



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**Interações Químicas no Sistema Soja – Percevejo *Euschistus heros*  
(Hemiptera: Pentatomidae) – Parasitóide de Ovos *Telenomus podisi*  
(Hymenoptera: Scelionidae)**

MIRIAN FERNANDES FURTADO MICHEREFF

Brasília – DF  
Março de 2011

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**Interações Químicas no Sistema Soja – Percevejo *Euschistus heros*  
(Hemiptera: Pentatomidae) – Parasitóide de Ovos *Telenomus podisi*  
(Hymenoptera: Scelionidae)**

MIRIAN FERNANDES FURTADO MICHEREFF

Orientadora: Dra. Ivone Rezende Diniz

Co-orientadora: Dra. Maria Carolina Blassioli Moraes

Tese apresentada à Universidade de Brasília,  
como parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Animal, para a  
obtenção do título de Doutor em Biologia Animal.

Brasília – DF

Março de 2011

Tese de Doutorado

**Mirian Fernandes Furtado Michereff**

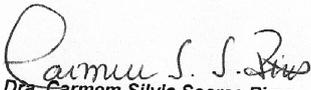
Título:

**“Interações químicas no sistema soja - percevejo *Euschistus Heros* - Parasitóide de ovos *Telenomus Podisi*”**

Comissão Examinadora:

  
**Prof. Dra. Ivone Rezende Diniz**  
Presidente/Orientadora  
UnB

  
**Dr. Martin Francisco Pareja**  
Membro Titular Externo não Vinculado ao  
Programa  
UFLavras

  
**Dra. Carmem Silvia Soares Pires**  
Membro Titular Externo não Vinculado ao  
Programa  
Embrapa

  
**Dra. Cristina Schetino Bastos**  
Membro Titular Interno não Vinculado ao  
Programa  
UnB/ FAV

  
**Dra. Rosana Tidon**  
Membro Titular Interno Vinculado ao Programa  
UnB/ IBD

**Prof. Dr. Reginaldo Constantino**  
Membro Suplente  
Interno Vinculado ao Programa  
UnB/ IBD

Brasília, 29 de março de 2011.

“Hoje desaprendo o que tinha  
aprendido até ontem e que  
amanhã recomencerei a aprender”.

Cecília Meireles

*Aos meus amados pais,  
Aos meus amados esposo e filho,  
Aos meus amados irmãos.*

## **Agradecimentos**

À Universidade de Brasília, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, pela oportunidade de realização do doutorado;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo. À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAP-DF) pelo apoio financeiro para a execução do projeto;

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo suporte técnico e financeiro para o desenvolvimento do trabalho;

À professora Ivone Rezende Diniz, por ter aceitado me orientar, pela confiança, pela dedicação e presteza na orientação e pelas conversas que muito me tranquilizavam;

À pesquisadora e co-orientadora nesse projeto Maria Carolina Blassioli Moraes, pela solicitude em me atender, pelo incentivo constante, pelo exemplo de entusiasmo no trabalho e pela amizade;

Ao pesquisador Miguel Borges, pela oportunidade de trabalhar com o grupo do Laboratório de Semioquímicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelos aconselhamentos e pela atenção sempre oferecida;

Ao pesquisador Raúl Alberto Laumann, pelos aconselhamentos, pela ajuda no campo e pela solicitude em me atender;

Ao pesquisador Austeclínio Lopes de Farias Neto, pelo envio das sementes de soja utilizadas durante a execução do trabalho;

Aos professores Cristina Schetino (UnB), Martín Pareja (UFLA), Rosana Tidon e Reginaldo Constantino (UnB), e à pesquisadora Carmen Pires (Embrapa – Cenargen) pelo aceite em participar da banca e pelas contribuições dadas ao trabalho;

Aos funcionários do laboratório pelos auxílios, na criação dos insetos (Diva Tiburcio); no manuseio do equipamento de cromatografia (Márcio Oliveira) e na criação dos insetos, no campo e na confecção das gaiolas (Hélio Moreira);

Ao pesquisador Guy de Capdeville e à analista Ana Cristina Gomes (Embrapa – Cenargen), pela oportunidade da realização dos experimentos de microscopia eletrônica de varredura. Ao pesquisador Marcelo Bemquerer (Embrapa – Cenargen), pelas sugestões dadas ao artigo referente a um dos capítulos da tese;

À pesquisadora Clara Beatriz Hoffmann-Campo (Embrapa Soja), pelo auxílio nas análises dos isoflavonóides;

À grande amiga Letícia de Almeida Gonçalves (UFG), pela ajuda na interpretação das fotos de microscopia eletrônica de varredura e pela torcida;

Aos meus pais, Fausto Eustáquio Furtado e Ana Fernandes Furtado, por terem me ensinado a ser gente, pelo amor, pelo zelo, pelo apoio incondicional, pelo incentivo, pela preocupação e pela torcida constante,

Ao meu esposo Miguel Michereff Filho, pelo companheirismo, pela compreensão sem fim, pelas noites em claro, pelos ensinamentos, pelo incentivo e pelo amor. Ao meu filho, meu pequeno, Ivo Furtado Michereff, por sempre preencher minha vida com alegria, por ser tão bonzinho e muitas vezes aceitar a minha ausência;

Aos meus irmãos, Marcelo e Carolina Fernandes Furtado, pelo carinho e por fazerem dos nossos encontros, momentos felizes e agradáveis, cheios de boas recordações e de saudades;

Às amigas, Ana Paula Lopes, Luciane Xavier, Magali Rodrigues, Michely Aquino e Paulina Ribeiro, por todas as conversas científicas, pelo carinho e pela presença marcante, repleta de boas lembranças;

Aos meninos e meninas do laboratório, Aline Dias, Jonatas Ferreira e Samantha Silveira, pela ajuda no experimento de campo; Diego Magalhães, pela disponibilidade constante de sempre ajudar; e junto com Cecília Vieira, Karen Lima e Maria da Penha, por tornarem o ambiente de trabalho agradável.

Às velhas amigas de caminhada, por sempre estarem por perto.

E principalmente a Deus, por me lembrar todos os dias do Seu amor, e que em Sua infinita bondade, me permitiu cumprir esta grande e importante etapa da minha trajetória acadêmica.

## Sumário

Resumo.....	xviii
Abstract.....	xx
Introdução .....	1
 <b>Capítulo I - Preferência de Oviposição e Biologia de <i>Euschistus heros</i> em Cultivares de Soja Resistente e Suscetível</b>	
Introdução.....	6
Material e Métodos.....	9
Resultados.....	17
Discussão.....	29
 <b>Capítulo II - Voláteis Mediadores da Interação Planta-Herbívoro-Inimigo Natural em Cultivares de Soja Resistente e Suscetível</b>	
Introdução.....	35
Material e Métodos.....	37
Resultados.....	47
Discussão.....	61
 <b>Capítulo III - Efeito dos Compostos (<i>E,E</i>)-<math>\alpha</math>-farneseno, salicilato de metila e (<i>Z</i>)-3-acetato de hexenila no Comportamento do <i>Telenomus podisi</i>, Parasitóide de Ovos do <i>Euschistus heros</i></b>	
Introdução.....	66
Material e Métodos.....	68
Resultados.....	70
Discussão.....	75

**Capítulo IV – Interações Tróficas entre Cultivares de Soja Resistente e Suscetível, Parasitóides de Ovos da Família Scelionidae e o Percevejo *Euschistus heros***

Introdução.....	78
Material e Métodos.....	81
Resultados.....	87
Discussão.....	95
Considerações Finais.....	99
Referências Bibliográficas.....	102

Lista de Tabelas

Capítulo I

<b>Tabela 1.</b> Valores médios ( $\pm$ EPM) da duração do período ninfal, do segundo ao quinto ínstar e do desenvolvimento de ovo a adulto, de <i>Euschistus heros</i> alimentado com vagens das cultivares de soja Dowling, IAC100 e Silvânia ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , UR $65 \pm 10\%$ e fotofase de 14 hr), no Laboratório de Semioquímicos – Embrapa Recursos Genéticos e biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF.....	18
<b>Tabela 2.</b> Valores médios ( $\pm$ EPM) da longevidade (dias) e do peso (mg) de fêmeas e de machos de <i>Euschistus heros</i> , provenientes das ninfas alimentadas com vagens das cultivares de soja IAC100 e Silvânia ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , UR $65 \pm 10\%$ e fotofase de 14 hr).....	19
<b>Tabela 3.</b> Características biológicas (média $\pm$ EPM) de <i>Euschistus heros</i> provenientes das ninfas alimentadas com vagens das cultivares de soja, IAC100 e Silvânia ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , UR: $65 \pm 10\%$ e fotofase de 14 hr).....	20
<b>Tabela 4.</b> Mortalidade dos diferentes ínstar de <i>Euschistus heros</i> alimentados com vagens das cultivares de soja, Dowling, IAC100 e Silvânia ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , UR: $65 \pm 10\%$ e fotofase de 14 hr).....	21
<b>Tabela 5.</b> Sobrevivência (média e mediana), em dias, de <i>Euschistus heros</i> ao longo de 32 dias de vida nas cultivares de soja Dowling, IAC100 e Silvânia. Valores de <i>P</i> foram associados à comparação das curvas de sobrevivência pelo teste Log-Rank.....	22
<b>Tabela 6.</b> Análise de variância em esquema fatorial, da concentração ( $\mu\text{g/ml}$ ) de isoflavonóides, ao longo do tempo, nas cultivares Dowling e Silvânia, sadia e com dano de herbivoria causado por <i>Euschistus heros</i> .....	25

## Capítulo II

<b>Tabela 1.</b> Média $\pm$ EPM (em ng no intervalo entre 72 e 96 hr depois do início dos tratamentos) dos compostos voláteis coletados de plantas não danificadas (Cont) ou submetidas à Herbivoria (Herb), Oviposição (Ovi) e Herbivoia+Oviposição (HerbOvi) para as cultivares de soja Dowling, IAC100 e Silvânia. Experimento realizado no Laboratório de Semioquímicos – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF.....	56
---	----

## Capítulo IV

<b>Tabela 1.</b> Ocorrência de parasitóides em cartelas com ovos sentinela de <i>Euschistus heros</i> em três cultivares de soja, em 12 avaliações semanais, no campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF, no período de setembro a dezembro de 2010.....	90
---	----

<b>Tabela 2.</b> Captura de parasitóides Scelionidae em armadilhas adesivas amarelas instaladas nas parcelas de diferentes cultivares de soja, em sete avaliações semanais, no campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF, no período de setembro a dezembro de 2010.....	94
--	----

## Lista de Figuras

### Capítulo I

<b>Figura 1A)</b> Percevejo marrom <i>Euschistus heros</i> (Pentatomidae), considerado praga da soja e modelo utilizado nos experimentos e B) Sistema de criação do <i>Euschistus heros</i> mantido no laboratório de Semioquímicos – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF.....	10
<b>Figura 2.</b> Placas com ninfas utilizadas nos experimentos da biologia do <i>E. heros</i> em cultivares de soja.....	11
<b>Figura 3A)</b> Parasitóide de ovos, <i>Telenomus podisi</i> Ashmead, 1881 (Hymenoptera: Scelionidae), utilizado nos experimentos e B) Sistema de criação do parasitóide de ovos <i>Telenomus podisi</i> mantido no laboratório de Semioquímicos – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF.....	12

<b>Figura 4.</b> Arenas, formadas por uma base de madeira (40 cm de diâmetro), utilizadas para os testes de preferência de oviposição de <i>Euschistus heros</i> entre diferentes cultivares de soja.....	13
<b>Figura 5.</b> Número de posturas e ovos (média ± EPM) de <i>Euschistus heros</i> em folhas das cultivares de soja Dowling, IAC100 e Silvânia, no teste sem chance de escolha, em gaiolas cobertas. Os dados foram transformados em $\log(x+1)$ para as análises. Barras da variável seguidas pela mesma letra não diferiram significativamente entre si, pelo teste Tukey ( $P>0.05$ ).....	17
<b>Figura 6.</b> Curvas de sobrevivência de <i>Euschistus heros</i> (ninfas+adultos) ao longo de 32 dias de alimentação com vagens das cultivares de soja Dowling, IAC100 e Silvânia.....	23
<b>Figura 7.</b> Isoflavonóides totais (média ± EPM) extraídos de vagens de soja não atacadas (controle) e atacadas pelo <i>Euschistus heros</i> (herbivoria) das cultivares Dowling e Silvânia. Os dados foram transformados em $\log(x+1)$ para as análises. Caixas seguidas pela mesma letra, dentro de cada cultivar e entre as cultivares, não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P>0.05$ ). CtDow: controle da cultivar Dowling, HbDow: cultivar Dowling submetida à herbivoria, CtSil: controle da cultivar Silvânia, HbSil: cultivar Silvânia submetida à herbivoria.....	24
<b>Figura 8.</b> Compostos isoflavonóides (média ± EPM) extraídos das vagens sadias (controle) e atacadas pelo <i>Euschistus heros</i> (herbivoria) das cultivares Dowling e Silvânia. Os dados foram transformados em $\log(x+1)$ para as análises. Asterisco indica diferença significativa na concentração de cada composto entre cultivares de soja, pelo teste F ( $P\leq 0.05$ ).....	25
<b>Figura 9.</b> Concentração dos principais compostos isoflavonóides ( $\mu\text{g/ml}$ ) (média ± EPM) extraídos de vagens de soja não atacadas (controle) e submetidas ao tratamento de herbivoria pelo <i>Euschistus heros</i> por 24 hr, no Laboratório de Semioquímicos – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF. CtDow: controle da cultivar Dowling, HbDow: cultivar Dowling submetida à herbivoria, CtSil: controle da cultivar Silvânia, HbSil: cultivar Silvânia submetida à herbivoria. Os dados foram transformados em $\log(x+1)$ para as análises. Caixas seguidas pela mesma letra, dentro de cada cultivar e entre as cultivares, não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey	

( $P > 0.05$ ).....	27
<b>Figura 10.</b> Concentração dos principais compostos isoflavonóides ( $\mu\text{g/ml}$ ) (média $\pm$ EPM) extraídos de vagens de soja não atacadas (controle) e submetidas ao tratamento de herbivoria pelo <i>Euschistus heros</i> por 48 hr, no Laboratório de Semioquímicos – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF. CtDow: controle da cultivar Dowling, HbDow: cultivar Dowling submetida à herbivoria, CtSil: controle da cultivar Silvânia, HbSil: cultivar Silvânia submetida à herbivoria. Os dados foram transformados em $\log(x+1)$ para as análises. Caixas seguidas pela mesma letra, dentro de cada cultivar e entre as cultivares não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0.05$ ).....	28
<b>Figura 11.</b> Concentração dos principais compostos isoflavonóides ( $\mu\text{g/ml}$ ) (média $\pm$ EPM) extraídos de vagens de soja não atacadas (controle) e submetidas ao tratamento de herbivoria pelo <i>Euschistus heros</i> por 72 hr, no Laboratório de Semioquímicos – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF. CtDow: controle da cultivar Dowling, HbDow: cultivar Dowling submetida à herbivoria, CtSil: controle da cultivar Silvânia, HbSil: cultivar Silvânia submetida à herbivoria. Os dados foram transformados em $\log(x+1)$ para as análises. Caixas seguidas pela mesma letra, dentro de cada cultivar e entre as cultivares não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0.05$ ).....	29

## Capítulo II

<b>Figura 1.</b> Sistema de bioensaio com o olfatômetro em forma de “Y” utilizado no Laboratório de Semioquímicos – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF.....	40
<b>Figura 2.</b> Sistema de bioensaio com o olfatômetro de quatro escolhas do Laboratório de Semioquímicos – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF.....	42
<b>Figura 3.</b> Sistema de coleta de voláteis (aeração) do Laboratório de Semioquímicos – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF.....	44
<b>Figura 4.</b> Aspecto, em microscopia eletrônica de varredura, da injúria de	

herbivoria causada pelo *Euschistus heros* em folhas de soja. A) Probóscide do percevejo inserida na folha da cultivar IAC100 B) Injúria obtida sob maior aumento e C) Perfuração deixada na folha da cultivar Dowling após a retirada da probóscide, com exposição dos tecidos internos..... 48

**Figura 5.** Aspecto, em microscopia eletrônica de varredura, da injúria de oviposição causada pelo *Euschistus heros* em folhas de soja. A) Sítio de oviposição na cultivar IAC100, mostrando as células deformadas e a presença da cola utilizada na fixação dos ovos à folha B) Sítio de oviposição, sob maior aumento, mostrando o destacamento da epiderme e a exposição do mesofilo (parênquima clorofiliano) e C) Destacamento dos ovos junto com a epiderme da folha da cultivar Silvânia..... 49

**Figura 6.** Respostas de fêmeas de *Telenomus podisi* no olfatômetro em “Y” para a cultivar de soja Dowling submetida a diferentes tratamentos. Cont: planta não danificada, Ovi: com oviposição, HerbOvip: com herbivoria+oviposição e Herb: com herbivoria. 24, 48, 72, 96 e 120 hr = tempo depois do início dos tratamentos (indução da planta). Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ), a 5% de probabilidade. Números entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum dos tratamentos..... 50

**Figura 7.** Respostas das fêmeas de *Telenomus podisi* no olfatômetro em “Y” para a cultivar de soja IAC100 submetida a diferentes tratamentos. Cont: planta não danificada, Ovi: com oviposição, HerbOvip: com herbivoria+oviposição e Herb: com herbivoria. 24, 48, 72, 96 e 120 hr = tempo depois do início do dano (indução da planta). Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste  $\chi^2$ , a 5% de probabilidade. Números entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum dos tratamentos..... 51

**Figura 8.** Tempo de residência (em segundos) das fêmeas de *E. heros* no olfatômetro de quatro escolhas para plantas não danificadas de soja das cultivares Dowling, IAC100 e Silvânia. Barras seguidas da mesma letra não diferiram significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade..... 52

**Figura 9.** Respostas das fêmeas acasaladas e alimentadas de *Euschistus heros* no olfatômetro em “Y” para plantas não danificadas das cultivares Dowling,

IAC100 e Silvânia. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste  $\chi^2$ , a 5% de probabilidade. Números entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum dos tratamentos..... 53

**Figura 10.** Tempo de residência (em segundos) das fêmeas de *E. heros* no olfatômetro em “Y” para plantas não danificadas das cultivares Dowling, IAC100 e Silvânia. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste *t* pareado, a 5% de probabilidade..... 53

**Figura 11.** Voláteis totais (média±EPM) obtidos das plantas não danificadas (controle) e submetidas aos tratamentos de herbivoria, oviposição e herbivoria+oviposição das cultivares Dowling, IAC100 e Silvânia. O aumento dos voláteis liberados por plantas danificadas da cultivar Dowling foi significativo depois de 48 hr. Para as cultivares IAC100 e Silvânia não houve diferença significativa entre os tratamentos e nas interações com o tempo (Manova para medidas repetidas,  $P>0.05$ ). Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada hora não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade..... 55

**Figura 12.** Diagrama de PRC e peso das variáveis ( $b_k$ ), baseado na mistura dos voláteis liberados por plantas da cultivar Dowling, em sete dias de amostragem. As linhas representam o padrão de resposta das plantas de soja aos diferentes tratamentos no tempo. O valor de P indica a significância do primeiro eixo do diagrama de PRC sobre todas as horas, baseada no teste de permutação de Monte Carlo, com estatística semelhante ao teste F. Em cada hora, o valor de  $C_{dt}$  difere significativamente entre os tratamentos que não possuem a mesma letra (a-c); letras repetidas ou a ausência delas, dentro de cada tempo, mostram contrastes que não diferiram significativamente pelo teste de permutação de Monte Carlo, a 5% de probabilidade. Quanto maior (valor absoluto) o peso da variável (no caso, composto volátil), maior a contribuição desta no padrão de resposta dos tratamentos que diverge em relação ao comportamento do tratamento controle (no controle, linha  $C_{dt} = 0$ ) indicado na PRC..... 59

**Figura 13.** Principais voláteis liberados (média±EPM) por plantas não atacadas (controle) e submetidas aos tratamentos de herbivoria, oviposição e herbivoria+oviposição da cultivar Dowling. As barras representam o erro padrão da média. Asterisco indica diferença significativa no contraste entre plantas

sadias e induzidas dentro de cada hora, pelo teste  $t$ , a 5% de probabilidade..... 60

### Capítulo III

**Figura 1.** Respostas das fêmeas de *Telenomus podisi* no olfatômetro em “Y” para diferentes concentrações do composto (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno ou hexano (controle). Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ), a 1% de probabilidade. Números entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum dos tratamentos..... 70

**Figura 2.** Tempo de residência (em segundos) das fêmeas de *Telenomus podisi* no olfatômetro em “Y” para as diferentes concentrações do composto (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste  $t$  pareado, a 1% de probabilidade..... 71

**Figura 3.** Tempo de residência (em segundos) das fêmeas de *T. podisi* no olfatômetro em “Y” para as diferentes concentrações do composto salicilato de metila. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste  $t$  pareado, a 5% de probabilidade..... 72

**Figura 4.** Tempo de residência (em segundos) das fêmeas de *T. podisi* no olfatômetro em “Y” para as diferentes misturas dos compostos Fa: (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno, Ms: salicilato de metila e Ah: (*Z*)-3-acetato de hexenila; controle: hexano. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste  $t$  pareado, a 5% de probabilidade..... 73

**Figura 5.** Respostas das fêmeas de *T. podisi* no olfatômetro em “Y” para planta sadia ou com dano de herbivoria; controle: (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno na concentração de  $1 \times 10^{-5}$ M. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ), a 0.1% de probabilidade. Números entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum dos tratamentos..... 74

**Figura 6.** Tempo de residência (em segundos) das fêmeas de *T. podisi* no olfatômetro em “Y” para planta não atacada ou com herbivoria; controle: (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno na concentração de  $1 \times 10^{-5}$ M. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste  $t$  pareado, a 5% de probabilidade..... 74

## Capítulo IV

- Figura 1.** Desenho esquemático do arranjo das parcelas com plantas de soja das cultivares Dowling (D1 a D5), IAC100 (I1 a I5) e Silvânia (S1 a S5), localizadas na área experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, utilizadas nas avaliações da flutuação populacional do percevejo *E. heros* e dos parasitóides de ovos da família Scelionidae..... 82
- Figura 2.** Gaiolas de madeira utilizadas para a proteção das plantas de soja das cultivares Dowling, IAC100 e Silvânia, durante o período de setembro a dezembro de 2010, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF..... 83
- Figura 3.** A) Cartelas (4cm x 4cm) com 50 ovos de *Euschistus heros*, colados com goma arábica e recobertos com filó (malha de 4 mm) e B) Cartelas com ovos sentinela presos na planta de soja no campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF, no período de setembro a dezembro de 2010..... 85
- Figura 4.** Gaiola instalada em parcela da cultivar de soja Dowling com armadilhas adesivas amarelas em seu interior (Biotrap®, Biocontrole Método de Controle de Pragas Ltda) para a captura dos parasitóides, no campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF, no período de setembro a dezembro de 2010..... 86
- Figura 5.** Densidade de A) ninfas+adultos e B) ovos do percevejo *Euschistus heros* por planta. C) Porcentagem de ovos parasitados nas cultivares de soja Dowling, IAC100 e Silvânia, no campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF, no período de setembro a dezembro de 2010..... 88
- Figura 6.** Parasitismo em cartelas com ovos (sentinela) de *E. heros* colocadas nas cultivares de soja Dowling, IAC100 e Silvânia, no campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF, no período de setembro a dezembro de 2010. A) Todos os parasitóides emergidos dos ovos e B) Padrão de parasitismo ao longo do tempo. Barras seguidas pela mesma letra não diferiram significativamente entre si pelo teste Tukey ( $P<0.05$ )..... 91
- Figura 7.** Parasitismo em cartelas com ovos (sentinela) de *E. heros* colocadas

nas cultivares de soja Dowling, IAC100 e Silvânia. A) Todos os parasitóides da família Scelionidae e B) Exclusivamente a espécie *Telenomus podisi*. Asterisco indica diferença significativa entre as cultivares, dentro de data, pelo teste Tukey ( $P < 0.05$ )..... 92

**Figura 8.** Captura de vespas parasitóides em armadilhas adesivas amarelas instaladas nas parcelas das cultivares de soja Dowling, IAC100 e Silvânia, entre os estádios reprodutivos R1 e R8, no campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF, no período de setembro a dezembro de 2010. A) Total de parasitóides B) Todos os parasitóides da família Scelionidae C) Gênero *Telenomus* e D) Gênero *Trissolcus*. Asterisco indica diferença significativa entre as cultivares, dentro de data, pelo teste Tukey ( $P < 0.05$ )..... 95

#### Anexos

<b>Anexo 1.</b> Procedência dos Compostos Químicos e Curvas de Calibração Para a Quantificação dos Flavonóides da Soja.....	121
<b>Anexo 2.</b> Manuscrito Referente à Parte dos Resultados Apresentados no Capítulo II, aceito para Publicação no Periódico “Journal of Chemical Ecology”.....	123
<b>Anexo 3.</b> Figuras Cujos Resultados Não Foram Significativos - Capítulo II – Voláteis Mediadores da Interação Planta-Herbívoro-Inimigo Natural em Cultivares de Soja Resistente e Suscetível.....	151
<b>Anexo 4.</b> Perfis Cromatográficos das Cultivares de Soja Dowling, IAC100 e Silvânia Submetidas à Herbivoria, Herbivoria+Oviposição e Oviposição e Plantas Sadias.....	159
<b>Anexo 5.</b> Figuras Cujos Resultados Não Foram Significativos - Capítulo III - Efeito dos Compostos ( <i>E,E</i> )- $\alpha$ -farneseno, salicilato de metila e ( <i>Z</i> )-3-acetato de hexenila no Comportamento do <i>Telenomus podisi</i> , Parasitóide de Ovos do <i>Euschistus heros</i> .....	162

**Resumo – Interações Químicas no Sistema Soja – Percevejo *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) – Parasitóide de Ovos *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae)**

O controle biológico associado ao uso de cultivares resistentes ao ataque de insetos apresenta interesse e potencial para ser utilizado no manejo de pragas. Os objetivos do trabalho foram investigar os mecanismos envolvidos na resistência das cultivares de soja Dowling e IAC100 ao percevejo *Euschistus heros*, em comparação com a cultivar suscetível Silvânia; avaliar a atração do parasitóide de ovos, *Telenomus podisi*, e do percevejo a essas cultivares com diferentes tipos de injúrias (herbivoria, herbivoria+oviposição e oviposição); avaliar a resposta do parasitóide aos compostos induzidos pela herbivoria, assim como investigar a distribuição de ninfas e adultos do percevejo e os parasitóide de ovos de *E. heros* nas diferentes cultivares em condições de campo. No teste de oviposição do percevejo, com escolha entre as cultivares, não houve diferença significativa no número de posturas e ovos entre as cultivares, enquanto no teste sem chance de escolha, o número de ovos deixados na cultivar Silvânia foi maior do que nas demais. As cultivares resistentes afetaram o desenvolvimento do percevejo. As ninfas mantidas na cultivar Dowling não completaram seu ciclo biológico. Houve diferença nos pesos médios e na longevidade dos adultos do percevejo para as cultivares IAC100 e Silvânia. A fecundidade foi maior para fêmeas alimentadas na cultivar Silvânia, porém não houve diferença na viabilidade dos ovos. A sobrevivência do percevejo da fase ninfal até adulto diferiu significativamente entre os tratamentos. Houve maior produção dos isoflavonóides na cultivar Silvânia, sendo que apenas o composto genisteína, 48hr após a herbivoria, foi produzido em maior quantidade. Nos bioensaios com olfatômetro em “Y”, os parasitóides foram atraídos para as plantas injuriadas pela herbivoria e pela associação de herbivoria+oviposição quando comparadas com plantas não atacadas de soja nas cultivares resistentes, mas não mostrou preferência para cultivar Silvânia em nenhum dos tratamentos. Os voláteis da planta emitidos nas três cultivares após a oviposição não atraíram o parasitóide. Nos bioensaios com o olfatômetro de quatro escolhas, fêmeas de *E. heros* não mostraram preferência para os odores das plantas de soja atacadas ou não para as três cultivares. Porém, com o olfatômetro em “Y”, o percevejo foi atraído para plantas não atacadas quando comparadas com o controle (somente ar). As análises de Curvas de Respostas Principais (PRC) mostraram que houve diferença entre os tratamentos ao longo do tempo no perfil químico dos voláteis entre os tratamentos para a cultivar Dowling. Os

compostos que mais contribuíram para a diferença entre plantas de soja injuriadas comparadas com plantas não atacadas foram (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno, salicilato de metila, (*Z*)-3-acetato de hexenila e (*E*)-2-octen-1-ol. O parasitóide foi atraído somente para o (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno a  $1 \times 10^{-5}$  M nos testes no olfatômetro em “Y”, feitos com cada um dos compostos, com exceção do (*E*)-2-octen-1-ol, e comparados ao controle (hexano). Porém, houve diferença no tempo de residência para o composto salicilato de metila nas concentrações  $1 \times 10^{-4}$  e  $1 \times 10^{-5}$  M. Não houve diferença significativa na primeira escolha, nem no tempo que o parasitóide permaneceu nos braços do olfatômetro, tratamento e controle, quando as misturas: (1) (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno+salicilato de metila+(*Z*)-3-acetato de hexenila; (2) (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno+ salicilato de metila; (3) (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno+(*Z*)-3-acetato de hexenila e (4) salicilato de metila+(*Z*)-3-acetato de hexenila foram testadas contra o controle (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno a  $1 \times 10^{-5}$  M. O parasitóide também não mostrou preferência pelas misturas testadas, com o hexano como controle. Entretanto, o tempo de residência no braço com a mistura 2, especificada acima, foi estatisticamente diferente. *Telenomus podisi* foi atraído para as plantas com herbivoria, permanecendo também a maior parte do tempo no braço do olfatômetro com o tratamento, nos bioensaios utilizando plantas atacadas e não atacadas pelo *E. heros*, após 96 hr, comparado com o (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno a  $1 \times 10^{-5}$  M. Não houve diferença entre as cultivares na distribuição do percevejo nas plantas do campo. A maior população foi observada no final do ciclo da soja, porém, o maior número de ovos naturais e parasitismo foram encontrados entre os estágios reprodutivos R1 e R5. Os parasitóides *T. podisi*, *Trissolcus teretis*, *Tr. urichi* e *Tr. brochymenae* emergiram dos ovos sentinela de *E. heros*, sendo *T. podisi* o mais freqüente e com maior ocorrência a partir do estágio reprodutivo R6. Os resultados sugerem que as cultivares IAC100 e Dowling possuem defesa direta (constitutiva) contra *E. heros* e que não houve indução da produção dos isoflavonóides na cultivar de soja resistente Dowling pela injúria de herbivoria. As plantas das cultivares resistentes danificadas pelo percevejo apresentaram defesa induzida indireta. Os compostos (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno, salicilato de metila, (*Z*)-3-acetato de hexenila estão, provavelmente, envolvidos na atração do parasitóide *T. podisi*. O parasitóide *T. podisi* foi atraído pela cultivar de soja resistente Dowling em condições de campo.

**Abstract - Chemical Interactions on System Soybean – stink bug *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) – Egg Parasitoid *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae)**

The association of resistant varieties and biological control has great interest and potential to be used for pest management. The aims of this work were to evaluate the mechanisms involved in resistance of the soybean cultivars Dowling and IAC100 for the stinkbug *Euschistus heros*, in contrast with the susceptible Silvânia; the attraction of *Telenomus podisi* and the stinkbug to different types of damage (herbivory, herbivory+oviposition and oviposition) to these cultivars; the response of the parasitoid to compounds induced by herbivory damage and the distribution of nymphs and adults of the stinkbug and the egg parasitoid on different cultivars under field conditions. In choice tests, there was no difference in the number of clutches and the number of eggs between the cultivars, but the cultivar Silvânia received more eggs in the test without choice. The nymphs reared on cv Dowling did not complete their biological cycle. The mean weight and the longevity of adults on the different cultivars were different. Female fecundity on cultivar Silvânia was higher than on cultivar IAC100, however the egg fertility was not different. The survivorship of nymphs until adults differed significantly between treatments. Total amount of isoflavonoids compounds was higher in cultivar Silvânia, and only the compound genistein at 48 hr after damage, was produced in greater quantity in the herbivory treatment. In a Y-tube olfactometer, the parasitoids were attracted to herbivory and herbivory+oviposition damaged soybean plants when compared to undamaged soybean plants for the resistant cultivars, but did not show preference for the susceptible cultivar Silvânia in any of the damage treatments. The plant volatiles emitted by oviposition damaged plants in the three cultivars did not attract the egg parasitoid. In four-arm-olfactometer bioassays *E. heros* females did not show a preference for odors of damaged or undamaged soybean plants of the three cultivars studied. In a Y-tube olfactometer, the stink bug was attracted to undamaged soybean plants for all cultivars compared with air. The Principal Response Curves (PRC) analysis showed consistent variability over time in the chemical profile of volatiles between treatments for the cultivar Dowling. The compounds that most contributed to the divergence between damaged soybean plants compared to undamaged plants were (*E,E*)- $\alpha$ -farnesene, methyl salicylate, (*Z*)-3-hexenyl acetate and (*E*)-2-octen-1-ol. Testing the compounds in a Y-tube olfactometer, the parasitoids were attracted only to (*E,E*)- $\alpha$ -farnesene at  $1 \times 10^{-5}$  M, when both individual compounds and hexane

were contrasted. However, the residence time was different to methyl salicylate at concentrations of  $1 \times 10^{-4}$  e  $1 \times 10^{-5}$ M. No difference was observed on the initial choice neither on the time that the parasitoid remained in the arms of the olfactometer, treatment and control, when the blends of volatiles: (1) (*E,E*)- $\alpha$ -farnesene+methyl salicylate+(*Z*)-3-hexenyl acetate; (2) (*E,E*)- $\alpha$ -farnesene+methyl salicylate; (3) (*E,E*)- $\alpha$ -farnesene+(*Z*)-3-hexenyl acetate and (4) methyl salicylate+(*Z*)-3-hexenyl acetate were tested against (*E,E*)- $\alpha$ -farnesene at  $1 \times 10^{-5}$ M. Testing hexane as control, the parasitoid did not show preference to the blends tested, but the residence time in the arm supplied with the blend 2 was statistically different. In the bioassays with 96 hr herbivory damage caused by *E. heros*, and undamaged soybean plants against (*E,E*)- $\alpha$ -farnesene at  $1 \times 10^{-5}$ M, *T. podisi* was attracted to herbivory damaged soybean plants, also remaining a long of time in the olfactometer arm supplied with the odor of herbivory damaged plants. There was no difference between cultivars in stink bug distribution in the field; the highest population was observed in the final stages of crop, however, more natural eggs and parasitism were found among the reproductive stages R1 and R5. The parasitoids *T. podisi*, *Trissolcus teretis*, *Tr. urichi* e *Tr. brochymenae* emerged from the sentinel eggs of *E. heros*, where *T. podisi* was the most common and occurred more from the reproductive stage R6. These results suggest that the cv IAC100 and Dowling present direct defense (constitutive) against *E. heros*; that the herbivory damage did not induce isoflavonoids production on resistant soybean cultivar Dowling; the plants of the resistant cultivars damaged by the stinkbug have indirect induced defense; the compounds (*E,E*)- $\alpha$ -farnesene, methyl salicylate, (*Z*)-3-hexenyl acetate are probably involved in the attraction of the egg parasitoid *T. podisi* and that the parasitoid *T. podisi* is attracted by the cultivar Dowling in field conditions.

## Introdução

Atualmente a soja, *Glycine max* (L.) Merrill, 1917 (Fabales: Fabaceae), é a oleaginosa mais produzida e consumida no mundo (Wilcox 2004). Seu cultivo no Brasil teve início na região sul e, atualmente, é produzida do norte ao sul do país, com as maiores áreas na região Centro-Oeste, principalmente no bioma Cerrado (Portugal, 1999; Conab, 2010).

O Brasil é o segundo maior produtor e exportador de soja, com área cultivada de 23.2 milhões de hectares, com produtividade anual em torno de 2.9 t/hectare e produção total de 68.7 milhões de toneladas na safra 2009-2010 (Conab, 2010). Dentre os grandes produtores, o Brasil possui o maior potencial de expansão da área cultivada, podendo, a depender das necessidades de consumo, mais do que duplicar sua produção, e em curto prazo, constituir-se no maior produtor e exportador mundial de soja e seus derivados (Dall’Agnol et al., 2008).

Milhões de toneladas de soja são perdidas, anualmente, pelo ataque de insetos-praga, com destaque para o complexo de espécies de percevejos da família Pentatomidae (Panizzi, 1997; Panizzi et al., 2007). O percevejo-marrom *Euschistus heros* (Fabricius, 1794), o percevejo-verde-pequeno *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) e o percevejo-verde *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758), são considerados as pragas mais importantes para a cultura da soja no Brasil (Panizzi e Slansky, 1985; Corrêa-Ferreira e Panizzi, 1999) e, dentre estes, *E. heros* se destaca por ser uma das principais espécies que ocorre do norte do Estado do Paraná ao Centro-Oeste brasileiro (Corrêa-Ferreira e Panizzi, 1999).

A colonização da lavoura de soja pelos percevejos pentatomídeos ocorre no período vegetativo (V – que vai de V1 a V7), especificamente entre o final do estágio V6 e o início do estágio V7 (Borges et al., 2011) ou logo após a floração, período reprodutivo (R – que vai de R1 a R5), especificamente a partir do final do estágio R1 ao início do R2. A partir do aparecimento das vagens (R3), inicia-se a reprodução da praga na lavoura e o surgimento das ninfas. No final do desenvolvimento das vagens (R4) e início do enchimento dos grãos (R5), ocorre o aumento rápido da população, período no qual a soja se torna mais suscetível ao ataque desses insetos (Corrêa-Ferreira e Panizzi, 1999).

Durante a alimentação, o aparelho bucal do percevejo é introduzido nas vagens, e ao atingirem as sementes, danificam diretamente os tecidos, tornando-as chochas e enrugadas, levando a perdas significativas no rendimento, na qualidade e no potencial

germinativo da soja (Panizzi e Slansky, 1985; Panizzi, 2000). Pode ocorrer ainda redução no teor de óleo, aumento na percentagem de proteínas e ácidos graxos livres nas sementes, distúrbios fisiológicos como a retenção foliar e aumento na transmissão de patógenos (Villas-Bôas et al., 1990; Sosa-Gómez e Moscardi, 1995; Boethel et al., 2000).

Apesar dos prejuízos causados pelos percevejos, não é recomendável a aplicação preventiva de agrotóxicos, pois além do grave problema de poluição ambiental, o uso desnecessário e excessivo de produtos químicos pode também elevar os custos da produção, aumentar a resistência dos insetos aos produtos utilizados, inviabilizar a produção da cultura e afetar os inimigos naturais (Pedigo 1996). O controle químico só deveria ser efetuado quando as pragas atingissem o nível de controle, dois percevejos/m<sup>2</sup> (Embrapa, 2008). Entretanto, não é o que acontece no Brasil onde a produção de soja é, tipicamente, dependente de agrotóxicos e fertilizantes solúveis (Gazzoni et al., 1994; Corrêa-Ferreira e Moscardi, 1996).

Dentre os métodos alternativos, o controle biológico possui a vantagem de proteger a diversidade biológica, porque atua no ecossistema sobre as populações alvo, com alta especificidade; apresenta menor probabilidade de causar desequilíbrio ao meio ambiente; não deixa resíduos no solo, na água ou no alimento e, ainda, apresenta maior sustentabilidade (Gallo et al., 2002). O uso de agentes de controle biológico mostra-se potencialmente promissor em programas de manejo integrado de pragas da soja (Orr 1988), especialmente os parasitóides de ovos dos gêneros *Telenomus* e *Trissolcus* (Hymenoptera: Scelionidae), que são os inimigos naturais mais comuns dos percevejos e que ocorrem naturalmente em diversas regiões do Brasil, inclusive no Distrito Federal (Corrêa-Ferreira e Moscardi, 1995; Medeiros et al., 1997; Corrêa-Ferreira, 2002). A espécie *Telenomus podisi* Ashmead, 1881 se destaca devido à alta frequência com que é encontrado parasitando os ovos de *E. heros* nos cultivos de soja (Medeiros et al., 1997, 1998; Pacheco e Corrêa-Ferreira, 2000).

Devido ao tamanho bastante pequeno da maioria dos parasitóides de ovos e a complexidade estrutural do ambiente onde habitam, um dos maiores desafios para o parasitóide é encontrar o hospedeiro adequado. Alguns estudos sugerem que para transpor essa barreira, eles desenvolveram mecanismos que os guiam para seus hospedeiros, utilizando várias pistas como sinais visuais, físicos e químicos provenientes destes ou associados a eles. Entre esses estão os sinais emitidos pelas plantas hospedeiras (Vet e Dicke, 1992; Fatouros et al., 2008; Vinson, 1998).

O parasitóide *T. podisi* responde a diferentes pistas, como feromônio sexual do *E. heros* (Borges et al., 1999), traços deixados no substrato por fêmeas de *E. heros* (Borges et al., 2003), voláteis induzidos por herbivoria (Moraes et al., 2005), sinais vibratórios produzidos durante a comunicação sexual do *E. heros* (Laumann et al., 2007), compostos defensivos (Laumann et al., 2009) e voláteis induzidos pelo fitormônio (Z)-jasmone em plantas de soja (Moraes et al., 2009).

A resposta das plantas à herbivoria é extremamente complexa e envolve estratégias que permitem o escape, a defesa ou a tolerância ao ataque do herbívoro (Rausher, 1992). As plantas possuem mecanismos de defesa que podem atuar na proteção contra herbívoros, fitopatógenos ou fatores abióticos, como estresse hídrico, podendo ser ainda de natureza constitutiva ou induzida. A defesa constitutiva ocorre de forma contínua e não depende da presença ou da ação do agente agressor, enquanto a induzida se expressa somente após a ocorrência da injúria. Em alguns casos, ambas podem ocorrer em conjunto em uma mesma planta (Pieterse e Dicke, 2007; Chen, 2008).

As defesas constitutivas e induzidas podem ser diretas, sendo formadas por características morfológicas, que incluem estruturas da planta como tricomas, espinhos, superfícies cerosas e folhagem endurecida e que atuam de forma negativa sobre o inseto, de modo a preservar a planta de injúrias mais sérias; ou por características químicas que envolvem a produção de toxinas, de repelentes, supressores de alimentação ou oviposição, deterrentes e redutores de digestibilidade (Lara, 1991; Dicke, 1994; Cortesero et al., 2000). Os isoflavonóides são compostos secundários fenólicos produzidos pelas plantas, envolvidos na defesa das mesmas contra herbívoros e fitopatógenos (Chen, 2008), que estão envolvidos na resistência da soja contra *N. viridula* e *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes cultivares de soja (Piubelli et al., 2003a, 2005).

A defesa constitutiva pode ser indireta, com a presença de nectários extraflorais ou domáceas, que atraem inimigos naturais para as plantas que a possuem (Schoonhoven et al., 2005; Heil, 2008). A defesa induzida também pode ser indireta, onde a planta atacada pelo herbívoro pode liberar compostos orgânicos voláteis (COVs) que atuam na atração dos seus inimigos naturais, como parasitóides ou predadores (Price, 1997; Kessler e Baldwin, 2002; Heil, 2008; Karban, 2011). Vários estudos já mostraram que os parasitóides usam os COVs liberados após a injúria causada pelo herbívoro para localizarem os seus hospedeiros. O parasitóide *Trissolcus basalis* (Wollaston, 1858)

respondeu aos voláteis induzidos de plantas de feijão danificadas por herbivoria+oviposição pelo percevejo *N. viridula* (Colazza et al. 2004a) e o parasitóide *T. podisi* respondeu aos voláteis das plantas de soja induzidas pela herbivoria do *E. heros* (Moraes et al., 2005, 2008).

Os voláteis induzidos além de atraírem os inimigos naturais podem, ainda, sinalizar a localização do alimento para os herbívoros, indicar aos insetos a presença de organismos competidores, como também indicar o decréscimo qualitativo da planta (Dicke, 2009). Por exemplo, a seleção de uma planta com a presença de defesa já induzida por um herbívoro pode expor o herbívoro aos efeitos prejudiciais das suas substâncias defensivas ou atrair os seus inimigos naturais (Carrol et al., 2008; Halitschke et al., 2008).

A pesquisa da comunicação química entre plantas e insetos pode gerar uma série de ferramentas com potencialidade de utilização no manejo integrado de pragas. A identificação dos compostos responsáveis pela defesa química da planta e sua ação nas interações com insetos de diferentes níveis tróficos, poderia ser usada para atrair ou manter os inimigos naturais na cultura ou para repelir os herbívoros (Gatehouse, 2002) e, ainda, para auxiliar no desenvolvimento de cultivares com genes que produzam esses compostos naturalmente, antes mesmo de sofrerem a injúria e que seriam resistentes às pragas (Piubelli et al., 2005).

Outro método alternativo de controle seria o uso de cultivares resistentes. Pode-se considerar uma cultivar resistente, aquela que devido a sua constituição genotípica, é menos danificada que outras por uma praga em condições de igualdade (Painter, 1951; Lara, 1991; Gallo et al., 2002). Deve-se considerar ainda que, a resistência, é relativa e específica, havendo sempre a necessidade de comparação com outras cultivares, sendo muitas vezes resistente a uma praga e suscetível a outras (Gallo et al., 2002).

Em geral os estudos de resistência varietal em soja envolvem principalmente os efeitos diretos nos herbívoros (Li et al., 2004, 2008; Piubelli et al., 2005). Diferentes trabalhos têm mostrado características de resistência da cultivar IAC100 aos percevejos e à lagarta da mariposa *A. gemmatalis* na fase reprodutiva das plantas (Fernandes et al., 1994; Lourenção et al., 1997; Machado et al., 1999). A cultivar Dowling apresentou efeitos de antibiose e não-preferência ao pulgão *Aphis glycines* Matsumura, 1917 (Hemiptera: Aphididae), que pararam de se alimentar e morreram depois de 48 hr em uma dieta com esta cultivar (Li et al. 2004, 2008).

