exemplo de parasitóide especialista que responde aos voláteis somente após o aprendizado associativo é *Chrysonotomyia ruforum* Krausse (Hymenoptera: Eulophidae) (MUMM et al., 2005). Mesmo tratando-se de voláteis induzidos pela oviposição do seu hospedeiro, ou seja, odores específicos do estágio-alvo, o parasitóide não responde de maneira inata, o que contraria as teorias de Vet e Dicke (1992), Geervliet et al. (1998) e Steidle e van Loon (2003). Os autores sugerem que a necessidade de aprendizado dessas pistas pelo parasitóide especialista pode ser devido à alta variabilidade na composição de terpenóides entre os genótipos e até entre indivíduos da planta hospedeira, *Pinus sylvestris* L.. Assim, aparentemente, a resposta inata do parasitóide não seria adaptativa.

Por outro lado, nos trabalhos de Moraes et al. (2005, 2009), *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae), que é considerado um parasitóide generalista de ovos de pentatomídeos, é atraído inatamente por voláteis induzidos pela alimentação de ninfas e adultos ou pelo cis-jasmonato, precursor da defesa induzida por herbívoros, em plantas de soja e de grão-de-bico.

Além dos resultados referentes à atração dos parasitóides pelos voláteis liberados pelas plantas, esse trabalho avaliou a possibilidade dos parasitóides, guiados por essas pistas químicas, encontrar posturas recém-depositadas nas próprias plantas induzidas. Assim, em testes de preferência, verificou-se que os voláteis emitidos da planta de milho induzida pela herbivoria, representada pelo tratamento PIL, não interfere no comportamento de seleção da planta para oviposição de *S. frugiperda* (Figura 4.6). O número médio de ovos depositados na PND foi maior, no entanto, a diferença em relação à deposição de ovos na PIL não foi significativa. Em vista desses resultados e dos bioensaios de atração dos parasitóides de ovos, os voláteis do milho induzidos pela herbivoria das lagartas pode conduzi-los diretamente a plantas que contenha o estágio alvo do seu hospedeiro, os ovos.

Geralmente, as plantas atacadas pelos herbívoros induzem não só defesas indiretas, como a emissão de voláteis atraentes aos inimigos naturais, mas também a produção de defesas que podem afetar diretamente a biologia e o comportamento de seleção do herbívoro, seja pela produção de proteínas tóxicas ou de compostos deterrentes (FELTON et al., 1994; DE MORAES; MESCHER ; TUMLINSON, 2001). Por exemplo, a planta de milho induzida por outra espécie de lepidóptero, *Ostrinia furnacalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae), foi repelente para a oviposição de fêmeas da mesma espécie (HUANG et al., 2009). Entretanto, no trabalho de Anderson e Alborn (1999), *Spodoptera littoralis* Bois. (Lepidoptera: Noctuidae) preferiu ovipositar em plantas de algodão induzidas pela herbivoria das lagartas. Diferentemente, no nosso estudo, *S. frugiperda* não foi capaz de discriminar as plantas infestadas pelas lagartas das plantas intactas. Poderia se especular que esse resultado pode ter ocorrido em função das dimensões das gaiolas em que o experimento de preferência foi conduzido, porém nos dois últimos trabalhos citados, as gaiolas tinham aproximadamente o mesmo tamanho ou eram menores.

Segundo Peñaflor et al.¹(dados não publicados), os parâmetros biológicos das lagartas de *S. frugiperda* não são afetados pelas defesas induzidas pela herbivoria da mesma espécie. Portanto, a não discriminação das plantas induzidas por *S. frugiperda* na seleção da planta para a oviposição pode ser explicada pelo desenvolvimento da sua progênie, que não é afetado pela indução de defesas diretas.

Considerando-se que os odores dos ovos apresentam baixa detectabilidade e, por isso, não constituem pistas que atuam a longas distâncias, os odores das plantas induzidos pela alimentação do herbívoro constituem pistas mais facilmente detectáveis pelos parasitóides, pois são mais abundantes e apresentam maior volatilidade (VINSON, 1998; VET; DICKE, 1992; CONTI et al., 2003). No entanto, a utilização de voláteis induzidos pela herbivoria só será adaptativo para o parasitóide de ovos quando a espécie do hospedeiro apresenta sobreposição de gerações. No sistema tritrófico em estudo, *S. frugiperda* é uma espécie multivoltina, e, assim, a atração dos parasitóides de ovos *T. remus* e *T. pretiosum* pelos voláteis induzidos pela herbivoria das lagartas, é um comportamento adaptativo, pois o uso dessas pistas deve guiar os parasitóides ao habitat do hospedeiro, onde possivelmente poderão ser encontrados ovos, tornando assim a localização à longa distância mais eficiente.

Diferentemente dos parasitóides larvais, os parasitóides de ovos são agentes de controle biológico importantes devido a sua ação anterior ao ataque pelo inseto praga, prevenindo o dano à cultura. Sob essa perspectiva, a utilização de parasitóides de ovos em programas de controle biológico é mais vantajoso, e pode ainda atuar conjuntamente com os parasitóides larvais, pois não competem pelo mesmo estágio do hospedeiro e o controle pode ser otimizado (BOTELHO et al., 1999).

Os conhecimentos gerados nesse trabalho podem auxiliar no desenvolvimento de táticas que auxiliem a eficiência do controle biológico exercido pelos parasitóides de ovos em campo. Por exemplo, o emprego de semioquímicos importantes na localização do hospedeiro pelos parasitóides de ovos na área de cultivo pode aumentar o parasitismo (VINSON, 1992; KHAN et al. 2008). Além disso, a aplicação de substâncias que ativam a produção dos voláteis nas plantas (Ácido Jasmônico ou Ácido Salicílico) pode promover o mesmo efeito (STOUT; ZEHNDER; BAUR, 2002; LOU et al., 2005).

¹ PEÑAFLOR, M.F.G.V.; WERNEBURG, A.G.; ATAURI, L.M.; ERB, M.; ROBERT, C.; TURLINGS, T.C.J.; BENTO, J.M.S. A oviposição de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: noctuidae) altera as defesas diretas e indiretas do milho?

O presente trabalho revelou que os parasitóides de ovos especialista e generalista, *T. remus* e *T. pretiosum*, podem utilizar os voláteis induzidos pela herbivoria da lagarta-do-cartucho como pistas indiretas dos ovos de seu hospedeiro. Além disso, esses odores podem orientá-los a plantas contendo ovos, uma vez que *S. frugiperda* não apresentou um comportamento de preferência de oviposição definido. Os parasitóides de ovos com diferente grau de especialização quanto a gama de hospedeiros empregam estratégias diferentes no uso dos voláteis de plantas induzidos pela herbivoria. O especialista *T. remus* necessita da experiência com os odores, mas responde a diferentes composições de misturas, enquanto o generalista *T. pretiosum* apresenta comportamento inato aos voláteis emitidos pelo milho nas primeiras horas, em que os VFVs estão presentes, mas também tem capacidade de aprendizado. Os compostos-chave da atração de ambas espécies devem ser identificados em futuros estudos.

Referências

- ANDERSON, P.; ALBORN, H. Effects on oviposition behavior and larval development of *Spodoptera littoralis* by herbivore-induced changes in cotton plants. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Edinburgh, v. 92, p. 45-51, 1999.
- BATE, N.J.; ROTHSTEIN, S.J. C6-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. **Plant Journal**, Malden, v. 16, p. 561-569, 1998.
- BEEVERS, M.; LEWIS, W.J.; GROSS, H.R.; NORLUND, D.A. Kairomones and their use for management of entomophagous insects: X. Laboratory studies on manipulation of host-finding behavior of *Trichogramma pretiosum* Riley with a kairomone extracted from *Heliothis zea* (Boddie) moth scales. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 7, p. 635-648, 1981.
- BOTELHO, P.S.M.; PARRA, J.R.P.; CHAGAS NETO, J.F.; OLIVEIRA, C.P.B. Associação dos parasitóides de ovos *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e do parasitóide larval *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae) no controle de *Diatraea saccharalis*, (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Vacaria, v. 28, p. 491-496, 1999.
- BRUNI, R., SANT'ANA, J.; ALDRICH, J.R.; BIN, F. Influence of host pheromone on egg parasitism by Scelionidae wasps: Comparison of phoretic and nonphoretic parasitoids. **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 13, p. 165-173, 2000.
- COLAZZA, S.; ROSSI, M.C.; CLEMENTE, A. Response of the egg parasitoid *Telenomus busseolae* (Gahan) to sex pheromone of *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 23, p. 2437-2444, 1997.

CONTI, E.; SALERNO, G.; BIN, F.; WILLIAMS, H.J.; VINSON, S.B. Chemical cues from *Murgantia histrionica* eliciting host locations and recognition in the egg parasitoid *Trissolcus brachymenae*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 29, p. 115-130, 2003.

DE MORAES, C.M.; LEWIS, W.J.; PARE, P.W.; ALBORN, H.T.; TUMLINSON, J.H. Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. **Nature**, London, v. 393, p. 570-573, 1998.

DE MORAES, C.M.; MESCHER, M.C.; TUMLINSON, J.H. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. **Nature**, London, v. 410, p. 577-580, 2001.

DEGEN, T.; DILLMANN, C.; MARION-POLL, F.; TURLINGS, T.C.J. High genetic variability of herbivore-induced volatile emission within a broad range of maize inbred lines. **Plant Physiology**, Rockville, v. 135, p. 1928-1938, 2004.

DICKE, M.; SABELIS, M.W.; TAKABAYASHI, J.; BRUIN, J.; POSTHUMUS, M.A. 1990. Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals: prospects for application in pest control. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 16, p. 3091-3118.

DICKENS, J.C. Predator-prey interactions: olfactory adaptations of generalist and specialist predators. **Agricultural and Forest Entomology**, Burlington, v. 1, p. 47-54, 1999.

DUDAREVA, N.; NEGRE, F.; NAGEGOWDA, D.A.; ORLOVA, I. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Science**, Philadelphia, v. 25, p. 417-440, 2006.