O emprego de plantas resistentes a insetos tem sido considerado um método promissor de controle devido à possibilidade de permitir a manutenção da praga em níveis inferiores ao de dano econômico, sem causar prejuízos ao ambiente e sem ônus adicional ao agricultor. Além disso, por sua compatibilidade com os demais métodos de controle, é uma técnica ideal para ser utilizada em programas de manejo de pragas (Gallo et al., 2002; Vendramim e Guzzo, 2009).

Apesar das informações sobre fontes de resistência na soja aos herbívoros, não há estudos que avaliam se plantas que possuem resistência durante o estágio reprodutivo, que envolve primeiramente as defesas diretas, apresentam também defesa indireta nos estágios vegetativos, e se há interação de cultivares resistentes com os inimigos naturais. Para o manejo integrado de pragas na cultura da soja, tem sido proposto que os inimigos naturais poderiam ser liberados ou atraídos para o campo antes da chegada dos percevejos (Borges et al., 1998). Para isso, é importante que o desenvolvimento das cultivares resistentes não altere a resposta da planta aos herbívoros e a liberação de voláteis induzidos pela herbivoria que atraem os inimigos naturais.

O estudo da ecologia química da interação planta - herbívoro - inimigo natural mostra-se como uma ferramenta útil na elucidação dos mecanismos que governam os comportamentos de procura do hospedeiro e oviposição pelo parasitóide, na identificação dos metabólitos secundários (voláteis e não-voláteis) relevantes ao sistema tritrófico e na prospecção dos atributos desfavoráveis da cultivar de soja ao parasitóide. Essas respostas podem subsidiar futuros programas de melhoramento genético vegetal e manejo de inimigos naturais na cultura. Duas cultivares de soja conhecidas por apresentarem resistência contra herbívoros (Dowling e IAC100) e uma cultivar (Silvânia) relatada como suscetível aos percevejos (Laumann et al., 2008) foram selecionadas para esse estudo, com o objetivo de investigar quais os mecanismos de defesa envolvidos na interação soja-*E. heros*-*T. podisi*.

A tese versa sobre a ecologia química dessa interação e foi organizada em quatro capítulos: o primeiro, intitulado “Preferência de Oviposição e Biologia de *Euschistus heros* em Cultivares de Soja Resistente e Suscetível”, foi desenvolvido com o objetivo de avaliar os efeitos das cultivares resistentes, Dowling e IAC100 e da suscetível Silvânia, na biologia de *E. heros*, em condições de laboratório. O segundo capítulo “Voláteis Mediadores da Interação Planta-Herbívoro-Inimigo Natural em Cultivares de Soja Resistente e Suscetível”, tratou das respostas do parasitóide *T. podisi* às cultivares de soja resistente e suscetível, após os danos causados pela herbivoria, pela

herbivoria+oviposição e pela oviposição por fêmeas de *E. heros*; da atratividade das fêmeas do percevejo para os voláteis liberados por plantas de soja saudáveis ou danificadas e da identificação do perfil químico dos voláteis liberados pelas diferentes cultivares saudáveis ou danificadas. O terceiro capítulo “Efeito dos Compostos (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno, salicilato de metila e (*Z*)-3-acetato de hexenila no Comportamento do *Telenomus podisi*, Parasitóide de Ovos do *Euschistus heros*”, tratou da avaliação da resposta do parasitóide aos principais compostos liberados pela soja após as injúrias causadas pelo percevejo. O quarto e último capítulo “Interações Tróficas entre Cultivares de Soja Resistente e Suscetível, Parasitóides de Ovos da Família Scelionidae e o Percevejo *Euschistus heros*”, foi desenvolvido para avaliar como as ninfas e os adultos do percevejo e os parasitóides de ovos de *E. heros* distribuem-se nas diferentes cultivares em condições de campo.

As citações dos autores ao longo do texto, as referências bibliográficas, a citação de unidades de medida nas descrições da metodologia e dos resultados, seguiram as normas de publicação do periódico “Journal of Chemical Ecology.”

## Capítulo I

### Preferência de Oviposição e Biologia de *Euschistus heros* em Cultivares de soja Resistente e Suscetível

#### Introdução

As plantas possuem atributos físicos e químicos que podem atuar como defesas constitutivas, presentes antes mesmo de sofrerem a injúria; ou induzidas, que se manifestam após a injúria, e que podem favorecê-las na defesa contra de herbívoros, fitopatógenos e condições desfavoráveis do ambiente (Pieterse e Dicke, 2007; Chen, 2008). A defesa induzida pode ser indireta, caracterizada pela atração dos inimigos naturais; e direta, onde as plantas expressam mecanismos que reduzem o potencial reprodutivo e a longevidade da população dos herbívoros (Cortesero et al., 2000; Dicke e Hilker, 2003; Chen, 2008).

As defesas diretas das plantas podem atuar sobre os herbívoros produzindo barreiras morfológicas para a alimentação e/ou oviposição, como espinhos e tricomas,

ou barreiras químicas, os metabólitos secundários, tais como alcalóides, terpenóides, esteróides e flavonóides (Kogan, 1986; Arimura et al., 2005; Chen, 2008). Esses compostos desempenham função importante não somente na escolha inicial do herbívoro, como também na determinação da quantidade de alimento que o inseto vai ingerir (Beck, 1965; Fraenkel, 1969; Srivastava et al., 1999). Por exemplo, os isoflavonóides são compostos fenólicos que podem atuar como deterrentes da alimentação e/ou levar ao espessamento da parede celular, desempenhando papel importante no mecanismo de resistência por antibiose contra os insetos (Treutter, 2006; Chen, 2008; O'Neil et al., 2010). São derivados da rota do ácido chiquímico, a partir da via dos fenilpropanóides, e podem se apresentar em quatro formas químicas: as agliconas, a exemplo dos compostos daidzeína e genisteína; as gliconas, daidzina e genistina; os derivados glicolisados acetilados e os malonilados (Mann, 1994; Lee et al., 2003).

A resistência das plantas envolve características que as tornam menos suscetíveis ao ataque do herbívoro, dependendo das condições em que são manifestadas. Existem três categorias de resistência de plantas aos insetos: 1) não-preferência, quando a planta não apresenta as características adequadas ao desenvolvimento do inseto herbívoro, ocorrendo uma reação negativa durante o processo de seleção da planta, sendo a planta, nesse caso, pouco utilizada para a oviposição, alimentação ou como abrigo pelo hospedeiro; 2) antibiose, quando o inseto se alimenta normalmente da planta, mas esta afeta negativamente o crescimento e/ou desenvolvimento do inseto; e 3) tolerância, quando a planta apresenta habilidade para se desenvolver, reproduzir e recuperar-se da injúria, suportando uma população aproximadamente igual àquela que danifica um hospedeiro suscetível (Painter, 1951; Schoonhoven et al., 2005; Vendramim e Guzzo, 2009).

As causas de não-preferência incluem repelentes e restringentes químicos vegetais, pubescência (uma cobertura de tricomas simples ou glandulares), ceras superficiais e espessura ou dureza das folhas - todos os quais podem impedir a colonização da planta pelos insetos. Os efeitos de antibiose sobre os insetos variam de leves a letais, e os fatores incluem toxinas, inibidores de crescimento, níveis reduzidos de nutrientes, exsudados viscosos de tricomas (pêlos) glandulares e altas concentrações de compostos vegetais indigeríveis (Gullan e Cranston, 2008).

Estudos de resistência nas cultivares de soja envolveram primeiramente as defesas diretas contra os herbívoros durante o estágio reprodutivo da soja (Piubelli et al., 2005;

Li et al., 2004, 2008). Alguns estudos têm sugerido que a resistência no estágio reprodutivo da soja para percevejos e lagartas poderia estar relacionada à concentração dos isoflavonóides nas sementes (Rao et al., 1990; Hoffmann-Campo, et al., 2001; Piubelli et al., 2003a). A cultivar IAC100 tem altas concentrações de isoflavonóides quando comparada a outras cultivares de soja e confere também alta resistência para os percevejos (Carrão-Panizzi e Kitamura, 1995). A resistência de IAC100 tem efeito de antibiose para *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) (Piubelli et al., 2005; McPherson e Buss, 2007). As categorias de defesa, antibiose e não-preferência parecem estar envolvidas na resistência da cv Dowling contra os pulgões. Nesse caso, houve uma interrupção da alimentação com conseqüente morte após 48 hr do início do experimento em laboratório (Li et al., 2004, 2008). Por outro lado, a cultivar Silvânia apresenta alta suscetibilidade ao ataque dos percevejos, mas faltam estudos para verificar o que a torna suscetível, quando comparada a outras cultivares (Laumann et al., 2008).

A redução da preferência por um hospedeiro e do tempo de desenvolvimento dos herbívoros, devido às defesas diretas da planta, pode afetar o crescimento das populações e a estrutura das comunidades de herbívoros e inimigos naturais (Agrawal, 2005). Deste modo, os objetivos do trabalho foram: (i) avaliar se há preferência para oviposição de fêmeas de *Euschistus heros* nas cultivares de soja Dowling, IAC100 e Silvânia; (ii) avaliar o efeito das diferentes cultivares de soja no desenvolvimento das ninfas, na fecundidade das fêmeas, na fertilidade dos ovos e na sobrevivência dos adultos de *E. heros* e (iii) investigar a influência da herbivoria causada por fêmeas de *E. heros* na produção dos isoflavonóides nas cultivares de soja resistentes e suscetível.

As hipóteses testadas foram: (i) as cultivares de soja Dowling, IAC100 e Silvânia, influenciam a escolha do sítio de oviposição pelas fêmeas de *E. heros*; (ii) o desenvolvimento dos percevejos é influenciado pelo tipo de alimento em que ele é criado e (iii) a produção dos isoflavonóides é induzida após o ataque do percevejo e esta produção ocorre de maneira diferenciada entre as cultivares testadas. Os resultados esperados são que as fêmeas de *E. heros* preferirão ovipositar na cultivar Silvânia; os insetos criados nas cultivares Dowling e IAC100, terão os ciclos de vida mais prolongados do que aqueles criados na cultivar Silvânia e, ainda, que a herbivoria induzirá uma maior produção dos isoflavonóides nas vagens da cultivar Dowling.

## Material e Métodos

As criações dos insetos e os experimentos foram conduzidos nos laboratórios de Bioecologia e Semioquímicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF, Brasil (15°47' S, 47°55' W), sob temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $65 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 14L:10E. As sementes e as vagens das cultivares (cv) Dowling e IAC100 (consideradas como resistentes), e Silvânia (suscetível), utilizadas nos experimentos foram obtidas da Embrapa Cerrados, Brasília, DF.

### *Criação dos Insetos*

As colônias do percevejo *E. heros* (Fig. 1A) foram estabelecidas a partir de insetos coletados em campos de soja, próximos ao Cenargen, Brasília, DF. Os insetos foram mantidos em sala de criação, em gaiolas plásticas de 8 l (22 cm diâmetro x 26 cm de altura) (Fig. 1B) forradas com papel e alimentados com sementes de amendoim [*Arachis hypogaea* L., 1758 (Fabales: Fabaceae)], soja Conquista [*Glycine max* (L.) Merrill, 1917 (Fabales: Fabaceae)], girassol [*Helianthus annuus* L., 1758 (Asterales: Asteraceae)] e vagens de feijão [*Phaseolus vulgaris* L., 1758 (Fabales: Fabaceae)]. Um pote plástico (7 cm de diâmetro x 5 cm de altura), contendo água, com uma tampa contendo um furo no meio e um chumaço de algodão, foi colocado dentro das gaiolas para suprimento de dieta líquida e para a manutenção da umidade do meio. As gaiolas, a água e o alimento foram trocados duas vezes por semana.



Fig. 1A) Percevejo marrom *Euschistus heros* (Pentatomidae), considerado praga da soja e modelo utilizado nos experimentos B) Sistema de criação do *Euschistus heros* mantido no Laboratório de Semioquímicos – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF.

Uma tela plástica de 15 cm<sup>2</sup> foi colocada dentro das gaiolas para servir como substrato para oviposição e como abrigo para os percevejos. Os ovos foram coletados e armazenados em placas de Petri plásticas (9 cm de diâmetro x 2 cm de altura) forradas com papel, contendo a mesma dieta dos adultos e mantidas na sala de criação nas mesmas condições de temperatura, umidade relativa e fotoperíodo que os adultos. Quando as ninfas (Fig. 2) atingiram o terceiro ínstar, foram transferidas para gaiolas plásticas e criadas como descrito anteriormente.

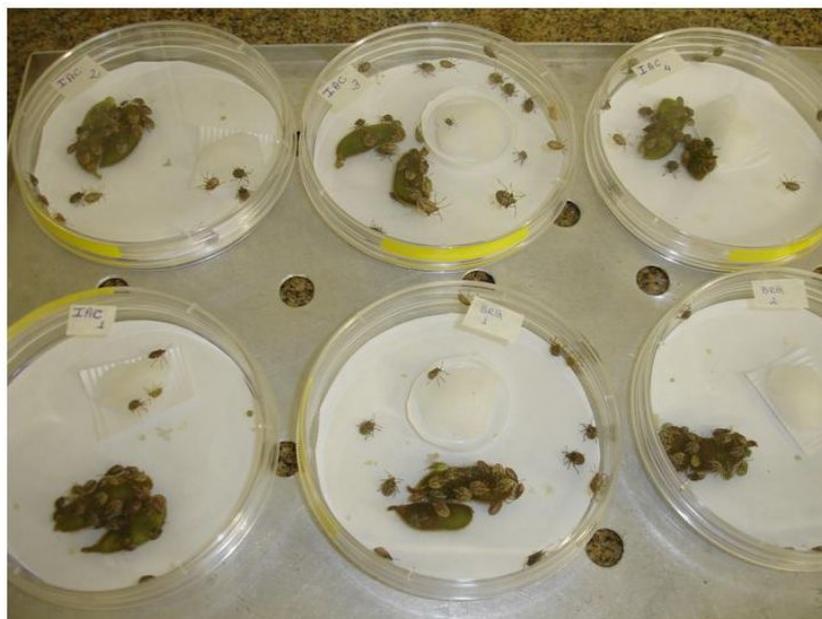


Fig. 2. Placas de Petri plásticas (9 cm de diâmetro x 2 cm de altura), com ninfas de terceiro instar, utilizadas nos experimentos da biologia do *Euschistus heros* criadas em diferentes cultivares de soja.

Os parasitóides de ovos, *Telenomus podisi* Ashmead, 1881 (Hymenoptera: Scelionidae) (Fig. 3A), foram mantidos dentro de caixas de acrílico (frasco com 25 cm<sup>2</sup> e pescoço afunilado; ICN Biomedicals, Irvine, CA), em ovos de *E. heros* e alimentados com gotas de mel. Diariamente, após a emergência, os machos e as fêmeas foram separados e colocados em novas caixas de acrílico. Parte dos adultos foi colocada com ovos do percevejo por 24 hr para o acasalamento e para que as fêmeas parasitassem os ovos, que foram posteriormente removidos e colocados em outras caixas para incubação e manutenção da colônia (Fig. 3B). A outra parte foi mantida sem ovos para que as fêmeas de 48 hr, utilizadas nos bioensaios, não tivessem experiência de oviposição. Os percevejos e os parasitóides foram mantidos em salas separadas.

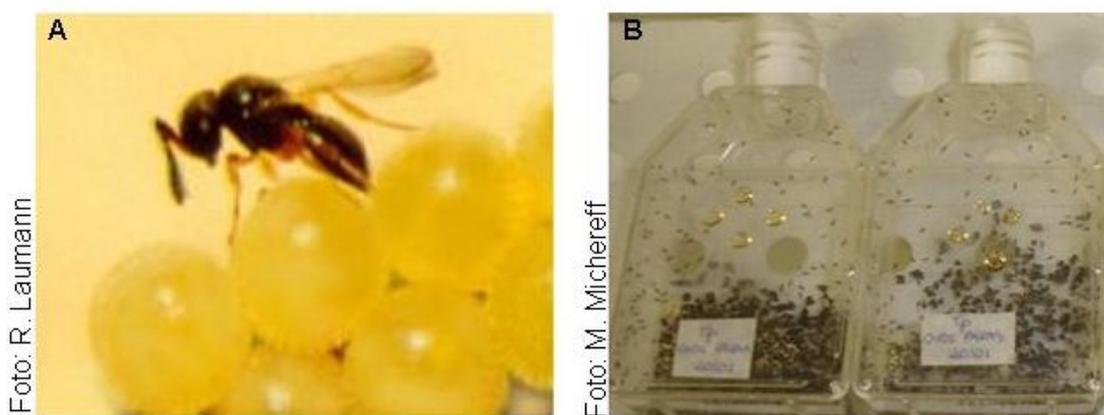


Fig. 3A) Parasitóide de ovos de Pentatomidae, *Telenomus podisi* Ashmead, 1881 (Hymenoptera: Scelionidae), utilizado nos experimentos B) Sistema de criação do parasitóide de ovos *Telenomus podisi* mantido no Laboratório de Semioquímicos – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF.

#### *Preferência para oviposição*

Os experimentos foram conduzidos no período de março a setembro de 2009. Todas as plantas usadas no experimento estavam no estágio vegetativo três (V3) (Fehr et al. 1971). Para obtenção das plantas, as sementes de soja foram colocadas em papel de germinação molhado, envolto por saco plástico de polietileno microperfurado e, aproximadamente, três dias após a germinação, foram transplantadas para vasos (8 cm de diâmetro x 9 cm de altura), contendo uma mistura de solo mais substrato orgânico (na proporção de 1:1 m/m). Estes foram mantidos em sala para crescimento de plantas, sob condições controladas.

Nos testes com e sem chance de escolha para a oviposição de *E. heros* foram utilizadas arenas formadas por uma base de madeira (40 cm de diâmetro) com seis sulcos (7 cm de diâmetro), onde os vasos das plantas, envoltos em pedaços de papel alumínio foram encaixados. Após a montagem das plantas na arena, as fêmeas acasaladas com 20 dias após a passagem para a fase adulta, foram colocadas no centro da mesma, dando início ao experimento. Para a cobertura das plantas e aprisionamento das fêmeas, utilizou-se um cesto de plástico (38 cm de diâmetro x 90 cm de altura)

forrado com plástico transparente furado com agulha número dois para a ventilação do sistema (Fig. 4). Cada conjunto de fêmeas (12 para o teste com escolha) e (oito para o teste sem escolha) foi usado uma única vez, sendo posteriormente devolvido para as gaiolas de criação. O número de posturas por planta e o número de ovos por postura foram avaliados 24 hr após a liberação das fêmeas.



Fig. 4. Arenas, formadas por uma base de madeira (40 cm de diâmetro), utilizadas para os testes de preferência de oviposição de *Euschistus heros* entre diferentes cultivares de soja, no Laboratório de Semioquímicos – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF.

No teste com escolha, duas plantas de cada cultivar (Dowling, IAC100 e Silvânia) foram colocadas na arena, onde cada arena foi considerada como uma repetição, totalizando 18 repetições. No teste sem escolha, quatro plantas da mesma

cultivar foram avaliadas ao mesmo tempo, onde cada arena foi considerada uma repetição, no total também de 18 repetições.

#### *Biologia do E. heros em cultivares de soja*

O experimento foi conduzido no período de fevereiro a julho de 2009. Os ovos dos percevejos foram obtidos da criação mantida no laboratório de Bioecologia e Semioquímicos do Cenargen. As vagens das três cultivares (Dowling, IAC100 e Silvânia) utilizadas como fonte de alimento para os percevejos, foram colhidas das plantas no estágio R6, quando estavam completamente cheias, mas não maduras e armazenadas em freezer na temperatura de  $-4^{\circ}\text{C}$  dentro de sacos plásticos tipo “zip lock”. Essas foram retiradas do freezer quatro horas antes de serem oferecidas aos insetos e mantidas, durante esse período, em papel de filtro à temperatura ambiente.

Ninfas de segundo ínstar foram transferidas para potes plásticos (9 cm de diâmetro x 15 cm de altura) contendo duas vagens da cultivar utilizada no experimento e um chumaço de algodão umedecido com água. Foram utilizados seis potes por tratamento, cada um com 40 ninfas. A duração de cada ínstar ninfal foi registrada quando pelo menos 50% dos indivíduos passaram para o próximo estágio.

Os adultos foram sexados com base na morfologia externa da genitália (Borges et al., 2006). Após 24 hr da ecdise e do endurecimento cuticular, estes foram pesados utilizando uma balança analítica (AT 200 Mettler). Um macho e uma fêmea foram colocados dentro de um pote plástico contendo uma tela plástica de  $5\text{ cm}^2$  para sítio de oviposição e alimentados com as vagens das respectivas cultivares. Os ovos foram recolhidos diariamente e colados em pedaços de cartolina ( $1\text{ cm}^2$ ) com goma arábica com o auxílio de um microscópio estereoscópio (Stemi SV6 Zeiss), tomando-se o cuidado de fixar a base inferior do ovo com resquícios da cola do ovipositor na cartolina. Os ovos colados nas cartolinas foram mantidos em placas de Petri até o momento da eclosão.

Foram feitas avaliações diárias para a determinação da sobrevivência de ninfas e adultos, da longevidade dos adultos, do período de pré-oviposição, do número de ovos e do número de ovos por fêmea (fecundidade), da viabilidade dos ovos (fertilidade) e do número de ninfas/fêmea.

### *Extração dos isoflavonóides de cultivares de soja resistente e suscetível*

Os experimentos foram conduzidos no período de outubro a janeiro de 2010. Vagens no estágio reprodutivo R6 das cultivares de soja Dowling e Silvânia foram colocadas separadamente em potes plásticos (7,5 cm de diâmetro x 5 cm de altura). Para a obtenção da injúria de herbivoria, foram colocadas três fêmeas de *E. heros*, acasaladas e em jejum de 24 hr, em um pote contendo duas vagens. As vagens do controle foram colocadas em potes semelhantes, sendo estes mantidos em sala separada do tratamento. Após 24, 48 e 72 hr de dano, as vagens de cada cultivar foram removidas e imediatamente submetidas à extração com solvente orgânico para isolamento dos isoflavonóides. As sementes foram removidas das vagens e maceradas utilizando nitrogênio líquido, almofariz e pistilo de porcelana até a obtenção de uma farinha fina. Desse material foram pesados 2 g, colocados em um balão volumétrico, adicionados 2 ml de HCl 0,1N e 10 ml de metanol. Os frascos contendo as amostras foram mantidos por 2 hr no agitador de bancada à temperatura ambiente e depois sonicadas durante 10 min. Em seguida, as soluções foram filtradas utilizando-se cones de papel de filtro (80 g/m<sup>2</sup> de granatura, 205 µm de espessura, 14 µm valor médio dos poros Qualy J Pro Lab) e pré-concentradas usando um “speed-vac” durante 24 hr. O material residual obtido foi armazenado a -80<sup>0</sup>C para análise posterior por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Para as análises por CLAE o material foi re-suspendido em 5 ml de metanol 80% e centrifugado por 10 min a 14.000 rpm. Em seguida as soluções foram filtradas utilizando-se filtro de seringa com membrana PTFE hidrofílico (25 mm diâmetro x 0,45 µm poro Millipore Millex), transferidas para frascos de vidro de 4 ml. Uma alíquota de 10 µl foi injetada e analisada por CLAE (Shimadzu, modelo SPD-M10A VP) usando uma coluna C18 fase reversa (CLS-ODS-C18-M, 4.6 mm diâmetro x 250 mm de comprimento). As análises foram conduzidas usando um gradiente composto por dois solventes: (A) uma solução composta por MeOH:H<sub>2</sub>O:HOAc (18:1:1) e (B) 2% de ácido acético (HOAc) em H<sub>2</sub>O. O gradiente inicial foi de 75% do solvente B e 25% do A, alterado para 25% do solvente B e 75% do A em 40 min, retornando para a condição inicial em 45 min. Esta condição foi mantida por 5 min para a limpeza da coluna. O fluxo do solvente foi de 1 ml/min, a temperatura durante a corrida foi de 24<sup>0</sup>C e o tempo total da corrida foi de 50 min. Para a análise, foram utilizadas três amostras (repetições) para cada tratamento. Todos os solventes utilizados foram de grau CLAE (Anexo 1).

Para a detecção dos isoflavonóides, foi utilizado um detector espectrofotométrico com lâmpada de tungstênio com arranjo de fotodiodo (Waters, modelo 996), ajustado para maior sensibilidade no comprimento de onda de 260 nm. Para a quantificação foram utilizadas curvas de padrão externo. As curvas foram construídas usando padrões de daidzina, acetil-daidzina, malonil-daidzina, daidzeína, genistina, malonil-genistina, derivado-genistina, genisteína, derivado-genisteína, glicitina, acetil-glicitina, malonil-glicitina e gliciteína. A área correspondente de cada composto foi calculada e aplicada à equação da curva de calibração dos padrões para estimar a concentração do composto na amostra (Anexo 1).

#### *Análises estatísticas*

Análise de variância (Anova) e comparação das médias pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade, foram feitas para avaliar os dados referentes ao número de posturas e de ovos no experimento de preferência de oviposição, para comparar a mortalidade total de ninfas e adultos dentro de cada estágio/fase de desenvolvimento entre cultivares. Para a avaliação da sobrevivência foi utilizado o método de Kaplan-Meier que estima o tempo mediano de sobrevivência (TMS) e compara as curvas de sobrevivência pelo teste de Log-Rank.

As concentrações de isoflavonóides totais e de cada composto individualizado extraídos das vagens das cultivares Dowling e Silvânia foram submetidas à Anova, em arranjo fatorial 2x2x3 (2 cultivares x 2 tratamentos de dano x 3 horários de avaliação) e delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Quando os efeitos significativos para os fatores individuais e suas interações foram detectados, procedeu-se a comparação das médias pelo teste de Tukey, à significância de 5%.

Os dados foram submetidos aos testes de normalidade (Lilliefors) e homogeneidade de variância (Bartlett), após os quais foram transformados em  $\log(x+1)$  ou  $\text{raiz}(x+1)$  para atender os pré-requisitos da Anova. Todas as análises foram realizadas no programa estatístico SAS 9.0 (SAS Institute, 2001). Neste trabalho foram mostrados apenas os resultados dos compostos que apresentaram alguma diferença significativa em razão dos fatores em estudo.

## Resultados

### Preferência para oviposição

Quando as fêmeas de *E. heros* foram testadas no tratamento com chance de escolha, elas utilizaram igualmente as cultivares de soja para a oviposição. O número de posturas ( $F=0.23$ ,  $P=0.794$ ) e de ovos por planta ( $F=0.06$ ,  $P=0.940$ ) não variou significativamente entre as cultivares.

No teste sem chance de escolha, também não houve diferença significativa entre as cultivares de soja quanto ao número de posturas encontradas ( $F=2.13$ ,  $P=0.129$ ). Entretanto, houve diferença no número de ovos por planta entre as cultivares ( $F=5.76$ ,  $P=0.006$ ). O número médio de ovos foi significativamente maior na cv Silvânia enquanto as cultivares IAC100 e Dowling, não diferiram entre si (Fig. 5).

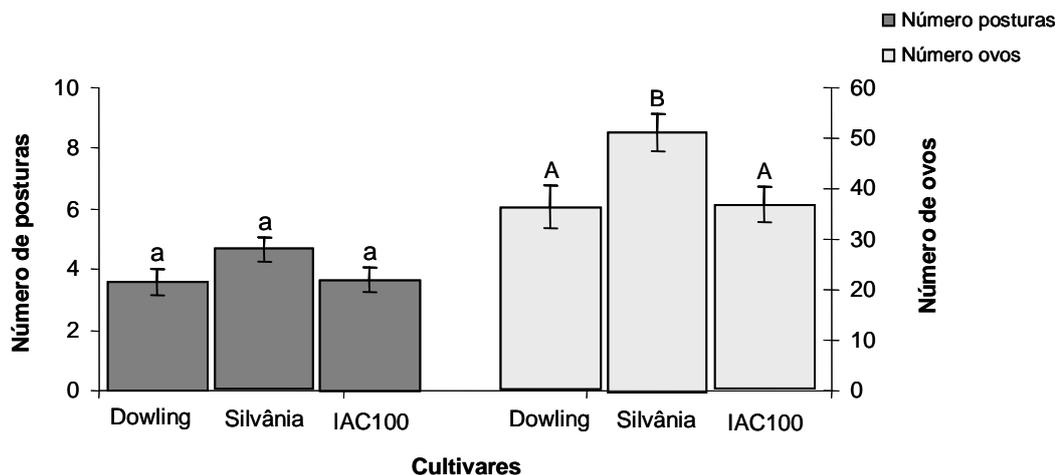


Fig. 5. Número de posturas e de ovos (média  $\pm$  EPM) de *Euschistus heros* em folhas das cultivares de soja, Dowling, IAC100 e Silvânia, no teste sem chance de escolha, em gaiolas cobertas. Os dados foram transformados em  $\log(x+1)$  para as análises. Barras da variável seguidas pela mesma letra não diferiram significativamente entre si, pelo teste Tukey ( $P>0.05$ ).

### Biologia do *E. heros* em cultivares de soja

O desenvolvimento de *E. heros* foi afetado pelas características morfológicas e/ou químicas das cultivares de soja (Tabela 1). Constatou-se diferenças significativas

na duração do segundo ao quinto ínstar ninfal (2<sup>o</sup> ínstar:  $F=14.65$ ,  $P<0.001$ ; 3<sup>o</sup> ínstar:  $F=18.36$ ,  $P<0.001$ ; 4<sup>o</sup> ínstar:  $F=5.30$ ,  $P=0.006$ ; 5<sup>o</sup> ínstar:  $F=478.72$ ,  $P<0.001$ ), da fase ninfal completa ( $F=478.72$ ,  $P<0.001$ ) e do período total de ovo a adulto ( $F=16.14$ ,  $P<0.001$ ), quando o desenvolvimento das ninfas nas diferentes cultivares foi comparado. A duração da maioria dos estádios ninfais foi significativamente maior quando os percevejos foram alimentados com as cultivares Dowling IAC100, do que com a cultivar Silvânia (Tabela 1). Embora a duração do segundo ao quarto ínstar de *E. heros* na cv Dowling tenha sido maior, quando comparada com a cv Silvânia (Tabela 1), a estimativa da duração da fase ninfal não ultrapassou 23 dias em razão da morte de todas as ninfas quando da passagem para o quinto ínstar.

Tabela 1. Valores médios ( $\pm$  EPM) da duração do período ninfal, do segundo ao quinto ínstar e do desenvolvimento de ovo a adulto, de *Euschistus heros* alimentado com vagens das cultivares de soja Dowling, IAC100 e Silvânia ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , UR  $65 \pm 10\%$  e fotofase de 14 hr), no Laboratório de Semioquímicos – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF.

Duração (dias) <sup>1</sup>	Cultivares		
	Dowling	Silvânia	IAC100
2 <sup>o</sup> ínstar	5.0 $\pm$ 0.1 a	4.4 $\pm$ 0.1 b	5.0 $\pm$ 0.1 a
3 <sup>o</sup> ínstar	6.0 $\pm$ 0.1 a	4.3 $\pm$ 0.1 b	5.7 $\pm$ 0.1 a
4 <sup>o</sup> ínstar	5.3 $\pm$ 0.1 a	4.5 $\pm$ 0.3 b	5.6 $\pm$ 0.1 a
5 <sup>o</sup> ínstar	- <sup>2</sup>	5.6 $\pm$ 0.5 b	7.2 $\pm$ 0.2 a
Fase ninfal	-	23.9 $\pm$ 0.7b	26.8 $\pm$ 0.2a
Ovo-adulto	-	28.2 $\pm$ 0.3 b	32.0 $\pm$ 0.2 a

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem entre si, respectivamente, pelo teste F e pelo teste de Tukey, a 5 % de significância. Os dados foram transformados em  $\log(x+1)$  para as análises. <sup>2</sup>Traços representam ausência de dados para a cv Dowling.

Houve diferença significativa entre os pesos de fêmeas ( $F=19.78$ ,  $P<0.001$ ) e de machos ( $F=6.13$ ,  $P=0.013$ ) criados nas cultivares IAC100 e Silvânia. Os pesos dos

adultos alimentados na cv IAC100 foram estatisticamente menores em relação aos pesos dos adultos na cv Silvânia (Tabela 2). Os adultos cujas ninfas se alimentaram na cv IAC100 viveram por menos tempo, diferindo estatisticamente da longevidade dos adultos criados na cv Silvânia (fêmeas:  $F=85.99$ ,  $P<0.001$ ; machos:  $F=27.26$ ,  $P<0.001$ ) (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios ( $\pm$  EPM) da longevidade (dias) e do peso (mg) de fêmeas e de machos de *Euschistus heros*, provenientes das ninfas alimentadas com vagens das cultivares de soja IAC100 e Silvânia ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , UR  $65 \pm 10\%$  e fotofase de 14 hr).

Características <sup>1</sup>	Cultivares		
	Dowling	Silvânia	IAC100
Longevidade da fêmea (dias)	-	40.6 $\pm$ 2.6 a	10.0 $\pm$ 1.1 b
Peso da fêmea (mg)	-	52.9 $\pm$ 0.7 a	47.3 $\pm$ 0.9 b
Longevidade do macho (dias)	-	35.8 $\pm$ 3.5 a	8.6 $\pm$ 1.0 b
Peso do macho (mg)	-	49.5 $\pm$ 0.8 a	45.2 $\pm$ 0.8 b

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste F a 5 % de significância. Os dados foram transformados em  $\log(x+1)$  para as análises.

A utilização de diferentes cultivares como alimentos para as ninfas do *E. heros* não afetou os períodos de pré-oviposição ( $F=2.78$ ,  $P=0.112$ ), a incubação dos ovos ( $F=2.84$ ,  $P=0.106$ ) e nem a viabilidade dos mesmos ( $F=1.55$ ,  $P=0.221$ ) (Tabela 3). Contudo, observou-se diferença significativa no período de oviposição ( $F=26.40$ ,  $P<0.001$ ), no número de ovos por fêmea ( $F=12.06$ ,  $P<0.002$ ) e de ninfas por fêmea ( $F=8.72$ ,  $P=0.006$ ). Todas estas características foram menores para as fêmeas alimentadas com a cv IAC100, do que aquelas criadas na cv Silvânia. Também, o número de fêmeas que ovipositaram foi diferente entre as cultivares IAC100 e Silvânia ( $\chi^2=15.54$ ,  $P<0.001$ ) (Tabela 3).

Tabela 3. Características biológicas (média  $\pm$  EPM) das fêmeas de *Euschistus heros* provenientes das ninfas alimentadas com vagens das cultivares de soja, IAC100 e Silvânia ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , UR:  $65 \pm 10\%$  e fotofase de 14 hr).

Características <sup>1</sup>	Cultivares		
	Dowling	Silvânia	IAC100
Período de pré-oviposição (dias)	- <sup>2</sup>	13.7 $\pm$ 1.5 a	9.4 $\pm$ 1.4 a
Período de oviposição (dias)	-	25.6 $\pm$ 3.3 a	1.2 $\pm$ 0.4 b
Incubação dos ovos (dias)	-	5.0 $\pm$ 0.1 a	5.0 $\pm$ 0.2 a
Fêmeas que ovipositaram (%) <sup>3</sup>	-	50.0 a	10.6 b
Ovos por fêmea	-	105.8 $\pm$ 15.8 a	10.2 $\pm$ 3.3 b
Viabilidade dos ovos (%)	-	57.5 $\pm$ 5.7 a	44.7 $\pm$ 23.1 a
Ninfas por fêmea	-	66.3 $\pm$ 11.1 a	5.8 $\pm$ 2.4 b

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste F, a 5 % de significância. Dados de duração dos períodos e de percentagem foram transformados, respectivamente, em  $\log(x+1)$  e  $\text{raiz}(x+1)$  para as análises.

<sup>2</sup>Traços representam ausência de dados para a cv Dowling.

<sup>3</sup>Percentagens seguidas pela mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste  $\chi^2$  aplicado a proporções, a 5 % de significância.

A mortalidade durante a fase ninfal a partir do quarto ínstar foi diferente entre as cultivares ( $F=49.17$ ,  $P<0.001$ ; Tabela 4). Houve maior taxa de mortalidade de *E. heros* na cv Dowling (80,4%) em relação às cultivares Silvânia (13,0%) e IAC100 (7,9%), que não diferiram estatisticamente entre si. A mortalidade no quinto ínstar também diferiu entre as cultivares ( $F=287.36$ ,  $P<0.001$ ). Todas as ninfas alimentadas com vagens da cv Dowling morreram e apenas 29,5% daquelas mantidas na cv IAC100 passaram para a fase adulta, enquanto a sobrevivência na cv Silvânia (suscetível) foi superior a 82%. De forma similar, a mortalidade de *E. heros* na fase adulta foi contrastante entre as cultivares ( $F=163.74$ ,  $P<0.001$ ); aos 10 dias da emergência dos adultos (Tabela 4), todos os insetos alimentados com vagens da cv IAC100 estavam mortos, enquanto aqueles criados na cv Silvânia apenas 3.9% morreram neste período.

Tabela 4. Mortalidade dos diferentes ínstar de *Euschistus heros* alimentados com vagens das cultivares de soja, Dowling, IAC100 e Silvânia ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , UR:  $65 \pm 10\%$  e fotofase de 14 hr).

Mortalidade (%)	Cultivares		
	Dowling	Silvânia	IAC100
Fase ninfal			
2 <sup>o</sup> ínstar	33.0±2.1 a	29.5±2.1 a	34.8±1.8 a
3 <sup>o</sup> ínstar	7.2±2.2 a	2.0±1.8 a	3.0±1.3 a
4 <sup>o</sup> ínstar	80.4±5.5 a	13.0±3.2 b	7.9±2.4 b
5 <sup>o</sup> ínstar	100±0.0 a	17.0±5.9 c	70.5±2.6 b
Fase adulta (10 dias após emerg.)	-	3.9±3.8 b	100.0±0.0 a

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de significância. Os dados foram transformados em  $\text{raiz}(x+1)$  para as análises.

O tempo mediano de sobrevivência (TMS) corresponde ao momento em que 50% da população estaria morta. Os valores de TMS estimados pela análise de sobrevivência de Kaplan-Meier foram de 15, 19 e 23 dias, respectivamente, para as cultivares Dowling, IAC100 e Silvânia (Tabela 5). Pela sobreposição dos intervalos de confiança deste parâmetro, a cv Dowling diferiu das demais cultivares e mostrou-se menos favorável ao percevejo. Entretanto, considerando o período completo do experimento (32 dias), todas as três cultivares de soja diferiram entre si em relação às curvas de sobrevivência de *E. heros*, pelo teste Log-Rank ( $\chi^2=255.66$ ,  $P<0.001$ ) (Figura 6; Tabela 5).

Na comparação das curvas, constatou-se que o percevejo sobreviveu significativamente mais tempo na cv Silvânia em relação às cultivares Dowling e IAC100 (teste de Log-rank,  $P<0.01$ ). Diferenças marcantes entre as curvas de sobrevivência somente foram verificadas após 15 dias do início do experimento, com rápido declínio na sobrevivência dos insetos alimentados com vagens da cv Dowling que culminou com a morte de todos os indivíduos no 19<sup>o</sup> dia. Neste período as cultivares Silvânia e IAC100 geraram curvas de sobrevivência estatisticamente similares (teste de Log-rank,  $P=0.06$ ). A distinção entre essas duas cultivares ocorreu

somente a partir do 23<sup>o</sup> dia, sobretudo, em razão da maior sobrevivência dos adultos na cv Silvânia.

Tabela 5. Sobrevivência (média e mediana), em dias, de *Euschistus heros* ao longo de 32 dias de vida nas cultivares de soja Dowling, IAC100 e Silvânia. Valores de *P* foram associados à comparação das curvas de sobrevivência pelo teste Log-Rank.

Cultivar	Insetos	Tempo de sobrevivência (dias)		Teste Log-Rank <sup>3</sup>		
		Média (± DP) <sup>1</sup>	Mediana (TMS) <sup>2</sup>	Silvânia	IAC100	Dowling
Silvânia	300	20.6 ± 0.6	19 (19-25)	-	0.0001	0.0001
IAC100	300	18.8 ± 0.5	23 (22-24)	-	-	0.0001
Dowling	300	13.4 ± 0.3	15 (15-17)	-	-	-

<sup>1</sup>Desvio padrão.

<sup>2</sup>Tempo mediano de sobrevivência e intervalos de confiança ( $\alpha=0,05$ ), estimados pelo método de Kaplan-Meier.

<sup>3</sup>Valores de *P* associados à comparação pareada das curvas de sobrevivência de *E. heros* entre cultivares de soja, pelo  $\chi^2$  do teste de Log-Rank.

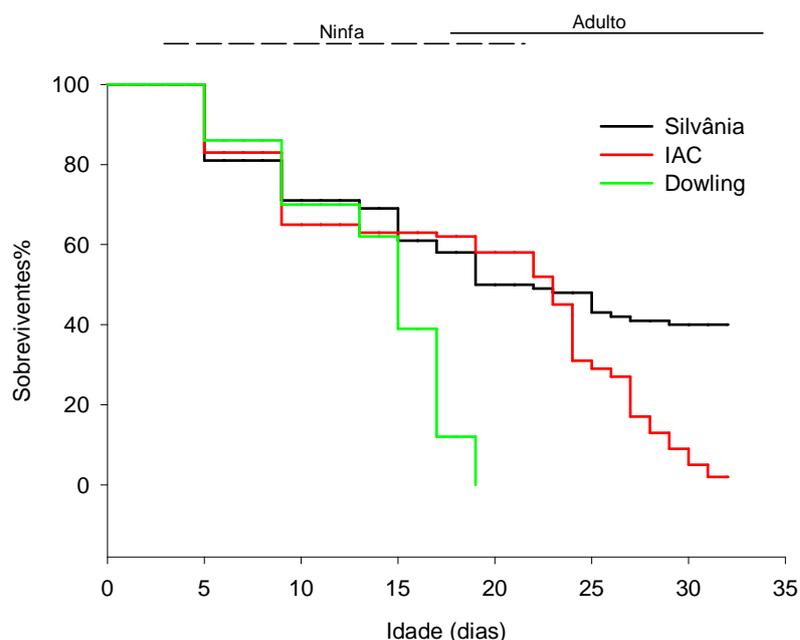


Fig. 6. Curvas de sobrevivência de *Euschistus heros* (ninfas+adultos) ao longo de 32 dias de alimentação com vagens das cultivares de soja Dowling, IAC100 e Silvânia.

#### *Extração dos isoflavonóides de cultivares de soja resistente e suscetível*

Os resultados da extração realizada com as vagens das cultivares de soja mostraram que houve maior produção dos isoflavonóides totais (Fig. 7) na cv Silvânia do que na Dowling ( $F=67.76$ ,  $P<0.001$ ). Estas diferenças foram observadas nas avaliações de 48 hr e 72 hr (interação cultivar x tempo;  $F=4.71$ ,  $P=0.019$ ). Por outro lado, a ocorrência ou não de herbivoria não afetou o padrão de produção dos isoflavonóides nas cultivares (interação cultivar x dano;  $F=0.09$ ,  $P=0.772$ ) e nem no período da avaliação (interação cultivar x tempo;  $F=1.44$ ,  $P=0.256$ ).

Na mistura dos isoflavonóides foram identificados 13 compostos, que incluíram: daidzina, acetil-daidzina, malonil-daidzina, daidzeína, genistina, malonil-genistina, derivado-genistina, genisteína, derivado-genisteína, glicitina, acetil-glicitina, malonil-glicitina e gliciteína (Fig. 8). Todos os isoflavonóides ocorreram em ambas as cultivares, com exceção de dois compostos, deriv-genistina e deriv-genisteína, que foram detectados somente em vagens da cv Silvânia. Na análise individual os compostos daidzina, daidzeína, genistina, genisteína, glicitina e gliciteína apresentaram diferenças na concentração entre as cultivares de soja (Fig. 8, Tabela 6). Houve maior concentração destes isoflavonóides na cv Silvânia (Tabela 6) do que na cv Dowling.

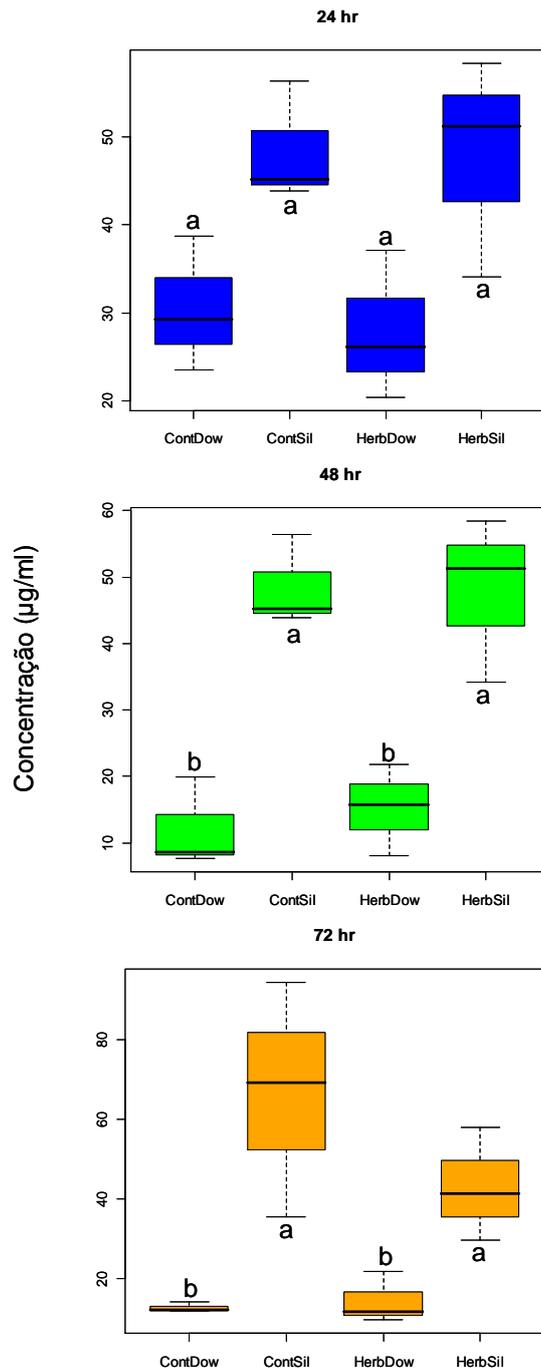


Fig. 7. Isoflavonóides totais (média  $\pm$  EPM) extraídos de vagens de soja não atacadas (controle) e atacadas por *Euschistus heros* (herbivoria) das cultivares Dowling e Silvânia. Os dados foram transformados em  $\log(x+1)$  para as análises. Caixas seguidas pela mesma letra, dentro de cada cultivar e entre as cultivares, não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P>0.05$ ). CtDow: controle da cultivar Dowling, HbDow: cultivar Dowling submetida à herbivoria, CtSil: controle da cultivar Silvânia, HbSil: cultivar Silvânia submetida à herbivoria.

Tabela 6. Análise de variância em esquema fatorial, da concentração ( $\mu\text{g/ml}$ ) de isoflavonóides, ao longo do tempo, nas cultivares de soja, Dowling e Silvânia, sadia e com dano de herbivoria causado por *Euschistus heros*.

Variação	GL	Valor de F					
		Daidzina	Daidzeína	Genistina	Genisteína	Glicitina	Gliciteína
Cultivar (C)	1,24	24.31**	11.76**	56.39**	23.47**	34.89**	227.47**
Dano (D)	1,24	0.78 <sup>ns</sup>	6.06*	0.98 <sup>ns</sup>	5.26*	0.29 <sup>ns</sup>	1.40 <sup>ns</sup>
Tempo (T)	2,4	11.69**	26.95**	4.87*	10.07**	3.31*	0.28 <sup>ns</sup>
C x D	1,24	0.00 <sup>ns</sup>	8.06*	0.00 <sup>ns</sup>	8.55*	0.26 <sup>ns</sup>	1.57 <sup>ns</sup>
C x T	2,24	7.02**	5.39*	6.27*	13.00**	6.88**	0.93 <sup>ns</sup>
D x T	2,24	1.13 <sup>ns</sup>	3.67*	0.36 <sup>ns</sup>	5.66**	0.60 <sup>ns</sup>	0.79 <sup>ns</sup>
C x D x T	2,24	2.39 <sup>ns</sup>	8.31*	0.02 <sup>ns</sup>	9.27**	0.53 <sup>ns</sup>	2.91 <sup>ns</sup>

<sup>ns</sup> Não significativo; \*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.05$ . Os dados foram transformados em  $\log(x+1)$  para as análises.

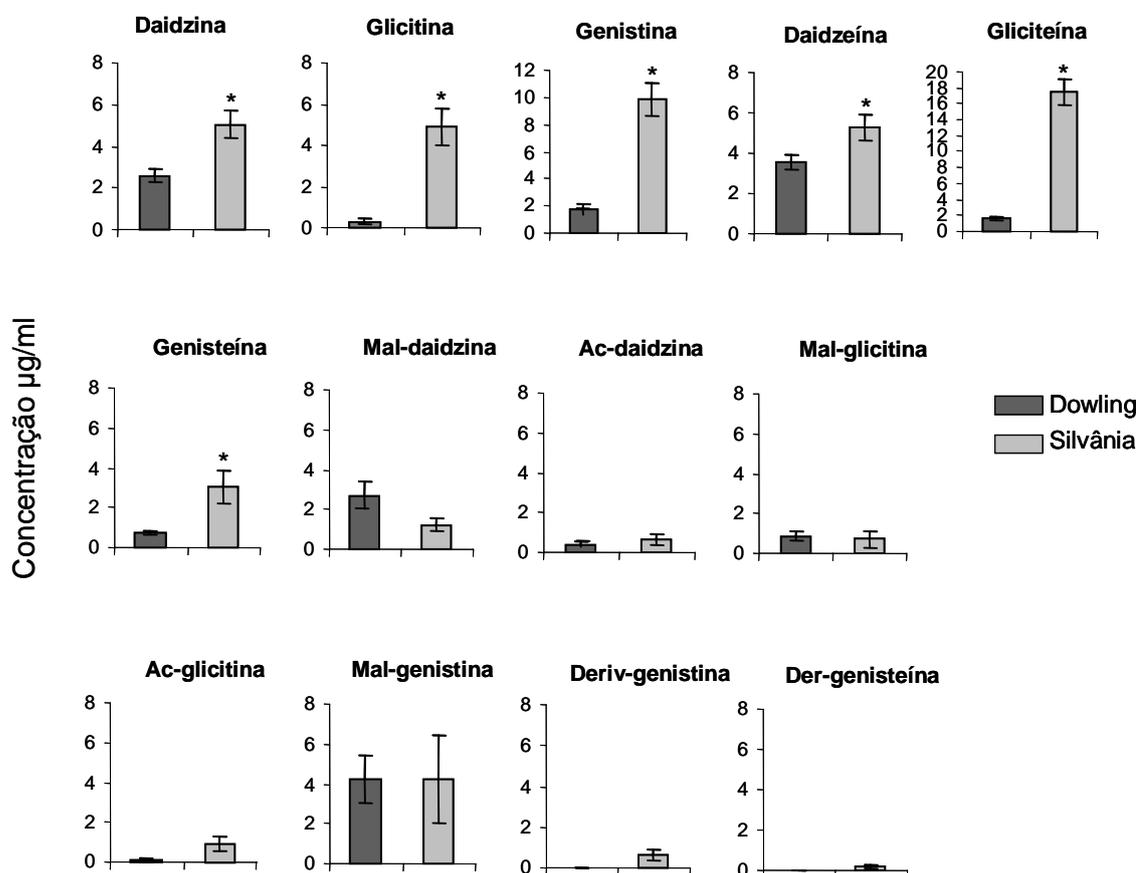


Fig. 8. Compostos isoflavonóides (média  $\pm$  EPM) extraídos das vagens não atacadas (controle) e atacadas pelo *Euschistus heros* (herbivoria) das cultivares Dowling e Silvânia. Os dados foram transformados em  $\log(x+1)$  para as análises. Asterisco indica diferença significativa na concentração de cada composto entre cultivares de soja, pelo teste F ( $P \leq 0.05$ ).

Houve diferença na concentração de gliciteína entre cultivares, mas que foram constantes ao longo do tempo (Figs. 9, 10 e 11). As diferenças detectadas na concentração (efeito de herbivoria) dos isoflavonóides entre vagens atacadas pelo percevejo e aquelas não atacadas (controle) foram apenas para os compostos daidzeína e genisteína (Tabela 6). Para estes compostos também houve interações significativas nas respostas específicas da cv Silvânia induzidas pelo ataque de *E. heros* (Figs. 10 e 11). Por outro lado, não houve mudanças na concentração de isoflavonóides como resposta à herbivoria na cv Dowling. O efeito do tempo e sua interação com os demais fatores em estudo também foram observados para a maioria dos isoflavonóides (Tabela 6).

O desdobramento das interações pode ser observado nas figuras 9, 10 e 11. Maiores concentrações dos compostos daidzina e glicitina na cv Silvânia ocorreram somente após 24 hr (interação cultivar x tempo) e sem nenhuma distinção entre plantas atacadas e não atacadas por *E. heros*. No caso de genistina também não houve resposta após a herbivoria e as diferenças entre as cultivares (maior concentração em Silvânia) foram observadas apenas nas avaliações de 48 hr e 72 hr.

Dinâmicas mais complexas (interação cultivar x dano x tempo) estiveram associadas aos compostos daidzeína e genisteína. Na avaliação de 48 hr a concentração de daidzeína foi significativamente maior em vagens de Silvânia que foram atacadas por *E. heros*, enquanto a concentração nas vagens sadias desta cultivar não diferiu daquelas da cv Dowling, tanto nas vagens sadias quanto nas atacadas (Fig. 10). Por outro lado, a avaliação de 72 hr, mostrou que maiores concentrações deste isoflavonóide foram encontradas em vagens não atacadas (controle) de ambas as cultivares, sem diferença entre si (Fig. 11). Na avaliação de 48 hr o composto genisteína mostrou maior concentração em vagens de Silvânia com herbivoria, enquanto na avaliação 72 hr houve declínio deste isoflavonóide nas vagens atacadas pelo percevejo e aumento naquelas não atacadas.

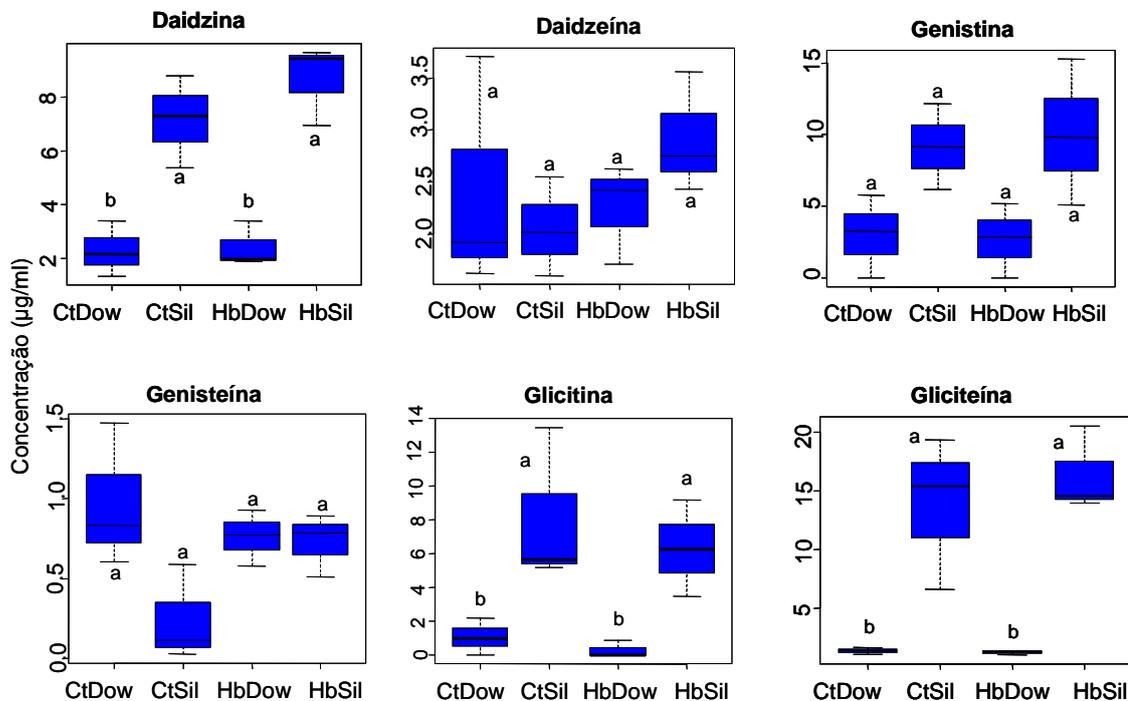


Fig. 9. Concentração dos principais compostos isoflavonóides (µg/ml) (média ± EPM) extraídos de vagens de soja não atacadas (controle) e submetidas ao tratamento de herbivoria pelo *Euschistus heros* por 24 hr, no Laboratório de Semioquímicos – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF. Tratamentos: CtDow: controle da cultivar Dowling, HbDow: cultivar Dowling submetida à herbivoria, CtSil: controle da cultivar Silvânia, HbSil: cultivar Silvânia submetida à herbivoria. Os dados foram transformados em  $\log(x+1)$  para as análises. Caixas seguidas pela mesma letra, dentro de cada cultivar e entre as cultivares, não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P>0.05$ ).

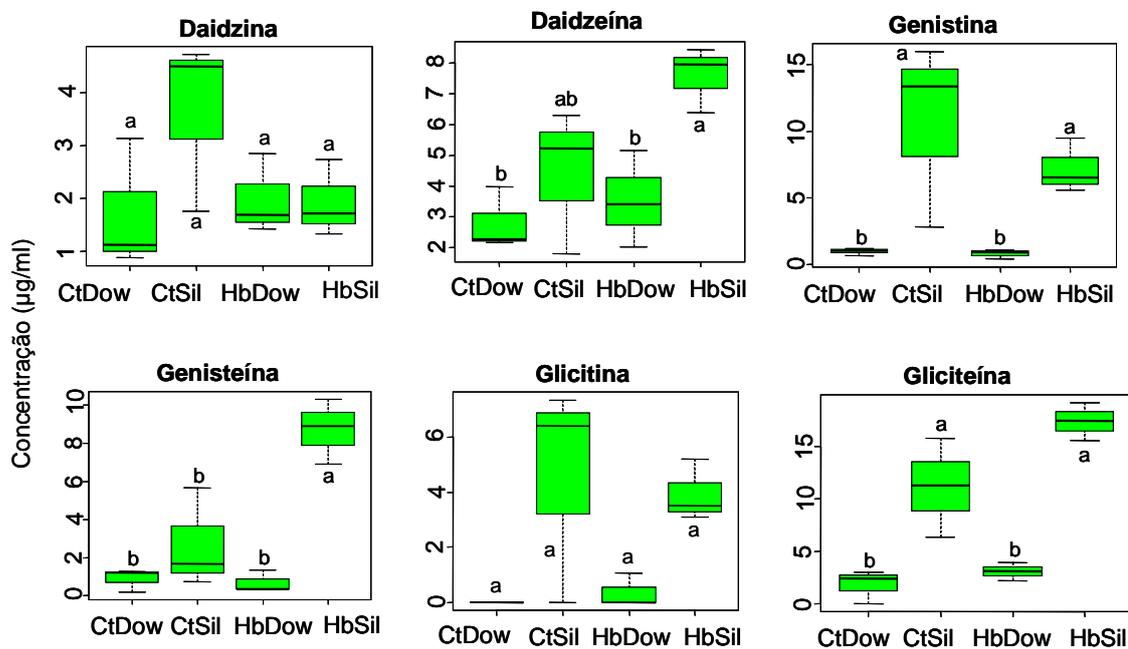


Fig. 10. Concentração dos principais compostos isoflavonóides ( $\mu\text{g/ml}$ ) (média  $\pm$  EPM) extraídos de vagens de soja não atacadas (controle) e submetidas ao tratamento de herbivoria pelo *Euschistus heros* por 48 hr, no Laboratório de Semioquímicos – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF. Tratamentos: CtDow: controle da cultivar Dowling, HbDow: cultivar Dowling submetida à herbivoria, CtSil: controle da cultivar Silvânia, HbSil: cultivar Silvânia submetida à herbivoria. Os dados foram transformados em  $\log(x+1)$  para as análises. Caixas seguidas pela mesma letra, dentro de cada cultivar e entre as cultivares, não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P>0.05$ ).

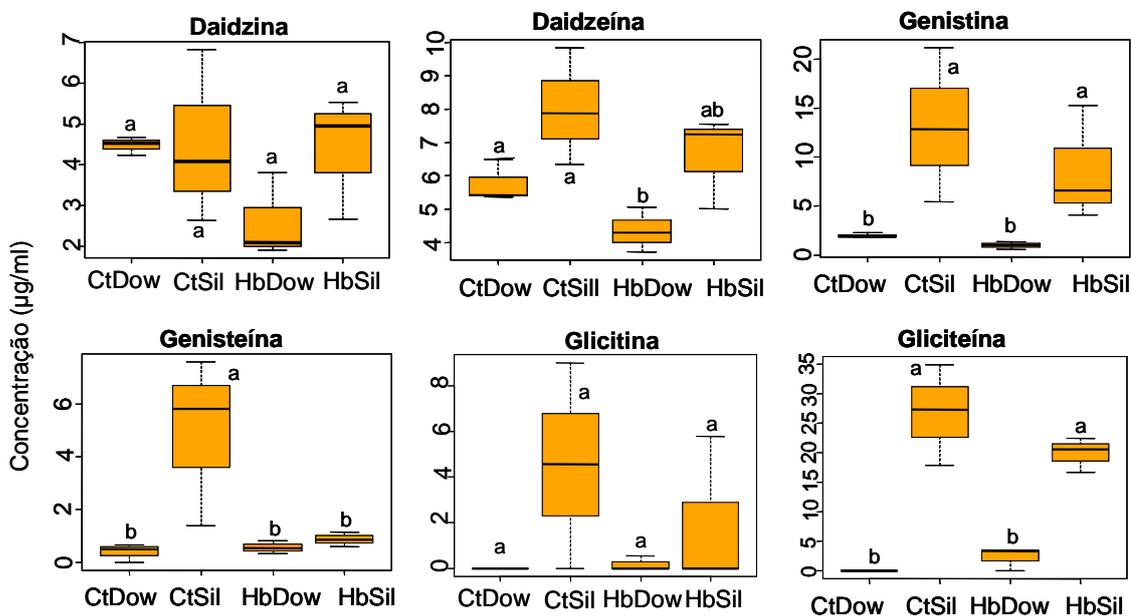


Fig. 11. Concentração dos principais compostos isoflavonóides ( $\mu\text{g/ml}$ ) (média  $\pm$  EPM) extraídos de vagens de soja não atacadas (controle) e submetidas ao tratamento de herbivoria pelo *Euschistus heros* por 72 hr, no Laboratório de Semioquímicos – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF. Tratamentos: CtDow: controle da cultivar Dowling, HbDow: cultivar Dowling submetida à herbivoria, CtSil: controle da cultivar Silvânia, HbSil: cultivar Silvânia submetida à herbivoria. Os dados foram transformados em  $\log(x+1)$  para as análises. Caixas seguidas pela mesma letra, dentro de cada cultivar e entre as cultivares, não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P>0.05$ )

## Discussão

A resistência nas plantas pode se manifestar de diferentes maneiras em testes com e sem chance de escolha. Estudos têm mostrado que uma cultivar pode se revelar como resistente em teste com chance de escolha, mas não manter essa característica quando cultivada isoladamente, permitindo a alimentação ou a oviposição dos

herbívoros (Lara, 1991). Por exemplo, não houve diferença na oviposição da mosca-branca *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em diferentes genótipos de soja, no teste com escolha. Entretanto, no teste sem chance de escolha houve maior oviposição na cv resistente IAC74-2832 (Lima e Lara, 2004).

O maior número de ovos deixados na cv Silvânia sugere que o mecanismo de não-preferência para o percevejo marrom pode estar envolvido na resistência das cultivares Dowling e IAC100. A presença de alguma característica na cv Silvânia pode ter favorecido a oviposição no teste sem escolha, mas que não foi suficiente para apresentar preferência pela cultivar suscetível quando testada junto com as demais. Em teste com escolha a falta de discriminação pela planta hospedeira pode ocorrer como uma forma de escape do herbívoro. Quando todas as plantas são visitadas, a alimentação e/ou oviposição podem ser iniciadas, mas a planta pode ser abandonada, em seguida, devido, provavelmente, a algum atributo morfológico ou químico que desfavoreça a permanência do inseto na mesma (Crompton e Ode, 2010).

Uma possibilidade desse desfavorecimento pode ser atribuída à densidade e aos tipos de tricomas presentes nas folhas. Alguns autores sugerem que a presença e a densidade dos tricomas pode ser uma característica relacionada à resistência das plantas contra os herbívoros, devido à dificuldade que este teria no acesso à planta para se alimentar ou ovipositar (Cortesero et al. 2000; Mishalska 2003; Simmons e Gurr 2005). Por outro lado, outros estudos relatam o efeito contrário, onde o maior número de ovos poderia estar associado ao alto número de tricomas, como observado, por exemplo, com *B. tabaci* e a soja PI 227687 (Vale e Lourenção, 2002). Os genótipos altamente pilosos podem fornecer um microclima mais adequado para a oviposição das fêmeas de *B. tabaci*, podendo ainda desfavorecer o comportamento de forrageamento dos inimigos naturais (Butter e Vir, 1989; Cortesero et al., 2000), aumentando a chance do herbívoro não ser atacado.

Novos estudos são necessários para investigar se as diferenças na densidade e nos tipos de tricomas presentes nas folhas dessas cultivares afetam a oviposição de *E. heros*. A alta pilosidade fornece um microclima para a oviposição, como observado para mosca-branca. Entretanto, isso pode não ocorrer com ovos dos percevejos devido ao fato de serem maiores e, portanto, mais difíceis de serem acomodados entre os tricomas. É importante levar em consideração também que, a mosca-branca coloca ovos isolados enquanto os percevejos, normalmente, colocam massas de ovos.

A resistência da cv IAC100 aos herbívoros da soja tem sido estudada para outros insetos como *A. gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Nezara viridula* (L., 1758) (Hemiptera: Pentatomidae). Em relação à *A. gemmatalis* foram observados a diminuição do peso das lagartas e pupas, o aumento do período larval e o maior índice de mortalidade nas lagartas. Para os percevejos adultos verificou-se um menor peso quando alimentados com a cv IAC100, sugerindo o efeito de antibiose para esses insetos (Machado et al., 1999; Piubelli et al., 2003b, 2005). A maior resistência da cv IAC100 e a maior suscetibilidade da Silvânia foram atestadas neste trabalho, onde os aspectos biológicos como, período de oviposição, número de ovos e de ninfas por fêmea, peso e longevidade dos adultos foram menores para os insetos criados na cv IAC100, observando ainda que, o período de desenvolvimento ninfal foi maior em relação ao da cv Silvânia. Esses resultados indicam que a cv IAC100 pode ser inadequada para o desenvolvimento dos percevejos, pois segundo Soo Hoo e Fraenkel (1966), o desenvolvimento do inseto é adequado quando ele apresenta um ciclo de vida curto, possui imaturos com pesos adequados e baixa taxa de mortalidade.

A longevidade média dos adultos oriundos das ninfas alimentadas com a cv Silvânia foi menor do que a observada por Costa et al. (1998). Entretanto, nesse caso os insetos alimentaram-se no laboratório, de sementes de girassol e amendoim, bem como de vagens de feijão e no presente trabalho os insetos foram alimentados somente com as vagens de cada tratamento. Assim parece haver a necessidade do complemento da dieta com outros tipos de grãos para o melhor desenvolvimento do *E. heros*, como sugerido por Panizzi (2000).

Os resultados obtidos apresentam o primeiro relato da resistência da cv Dowling para um percevejo, descrita anteriormente somente para o pulgão *Aphis glycines* Matsumura, 1917 (Hemiptera: Aphididae) (Hill et al., 2004). A resistência da cv Dowling para o pulgão, está relacionada aos mecanismos de antibiose e não-preferência, já que os insetos pararam de se alimentar e morreram depois de 48 hr em uma dieta com esta cultivar (Li et al., 2004, 2008). Os resultados do presente trabalho sugerem também que a resistência da cv Dowling para *E. heros* envolve a categoria de antibiose, uma vez que houve efeito negativo no desenvolvimento das ninfas criadas nesta cultivar, o que resultou na não obtenção de adultos neste tratamento.

O experimento foi repetido três vezes, sendo esse resultado confirmado também no segundo experimento, enquanto, que na terceira repetição, houve a emergência de apenas 4% de adultos (dados não apresentados). Alterações no ciclo de vida do inseto,

como prolongamento do ciclo de desenvolvimento ou redução da emergência de adultos, em função do genótipo da planta onde o inseto está sendo criado, são consideradas indicativas da presença de antibiose (Crompton e Ode, 2010). Por outro lado, a cv Dowling não apresentou efeito semelhante sobre a biologia do *N. viridula* em estudos de laboratório (Hoffmann-Campo, comunicação pessoal). Provavelmente os fatores presentes nesta cultivar, que interferiram no desenvolvimento das ninfas do *E. heros*, não causam o mesmo efeito sobre *N. viridula*, levando em consideração que uma das características da resistência é ser específica, sendo muitas vezes resistente a uma praga e moderadamente resistente ou suscetível a outras (Schaller, 2008).

A resistência por antibiose pode estar associada aos compostos fenólicos, que em geral, desempenham função importante na defesa da planta contra herbívoros e fitopatógenos (Dixon e Steele, 1999). Alguns deles, como os flavonóides, dependendo da concentração, podem ser atraentes, deterrentes, repelentes, ou tóxicos aos insetos (Rao et al., 1990; Simmonds, 2001; Hoffmann-Campo et al., 2001). Estudos têm sugerido que a resistência no estágio reprodutivo da soja às lagartas e aos percevejos poderia estar relacionada à concentração dos isoflavonóides nas sementes. Os compostos daidzina e genistina foram induzidos após a alimentação de *N. viridula* na soja PI 227687 (Piubelli et al., 2003a). Outros compostos como rutina e genistina, liberados pelos genótipos PI 274454, PI 227687 e pela cultivar IAC100 interferiram negativamente no desenvolvimento de *A. gemmatilis* (Piubelli et al., 2005). Em outras culturas, como por exemplo, para grão-de-bico, *Cicer arietinum* L., 1758 (Fabales: Fabaceae), os compostos maackiaina e judaicina poderiam também estar envolvidos na suscetibilidade à *Helicoverpa armigera* Hübner, 1805 (Lepidoptera: Noctuidae) (Simmonds e Stevenson, 2001).

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que a produção de isoflavonóides para a cv resistente Dowling foi menor do que na suscetível Silvânia, sugerindo que, neste caso, esses compostos provavelmente não estão relacionados à alta mortalidade das ninfas de *E. heros*. A defesa direta pode estar relacionada a outros compostos, como por exemplo, alguns aminoácidos encontrados na soja e que podem ser responsáveis pela resistência das plantas como observado por Chiozza et al. (2010), onde a composição dos aminoácidos nas folhas de soja interferiram no desenvolvimento do pulgão *A. glycines*.

A falta da indução dos isoflavonóides pode ter ocorrido porque a injúria causada pelos percevejos não foi suficientemente intensa para levar ao aumento da produção

desses compostos. Provavelmente, o número de percevejos utilizados neste estudo (dois por vagem) foi insuficiente para levar à indução da defesa após a alimentação, principalmente na cv Dowling, onde o percevejo pode não ter se alimentado, ou permanecido menos tempo se alimentando. O tipo e a intensidade da injúria causada pelo herbívoro podem afetar a indução da defesa nas plantas, evitando assim gasto energético desnecessário pela planta (Underwood, 2000).

Os resultados, tanto da maior produção dos isoflavonóides na cultivar suscetível, como a maior produção de alguns compostos nas vagens não atacadas, podem estar relacionados com a indução de um fator não controlado no experimento. Houve um aumento, ao longo do tempo, principalmente das agliconas, genistéina, daidzeína e gliciteína, enquanto os compostos glicosados mantiveram suas quantidades constantes ou diminuíram. No geral, os metabólitos secundários que atuam nos insetos como substâncias tóxicas ou deterrentes da alimentação estão na forma aglicona. A produção desses compostos ocorre devido a diferentes fatores, inclusive pela indução das enzimas presentes na saliva dos insetos (Moraes et al., 2005). No entanto, o aumento observado nesse trabalho ocorreu tanto nas plantas atacadas pelo herbívoro, como nas plantas não atacadas, o que sugere uma decomposição do material, provocada por outros fatores, como fungos ou bactérias, por exemplo.

A categoria de não-preferência para a alimentação também pode estar envolvida na resistência da cv Dowling. A morfologia das vagens pode interferir na alimentação dos percevejos. As vagens com alta densidade de tricomas, podem inibir a picada de prova e a continuação da alimentação nas mesmas. A alta densidade de tricomas nas vagens da cv IAC Holambra Stuart-2, pode ter afetado o comportamento dos percevejos, principalmente das ninfas de *N. viridula*, que não conseguiram se alimentar nas vagens desta cultivar (Lourenção et al., 1997). Resultado semelhante pode ter ocorrido para a cv Dowling e as ninfas do *E. heros*, onde o desenvolvimento foi afetado devido à presença de muitos tricomas nas vagens, que dificultaram a alimentação das formas imaturas do percevejo nesta cultivar. Porém, estudos são necessários para investigar a densidade e os tipos de tricomas presentes nas vagens das cultivares Dowling, IAC100 e Silvânia, e avaliar se há relação com a preferência alimentar do percevejo.

Dentre as três categorias de resistência conhecidas, a antibiose mostra-se como importante ferramenta para ser investigada nas cultivares a serem desenvolvidas. A não-preferência só pode ser detectada se houver chance de escolha pelo herbívoro entre, pelo

menos, duas cultivares; a tolerância pode não se manifestar quando o herbívoro atinge alta infestação. Por outro lado, a antibiose afeta diretamente o desenvolvimento e a sobrevivência do herbívoro que pode ser caracterizada pela mortalidade na fase imatura, prolongamento do período de desenvolvimento, redução do peso, da fecundidade, da fertilidade e do período de oviposição (Vendramim e Guzzo 2009). O mecanismo de antibiose na resistência de plantas aos herbívoros tem sido largamente verificado dentro de diferentes culturas, e tem se mostrado uma ferramenta importante para o manejo integrado de outras pragas. Alguns genótipos de algodoeiro apresentaram resistência do tipo antibiose por terem afetado o desenvolvimento de *Alabama argillacea* (Hübner, 1823) (Lepidoptera: Noctuidae) (Santos e Boiça Júnior, 2001). A mosca-branca *B. tabaci* também teve seu ciclo de vida prolongado, indicando a ocorrência de não-preferência para alimentação e/ou antibiose em diferentes genótipos de tomate (Baldin et al., 2005).

Em resumo, os resultados deste trabalho sugerem que as cultivares Dowling e IAC100 não exerceram repelência para o *E. heros*, que as utilizaram como sítio de oviposição. Entretanto, o maior número de ovos encontrados na cultivar suscetível, sugere que a resistência das cultivares contra o percevejo marrom pode estar relacionada ao mecanismo de não-preferência para a oviposição. O mecanismo de antibiose parece ter predominado na resistência das cultivares Dowling e IAC100 contra o percevejo *E. heros*. Entretanto, as causas relacionadas ao menor desempenho do percevejo nestas cultivares ainda são desconhecidas, pois apesar das sugestões de alguns autores de que a resistência no estágio reprodutivo da soja poderia estar relacionada à concentração dos isoflavonóides nas sementes, não foi possível observar esta relação na cv resistente Dowling. O mecanismo de não-preferência para alimentação também pode estar envolvido na resistência da cv Dowling, devido à presença de muitos tricomas ou algum composto deterrente nas vagens, que interferiram na alimentação das ninfas do percevejo nesta cultivar.

Uma continuação da linha de pesquisa deverá incluir a investigação dos fatores presentes nas cultivares resistentes, principalmente na Dowling, que interferiram na biologia do *E. heros*, tais como a presença da barreira física, tricomas ou pêlos, e mesmo da barreira química, como a produção de outros compostos secundários, ou até mesmo dos isoflavonóides, que talvez tenham sido induzidos na cv Silvânia, mais do que na Dowling, devido a algum fator não controlado no experimento.

## Capítulo II

### Voláteis Mediadores da Interação Planta-Herbívoro-Inimigo natural em Cultivares de Soja Resistente e Suscetível

#### Introdução

As plantas são equipadas com muitos mecanismos de defesa contra herbívoros, fitopatógenos ou modificações abióticas, como estresse hídrico ou dano mecânico. Um dos mecanismos de defesa das plantas em resposta às injúrias provocadas por herbívoros é a liberação induzida de compostos orgânicos voláteis (COVs) que podem ter efeito repelente nos herbívoros ou atuar como atrativos para parasitóides e predadores (Price, 1997; De Moraes et al., 2001; Hilker e Meneirs, 2006; Chen, 2008; Heil, 2008).

Os compostos voláteis induzidos por herbivoria são quantitativamente ou qualitativamente diferentes daqueles liberados pelas plantas não submetidas à herbivoria (Dicke, 1999). Essas diferenças dependem das características da planta, que variam entre espécies ou genótipos e das diferentes espécies de herbívoros que estão causando as injúrias (Rasmann e Turlings, 2008). Essas mudanças podem ser responsáveis pela atração diferenciada de parasitóides e predadores (Fritzsche-Hoballah e Turlings, 2001).

Plantas de soja, *Glycine max* (L.) Merrill, 1917 (Fabales: Fabaceae) e feijão guandu, *Cajanus cajan* (Valder, 1895) (Fabales: Fabaceae) danificadas por *Euschistus heros* (Fabricius, 1794) (Hemiptera: Pentatomidae), liberaram um perfil químico de voláteis semelhantes, que atraíram o parasitóide de ovos *Telenomus podisi* (Ashmead, 1881) (Hymenoptera: Scelionidae). Entretanto, quando a soja foi danificada por lagartas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) o perfil químico foi diferente e não atraiu o *T. podisi*, mostrando a especificidade da resposta da planta (Moraes et al., 2005).

Os compostos induzidos pela herbivoria incluem álcoois, ésteres, aldeídos e vários terpenos (Dudareva et al., 2006; Pichersky et al., 2006). Alguns compostos, como (*Z*)-3-acetato de hexenila e (*E*)-2-hexenal, chamados voláteis verdes das plantas (“green-leaf-volatiles” - GLV), derivados da rota da lipoxigenase, em geral, liberados imediatamente após as células serem danificadas (Gatehouse, 2002). Outros, porém, não são armazenados, têm sua produção induzida após a injúria, e pode levar alguns minutos ou mesmo dias para serem liberados (Moraes et al., 2005, 2008, 2009; Rostás e Eggert,

2008). Dentre estes compostos estão, principalmente, os derivados do ácido chiquímico, como o salicilato de metila e o indol; e os compostos de origem terpêncica, como os monoterpenos, limoneno, linalol e  $\beta$ -ocimeno; e os sesquiterpenos,  $\beta$ -cariofileno e (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno (Dudareva et al., 2006; Pichersky et al., 2006).

Vários estudos mostraram que os parasitóides de herbívoros usam os compostos voláteis liberados após a injúria para localizarem os seus hospedeiros. O parasitóide de ovos *Chrysonotomyia ruforum* (Krausse, 1917) (Hymenoptera: Eulophidae) foi atraído pelos voláteis liberados pela planta de *Pinus sylvestris* (L., 1753) (Pinales: Pinaceae) a partir da oviposição causada por *Diprion pini* (L., 1758) (Hymenoptera: Diprionidae) (Hilker et al., 2002a). O parasitóide de ovos *T. podisi* também respondeu aos voláteis das plantas induzidas pela herbivoria de *E. heros* (Moraes et al., 2005, 2008).

Os compostos responsáveis pela defesa da planta e suas funções nas interações com os inimigos naturais poderiam ser usados para atrair ou manter os parasitóides nas culturas (Gatehouse, 2002), podendo ainda ajudar o produtor no desenvolvimento de cultivares resistentes a pragas (Piubelli et al., 2005). Sendo assim, é importante a identificação desses compostos e que essa resistência confira atratividade aos inimigos naturais. Todavia, nem sempre, a associação das variedades resistentes e dos inimigos naturais resulta em interações positivas. Atributos químicos e morfológicos das plantas podem influenciar diretamente na sobrevivência, na fecundidade e no sucesso de forrageamento dos inimigos naturais em busca dos hospedeiros ou das presas. Estas características também podem ter efeitos indiretos, por afetar a qualidade de um herbívoro que, por sua vez, afeta a fisiologia, o comportamento ou o desenvolvimento dos inimigos naturais (Cortesero et al., 2000).

O parasitóide *Hyposoter exiguae* (Viereck, 1912) (Hymenoptera: Ichneumonidae) teve a sua sobrevivência e o seu desenvolvimento reduzidos quando criado em hospedeiros como as lagartas de *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) que alimentaram-se de plantas com defesas induzidas quando comparadas com lagartas criadas em plantas sem a ativação da defesa (Thaler, 1999). A cultivar de soja resistente exerceu um efeito negativo sobre o predador *Podisus maculiventris* (Say, 1832) (Hemiptera: Pentatomidae), de *Epilachna varivestis* Mulsant, 1850 (Coleoptera: Coccinellidae), sugerindo que esta desfavoreceu a ação do inimigo natural sobre a praga (Bartlett, 2008).

Os objetivos deste estudo foram: (i) avaliar a morfologia foliar da soja após atividades de herbivoria e oviposição causadas pelas fêmeas de *E. heros*; (ii) avaliar a

resposta do parasitóide *T. podisi* às cultivares de soja Dowling, IAC100 e Silvânia, após as atividades de herbivoria e oviposição causadas por fêmeas de *E. heros*; (iii) investigar se as fêmeas de *E. heros* são atraídas pelos voláteis liberados por plantas de soja atacadas e não atacadas das diferentes cultivares; (iv) caracterizar o perfil químico dos voláteis liberados pelas cultivares de soja resistente e suscetível, após a herbivoria e a oviposição do percevejo *E. heros*.

As hipóteses do trabalho foram: (i) há alteração na morfologia foliar de plantas de soja em decorrência das atividades de herbivoria e oviposição; (ii) os voláteis produzidos por plantas atacadas pelo percevejo estimulam a resposta olfativa do parasitóide *T. podisi*; (iii) os voláteis produzidos por plantas não atacadas estimulam a resposta olfativa das fêmeas do percevejo *E. heros* e (iv) há diferença na produção de voláteis entre planta atacadas e não atacadas e entre cultivares resistente e suscetível. Estudos anteriores mostraram a diferença na liberação dos compostos voláteis em outras cultivares e que o parasitóide foi capaz de distinguir os diferentes danos nas plantas. Neste trabalho espera-se que o parasitóide responda aos voláteis liberados pelas cultivares Dowling e IAC100 no período anterior a 96 hr após a injúria; a produção dos voláteis nas cultivares resistentes seja maior em relação à suscetível, favorecendo assim a defesa indireta das plantas e que as plantas previamente atacadas sejam rejeitadas pelas fêmeas de *E. heros*.

O trabalho referente à parte deste capítulo com o título “Volatiles Mediating a Plant-Herbivore-Natural Enemy Interaction in Resistant and Susceptible Soybean Cultivars” foi publicado no periódico “Journal of Chemical Ecology, 37(3):273-285” e encontra-se disponível “on line” na página do “site” do periódico (Anexo 2).

## **Material e Métodos**

Os insetos e as plantas utilizados nos experimentos foram mantidos como descrito no Capítulo I. Para os experimentos de avaliação do efeito dos danos provocados pelo herbívoro na defesa indireta em plantas de soja, os machos e as fêmeas de *E. heros* foram separados depois da ecdise e do endurecimento cuticular, porém antes da maturidade sexual, por volta de cinco dias de idade. As fêmeas de *T. podisi* utilizadas nos bioensaios foram separadas diariamente e utilizadas com 48 hr após emergência.

Quando as plantas atingiram o estágio vegetativo (V3) foram utilizadas para os seguintes tratamentos: (1) injúria de herbivoria (Herb) - cinco fêmeas virgens do percevejo entre 2 a 4 dias de idade como adulta; (2) injúria de oviposição (Ovip) - cinco

fêmeas acasaladas entre 12 a 15 dias de adulta e sem o estilete bucal; (3) ambas as injúrias de herbivoria e oviposição (HerbOvip) - cinco fêmeas acasaladas entre 12 a 15 dias de adulta; e (4) controle (Cont) no qual foram utilizadas plantas sem injúria provocada pelo percevejo. Para evitar a fuga dos insetos das plantas de soja, estas foram envolvidas por sacos plásticos de polietileno microperfurados até o momento de serem utilizadas nos experimentos.

#### *Estudo de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

Os experimentos foram conduzidos no período de abril a junho de 2009 para investigar se as atividades de herbivoria e oviposição causadas pelo percevejo marrom danificam as células das folhas de soja. Para isso foram processadas e observadas amostras de folhas com oviposição e herbivoria de *E. heros* utilizando microscópio eletrônico de varredura.

Para a obtenção de folhas com ovos de *E. heros*, seis fêmeas acasaladas foram colocadas nas plantas das diferentes cultivares de soja por 24 hr. Para a injúria de herbivoria seis fêmeas virgens, em jejum de 24 hr, foram colocadas nas plantas e observadas até o início da alimentação. Após 1 min do início da alimentação das fêmeas, as probóscides foram cortadas, com uma tesoura cirúrgica.

A região das folhas contendo as posturas e as probóscides foram cortadas em pedaços de 1 cm<sup>2</sup> e fixados em glutaraldeído a 2,5% (v/v), preparado em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 6,8 durante 24 hr sob vácuo. Posteriormente, o fixador foi trocado e as amostras ficaram no vácuo por mais 30 min. O fixador foi trocado novamente e deixado por 90 min à 4°C.

Após a fixação, as amostras foram lavadas cinco vezes com tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 6,8, tendo cada lavagem a duração de 10 min. Em seguida, o tampão foi retirado, sem expor o tecido vegetal ao ambiente e foi feita a pós-fixação com tetróxido de ósmio a 2% durante 60 min à temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, foram realizadas três outras lavagens de cinco minutos cada uma, com tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 6,8. Em seguida, as amostras foram desidratadas em solução aquosa de etanol de 30%, 50%, 70%, 90% e 100% (v/v), permanecendo 20 min em cada concentração, sendo que na concentração de 100% o procedimento foi repetido três vezes. Enquanto as amostras estavam nas concentrações de 30 a 70%, estas foram mantidas a 4°C, e para as concentrações de 90 e 100%, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente.

Após a desidratação foi feita a substituição do etanol por CO<sub>2</sub> líquido (“Critical point dryer”, Baltec CPD 030) na temperatura entre 0 e 5°C à pressão atmosférica e, em seguida, elevando-se a temperatura e a pressão do compartimento, ocorreu o chamado ponto crítico, onde o CO<sub>2</sub> passou ao estado gasoso sem formar uma interface gás/líquido, o que levaria a uma deformação das células devido à tensão superficial do sistema.

Os pedaços de folhas foram retirados do aparelho de ponto crítico e montados sobre um disco metálico, “stubs” ou porta-espécimen, de aproximadamente 12 mm, com o auxílio de uma fita adesiva dupla face, que adere firmemente a amostra ao porta-espécimen e assegura boa condutividade elétrica entre eles. Posteriormente, as amostras foram cobertas com uma camada delgada de ouro, de aproximadamente 20 nm de espessura, para tornar suas superfícies boas emissoras de elétrons. Esta cobertura foi feita em um metalizador (“sputter coater”, Emitech K550), onde ocorre uma ionização da atmosfera, que bombardeia a placa de ouro retirando os átomos de ouro (Au), e estes formam uma névoa que se deposita uniformemente sobre a superfície das amostras. A observação das amostras foi feita em microscópio eletrônico de varredura (Zeiss DMS 962 a 10 kV e distância entre 13 e 18 mm).

Foram feitas três repetições para cada tratamento, contendo pedaços de plantas com ovos e com probóscide e uma repetição com pedaço de folha sem a probóscide e sem ovos.

#### *Bioensaios no olfatômetro com o parasitóide de ovos*

Os experimentos foram conduzidos no período de junho de 2007 a julho de 2009. Para determinar se os voláteis induzidos pela herbivoria ou pela oviposição têm um efeito no comportamento de busca do parasitóide, utilizou-se um olfatômetro na forma de “Y” (Fig. 1), que foi manufaturado em uma placa de acrílico (19 cm x 19 cm) com uma cavidade em forma de “Y” (corpo 8 cm; braços 7 cm cada; ângulo de 130°; diâmetro 1.5 cm). Esta placa de acrílico foi mantida entre dois vidros com as mesmas dimensões da placa: o ventral translúcido e o dorsal transparente, que foram prensados com cliques de papel conforme Moraes et al., (2005). Câmaras de vidro contendo plantas danificadas e não danificadas foram conectadas ao olfatômetro através de tubos de silicone. O ar filtrado (obtido com carvão ativado) e umedecido passou pelas câmaras e circulou no interior do olfatômetro com fluxo de 0.6 l/min. Para o escoamento do ar, uma bomba de sucção foi ligada no extremo oposto à entrada de ar, e regulada para um

fluxo de 0.2 l/min. O olfatômetro foi iluminado na parte inferior por lâmpadas de infravermelho (comprimento de onda a 950 nm, 108 LEDs) para auxiliar na eliminação de reflexos e sombras na arena de captura das imagens.



Fig. 1. Sistema de bioensaio com o olfatômetro em forma de “Y” utilizado no Laboratório de Semioquímicos – Empresa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF.

O comportamento do parasitóide foi monitorado por uma câmera de vídeo (Sony SPT M324CE; Sony, Minato-Ku, Tokyo, Japão, ajustada com lentes 12.5-75.0 mm/F1.8. As imagens capturadas foram digitalizadas utilizando uma placa de captura de vídeo (PC-Studio PCTV Pinnacle System) e os dados registrados e processados pelo software SACAM (Jorge et al., 2005).

Uma única fêmea do parasitóide foi introduzida na base do olfatômetro, em cada ocasião e observada por 600 seg, para o registro da primeira escolha em cada braço. A primeira escolha foi considerada quando a fêmea entrou e permaneceu em um dos braços por pelo menos 20 seg. Cada fêmea foi usada somente uma vez no experimento,

e as plantas foram descartadas depois de cinco repetições, quando a posição dos braços também foi trocada, para eliminar os efeitos da posição da fonte sobre a escolha das fêmeas. As respostas das fêmeas foram testadas para as seguintes combinações: (1) Herb vs. Cont; (2) HerbOvi vs. Cont, (3) Ovi vs. Cont e (4) Ar vs. Cont, com 60 repetições para cada combinação. Os bioensaios foram conduzidos para cada cultivar de soja depois de 24, 48, 72, 96 e 120 hr do início dos tratamentos. As plantas não danificadas e danificadas foram mantidas em salas diferentes (sob as mesmas condições de temperatura, umidade e luminosidade) até o momento de serem usadas nos experimentos, para evitar a sinalização química entre as plantas. Os insetos foram retirados das plantas antes delas serem utilizadas nos bioensaios.

#### *Bioensaios no olfatômetro com fêmeas de *E. heros**

Os experimentos foram conduzidos no período de maio de 2009 a janeiro de 2010. Para verificar se as plantas danificadas, não danificadas e as diferentes cultivares têm um efeito no comportamento de escolha das fêmeas de *E. heros*, experimentos foram conduzidos utilizando-se dois tipos de olfatômetro. No primeiro experimento, foi usado um olfatômetro de quatro escolhas (Fig. 2) conforme modificação sugerida por Vet et al. (1983) e manufaturado em uma placa de acrílico (44 cm x 44 cm) com uma cavidade em forma de “X” (corpo 37 cm e braços 25 cm cada). A placa de acrílico foi mantida entre dois vidros com as mesmas dimensões, sendo o de baixo translúcido e o de cima transparente. Todo o conjunto foi prensado usando cliques de papel. O olfatômetro de quatro escolhas foi escolhido para avaliar o comportamento do percevejo devido à possibilidade de testar diferentes odores simultaneamente (Vet et al., 1983).