FELTON, G.W.; BI, J.L.; SUMMERS, C.B.; MUELLER, A.J.; DUFFEY, S.S. Potential role of lipoxygenases in defense against insect herbivory. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 20, p. 651-666, 1994.

GAUTAM, R.D. Variations in amino acids in fertile and unfertile eggs of *Spodoptera litura* (Fabr.) contribute towards parasitism by *Telenomus remus* Nixon (Scelionidae: Hymenoptera). **Journal of Entomological Research**, New Delhi, v. 10, p. 161-165, 1986.

GAZIT, Y.; LEWIS, W.J.; TUMLINSON, J.H. Arrestment of *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae) by a kairomone associated with eggs of its host, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**, San Diego, v. 6, p. 283-290, 1996.

GEERVLIET, J.B.F.; VREUGDENHIL, A.I.; DICKE, M.; VET, L.E.M. Learning to discriminate between infochemicals from different plant-host complexes by the parasitoids *Cotesia glomerata* and *Cotesia rubecula*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Edinburgh, v. 86, p. 241-252, 1998.

GOINGUENÉ, S.; DEGEN, T.; TURLINGS, T.C.J. Variability in herbivore-induced odour emissions among maize cultivars and their wild ancestors (teosinte). **Chemoecology**, Jena, v. 11, p.9-16, 2001.

GOUNGUENÉ, S.; PICKETT, J.A.; WADHAMS, L.J.; BIRKETT, M.A.; TURLINGS, T.C.J. Antennal electrophysiological responses of three parasitic wasps to caterpillar-induced volatiles from maize, cotton and cowpea. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 31, p. 1023-1038, 2005.

GREENE, G.L.; LEPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar. A rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 69, p. 447-448, 1976.

HILKER, M.; KOBBS, C.; VARAMA, M.; SCHRANK, K. Insect egg deposition induces *Pinus* to attract egg parasitoids. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 205, p. 455-461, 2002.

HUANG, C.H.; YAN, F.M.; BYERS, J.A.; WANG, R.J.; XU, C.R. Volatiles induced by the larvae of the Asian corn borer (*Ostrinia furnacalis*) in maize plants affect behavior of conspecific larvae and female adults. **Insect Science**, Chongqing, v. 16, p. 311-320, 2009.

HOBALLAH, M.E.F.; TURLINGS, T.C.J. The role of fresh versus old leaf damage in the attraction of parasitic wasps to herbivore-induced maize volatiles. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 31, p. 2003-2018, 2005.

KESSLER, A.; BALDWIN, I.T. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. **Science**, Washington, v. 291, p. 2141-2144, 2001.

KHAN, Z.R.; JAMES, D.G.; MIDEGA, C.A.O.; PICKETT, J.A. Chemical ecology and conservation biological control. **Biological Control**, San Diego, v. 45, p. 210-224, 2008.

LOU, Y.G.; MA, B.; CHENG, J.A. Attraction of the parasitoid *Anagrus nilaparvatae* to rice volatiles induced by the rice brown planthopper *Nilaparvata lugens*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 31, p. 2357-2372, 2005.

LOU, Y.G.; DU, M.H.; TURLINGS, T.C.J.; CHENG, J.A.; SHAN, W.F. Exogenous application of jasmonic acid induces volatile emissions in rice and enhances parasitism of *Nilaparvata lugens* eggs by the parasitoid *Anagrus nilaparvatae*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 31, p. 1985-2002, 2005.

MANRIQUE, V.; JONES, W.A.; WILLIAMS, L.H.; BERNAL, J.S. Olfactory responses of *Anaphes iole* (Hymenoptera: Mymaridae) to volatile signals derived from host habitat. **Journal of Insect Behavior**, Byron, v. 18, p. 89-104, 2005.

MATTIACCI, L.; DICKE, M.; POSTHUMUS, M.A. β -Glucosidase: an elicitor of herbivore induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Washington, v. 92, p. 2036-2040, 1995.

MEINERS, T.; HILKER, M. Host location in *Oomyzus gallerucae* (Hymenoptera: Eulophidae), an egg parasitoid of the elm leaf beetle *Xanthogaleruca luteola* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Oecologia**, Heidelberg, v. 112, p. 87-93, 1997.

MEINERS, T.; HILKER, M. Induction of plant synomones by oviposition of a phytophagous insect. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 26, p. 221-232, 2000.

MORAES, M.C.; LAUMANN, R.; SUJII, E.R.; PIRES, C.; BORGES, M. Induced volatiles in soybean and pigeon pea plants artificially infested with the neotropical brown stink bug, *Euchistus heros*, and their effect on the egg parasitoid, *Telenomus podisi*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Edinburgh, v. 115, p. 227-237, 2005.

MORAES, M.C.B.; LAUMANN, R.; PAREJA, M.; SERENO, F.T.P.S.; MICHEREFF, M.F.F.; BIRKETT, M.A.; PICKETT, J.A.; BORGES, M. Attraction of the stink bug egg parasitoid *Telenomus podisi* to defence signals from soybean activated by treatment with cis-jasmone. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Edinburgh, v. 131, p. 178-188, 2009.

MUMM, R.; TIEMANN, T.; VARAMA, M.; HILKER, M. Choosy egg parasitoids: Specificity of oviposition-induced pine volatiles exploited by an egg parasitoid of pine sawflies. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Edinburgh, v. 115, p. 217-225, 2005.

NGI SONG, A.J.; OVERHOLT, W.A.; NJAGI, P.G.N.; DICKE, M.; AYERTEY, J.N.; LWANDE, W. Volatile infochemicals used in host and host habitat location by *Cotesia flavipes* Cameron and *Cotesia sesamiae* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), larval parasitoids of stemborers on gramineae. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 22, p. 307-323, 1996.

NGUMBI, E.; CHEN, L.; FADAMIRO, H.Y. Comparative GC-EAD responses of a specialist (*Microplitis croceipes*) and a generalist (*Cotesia marginiventris*) parasitoid to cotton volatiles induced by two caterpillar species. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 35, p. 1009-1020, 2009.

NOLDUS, L.P.J.; LEWIS, W.J.; TUMLINSON, J.H. beneficial aethropod behavior mediated by airborne semiochemicals. IX Differential response of *Trichogramma pretiosum*, an egg parasitoid of *Heliothis zea*, to various olfactory cues. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 16, p. 3531-3544, 1990.

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

PICHO, H.G. Biologia de *Telenomus remus* Nixon (Hym.: Scelionidae). **Revista Peruana de Entomologia**, Lima, v. 30, p. 29-32, 1987.

PINTO, J.D. Taxonomia de Trichogrammatidae (Hymenoptera) com ênfase nos gêneros que parasitam Lepidoptera. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, 1997. p. 13-39.

REDDY, G.V.P.; HOLOPAINEN, J.K.; GUERRERO, A. Olfactory responses of *Plutella xylostella* natural enemies to host pheromone, larval frass, and green leaf cabbage volatiles. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 28, p. 131-143, 2002.

ROMEIS, J.; BABENDREIER, D.; WÄCKERS, F.L.; SHANOWER, T.G. Habitat and plant specificity of *Trichogramma* egg parasitoids—underlying mechanisms and implications. **Basic and Applied Ecology**, Gottingen, v. 6, p. 215-236, 2005.

ROSTÁS, M.; HILKER, M. Feeding damage by larvae of the mustard leaf beetle deters conspecific females from oviposition and feeding. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Edinburgh, v. 103, p. 267-277, 2002.

SCHWARTZ, A.; GERLING, D. Adult biology of *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae) under laboratory conditions. **Entomophaga**, Paris, v. 19, p. 482-492, 1974.

SEN, A.; RAINA, R.; JOSEPH, M.; TUNGIKAR, V.B. Response of *Trichogramma chilonis* to infochemicals: an SEM and electrophysiological investigation. **Biocontrol**, Amsterdam, v. 50, p. 429-447, 2005.

SHIOJIRI, K.; TAKABAYASHI, J.; YANO, S.; TAKAFUJI, A. Herbivore-species-specific interactions between crucifer plants and parasitic wasps (Hymenoptera: Braconidae) that are mediated by infochemicals present in areas damaged by herbivores. **Applied Entomology and Zoology**, Mie, v. 35, p. 519-524, 2000.

SHIOJIRI, K.; OZAWA, R.; MATSUI, K.; KISHIMOTO, K.; KUGIMIYA, S.; TAKABAYASHI, J. Role of the lipoxygenase/lyase pathway of host-food plants in the host searching behavior of the two parasitoid species, *Cotesia glomerata* and *Cotesia plutellae*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 32, p. 969-979, 2006.

SHU, S.; JONES, R. L. Kinetic effects of kairomone in moth scales of the European corn borer on *Trichogramma nubilale* Ertle & Davis (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Journal of Insect Behavior**, Byron, v. 2, p. 123–131, 1989.

SMID, H.M.; VAN LOON, J.A.; POSTHUMUS, M.A.; VET, L.E.M. GC-EAG-analysis of volatiles from Brussels sprouts plants damaged by two species of *Pieris* caterpillars: olfactory receptive range of a specialist and a generalist parasitoid wasp species. **Chemoecology**, Jena, v. 12, p. 169-176, 2002.

STEIDLE, J.L.M.; VAN LOON, J.J.A. Dietary specialization and infochemical use in carnivorous arthropods: testing a concept. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Edinburgh, v. 108, p. 133-148, 2003.

STOUT, M.J.; ZEHNDER, G.W.; BAUR, M.E. Potential for the use of elicitors of plant resistance in arthropod management programs. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, Tokyo, v. 51, p. 222-235, 2002.

TAKABAYASHI, J.S.; TAKAHASHI, S.; DICKE, M.; POSTHUMUS, M.A. Developmental stage of herbivore *Pseudaletia separata* affects production of herbivore-induced synomone by corn plants. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 21, p. 273-287, 1995.

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

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

VET, L.E.M.; DICKE, M. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 37, p. 141-172, 1992.

VINSON, S.B. Can semiochemicals alter the use of parasites in IPM programs. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 301-313, 1992.

VINSON, S.B. The general host selection behavior of parasitoid Hymenoptera and a comparison of initial strategies utilized by larvaphagous and oophagous species. **Biological Control**, San Diego, v. 11, p. 79-96, 1998.