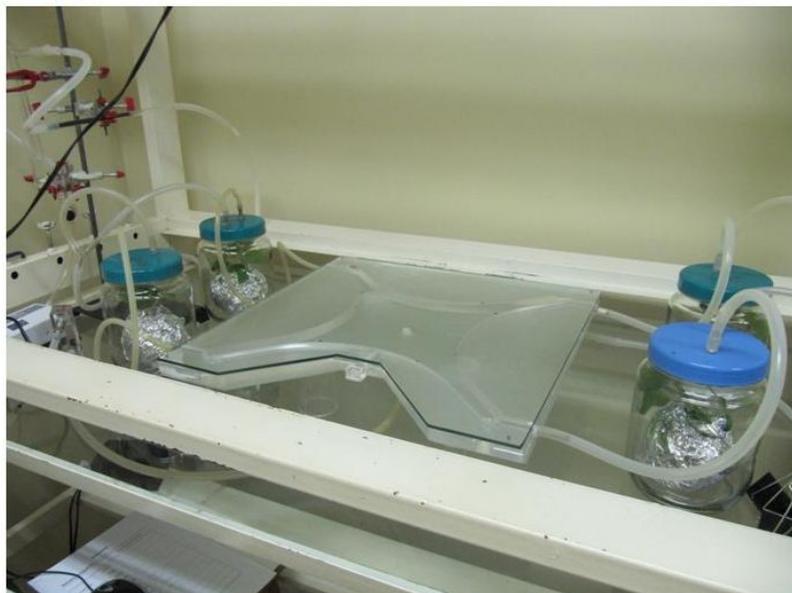


Fig. 2. Sistema de bioensaio com o olfatômetro de quatro escolhas do Laboratório de Semioquímicos – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF.

Os experimentos foram conduzidos usando as mesmas condições descritas anteriormente para os parasitóides. A primeira escolha foi considerada quando a permanência da fêmea no braço foi de, pelo menos, 60 seg. As respostas de 70 fêmeas foram observadas para as seguintes combinações: (1) Herb vs. HerbOvi vs. Ovi vs. Cont para cada cultivar (cv) de soja com 96 hr após os tratamentos, (2) Planta não atacada da cv Dowling vs. planta não atacada da cv IAC100 vs. planta não atacada da cv Silvânia vs. Ar e (3) Ar nos quatro braços. Para cada uma das combinações foram testadas fêmeas em diferentes condições fisiológicas: (a) fêmeas virgens em jejum de 24 hr; (b) fêmeas virgens alimentadas e (c) fêmeas acasaladas alimentadas. Com base nos resultados dos bioensaios utilizando o parasitóide e com o olfatômetro em “X” com 96 hr após os tratamentos, a cv Dowling foi selecionada e avaliada ainda, na combinação das injúrias com 24 hr e planta não atacada para fêmeas virgens em jejum e fêmeas acasaladas alimentadas. Para todas as combinações de bioensaio foi avaliado, também,

o tempo de residência das fêmeas do percevejo em cada braço do olfatômetro, que significa que o estímulo atraiu e foi suficiente para reter o inseto na área.

No segundo experimento, utilizou-se um olfatômetro na forma de “Y” (Fig. 1), que foi manufacturado em uma placa de acrílico (40 cm x 32 cm) com uma cavidade em forma de “Y” (corpo 20 cm; braços 17 cm cada; ângulo de 130°; diâmetro 2.5 cm). Este olfatômetro foi utilizado como auxiliar na interpretação dos resultados obtidos na olfatometria em “X”, uma vez que com o olfatômetro em “Y” é possível comparar somente dois estímulos. Os experimentos foram conduzidos usando as mesmas condições descritas anteriormente para os parasitóides. A primeira escolha foi considerada quando as fêmeas permaneciam no braço durante, pelo menos, 60 seg. As respostas de 50 fêmeas do percevejo foram observadas para as seguintes combinações: (1) Não danificadas vs. Ar para cada cultivar, (2) Herb vs. Cont, (3) HerbOvi vs. Cont e (4) Ovi vs. Cont para a cv Dowling com 96 hr após os tratamentos. Para a combinação 1 foram testadas fêmeas acasaladas alimentadas, porém, para as combinações de 2 a 4 foram testadas fêmeas virgens em jejum por 24 hr e fêmeas acasaladas alimentadas. Para todas as combinações do bioensaio foi avaliado também o tempo de residência das fêmeas em cada braço do olfatômetro.

#### *Coleta de voláteis (Aeração)*

Os experimentos foram conduzidos no período de junho de 2007 a novembro de 2008. A coleta de voláteis das plantas danificadas por herbivoria, herbivoria+oviposição e oviposição e de plantas controle, foi realizada em câmara de vidro (com volume interno de 10 l). Os vasos contendo as plantas de soja foram cobertos com papel alumínio, para minimizar a contaminação pelos voláteis do solo (Fig. 3).

A entrada de ar foi feita através de um compressor de ar com corrente de 1.0 l/min conectado a um filtro de carvão ativado, e a saída através de uma bomba de vácuo (0.6 l/min) conectada a um tubo de vidro com adsorvente, através de conexões de silicone, para a coleta dos voláteis, formando um sistema “push-pull”, como descrito por Moraes et al. (2008).

Os voláteis foram coletados a cada 24 hr, durante sete dias consecutivos, com 11 repetições para cada tratamento, em tubos de vidro contendo 100 mg do adsorvente SuperQ (80-100 “mesh”, Alltech PA, EUA). Os tubos do adsorvente foram eluídos com 500 µl do solvente orgânico *n*-hexano e pré-concentrados para 200 µl com fluxo suave de N<sub>2</sub>. Após a eluição, os tubos com adsorventes foram pré-condicionados usando

diclorometano (2 ml) e aquecidos à 134°C sobre fluxo de nitrogênio por duas horas antes de serem colocados novamente na câmara de aeração. Os extratos foram armazenados a -20°C até sua utilização em cromatógrafo gasoso (CG) e CG acoplado ao espectrômetro de massas (CG-MS).

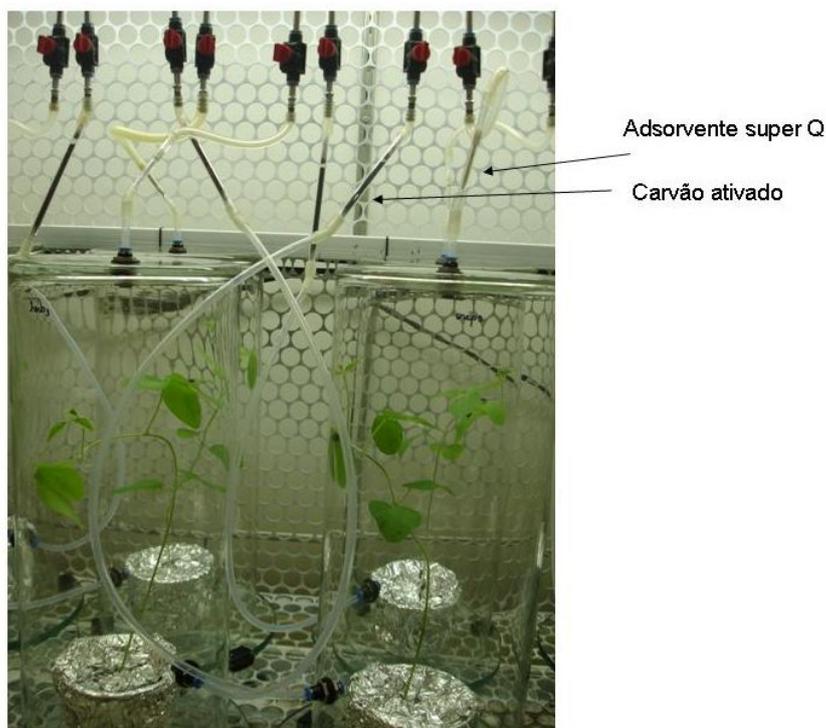


Fig. 3. Sistema de coleta de voláteis (aeração) do Laboratório de Semioquímicos – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF.

As análises químicas dos extratos obtidos foram conduzidas utilizando cromatógrafo gasoso (CG) (Shimadzu 17A, coluna apolar DB-5, 0.25 mm de diâmetro x 30 m de comprimento, filme 0.25  $\mu$ m, J&W Scientific, Folsom, CA, USA), com detector de ionização por chama (DIC) a 270°C e um programa na temperatura de 50°C/1 min, 15°C/min a 250°C/20 min. Para a análise no CG, uma alíquota de 50  $\mu$ l de cada extrato foi separada e 1  $\mu$ l do composto 1-octen-3-ol foi adicionado como padrão interno (PI), na concentração final de 9.8  $\mu$ g/ml. Um  $\mu$ l de cada amostra foi injetado

usando o modo “splitless” e o gás hélio foi utilizado como carreador. A quantificação dos compostos liberados pelas plantas a cada período de 24 hr foi conduzida através da comparação das áreas de cada composto em relação à área do PI utilizado. Os dados foram coletados com o software ClassGC e analisados usando o programa Excel (Microsoft Office Professional edição 2003®, Microsoft Corporation, EUA).

Para a identificação dos compostos, análise qualitativa, os extratos selecionados foram analisados por CG-EM Shimadzu QP2010 equipado com um analisador quadrupolar, com uma coluna apolar DB-5 (0.25 mm de diâmetro x 30 m de comprimento, com filme 0.25 µm, J&W Scientific, Folsom, CA, USA), com ionização de impacto de elétrons (70-eV, temperatura 200°C) e com um injetor “splitless”. O gás hélio foi usado como carreador. Os dados foram coletados e analisados com o software GC-MS Solutions 2.4 (Shimadzu Corporation, Japan). A identificação dos compostos foi conduzida usando o índice de Kováts (KI) e por comparação do padrão de fragmentação obtido dos compostos das amostras com o padrão de fragmentação de espectros de massas dos dados de bibliotecas espectrais (NIST 2005 e Wiley) ou com espectros publicados. Para a confirmação, o padrão de fragmentação e o KI foram comparados com os dados obtidos dos padrões autênticos (Anexo 1) que foram injetados no espectrômetro de massas nas mesmas condições das amostras, quando havia o padrão disponível.

#### *Análises estatísticas*

A preferência dos parasitóides para os voláteis das plantas danificadas vs. plantas não danificadas, para cada tempo e tratamento (24, 48, 72, 96 e 120 hr), a escolha inicial do percevejo para os voláteis das três cultivares e das plantas danificadas vs. plantas não danificadas foram testadas com o teste *qui-quadrado* com correção de Yates para continuidade (Zar, 1998).

O tempo de residência, tempo em que o percevejo permaneceu em cada braço do olfatômetro durante cada bioensaio, foi calculado e submetido aos testes *t* pareados nos bioensaios de duas escolhas e de Kruskal-Wallis nos bioensaios de quatro escolhas. As análises do teste *qui-quadrado* foram feitas utilizando o programa estatístico SAS 9.0 (SAS Institute 2001), enquanto os testes *t* pareado e de Kruskal-Wallis foram feitos no programa R 2.8.0 (R statistical Development Core Team, 2009).

Desde que a coleta dos voláteis foi feita na mesma planta por vários dias consecutivos, análise de variância para medidas repetidas foi utilizada para evitar o

problema de pseudo-repetição nas datas analisadas (Hurlbert, 1984; Green, 1993). O total de voláteis liberados em cada tratamento ao longo do tempo foi comparado pela análise de variância multivariada (Manova) para medidas repetidas (PROC Anova com especificação PROFILE), tendo os tempos de coleta dos voláteis como medidas repetidas da mesma unidade experimental, conforme sugerido por von Ende (1993). A comparação entre médias dos tratamentos foi realizada dentro de cada tempo de coleta usando-se o teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Estas análises foram efetuadas no programa estatístico SAS 9.0.

A mudança no perfil químico das plantas de soja danificadas e não danificadas ao longo do tempo foi avaliada através da análise de Curvas de Respostas Principais (“Principal Response Curves” - PRC). A análise de PRC é uma técnica multivariada desenvolvida para estudos com medidas repetidas no tempo e derivada da análise de redundância (RDA), que foca na proporção da variância explicada por variáveis de interesse, neste caso, a herbivoria e a oviposição do percevejo *E. heros* e os períodos (horas após o ataque) ao longo do experimento. A análise de PRC modela o efeito do tratamento  $d$  em um determinado tempo  $t$  no composto  $k$ . O modelo estatístico para a concentração do composto é:  $(y_{d(j)tk} = y_{0k} + b_k c_{dt} + \varepsilon_{d(j)tk})$ , onde  $y_{d(j)tk}$  = concentração do composto  $k$  na repetição  $j$  do tratamento  $d$  no tempo  $t$ ;  $y_{0k}$  = concentração média do composto  $k$  no controle (planta sadia) ( $d = 0$ );  $c_{dt}$  = resposta básica padrão para cada tratamento  $d$  no tempo  $t$ ;  $b_k$  = peso de cada variável (composto), que fornece informação sobre a importância que cada composto teve para gerar o padrão básico de resposta e  $\varepsilon_{d(j)tk}$  = erro com média zero e variância  $\sigma_k^2$ . Estes parâmetros foram gerados através de estimativas dos quadrados mínimos pela RDA, a partir de uma regressão de graus reduzidos com base na concentração dos compostos voláteis liberados por plantas submetidas aos diferentes tratamentos e assumindo o tempo de coleta como co-variável (van den Brink e ter Braak, 1999). O conjunto de dados foi constituído por 11 repetições para cada tempo de coleta e tratamento.

Os valores de  $c_{dt}$ , referentes ao efeito de tratamento, foram plotados como o eixo vertical (primeiro eixo de PRC extraído, PRC1) ao longo do tempo de amostragem, o que gerou o diagrama de PRC, com uma curva para cada tratamento, e que descreveu a dinâmica na mudança da mistura dos voláteis liberados pela planta ao longo do tempo. Neste diagrama foi apresentada a variação na composição dos voláteis na soja danificada e não danificada, sendo a última utilizada como padrão de referência ou controle ( $c_{dt} = 0$ ). A resposta baseada nos pesos das variáveis ( $b_k$ ), colocada no lado

direito de cada diagrama permitiu avaliar a contribuição de cada composto para o padrão da curva obtida. Valores de  $b_k$  maiores que 0.5 ou menores que -0.5 indicam maior contribuição para as mudanças na curva de resposta em relação ao comportamento do controle no diagrama de PRC.

A análise de PRC foi aplicada separadamente para cada cultivar de soja. Para cada conjunto de análises, a significância de cada diagrama de PRC em termos de variância de tratamento apresentada foi determinada mediante um teste F gerado por permutação (teste de permutação de Monte Carlo; com 999 permutações) aplicada sobre a série temporal completa na RDA parcial, a partir da qual a PRC foi obtida. Uma segunda série de testes de permutação (contrastes individuais) foi feita dentro de cada dado da amostragem para determinar se as diferenças mostradas pelo diagrama de PRC entre os tratamentos em um respectivo horário seriam estatisticamente significativas. As análises foram feitas no programa CANOCO 4.5 para Windows (ter Braak e Šmilauer, 2002). Os compostos responsáveis pela diferença entre os tratamentos no diagrama da PRC foram submetidos individualmente à Manova para medidas repetidas, seguida por contrastes formados dentro de cada tempo de coleta para comparar a indução nos tratamentos contra o controle, usando o teste t, com significância de 5%.

## **Resultados**

### *Estudo de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

Através das imagens pode-se observar que a penetração da probóscide na folha levou à ruptura da epiderme, atingindo provavelmente os tecidos condutores, xilema e floema. As células próximas da região perfurada pela probóscide permaneceram intactas (Fig. 4 A e B). Quando a probóscide foi retirada, observou-se a perfuração e exposição dos tecidos internos ao ambiente externo (Fig. 4 C). Já com as imagens obtidas da oviposição de *E. heros* foi possível observar a presença da cola utilizada na fixação dos ovos à folha e a deformação das células epidérmicas ao redor do sítio de oviposição (Fig. 5 A). Na região onde os ovos e a cola foram retirados houve a exposição do mesofilo (parênquima clorofiliano) (Fig. 5 B). Pode-se observar, ainda, que os ovos são fixados fortemente nas folhas, pois uma vez arrancados, ocorre o destacamento também da epiderme (Fig 5 C). Não foi possível observar qualquer diferença causada pela herbivoria ou pela deposição de ovos por *E. heros* entre as diferentes cultivares estudadas.

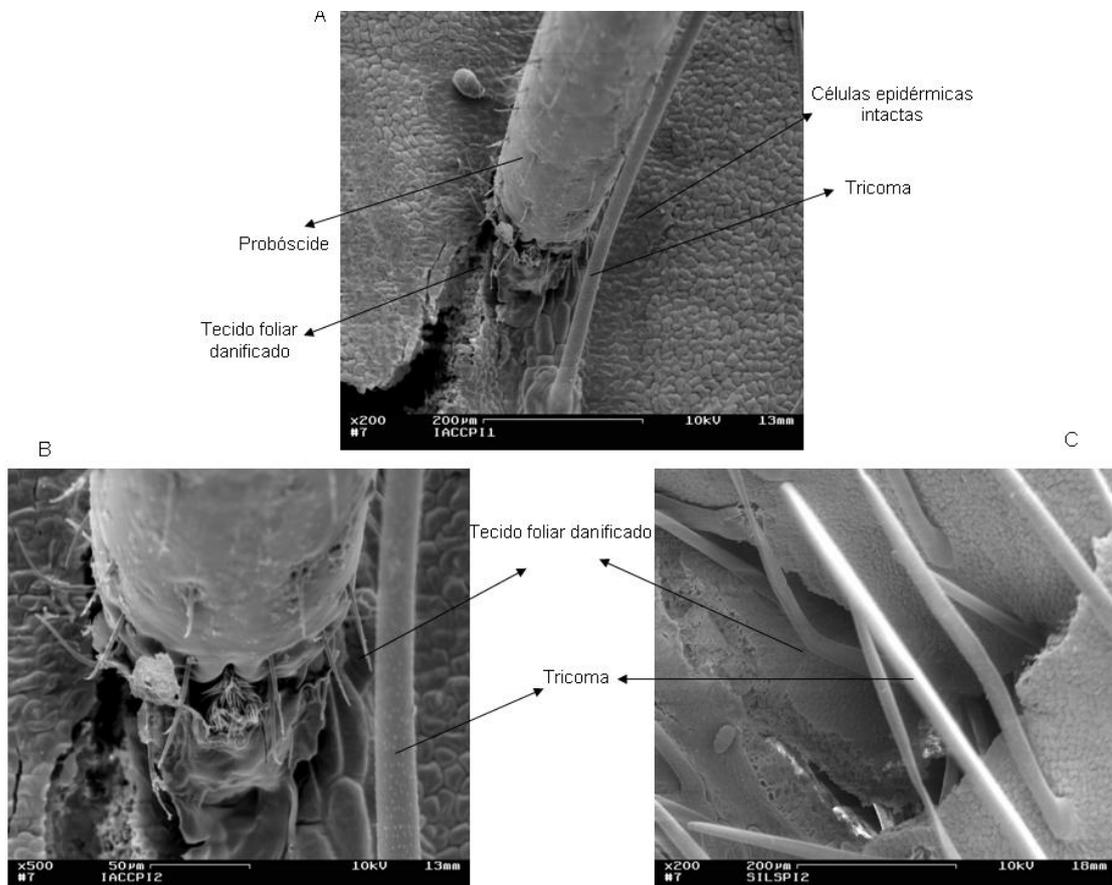


Fig. 4. Aspecto, em microscopia eletrônica de varredura, da injúria de herbivoria causada pelo *Euschistus heros* em folhas de soja. A) Probóscide do percevejo inserida na folha da cultivar IAC100 B) Injúria obtida sob maior aumento da imagem A e C) Perfuração deixada na folha da cultivar Dowling após a retirada da probóscide, com exposição dos tecidos internos.

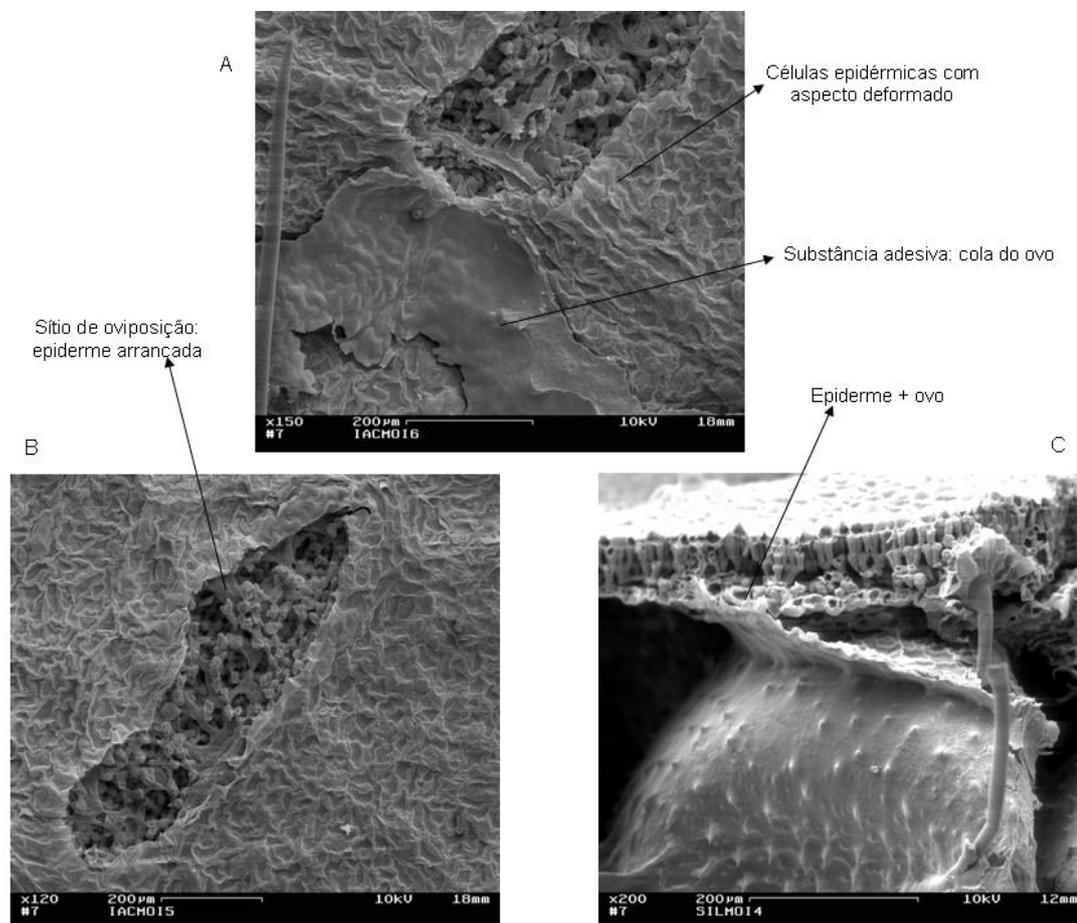


Fig. 5. Aspecto, em microscopia eletrônica de varredura, da injúria de oviposição causada pelo *Euschistus heros* em folhas de soja. A) Sítio de oviposição na cultivar IAC100, mostrando as células deformadas e a presença da cola utilizada na fixação dos ovos à folha B) Sítio de oviposição, sob maior aumento, mostrando o destacamento da epiderme e a exposição do mesofilo (parênquima clorofiliano) e C) Destacamento dos ovos junto com a epiderme da folha da cultivar Silvânia.

*Bioensaios no olfatômetro com o parasitóide de ovos*

O parasitóide *T. podisi* respondeu preferencialmente aos odores liberados pelas plantas da cv Dowling submetidas à herbivoria (Herb) ( $\chi^2=7.67$ ,  $P=0.005$ ;  $\chi^2=8.06$ ,  $P=0.005$ ) e à herbivoria+oviposição (HerbOvi) ( $\chi^2=9.60$ ,  $P=0.002$ ;  $\chi^2=8.06$ ,  $P=0.005$ ) em relação às plantas controle (Cont) para 72 e 96hr, respectivamente (Fig. 6). A resposta foi positiva para os voláteis da cv IAC100 nos tratamentos Herb ( $\chi^2=11.26$ ,  $P=0.001$ ) e HerbOvi ( $\chi^2=8.06$ ,  $P=0.005$ ) quando comparados com o tratamento Cont para 96 hr. Entretanto, não foi observada preferência para os odores dos outros tratamentos e nos demais horários de avaliação (Fig. 7). Para a cv Silvânia, não houve nenhuma preferência aos odores quando comparadas plantas danificadas e não danificadas em todos os tratamentos e ao longo dos sete dias avaliados ( $P>0.05$ ) (Anexo 3.1).

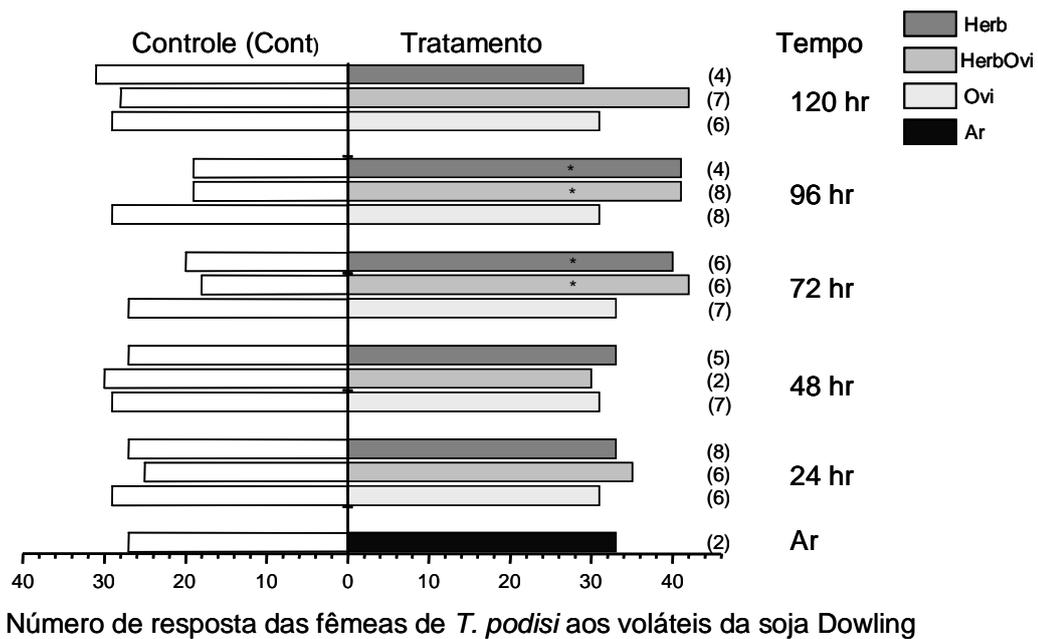


Fig. 6. Respostas de fêmeas de *Telenomus podisi* no olfatômetro em “Y” para a cultivar de soja Dowling submetida a diferentes tratamentos. Cont: planta não danificada, Ovi: com oviposição, HerbOvip: com herbivoria+oviposição e Herb: com herbivoria. 24, 48, 72, 96 e 120 hr = tempo depois do início dos tratamentos (indução da planta). Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ), a 5% de probabilidade. Números entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum dos tratamentos.

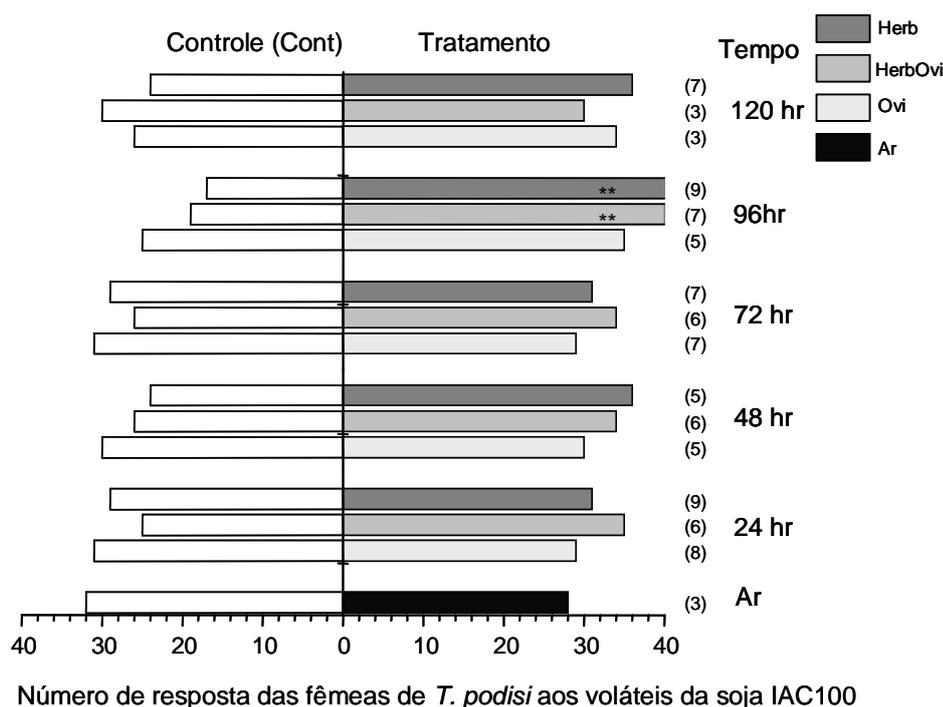


Fig. 7. Respostas de fêmeas de *Telenomus podisi* no olfatômetro em “Y” para a cultivar de soja IAC100 submetida a diferentes tratamentos. Cont: planta não danificada, Ovi: com oviposição, HerbOvip: com herbivoria+oviposição e Herb: com herbivoria. 24, 48, 72, 96 e 120 hr = tempo depois do início dos tratamentos (indução da planta). Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste  $\chi^2$ , a 1% de probabilidade. Os números entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum dos tratamentos.

#### Bioensaios no olfatômetro com fêmeas de *E. heros*

Nos bioensaios com o olfatômetro de quatro escolhas, as fêmeas de *E. heros* nos diferentes estados fisiológicos testados (virgem em jejum, virgem alimentada e acasalada alimentada) não mostraram preferência para as plantas submetidas à herbivoria, herbivoria+oviposição e oviposição, 96 hr após o início dos mesmos quando comparadas às plantas não danificadas (testemunha) ( $\chi^2$ ,  $P > 0.05$ ) para as cultivares Dowling, IAC100 e Silvânia. Nos bioensaios com plantas não danificadas e ar, não foi

observada também preferência do percevejo na primeira escolha dos tratamentos ( $\chi^2$ ,  $P>0.05$ ) (Anexo 3.2).

Nos bioensaios realizados com as plantas não danificadas e o ar houve diferença significativa no tempo de residência somente para fêmeas virgens e alimentadas (Kruskal-Wallis,  $H=10.03$ ,  $P=0.02$ ) (Fig. 8). Não houve diferença significativa no tempo de residência para as cultivares individuais submetidas a diferentes tratamentos (Kruskal-Wallis,  $P>0.05$ ) (Anexo 3.3), para fêmeas acasaladas e alimentadas e virgens em jejum entre plantas da cv Dowling submetidas aos tratamentos Herb, HerbOvip e Ovip, 24 hr após o início dos mesmos, em relação às plantas não danificadas (Cont) (teste  $\chi^2$ ,  $P>0.05$ ) (Anexo 3.4) e nem no tempo de residência nos braços do olfatômetro de quatro escolhas (Kruskal-Wallis,  $P>0.05$ ) (Anexo 3.5).

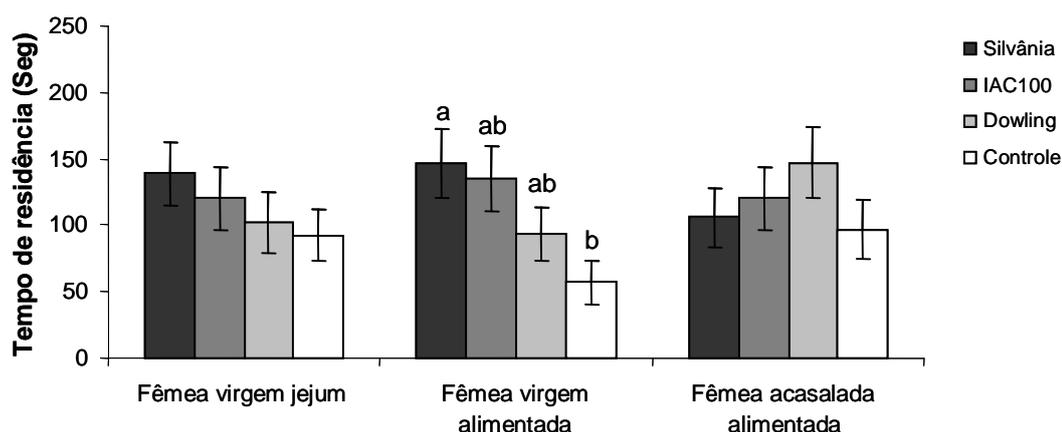


Fig. 8. Tempo de residência (em segundos) das fêmeas de *E. heros* no olfatômetro de quatro escolhas para plantas não danificadas de soja das cultivares Dowling, IAC100 e Silvânia. Barras seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade.

Nos bioensaios com o olfatômetro em “Y”, as fêmeas acasaladas e alimentadas de *E. heros* mostraram preferência para as plantas não danificadas, quando testadas com o ar para as três cvs Dowling ( $\chi^2=9.68$ ,  $P=0.002$ ), IAC100 ( $\chi^2=3.92$ ,  $P=0.048$ ) e

Silvânia ( $\chi^2=5.12$ ,  $P=0.024$ ) (Fig. 9). O tempo de residência das fêmeas nos braços do olfatômetro também diferiu significativamente para as cvs Dowling ( $t=2.51$ ,  $P=0.016$ ), IAC100 ( $t=1.90$ ,  $P=0.049$ ) e Silvânia ( $t=1.96$ ,  $P=0.046$ ) (Fig. 10).

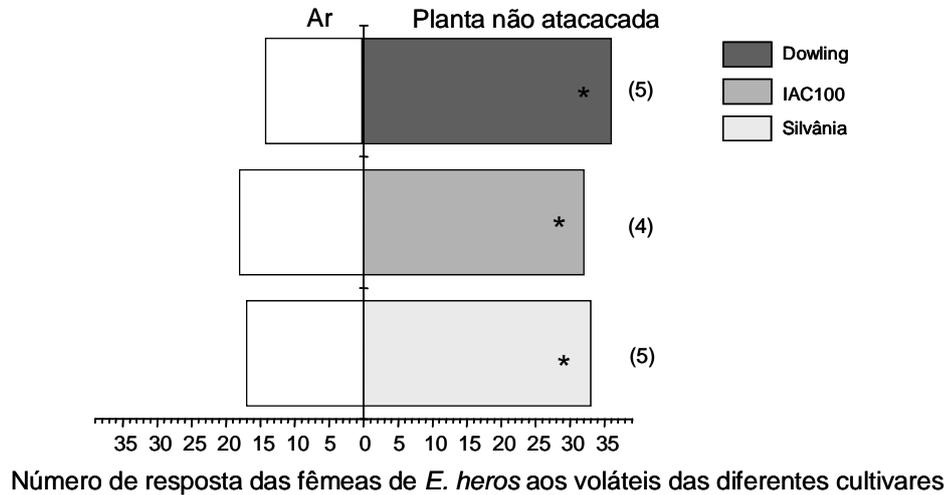


Fig. 9. Respostas de fêmeas acasaladas e alimentadas de *Euschistus heros* no olfatômetro em “Y” para plantas não danificadas das cultivares Dowling, IAC100 e Silvânia. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste  $\chi^2$ , a 5% de probabilidade. Números entre parênteses representam os insetos que não responderam para nenhum dos tratamentos.

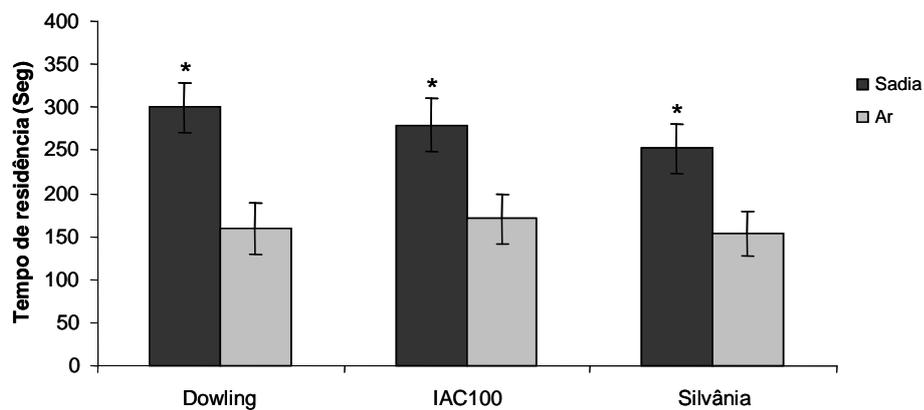


Fig. 10. Tempo de residência (em segundos) das fêmeas de *E. heros* no olfatômetro em “Y” para plantas não danificadas das cultivares Dowling, IAC100 e Silvânia. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste  $t$  pareado, a 5% de probabilidade.

Para a cv Dowling submetida à Herb, HerbOvi, Ovi, 96 hr após o início dos mesmos e testadas no olfatômetro em “Y”, não constatou-se diferença significativa entre os tratamentos para a primeira escolha das fêmeas acasaladas e alimentadas e virgens em jejum ( $\chi^2$ ,  $P>0.05$ ) (Anexo 3.6), nem para o tempo de residência nos braços com os tratamentos e o controle (planta não atacada) (Kruskal-Wallis,  $P>0.05$ ) (Anexo 3.7 e 3.8).

#### *Coleta de voláteis (Aeração)*

Os voláteis totais liberados pela cv Dowling diferiram entre os tratamentos ao longo do tempo (tratamento:  $F=9.89$ ;  $d.f.=3, 56$ ;  $P=0.001$ ; interação: *Wilk's*  $\lambda=0.383$ ;  $d.f.=18, 145$ ;  $F=3.25$ ;  $P=0.001$ ) (Fig. 11). O perfil químico das plantas submetidas à herbivoria, herbivoria+oviposição e oviposição diferiu quando comparado com plantas não atacadas a partir de 48 hr após os tratamentos (teste Tukey,  $P<0.05$ ). Por outro lado, não houve efeito significativo de tratamento ou de sua interação com o tempo para a cv IAC100 (tratamento:  $F=1.82$ ;  $d.f.=3, 56$ ;  $P=0.15$ ; interação: *Wilk's*  $\lambda=0.583$ ;  $d.f.=18, 145$ ;  $F=1.61$ ;  $P=0.06$ ) e para a cv Silvânia (tratamento:  $F=2.63$ ;  $d.f.=3, 56$ ;  $P=0.06$ ; interação: *Wilk's*  $\lambda=0.607$ ;  $d.f.=18, 145$ ;  $F=1.55$ ;  $P=0.08$ ) (Fig. 11).

Os perfis químicos dos extratos obtidos das plantas como resultado dos três tipos de injúrias (herbivoria, herbivoria+oviposição e oviposição) e das plantas não atacadas foram diferentes entre as cultivares Dowling, IAC100 e Silvânia (Anexo 4). Os compostos (*Z*)-2-octen-1-ol e (*E*)-2-octen-1-ol, foram identificados somente na cv Dowling; (*E*)-2-acetato de hexenila e indol foram identificados na IAC100; enquanto o DMNT foi identificado somente na cv Silvânia (Tabela 1). As três cultivares de soja também emitiram compostos comuns, como os voláteis verdes das plantas, (*Z*)-3-acetato de hexenila; os terpenos canfeno, limoneno,  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -cariofileno, (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno e TMTT; e os derivados do ácido chiquímico benzotiazol, benzaldeído e salicilato de metila. Observou-se ainda que, ocorreu maior liberação de alguns compostos nas plantas danificadas quando comparadas às não atacadas (Tabela 1).

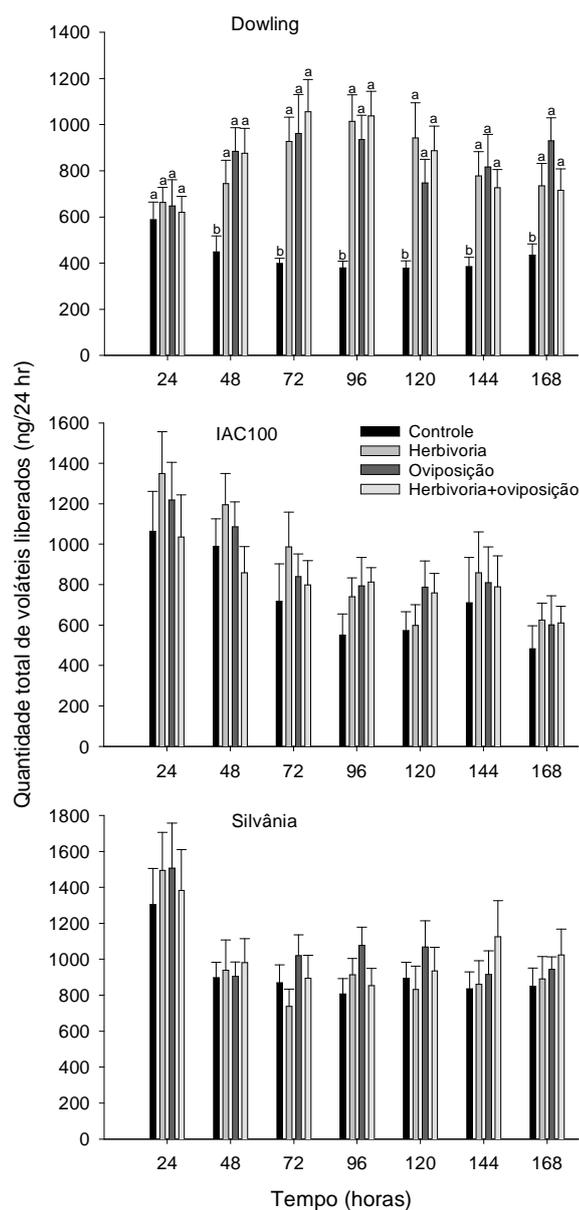


Fig. 11. Voláteis totais (média±EPM) obtidos das plantas não atacadas (controle) e submetidas aos tratamentos de herbivoria, oviposição e herbivoria+oviposição das cultivares Dowling, IAC100 e Silvânia. O aumento dos voláteis liberados por plantas danificadas da cultivar Dowling foi significativo depois de 48 hr. Para as cultivares IAC100 e Silvânia não houve diferença significativa entre os tratamentos e nas interações com o tempo (Manova para medidas repetidas,  $P>0.05$ ). Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada hora não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Tabela 1. Média  $\pm$  erro padrão da média (em ng no intervalo entre 72 e 96 hr após o início dos tratamentos) dos compostos voláteis coletados de plantas sadias (Cont) ou submetidas à Herbivoria (Herb), Oviposição (Ovi) e Herbivoria+Oviposição (HerbOvi) para as cultivares de soja Dowling, IAC100 e Silvânia. Experimento realizado no Laboratório de Semioquímicos – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF

Compostos	(ng 72- 96 hr) <sup>1</sup>			
	Cont	Herb	Ovi	HerbOvip
<b>Dowling</b>				
Canfeno	14.8 $\pm$ 2.4	17.9 $\pm$ 3.8	37.1 $\pm$ 9.6	26.4 $\pm$ 8.2
Benzaldeído	13.6 $\pm$ 2.9	20.5 $\pm$ 4.2	18.4 $\pm$ 5.1	27.4 $\pm$ 9.9
(Z)-3-Acetato de hexenila	92.5 $\pm$ 19.0 <sup>a</sup>	226.4 $\pm$ 64.9 <sup>b</sup>	185.0 $\pm$ 39.2 <sup>a</sup>	278.6 $\pm$ 51.4 <sup>b</sup>
Limoneno	31.2 $\pm$ 6.8	41.1 $\pm$ 8.0	62.9 $\pm$ 11.9	48.0 $\pm$ 9.5
(Z)-2-Octen-1-ol*	20.2 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	39.4 $\pm$ 10.9 <sup>a</sup>	85.4 $\pm$ 16.9 <sup>b</sup>	70.7 $\pm$ 17.2 <sup>b</sup>
(E)-2-Octen-1-ol*	50.6 $\pm$ 8.5 <sup>a</sup>	117.3 $\pm$ 21.4 <sup>b</sup>	218.9 $\pm$ 52.9 <sup>b</sup>	204.8 $\pm$ 60.6 <sup>b</sup>
Salicilato de metila	115.3 $\pm$ 8.4 <sup>a</sup>	437.8 $\pm$ 43.8 <sup>b</sup>	240.8 $\pm$ 39.5 <sup>b</sup>	462.6 $\pm$ 61.4 <sup>b</sup>
Benzotiazol	13.4 $\pm$ 2.4	24.6 $\pm$ 3.6	35.7 $\pm$ 14.1	15.0 $\pm$ 2.6
(E)-2-Decenal	9.1 $\pm$ 3.4	5.5 $\pm$ 1.3	17.9 $\pm$ 4.4	16.7 $\pm$ 4.8
$\beta$ -Cariofileno	30.2 $\pm$ 8.5	54.2 $\pm$ 13.2	57.8 $\pm$ 12.9	50.6 $\pm$ 11.5
$\alpha$ -Humuleno	42.6 $\pm$ 7.0	52.0 $\pm$ 10.6	92.1 $\pm$ 22.0	85.6 $\pm$ 16.9
(E,E)- $\alpha$ -Farneseno	213.8 $\pm$ 24.0 <sup>a</sup>	623.4 $\pm$ 75.1 <sup>b</sup>	526.2 $\pm$ 74.8 <sup>b</sup>	562.2 $\pm$ 66.9 <sup>b</sup>
TMTT	55.9 $\pm$ 10.7	114.0 $\pm$ 36.8	94.2 $\pm$ 25.9	90.9 $\pm$ 22.9
<b>IAC100</b>				
(E)-2-Hexenal	16.6 $\pm$ 7.9	32.0 $\pm$ 18.6	12.2 $\pm$ 6.3	39.1 $\pm$ 18.1
(E)-2-Hexen-1-ol	24.7 $\pm$ 10.4	12.2 $\pm$ 4.4	15.1 $\pm$ 6.4	13.5 $\pm$ 4.4
(Z)-3-Hexen-1-ol	29.8 $\pm$ 18.8	10.6 $\pm$ 2.6	20.3 $\pm$ 12.5	10.7 $\pm$ 2.4
Canfeno	36.7 $\pm$ 13.4	48.4 $\pm$ 22.2	47.6 $\pm$ 16.9	29.1 $\pm$ 11.5
Benzaldeído	37.2 $\pm$ 18.1	19.1 $\pm$ 4.7	32.1 $\pm$ 12.8	19.9 $\pm$ 4.2
(Z)-3-Acetato de hexenila	40.8 $\pm$ 16.3 <sup>a</sup>	123.3 $\pm$ 52.6 <sup>b</sup>	73.3 $\pm$ 19.0 <sup>a</sup>	97.2 $\pm$ 30.9 <sup>b</sup>
(E)-2-Acetato de hexenila	22.7 $\pm$ 16.8	52.8 $\pm$ 34.9	26.4 $\pm$ 11.9	17.2 $\pm$ 1.7
Limoneno	87.7 $\pm$ 37.9	54.5 $\pm$ 13.3	110.6 $\pm$ 31.8	64.4 $\pm$ 22.5
(E)-Ocimeno	51.1 $\pm$ 13.3	65.8 $\pm$ 15.6	102.3 $\pm$ 60.4	112.5 $\pm$ 18.3
Linalol	64.5 $\pm$ 18.4	94.0 $\pm$ 22.9	166.3 $\pm$ 58.8	118.9 $\pm$ 22.7
Salicilato de metila	36.6 $\pm$ 15.2 <sup>a</sup>	123.9 $\pm$ 9.8 <sup>b</sup>	78.9 $\pm$ 30.8 <sup>a</sup>	135.1 $\pm$ 50.1 <sup>b</sup>
Benzotiazol	15.7 $\pm$ 4.7	21.3 $\pm$ 42.6	14.5 $\pm$ 4.3	16.7 $\pm$ 4.2
Indol	20.0 $\pm$ 8.2	12.6 $\pm$ 3.7	21.0 $\pm$ 8.2	19.7 $\pm$ 4.2
$\beta$ -Cariofileno	101.9 $\pm$ 43.5	89.2 $\pm$ 5.0	83.6 $\pm$ 21.3	90.3 $\pm$ 22.3
Geranil acetona	107.7 $\pm$ 36.5	91.3 $\pm$ 28.3	122.5 $\pm$ 27.2	105.8 $\pm$ 26.8
$\alpha$ -Humuleno	271.9 $\pm$ 68.7	126.9 $\pm$ 45.3	198.4 $\pm$ 65.4	279.2 $\pm$ 77.2
(E,E)- $\alpha$ -Farneseno	149.5 $\pm$ 42.7 <sup>a</sup>	362.9 $\pm$ 86.8 <sup>b</sup>	247.9 $\pm$ 64.3 <sup>a</sup>	354.2 $\pm$ 62.4 <sup>b</sup>
TMTT	67.3 $\pm$ 24.1	82.9 $\pm$ 18.9	84.1 $\pm$ 20.3	70.3 $\pm$ 17.9

Tabela 1. Continuação

Compostos	(ng 72- 96 hr) <sup>1</sup>			
	Cont	Herb	Ovi	HerbOvi
<b>Silvânia</b>				
(E)-2-Hexenal	26.1 ± 12.1	52.7 ± 19.8	64.7 ± 23.6	47.6 ± 18.7
(E)-2-Hexen-1-ol	35.7 ± 7.6	20.9 ± 6.0	41.2 ± 11.4	45.5 ± 13.1
(Z)-3-Hexen-1-ol	26.2 ± 7.1	20.8 ± 9.8	42.4 ± 12.8	32.8 ± 10.2
Canfeno	42.9 ± 6.1	83.2 ± 36.2	79.6 ± 24.9	46.5 ± 7.7
Benzaldeído	21.0 ± 4.3	19.0 ± 2.7	50.2 ± 11.3	48.0 ± 14.2
(Z)-3-Acetato de hexenila	86.2 ± 19.4	52.1 ± 22.9	75.6 ± 24.5	76.4 ± 30.9
Limoneno	74.4 ± 16.9	96.9 ± 18.6	175.3 ± 38.8	137.2 ± 28.6
(E)-Ocimeno	105.5 ± 22.2	119.7 ± 26.1	179.9 ± 18.9	152.9 ± 32.9
Linalol	134.7 ± 20.6	144.9 ± 24.0	169.3 ± 27.9	141.5 ± 21.3
DMNT	41.5 ± 11.7	46.2 ± 11.1	61.0 ± 9.9	44.0 ± 9.2
Salicilato de metila	30.1 ± 8.8	46.3 ± 11.8	45.9 ± 11.3	46.5 ± 11.6
Benzotiazol	13.9 ± 2.9	19.4 ± 6.3	13.4 ± 3.5	23.7 ± 8.9
β-Cariofileno	31.3 ± 9.2	92.1 ± 37.2	41.5 ± 13.1	42.7 ± 18.2
Geranil acetona	138.8 ± 30.8	164.5 ± 29.2	167.1 ± 38.5	138.6 ± 38.3
α-Humuleno	140.0 ± 27.3	192.6 ± 39.8	226.0 ± 62.9	219.7 ± 53.0
(E,E)-α-Farneseno	153.8 ± 25.1	123.3 ± 19.2	222.8 ± 46.5	201.8 ± 44.4
TMTT	66.7 ± 15.8	44.6 ± 15.1	72.4 ± 19.4	49.8 ± 17.4

<sup>1</sup>Valores médios (± EPM) calculados a partir de 22 amostras obtidas na aeração das plantas de soja no intervalo de 72-96 hr depois do início do dano. Médias seguidas pela mesma letra dentro da linha não são estatisticamente diferentes pela Manova com  $P > 0.05$ . TMTT ((E,E)-4,8,12-trimetiltrideca-1,3,7,11-tetraeno), DMNT ((E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno).

\*Tentativa de identificação dos compostos.

A análise de PRC dos voláteis liberados pelas plantas mostrou que houve diferença entre os tratamentos ao longo do tempo para a cv Dowling. Da variância total existente no conjunto de dados relativos à composição da mistura dos voláteis liberados, 8.6% foi explicado pelo tempo e 12% foi explicado pela indução dos tratamentos. A variância apresentada no primeiro eixo da PRC foi significativa (teste de permutação de Monte Carlo  $F=35.0$ ,  $P=0.001$ ), e explicou 63.0% da variação na composição da mistura devido à interação entre tratamentos e tempo (Fig. 12). Não houve diferença significativa entre os tratamentos 24 hr após a injúria, indicando que a mistura de voláteis induzida pelos quatro tratamentos foi similar. Entretanto, a partir de 48 hr, o diagrama de PRC mostrou divergência significativa entre as curvas dos tratamentos quando comparadas à curva controle (planta não atacada de soja) (Fig. 12).

Os pesos das variáveis ( $b_k$ ) representados no lado direito do diagrama de PRC para a cv Dowling foram positivos (Fig. 12), indicando que todos os compostos foram associados positivamente com o padrão de mudanças na mistura dos voláteis, ou seja, seguiram a mesma tendência das curvas de tratamentos que divergiram do controle. Entretanto, somente os compostos com pesos absolutos maiores que 0.5 contribuíram efetivamente para os resultados observados no diagrama de PRC (van den Brink e ter Braak, 1999) e quanto maior o valor de  $b_k$ , maior a influência do referido composto no padrão de liberação da mistura dos voláteis. Deste modo, (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno, salicilato de metila, (*Z*)-3-acetato de hexenila e (*E*)-2-octen-1-ol, foram os principais compostos que contribuíram (valor absoluto de  $b_k > 1.0$ ) para as diferenças entre os tratamentos e o controle na cv Dowling (Fig. 12).

Observou-se ainda interação significativa entre tratamento e tempo (Manova para medidas repetidas,  $P < 0.05$ ) para cada um dos principais compostos liberados pela cv Dowling (Fig. 13). Plantas submetidas à Herb e HerbOvip diferiram das plantas não atacadas (contraste dentro do tempo; teste  $t$ ,  $P < 0.05$ ), liberando quantidades maiores dos mesmos compostos, como previamente indicado pela análise de PRC (Fig. 13).

Não foram detectados efeitos significativos de tratamento e de sua interação com o tempo sobre a composição da mistura dos voláteis na análise de PRC para as cvs IAC100 ( $F=1.9$ ,  $P=0.073$ ; Tabela 1, Anexo 3.9) e Silvânia ( $F=10.4$ ,  $P=0.104$ ; Tabela 1, Anexo 3.10). Os pesos das variáveis ( $b_k$ ) gerados no diagrama de PRC apresentaram valores baixos, variando entre -0.5 e 0.5, para todos os compostos amostrados (Anexos 3.9 e 3.10).

Apesar de não ter sido observada diferença significativa pela análise de PRC para a cv IAC100, alguns compostos selecionados foram analisados individualmente por Manova para medidas repetidas ( $P < 0.05$ ). Constatou-se que (*Z*)-3-acetato de hexenila ( $t=2.03$ ,  $P=0.06$ ), salicilato de metila ( $t=2.16$ ,  $P=0.03$ ) e (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno ( $t=1.91$ ,  $P=0.06$ ) em 72 hr foram diferentes ou marginalmente não significativos em Herb quando comparado ao Cont. Os compostos (*Z*)-3-Acetato de hexenila ( $t=2.07$ ,  $P=0.04$ ), salicilato de metila ( $t=1.83$ ,  $P=0.07$ ) e (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno ( $t=2.82$ ,  $P=0.006$ ) em 96 hr foram diferentes ou marginalmente não significativos para HerbOvip quando comparado com o Cont, e (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno ( $t=2.32$ ,  $P=0.02$ ) para Herb em 96 hr quando comparado com o Cont. Os compostos liberados pela cv Silvânia também foram submetidos à Manova para medidas repetidas, mas não houve diferença significativa entre tratamentos para nenhum composto.

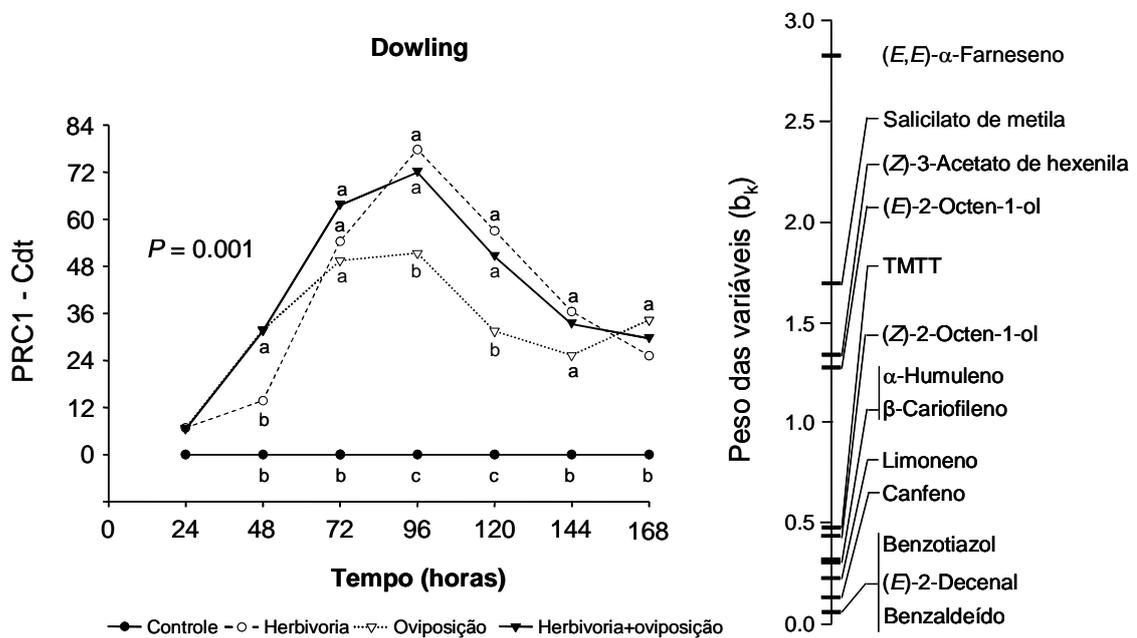


Fig. 12. Diagrama de PRC e peso das variáveis ( $b_k$ ), baseados na mistura dos voláteis liberados por plantas da cultivar Dowling, em sete dias de amostragem. As linhas representam o padrão de resposta das plantas de soja aos diferentes tratamentos no tempo. O valor de P indica a significância do primeiro eixo do diagrama de PRC sobre todas as horas, baseada no teste de permutação de Monte Carlo, com estatística semelhante ao teste F. Em cada hora, o valor de  $C_{dt}$  difere significativamente entre os tratamentos que não possuem a mesma letra (a-c); letras repetidas ou a ausência delas, dentro de cada tempo, mostram contrastes que não diferiram significativamente pelo teste de permutação de Monte Carlo, a 5% de probabilidade. Quanto maior (valor absoluto) o peso da variável (no caso, composto volátil), maior a contribuição desta no padrão de resposta dos tratamentos que diverge em relação ao comportamento do tratamento controle (no controle, linha  $C_{dt} = 0$ ) indicado na PRC.

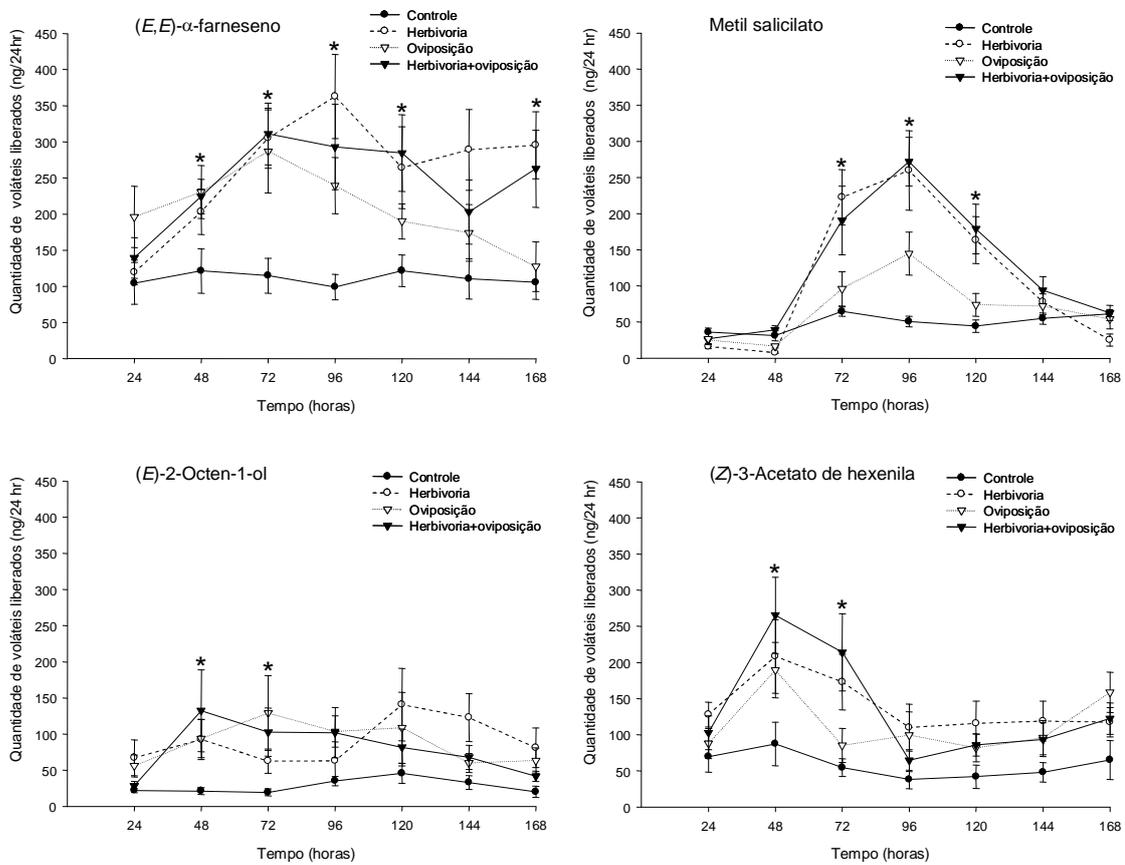


Fig. 13. Principais voláteis liberados (média±EPM) por plantas não atacadas (controle) e submetidas aos tratamentos de herbivoria, oviposição e herbivoria+oviposição da cultivar Dowling. As barras representam o erro padrão da média. Asterisco indica diferença significativa no contraste entre plantas não atacadas e atacadas dentro de cada hora, pelo teste *t*, a 5% de probabilidade.

## Discussão

As cultivares de soja, seja a suscetível Silvânia ou as resistentes Dowling e IAC100, tiveram respostas diferentes em relação a cada dano do herbívoro, desencadeando também uma resposta diferente no *T. podisi*, parasitóide de ovos de *E. heros*. Os resultados confirmam a hipótese que a indução da defesa indireta em resposta ao dano causado pelo herbívoro em cultivares resistentes de soja difere daquela da cultivar suscetível. Houve maior indução da defesa indireta; medida através da produção dos compostos voláteis e pela maior atratividade do parasitóide de ovos *T. podisi* para as cultivares de soja resistentes Dowling e IAC100 danificadas por herbivoria do que para as plantas não atacadas. Estudos com percevejos, soja e feijão mostraram que o dano de oviposição não induziu a defesa indireta das plantas (Colazza et al., 2004 a,b; Moraes et al., 2008). Os resultados obtidos neste trabalho concordam com esses anteriores já que após a oviposição do *E. heros* não houve resposta do parasitóide para as plantas contendo ovos do percevejo.

Os ovos deixados nas cultivares Dowling e IAC100 podem ter ativado uma outra rota metabólica, uma vez que o perfil químico foi diferente quando comparado plantas saudas com aquelas danificadas por herbivoria e herbivoria+oviposição. Moraes et al. (2008) sugeriram que o parasitóide *T. podisi* não foi atraído pela mistura de voláteis produzida pelos danos de herbivoria+oviposição e oviposição nas plantas de soja (cv BR16) provavelmente, devido ao desligamento da rota do jasmonato provocado pelo dano de oviposição. Porém, os resultados obtidos neste estudo sugerem que a oviposição não silencia a defesa da planta relacionada ao ácido jasmônico, uma vez que plantas com dano de herbivoria+oviposição também foram atrativas para o parasitóide de ovos.

A falta de atração do parasitóide para as plantas com oviposição poderia ser explicada se a resposta da planta não fosse sistêmica. A associação dos ovos com as folhas pode ocorrer de várias maneiras: eles podem ser afixados levemente ou firmemente ou, ainda, serem colocados sobre um dano foliar prévio ocasionado pelo herbívoro (Hilker e Meiners, 2006). Geralmente, a fêmea do percevejo não danifica a folha antes de depositar seus ovos, mas quando esses são colocados nas folhas, forma-se uma necrose localizada embaixo e ao redor dos ovos, o que pode provocar uma resposta mais sensível [“hypersensitive response” (HR)] da planta. Na HR a planta ativa a sua defesa somente na área danificada, isolando-a e impedindo que a injúria se espalhe por uma área maior, similar ao que ocorre quando as plantas se defendem de fitopatógenos

(Walling, 2000; Kaloshian e Walling, 2005). As imagens obtidas no estudo de microscopia eletrônica de varredura mostram a deformação das células epidérmicas no sítio de oviposição e ao redor do mesmo, sugerindo a ocorrência da necrose nas cultivares de soja Dowling, IAC100 e Silvânia, o que pode ter levado ao isolamento da área necrosada e a não ativação do sistema de defesa da planta.

É necessário investigar o que induz as plantas de soja a responderem com necrose ao dano de oviposição; mas a indução da HR poderia estar relacionada à presença de microorganismos ou de compostos químicos na secreção do oviduto. Balbyshev e Lorenzen, (1997) descreveram a formação de necrose em *Solanum* sp. (Sonalales: Solanaceae) em resposta à oviposição de *Leptinotarsa decemlineata* Say, 1824 (Coleoptera: Chrysomelidae), e sugeriram que o indutor na resposta está localizado na cola utilizada para afixar a massa de ovos na folha, uma vez que ovos isolados não estimularam a necrose do tecido. Estudos relacionados à composição química tanto da saliva quanto da secreção do oviduto estão sendo conduzidos na tentativa de elucidar este fenômeno.

O parasitóide de ovos *T. podisi* respondeu às plantas danificadas somente por herbivoria para as cvs Dowling e IAC100. Resultados semelhantes foram encontrados por Moraes et al. (2008) ao estudarem a cv de soja BR16. Porém, na literatura nem sempre a injúria da herbivoria sozinha é suficiente para desencadear a resposta do parasitóide. Para a atração do parasitóide de ovos *Trissolcus basalis* (Wollaston, 1858) (Hymenoptera: Scelionidae) aos voláteis de plantas de feijão vagem, *Vicia faba* L., 1753 (Fabales: Fabaceae) foi necessária a combinação das injúrias de herbivoria+oviposição (Colazza et al., 2004a). A injúria de herbivoria em ulmeiro *Ulmus minor* Miller, 1768 (Rosales: Ulmaceae) também não foi suficiente para que a planta emitisse voláteis atrativos para o parasitóide de ovos *Oomyzus gallerucae* (Fonscolombe, 1832) (Hymenoptera: Eulophidae) (Meiners e Hilker, 1997).

Os resultados obtidos indicam que, embora o parasitóide *T. podisi* não tenha sido atraído pelos voláteis liberados pela planta após a oviposição, ele pode chegar à planta antes que o percevejo oviposite, uma vez que o parasitóide responde aos voláteis liberados pelas plantas danificadas por herbivoria, o que pode indicar a presença futura de ovos no local. É vantajoso para o parasitóide detectar os voláteis induzidos pela planta assim que os ovos são deixados na mesma pelo herbívoro (Hilker et al., 2002b). A planta com defesa induzida pode ainda aumentar seu sucesso quando for capaz de atrair o inimigo natural para os ovos do herbívoro antes que a injúria seja grande, ou

seja, antes que os ovos eclodam e que as formas imaturas do herbívoro comecem a se alimentar da planta (Vinson, 1998).

As injúrias causadas pela herbivoria e pela oviposição podem atingir diferentes estruturas morfológicas das plantas de soja. Com a herbivoria, os tecidos condutores internos, xilema e floema, provavelmente são atingidos e com a retirada da probóscide da folha os tecidos internos ficam expostos, podendo favorecer a entrada de fitopatógenos no local. No presente trabalho foi observado que, em relação à oviposição, a cola utilizada na fixação dos ovos se adere fortemente à folha e danifica as células ao redor e no sítio de oviposição. Já as células ao redor da região perfurada pela probóscide permanecem intactas. As injúrias são diferentes quanto à modificação que causam nas células da folha e, podem estar relacionados com a liberação diferenciada de compostos voláteis. Porém, novos estudos são necessários para investigar o grau de extensão do dano no interior das células, através de cortes morfológicos das folhas danificadas.

A análise de PRC usada neste estudo mostrou os principais compostos induzidos pelos danos do herbívoro e a interação entre o tempo do dano e os voláteis liberados pelas plantas de soja. Essa análise multivariada é comumente usada para auxiliar nas avaliações do impacto de poluentes nas comunidades aquáticas e terrestres em estudos de ecotoxicologia (van den Brink e ter Braak, 1999; van den Brink et al., 2003), e tem sido aplicada também para outros aspectos ecológicos (Torres e Ruberson, 2005; Poelman et al., 2010). A grande vantagem da PRC comparada com outras análises multivariadas é a possibilidade de avaliar os compostos ao longo do tempo e a importância de cada composto na mistura dos voláteis e, ainda, não tem limitação no número das variáveis ou da necessidade de distribuição normal dos dados.

Os resultados da PRC sugerem que o aumento dos quatro compostos (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno, salicilato de metila, (*Z*)-3-acetato de hexenila e (*E*)-2-octen-1-ol na mistura total colaborou para a atração do parasitóide de ovos *T. podisi*. Entretanto a função desses compostos, individualmente, ainda precisa ser avaliada. A atração de parasitóides e predadores aos voláteis induzidos pelos herbívoros é frequentemente atribuída à contribuição relativa de cada composto na mistura (D'Alessandro et al., 2006, 2009; Pareja et al., 2009) e nem todos os compostos induzidos pelo dano são importantes para mudar o comportamento do inseto. Por exemplo, dois compostos importantes (majoritários) na mistura de voláteis induzidos por herbívoro, indol no milho, *Zea mays* L., 1825 (Poales: Poaceae) e salicilato de metila em *Arabidopsis sp.* L. (Brassicales:

Brassicaceae), não foram os responsáveis pela atração dos parasitóides testados (D'Alessandro et al., 2006; Snoeren et al., 2010, respectivamente).

O parasitóide *T. podisi* não fez distinção entre os odores das plantas atacadas ou não atacadas para nenhum tratamento na cv Silvânia, provavelmente porque não há diferença entre os compostos liberados por plantas danificadas e sadias desta cultivar. Segundo Vet et al. (1998) se o inseto não discrimina entre fontes de odores, é porque ele não é capaz de fazê-lo ou porque os odores não estão na concentração ou na proporção corretas para serem percebidas e, no caso, não são utilizados pelo inimigo natural como pistas que indicam a presença do hospedeiro na área. *Telenomus podisi* respondeu às cultivares de soja Dowling e IAC100, indicando deste modo, que o inseto foi capaz de distinguir as fontes de odor, e desde que os bioensaios foram feitos sob as mesmas condições também para a cv Silvânia, os resultados sugerem que esta cultivar de soja não teve sua defesa induzida pelo ataque do herbívoro.

Os voláteis da planta induzidos pela ação dos herbívoros são um dos componentes importantes na habilidade dos parasitóides de localizarem seus hospedeiros. Portanto, a possibilidade de manter e ainda aumentar a atração dos inimigos naturais para a cultura poderia ser considerada uma importante característica durante o desenvolvimento de novas variedades de plantas. Porém, estas possibilidades podem algumas vezes apresentar a desvantagem pelos efeitos que estas mudanças causam na atração dos herbívoros para as plantas, pois os voláteis que atraem os inimigos naturais poderiam, também, atrair maior número de herbívoros (Cortesero et al., 2000). Por exemplo, a traça-da-uva *Lobesia botrana* (Denis e Schiffermüller, 1775) (Lepidoptera: Tortricidae) usa os voláteis liberados pelas inflorescências e pelos frutos de duas variedades de uva na busca e seleção de sítios para oviposição (Anfora et al., 2009).

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que o herbívoro *E. heros* não usou os voláteis induzidos pelas suas injúrias como pistas para distinguir entre plantas danificadas e não danificadas. É vantajoso para os herbívoros evitarem colocar seus ovos em plantas com defesas induzidas, porque estas plantas além de hospedarem outros herbívoros, o que aumenta a competição por alimento para a prole, podem ainda aumentar a chance de atrair os inimigos naturais (Thaler, 1999). As plantas com defesas induzidas por *Empoasca fabae* (Harris, 1841) (Hemiptera: Cicadellidae) interferiram no estabelecimento do besouro *Leptinotarsa decemlineata* (Say, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) (herbívoro que chegou depois) na planta (Kaplan et al., 2007). A ação

dessa defesa aumentou o tempo de desenvolvimento das larvas e, assim, o tempo de exposição destas ao predador *P. maculiventris*. As fêmeas de *E. heros* podem utilizar outras pistas das plantas, como por exemplo, atributos morfológicos ou compostos não voláteis, que farão com que elas evitem ovipositar nas plantas que possuem essas características desfavoráveis à sobrevivência dos adultos que visitam as plantas ou até mesmo ao desenvolvimento da prole.

Fêmeas de *E. heros* não mostraram preferência entre plantas danificadas ou não, nem tampouco entre as cultivares de soja. Entretanto, elas responderam preferencialmente à soja não atacada quando comparada com o ar, sugerindo que o herbívoro usa os voláteis liberados pelas plantas de soja para localizar seu hospedeiro. Esses resultados estão de acordo com o obtido no teste de preferência para oviposição, apresentado no Capítulo I, onde não houve diferença no número de ovos deixados pelas fêmeas nas diferentes cultivares, quando as plantas foram oferecidas ao mesmo tempo. Mas, quando estas foram testadas separadamente, maior número de ovos foi observado na cultivar Silvânia, sugerindo a presença de alguma característica nesta cultivar, provavelmente não relacionada aos voláteis da planta, que levou a maior deposição de ovos pelas fêmeas do percevejo, que não foi percebida quando as três cultivares juntas se encontravam juntas.

As atividades de herbivoria e herbivoria+oviposição causadas por fêmeas de *E. heros* nas cultivares de soja Dowling e IAC100, induziram a defesa indireta das mesmas, uma vez que a mistura dos voláteis liberada pelas plantas atraíu o parasitóide de ovos *T. podisi*. A atração dos parasitóides em resposta à injúria do herbívoro, confere alto valor adaptativo para as plantas que sinalizam o ataque, pois estas poderão ter maior chance de se livrarem mais rapidamente dos seus agressores. As cultivares Dowling e IAC100 liberaram maiores quantidades dos compostos: (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno, salicilato de metila, (*Z*)-3-acetato de hexenila e (*E*)-2-octen-1-ol. Estudos adicionais ainda são necessários, para investigar o papel de cada um desses compostos na atração do parasitóide *T. podisi*. A confirmar os compostos determinantes nessa atração, esses voláteis poderiam auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias para o controle do *E. heros* na cultura de soja.

## Capítulo III

### **Efeito dos Compostos (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno, salicilato de metila e (*Z*)-3-acetato de hexenila no Comportamento do *Telenomus podisi* Parasitóide de Ovos de *Euschistus heros***

#### **Introdução**

O processo de seleção do hospedeiro pelo parasitóide de ovos envolve os comportamentos de localização e de reconhecimento antes mesmo da oviposição pelo herbívoro (Vinson, 1984, 1985). Em cada fase desse processo, estímulos físicos e químicos podem atuar como importantes pistas na alteração do comportamento de busca (Nelson e Roitberg, 1995; Vinson, 1998; Fatouros et al., 2008). Alguns estudos têm mostrado que o parasitóide de ovos *Telenomus podisi* (Ashmead, 1881) (Hymenoptera: Scelionidae), inimigo natural mais comum do percevejo marrom, *Euschistus heros* (Fabricius, 1794) (Hemiptera: Pentatomidae) (Corrêa-Ferreira, 1986; Peres e Corrêa-Ferreira, 2004) reconhece alguns sinais físicos e químicos emitidos pelo percevejo, e utiliza esses sinais na localização do hospedeiro durante o comportamento de busca (Borges et al., 1999, 2003; Laumann et al., 2009).

Plantas danificadas pelos herbívoros liberam uma mistura complexa de compostos orgânicos voláteis, que são utilizados por predadores e parasitóides como sinais, no forrageamento, que ajudam na localização de suas presas ou de seus hospedeiros (Dicke, 1999; D'Alessandro et al., 2009). Assim, os parasitóides podem utilizar os voláteis emitidos pelas plantas danificadas por seus herbívoros mais do que aqueles liberados pelo próprio hospedeiro, porque os primeiros são liberados em maior quantidade e seriam mais facilmente detectados (Vet e Dicke, 1992). Estudos mostraram que o parasitóide *T. podisi* também responde aos voláteis liberados pelas plantas após o ataque do percevejo marrom para diferentes cultivares (Moraes et al., 2005, 2008) e para plantas induzidas pelo fitormônio (*Z*)-jasmone (Moraes et al., 2009).

No entanto, para a maior parte dos estudos envolvendo interações tritróficas há pouco conhecimento sobre quais compostos da mistura dos voláteis estão envolvidos no comportamento de busca dos inimigos naturais dos herbívoros (Dicke e van Loon, 2000). Alguns trabalhos sugerem que o contexto químico; a concentração e principalmente a proporção relativa dos compostos liberados pelas plantas; em que esses voláteis são percebidos é importante para a resposta do parasitóide (Heil, 2004;

Hilker e Meiners, 2006). Entretanto, não houve diferença na atração do parasitóide *Cotesia marginiventris* (Cresson, 1865) (Hymenoptera: Braconidae) quando foram contrastados os extratos da planta induzida de milho, *Zea mays* L., 1825 (Poales: Poaceae), com baixa e alta concentração dos três principais sesquiterpenos da mistura dos voláteis e a remoção de um composto minoritário da mistura de voláteis tornou a planta não atrativa ao parasitóide (D'Alessandro e Turlings, 2005). As diferenças qualitativas na mistura dos voláteis, às vezes, podem ser mais importantes para a atração do parasitóide do que aquelas quantitativas (Fritzsche-Hoballah et al., 2002).

Por outro lado, a variação na atração dos inimigos naturais entre plantas sadias ou danificadas é atribuída à presença e à abundância relativa dos compostos atrativos dentro da mistura (D'Alessandro et al., 2009). Em planta de milho, fêmeas com experiência de oviposição do parasitóide *C. marginiventris*, mostraram preferência pela mistura dos voláteis verdes das plantas e dos terpenos, porém as fêmeas do parasitóide *Microplitis rufiventris* Kokujev, 1914 (Hymenoptera: Braconidae) preferiram o tratamento contendo os voláteis verdes das plantas (Hoballah e Turlings, 2005). Alguns outros trabalhos têm sido conduzidos para investigar a importância de determinado volátil na atração dos inimigos naturais utilizando, por exemplo, os compostos sintéticos isolados ou nas misturas, ou ainda induzindo algumas substâncias das misturas (D'Alessandro e Turlings, 2006; Schroeder e Hilker, 2008; Snoeren et al., 2010).

A identificação dos compostos envolvidos na atração do parasitóide é fundamental para o entendimento do processo de busca pelo hospedeiro e pode ser usado na manipulação dos inimigos naturais no campo (Turlings e Ton, 2006; Degenhardt et al., 2009). O desenvolvimento de cultivares com a capacidade de liberar compostos defensivos que atraiam os inimigos naturais ou a aplicação da forma sintética desses compostos no campo poderia fazer parte de uma estratégia dentro do manejo integrado de pragas da soja para o controle do *E. heros*, através da atração do parasitóide *T. podisi*.

No Capítulo II os resultados mostraram que os compostos (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno, salicilato de metila e (*Z*)-3-acetato de hexenila mostraram diferenças significativas entre plantas atacadas e não atacadas para a cv de soja Dowling (análise PRC). Considerando que o *T. podisi* respondeu às plantas induzidas por herbivoria e herbivoria+oviposição para a cv Dowling, esses compostos foram selecionados com o objetivo de avaliar: (i) o efeito dos mesmos, individualmente, no comportamento das fêmeas do *T. podisi*; (ii) o efeito de diferentes concentrações na resposta dos insetos e (iii) a resposta do

parasitóide *T. podisi* às diferentes misturas dos compostos. A hipótese testada foi que os compostos (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno, salicilato de metila e/ou (*Z*)-3-acetato de hexenila modificam o comportamento de resposta do parasitóide *T. podisi*. O parasitóide provavelmente será atraído para os compostos testados, uma vez que houve resposta para plantas que liberaram os mesmos em maior quantidade, conforme resultado apresentado no Capítulo II. Espera-se também que a resposta do parasitóide seja maior para a mistura do que para cada composto isoladamente, levando em consideração que os mesmos são liberados em conjunto pelas plantas.

## **Material e Métodos**

As fêmeas do parasitóide *T. podisi* utilizadas nos experimentos foram mantidas nas mesmas condições de laboratório descritas no Capítulo II.

### *Bioensaios com compostos voláteis individuais da soja*

Os experimentos foram conduzidos nos meses de junho e julho de 2010. Para determinar o efeito dos compostos (*Z*)-3-acetato de hexenila, salicilato de metila e (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno no comportamento de busca do parasitóide, foram feitos bioensaios com os padrões autênticos dos compostos, utilizando-se um olfatômetro na forma de “Y” (descrito no Capítulo II).

Os compostos usados nos bioensaios foram testados nas concentrações de  $1 \times 10^{-1}$  M,  $1 \times 10^{-2}$  M,  $1 \times 10^{-3}$  M,  $1 \times 10^{-4}$  M e  $1 \times 10^{-5}$  M. Essas concentrações foram selecionadas baseadas na concentração média de cada composto nas amostras obtidas na coleta de voláteis das plantas, nos horários de 72 e 96 hr de aeração (Ver Tabela 1 no Capítulo II). Cada composto foi testado usando o *n*-hexano, como controle. Foram feitas 40 repetições para cada composto em cada concentração. Uma alíquota de 10  $\mu$ l das soluções foi aplicada em pedaços de 1 cm<sup>2</sup> de papel de filtro (80 g/m<sup>2</sup> de granatura, 205  $\mu$ m de espessura, 14  $\mu$ m valor médio dos poros Qualy J Pro Lab), que permaneceu à temperatura ambiente durante 1 min antes de ser inserido na seringa conectada ao braço do olfatômetro, permitindo-se assim, a evaporação do solvente. O mesmo procedimento foi feito para o papel de filtro contendo somente o solvente *n*-hexano. Os papéis de filtro contendo o composto testado e o solvente, bem como todo o sistema do olfatômetro foram trocados a cada cinco bioensaios.

Uma única fêmea do parasitóide foi observada por 600 seg. O registro da primeira escolha foi feito quando a fêmea entrou e permaneceu em um dos braços do

olfatômetro por pelo menos 20 seg. O tempo de residência, tempo em que o mesmo permanece em cada braço do olfatômetro foi medido. Cada fêmea foi usada somente uma vez e a posição dos braços foi modificada a cada cinco repetições, para evitar os efeitos da posição da fonte sobre a escolha da fêmea.

#### *Bioensaios com misturas dos compostos voláteis da soja*

O experimento foi conduzido no período de novembro a dezembro de 2010. Baseado no resultado do experimento descrito acima, os bioensaios foram realizados com as misturas dos compostos testados anteriormente. As condições em que os bioensaios foram conduzidos seguiram as mesmas descritas nos experimentos com os compostos individuais. As misturas testadas foram: (1) (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno + salicilato de metila + (*Z*)-3-acetato de hexenila na concentração de  $1 \times 10^{-5} \text{M}$ , (2) (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno + salicilato de metila na concentração de  $1 \times 10^{-5} \text{M}$ , (3) (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno + (*Z*)-3-acetato de hexenila na concentração de  $1 \times 10^{-5} \text{M}$  e (4) salicilato de metila + (*Z*)-3-acetato de hexenila na concentração de  $1 \times 10^{-5} \text{M}$ .

Cada mistura foi testada usando o *n*-hexano e o (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno  $1 \times 10^{-5} \text{M}$ , como controles. Foram feitas 40 repetições para cada mistura. As variáveis analisadas foram primeira escolha do parasitóide e tempo de residência.

#### *Bioensaios com plantas e o composto (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno $1 \times 10^{-5} \text{M}$*

O experimento foi conduzido nos meses de dezembro de 2010 e janeiro de 2011. Para verificar o efeito do composto (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno  $1 \times 10^{-5} \text{M}$  contrastado com plantas de soja no comportamento de busca do parasitóide *T.podisi*, bioensaios foram conduzidos no olfatômetro de duas escolhas tipo “Y”. Foram realizados 40 bioensaios para os diferentes tratamentos: planta não atacada e planta submentida à herbivoria por 96 hr da cv Dowling. Plantas danificadas foram obtidas como descrito no Capítulo II.

As combinações foram: planta não atacada vs. (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno  $1 \times 10^{-5} \text{M}$  e planta com herbivoria por 96 hr vs. (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno  $1 \times 10^{-5} \text{M}$ . Foram registradas a primeira escolha e o tempo de residência em cada braço do olfatômetro. As condições em que os bioensaios foram conduzidos seguiram as mesmas descritas anteriormente.

#### *Análises estatísticas*

Os dados da primeira escolha do parasitóide foram analisados utilizando o teste *qui-quadrado* (a 5% de significância) com correção de Yates para continuidade (Zar

1998). O tempo de residência do parasitóide em cada braço do olfatômetro, tratamento e controle, foi submetido ao teste *t* pareado. As análises foram feitas utilizando o programa estatístico R 2.8.0 (R statistical Development Core Team, 2009).

## Resultados

### *Bioensaios com compostos voláteis individuais da soja*

O parasitóide de ovos *T. podisi* respondeu preferencialmente para o composto (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno na concentração de  $1 \times 10^{-5}$  M quando comparado com o hexano usado como controle ( $\chi^2 = 8.10$ ,  $P = 0.007$ ) (Fig.1). O tempo de residência diferiu significativamente entre os tratamentos também para a concentração de  $1 \times 10^{-5}$  M ( $t = -3.10$ ,  $P = 0.002$ ) (Fig.2), sendo possível observar que o tempo de permanência do parasitóide no braço do olfatômetro no tratamento foi maior do que no controle. Não foi observada diferença significativa nas demais concentrações para a primeira escolha e para o tempo de residência.

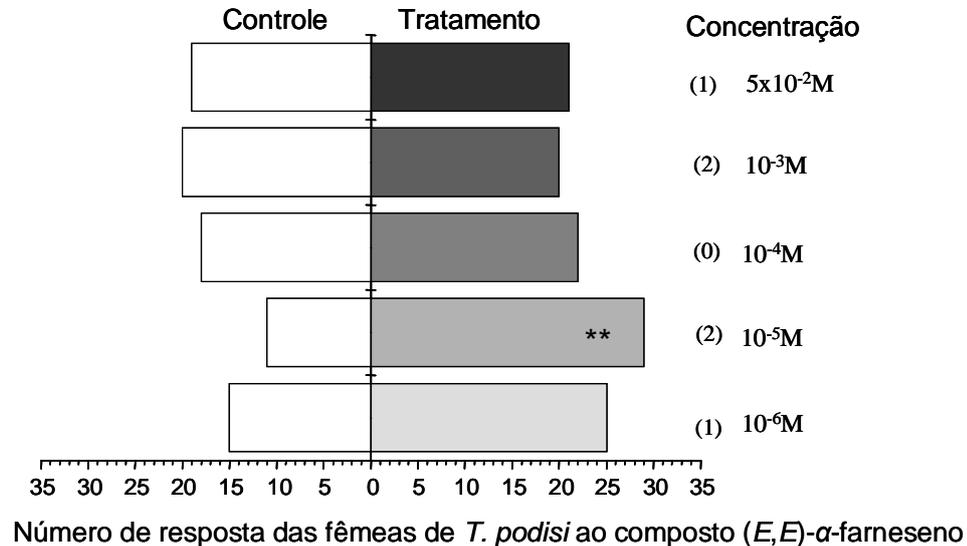


Fig. 1. Respostas de fêmeas de *Telenomus podisi* no olfatômetro em “Y” para diferentes concentrações do composto (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno ou hexano (controle). Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ), a 1% de probabilidade. Números entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum dos tratamentos.

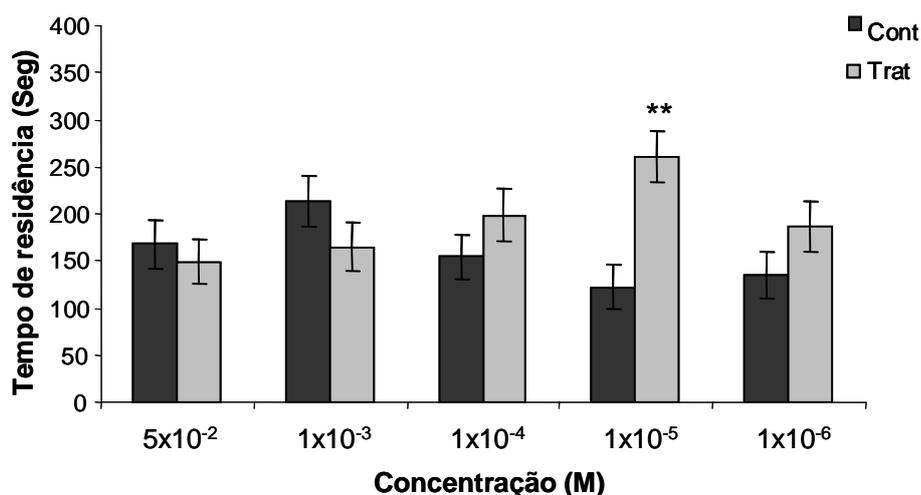


Fig. 2. Tempo de residência (em segundos) das fêmeas de *Telenomus podisi* no olfatômetro em “Y” para as diferentes concentrações do composto (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste *t* pareado, a 1% de probabilidade.

O parasitóide não mostrou preferência para o composto salicilato de metila nas concentrações avaliadas ( $\chi^2 > 0.05$ ) (Anexo 5.1). Porém, houve diferença significativa no tempo de residência do parasitóide entre os tratamentos nas concentrações de  $1 \times 10^{-4}$  M ( $t = 2.01$ ,  $P = 0.021$ ) e  $1 \times 10^{-5}$  M ( $t = -2.45$ ,  $P = 0.009$ ) (Fig. 3). Na concentração de  $1 \times 10^{-4}$  M, o parasitóide permaneceu mais tempo no braço com hexano (controle) do que no tratamento; sendo observado o inverso para a concentração de  $1 \times 10^{-5}$  M.

Para o composto (*Z*)-3-acetato de hexenila os tratamentos não diferiram entre si para todas as concentrações testadas ( $\chi^2 > 0.05$ ) (Anexo 5.2), não havendo também diferença estatística entre os tratamentos para o tempo de residência durante os bioensaios (teste *t* pareado,  $P > 0.05$ ) (Anexo 5.3).

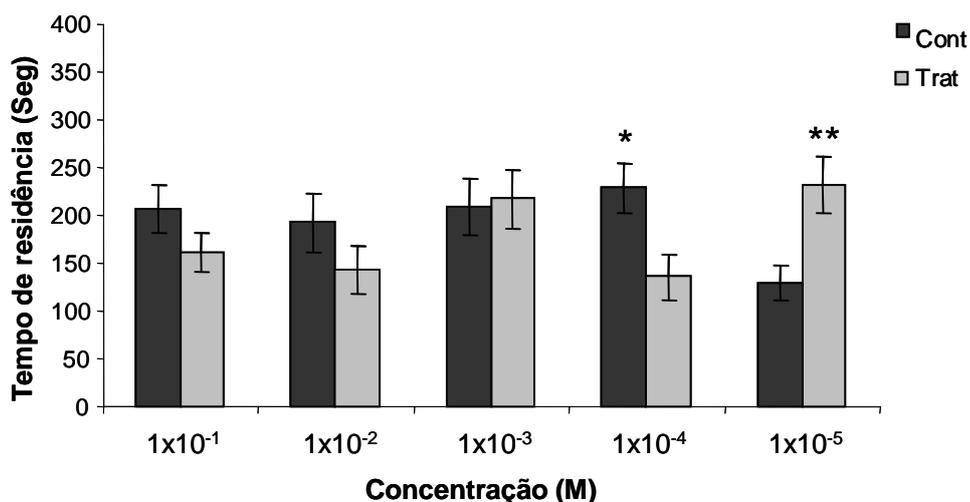


Fig. 3. Tempo de residência (em segundos) das fêmeas de *T. podisi* no olfatômetro em “Y” para as diferentes concentrações do composto salicilato de metila. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste *t* pareado, a 5% de probabilidade.