ZUCCHI, R.A.; MONTEIRO, R.C. O gênero *Trichogramma* na América do Sul. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, 1997. p. 41-46.

5 A OVIPOSIÇÃO DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) ALTERA AS DEFESAS DIRETAS E INDIRETAS DO MILHO?

Resumo

As plantas, quando atacadas pelos insetos herbívoros, emitem substâncias voláteis que constituem pistas químicas para os inimigos naturais na busca pelo seu hospedeiro/presa. Esse mecanismo de defesa indireta já foi comprovado em diversas espécies de plantas. Mais recentemente, verificou-se que a oviposição dos herbívoros também desencadeia nas plantas a produção de voláteis atraentes para os parasitóides de ovos. O presente estudo teve como objetivo investigar se a oviposição de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) altera as defesas diretas e indiretas do milho induzidas pela herbivoria. As defesas diretas da planta contra a herbivoria das lagartas de *S. frugiperda* não foram alteradas pela oviposição. Em relação à defesa indireta, as plantas que sofreram oviposição emitiram em menores quantidades os compostos terpenos (homo, mono e sesquiterpenos) em relação ao controle, enquanto que as emissões de voláteis de folhas verdes e aromáticos não foram alterados. Esses resultados sugerem que a oviposição do herbívoro pode ter implicações importantes nas interações tritróficas e mais estudos deverão ser conduzidos para investigar os efeitos dessas alterações no 3° nível trófico.

Palavras-chave: Defesas induzidas, Voláteis de planta, Terpenos, Herbivoria, Oviposição

Abstract

Herbivore-attacked plants emit volatile substances that are used as chemical cues by natural enemies for host/prey finding. This indirect defense mechanism was demonstrated in several plant species. More recently, it was verified that herbivore oviposition on plant also elicits production of attractive volatiles to egg parasitoids. The current study aimed to investigate if *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) oviposition changes direct and indirect herbivore-induced maize defenses. Plant direct defenses, measured by weight of larvae fed on the plant, were not changed by oviposition. In regard to indirect defenses, oviposition induced plants emitted in lower amounts terpene compounds (mono, di and sesquiterpenes) in relation to control, while emissions of green leaf volatiles and aromatics were not changed. These results suggest that herbivore oviposition can have important relevance in tritrophic interactions and further studies will be conducted to investigate the effects of these changes on the 3rd trophic level.

Keywords: Induced defenses, Plant volatiles; Terpenes, Herbivory, Oviposition

5.1 Introdução

As plantas apresentam diversos mecanismos de defesa que são produzidos apenas quando atacadas pelos herbívoros, denominadas de defesas induzidas. Essas defesas podem ser classificadas em diretas quando reduzem a alimentação ou a oviposição do herbívoro, ou indiretas, quando consistem em mecanismos que provocam a atração dos inimigos naturais dos herbívoros (KARBAN; BALDWIN, 1997). Estes mecanismos podem ser estruturas que servem de abrigo, como as domáceas, que provêm açúcar, ou como nectários extraflorais, ou a liberação de compostos voláteis atraentes aos inimigos naturais (TURLINGS; WÄCKERS, 2004). A emissão de voláteis induzidos após o ataque dos herbívoros constitui uma das principais pistas químicas na localização do hospedeiro/presa pelos inimigos naturais (DE MORAES et al., 1998; DICKE et al., 1990).

O estágio de ovo dos herbívoros não produz qualquer dano à planta, porém, ela é capaz de detectar a presença de posturas sobre a sua superfície e, de modo semelhante à herbivoria, induzir mecanismos de defesa. A resposta defensiva da planta à oviposição do herbívoro constitui um modo de prevenir o dano provocado pelos imaturos que irão eclodir (HILKER; MEINERS, 2006; HILKER; ROHFRIETSCH; MEINERS, 2002). Essas defesas também podem ser direcionadas direta ou indiretamente aos ovos, larvas recém-eclodidas, e/ou fêmeas grávidas. As defesas diretas induzidas compreendem o crescimento de neoplasmas no local em contato com o tecido vegetal, a necrose (resposta hipersensitiva), produção de substâncias ovicidas, ou ainda a produção de aleloquímicos deterrentes da oviposição (BALBYSHEV; LORENZEN, 1997; BLAAKMEER et al., 1994; DOSS et al., 2000; SEINO; SUZUKI; SOGAWA, 1996).

As defesas indiretas induzidas pela oviposição consistem na liberação de voláteis atraentes aos parasitóides de ovos (HILKER; MEINERS, 2002), ou em alterações químicas da superfície da folha que são detectadas pelo contato e tem efeito arrestante para parasitóides de ovos (FATOUROS et al., 2005, 2007). Entretanto, desde a primeira descoberta (MEINERS; HILKER, 1997), esse tipo de defesa foi efetivamente comprovada em poucos sistemas tritróficos, que foram extensivamente estudados nos últimos anos, sugerindo que esse mecanismo deve ser particular a algumas espécies vegetais, ou que esse tipo de interação deve ainda ser mais bem estudado. (FATOUROS et al., 2008; HILKER et al., 2002; MEINERS; HILKER, 2000; MUMM et al. 2003; WEGENER et al. 2001).

Como a oviposição freqüentemente antecede o ataque pela herbivoria na planta (HUANG et al., 2009; ROSTÁS; HILKER, 2002), a detecção dos ovos representa um sinal importante de risco de ataque iminente. Assim, a hipótese testada nesse estudo é que, após a deposição de ovos, a planta pré-ative as suas defesas contra herbivoria, como em um estado de alerta.

A indução de defesas contra herbivoria envolve uma série de processos como o reconhecimento do ataque, a ativação dos genes e o desencadeamento de rotas bioquímicas que levam algumas horas (REYMOND et al., 2000). Por isso, a ativação das primeiras etapas da indução previamente ao dano devido à detecção do caminhar ou da oviposição do inseto na planta pode proporcionar uma maior eficiência na defesa quando sob o ataque (HILKER; MEINERS, 2009). Essa hipótese é congruente ao efeito “priming” que corresponde a um estado fisiológico da planta de preparação das respostas defensivas devido a estímulos externos, de forma que, ao ser atacada, as defesas são induzidas mais rápida e intensamente (CONRATH et al., 2006).

Estímulos de diferentes naturezas podem provocar o estado fisiológico de “priming” nas plantas, entretanto, em relação às defesas induzidas pelo ataque de herbívoros, o principal estímulo reportado é a detecção de voláteis emitidos pelas plantas vizinhas atacadas pelos herbívoros (ENGELBERTH et al., 2004; KESSLER et al., 2006; FROST et al., 2008).

Em vista disso, o presente trabalho teve como objetivo verificar se a oviposição de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) alterou a expressão das defesas diretas e indiretas contra a herbivoria avaliando-se as lagartas da mesma espécie. A hipótese testada considerou que a indução de defesas diretas e indiretas previamente à herbivoria poderia constituir um mecanismo adaptativo das plantas, pois a indução mais rápida e eficiente das defesas poderia contribuir para que a planta torna-se mais apta à sobrevivência no ambiente.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Cultivo das plantas e criação dos insetos

As plantas de milho (*Zea mays* var. Delprim) foram cultivadas no substrato comercial Basiplant[®] e mantidas em casa-de-vegetação. Foram utilizadas plantas com 8-10 dias após a emergência, contendo 3 folhas.

Os insetos utilizados nos experimentos foram provenientes de criações mantidas em uma sala a 25±2°C, UR de 70±10% e 12 h de fotofase, no laboratório de Ecologia Química e

Comportamento de Insetos, ESALQ/USP. A população de *S. frugiperda* foi proveniente da criação do Laboratório de Biologia de Insetos, ESALQ/USP, e foi criada em dieta artificial (GREENE; LEPPLA; DICKERSON, 1976). Massas de ovos colocadas sobre o papel sulfite foram recortadas e acondicionadas em copos plásticos de 4,5 cm de altura e 7 cm de diâmetro, contendo a dieta artificial, até atingirem o 3º instar (PARRA, 2001). Nesse estágio, 40 lagartas foram transferidas para uma bandeja fechada de 19 cm de comprimento, 13 cm de largura e 3 cm de altura, com aproximadamente 150 ml de dieta artificial, previamente esterilizada em luz UV, onde foram mantidas até a fase de pupa (DA SILVA, dados não publicados). Em seguida, as pupas foram transferidas para potes plásticos fechados até a emergência dos adultos, quando os sexos foram separados, de acordo com diferenças na coloração das asas, e acondicionados em gaiolas de PVC de 10 cm de diâmetro e 22 cm de altura, fechadas em ambas extremidades com placas de Petri. As gaiolas foram forradas internamente com papel sulfite, que foi diariamente trocado para a coleta das posturas de *S. frugiperda*.

5.2.2 Plantas induzidas pela oviposição

Para a obtenção de posturas de *S. frugiperda* nas plantas, três fêmeas com idade aproximada de três dias, ou seja, em início de oviposição (ESCALDANTE, 1974), provenientes da criação de laboratório, foram colocadas em gaiolas de *voile* acopladas às plantas de milho por uma noite. No dia seguinte, as plantas contendo 2 a 3 posturas médias foram separadas para os experimentos (Figura 5.1).

5.2.3 Experimentos de defesas diretas

O experimento para avaliar as defesas diretas das plantas consistiu na pesagem e na estimativa de outros parâmetros biológicos do desenvolvimento de lagartas alimentadas nos diferentes tratamentos.

Em dois experimentos diferentes, foram avaliados quatro tratamentos: (i) Planta Não Danificada (PND); (ii) Planta Induzida pelo Regurgito (PIR); (iii) Planta Induzida pela Oviposição (PIO); (iv) Planta Induzida pela Oviposição+Regurgito (PIOR). Nos tratamentos PIO e PIOR, as posturas foram removidas 48h após a indução pela oviposição. A indução pela

herbivoria consistiu na raspagem da 2ª e 3ª folhas das plantas de milho dos tratamentos PIR e PIOR e a aplicação de 10 µL de regurgito de *S. frugiperda* no local, no dia anterior ao início do bioensaio.