#### *Bioensaios com misturas dos compostos voláteis da soja*

Nos bioensaios onde as misturas dos compostos (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno, salicilato de metila e (*Z*)-3-acetato de hexenila foram contrastadas com o (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno na concentração de  $1 \times 10^{-5} \text{M}$ , como controle, as fêmeas do parasitóide não mostraram preferência entre o controle e as diferentes combinações dos compostos ( $\chi^2 > 0.05$ ) (Anexo 5.4). O tempo de residência nos braços do olfatômetro também não diferiu estatisticamente entre os tratamentos (teste *t* pareado,  $P > 0.05$ ) (Anexo 5.5).

Nos bioensaios em que o controle foi o composto hexano, o parasitóide não respondeu significativamente às diferentes combinações dos compostos para a primeira escolha ( $\chi^2 > 0.05$ ) (Anexo 5.6), porém permaneceu maior parte do tempo no braço do olfatômetro contendo a mistura dos compostos (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno e salicilato de metila (Fa+Ms), diferindo dos demais tratamentos ( $t = 3.01$ ,  $P = 0.042$ ) (Fig. 4).

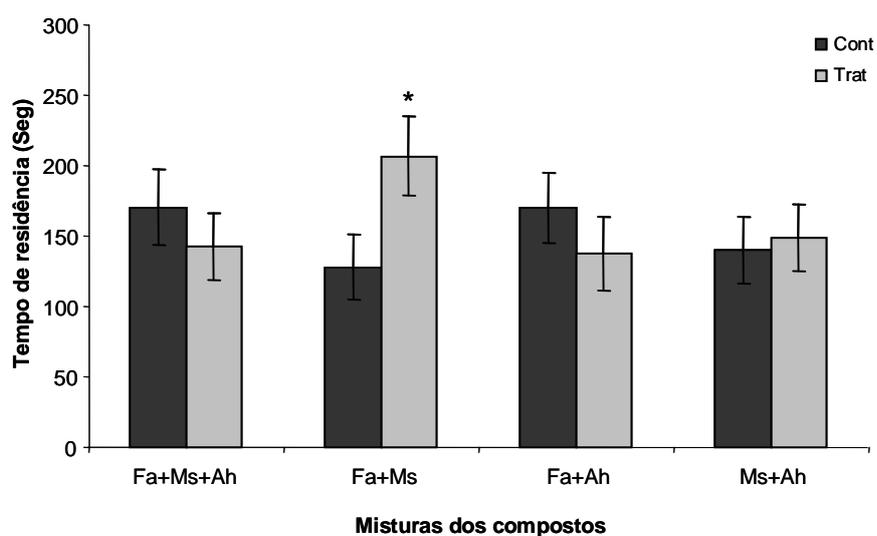


Fig. 4. Tempo de residência (em segundos) das fêmeas de *T. podisi* no olfatômetro em “Y” para as diferentes misturas dos compostos Fa: (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno, Ms: salicilato de metila e Ah: (*Z*)-3-acetato de hexenila; controle: hexano. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste *t* pareado, a 5% de probabilidade.

#### Bioensaios com plantas e o composto (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno $1 \times 10^{-5} M$

Para os bioensaios utilizando os tratamentos plantas danificadas por herbivoria vs. (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno  $1 \times 10^{-5} M$ , o parasitóide mostrou preferência pelo tratamento planta com herbivoria ( $\chi^2 = 14.4$ ,  $P < 0.001$ ) (Fig.5). Porém, nos bioensaios utilizando planta não atacada e o composto (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno  $1 \times 10^{-5} M$ , como controle, os resultados não foram significativos para a escolha inicial das fêmeas do parasitóide *T. podisi* ( $\chi^2 = 0.057$ ) (Fig. 5).

Houve diferença significativa também para o tempo de residência do parasitóide nos bioensaios utilizando plantas danificadas por herbivoria ( $t = -2.11$ ,  $P = 0.041$ ) (Fig. 6). Por outro lado, o tempo de residência nos bioensaios com plantas não atacadas não diferiu estatisticamente entre os tratamentos (teste *t* pareado,  $P > 0.05$ ) (Fig. 6).

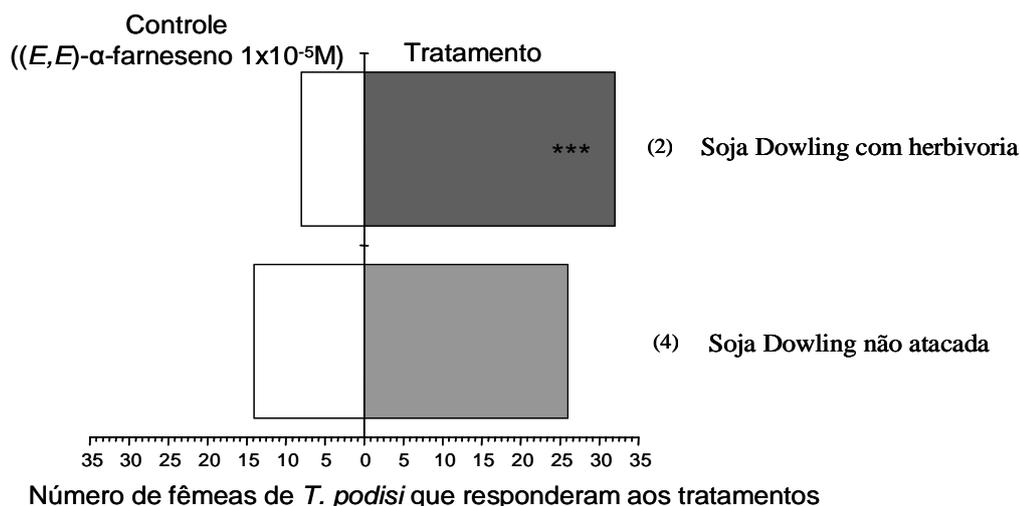


Fig. 5. Respostas de fêmeas de *T. podisi* no olfatômetro em Y para planta não atacada ou danificada por herbivoria; controle: (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno na concentração de  $1 \times 10^{-5}$ M. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ), a 0.1% de probabilidade. Números entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum dos tratamentos.

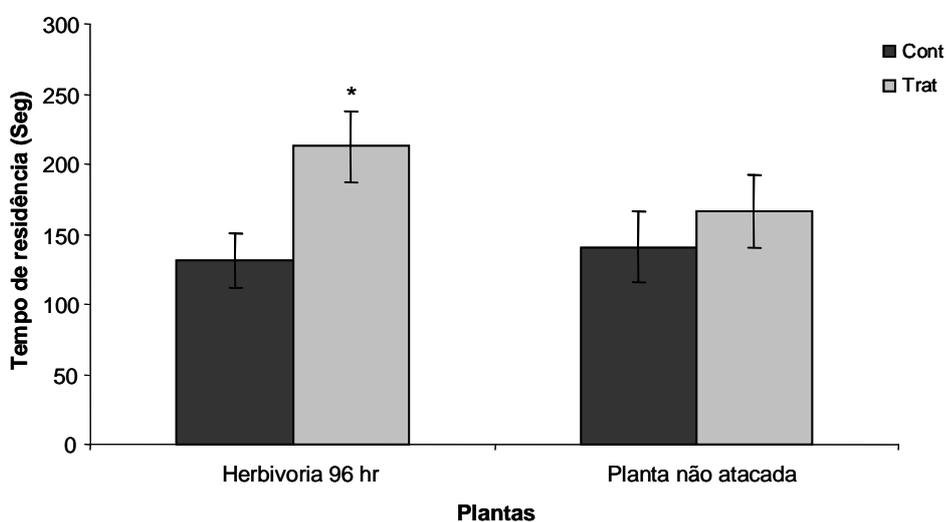


Fig. 6. Tempo de residência (em segundos) das fêmeas de *T. podisi* no olfatômetro em Y para planta não atacada ou com herbivoria; controle: (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno na concentração de  $1 \times 10^{-5}$ M. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste *t* pareado, a 5% de probabilidade.

## Discussão

Os inimigos naturais dos insetos herbívoros possuem a habilidade de responder aos voláteis das plantas induzidas pelo ataque dos mesmos (Heil, 2004; Hilker e Meiners, 2006). A cultivar de soja BR16 induziu a liberação de diferentes compostos, incluindo (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno, salicilato de metila e (*Z*)-3-acetato de hexenila (Moraes et al., 2008, 2009) e de acordo com os resultados do presente trabalho, podem mesmo estar envolvidos na atração do parasitóide *T. podisi*. Apesar do parasitóide não ter mostrado preferência para o salicilato de metila no presente trabalho, houve diferença no tempo de residência do mesmo no braço do olfatômetro com salicilato de metila a  $1 \times 10^{-4}$ M e  $1 \times 10^{-5}$ M. Observou-se ainda que o tempo de residência do parasitóide no braço do olfatômetro contendo a mistura (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno+salicilato de metila foi significativamente maior do que no controle (hexano). Estes resultados sugerem que o salicilato de metila e/ou o (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno modificam o comportamento do *T. podisi* e que, provavelmente, desempenham papéis importantes na atração deste parasitóide.

Os inimigos naturais parecem não utilizar todos os compostos presentes na mistura de voláteis induzidos liberados pela planta, como pistas para a localização do habitat ou do hospedeiro, sendo capazes de perceber diferenças qualitativas e quantitativas dos compostos presentes nas misturas. Estudos têm demonstrado a ocorrência de atração dos inimigos naturais para compostos como os voláteis verdes das plantas e terpenos. Por exemplo, foi observada a resposta do parasitóide de ovos *Anaphes iole* Girault, 1911 (Hymenoptera: Mymaridae) para os compostos (*Z*)-3-acetato de hexenila, salicilato de metila e  $\alpha$ -farneseno, em laboratório (Williams et al., 2008).

Entretanto, no geral, os compostos individuais sozinhos não são eficientes na atração do inimigo natural, como mostrado nos estudos com o parasitóide *Chrysonotomyia ruforum* (Krausse, 1917) (Hymenoptera: Eulophidae) cujas fêmeas não foram atraídas pelo (*E*)- $\beta$ -farneseno isolado; um composto liberado em quantidades significativamente elevadas nas plantas de *Pinus sylvestris* L., 1753 (Pinales: Pinaceae) (Mumm et al., 2003). Contudo, quando este sesquiterpeno foi oferecido em combinação com a mistura dos voláteis emitida pelas plantas não atacadas, houve a atração do parasitóide (Mumm e Hilker, 2005).

A resposta do parasitóide aos voláteis induzidos das plantas pode estar relacionada com a presença ou a ausência de alguns compostos que são importantes para a discriminação entre diferentes misturas pelo inimigo natural (Dicke, 1999) como, também, à ocorrência do composto abaixo da concentração limiar detectável pelo inseto

e pelos equipamentos de análise. A presença do indol; principal composto liberado por plantas com defesas induzidas de milho (Turlings et al., 1998a); não modificou o comportamento de atração do parasitóide *C. marginiventris*, apresentando inclusive efeito repelente para *Microplitis rufiventris* kokujev, 1836 (Hymenoptera: Braconidae) (D'Alessandro et al., 2006).

A presença de alguns compostos, dentro da mistura dos voláteis induzidos, pode causar efeito repelente aos parasitóides ou podem interferir na atratividade de outros compostos (D'Alessandro et al., 2009). Alguns estudos já mostraram o efeito repelente de alguns compostos sobre os parasitóides, como observado, por exemplo, em plantas modificadas de *Arabidopsis thaliana* L., 1758 (Brassicales: Brassicaceae) (Loivamäki et al., 2008; Snoeren et al., 2010). O parasitóide *T. podisi* não apresentou comportamento de repelência para os compostos testados neste estudo. Entretanto, a falta de resposta do parasitóide para as misturas avaliadas no trabalho pode ter ocorrido devido à interferência de um ou mais compostos da mistura ou então pela ausência de outros que ocorrem em menor quantidade, chamados de compostos minoritários, podendo ser o caso do composto (*E*)-2-octen-1-ol, que também contribuiu para a diferença na mistura dos voláteis liberados pelas plantas entre os tratamentos e o controle na cv Dowling.

Houve preferência do parasitóide *T. podisi* pelas plantas danificadas por herbivoria, sugerindo que a mistura liberada pela planta danificada foi mais atrativa ao *T. podisi* do que o (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno  $1 \times 10^{-5}$ M. Isso indica que outros compostos, além desses testados, são importantes para a atração do inimigo natural. Estes resultados sugerem também que os parasitóides utilizam determinados compostos, como indicadores da presença do hospedeiro, que são provavelmente os mais atrativos, mas podem também usar informações do “background” da planta, que são mais ocorrentes durante o comportamento de busca pelo hospedeiro (Röse et al., 1998; Turlings et al., 1998b; Pareja et al., 2009). O “background odor”, que são as pistas adicionais relacionadas aos voláteis do local onde o recurso é encontrado, pode aprimorar a resposta do inseto para encontrar ou verificar a disponibilidade do recurso. O sucesso na atração do inimigo natural requer uma combinação específica de compostos liberados (Schroder e Hilker, 2008).

Conhecimentos da defesa induzida de plantas podem ser aplicados no desenvolvimento de novas abordagens para o controle biológico sustentável. A seleção e a manipulação de genes da planta envolvidos na resistência possuem potencial de serem utilizadas no desenvolvimento de cultivares que sejam ao mesmo tempo

resistentes a herbívoros e a patógenos e atrativas aos inimigos naturais (Dicke e Hilker, 2003; Turlings e Ton, 2006). A manipulação genética das plantas pode levar à produção de compostos envolvidos na atração de diferentes inimigos naturais, como observado, por exemplo, em *A. thaliana*, onde houve a obtenção de plantas, com alta emissão de sesquiterpeno, que foram capazes de atrair o parasitóide *C. marginiventris* (Schnee et al., 2006) e em plantas de milho que após a inserção do gene sintase-E $\beta$ C passaram a emitir constitutivamente o sesquiterpeno (*E*)- $\beta$ -cariofileno, o que favoreceu a atração do nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis megidis* (Poinar, Jackson e Klein, 1987) (Rhabditida: Heterorhabditidae) (Degenhardt et al., 2009).

Outra possibilidade de utilização seria a liberação em campo desses compostos envolvidos na atração do parasitóide, visando aumentar o recrutamento dos inimigos naturais. Os compostos poderiam ser aplicados na forma de “spray” ou em sistemas de liberação controlada. Essa aplicação pode causar dois efeitos ao mesmo tempo, atrair diretamente os inimigos naturais e/ou induzir as plantas a produzirem mais voláteis, que atuariam também na atração dos inimigos naturais (Moraes et al., 2009; Simpson et al., 2011).

Existem evidências de que os compostos orgânicos voláteis induzidos pela herbivoria estão envolvidos na comunicação entre plantas. Os trabalhos sugerem que as plantas não atacadas podem responder às informações químicas emitidas por plantas vizinhas danificadas, produzindo e liberando mais rapidamente compostos que atuarão na defesa, quando submetidas a algum tipo de injúria (Engelberth et al., 2004; Arimura et al., 2005). As plantas podem liberar compostos voláteis que induzem a resposta de defesa nas plantas vizinhas, tornando-as menos disponíveis para a invasão de novos herbívoros (Baldwin et al., 2006). Esta produção dos compostos pelas plantas antes mesmo de serem danificadas pode também antecipar a chegada dos inimigos naturais na cultura. Plantas de milho não atacadas quando expostas às outras plantas incluindo milho, tabaco, pimenta e algodão danificadas artificialmente, ou mesmo a alguns voláteis verdes das plantas, aumentaram a liberação do (*Z*)-3-acetato de hexenila e do DMNT ((*E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno), compostos que atuam na atração de inimigos naturais em diferentes culturas (Yan e Wang, 2006).

Os resultados do presente trabalho indicam que o (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno e o salicilato de metila desempenham papel importante no comportamento de busca do *T. podisi*, bem como alguns compostos minoritários que não foram identificados. Além disso, permanece ainda sem resposta como seria o comportamento do parasitóide quando estes

compostos fossem adicionados à planta de soja, tanto danificada pela herbivoria quanto não danificada.

Novas combinações com as concentrações dos compostos e outros estudos com os extratos das plantas devem ser feitos na tentativa de investigar a melhor mistura e/ou quais outros compostos favorecem a atração do parasitóide. Novos bioensaios com as combinações (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno+planta danificada por herbivoria vs. planta não atacada e vs planta danificada por herbivoria também são necessários, para tentar desvendar se os compostos orgânicos voláteis do metabolismo secundário da planta ou os compostos liberados devido à respiração, como etileno e CO<sub>2</sub>, que estão faltando na mistura, são importantes para a atração do parasitóide. O efeito do composto (*E*)-2-octen-1-ol na atração do parasitóide *T. podisi* também tem que ser investigado, pois ele pode desempenhar um papel importante no recrutamento do inimigo natural. Com o conhecimento sobre os compostos liberados pela soja e que atuam na atração do *T. podisi* novas cultivares podem ser desenvolvidas e, assim, gerar plantas que emitam elevadas quantidades destes compostos ou, ainda, liberar no campo os próprios compostos, visando utilizá-los como ferramenta para aumentar a eficiência da atração do parasitóide.

## Capítulo IV

### **Interações Tróficas entre Cultivares de Soja Resistente e Suscetível, Parasitóides de Ovos da Família Scelionidae e o Percevejo *Euschistus heros***

#### **Introdução**

O percevejo marrom *Euschistus heros* (Fabricius, 1794) (Hemiptera: Pentatomidae), juntamente com outros percevejos da família Pentatomidae, é considerado uma importante praga da cultura de soja, causando sérios prejuízos aos agricultores brasileiros. Ao se alimentarem das plantas, estes insetos sugadores podem causar deformações e diminuição do tamanho das sementes, retenção foliar, redução do poder germinativo e diminuição da produção (Panizzi e Slansky, 1985; Sosa-Gómez e Moscardi, 1995; Panizzi, 2000).

A redução das populações de inimigos naturais de pragas, bem como a contaminação do meio ambiente, são problemas decorrentes do uso indiscriminado dos agrotóxicos, prática largamente utilizada para controlar os percevejos fitófagos em cultivos de soja no Brasil. Neste contexto, o desenvolvimento de formas alternativas e sustentáveis de controle dessas pragas representa uma das principais demandas dos programas de manejo fitossanitário da soja (Gazzoni et al., 1994; Portugal, 1999).

Dentre as táticas de controle com potencial de adoção no manejo integrado, o uso de cultivares resistentes tem sido preconizada devido à possibilidade de permitir a manutenção da praga em níveis de infestação toleráveis pelo sistema produtivo, sem causar prejuízos ao ambiente e sem ônus adicional ao agricultor. Além disso, pode ser compatível com outras táticas, como o controle biológico e o manejo do ambiente de cultivo (Pedigo, 1996; Gallo et al., 2002; Vendramim e Guzzo, 2009).

Entretanto, nem sempre a associação de cultivares resistentes e inimigos naturais resulta em interações positivas e no controle populacional da praga. Desta forma, há necessidade que sejam elucidadas as interações tritróficas envolvendo a planta hospedeira, a praga-alvo e seus inimigos naturais, antes de se decidir pela utilização conjunta dessas técnicas de controle, ou da introdução de uma cultivar resistente no sistema biológico (Lewis et al., 1997; Vendramim, 2002).

A resistência da cultivar IAC100 sobre os artrópodes herbívoros da soja tem sido evidenciada em vários estudos em condições de campo. O menor índice de retenção foliar e o menor peso de sementes danificadas pelos percevejos foram observados para esta cultivar, sugerindo a ocorrência da categoria de resistência por tolerância ao ataque dos percevejos (Fernandes et al., 1994). Resultado semelhante foi encontrado para percevejos e insetos desfolhadores, principalmente *Anticarsia gemmatalis* Hübner 1818, (Lepidoptera: Noctuidae) e coleópteros da família Chrysomelidae (Lourenção et al., 1997). A alimentação de várias lagartas desfolhadoras em diferentes cultivares ocasionou baixa desfolha na cv IAC100 (McPherson e Buss, 2007). Adicionalmente em experimentos de campo, houve diferença na colonização das plantas pelos percevejos entre as cultivares testadas. Níveis populacionais mais baixos ocorreram nas cultivares Dowling e IAC100, enquanto maior colonização foi obtida para a cultivar Silvânia (Laumann et al., 2008). Para a cultivar Dowling não há relatos de estudos da resistência aos percevejos em condições de campo. No entanto, a resistência desta cultivar ao pulgão *Aphis glycines* Matsumura, 1917 (Hemiptera: Aphididae) já foi constatada em laboratório (Hill et al., 2004; Chiozza et al., 2010).

Apesar dos vários estudos abordando os efeitos da resistência das cultivares Dowling e IAC100 sobre os herbívoros da soja, pouco se conhece a respeito da interação dessas cultivares com os inimigos naturais no agroecossistema. Vespas da família Scelionidae destacam-se entre os parasitóides de ovos dos percevejos da soja e a espécie *Telenomus podisi* (Ashmead, 1881) é o principal parasitóide de ovos do percevejo *E. heros* (Peres e Corrêa-Ferreira, 2004). A ocorrência deste parasitóide juntamente com o *Trissolcus basal* (Wollaston, 1858), *Tr. teretis* Johnson, 1847, *Tr. urichi* Crawford, 1876 e *Tr. brochymenae* Ashmead, 1881 tem sido amplamente relatada em cultivos de soja no Brasil. Em algumas situações, o nível de parasitismo dos ovos é elevado e contribui para a redução populacional dos percevejos na cultura (Corrêa-Ferreira e Moscardi, 1995; Medeiros et al., 1998; Godoy et al., 2005).

As cultivares resistentes podem afetar a dinâmica populacional dos herbívoros ao interferir no seu comportamento durante o processo de seleção da planta hospedeira para oviposição e alimentação, na sua biologia ou na atividade e eficiência de seus inimigos naturais mediante diferentes estratégias de defesa contra a herbivoria (Cortesero et al., 2000; Bartlett, 2008). Os resultados apresentados nos capítulos anteriores desta tese indicaram que, em condições de laboratório, as cultivares resistentes Dowling e IAC100 apresentam defesas direta e indireta contra o percevejo *E. heros*. Estas cultivares interferiram no desenvolvimento e na reprodução do percevejo, e quando atacadas pelo mesmo liberaram uma mistura de compostos voláteis que foi atrativa ao parasitóide de ovos *T. podisi*. Tais atributos revelaram o potencial das cultivares Dowling e IAC100, como mais uma alternativa a ser incorporada em um programa de manejo integrado de percevejos da soja. No entanto, faz-se necessário avaliar estas cultivares em condições de campo, sob a influência simultânea de diferentes fatores, incluindo a presença de outros herbívoros, de inimigos naturais e de outros estímulos encontrados no meio ambiente.

Assim, este estudo teve como objetivos determinar a influência de cultivares de soja resistente e suscetível sobre: i) a flutuação populacional do percevejo marrom; ii) a abundância dos parasitóides da família Scelionidae e iii) o parasitismo dos ovos de *E. heros* por estes inimigos naturais. A hipótese do trabalho é que a cultivar resistente afeta tanto a flutuação populacional do percevejo marrom da soja, quanto o parasitismo de seus ovos por vespas da família Scelionidae. Espera-se encontrar menor número de percevejos e maior proporção de parasitóides de ovos nas cultivares Dowling e IAC100, quando comparadas à cultivar Silvânia.

## Material e Métodos

O experimento foi conduzido no campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília, DF de setembro a dezembro de 2010, período compreendido entre o início do estágio reprodutivo (R2) até a maturidade fisiológica das plantas (R8). O plantio foi estabelecido em diferentes datas segundo o ciclo de cada uma das cultivares, visando sincronizar o período reprodutivo das três cultivares no campo. As cultivares Silvânia e IAC100 foram plantadas 15 dias antes da cultivar Dowling, devido à maturação precoce da última cultivar. As três cultivares foram plantadas em uma área de 0.55 ha, em 15 parcelas de 2.5 m x 3.0 m, distribuídas com arranjos em blocos, com espaçamento de 4.5 m na largura e 5.0 m no comprimento entre elas (Fig. 1), tendo as bordas formadas por uma mata ripária do lado direito e um plantio de algodão do esquerdo. Cada parcela foi constituída por cinco fileiras de cultivo, no espaçamento de 0.4 m entre linhas e densidade de oito plantas por metro linear.

Antes do plantio foram feitas duas aplicações de herbicida (Dual Gold, 1.5 l/ha), calagem do solo (calcário e gesso) e uma adubação com NPK (4-14-20) e micronutrientes supersimples. As sementes foram inoculadas com bactéria fixadora de nitrogênio (*Bradyrhizobium* sp., Rhizobiales: Rhizobiaceae) na proporção de 1 kg de inoculante turfoso para 50 kg de sementes. No dia do plantio foi realizada uma adubação de cobertura nas linhas utilizando NPK (2:10:10).

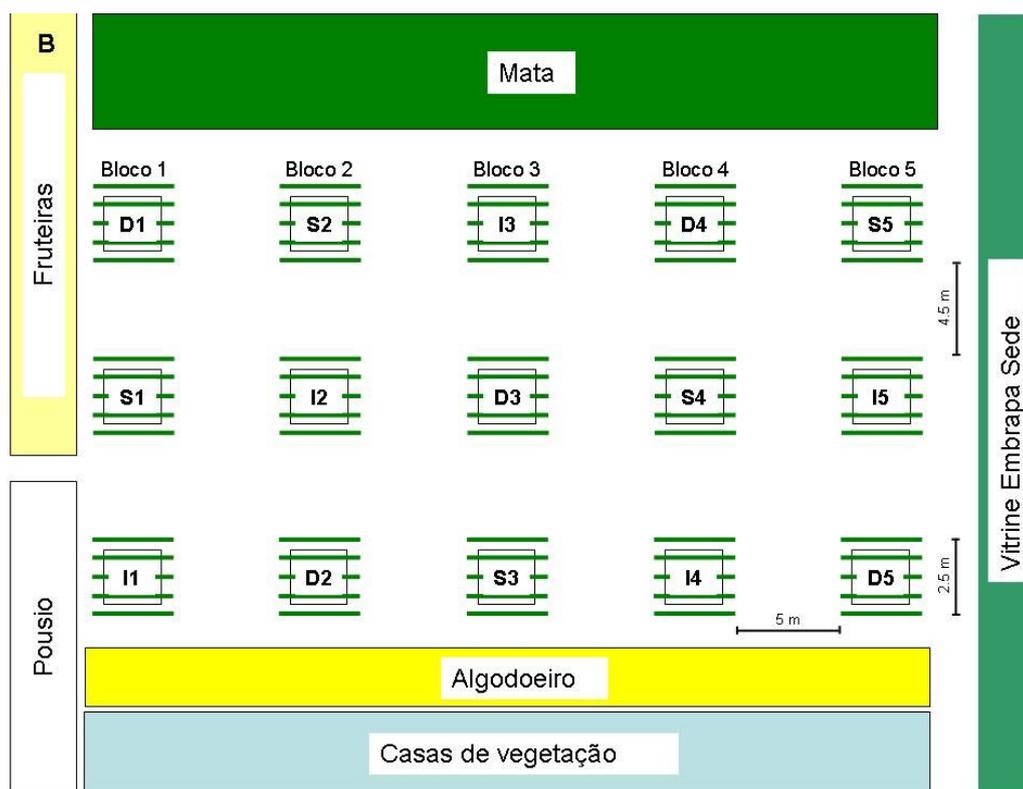


Fig. 1. Desenho esquemático do arranjo das parcelas com plantas de soja das cultivares Dowling (D1 a D5), IAC100 (I1 a I5) e Silvânia (S1 a S5), localizadas na área experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, utilizadas nas avaliações da flutuação populacional do percevejo *E. heros* e dos parasitóides de ovos da família Scelionidae.

No início do estágio reprodutivo (R1) dessas cultivares de soja, as parcelas foram cobertas com gaiolas (2.4 m de comprimento x 1.2 m de largura x 1.90 m de altura) (Fig. 2) confeccionadas com madeira e filó branco (malha de 4 mm) capazes de reter os percevejos dentro da mesma e permitir o livre acesso dos parasitóides. Cada gaiola (2.90 m<sup>2</sup>) cobriu três fileiras de cultivo da soja. No dia em que as plantas foram protegidas, 15 fêmeas acasaladas de *E. heros* foram liberadas em cada gaiola, visando alcançar dois percevejos por metro linear, similar à densidade usada como nível de dano econômico (Embrapa 2008). Após três semanas, foi realizada uma segunda infestação, como descrito anteriormente.



Fig. 2. Gaiolas de madeira utilizadas para a proteção das plantas de soja das cultivares Dowling, IAC100 e Silvânia no campo, durante o período de setembro a dezembro de 2010, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF.

#### *Densidade populacional do percevejo *Euschistus heros**

Para estimar a densidade populacional do percevejo marrom ao longo do desenvolvimento da soja, 10 plantas de cada parcela foram avaliadas semanalmente. Estas foram escolhidas aleatoriamente e inspecionadas na sua totalidade em busca de posturas, ovos parasitados, ninfas e adultos de *E. heros*. Os dados foram expressos, respectivamente, como densidade de indivíduos por planta e porcentagem de ovos parasitados.

### *Parasitismo dos ovos sentinela de E. heros*

Para estimar a taxa de parasitismo dos ovos de *E. heros* nas diferentes cultivares, cartelas com ovos sentinela foram levadas ao campo semanalmente, a partir do estágio fenológico R1. Foram colados 50 ovos, obtidos a partir da criação estabelecida no Laboratório de Semioquímicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em pedaços de cartolina verde (4 cm x 4 cm) com o auxílio de goma arábica. No dia posterior à colagem, os ovos foram cobertos com um pedaço de filó branco (3 cm x 3 cm) com malha de 4 mm (Figs. 3A e B), que permitia o acesso dos parasitóides aos ovos, mas evitava a predação dos mesmos.

Três cartelas foram colocadas dentro de cada gaiola na diagonal, fixadas nas plantas, permanecendo no campo durante quatro dias. Em seguida, as cartelas foram levadas ao laboratório, acondicionadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro x 2 cm de altura), mantidas sob temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , umidade de  $65 \pm 10\%$  rh e fotoperíodo de 14L:10E. Após cinco dias foram avaliadas para verificar se os ovos estavam parasitados ou não. A partir do décimo dia foram feitas vistorias das cartelas duas vezes por semana, à procura de adultos das vespas parasitóides, ou então, dissecação dos ovos, quando os parasitóides não completaram seu desenvolvimento ou não conseguiram emergir.

Os insetos obtidos foram colocados em frascos de vidro contendo álcool 70% para posterior identificação. Os parasitóides da família Scelionidae foram identificados utilizando-se a chave dicotômica elaborada pela Dra. Maria Loiácono (Museu de Ciências Naturais, La Plata, Argentina) e os outros parasitóides foram identificados conforme Gauld e Bolton (1998) e Goulet e Huber (1993). Os dados foram expressos como porcentagem de ovos parasitados. Apenas os taxons com frequência de ocorrência nas cartelas acima de 25% foram considerados nas análises estatísticas. Este procedimento excluiu espécies menos representativas e foi adotado para minimizar os problemas nas análises originados pelos excessivos valores nulos nos dados.

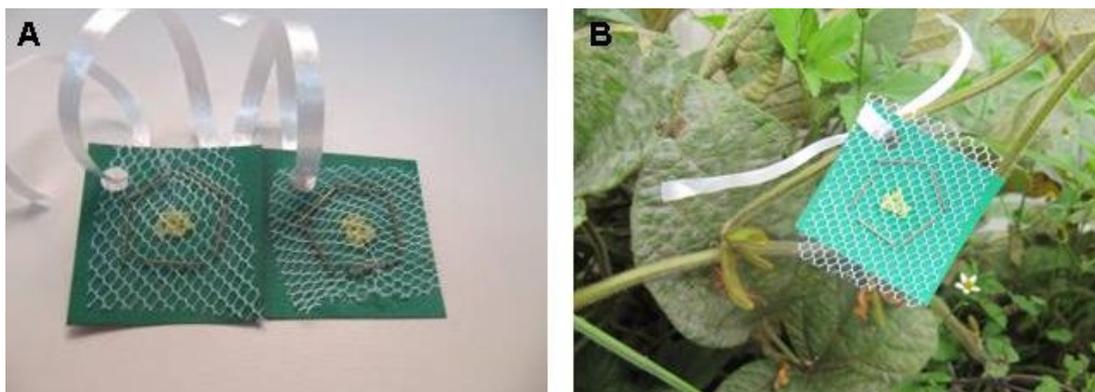


Fig. 3A) Cartelas (4 cm x 4 cm) com 50 ovos de *Euschistus heros*, colados com goma arábica e recobertos com filó (malha de 4 mm) e B) Cartelas com ovos sentinela presos na planta de soja no campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF, no período de setembro a dezembro de 2010.

#### *Captura de parasitóides da família Scelionidae em armadilhas adesivas*

A abundância dos parasitóides Scelionidae foi determinada mediante amostragem com armadilhas na forma de placas adesivas, de coloração amarela (Biotrap®, BioControle Métodos de Controle de Pragas Ltda.). As placas adesivas (15 cm de comprimento x 12.5 cm de largura) foram colocadas a aproximadamente 1 m de altura do solo e presas por arames em estacas de madeira. Três armadilhas foram dispostas em cada gaiola na diagonal da mesma (Fig. 4) e permaneceram ativas durante quatro dias consecutivos. Após esse período, as armadilhas foram envoltas em filme PVC e armazenadas na geladeira do laboratório de Semioquímicos para posterior identificação dos parasitóides capturados. As armadilhas foram instaladas dentro das gaiolas de campo a cada 14 dias, do estágio fenológico R1 até R8, totalizando sete avaliações semanais. Os parasitóides Scelionidae foram identificados até o menor nível taxonômico possível. Os dados foram expressos como densidade de indivíduos por armadilha.



Fig. 4. Gaiola instalada em parcela da cultivar de soja Dowling contendo armadilhas adesivas amarelas em seu interior (Biotrap®, BioControle Métodos de Controle de Pragas Ltda.) para a captura dos parasitóides, no campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF, no período de setembro a dezembro de 2010.

#### *Análises estatísticas*

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com cinco repetições. A densidade populacional (ovos, ninfas e adultos) de *E. heros*, a porcentagem de parasitismo dos ovos e a captura dos parasitóides em cartelas adesivas, em cada cultivar (tratamento) ao longo do tempo, foram submetidas à análise de variância para medidas repetidas (Proc Anova, com especificações Profile e Contrast), tendo as datas de avaliação como medidas repetidas da mesma unidade experimental, conforme sugerido por von Ende (1993). Este procedimento foi utilizado visando evitar problemas oriundos da pseudo-repetição e da falta de independência das avaliações realizadas no tempo para o mesmo indivíduo (Hurlbert, 1984; Green, 1993). Os graus de liberdade

para testar a significância da interação cultivar x tempo foram corrigidos pelo valor de epsilon de Greenhouse-Geisser, considerando-se a existência de correlações desiguais entre elas. A comparação entre médias das cultivares foi realizada dentro de cada tempo de avaliação pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Os dados foram submetidos previamente aos testes de normalidade (Lilliefors) e homogeneidade de variância (Bartlett), após os quais foram transformados em  $\log(x+1)$  ou  $\text{raiz}(x+1)$  para atender os pré-requisitos da Anova. As análises foram realizadas no programa estatístico SAS 8.2 (SAS Institute, 2001).

## **Resultados**

### *Densidade populacional do percevejo Euschistus heros*

Não houve diferença significativa entre cultivares de soja para as densidades de ninfas+adultos (cultivar:  $F=1.74$ ,  $P=0.236$ ; cultivar x tempo:  $F=1.06$ ,  $P=0.415$ ) (Fig. 5A) e de ovos por planta (cultivar:  $F=0.50$ ,  $P=0.751$ ; cultivar x tempo:  $F=0.68$ ,  $P=0.631$ ) (Fig. 5B) nem para a porcentagem de ovos parasitados encontrados nas plantas (cultivar:  $F=2.05$ ,  $P=0.191$ ; cultivar x tempo:  $F=1.21$ ,  $P=0.322$ ) (Fig. 5C), dentro das gaiolas. As maiores densidades de ovos e níveis de parasitismo de ovos ocorreram nos estágios reprodutivos iniciais, observando-se seu declínio a partir do estágio reprodutivo R4 (Figs. 5B e C). A população de percevejos permaneceu baixa até o final do estágio reprodutivo R5, apresentando maior pico entre os estádios R6 e R7 (Fig. 5A). Somente nesta ocasião verificou-se que a infestação da praga (2-8 percevejos/m) superou o nível de controle para percevejos ( $NDE \geq 2$  indivíduos/metro linear; Embrapa, 2008).

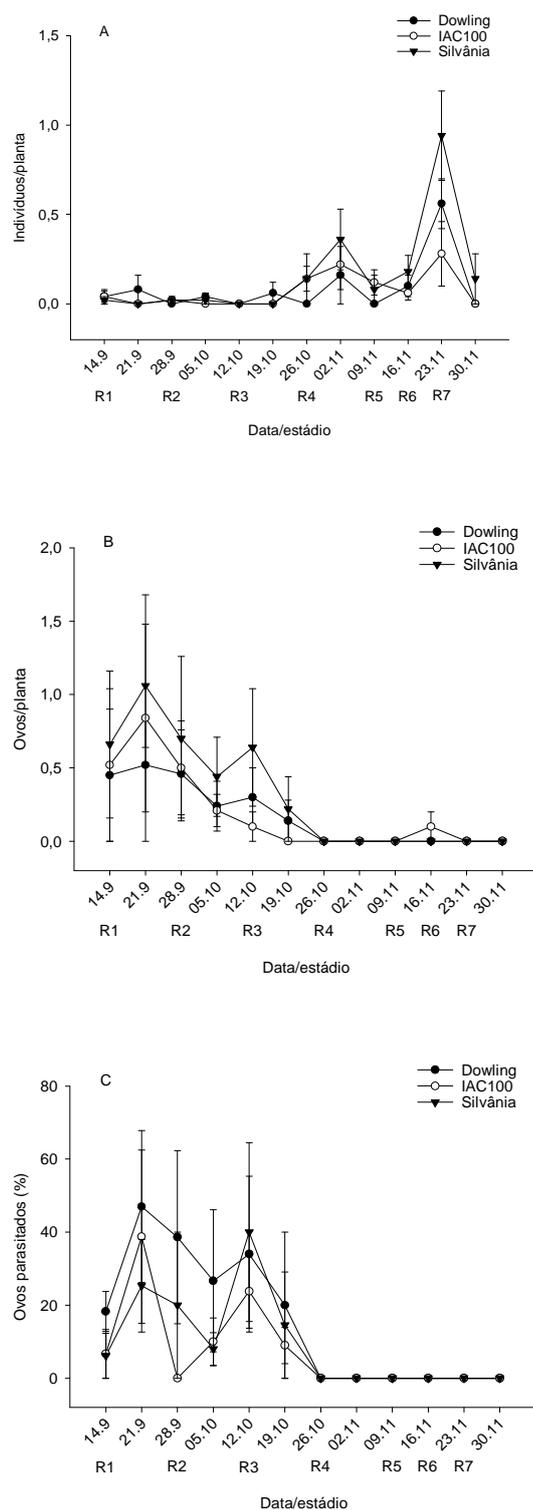


Fig. 5. Densidade de: A) ninfas+adultos e B) ovos do percevejo *Euschistus heros* por planta. C) Porcentagem de ovos parasitados nas cultivares de soja Dowling, IAC100 e Silvânia, no campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF, no período de setembro a dezembro de 2010.

### *Parasitismo dos ovos sentinela de E. heros*

Os ovos sentinela vindos do campo foram parasitados preferencialmente pela espécie *Telenomus podisi*, seguido por *Trissolcus teretis* nas cultivares Dowling, IAC100 e Silvânia. Os ovos também foram parasitados por *Tr. urichi* e *Tr. brochymenae*, por dois outros parasitóides da família Encyrtidae, para a cultivar Dowling, além de dois parasitóides do gênero *Trissolcus* não identificados (Tabela 1). Não foi verificada a presença de *Tr. basalis* na área durante o período de avaliação. Nas análises foram consideradas apenas as porcentagens de parasitismo de ovos relativas ao total de parasitóides, ao total da família Scelionidae e à espécie *T. podisi*, em razão da baixa ocorrência dos demais parasitóides.

O parasitismo de ovos no total de parasitóides diferiu entre as cultivares de soja ( $F=5.07$ ,  $P=0.038$ ), de maneira similar ao longo das avaliações (cultivar x tempo:  $F=0.97$ ,  $P=0.546$ ) (Fig. 6A). Verificou-se maior parasitismo de ovos de *E. heros* na cultivar Dowling, enquanto IAC100 e Silvânia não diferiram entre si. Houve aumento na taxa de parasitismo de ovos com o tempo ( $F=9.64$ ,  $P=0.045$ ), chegando a mais de 55% no estágio reprodutivo R5, com posterior declínio (Fig. 6B).

Tabela 1. Ocorrência de parasitóides em cartelas com ovos sentinela de *Euschistus heros* em três cultivares de soja, em 12 avaliações semanais, no campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF, no período de setembro a dezembro de 2010.

Parasitóide	Dowling		IAC100		Silvânia	
	Abundância <sup>1</sup>	Frequência (%) <sup>2</sup>	Abundância	Frequência (%)	Abundância	Frequência (%)
Total de parasitóides	995	40,5*	803	38,2*	748	31,8*
Família Scelionidae	953	37,1*	803	35,1*	748	31,8*
<i>Telenomus podisi</i>	843	30,5*	701	29,8*	682	28,2*
<i>Trissolcus teretis</i>	104	4,8	62	3,5	54	4,8
<i>Trissolcus urichi</i>	0	0,0	0	0,0	6	0,6
<i>Trissolcus bochymenae</i>	6	0,6	40	1,2	6	0,6
Família Encyrtidae	42	3,6	0	0,0	0	0,0

<sup>1</sup>Total de indivíduos do parasitóide emergidos em cartelas com ovos instaladas nas parcelas de cada cultivar, em 12 avaliações.

<sup>2</sup>Frequência de ocorrência nas cartelas com ovos (%) = número de cartelas de ovos contendo o parasitóide nas parcelas da cultivar, dividido pelo total de cartelas com ovos utilizadas em cada cultivar e multiplicado por 100 (n = 105).

\*Incluído nas análises.

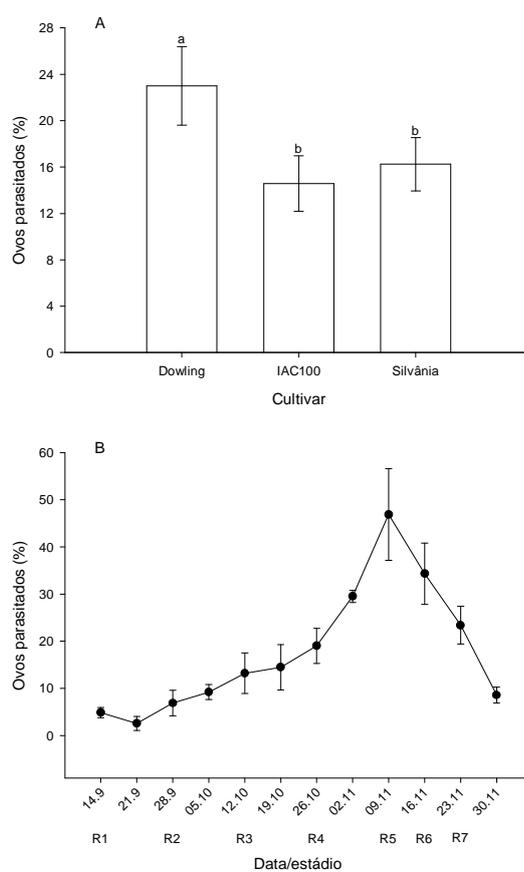


Fig. 6. Parasitismo em cartelas com ovos (sentinela) de *E. heros* colocadas nas cultivares de soja Dowling, IAC100 e Silvânia, no campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF, no período de setembro a dezembro de 2010. A) Todos os parasitóides emergidos dos ovos e B) Padrão de parasitismo ao longo do tempo. Barras seguidas pela mesma letra não diferiram significativamente entre si pelo teste Tukey ( $P < 0.05$ ).

Não houve diferença significativa entre as cultivares de soja (cultivar:  $F=2.46$ ,  $P=0.147$ ; cultivar x tempo:  $F=1.06$ ,  $P=0.415$ ) quando se considerou o parasitismo de ovos por todos os espécimes identificados da família Scelionidae (Fig. 7A). As maiores taxas de parasitismo de ovos (32-75%) por este grupo de parasitóides, ocorreu quando as plantas estavam entre os estádios R4 e R7.

Ao contrário de outros parasitóides Scelionidae, *T. podisi* foi a espécie mais freqüente nas cartelas de ovos sentinelas (Tabela 1) e seu parasitismo diferiu entre as cultivares de soja ao longo das avaliações (cultivar x tempo:  $F=4.94$ ,  $P=0.031$ ). O parasitismo por *T. podisi* foi significativamente maior nas parcelas cultivadas com a cultivar Dowling em relação às demais cultivares quando as cartelas com ovos de *E. heros* foram colocadas nos estádios R6 e R7 (Fig. 7B). A porcentagem de ovos parasitados por *T. podisi* não diferiu entre as cultivares IAC100 e Silvânia nos diferentes estádios reprodutivos da soja.

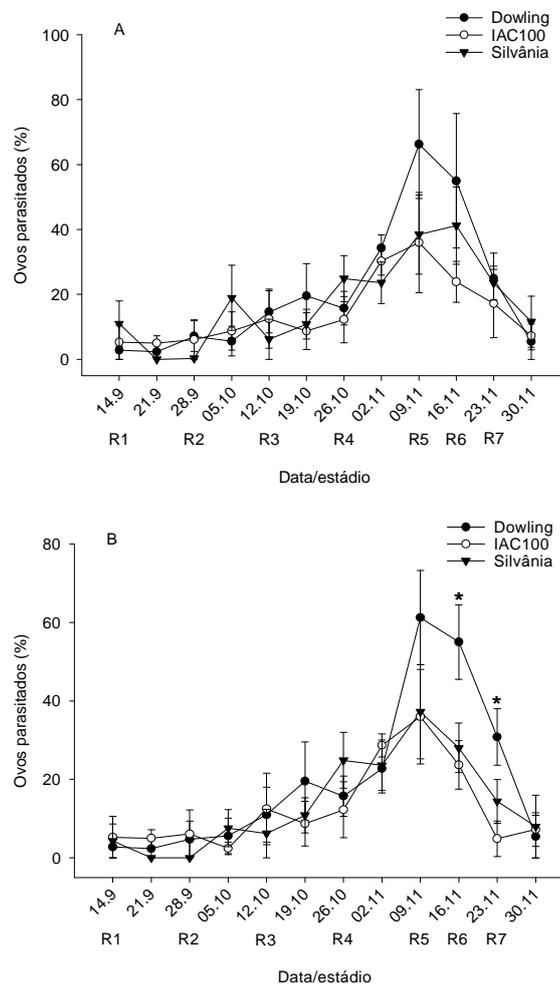


Fig. 7. Parasitismo em cartelas com ovos (sentinela) de *E. heros* colocadas nas cultivares de soja Dowling, IAC100 e Silvânia. A) Todos os parasitóides da família Scelionidae e B) Exclusivamente a espécie *Telenomus podisi*. Asterisco indica diferença significativa entre as cultivares, dentro de data, pelo teste Tukey ( $P<0.05$ ).

### *Captura de parasitóides da família Scelionidae nas armadilhas adesivas*

Não foram detectadas diferenças significativas na frequência de captura de parasitóides da família Scelionidae nas armadilhas adesivas entre as cultivares Dowling, IAC100 e Silvânia (Tabela 2) ( $\chi^2$ ,  $P>0.05$ ). Resultados similares foram observados para parasitóides Scelionidae pertencentes aos gêneros *Telenomus* e *Trissolcus* (Tabela 2).

A captura de todos os parasitóides nas armadilhas adesivas não foi diferente entre as cultivares ao longo do tempo ( $F=3.14$ ,  $P=0.142$ ) (Fig. 8A). Não houve diferença também entre as cultivares de soja com relação à captura do total de parasitóides da família Scelionidae nas armadilhas adesivas ao longo das avaliações (cultivar x tempo:  $F=2.56$ ,  $P=0.128$ ), observando-se pico de captura quando as plantas estavam no estágio R3 (Fig. 8B).

Ocorreram diferenças entre as cultivares de soja quando a captura de parasitóides dos gêneros *Telenomus* (cultivar x tempo:  $F=3.9$ ,  $P=0.031$ ) e *Trissolcus* (cultivar x tempo:  $F=2.53$ ,  $P=0.042$ ) foi analisada separadamente, nos diferentes estádios de desenvolvimento das plantas (Figs. 8C e D). No estágio R5, a captura de parasitóides do gênero *Telenomus* nas armadilhas amarelas foi significativamente menor nas parcelas da cv Silvânia em relação às parcelas da Dowling e da IAC100, as quais não diferiram entre si (Fig. 8C). Neste mesmo estágio fenológico da soja, a captura de parasitóides do gênero *Trissolcus* foi significativamente maior nas parcelas da Dowling em relação às parcelas das cultivares IAC100 e Silvânia (Fig. 8D).

Tabela 2. Captura de parasitóides Scelionidae em armadilhas adesivas amarelas instaladas nas parcelas de diferentes cultivares de soja, em sete avaliações semanais, no campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF, no período de setembro a dezembro de 2010.

Parasitóide	Dowling		IAC100		Silvânia	
	Abundância <sup>1</sup>	Frequência (%) <sup>2</sup>	Abundância	Frequência (%)	Abundância	Frequência (%)
Família Scelionidae	465	96,5	384	88,6	426	81,9
<i>Telenomus</i> sp.	127	47,6	103	38,1	96	44,8
<i>Trissolcus</i> sp.	130	47,6	96	46,7	100	36,9

<sup>1</sup>Total de indivíduos do parasitóide coletados em armadilhas instaladas nas parcelas de cada cultivar, durante quatro dias consecutivos, em sete avaliações.

<sup>2</sup>Frequência de captura nas armadilhas (%) = número de armadilhas de soja contendo o parasitóide nas parcelas da cultivar, dividido pelo total de armadilhas da cultivar e multiplicado por 100 (n = 105).

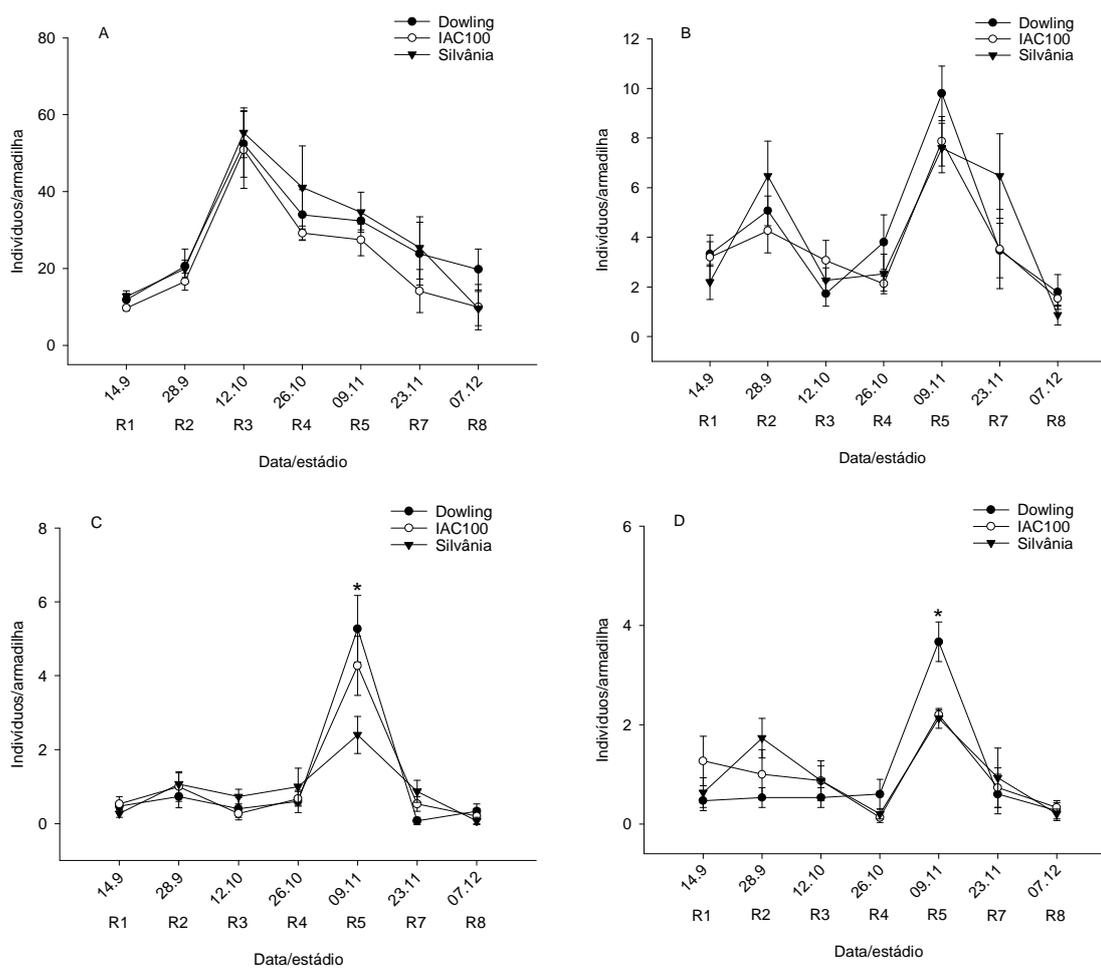


Fig. 8. Captura de vespas parasitoides em armadilhas adesivas amarelas instaladas nas parcelas de diferentes cultivares de soja, entre os estádios R1 e R8, no campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF, no período de setembro a dezembro de 2010. A) Total de parasitoides B) Todos os parasitoides da família Scelionidae C) Gênero *Telenomus* e D) Gênero *Trissolcus*. Asterisco indica diferença significativa entre as cultivares, dentro de data, pelo teste Tukey ( $P < 0.05$ ).

## Discussão

A baixa infestação do percevejo *E. heros* observada nas gaiolas nas primeiras avaliações para as cultivares Dowling, IAC100 e Silvânia pode ter ocorrido devido à mortalidade dos insetos utilizados para a infestação das plantas, antes do

estabelecimento de uma próxima geração. Insetos mantidos em laboratório podem ser afetados pelas condições não controladas no ambiente natural, tendo então sua longevidade e sua sobrevivência diminuídas, quando comparados com os insetos criados em plantas no campo ou insetos criados, exclusivamente, no laboratório (Peres e Corrêa-Ferreira, 2004).

O aumento da população no final do ciclo pode ter ocorrido devido à entrada de insetos que se encontravam no exterior das gaiolas. Na segunda quinzena do mês de outubro, o algodão e o feijão, plantados em duas bordas do plantio de soja, foram colhidos, o que pode ter aumentado a chance da migração dos insetos para o cultivo de soja. Na mesma época ocorreram alguns dias de chuva, e devido ao forte vento, o tecido das gaiolas sofreu alguns danos, que pode ter facilitado a entrada desses insetos. Foi observada nesta época alta infestação do percevejo *Neomegalotomus spp.* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) nas plantas de soja ao redor das gaiolas, e até mesmo no filó das mesmas.

No Capítulo I, no teste de preferência de oviposição, maior número de ovos foi depositado na cultivar Silvânia, quando testada isoladamente. Resultado semelhante não foi observado em condições de campo, pois não houve diferença no número de ovos depositados naturalmente nas plantas e nem na distribuição dos percevejos entre as cultivares. Diferentemente do observado neste trabalho, a suscetibilidade da cultivar Silvânia já tinha sido observada anteriormente, em condições de campo, quando esta mostrou maior colonização e estabelecimento populacional dos percevejos em suas plantas, quando comparada com a cultivar Dowling, que teve o menor número total de percevejos colonizando suas plantas (Laumann et al., 2008).

A presença dos parasitóides no plantio foi observada desde o florescimento até a maturação da soja. A porcentagem de parasitismo na cultivar Dowling foi maior que 60% e diferente das taxas obtidas para as cultivares IAC100 e Silvânia. Em estudos de levantamento das espécies de parasitóides de ovos dos percevejos da família Pentatomidae, as taxas de parasitismo natural acima de 60% foram consideradas altas. Observou-se também que o parasitóide *T. podisi*, foi a espécie mais freqüente nas áreas avaliadas e que houve preferência por ovos de *E. heros*, quando na presença de outros percevejos da soja (Corrêa-Ferreira e Moscardi, 1995; Medeiros et al., 1998). Os resultados obtidos neste trabalho evidenciaram a preferência do *T. podisi* pelos ovos do percevejo *E. heros*, pois a maior parte dos ovos sentinela do percevejo foram parasitados por este parasitóide.

O maior parasitismo observado nos ovos naturais no início do estágio reprodutivo, em relação ao ocorrido nos ovos sentinela, sugere que a interação da planta com os ovos depositados nela desempenha um papel importante na atração dos parasitóides, mesmo que as plantas contendo oviposição não tenham atraído o parasitóide *T. podisi* no olfatômetro em “Y” (como mostrado no Capítulo II). As plantas, das cultivares Dowling e IAC100, submetidas à herbivoria mais oviposição atraíram o *T. podisi*, indicando que a herbivoria induziu a liberação de compostos voláteis, que são utilizados por predadores e parasitóides como sinais, no forrageamento, e ajudam na localização de suas presas ou de seus hospedeiros, como relatado na literatura (Dicke, 1999; D’Alessandro et al., 2009).

O aumento do parasitismo nos ovos sentinela ocorreu após o estágio reprodutivo R5, época em que houve um declínio dos ovos naturais no campo, indicando mais uma vez, que os ovos depositados nas plantas foram mais atrativos do que os ovos colados em cartelas. Os parasitóides podem utilizar os voláteis emitidos pelas plantas danificadas por seus herbívoros mais do que aqueles liberados pelo próprio hospedeiro, porque os primeiros são liberados em maior quantidade e seriam mais facilmente detectados no ambiente (Vet e Dicke, 1992; Turlings et al., 1998b).

A diferença observada na captura dos parasitóides dos gêneros *Telenomus* e *Trissolcus* nas armadilhas adesivas e do parasitismo dos ovos sentinela de *E. heros* causados pelo *T. podisi*, sugerem que houve a ativação da defesa induzida indireta na cultivar Dowling, como observado nos experimentos do laboratório (resultado apresentado no Capítulo II), em que o parasitóide *T. podisi* foi atraído para plantas danificadas desta cultivar, quando comparadas com plantas não atacadas.

Os parasitóides de ovos da família Scelionidae chegam à cultura de soja após o primeiro pico populacional dos percevejos (Borges et al., 1998). Para aumentar a eficiência da ação desses parasitóides seria interessante antecipar a sua colonização na lavoura e manter alta sua população durante todo o ciclo de cultivo da soja, na tentativa de diminuir a chance de ocorrer o aumento da população dos percevejos. Isto poderia ser feito com a manipulação genética das plantas que pode levar ao aumento da produção nas plantas dos compostos envolvidos na atração de diferentes inimigos naturais (Schnee et al., 2006; Degenhardt et al., 2009), ou com a liberação desses compostos no campo, com pulverizações ou em sistemas de liberação controlada (Moraes et al., 2009; Simpson et al., 2011).

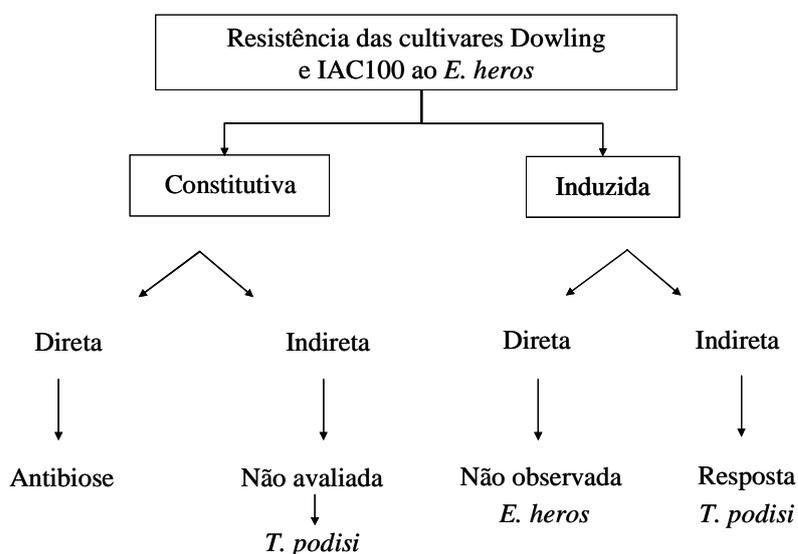
Os compostos (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno, salicilato de metila e (*Z*)-3-acetato de hexenila podem estar relacionados com a atratividade do parasitóide *T. podisi*, (Capítulo III). Embora novos estudos sejam necessários para investigar o efeito desses compostos sobre o inimigo natural, principalmente em relação às plantas danificadas e sadias da cultivar Dowling, estudos com outras culturas, têm mostrado a atração dos inimigos naturais a esses mesmos compostos que foram induzidos após as injúrias causadas pelo *E. heros*. Em campos de algodão, o parasitismo dos ovos de *Lygus lineolaris* Palisot du Beauvois (Hemiptera: Miridae) foi maior quando associados com os compostos (*Z*)-3-acetato de hexenila e  $\alpha$ -farneseno (Williams et al., 2008). A captura de diferentes inimigos naturais, também em campos de algodão, utilizando armadilhas adesivas com os compostos (*Z*)-3-acetato de hexenila, nonanal e salicilato de metila mostrou que esses compostos foram eficientes na atratividade dos insetos (Yu et al., 2008).

Os resultados obtidos com os percevejos não forneceram subsídios para confirmar a associação das defesas constitutivas e induzidas nas cultivares resistentes, em condições de campo. Não foi possível acompanhar o desenvolvimento das ninfas originadas dos ovos colocados nas plantas pelas fêmeas introduzidas nas gaiolas no início do experimento, provavelmente porque elas morreram ou escaparam das gaiolas, devido ao pequeno tamanho. Em um estudo comparando os efeitos dos inibidores de proteinase sobre o besouro *Epilachna verivestis* Mulsant, 1850 (Coleoptera: Coccinellidae) em laboratório e campo, os resultados obtidos sugeriram que estes compostos interferem no desempenho do herbívoro e estão associados tanto à defesa constitutiva, quanto à defesa induzida nas plantas de soja (Underwood et al., 2002).

Não foi possível avaliar o efeito de antibiose, em condições de campo. As cultivares Dowling e IAC100 não apresentaram o mecanismo de resistência de não-preferência para oviposição e alimentação, sugerido em laboratório, mas a atração dos parasitóides, principalmente, para a cultivar Dowling, pode estar envolvida na ativação da defesa indireta induzida. Novos estudos são necessários, com uma infestação maior de percevejos, para que as populações de ninfas e adultos sejam monitoradas em condições de campo. É interessante também avaliar se há uma relação entre as mudanças observadas nas plantas em laboratório, por exemplo, com a ocorrência da defesa induzidas em condições de campo.

## Considerações finais

Os resultados indicam que a resistência das cultivares Dowling e IAC100 pode estar relacionada às defesas constitutiva e induzida contra o percevejo *Euschistus heros*, como mostrado no fluxograma abaixo.



A defesa constitutiva direta foi observada através da categoria de antibiose, onde ninfas e adultos do percevejo tiveram seu desenvolvimento e sua reprodução afetados pelo tipo de alimentação que receberam (Capítulo I). A antibiose pode estar relacionada com a presença de barreira morfológica, tricomas ou pêlos, ou mesmo da barreira química, como a produção de compostos secundários, deterrentes de alimentação e/ou oviposição, que podem estar relacionados ao menor desempenho do percevejo nas cultivares Dowling e IAC100, em condições de laboratório. Entretanto, novos estudos são necessários para investigar quais os fatores envolvidos na categoria de antibiose dessas cultivares sobre o *E. heros*, uma vez que neste estudo ao investigar os isoflavonóides, que são compostos relacionados à defesa da planta, observou-se maior produção desses compostos na cultivar Silvânia em relação à Dowling.

Apesar da defesa constitutiva indireta não ter sido investigada, o parasitismo dos ovos observado no experimento de campo (Capítulo IV), indica que as cultivares Dowling e IAC100 não afetaram negativamente o parasitóide *T. podisi*, pois este foi capaz de parasitar os ovos depositados nas plantas igualmente aos ovos encontrados nas parcelas contendo a cv Silvânia. Houve, também, maior parasitismo dos ovos sentinela nas cartelas contendo as plantas da cv Dowling, em relação às demais cultivares,

mostrando assim que não houve, por exemplo, interferência das características que conferem resistência para as cultivares Dowling e IAC100 no comportamento de forrageamento do inimigo natural e na capacidade de chegar até os ovos e parasitá-los.

A defesa induzida direta não foi observada, uma vez que as fêmeas do percevejo não evitaram as plantas de soja danificadas previamente nos bioensaios realizados com os olfatômetros (Capítulo II). A não distinção das fêmeas de *E. heros* entre as plantas danificadas e não danificadas, das cultivares avaliadas neste trabalho, pode fazer com que elas selecionem uma planta com menor recurso disponível para a prole, desfavorecendo assim o sucesso reprodutivo do herbívoro. Por outro lado, os resultados sugerem que *E. heros* induziu a defesa indireta nas cultivares de soja Dowling e IAC100 e que o parasitóide de ovos *T. podisi* foi atraído para as plantas danificadas por herbivoria e herbivoria+oviposição. Esta atração do parasitóide em resposta à injúria pode fazer com que seja maior o risco do percevejo perder seus ovos porque maior será a chance destes serem parasitados. A característica de comunicação entre plantas atacadas e inimigos naturais pode conferir maior valor adaptativo para os indivíduos envolvidos nesta interação, uma vez que o benefício será maior para estes em relação aos indivíduos que não apresentam este tipo de comunicação. Quanto maior a eficiência da comunicação, menor será o sucesso reprodutivo do herbívoro.

A atração do *T. podisi* às plantas com herbivoria e herbivoria+oviposição pode estar relacionada à presença dos compostos (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno, salicilato de metila e (*Z*)-3-acetato de hexenila, bem como alguns compostos minoritários, na mistura dos voláteis liberados pelas plantas danificadas. O parasitóide foi atraído para o composto (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno na concentração de  $1 \times 10^{-5}$  M, em condições de laboratório (Capítulo III), mas, permanece ainda sem resposta como seria o comportamento do parasitóide quando este composto fosse adicionado à planta de soja, tanto não atacada quanto submetida à herbivoria, bem como, para novas misturas contendo outros compostos presentes nas cultivares de soja.

A cultivar Silvânia comportou-se como suscetível, pois conferiu aos percevejos boa fonte de alimentação, favorecendo o desenvolvimento das ninfas (Capítulo I), não apresentando ainda a defesa induzida indireta, uma vez que mesmo após a herbivoria e oviposição não foi atrativa para o parasitóide *T. podisi* (Capítulo II). Em condições de campo, não houve diferença na colonização, quando comparada com as demais cultivares, mas continuou sem atrair os parasitóides. Entretanto, novos estudos podem

ser feitos com as três cultivares plantadas dentro da mesma gaiola, para investigar a preferência para oviposição e alimentação do percevejo em condições de campo.

No geral, os resultados sugerem que as cultivares Dowling e IAC100 possuem características importantes que devem ser levadas em consideração na implementação ou no desenvolvimento de novas cultivares em programas de melhoramento genético visando a obtenção de plantas mais resistentes. O conhecimento sobre os compostos presentes na soja envolvidos no mecanismo de antibiose para o *E. heros* e na atração do *T. podisi*, pode ser utilizado no desenvolvimento de novas cultivares que emitam elevadas quantidades destes compostos; ou a própria liberação dos mesmos no campo; com isso haveria um aumento da eficiência de atração do parasitóide. Novas cultivares podem também ser desenvolvidas, levando em consideração os atributos morfológicos que desfavoreçam o herbívoro, mas favoreçam o inimigo natural.

A teoria da defesa ótima prediz que as plantas podem investir a maior parte da defesa na parte da planta que tem o maior valor no sucesso da planta e que está mais suscetível ao ataque. Espera-se que esta parte deveria ter altos níveis de defesa constitutiva, enquanto outras, que são menos atacadas, deveriam investir mais na defesa induzida (Heil, 2008). Os resultados obtidos neste estudo sugerem que as vagens possuem mais defesas constitutivas enquanto as plantas no estágio vegetativo apresentam a defesa induzida. Novos estudos são necessários para investigar como ocorre a interação das defesas constitutiva e induzida das plantas de soja nos estágios vegetativo e reprodutivo das cultivares Dowling, IAC100 e Silvânia, e se há relação entre as categorias de resistência nos diferentes estágios fenológicos das plantas. Experimentos futuros devem ter como objetivos a determinação da concentração dos isoflavonóides durante os diferentes estágios fenológicos da soja, bem como, a avaliação da relação entre as defesas direta e indireta e a concentração dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelas plantas.

O ideal seria que as plantas apresentassem características que fossem atrativas aos inimigos naturais, mas não aos herbívoros. A obtenção de cultivares com nível moderado de resistência a herbívoros, onde seria possível manter a praga em baixos níveis de infestação, favorecendo assim a manutenção dos inimigos naturais no campo, mas sem causar danos econômicos ao produtor, em associação com outros métodos de controle para o manejo integrado de pragas, poderiam diminuir o uso de inseticidas, contribuindo assim para a sustentabilidade ecológica dos sistemas agrícolas.

## Referências Bibliográficas

AGRAWAL, A. A. 2005. Future directions in the study of induced plant responses to herbivory. *Entomol. Exp. Appl.* 115:97-105.

ANFORA, G., TASIN, M., DE CRISTOFARO, A., IORIATTI, C., e LUCCHI A. 2009. Synthetic grape volatiles attract mated *Lobesia botrana* females in laboratory and field bioassays. *J. Chem. Ecol.* 35: 1054-1062.

ARIMURA, G. I., KOST, C., e BOLAND, W. 2005. Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochim. Biophys. Acta* 1734:91-111.

BALBYSHEV, N. F., e LORENZEN, J. H. 1997. Hypersensitivity and egg drop, a novel mechanism of host-plant resistance to Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 90:652-657.

BALDIN, E. L. L., VENDRAMIN, J. D., e LOURENÇÃO, A. L. 2005. Resistência de genótipos de tomateiro à mosca-branca *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). *Neotrop. Entomol.* 34:435-441.

BALDWIN, I. T., HALITSHKE, R., PASCHOLD, A., e von DAHL, C. C. 2006. Volatile signaling in plant-plant interactions: “talking trees” in the genomics era. *Science* 311:812-815.

BARTLETT, R. 2008. Negative interactions between chemical resistance and predators affect fitness in soybeans. *Ecol. Entomol.* 33:673-678.

BECK, D. 1965. Resistance of plants to insects. *Annu. Rev. Entomol.* 10: 207-232.

BOETHEL, D.J., RUSSIN, J.S., WIER, A.T., LAYTON, M.B., MINK, J.S., e BOYD, M.L. 2000. Delayed maturity associated with southern green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) injury at various soybean phenological stages. *J. Econ. Entomol.* 93: 707-712.

BORGES, M., COLAZZA, S., RAMIREZ-LUCAS, P., CHAUHAN, K. R., MORAES, M. C. B., e ALDRICH, J. R. 2003. Kairomonal effect of walking traces from *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae) on two strains of *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae). *Physiol. Entomol.* 28: 349-355.

BORGES, M., COSTA, M. L. M., SUJII, E. R., CAVALCANTI, M.G., REGÍGOLO, G. F., RESCK, I. S., e VILELA, E. F. 1999. Semiochemical and physical stimuli involved in host recognition by *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae) toward *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). *Physiol. Entomol.* 24: 227-233.

BORGES, M., LAUMANN, R. A., SILVA, C. C. A., MORAES, M. C. B., SANTOS, H. M. E RIBEIRO, D. T. 2006. Metodologias de criação e manejo de colônias de percevejos da soja (Hemiptera: Pentatomidae) para estudos de comportamento e ecologia química. Brasília: Embrapa – Cenargen. 18p. Documentos, n. 182.

BORGES, M., MORAES, M. C. B., PEIXOTO, M. F., PIRES, C. S. S., SUJII, E. R., e LAUMANN, R. A. 2011. Monitoring the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) with pheromone-baited traps in soybean fields. *J. Appl. Entomol.* 135:68-80.

BORGES, M., SCHMIDT, F. G. V., SUJII, E. R., MEDEIROS, M. A., MORI, K., ZARBIN, P. H. G., e FERREIRA, J. T. B. 1998. Field responses of stink bugs to the natural and synthetic pheromone of the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). *Physiol. Entomol.* 23:202-207.

BROWN, G. C., NURDIN, F., RODRIGUEZ, J. G., e HILDEBRAND, D. F. 1991. Inducible resistance of soybean (var “Williams”) to Twospotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). *J. Kans. Entomol. Soc.* 64: 388-393

BUTTER, N. S., e VIR, B. K. 1989. Morphological basis of resistance in cotton to the whitefly *Bemisia tabaci*. *Phytoparasitica* 17:251-261.

CARRÃO-PANIZZI, M. C. e KITAMURA, K. 1995. Isoflavone content in Brazilian soybean cultivars. *Breed. Sci.* 45:295-300.

CARROLL, M. J., SCHMELZ, E. A., e TEAL, P. E. A. 2008. The attraction of *Spodoptera frugiperda* neonates to cowpea seedlings is mediated by volatiles induced by conspecific herbivory and the elicitor inceptin. *J. Chem. Ecol.* 34:291-300.

CHEN, M. S. 2008. Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Sci* 15:101-114.

CHIOZZA, M. V., O'NEAL, M. E., e MacINTOSH, G. C. 2010. Constitutive and induced differential accumulation amino acid in leaves of susceptible and resistant soybean plants in response to the Soybean aphid (Hemiptera: Aphididae). *Environ. Entomol.* 39:856-864.

COLAZZA, S., FUCARINO, A., PERI, E., SALERNO, G., CONTI, E., e BIN, F. 2004a. Insect oviposition induces volatile emission in herbaceous plants that attracts egg parasitoids. *J. Exp. Biol.* 207:47-53.

COLAZZA, S., MCELFRISH, J. S., e MILLAR, J. G. 2004b. Identification of volatile synomones, induced by *Nezara viridula* feeding and oviposition on *Bean* spp., that attract the egg parasitoid *Trissolcus basal*s. *J. Chem. Ecol.* 30:945-964.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. 2010. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, Décimo segundo levantamento, setembro 2010. Brasília-DF: Conab. <<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/7e05515f8222082610088f5a2376c6af..pdf>>.

CORRÊA-FERREIRA, B. S. 1986. Ocorrência natural do complexo de parasitóides de ovos de percevejos da soja no Paraná. *An. Soc. Entomol. Brasil* 15:189-199.

CORRÊA-FERREIRA, B. S. 2002. *Trissolcus basal*s para o controle de percevejos da soja, pp. 449-476, in J. R. P Parra (ed.). Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. Manole Ltda, São Paulo.

- CORRÊA-FERREIRA, B. S., e MOSCARD, F. 1995. Seasonal occurrence and host spectrum of egg parasitoids associated with Soybean stink bugs. *Biol. Control* 5:196-202.
- CORRÊA-FERREIRA, B. S., e MOSCARDI, F. 1996. Biological control of soybean stink bugs by inoculative releases of *Trissolcus basalis*. *Entomol. Exp. Appl.* 79:1-7.
- CORRÊA-FERREIRA, B. S., e PANIZZI, A. R. 1999. Percevejos da soja e seu manejo. Londrina: Embrapa-CNPSo. 45 p. Circular Técnica, n. 24.
- CORTESERO, A. M., STAPEL, J. O., e LEWIS, W. J. 2000. Understanding and manipulating plant attributes to enhance biological control. *Biol. Control* 17:35-49.
- COSTA, M. L. M., BORGES, M. e VILELA, E. F. 1998. Biologia reprodutiva de *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae). *An. Soc. Entomol. Brasil* 27:559-568.
- CROMPTON, D.S., e ODE, P.J. 2010. Feeding behavior analysis of the Soybean aphid (Hemiptera: Aphididae) on resistant soybean 'Dowling'. *J. Econ. Entomol.* 103:648-653.
- D'ALESSANDRO, M., BRUNNER, V., VON MÉREY, G., e TURLINGS, T. C. J. 2009. Strong attraction of the parasitoid *Cotesia marginiventris* towards minor volatile compounds of maize. *J. Chem. Ecol.* 35:999-1008.
- D'ALESSANDRO, M., HELD, M., TRIPONEZ, Y., e TURLINGS, T. C. J. 2006. The role of indole and other shikimic acid derived maize volatiles in the attraction of two parasitic wasps. *J. Chem. Ecol.* 32:2733-2748.
- D'ALESSANDRO, M., e TURLINGS, T. C. J. 2005. *In situ* modification of herbivore-induced plant odors: A novel approach to study the attractiveness of volatile organic compounds to parasitic wasps. *Chem. Senses* 30:739-753.

D'ALESSANDRO, M., e TURLINGS, T. C. J. 2006. Advances and challenges in the identification of volatiles that mediate interactions among plants and arthropods. *Analyst* 131:24-32.

DALL'AGNOL, A., ROESSING, A.C., LAZZAROTTO, J.J., HIRAKURI, M.H., e OLIVEIRA, A.B. 2008. O agronegócio da soja no Brasil e no mundo, pp. 11-29, in Tecnologias de produção de soja: região central do Brasil – 2008. Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste. 280p. Embrapa Soja - Sistemas de Produção, ISSN 1677-8499, n.12.

De MORAES, C. M., MESCHER, M. C., e TUMLINSON, J. H. 2001. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature* 410:577-580.

DEGENHARDT, J., HILTPOLD, I., KÖLLNER, T. G., FREY, M., GIERL, A., GERSHENZON, J., HIBBARD, B. C., ELLERSIECK, M. R., e TURLINGS, T. C. J. 2009. Restoring a maize root signal that attracts insect-killing nematodes to control a major pest. *PNAS* 106:13213-13218.

DICKE, M. 1994. Local and systemic production of volatile herbivore-induced terpenoids: their role in plant-carnivore mutualism. *J. Plant Physiol.* 43: 465-472.

DICKE, M. 1999. Are herbivore-induced plant volatiles reliable indicators of herbivore identity to foraging carnivorous arthropods? *Entomol. Exp. Appl.* 91:131-142.

DICKE, M. 2009. Behavioural and community ecology of plants that cry for help. *Plant Cell Environ.* 32: 654-665.

DICKE, M., e HILKER, M. 2003. Induced plant defences: from molecular biology to evolutionary ecology. *Basic Appl. Ecol.* 4: 3-14.

DICKE, M., e van LOON, J. J. A. 2000. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. *Entomol. Exp. Appl.* 97:237-249.

DIXON, R.A., e STEELF, C.L. 1999. Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci.* 4: 394-400.

DUDAREVA, N., NEGRE, F., NAGEGOWDA, D. A., e ORLOVA, I. 2006. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Crit. Rev. Plant Sci.* 25: 417-440.

EMBRAPA 2008. Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil – 2009 e 2010. Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste. 262p. 2008. (Sistemas de Produção / Embrapa Soja, ISSN 1677-8499; n.13).

ENGELBERTH, J., ALBORN, H. T., SCHMELZ, E. A., e TUMLINSON, J. H. 2004. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101:1781-1785.

FATOUROS, N. E., DICKE, M., MUMM, R., MEINERS, T., e HILKER, M. 2008. Foraging behavior of egg parasitoids exploiting chemical informations. *Behav. Ecol.* 19:677-689.

FEHR, W. R., CAVINESS, C. E., BURMOOD, D. T., e PENNINGTON, J. S. 1971. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Science* 11:929-931.

FERNANDES, F. M.; ATHAYDE, M. L. F., e LARA, F. M. 1994. Comportamento de cultivares de soja no campo em relação ao ataque de percevejos. *Pesq. agropec. bras.* 29:363-367.

FRAENKEL, G. 1969. Evaluation of four thoughts on secondary plant substances. *Entomol. Exp. Appl.* 12: 473-486.

FRITZSCHE HOBALLAH, M. E., TAMÒ, C., e TURLINGS, T. 2002. Differential attractiveness of induced odors emitted by eight maize varieties for the parasitoid *Cotesia marginiventris*: Is quality or quantity important? *J. Chem. Ecol.* 28: 951-968.

FRITZSCHE HOBALLAH, M. E. e TURLINGS, T. C. J. 2001. Experimental evidence that plants under caterpillar attack may benefit from attracting parasitoids. *Evol. Ecol. Res.* 3:553-565.

GALLO, D., NAKANO, O., SILVEIRA NETO, S., CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C., BERTI FILHO, E., PARRA, J.R.P., ZUCCHI, R.A., ALVES, S. B., ENDRAMIM, J. D., MARCHINI, L. C., LOPES, J. R. S., e OMOTO, C. 2002. Entomologia Agrícola. FEALQ, Piracicaba. 920p.

GATEHOUSE, J. A. 2002. Plant resistance towards insect herbivores: A dynamic interaction. *New Phytol.* 156: 145-169.

GAULD, I. D., e BOULTON, B. 1988. The Hymenoptera. Oxford University, Oxford, UK. 331p.

GAZZONI, D. L., SOSA-GÓMEZ, D. R.; MOSCARDI, F.; HOFFMAN-CAMPO, C. B., CORRÊA-FERREIRA, B., OLIVEIRA, L. J., e CORSO, I. 1994. Insects, pp. 81-108, in: Tropical soybean: improvement and production. Rome: FAO. (FAO Plant Production and Protection Series, n. 27).

GREEN, R. H. 1993. Application of repeated measures designs in environmental impact and monitoring studies. *Aust. J. Ecol.* 18:81-98.

GODOY, K. B., GALLI, J. C., e ÁVILA, C. J. 2005. Parasitismo de ovos de percevejos da soja *Euschistus heros* (Fabricius) e *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) e São Gabriel do Oeste, MS. *Cienc. Rural* 35:455-458.

GOULET, H., e HUBER, J. T. 1993. Hymenoptera of the World: an identification guide of families. Research Branch, Agriculture Canada, Ottawa. 668p.

GULLAN P. J., e CRANSTON, P. S. 2008. The insects: an outline of entomology. 3rd. ed. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK.

- HALITSCHKE, R., STENBEG, J.A., KESSLER, D., KESSLER, A., e BALDWIN, I. 2008. Shared signals – “alarm calls“ from plants increase apparency to herbivores and their enemies in nature. *Ecol. Lett.* 11: 24-34.
- HEIL, M. 2004. Induction of two indirect defences befenits Lima bean (*Phaseolus lunatus*, Fabaceae) in nature. *J. Ecol.* 92:527-536.
- HEIL, M. 2008. Indirect defence via tritrophic interactions. *New. Phytol.* 178:41-61.
- HILL, C. B., LI, Y., e HARTMAN, G. L. 2004. Resistance to the Soybean aphid in soybean germplasm. *Crop Sci.* 44:98-106.
- HILKER, M., KOBBS, C., VARAMA, M., e SCHRANK, K. 2002a. Insect egg deposition induces *Pinus sylvestris* to attract egg parasitoids. *J. Exp. Biol.* 205: 455-461.
- HILKER, M. e MEINERS, T. 2002b. Induction of plant responses to oviposition and feeding by herbivorous arthropods: a comparison. *Entomol. Exp. Appl.* 104: 181-192.
- HILKER, M. e MEINERS, T. 2006. Early herbivore alert: insect eggs induce plant defense. *J. Chem. Ecol.* 32: 1379-1397.
- HOBALLAH, M.E., e TURLINGS, T. C. J. 2005. The role of fresh *versus* old leaf damage in the attraction of parasitic wasps to herbivore-induced maize volatiles. *J. Chem. Ecol.* 31:2003-2018.
- HOFFMANN-CAMPO, C. B., HARBORNE, J. B., e McCAFFERY, A. R. 2001. Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. *Entomol. Exp. Appl.* 98:181-194.
- HURLBERT, S. H. 1984. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecol. Monogr.* 54:187–211.
- JORGE, L. A. C., LAUMANN, R. A., BORGES, M., MORAES, M. C. B., CRUZ, R. A., MILARE, B. N., e PALHARES, L. 2005. Software para avaliação do

comportamento de insetos. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária. Circular Técnica, n. 30, 7p.

KALOSHIAN, I. e WALLING, L. L. 2005. Hemipterans as plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:491-521.

KAPLAN, I., LYNCH, M. E., DIVELY, G. P., e DENNO, R. F. 2007. Leafhopper-induced plant resistance enhances predation risk in a phytophagous beetle. *Oecologia* 152: 665-675.

KARBAN, R. 2011. Evolutionary ecology of plant defences: The ecology and evolution of induced resistance against herbivores. *Funct. Ecol.* doi: 10.1111/j.1365-2435.2010.01789.x

KESSLER, A., e BALDWIN. I. T. 2002. Plant responses to insect herbivory. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 53: 299-328.

LARA, F. M. 1991. Princípios de resistência de plantas a insetos. 2.ed. Ícone, São Paulo. 336 p.

LAUMANN, R.A., AQUINO, M.F.S., MORAES, M.C.B., PAREJA, M., e BORGES, M. 2009. Response to egg parasitoids *Trissolcus basal* and *Telenomus podisi* to compounds from defensive secretions of stink bugs. *J. Chem. Ecol.* 35: 8-19.

LAUMANN R. A., FARIAS NETO, A. L., BLASSIOLI-MORAES, M. C., SILVA, A. P., VIEIRA, C. R., MORAES, S. V. P., HOFFMAN-CAMPO, C. B., e BORGES, M. 2008. Dinâmica populacional de percevejos (Hemiptera: Pentatomidae) em diferentes genótipos de soja. In: IX Simpósio Nacional Cerrado; II Simpósio Internacional Savanas Tropicais, Brasília, DF. Desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais: anais. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, <http://www.cpac.embrapa.br/download/747/t>

- LAUMANN, R. A., MORAES, M. C. B., COKL, A., e BORGES, M. 2007. Eavesdropping on the sexual vibratory communication of stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) by the egg parasitoid *Telenomus podisi*. *Anim. Behav.* 73: 637-649.
- LEE, S. J., AHN, J. K., KIM, S. H., KIM, J. T., HAN, S. J., JUNG, M. Y. e CHUNG, I. M. Variation in isoflavone of soybean cultivars with location and storage duration. *J. Agric. Food Chem.* 51: 3382-3389.
- LEWIS, W. J, VAN LENTEREN, J. C., PHATAK, S. C., e TUMLINSON. J. H. 1997. A total system approach to sustainable pest management. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 12243-12248.
- LI, Y., HILL, C. B., e HARTMAN, G. L. 2004. Effect of three resistant soybean genotypes on the fecundity, mortality and maturation of soybean aphid (Homoptera: Aphididae). *J. Econ. Entomol.* 97:1106-1111.
- LI, Y., ZOU, J., LI, M., BILGIN, D. D., VODKIN, L.O., HARTMAN, G. L., e CLOUGH, S. J. 2008. Soybean defense responses to the Soybean aphid. *New. Phytol.* 179:185-195.
- LIMA, A. C. S., e LARA, F. M. 2004. Resistência de genótipos de soja à mosca-branca *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). *Neotrop. Entomol.* 33:71-75.
- LOIVAMÄKI, M., MUMM, R., D ICKE, M., e SCHNITZLER, J. P. 2008. Isoprene interferes with the attraction of bodyguards by herbaceous plants. *PNAS* 105:17430-17435.
- LOURENÇÃO, A. L., MIRANDA, A. C., PEREIRA, J. C. V. N. A., e AMBROSANO, G. M. B. 1997. Resistência de soja a insetos: X. Comportamento de cultivares e linhagens em relação a percevejos e desfolhadores. *An. Soc. Entomol. Brasil* 26:543-550.

MACHADO, V. O. F., FERREIRA, G. A., ROSA, S. R. A., GARCIA, A. H., PINHEIRO, J. B., e VELOSO, V. R. S. 1999. Aspectos biológicos de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) em cultivares de soja (*Glycine max* Merrill). *Pesqu. Agropecu. Trop.* 29:39-41.

MANN, J. 1994. Chemical aspects of biosynthesis. Oxford University Press. 92p.

McPHERSON, R. M. e BUSS, G. R. 2007. Evaluation lepidopteran defoliation resistance in soybean breeding lines containing the stink bug (Hemiptera: Pentatomidae) resistance IAC100 cultivar in their pedigrees. *J. Econ. Entomol.* 100:962-968.

MEDEIROS, M. A., LOIÁCONO, M. S., BORGES, M., SCHIMIDT, e F. V. G. 1998. Incidência natural de parasitóides em ovos de percevejos (Hemiptera: Pentatomidae) encontrados na soja no Distrito Federal. *Pesq. agropec. bras.* 33:1431-1435.

MEDEIROS, M. A., SCHIMIDT, F. V. G., LOIÁCONO, M. S., CARVALHO, V. F., e BORGES, M. 1997. Parasitismo e predação de ovos de *Euschistus heros* (Fab.) (Heteroptera: Pentatomidae) no Distrito Federal, Brasil. *An. Soc. Entomol. Brasil* 26:397-401.

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

MISHALSKA, K. 2003. Clipping of leaf trichomes by eriophyd mites impedes their location by predators. *J. Insect Behav.* 16:833-844.

MORAES, M.C.B., LAUMANN, R.A., PAREJA, M., SERENO, F.T.P.S., MICHEREFF M.F.F., BIRKETT, M.A., PICKETT, J.A., e BORGES, M. 2009. Attraction of the stink bug egg parasitoid *Telenomus podisi* to defence signals from soybean activated by treatment with *cis*-jasmone. *Entomol. Exp. Appl.* 131: 178-188.

MORAES, M. C. B., LAUMANN, R. A., PIRES, C. S. S., SUJII, E. R., e BORGES, M. 2005. Induced volatiles in soybean and pigeon pea plants artificially infested with the

Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, and their effect on the egg parasitoid, *Telenomus podisi*. *Entomol. Exp. Appl.* 115:227-237.

MORAES, M. C. B., PAREJA, M., LAUMANN, R. A., HOFFMANN-CAMPO, C. B., e BORGES, M. 2008. Response of the parasitoid *Telenomus podisi* to induced volatiles from soybean damaged by stink bug herbivory and oviposition. *J. Plant. Int.* 3:1742-1756.

MUMM, R., e HILKER, M. 2005. The significance of background odour for an egg parasitoid to detect plants with host eggs. *Chem. Senses* 30:337-343.

MUMM, R., SCHRANK, K., WEGENER, R., SCHULZ, S., e HILKER, M. 2003. Chemical analysis of volatiles emitted by *Pinus sylvestris* after induction by insect oviposition. *J. Chem. Ecol.* 29: 1235-1252.

NELSON, J. M., e ROITBERG, B. D. 1995. Flexible patch time allocation by the leafminer *Opius dimidiatus*. *Ecol. Entomol.* 20:245-252.

O'NEIL, B. F., ZANGERI, A. R., DERMODY, O., BILGIN, D. D., CASTEEL, C. L., ZAVALA, J. A., DeLUCIA, E. H., BERENBAUM, M. R. 2010. Impact of elevated levels of atmospheric CO<sub>2</sub> and herbivory on flavonoids of soybean (*Glycine max* Linnaeus). *J. Chem. Ecol.* 36:35-45.

ORR, D. B. 1988. Scelionid wasps as biological control agents: a review. *Fla. Entomol.* 71:506-528.

PACHECO, D. J. P., e CORRÊA-FERREIRA, B. S. 2000. Parasitismo de *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Scelionidae) em populações de percevejos pragas da soja. *An. Soc. Entomol. Brasil* 29:295-302.

PAINTER, W.H. 1951. Insect resistance in crop plants. MacMillan, New York.