No experimento 1, foi aprisionada uma lagarta de 2º ínstar em gaiolas acopladas à 2 ou 3ª folha da planta que, nos tratamentos PIO e PIOR, necessariamente continha posturas. Dessa maneira, disponibilizou-se, diariamente, a mesma área foliar (limitada pela gaiola presa à folha) para a alimentação das lagartas em todos os tratamentos, de aproximadamente 0,8 cm². Portanto, nesse experimento não foi possível prolongar o tempo de avaliação, que foi de 5 dias, pois as lagartas mais desenvolvidas necessitavam de uma maior quantidade de alimento. Periodicamente, as lagartas foram pesadas e retornadas às mesmas plantas (Figura 5.2 A-C). Nas primeiras 24h, as lagartas foram pesadas três vezes, às 6, 18 e 24h após o início do bioensaio, para verificar se havia algum efeito dos tratamentos logo após a indução.

No experimento 2, foram utilizadas plantas de milho maiores (5-6 folhas) que foram disponibilizadas para a alimentação de uma lagarta de 2º instar que permaneceu na mesma planta até a pupação. Para manter a lagarta na planta, foi necessário acoplar gaiolas aos vasos de planta. Essas gaiolas foram feitas com garrafas PET de 2 l, cortadas no fundo, inseridas cuidadosamente na planta pela boca da garrafa, que foi fixada no vaso com Parafilm® (Figura 5.2 D). Nas bordas superiores da garrafa, local por onde as lagartas poderiam fugir, foi espalhada uma fina camada de talco. Diferentemente do experimento 1, a quantidade de alimento não foi controlada, assim a lagarta poderia se alimentar livremente de qualquer parte da planta. Seguindo o mesmo procedimento do experimento anterior, as lagartas foram pesadas diariamente, porém nesse experimento, foi possível avaliar outros parâmetros do desenvolvimento da lagarta-do-cartucho, como o tempo de larva-pupa, mortalidade larval, a viabilidade pupal e o peso das pupas.

A sala na qual estes experimentos foram conduzidos foi mantida a temperatura de 23±3°C, fotoperíodo de 12h e UR de 50±10%.



Figura 5.1 - Planta de milho submetida à oviposição de *Spodoptera frugiperda* por o período de uma noite (tratamento “planta induzida pela oviposição” – PIO)

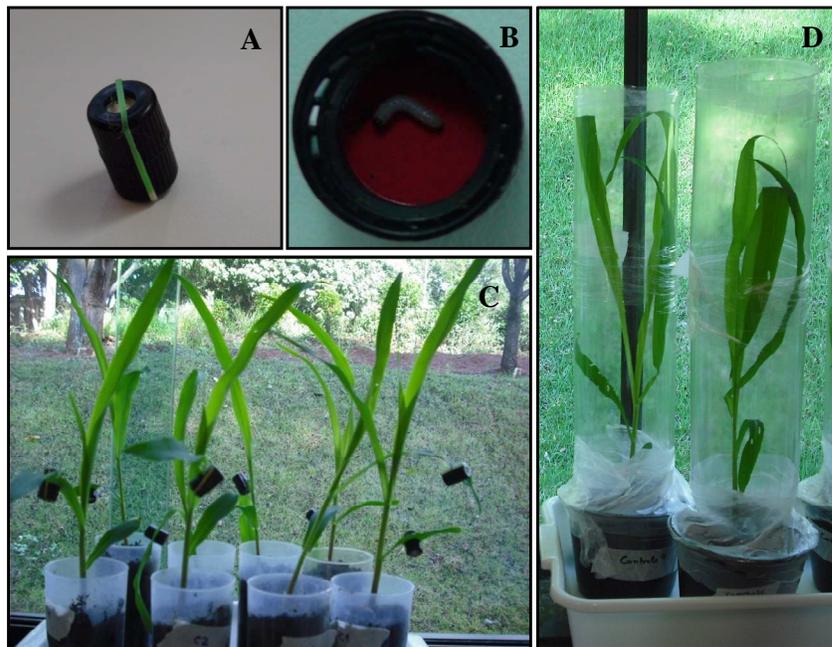


Figura 5.2 – A: gaiola utilizada no experimento 1 de defesa direta; B: lagarta de *Spodoptera frugiperda* de 2º instar no interior da gaiola; C- plantas de milho com as gaiolas acopladas às folhas (experimento 1); D: plantas de milho com gaiolas de garrafa PET para evitar a fuga das lagartas (experimento 2)

5.2.3 Experimento de defesas indiretas

Nesse experimento foi avaliado o efeito da oviposição da *S. frugiperda* sobre as defesas indiretas da planta em termos de produção de voláteis induzidos pela herbivoria. Semelhantemente ao experimento de defesa direta, após 48h as posturas da plantas foram removidas. Logo em seguida, as plantas induzidas ou não pela oviposição de *S. frugiperda* foram raspadas na 2^a e 3^a folhas e 10 µL de regurgito da lagarta-do-cartucho foi aplicado no local, compreendendo os tratamentos Planta Induzida pela Oviposição+Regurgito (PIOR) e Planta Induzida pelo Regurgito (PIR), respectivamente. Após isso, as plantas foram acondicionadas nas câmaras de vidro do sistema de coleta de voláteis, de maneira que a coleta foi iniciada imediatamente. As amostras dos voláteis foram coletadas a cada 1h30min, até completar 9h. A última coleta foi das 9-12h após a indução.

5.2.4 Coleta e Identificação dos voláteis

O sistema de coleta de voláteis e a metodologia empregada foram descritos detalhadamente por Turlings et al. (1998). Para a realização da coleta de voláteis, as plantas foram acondicionadas em câmaras de vidro acopladas ao sistema de aeração, cujo fluxo de entrada foi de 1,1 L/min (Figura 5.3 A). Para o bombeamento de ar no interior do sistema, utilizou-se uma bomba a vácuo que succionou o ar a 0,8 L/min e foi conectada aos filtros de coleta dos voláteis acoplados às câmaras contendo as plantas. Os filtros consistiram de um tubo de vidro fino com 25 mg de polímero adsorvente Super-Q® em seu interior (Figura 5.3 B).



Figura 5.3 – A: Câmaras de vidro com as plantas de milho, conectadas ao sistema de coleta de voláteis; B: Filtro de tubo de vidro com o polímero adsorvente Super-Q® sendo eluído com solvente diclorometano

Os filtros de Super-Q® expostos aos odores das plantas foram lavados com 150 μl de solvente diclorometano e o extrato foi armazenado em frascos de vidro vedados mantidos em um freezer a -86°C , até a análise. A cada amostra, foi adicionado 10 μl de uma solução de 200 ng de n-octane e nonyl acetate, como padrão interno.

As análises foram realizadas em um equipamento CG Agilent 78901 com o injetor ajustado em splitless, detector de ionização de chama (FID) e Hélio como gás de arraste (24 cm/s). De cada amostra, foi injetada uma alíquota de 3 μl em uma coluna capilar apolar EC-1 (30 m de comprimento 0,25mm de diâmetro e 0,25 μm de espessura de parede). Após a injeção, a temperatura da coluna foi mantida a 40°C por 3 min, elevada a uma velocidade de $8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até atingir 100°C e depois reduzida para $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 220°C . O sinal do detector foi processado com o software MSD ChemStation. Para a identificação, os espectros de massa dos compostos dados pelo equipamento EM Agilent VLMSD 59956 foram comparados com as bibliotecas “Plantvol.1”(específica para voláteis de milho) e “NIST05a”. Os compostos voláteis identificados foram agrupados nas diferentes classes químicas de acordo com a Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Compostos voláteis produzidos pelas plantas de milho induzidas pelo regurgito das lagartas de *Spodoptera frugiperda* divididos de acordo com as classes químicas

Voláteis de folhas verdes	Aromáticos	Mono e Homoterpenos	Sesquiterpenos
(Z)-3-hexenal	acetato de benzila	β -mirceno	(E)- β -cariofileno
(E)-2-hexenal	acetato de fenetila	linalol	(E)- α -bergamoteno
(E)-3-hexen-1-ol	indol	(3E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno	α -humuleno
acetato de (Z)-3-hexenila	acetato de geranila		(E)- β -farneseno

5.2.5 Análise dos dados

Os dados dos experimentos de defesa direta 1 e 2 foram analisados pela ANOVA- medidas repetidas. O parâmetro biológico mortalidade larval foi analisado pelo qui-quadrado ($\alpha=0,05$). Como os dados do tempo larva-pupa não apresentaram normalidade (teste Kolmogorov-Smirnov), eles foram analisados pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$). Já os dados referentes ao peso pupal passaram nos testes de normalidade e homogeneidade e foram analisados pela ANOVA ($\alpha=0,05$).

Os dados de quantificação dos compostos voláteis dos emitidos pelos tratamentos PIR e PIOR foram transformados pela fórmula analisados pelo teste t $\log(x+1)$ anteriormente à comparação pelo teste t ($\alpha=0,05$). Essas análises foram realizadas utilizando o software SigmaStat (Versão 2.03).

5.3 Resultados

O peso médio das lagartas de *S. frugiperda* não diferiu entre os tratamentos planta não danificada (PND), planta induzida pelo regurgito (PIR), planta induzida pela oviposição (PIO) e planta induzida pela oviposição e o regurgito (PIOR), em nenhum dos intervalos de tempo avaliados (ANOVA tempo*tratamento $F=1,537$; $P=0,084$; tratamento $F=0,363$; $P=0,7802$)(Figura 5.4). Entretanto, observa-se que, após o intervalo 48h, as curvas deixaram de se sobrepor e o peso médio das lagartas do tratamento PIOR foi menor em relação aos demais tratamentos, sendo essa diferença maior na última avaliação, com 132h. Neste intervalo, o peso médio das lagartas alimentadas em PND foi de $0,0056 \pm 0,0007$ g; $0,0054 \pm 0,0002$ em PIR; $0,0057 \pm 0,0004$ em PIO; e $0,0044 \pm 0,0004$ em PIOR.

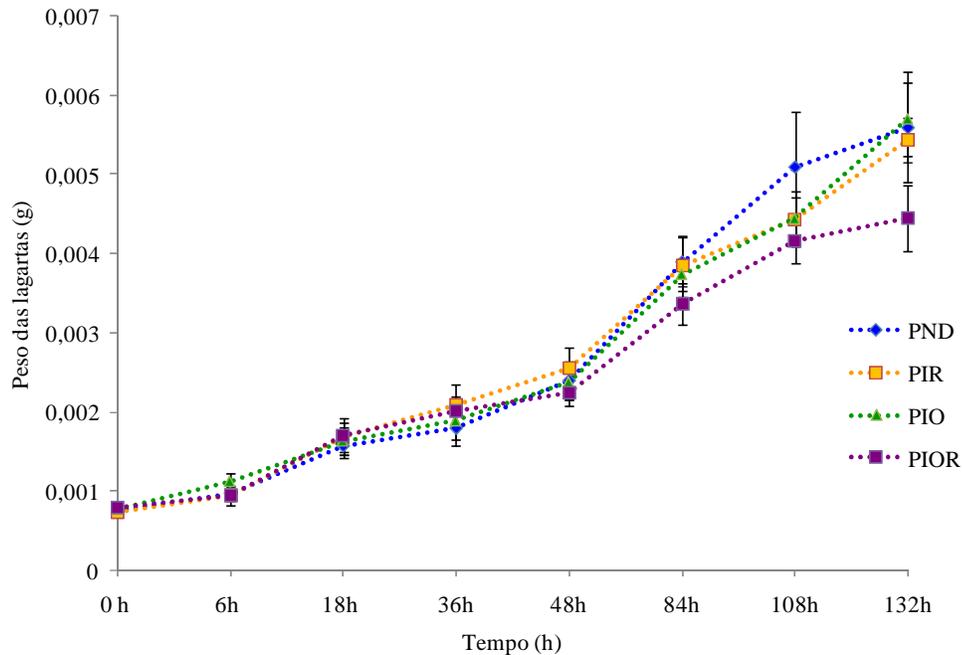


Figura 5.4 - Peso médio das lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas em planta de milho não danificada (PND), planta de milho induzida pelo regurgito (PIR), planta de milho induzida pela oviposição (PIO) e planta de milho induzida pela oviposição e o regurgito (PIOR), ao longo do tempo. Os dados referem-se ao experimento 1, em que as lagartas foram confinadas em gaiolas e a área foliar disponível ao consumo delimitada (ANOVA; n=9 tratamento F=0,363 P=0,7802; tempo*tratamento F=1,537; P=0,084).

No experimento 2 de defesa direta, em que se avaliou o peso das lagartas de *S. frugiperda* de 2º instar alimentadas por um tempo mais longo (10 dias), não houve diferença entre os tratamentos PND, PIR, PIO e PIOR, de maneira semelhante ao experimento 1 (Figura 5.5) (ANOVA tempo*tratamento F=1,284; P=0,1500; tratamento F=0,2865; P=0,8348). Nota-se que a partir do 5º dia, as curvas do peso médio das lagartas se diferenciaram discretamente, sendo PIR o tratamento com peso médio mais baixo até o 8º dia. No 9º dia, PIO passa a ser o tratamento com peso médio das lagartas mais baixo, porém, no último dia, o 10º dia, o peso médio de PIOR foi o mais baixo, seguido de PIO e PIR.

Os parâmetros biológicos mortalidade larval, duração de larva a pupa e peso da pupa das lagartas no experimento 2 de defesa direta não foram afetados pelos tratamentos de indução pelo regurgito e oviposição (Tabela 5.2). A maior mortalidade larval foi observada no tratamento PIR (53%), porém apresentou um maior peso pupal (0,1689±0,0206 g). Já a menor mortalidade larval, foi em PIO (35%) que, por sua vez apresentou o menor peso pupal (0,1258±0,0172 g) e o maior período de desenvolvimento de larva a pupa (13,5±0,5 dias).

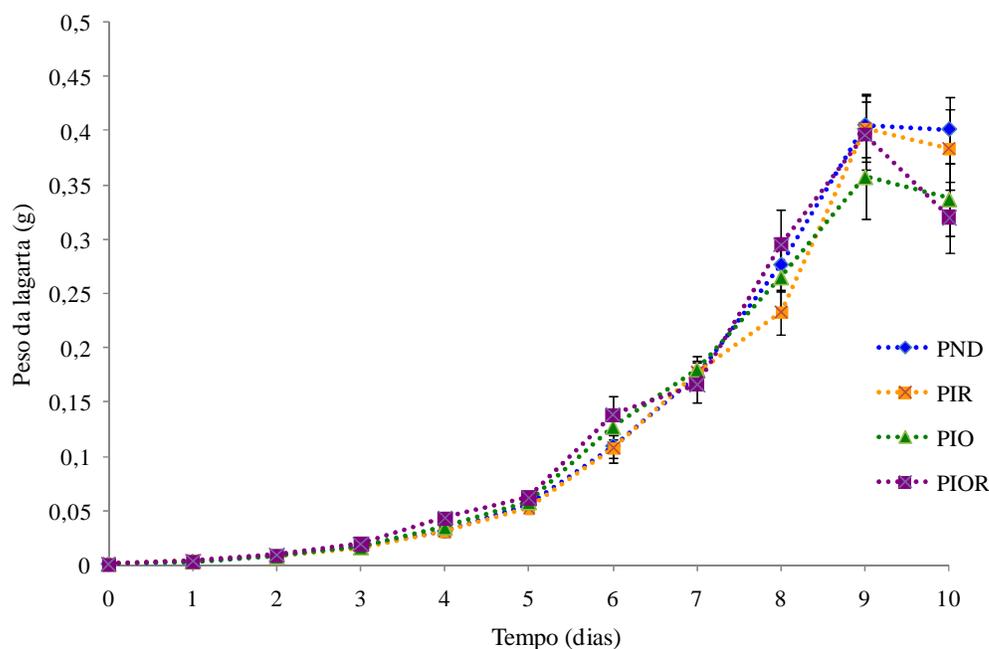


Figura 5.5 - Peso médio das lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas em planta de milho não danificada (PND), planta induzida pelo regurgito (PIR), planta induzida pela oviposição (PIO) e planta induzida pela oviposição e o regurgito (PIOR), ao longo do tempo. Os dados referem-se ao experimento 2, em que se disponibilizou uma planta para a alimentação livre da lagarta (ANOVA $n=15$ tratamento $F=0,286$ $p=0,8348$; tempo*tratamento $F=1,284$; $P=0,1500$).

Tabela 5.2 – Parâmetros biológicos do desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* alimentadas em planta não danificada (PND), planta induzida pelo regurgito (PIR), planta induzida pela oviposição (PIO) e planta induzida pela oviposição e o regurgito (PIOR)

Parâmetro biológico	Tratamentos			
	PND	PIR	PIO	PIOR
mortalidade larval (%) ^a	46%	53%	35%	43%
larva-pupa (dias±EP) ^b	13,0±0,6 a	12,6±0,4 a	13,5±0,5 a	12,6±0,4 a
peso pupal (g) ^c	0,1523±0,0118 a	0,1689±0,0206 a	0,1258±0,0172 a	0,1594±0,0157 a

^a a frequência de mortalidade não diferiu entre os tratamentos de acordo com o teste de qui-quadrado ($\chi^2=0,704$ $P=0,8723$)

^b a duração do período larva-pupa não diferiu entre os tratamentos de acordo com o teste Kruskal-Wallis ($H=2,670$ $P=0,4450$)

^c o peso pupal não diferiu entre os tratamentos de acordo com a ANOVA ($F=1,265$ $P=0,3070$)

No experimento em que se avaliou a influência da oviposição de *S. frugiperda* sobre as defesas indiretas das plantas contra herbivoria, verificou-se que o padrão de emissão de algumas classes de voláteis sofreu alteração em relação à planta controle que foi igualmente induzida com o regurgito das lagartas, mas que não foram induzidas pela oviposição (tratamento PIR).

Os VFVs apresentaram um padrão de emissão muito semelhante nos dois tratamentos, PIR e PIOR, em todos os tempos avaliados (Figura 5.6), sendo detectados em maiores quantidades no primeiro intervalo de 1h30min.

Por outro lado, os compostos homo e monoterpênicos, à partir das 3h, foram emitidos em maiores quantidades pelas plantas do tratamento PIR (controle), em relação à PIOR, e essa diferença foi significativa nos intervalos 6 e 9h (Figura 5.7) (teste t; 6h $t=2,592$ $P=0,029$; 9h $t=2,269$ $P=0,049$). Observou-se a ausência do pico na emissão desses compostos na PIOR, que ocorreu às 6h na PIR, atingindo, em média, $631,6 \pm 206,8$ ng.

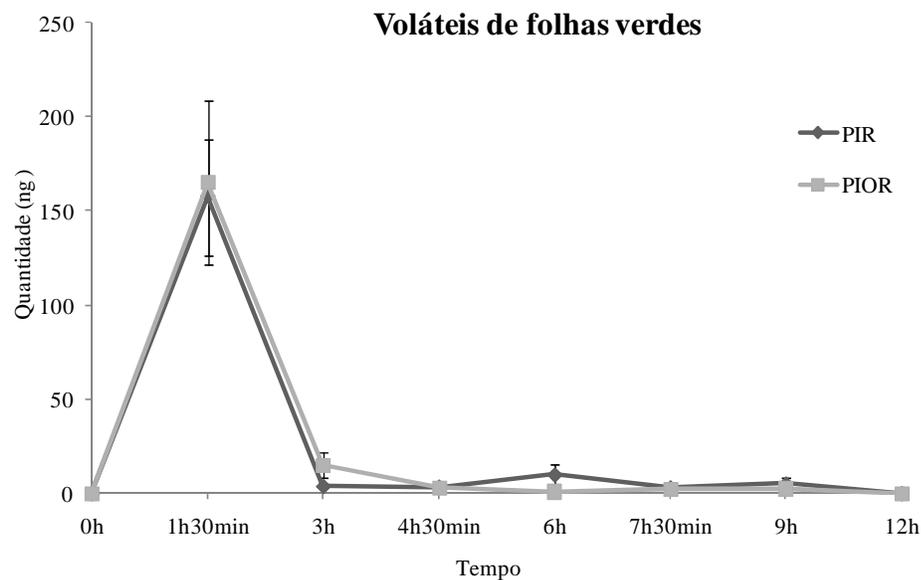


Figura 5.6 – Padrão de emissão de voláteis de folhas verdes (VFVs) em milho após a indução com o regurgito em plantas induzidas pela oviposição (PIO) e plantas controle, que não foram induzidas pelas posturas de *S. frugiperda* (PIR), ao longo do tempo

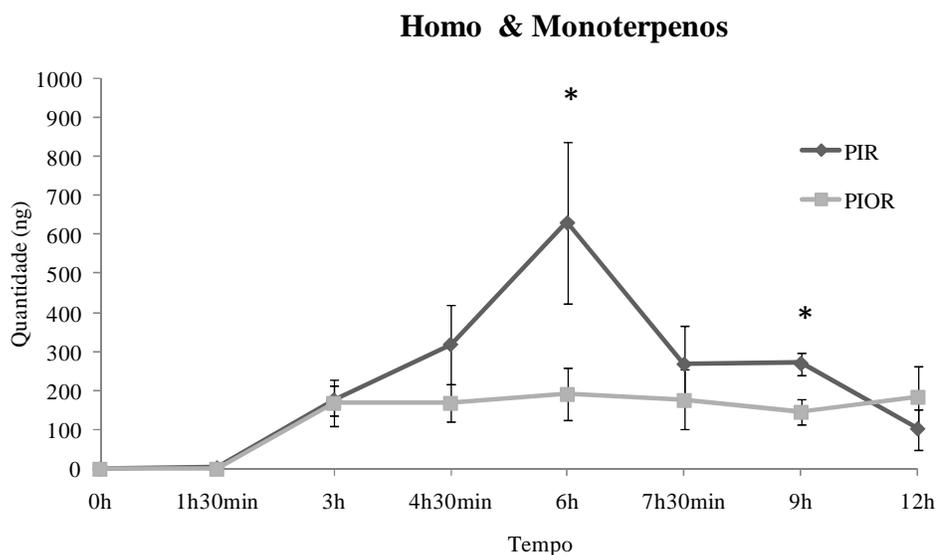


Figura 5.7 – Padrão de emissão de compostos voláteis mono e homoterpenos em milho após a indução com o regurgito em plantas induzidas pela oviposição (PIO) e plantas controle, que não foram induzidas pelas posturas de *S. frugiperda* (PIR), ao longo do tempo.*significativo a 5% pelo teste t (6h $t=2,592$ $P=0,029$; 9h $t=2,269$ $P=0,049$)

No padrão de emissão dos compostos aromáticos, a PIOR também apresentou ausência do pico às 6h que ocorreu na PIR (Figura 5.8), porém, devido à alta variabilidade da emissão, que foi de $255,5 \pm 119,5$ ng, não houve diferença significativa (teste t; $t=1,868$ $P=0,100$). Nos demais intervalos, não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Já o padrão de emissão dos sesquiterpenos, que foram os compostos liberados em maiores quantidades em relação às demais classes químicas, a PIOR os emitiu menores quantidades que a PIR até as 9h (Figura 5.9). Porém, essas taxas foram menores somente nos intervalos das 6 e 9h (6h $t=2,610$ $P=0,035$; 9h $t=2,507$ $P=0,041$).

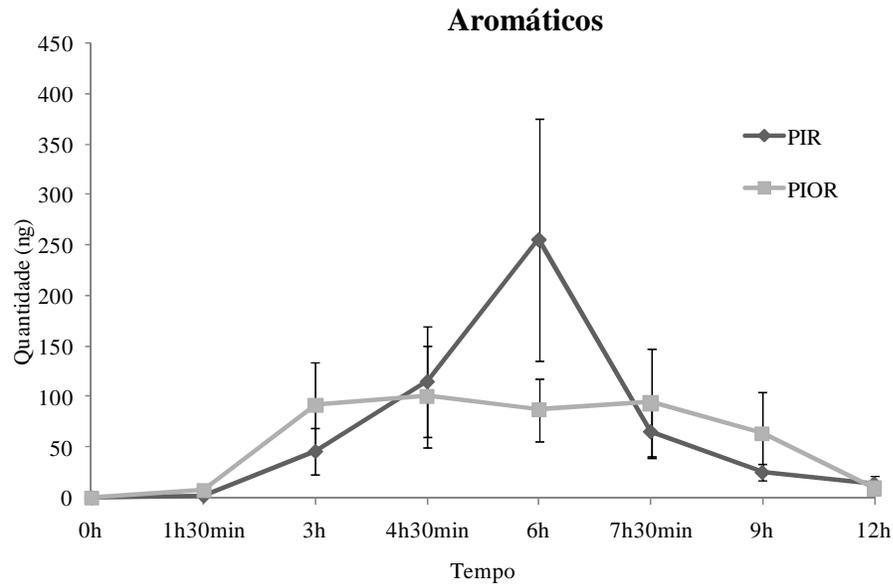


Figura 5.8 – Padrão de emissão de compostos voláteis aromáticos após a indução com o regurgito em plantas induzidas pela oviposição (PIO) e plantas controle, que não foram induzidas pelas posturas de *S. frugiperda* (PIR), ao longo do tempo

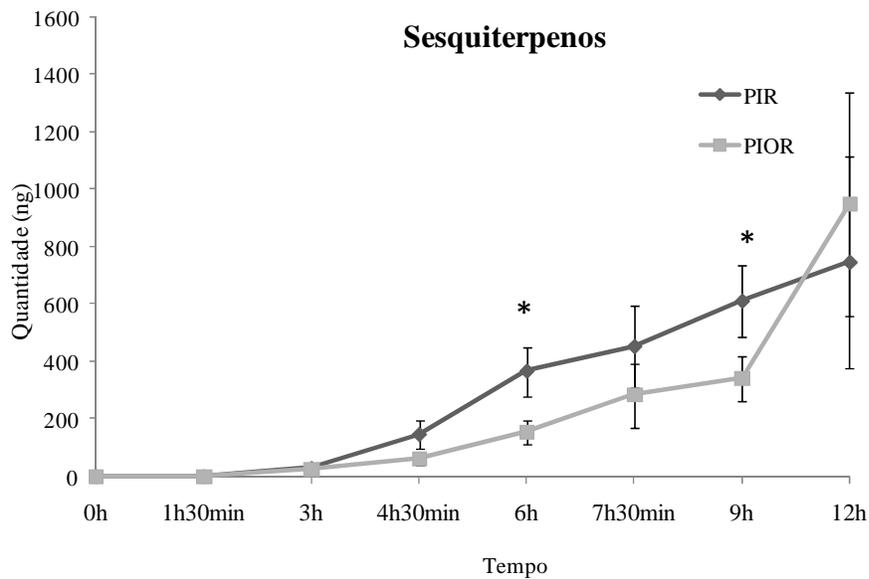


Figura 5.9 – Padrão de emissão de compostos voláteis sesquiterpenos após a indução com o regurgito em plantas induzidas pela oviposição (PIO) e plantas controle, que não foram induzidas pelas posturas de *S. frugiperda* (PIR). * significativo a 5% pelo teste t (6h $t=2,610$ $P=0,035$; 9h $t=2,507$ $P=0,041$)

5.4 Discussão

As plantas e os insetos herbívoros exercem constante e intensa pressão seletiva entre eles (BECKLIN, 2008). Na tentativa de maximizar o *fitness*, as plantas desenvolveram mecanismos complexos e diversificados de defesas contra o ataque dos herbívoros que, por sua vez, também evoluíram em adaptações comportamentais e/ou fisiológicas contra as respostas defensivas das plantas (DESPRÉS; DAVID; GALLET, 2007). Assim, a evolução desta interação inseto-planta é dinâmica (GATEHOUSE, 2002) e pode ser denominada como coevolução de acordo com Ehrlich e Raven (1964).

Nesse sentido, o presente trabalho buscou investigar se as defesas das plantas de milho contra a herbivoria é alterada de algum modo pela oviposição dos herbívoros, ou seja, se a planta otimiza suas defesas em função da oviposição do inseto, ou se ocorre uma manipulação do inseto sobre as defesas da planta. A nossa hipótese inicial era de que a planta detectasse a deposição de ovos sob a superfície foliar e assim, ativasse as suas defesas contra a herbivoria anteriormente ao ataque, como em um estado de “priming”, que tem sido freqüentemente reportado (CONRATH et al., 2006). Assim, a planta induzida pela oviposição responderia induzindo suas defesas de modo mais rápido e intenso após o ataque do herbívoro.

Entretanto, os resultados do presente trabalho não confirmaram essa hipótese. As defesas diretas das plantas induzidas pela herbivoria e/ou pela oviposição não afetaram o peso das lagartas de *S. frugiperda* nem os parâmetros biológicos, como a mortalidade, o tempo de larva a pupa ou o peso pupal. Era esperado um efeito deletério às lagartas pelo menos das plantas induzidas pela herbivoria em relação ao controle, pois o tratamento com o regurgito de *S. frugiperda* previamente ao experimento poderia afetar o peso das lagartas devido à indução de defesas diretas. Por essa razão, as lagartas foram pesadas em dois tempos iniciais, 6 e 18h após o início do experimento, porém, não houve qualquer diferença no peso das lagartas alimentadas nos diferentes tratamentos.

Sabe-se que o milho produz compostos tóxicos induzidos pela herbivoria, como flavonas e ácidos hidroxâmicos, principalmente DIMBOA (2,4-diidroxí-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona) (LEE et al., 1998; NIEMEYER, 1988). Portanto, provavelmente, as defesas diretas da plantas de milho são produzidas após a indução com o regurgito das lagartas de *S. frugiperda*, entretanto,

esse herbívoro deve apresentar mecanismos de resistência a essas defesas, não sendo afetado (CHEN, 2008; KARBAN; AGRAWAL, 2002).

As defesas diretas induzidas pela oviposição são conhecidas (HILKER; ROHFRITSCH; MEINERS, 2002), no entanto, há apenas um relato desse tipo de defesa que afeta negativamente o desenvolvimento das larvas e pupas do herbívoro (BEYAERT; STILLER; HILKER, 2009).

Já em relação às defesas indiretas, a oviposição provocou efeitos sobre a produção de voláteis da classe química dos terpenos: os monoterpenos, homoterpenos e sesquiterpenos, que foram emitidos em menores quantidades às 6 e 9h após a indução com o regurgito, em relação às plantas do grupo controle, que não foram ovipositadas. A emissão de compostos aromáticos e de VFVs, por sua vez, não diferiu entre o controle e a planta ovipositada, apesar de ter sido observada uma ausência de pico no padrão de emissão dos aromáticos na planta induzida pela oviposição.

Alguns trabalhos mostram que a oviposição do herbívoro pode induzir a emissão de voláteis, principalmente de terpenos (MUMM et al., 2004; KÖPKE et al., 2008). Embora a abundância e a diversidade de voláteis emitidos sejam mais baixas do que os induzidos pela herbivoria, os parasitóides de ovos são capazes de reconhecê-los e utilizá-los na localização do hospedeiro (HILKER; MEINERS, 2002).

No entanto, outros trabalhos indicam que a oviposição em si não induz na planta a emissão de voláteis atraentes aos parasitóides de ovos, mas sim a combinação da oviposição e herbivoria. Colazza, McElfresh e Millar (2004) constataram que a combinação da oviposição e a herbivoria de *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) induz em plantas de feijão uma maior quantidade do sesquiterpeno (*E*)- β -cariofileno na mistura quando comparadas com as plantas danificadas somente pela herbivoria, que atua como responsável pela atração do parasitóide de ovos *Trissolcus basal* (Wollaston) (Hymenoptera: Scelionidae).

Já o estudo conduzido por Moraes et al. (2008) verificou que plantas induzidas pela herbivoria e oviposição do percevejo *Euchistus heros* (Fabr.) (Heteroptera: Pentatomidae) interfere negativamente na atração do parasitóide *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Scelionidae), que responde aos voláteis induzidos apenas pela alimentação do hospedeiro.

Aparentemente, a planta de milho não produz voláteis *de novo* induzidos pela oviposição de *S. frugiperda* (PEÑAFLORES et al.², dados não publicados). Porém, verificou-se que ocorre uma supressão da emissão dos terpenos induzidos pela herbivoria ocasionada pela oviposição de *S. frugiperda* na planta de milho. Esse efeito pode acarretar em consequências sobre o 3º nível trófico, que pode passar a não reconhecer a mistura devido a mudanças nas proporções dos compostos. Dessa maneira, a supressão dos terpenos, que constituem grande parte da mistura de voláteis induzidos e são compostos importantes no forrageamento dos inimigos naturais (MUMM; POSTHUMUS; DICKE, 2008), pode constituir uma estratégia de manipulação das defesas das plantas pelo inseto herbívoro (KARBAN; AGRAWAL, 2002; TOOKER; DE MORAES, 2007a).

Embora, até o momento, as substâncias elicitoras das defesas induzidas pela oviposição foram encontradas na secreção que envolve os ovos (HILKER; MEINERS, 2006), ou em proteínas presentes do cório do ovo (LITTLE et al., 2007), sabe-se que os ovos dos insetos podem conter moléculas ativadoras das defesas da planta, como os fitormônios ácido jasmônico (AJ) e ácido salicílico (AS) (TOOKER; DE MORAES, 2005, 2007b), responsáveis, respectivamente, pela resistência a insetos e a patógenos. (GAFFNEY et al., 1993; THALER et al., 2002). A interação (*cross-talk*) entre as vias metabólicas do AJ e AS pode apresentar efeitos negativos, isto é, indução da via metabólica do AS pode tornar a planta mais suscetível aos herbívoros em decorrência da supressão da resistência mediada pelo AJ, e vice-versa (FELTON; KORTH, 2000; BOSTOCK et al., 2001). Dessa maneira, é possível que a oviposição de *S. frugiperda* tenha suprimido a emissão de voláteis terpenos, cuja síntese é derivada da via metabólica do AJ, devido à presença de AS nos ovos, que interage negativamente com a rota do AJ.

Essa hipótese corrobora com o trabalho de Bruessow et al. (2010) que mostrou que a oviposição de *Pieris brassicae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae) e *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) suprimiu as defesas diretas contra herbivoria em *Arabidopsis thaliana* devido ao aumento dos níveis de ácido salicílico (AS) no local em contato com as posturas. Porém, os autores não atribuem ao AS presente nos ovos, mas a indução da transcrição de genes ligados à resistência a patógenos, como a resposta hipersensitiva (LITTLE et al., 2007). Em

² PEÑAFLORES, M.F.G.V.; ERB, M.; WERNEBURG, A.G.; TURLINGS, T.C.J.; BENTO, J.M.S. **A planta de milho emite voláteis induzidos pela oviposição de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)?**

conclusão, esse estudo mostrou que composto(s) dos ovos do herbívoro promovem a supressão das defesas na planta para o seu próprio benefício, consistindo em uma estratégia de manipulação do herbívoro.

Uma outra possibilidade que explicaria a supressão de terpenos é a diminuição da atividade fotossintética em decorrência da ação física dos ovos (SCHRÖDER; FORSTREUTER; HILKER, 2005). Outro efeito que a oviposição na planta pode ocasionar é a redução na liberação de etileno (SCHRÖDER et al., 2007), um importante fitohormônio que, juntamente com o AJ e o AS, coordena a indução de defesas (VON DAHL; BALDWIN, 2007). Conseqüentemente, a sua redução em função da oviposição pode acarretar em alterações nas defesas diretas ou indiretas.

O efeito “priming”, embora não tenha sido constatado em resposta à oviposição de *S. frugiperda*, foi observado em plantas de milho previamente exposta aos voláteis liberados pelas plantas sob ataque de lagartas de *S. littoralis* (TON et al., 2006). O peso das lagartas alimentadas nas plantas expostas aos voláteis foi menor, assim como a emissão de voláteis foi mais rápida e intensa após o dano, principalmente em relação aos sesquiterpenos. Apesar do fenômeno “priming” ser bem conhecido, o mecanismo pelo qual a planta reconhece os voláteis induzidos emitidos pelas plantas vizinhas e pré-ativa suas defesas ainda não foi elucidado (BALDWIN, 2010).

Em conclusão, o presente estudo verificou que a oviposição não produz alterações nas defesas diretas induzidas pela herbivoria na planta de milho que afetem a lagarta-do-cartucho, porém, as defesas induzidas pela herbivoria em si, não foram efetivas para *S. frugiperda*, que deve apresentar mecanismos de resistência ou de manipulação dessas defesas. Por outro lado, as plantas que receberam ovos de *S. frugiperda* liberaram terpenos em quantidades reduzidas o que pode acarretar em conseqüências sobre o 3º nível trófico. Bioensaios de atratividade com os inimigos naturais da lagarta-do-cartucho aos odores das plantas induzidas pela oviposição e herbivoria podem mostrar se essas modificações nas proporções de terpenos têm relevância ecológica e constituem uma estratégia de manipulação do herbívoro sobre as defesas da planta.

Referências

BALBYSHEV, N.F.; LORENZEN, J.H. Hypersensitivity and egg drop, a novel mechanism of host-plant resistance to Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 90, p. 652-657, 1997.

BALDWIN, I. Plant Volatiles. **Current Biology**, Heidelberg, v. 20, p. 392-397, 2010.

BECKLIN, K.M. A coevolutionary arms race: understating plant-herbivore interactions. **The American Biology Teacher**, Reston, v. 70, p. 288-292, 2008.

BEYAERT, I.; STILLER, J.; HILKER, M. Egg deposition on a plant contributes to plant defense against feeding herbivores. In: ANNUAL MEETING OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF CHEMICAL ECOLOGY, 25, 2009, Neuchâtel, Suíça. **Abstract Book...** Neuchâtel: ISCE, 2009, p. 228.

BLACKMEER, A.; HAGENBEEK, D.; VAN BEEK, T.A.; DE GROOT, A.E.; SCHOONHOVEN, L.M.; VAN LOON, J.J.A. Plant response to eggs vs. host marking pheromone as factors inhibiting oviposition by *Pieris brassicae*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 20, p. 1657-1665, 1994.

BOSTOCK, R.M.; KARBAN, R.; THALER, J.S.; WEYMAN, P.D.; GILCHRIST, D. Signal interactions in induced resistance to pathogens and insect herbivores. **European Journal of Plant Pathology**, Haale, v. 107, p. 103-111, 2001.

BRUESSOW, F. ; DARIMONT-GOUHIER, C. ; BUCHALA, AM. ; METRAUX, J.P. ; REYMOND, P. Insect eggs suppress plant defense against chewing herbivores. **Plant Journal**, Malden, v. 62, p. 876-885, 2010.

CHEN, M.S. Inducible direct plant defense against insect herbivores : a review. **Insect Science**, Chongqing, v. 15, p. 101-114, 2008.

COLAZZA, S.; McELFRESH, J.S. ; MILLAR, J.G. Identification of volatiles synomoes, induced by *Nezara viridula* feeding and oviposition on bean spp./ that attract the egg parasitoid *trissolcus basalis*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 30, p. 945-964, 2004.

CONRATH, U. ; BECKERS, G.J.M. ; FLORS, V. ; GARCÍA-AGUSTÍN, P. ; JAKAB, G. ; MAUCH, F. ; NEWMAN, M.A. ; PIETERSE, C.M.J. ; POINSSOT, B./ POZO, M.J. ; PUGIN, A. ; SCHAFFRATH, U. ; TON, J. ; WENDEHENNE, D. ; ZIMMERLI, L. ; MANI-MAUCH, B. Priming : getting ready for battle. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Ithaca, v. 19, p. 1062-1071, 2006.

DE MORAES, C.M.; LEWIS, W.J.; PARE, P.W.; ALBORN, H.T.; TUMLINSON, J.H. Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. **Nature**, London, v. 393, p. 570-573, 1998.

DESPRÉS, L.; DAVID, J.P.; GALLET, C. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 22, p.298-307, 2007.

DICKE, M.; VAN BEEK, T.A.; POSTHUMUS, M.A.; BEN DOM, N.; VAN BOKHOVEN, H.; DE GROOT, A.E. Isolation and identification of volatile kairomone that affects acarine predator-prey interactions. Involvement of host plant in its production. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.16, p. 381-396, 1990.

DOSS, R.P.; OLIVER, J.E.; PROEBSTING, W.M.; POTTER, S.W. KUY, S.R.; CLEMENT, S.L.; WILLIAMSON, R.T.; CARNEY, J.R.; DEVILBISS, E.D. Bruchins-insect-derived plant regulators that stimulate neoplasm formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 97, p. 6218-6223, 2000.

EHRlich, P.R.; RAVEN, P.H. Butterflies and plants: a study in coevolution. **Evolution**, Malden, v. 18, p.586-608, 1964.

ENGELBERTH, J.; ALBORN, H.T.; SCHMELZ, E.A.; TUMLINSON, J.H. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 101, p. 1781-1787, 2004.

ESCALDANTE, J.A.G. Contribución al conocimiento de la biología de *Heliothis zea* y *Spodoptera frugiperda*, em el Cusco. **Revista Peruana de Entomología**, Lima, v. 17, p. 121-122, 1974.

FATOUROS, N.E.; BUKOVINSZKINE'KISS, G.; KALKERS, L.A.; GAMBORENA, R.S. DICKE, M.; HILKER, M. Oviposition-induced plant cues: do they arrest *Trichogramma* wasps during host location? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Edinburgh, v. 115, p. 207-215, 2005.

FATOUROS, N.E.; BUKOVINSZKINE'KISS, G.; DICKE, M.; HILKER, M. The response specificity of *Trichogramma* egg parasitoids towards infochemicals during host location. **Journal of Insect Behavior**, Byron, v. 20, p. 53-65, 2007.

FATOUROS, N.E.; BROEKGAARDEN; BUKOVINSZKINE'KISS, G.; van LOON, J.J.A.; MUMM, R.; HUIGENS, M.E.; DICKE, M.; HILKER, M. Male-derived butterfly anti-aphrodisiac mediates induced indirect plant defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 105, p. 10033-10038, 2008.

FELTON, G.W.; KORTH, K.L. Trade-offs between pathogen and herbivore resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, p. 309-314, 2000.

FROST, C.J.; MESCHER, M.C.; DERVINIS, C.; DAVIS J.M.; CARLSON J.E; DE MORAES, C.M. Priming defense genes and metabolites in hybrid poplar by the green leaf volatile cis-3-hexenyl acetate. **New Phytologist**, Malden, v. 180, p. 722-733, 2008.

GAFFNEY, T.; FRIEDRICH, L.; VERNOOIJ, B.; NEGROTTO, D.; NYE, G.; UKNESS, S.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. **Science**, Washington, v. 261, p. 754-756, 1993.

GATEHOUSE, J.A. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. **New Phytologist**, Malden, v. 156, p. 145-169, 2002.

GREENE, G.L.; LEPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar. A rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 69, p. 447-448, 1976.

KARBAN, R.; AGRAWAL, A.A. Herbivore offense. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 33, p. 641-664, 2002.

KARBAN, R.; BALDWIN, I. T. **Induced responses to herbivory**. Chicago: The University of Chicago Press, 1997. 319 p.

KESSLER, A.; HALITSCHKE, R.; DIEZEL, C. ;BALDWIN, I.T. Priming of plant defense responses in nature by airborne signaling between *Artemisia tridentata* and *Nicotiana attenuata*. **Oecologia**, Heidelberg, v. 148, p. 280-292, 2006.

KÖPKE, D.; SCHRÖDER, R.; FISCHER, H.M.; GERSHENZON, J.; HILKER, M.; SCHMIDT, A. Does egg deposition by herbivorous pine sawflies affect transcription of sesquiterpene synthases in pine? **Planta**, New York, v. 228, p. 427-438, 2008.

HILKER, M.; MEINERS, T. **Chemoecology of insect eggs and egg deposition**. Berlin: Blackwell Publishing, 2002. 390p.

_____. Early herbivore alert: Insect eggs induce plant defense. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 26, p. 1379-1397, 2006.

_____. How do plants “notice” attack by herbivorous arthropods? **Biological Reviews**, Malden, v. 85, p. 267-280, 2009.

HILKER, M.; ROHFRITSCH, O.; MEINERS, T. The plant's response towards insect egg deposition. In: HILKER, M.; MEINERS, T. (Ed.). **Chemoecology of insect eggs and egg deposition**. Berlin: Blackwell Publishing, 2002. p. 205-233.

HILKER, M.; KOBBS, C.; VARAMA, M.; SCHRANK, K. Insect egg deposition induces *Pinus* to attract egg parasitoids. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 205, p. 455-461, 2002.

HUANG, C.H.; YAN, F.M.; BYERS, J.A.; WANG, R.J.; XU, C.R. Volatiles induced by the larvae of the Asian corn borer (*Ostrinia furnacalis*) in maize plants affect behavior of conspecific larvae and female adults. **Insect Science**, Chongqing, v. 16, p. 311-320, 2009.

LEE, E.A.; BYRNE, P.F.; MCMULLEN, M.D.; SNOOK, M.E.; WISEMAN, B.R.; WIDSTROM, N.W.; COE, E.H. Genetic mechanisms underlying apimaysin and maysin synthesis and corn earworm antibiosis in maize (*Zea mays* L.). **Genetics**, Stanford, v. 149, p. 1997-2006, 1998.

LITTLE, D.; GOUHIER-DARIMONT, C.; BRUESSOW, F.; REYMOND, P. Oviposition by pierid butterflies triggers defense responses in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 143, p. 784-800, 2007.

MEINERS, T.; HILKER, M. Host location in *Oomyzus gallerucae* (Hymenoptera: Eulophidae), an egg parasitoid of the elm leaf beetle *Xanthogaleruca luteola* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Oecologia**, Heidelberg, v. 112, p. 87-93, 1997.

MEINERS, T.; HILKER, M. Induction of plant synomones by oviposition of a phytophagous insect. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 26, p. 221-232, 2000.

MORAES, M.C.B.; PAREJA, M.; LAUMANN, R.A.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; BORGES, M. Response of the parasitoid *Telenomus podisi* to induced volatiles from soybean damaged by stink bug herbivory and oviposition. **Journal of Plant Interactions**, Turin, v. 3, p. 111-118, 2008.

MUMM, R.; POSTHUMUS, M.A.; DICKE, M. Significance of terpenoids in induced indirect plant defence against herbivorous arthropods. **Plant, Cell and Environment**, Malden, v. 31, p. 575-585, 2008.

MUMM, R.; SCHRANK, K.; WEGENER, R.; SCHULZ, S.; HILKER, M. Chemical analysis of volatiles emitted by *Pinus sylvestris* after induction by insect oviposition. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 29, p. 1235-1252, 2003.

MUMM, R.; TIEMANN, T.; SCHULZ, S.; HILKER, M. Analysis of volatiles from black pine (*Pinus nigra*): significance of wounding and egg deposition by a herbivorous sawfly. **Phytochemistry**, Oxford, v. 65, p. 3221-3230, 2004.

NIEMEYER, H.M. Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defence chemicals in Gramineae. **Phytochemistry**, Oxford, v. 27, p. 3349-3358 1988.

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

REYMOND, P.; WEBER, H.; DAMOND, M.; FARMER, E.E. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 707-719, 2000.

ROSTÁS, M.; HILKER, M. Feeding damage by larvae of the mustard leaf beetle deters conspecific females from oviposition and feeding. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Edinburgh, v. 103, p. 267-277, 2002.

SCHRÖDER, R.; FORSTREUTER, M.; HILKER, M. A plant notices insect eggs deposition and changes its rate of photosynthesis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 138, p. 470-477, 2005.

SCHRÖDER, R.; CRISTESCU, S.M.; HARREN, F.J.M.; HILKER, M. Reduction of ethylene emission from Scots pine elicited by insect egg secretion. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 1835-1842, 2007.

SEINO, Y.; SUZUKI, Y.; SOGAWA, K. An ovicidal substance produced by rice plants in response to oviposition by the whitebacked planthopper, *Sogatella frucifera* (Horvath) (Homoptera: Delphacidae). **Applied Entomology and Zoology**, Mie, v. 31, p. 467-473, 1996.

THALER, J.S.; FARAG, M.A.; PARÉ, P.W.; DICKE, M. Jasmonate-deficient plants have reduced direct and indirect defenses against herbivores. **Ecology Letters**, London, v. 5, p. 764-774, 2002.

TOOKER, J.F.; DE MORAES, C.M. Jasmonate in Lepidoptera eggs and neonates. **Journal of Chemical Ecology**. New York, v. 31, p. 2753-2759, 2005.

_____. Feeding by hessian fly [*Mayetiola destructor* (Say)] larvae does not induce indirect defences. **Ecological Entomology**, Malden, v. 32, p. 153-161, 2007a.

_____. Jasmonate, salicylate, and benzoate in insect eggs. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 33, p. 331-343, 2007b.

TURLINGS, T.C.J.; WÄCKERS, F. Recruitment of predators and parasitoids by herbivore-injured plants. In: CARDÉ, R.T.; MILLAR, J.G. (Ed.) **Advances in insect chemical ecology**. Cambridge: Cambridge University Press, 2004. p. 21-74.

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

TON, J.; D'ALESSANDRO, M.; JOURDIE, V.; JAKAB, G.; KARLEN, D.; HELD, M.; MAUCH-MANI, B.; TURLINGS, T.C.J. Priming by airborne signals boosts direct and indirect resistance in maize. **Plant Journal**, Malden, v. 49, p. 16-26, 2006.

VON DAHL, C.C.; BALDWIN, I.T. Deciphering the role of ethylene in plant-herbivore interactions. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 26, p. 201-209, 2007.

WEGENER, R.S.; SCHULTZ, S.; MEINERS, T.; HADWICH, K.; HILKER, M. Analysis of volatiles induced by oviposition of the elm leaf beetle *Xanthogaleruca luteola* on *Ulmus minor*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 27, p. 499-515, 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)