PANIZZI, A. R. 1997. Wild hosts of pentatomids: ecological significance and role in their pest status crops. *Annu. Rev. Entomol.* 42:99-122.

PANIZZI, A. R. 2000. Suboptimal nutrition and feeding behavior of hemipterans on less preferred plant food sources. *An. Soc. Entomol. Brasil* 29:1-12.

PANIZZI, A. R., DUO, L. J. S., BORTOLATO, N. M., e SIQUEIRA, F. 2007. Nymph developmental time and survivorship, adult longevity, reproduction and body weight of *Dichelops melacanthus* (Dallas) feeding on natural and artificial diets. *Rev. Bras. Entomol.* 51:484-488.

PANIZZI, A. R., e SLANKY Jr., F. 1985. Review of phytophagous pentatomids (Hemiptera: Pentatomidae) associated with soybean in the Americas. *Fla. Entomol.* 68:184-203.

PAREJA, M., MOHIB, A., BIRKETT, A. M., DUFOUR, S., e GLINWOOD, R. T. 2009. Multivariate statistics coupled to generalized linear models reveal complex use of chemical cues by a parasitoid. *Anim. Behav.* 77:901-909.

PEDIGO, L. P. 1996. Entomology and pest management. 2nd.ed. Prentice Hall, Upper Saddle River. 678 p.

PERES, W. A. A., e CORRÊA-FERREIRA, B. S. 2004. Methodology of mass multiplication of *Telenomus podisi* Ash. and *Trissolcus basalus* (Woll.) (Hymenoptera: Scelionidae) on eggs of *Euschistus heros* (Fab.) (Hemiptera: Pentatomidae). *Neotrop. Entomol.* 33:457-462.

PICHERSKY, E., NOEL, J.P., e DUDAREVA, N. 2006. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science* 311: 808-811.

PIETERSE, C.M.J., e DICKE, M. 2007. Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology. *Trends Plant Sci.* 12:564-569.

PIUBELLI, G. C., HOFFMANN-CAMPO, C. B., ARRUDA, I. C., FRANCHINI, J. C., e LARA, F. M. 2003a. Flavonoid increase in soybean as a response to *Nezara viridula* injury and its effects on insect-feeding preference. *J. Chem. Ecol.* 29:1232-1232.

- PIUBELLI, G. C., HOFFMANN-CAMPO, C. B., ARRUDA, I. C., e LARA, F. M. 2003b. Nymphal development, lipid content, growth and weight gain of *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) fed on soybean genotypes. *Neotrop. Entomol.* 32:127-132.
- PIUBELLI, G. C., HOFFMANN-CAMPO, C. B., MOSCARDI, F., MIYAKUBO, S. H., e OLIVEIRA, M. C. N. 2005. Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatilis*? *J. Chem. Ecol.* 31:1509-1525.
- POELMAN, E. H., VAN LOON, J. J. A., VAN DAM, N. M., VET, L. E. M., e DICKE, M. 2010. Herbivore-induced plant responses in *Brassica oleracea* prevail over effects of constitutive resistance and result in enhanced herbivore attack. *Ecol. Entomol.* 35:240–247.
- PORTUGAL, A. D. 1999. State of the soybean agribusiness in Brazil, pp. 39-45, in H. E. Kauffmann (ed.). Proceedings of the World Soybean Research Conference VI, 1999. Chicago, Ill. Superior Printing, Champaign, Illinois.
- PRICE, P. 1997. Insect Ecology. 3rd edn. 874p. John Wiley & Sons, New York.
- RAO, K. V., CHATTOBABHYAY, S. K., e CHANDRASEKHARA REDDY, G. 1990. Flavonoids with mosquito larval toxicity. *J. Agric. Food. Chem.* 38:1427-1430.
- RASMANN, S. e TURLINGS, T. C. J. 2008. First insights into specificity of belowground tritrophic interactions. *Oikos* 117:362-369.
- RAUSHER, M.D. 1992. Natural selection and the plant-insect interaction, pp.20-88, in B. D. Roitenberg and M. B. Isman (eds.). Insect Chemical Ecology. Chapman and Hall, New York.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2009. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing. ISBN 3-900051-07-0. <<http://www.R-project.org>>.

- RÖSE, U. S. R., LEWIS, W. J., e TUMLINSON, J. H. 1998. Specificity of systemically released cotton volatiles as attractants for specialist and generalist parasitic wasps. *J. Chem. Ecol.* 24: 303-319.
- ROSTÁS, M., e EGGERT, K. 2008. Ontogenic and spatio-temporal patterns of induced volatiles in *Glycine max* in the light of the optimal defence hypothesis. *Chemoecology* 18:29-38.
- SANTOS, T. M., e BOIÇA Jr. A. 2001. Resistência de genótipos de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) a *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotrop. Entomol.* 30:297-303.
- SAS Institute. 2001. SAS User's Guide: Statistics, version 8.2, 6nd edn. SAS Institute, Cary, NC.
- SCHALLER, A. 2008. Induced plant resistance to herbivory. Springer, New York. 462p.
- SCHNEE, C., KÖLLNER, T. G., HELD, M., TURLINGS, T. C. J., GERSHENZON, J., e DEGENHARDT, J. 2006. The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. *PNAS* 103: 1129-1134.
- SCHOONHOVEN, L. M., van LOON, J. J. A. e DICKE, M. 2005. Insect- plant biology. Oxford University Press. 421p.
- SCHRÖDER, R., e HILKER, M. 2008. The relevance of background odor in resource location by insects: A behavioral approach. *Bioscience* 58:308-316.
- SIMMONDS, M. S. J. 2001. Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition. *Phytochemistry* 56: 245-252.
- SIMMONDS, M. S. J., e STEVENSON, P. C. 2001. Effects of isoflavonoids from *Cicer* on larvae of *Helicoverpa armigera*. *J. Chem. Ecol.* 27:965-977.

- SIMMONS, A. T., e GURR, G. M. 2005. Trichomes of *Lycopersicon* species and their hybrids: effects on pests and natural enemies. *Agric. Forest Entomol.* 7: 265-276.
- SIMPSON, M., GURR, G. M., SIMMONS, A. T., WRATTEN, S. D., JAMES, D. G., LEESON, G., e NICOL, H. I. 2011. Insect attraction to synthetic herbivorie-induced plant volatile-treated Field crops. *Agric. Forest Entomol.* 13:45-57.
- SNOEREN, T. A. L., MUMM, R., POELMAN, E. H., YANG, Y., PICHERSKY, E., e DICKE, M. 2010. The herbivore-induced plant volatile methyl salicylate negatively affects attraction of the parasitoid *Diadegma semiclausum*. *J. Chem. Ecol.* 36:479-489.
- SOO HOO, C.F., e FRAENKEL, G. 1966. The selection of food plants in a polyphagous inect, *Prodenia eridania* (Cramer). *J. Insect Physiol.* 12: 693-709.
- SOSA-GÓMES, D.R., e MOSCARDI, F. 1995. Retenção foliar diferencial em soja provocada por percevejos (Heteroptera: Pentatomidae). *An. Soc. Entomol. Brasil* 24: 401-404.
- SRIVASTAVA, R., SHUKLS, Y. N., e KUMAR, S. 1999. Recent advances in the chemistry of insect antifeedants. *J. Med. Arom. Plant Sci.* 21: 59-76.
- THALER, J. S. 1999. Jasmonate-inducible plant defenses cause increased parasitism of herbivores. *Nature* 399:686-688.
- ter BRAAK, C. J. F. e ŠMILAUER, P. 2002. CANOCO reference manual and user's guide to Canoco for Windows: software for canonical community ordination (version 4.5). Microcomputer Power, Ithaca, New York.
- TORRES, J. B., e RUBERSON, J. R. 2005. Canopy and ground-dwelling predatory arthropods in commercial Bt and non-Bt cotton fields: patterns and mechanisms. *Environ. Entomol.* 34:1242-1256.
- TREUTTER, D. 2006. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environ. Chem. Lett.* 4:147-157.

TURLINGS, T. C. J., LENGWILER, U.B., BERNASCONI, M.L., e WECHSLER, D. 1998a. Timing of induced volatile emissions in maize seedlings. *Planta* 207:146-152.

TURLINGS, T. C. J., BERNASCONI, M., BERTOSSA, R., BIGLER, F., CALOZ, G. e DORN, S. 1998b. The induction of volatile emissions in maize by three herbivore species with different feedings habits: possible consequences for their natural enemies. *Biol. Cont.* 11: 122-129.

TURLINGS, T. C. J., e TON, J. 2006. Exploiting scents of distress: the prospect of manipulating herbivore-induced plant odours to enhance the control of agricultural pests. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9:421-427.

UNDERWOOD, N. 2000. Density dependence in induced plant resistance to herbivore damage: threshold, strength and genetic variation. *Oikos* 89:295-300.

UNDERWOOD, N., RAUSHER, M., e COOK, W. 2002. Biassay versus chemical assay: measuring the impact of induced and constitutive resistance on herbivores in the field. *Oecologia* 131:211-219.

VALLE, G. E., e LOURENÇÃO, A. L. 2002. Resistência de genótipos de soja a *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). *Neotrop. Entomol.* 31:285-295.

van den BRINK, P. J., e ter BRAAK, C. J. F. 1999. Principal response curves: analysis of time dependent multivariate responses of biological community to stress. *Environ. Toxicol. Chem.* 18:138-148.

van den BRINK, P. J., van den BRINK, N. W., e ter BRAAK, C. J. F. 2003. Multivariate analysis of ecotoxicological data using ordination: demonstrations of utility on the basis of various examples. *Aust. J. Ecotoxicol.* 9:141-156.

VENDRAMIM, J. D. 2002. O controle biológico e a resistência de plantas, pp. 511-528, in in J. R. P Parra (ed.). Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. Manole Ltda, São Paulo.

VENDRAMIN, J.D., e GUZZO, E.C. 2009. Resistência de plantas e a bioecologia e nutrição dos insetos, pp. 1055-1105, in A.R. Panizzi and J.R. Parra (eds.). Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília-DF.

VET, L. E. M., e DICKE, M. 1992. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tri-trophic context. *Annu. Rev. Entomol.* 47:141-172.

VET, L. E. M., De JONG, A. G., FRANCHI, E., e PAPAJ, D. R. 1998. The effect of complete versus incomplete information on odour discrimination in a parasitic wasp. *Anim. Behav.* 55:1271-1279.

VET, L. E. M., van LENTEREN, J. C., HEYMANS, M., e MEELIS, E. 1983. An airflow olfactometer for measuring olfactory responses of hymenopterous parasitoids and other small insects. *Physiol. Entomol.* 8:97-106.

VILLAS-BÔAS, G. L., GAZZONI, D. L., OLIVEIRA, M. C. N.; PEREIRA, N. P.; ROESSING, A. C.; FRANÇA NETO, J. B., e HENNING, A. 1990. Efeito de diferentes populações de percevejos sobre rendimento e seus componentes, características agrônômicas e qualidade de sementes de soja. Londrina: Embrapa-CNPSo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n.1, 43p.

VINSON, S. B. 1984. Parasitoid-host relationship, pp. 205-233, in W. J. Bell and R. T. Cardé (eds.). Chemical ecology of insects. Chapman & Hall, New York.

VINSON, S. B. 1985. The behavior of parasitoids, pp. 417-469, in G. A. Kerkut and L. I. Gilbert. Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology 9. Pergamon Press, New York.

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

von ENDE, C. N. 1993. Repeated-measures analysis: growth and other time-dependent measures, pp. 113-137, in S. Scheiner and J. Gurevitch (eds.). Design and analysis of ecological experiments. Chapman & Halland, New York.

WALLING, L. L. 2000. The myriad plant responses to herbivores. *J. Plant Growth Regul.* 19:195-216.

WILCOX, J. R. 2004. World distribution and trade of soybean, pp.1-4, in: Madison: Boerma, H. R. and J. E. Specht (eds.). Soybeans: improvement, production and uses. ASA: CSSA: SSSA, Madison. (Agronomic Monography,16).

WILLIAMS III, L., RODRIGUEZ-SAONA, C., CASTLE, S.C., e ZHU, S. 2008. EAG-active herbivore-induced plant volatiles modify behavioral responses and host attack by an egg parasitoid. *J. Chem. Ecol.* 34:1190-1201.

YAN, Z.-G., e WANG, C.-Z. 2006. Wound-induced green leaf volatiles cause the release of and a terpenoid in maize. *Phytochemistry* 67:34-42.

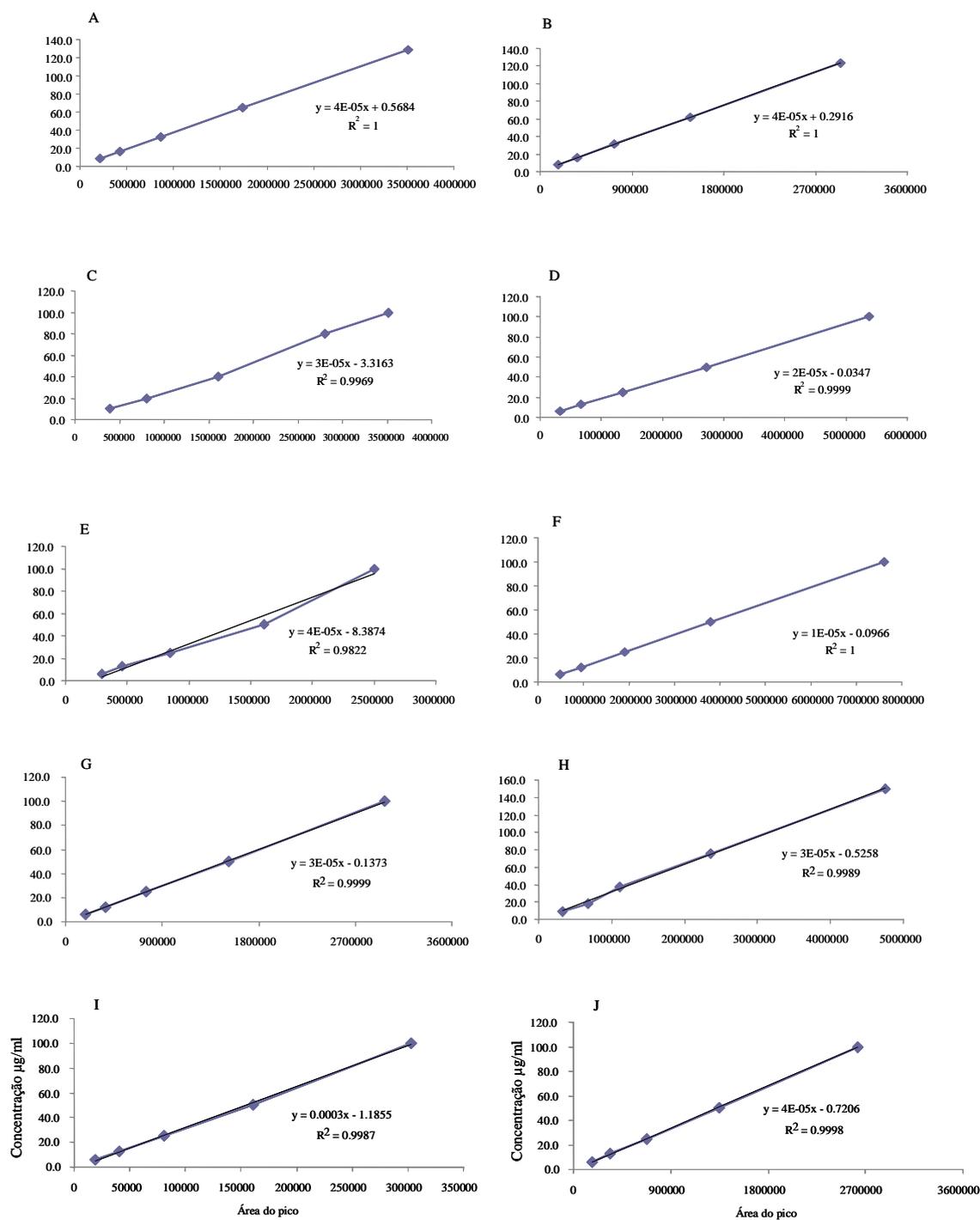
YU, H., ZHANG, Y., W. U. K., GAO, X. W., e GUO, Y. Y. 2008. Field-testing of synthetic herbivore-induced plant volatiles as attractants for beneficial insects. *Environ. Entomol.* 37:1410-1415.

ZAR, J. H. 1998. Biostatistical Analysis. 1nd edn. P. 929. Prentice Hall, London, UK.

## **Lista de Anexos**

### **Anexo1 - Procedência dos Compostos Químicos e Curvas de Calibração Para a Quantificação dos Flavonóides na Soja**

O metanol utilizado foi adquirido da J. T. Baker Chemicals B. V. (Deventer, Holanda) e o ácido acético da Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Água ultra-pura foi obtida através do sistema de purificação Milli-Q-Millipore Corporation (Bedford, MA, USA). O hexano (95%) foi adquirido da Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). (*E*)-2-hexenal e (*Z*)-3-hexen-1-ol foram adquiridos da Sigma Aldrich (Gillingham, Dorset, UK). (*Z*)-3-acetato de hexenila foi adquirido da Alfa Aesar (Heysham, UK) e (*E*)-ocimeno da Botanix (Paddock Wood, Kent, UK). Limoneno e linalol foram adquiridos da TCI America (Portland, USA). Salicilato de metila,  $\beta$ -cariofileno, benzotiaz,  $\beta$ -mirceno, geranyl acetona e (*E*)-2-acetato de hexenila foram adquiridos da Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno foi fornecido pelo pesquisador Jeffrey Aldrich (USDA-ARS, USA) e (*E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (DMNT) e (*E,E*)-4,8,12-trimetiltrideca-1,3,7,11-tetraeno (TMTT) foram fornecidos pelos pesquisadores Michael Birkett (Rothamsted Research, UK).



Curvas de calibração para a quantificação dos flavonóides na soja. Compostos: A) daidzina, B) glicitina, C) genistina, D) daidzeína, E) gliciteína, F) genisteína, G) malonil-daidzina, H) acetil-daidzina, I) malonil-glicitina, J) malonil-genistina.

**Anexo 2 - Manuscrito Referente à Parte dos Resultados Apresentados no Capítulo II, Publicado no Periódico “Journal of Chemical Ecology”.**

**Volatiles Mediating a Plant-Herbivore-Natural Enemy Interaction in Resistant and Susceptible Soybean Cultivars**

Michereff, M.F.F.,<sup>1,2</sup> Laumann R.A.,<sup>1</sup> Borges, M.,<sup>1</sup> Michereff-Filho M.,<sup>3</sup> Diniz I.R.,<sup>2</sup>,  
Farias Neto, A.L.,<sup>4</sup> Moraes M.C.B\*<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>*Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brazil*

<sup>2</sup>*Universidade de Brasília, Departamento de Zoologia, Brasília, Brazil*

<sup>3</sup>*Embrapa Hortaliças, Brasília, Brazil*

<sup>4</sup>*Embrapa Cerrados, Brasília, Brazil*

\*Correspondence: Moraes, MCB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Parque Estação Biológica-W5 Norte, CEP 70770-900, Brasília/DF, Brazil, Tel: +55 61 3448-4932, FAX +55 61 3448-4762; e-mail: [mcbmorae@cenargen.embrapa.br](mailto:mcbmorae@cenargen.embrapa.br)

**Abstract** Several studies have shown that herbivore induced plant volatiles act directly on herbivores and indirectly on their natural enemies. However, little is known about the effect of herbivore damage on resistant and susceptible plant cultivars and its effect on their natural enemies. Thus, the aim of this study was to evaluate the attraction of the herbivorous pentatomid bug *Euschistus heros* and its egg parasitoid *Telenomus podisi* to different types of damage (herbivory, herbivory+oviposition and oviposition) in two resistant soybean cultivars, Dowling and IAC100, and one susceptible cultivar, Silvânia. In a Y-tube olfactometer, the parasitoids were attracted to herbivory and herbivory+oviposition damaged soybean plants when compared to undamaged soybean plants for the resistant cultivars, but did not show preference for the susceptible cultivar Silvânia in any of the damage treatments. The plant volatiles emitted by oviposition damaged plants in the three cultivars did not attract the egg parasitoid. In four-arm-olfactometer bioassays *E. heros* females did not show preference for odors of damaged or undamaged soybean plants of the three cultivars studied. The Principal Response Curves (PRC) analysis showed consistent variability over time in the chemical profile of volatiles between treatments for the cultivar Dowling. The compounds that most contributed to the divergence between damaged soybean plants compared to undamaged

plants were (*E,E*)- $\alpha$ -farnesene, methyl salicylate, (*Z*)-3-hexenyl acetate, and (*E*)-2-octen-1-ol.

**Key words** *Euschistus heros*, *Telenomus podisi*, Stink Bug, Tritrophic Interactions, Indirect Defense.

## Introduction

Plants are equipped with several mechanisms to defend themselves against herbivores, microbial pathogens, or abiotic stress. One of the mechanisms of damage-induced plant defense is the production of plant volatile organic compounds (VOCs) that serve as repellents to herbivores or as attractants to parasitoids and predators (Price 1997; De Moraes et al. 2001; Hilker and Meiners 2006; Chen 2008; Heil 2008).

Plants can change the blend of VOCs in response to damage either qualitatively or quantitatively (Dicke 1999), depending mainly on plant traits that vary among species or genotypes and on the different herbivore species causing the damage (Lin et al. 2008; Rasmann and Turlings 2008). This change can be responsible for a differential attraction of parasitoids and predators (Fritzsche Hoballah and Turlings 2001). Soybean plants, *Glycine max* L. (Fabales: Fabaceae) and pigeon pea, *Cajanus cajan* (Valder) (Fabales: Fabaceae) damaged by *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae), released a similar chemical profile of volatiles which attracted the egg parasitoid *Telenomus podisi* (Ashmead) (Hymenoptera: Scelionidae). However, when soybean was damaged by feeding *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) larvae, the chemical profile was different and did not attract *T. podisi* (Moraes et al. 2005).

The identification of chemicals responsible for plant defense and their role in the interactions with natural enemies could be used to attract and retain parasitoids in crops (Gatehouse 2002) and could help breeders in the development of cultivars resistant to pests (Piubelli et al. 2005). Therefore, it is important that hostplant resistance combines positively with the action of natural enemies. However, this association does not always result in positive interactions. Chemical and morphological plant attributes can directly influence survival, fecundity, and foraging success of natural enemies on hosts or prey. These traits can also have indirect effects by affecting the quality of herbivores that in turn affects the physiology, behavior, or development of their natural enemies

(Cortesero et al. 2000). In a study investigating the effects of chemical plant resistance against herbivores and of predators on plant fitness, Bartlett (2008) observed a negative interaction between the predator *Podisus maculiventris* (Say) (Hemiptera: Pentatomidae) and soybean resistance against *Epilachna varivestis* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae).

Studies on resistance in soybean cultivars primarily involve direct defense against herbivory during the reproductive stage of soybean (Piubelli et al. 2005; Li et al. 2004, 2008). Carrão-Panizzi et al. (1995) reported that IAC100 contains high quantities of isoflavone compared to other soybean cultivars studied and showed high resistance to herbivorous stink bugs. The resistance of IAC100 to stink bugs and lepidopteran larvae was confirmed by McPherson and Buss (2007) and Piubelli et al. (2005) who proposed an antibiotic effect of this cultivar on velvetbean caterpillars, *A. gemmatalis*. The cultivar Dowling shows antixenotic and antibiotic effects against aphids, which stop feeding and die after 48 hr (Li et al. 2004, 2008).

However, except for these studies of direct effects of soybean cultivar resistance on herbivores, yet no study addressed the question how resistant traits of the vegetative stages of soybean cultivars affect the plant's indirect defense against herbivores. For Integrated Pest Management in soybean crops, it has been proposed that natural enemies could be released or attracted in the field before herbivorous stink bugs arrive (Borges et al. 1998). Therefore, it is important that the development of resistant cultivars does not alter plant responses to herbivore damage and the release of herbivory-induced volatiles that attract natural enemies.

In this study we tested the hypothesis that the level of indirect defense in response to damage by herbivores in resistant soybean cultivars is different from that of susceptible cultivars. Hence, we compared chemically the blend of herbivore-induced volatiles in resistant and susceptible soybean cultivars during the vegetative stages. In addition, we compared the behavioral response of both herbivores and their parasitoids to induced volatiles released by the different soybean cultivars. We chose two different cultivars that are known to display resistance against herbivores (IAC100 and Dowling) and one cultivar which shows high susceptibility to stink bugs (Silvânia) (Laumann et al. 2008); the studied herbivorous insect was the stinkbug *E. heros* and its egg parasitoid *T. podisi*.

In detail, we studied the following questions: (i) Does *T. podisi* respond differently to resistant and susceptible cultivars, when exposed to undamaged plants or plants damaged by herbivory and oviposition by *E. heros*? (ii) Are *E. heros* females attracted to the volatiles of undamaged or damaged soybean cultivars? (iii) Do resistant and susceptible soybean cultivars release a different chemical profile of volatiles when submitted to herbivory, herbivory + oviposition or oviposition damage by *E. heros*? (iv) Does attraction of *T. podisi* depend on the extent of herbivore damage?

### **Material and Methods**

*Plant and Insect Rearing* Soybean (cultivars Dowling, IAC100 and Silvânia) seeds were obtained from the Embrapa Cerrados Research Center (Brasília, DF, Brazil). The seeds were germinated on damp paper and after 3 d they were transplanted to pots with a mixture of soil and organic substrate (in a proportion of 1:1 w/w) and kept in a controlled environment room at L14:D10 photoperiod,  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $65 \pm 10\%$  r.h. All plants used in the experiments were in the V3 physiological stage (Fehr et al. 1971).

*E. heros* individuals were obtained from a laboratory colony started from adults collected in soybean fields near Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, Brazil ( $15^\circ47'$  S,  $47^\circ55'$  W). Bugs were reared in 8 l plastic containers, on a diet of soybeans, sunflower seeds (*Helianthus annuus*), raw peanuts (*Arachis hypogaea*), fresh green beans (*Phaseolus vulgaris*), and water. The food supply was renewed twice a week. To provide oviposition substrate and shelter for the bugs, a  $15\text{ cm}^2$  piece of a nylon mesh screen was placed inside the cages. To obtain virgin females, insects were sexed after their imaginal molt and cuticular hardening, and maintained isolated from males until their use in experiments.

The egg parasitoid *T. podisi* was obtained from a laboratory colony raised on eggs of *E. heros*. The wasps were maintained in acrylic cages ( $25\text{ cm}^2$  tissue culture flask, angled neck; ICN Biomedicals, Irvine, CA, USA), and fed with a drop of honey, supplied twice a week. Once parasitoids hatched from eggs, they were kept in acrylic cages for mating for 24 h, without host eggs. Two-day-old naïve females were used in the experiments. *E. heros* and *T. podisi* were maintained in separate environmental rooms at  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $65 \pm 10\%$  r.h. and a 14 hr photoperiod.

*Preparation of Plants for Bioassays* To evaluate the attraction of *T. podisi* to the three soybean cultivars (cv), the following treatments were used: (1) Herbivory damaged

soybean (Herb): five virgin sexually immature *E. heros* females (2 - 4 d in the adult stage) were placed on the plant; (2) Herbivory+oviposition damaged soybean (HerbOvi): five mated *E. heros* females (12 - 15 d into the adult stage) were placed on the plant; (3) Oviposition damaged soybean (Ovi): five mated *E. heros* females, with their stylet removed using dissection scissors, were placed on the plant; (4) Control: undamaged soybean (UD). For the treatments each plant was kept in a micropore plastic bag (bread bag) where the insects were introduced. The plants were used 24, 48, 72, 96, and 120 hr after damage, with 60 replicates for each time/treatment combination. All insects were removed from the plants a few minutes before the bioassays.

To evaluate the preference of *E. heros* females, the soybean plants were submitted to the same treatments as described above. All bioassays were carried out using plants on the 4<sup>th</sup> d of damage, because preliminary results showed that natural enemies respond to damaged plants only on the fourth day, and the chemical analysis of the extracts collected from the air-entrainment also showed higher levels of volatiles released on the fourth day.

*Olfactometer Bioassays with Egg Parasitoids* To determine if herbivory- or oviposition-induced volatiles have an effect on the foraging behavior of parasitoids, a choice between odors in a Y-shaped olfactometer was offered to individual naïve female parasitoids. A square acrylic block (19 x 19 cm) with a Y-shaped cavity (1cm thickness) sandwiched between two glass plates was used as the bioassay arena (Moraes et al. 2005). The trunk of the apparatus measured 8 cm, and each arm measured 7 cm. Damaged or undamaged plants were placed in glass chambers that were connected to the olfactometer via silicon tubing. Filtered (activated charcoal) and humidified air was pushed through the system at 0.6 l/min, and pulled through at 0.2 l/min, in a push-pull system. The behavior of the insect was monitored by a camera (CCD camera Sony SPT M324CE; Sony, Minato-Ku, Tokyo, Japan fitted with a 12.5-75.0 mm/F1.8 zoom lens) coupled to SACAM software (Jorge et al. 2005) to register behavioral parameters. A single *T. podisi* female was introduced at the base of the Y-tube and observed for 600 sec, and the first choice in each arm was recorded by the software. The first choice was considered to have been made when the insect entered an arm and remained there for at least 20 sec. Each individual was used only once, and the plants were replaced after every five repetitions. The position of the arms of the olfactometer was changed after every five bioassays in order to avoid any bias in the parasitoid response. The response

of the parasitoid females was tested for each combination as follows: (1) Herb vs. UD ( $N = 60$ ); (2) HerbOvi vs. UD ( $N = 60$ ) and (3) Ovi vs. UD ( $N = 60$ ). The bioassays were carried out for each soybean cultivar at 24, 48, 72, 96, and 120 hr after the start of damage. The damaged and undamaged plants were kept under the same conditions, but in different rooms to avoid plant-plant signalling, until used in the bioassays.

*Olfactometer Bioassays with Herbivore Females* A four-arm-olfactometer modified from Vet et al. (1983) was used with *E. heros* females. The olfactometer was constituted of a square acrylic block (44 x 44 cm) with an X-shaped cavity (1.5 cm) sandwiched between two glass plates, and it was used as the bioassay arena. The "X" of the apparatus measured 37 cm, and length of the active area for each arm was 25 cm. The length of each arm considered for a positive response of the insects was 15 cm, measured from the upwind end towards the center of the olfactometer. The bioassay was carried out using the same procedure as in the Y-olfactometer conditions described above. The first choice was considered to have been made when the insect entered an arm and remained there for at least 60 sec. The responses of 70 stink bug females were tested for each combination: (1) Herb vs. HerbOvi vs. Ovi vs. UD for each soybean cultivar (cv) with 96 hr of damage and (2) UD of cv Dowling vs. UD cv IAC100 vs. UD cv Silvânia vs. Air. For each combination we tested females in different physiological conditions: (a) starved virgin females (the diet was removed 24 hr before the bioassay); (b) fed virgin females, and (c) fed mated females.

*Volatile Analysis* Herb, HerbOvi, Ovi and UD plants were placed individually in cylindrical glass chambers (internal volume 10 l). Volatiles were collected for 24 hr, during seven consecutive days ( $N = 11$  replicates for each treatment). In an attempt to minimize contamination by volatiles from the soil, the pots were wrapped in aluminium foil. A glass tube containing the adsorbent Super Q (100 mg, 80-100mesh, Alltech PA, USA) was connected via a PTFE tube to a vacuum pump at a flow of 0.6 l/min and the air entrance was connected to a flow of air filtered with activated charcoal (1.0 l/min) creating a positive push-pull system (Moraes et al. 2008). The trapped volatiles were eluted from the adsorbent using 500  $\mu$ l *n*-hexane and pre-concentrated to 200  $\mu$ l under a  $N_2$  flow. Extracts were stored at  $-20^\circ\text{C}$  until analysis by gas chromatography (GC) and GC coupled to mass-spectrometry (GC-MS).

The extracts obtained by air entrainment were analyzed by GC (Shimadzu 17A, DB-5 column, 30 m X 0.25 mm ID, 0.25  $\mu$ m film, J&W Scientific, Folsom, CA, USA), using a temperature program of 50°C/1 min, 15°C/min to 250°C/20 min. The column effluent was analyzed with a flame ionization detector (FID) at 270°C. For the GC analyses 50  $\mu$ l of each extract was separated, and 1  $\mu$ l of 1-octen-3-ol was added as internal standard (IS), for a final concentration of 9.8  $\mu$ g/ml of the IS. One microliter of each sample was injected using a splitless mode with helium as carrier gas. Amounts released by the plant in each 24 hr period were calculated in relation to the area of the internal standard. Data were collected with ClassGC software and were handled using Excel Software (Microsoft Corporation 2003).

For qualitative analysis, selected extracts were analyzed using a Shimadzu QP2010 instrument equipped with a quadrupole analyzer, a non-polar DB-5 column (30 m X 0.25 mm ID, 0.25  $\mu$ m film, J&W Scientific, Folsom, CA, USA) and a splitless injector, with helium as the carrier gas. Ionization was by electron impact (70-eV, source temperature 200°C). Data were collected and analyzed with GC-MS Solutions 2.4 Software (Shimadzu Corporation, Japan). Identifications were made by comparison of spectra with library databases (NIST 2005) or with published spectra and confirmed using authentic standards when available.

*Chemicals* Super Q (80/100 mesh) was purchased from Alltech (PA, USA). n-Hexane (95% pesticide residue) was purchased from Fisher Scientific (Loughborough, Leicestershire, UK). (*E*)-2-hexenal and (*Z*)-3-hexen-1-ol were purchased from Sigma Aldrich (Gillingham, Dorset, UK). (*Z*)-3-hexenyl acetate was purchased from Alfa Aesar (Heysham, UK) and (*E*)-ocimene from Botanix (Paddock Wood, Kent, UK). Limonene and linalool were purchased from TCI America (Portland, USA). Methyl salicylate,  $\beta$ -caryophyllene, benzothiazole,  $\beta$ -myrcene, geranyl acetone and (*E*)-2-hexenyl acetate were purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). (*E,E*)- $\alpha$ -farnesene was provided by Jeffrey Aldrich (USDA-ARS, USA) and (*E*)-4,8-dimethylnona-1,3,7-triene (DMNT) and (*E,E*)-4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene (TMTT) were provided by Michael Birkett (Rothamsted Research, UK).

*Statistical Analysis* The null hypothesis of equal preference ( $P=0.05$ ) of parasitoids for the volatiles from damaged plants vs. undamaged plants was tested at each sampling

time (24, 48, 72, 96, and 120 hr), using *chi-square* tests with the Yates correction for continuity (Zar 1998).

Since the volatile sampling was carried out on the same plant at several time points, repeated measures analysis of variance was used to avoid the problem of pseudo-replication during the times analyzed (Hurlbert 1984; Green 1993). Therefore, the total amount of volatiles released in each treatment over time was compared by MANOVA (PROC ANOVA with the PROFILE statement; SAS Institute, 2001), using the subsequent sampling times as repeated measures of the same experimental unit, as suggested by von Ende (1993). Significant data by MANOVA were subjected to post-hoc mean comparisons in individual sampling time using the Tukey's test (significance level 5%).

The change in the chemical profile of damaged and undamaged soybean plants over time was assessed using Principal Response Curves (PRC) analysis. PRC models the effect of the treatment  $d$  at a determined time  $t$  in a species  $k$ . The statistical model for compound concentration is:  $(y_{d(j)tk} = y_{0k} + b_k c_{dt} + \varepsilon_{d(j)tk})$ , where,  $y_{d(j)tk}$  is the concentration of the compound  $k$  in replicate  $j$  of treatment  $d$  at time  $t$ ,  $y_{0k}$  is the mean concentration of the compound  $k$  in time  $t$  in the control (untreated plant,  $d = 0$ ),  $c_{dt}$  is a basic response pattern for every treatment  $d$  and time  $t$ ,  $b_k$  is the weight of each compound with this basic response pattern and  $\varepsilon_{d(j)tk}$  is an error term with mean zero and variance  $\sigma_k^2$ . These parameters were generated through RDA least-squares estimates from reduced-rank regression with concomitant variables (van den Brink and ter Braak 1999), with  $N = 11$  replicates for each sampling time and treatment.

The values of  $c_{dt}$  for the treatment (treatment effect) were plotted as vertical axis (first principal component, PRC1) over sampling time generating a PRC diagram, with a curve for each treatment, that describes the dynamic changes in the blend of volatiles released by the plant. We compared the variation in volatile composition in damaged and undamaged soybean, the latter being our standard ( $c_{dt} = 0$ ). The response variable weights (displayed on the right side of each diagram) allow evaluation of the contribution of each compound to the overall blend composition. The higher the values of the weight of the variable, the higher the contribution of the compound to the actual response pattern of the PRC.

PRC analysis was applied separately to each soybean cultivar, comparing the damaged and undamaged soybean. For each set of analyses, the significance of each PRC diagram was tested using an F-type test obtained by permutating (Monte Carlo

permutation tests; 999 permutations) whole time series in the partial RDA from which the PRC was obtained. A second series of permutation tests (individual contrasts) was performed within each sampling date to determine if differences indicated by the PRC diagram between treatments were statistically significant. These analyses were carried out using the software CANOCO 4.5 for Windows (ter Braak and Šmilauer 2002). The data from the main volatile compounds responsible for the treatment differences in PRC diagram were individually submitted to repeated measures MANOVA followed by contrasts formed within sampling time to compare induction treatments against the control, using the *t* test (significance level 5%).

## Results

*Olfactometer Bioassays with Egg Parasitoids* When testing the resistant soybean cultivar Dowling, the egg parasitoid *T. podisi* responded preferentially to the odor of plants with herbivory (Herb;  $\chi^2=7.67$ ,  $P=0.005$ ;  $\chi^2=8.06$ ,  $P=0.005$ ) and herbivory plus egg deposition (HerbOvi;  $\chi^2=9.60$ ,  $P=0.002$ ;  $\chi^2=8.06$ ,  $P=0.005$ ) when compared to undamaged plants (UD) after a 72 and 96 hr-treatment-period, respectively (Fig. 1). *T. podisi* preferred volatiles from the resistant soybean cultivar IAC100 when these have been treated for 96 hr by herbivory (Herb,  $\chi^2=11.26$ ,  $P=0.001$ ) and herbivory plus egg deposition (HerbOvi,  $\chi^2=8.06$ ,  $P=0.005$ ) to volatiles from undamaged (UD) plants. No preference was observed to the odors of cv IAC100 with other treatments at the different times evaluated (Fig. 2). For the susceptible cultivar Silvânia, *T. podisi* did not discriminate between odors emitted by undamaged plants and damaged plants regardless of the treatments and duration of treatment ( $P>0.05$ ) (Fig. 3).

*Olfactometer Bioassays with Herbivore Females* In the four-arm-olfactometer bioassays, the *E. heros* females in the different physiological states tested (virgin starved, virgin fed, and mated fed) did not show a preference for the Herb, HerbOvi, Ovi, or UD plants ( $\chi^2$ ,  $P>0.05$ ) of any the three cultivars Silvânia, IAC100 and Dowling or for undamaged plants of the three cultivars tested against air.

*Volatile Analysis* The total amount of volatiles released by the soybean cultivar Dowling differed between treatments throughout the sampling times (treatment:  $F=9.89$ ; *d.f.* = 3, 56;  $P=0.001$ ; interaction: *Wilk's*  $\lambda=0.383$ ; *d.f.*=18, 145;  $F=3.25$ ;

$P=0.001$ ) (Fig. 4). The chemical profile of Dowling plants treated by herbivory (Herb), herbivory plus egg deposition (HerbOvi), egg deposition only (Ovi) differed when compared to undamaged plants (UD) at 48 hr of treatment and at longer treatment periods (post-hoc pairwise comparisons by Tukey test,  $P<0.05$ ). No difference was observed for treatment effects or its interaction with time for the cv IAC100 (treatment:  $F=1.82$ ;  $d.f.=3, 56$ ;  $P=0.15$ ; interaction: *Wilk's*  $\lambda=0.583$ ;  $d.f.=18, 145$ ;  $F=1.61$ ;  $P=0.06$ ) or cv Silvânia (treatment:  $F=2.63$ ;  $d.f.=3, 56$ ;  $P=0.06$ ; interaction: *Wilk's*  $\lambda=0.607$ ;  $d.f.=18, 145$ ;  $F=1.55$ ;  $P=0.08$ ) (Fig. 4).

The chemical profile of the extracts obtained from the treatments Herb, HerbOvi, Ovi and UD differed between the three cultivars, Dowling, IAC100 and Silvânia. The compounds (*Z*)-2-octen-1-ol and (*E*)-2-octen-1-ol were identified only in cv Dowling; (*E*)-2-hexenyl acetate and indole were identified in cv IAC100; while DMNT was identified only in cv Silvânia (Table 1). The cultivars also emitted common compounds, such as the green leaf volatile (*Z*)-3-hexenyl acetate; the terpenoids camphene, limonene,  $\alpha$ -humulene,  $\beta$ -caryophyllene, (*E,E*)- $\alpha$ -farnesene, TMTT, and the shikimic acid derivatives benzothiazole, benzaldehyde and methyl salicylate. In addition, some compounds were released in higher quantities by damaged soybean when compared to undamaged soybean (Table 1).

*Soybean Cultivar Dowling* The PRC analysis of the plant volatiles released showed that cv Dowling had a consistent variability over time between treatments. Of the total variance in the blend composition of volatiles released, 8.6% is explained by sampling times and 12% is explained by induction treatments. The variance exhibited in the first PRC axis was highly significant (Monte Carlo permutation test  $F=35.0$ ,  $P=0.001$ ), and explained 63.0% of the variation in the blend composition due to interactions between sampling times and induction treatments (Fig. 5). At 24 hr after damage the analysis did not show a significant difference, indicating that the blends of the four treatments were similar. From 48 hr onward PRC showed a clear divergence in curves of the treatments when compared to the undamaged soybean (Fig. 5).

All variable weights ( $b_k$ ) showed on the right side of the PRC diagram were positive (Fig. 5), which means that all compounds were positively associated with the pattern of changes in the volatile blend. Compounds with weight values higher than 0.5 contribute to the overall volatile blend response (van den Brink and ter Braak 1999) and the greater the  $b_k$  value, the higher the influence on the blend response. Thus, (*E,E*)- $\alpha$ -

farnesene, methyl salicylate, (Z)-3-hexenyl acetate, and (E)-2-octen-1-ol were the main compounds that contributed ( $b_k$  absolute values > 1.0) to the divergence between treatments and control for the cv Dowling (Fig. 5).

A significant interaction between treatment and time (MANOVA for repeated measures,  $P < 0.05$ ) was found when data for the main compounds of cultivar Dowling were analyzed individually (Fig. 6). Plants with the treatments Herb and HerbOvi differed from UD plants (contrasts within sampling date;  $t$  test,  $P < 0.05$ ), releasing significantly higher quantities of the same compounds as indicated by PRC analysis (Fig. 6).

*Soybean Cultivars IAC100 and Silvânia* No significant treatment effect on the volatile blend composition was observed in PRC analysis for the cultivars IAC100 ( $F = 1.9$ ,  $P = 0.073$ ; Fig. 7, Table 1) and Silvânia ( $F = 10.4$ ,  $P = 0.104$ ; Fig. 8, Table 1). The variable weights ( $b_k$ ) displayed in the PRC diagrams showed low values, ranging between -0.5 and 0.5, for all compounds sampled (Fig. 7 and 8).

Although no differences were observed by PRC for IAC100, some compounds were released in higher quantities by plants with the treatments Herb and HerbOvi when compared to UD and Ovi (Table 1). When we analyzed the compounds individually (MANOVA for repeated measures,  $P < 0.05$ ), (Z)-3-hexenyl acetate ( $t_{59,3} = 2.031$ ,  $P = 0.055$ ), methyl salicylate ( $t_{59,3} = 2.159$ ,  $P = 0.035$ ), and (E,E)- $\alpha$ -farnesene ( $t_{48,3} = 1.909$ ,  $P = 0.061$ ) were released in significantly or marginally non-significantly higher amounts from plants subjected to 72-hr-herbivory (Herb) when compared to undamaged plants (UD). (Z)-3-Hexenyl acetate ( $t_{59,3} = 2.071$ ,  $P = 0.043$ ), methyl salicylate ( $t_{59,3} = 1.834$ ,  $P = 0.072$ ) and (E,E)  $\alpha$ -farnesene ( $t_{55,3} = 2.820$ ,  $P = 0.006$ ) were released in significantly or or marginally non significantly higher amounts from plants subjected to 96 hr-herbivory-plus-oviposition (HerbOvi) when compared to undamaged ones (UD). (E,E)- $\alpha$ -farnesene ( $t_{55,3} = 2.322$ ,  $P = 0.023$ ) was released in significantly higher amounts from plants after 96 hr herbivory (Herb) when compared to undamaged plants (UD). The quantities of compounds released by Silvânia also were analyzed by MANOVA for repeated measures, but they did not differ among treatments.

## Discussion

In this study comparing the susceptible cultivar Silvânia and the resistant cultivars Dowling and IAC100, it is apparent that each cultivar has a different response to herbivore damage, eliciting different responses by the egg parasitoid. The results

support our hypothesis that the level of indirect defense in response to damage by herbivores in resistant soybean cultivars is different from that of susceptible cultivars. We could show that the resistant cultivars (here Dowling and IAC100) showed stronger induction of indirect defense; they show a higher production of volatile compounds in response to herbivore attack and a stronger response by the egg parasitoid, *T. podisi*, to volatiles released from plants with herbivory and herbivory + oviposition when compared to undamaged plants. In addition, the results obtained in this study agree with those presented by previous work on induced plant responses to oviposition by Pentatomidae (Colazza et al. 2004 a,b; Moraes et al. 2008), where oviposition itself (without herbivory) did not cause changes of plant odor that are attractive to the egg parasitoids.

However, egg-laying by the pentatomid *E. heros* on the cultivars Dowling and IAC100 changes the plant volatile profile; we have detected differences in the volatile blends of these cultivars between undamaged, herbivory and herbivory+oviposition damaged soybean plants. Moraes et al. (2008) suggested that the egg parasitoid *T. podisi* was not attracted to the blend of volatiles produced by herbivory+oviposition and oviposition damaged soybean (cv BR-16) probably due the switching-off of jasmonate signaling caused by oviposition damage. In contrast, the results presented here suggest that oviposition did not switch off jasmonic acid-dependent plant defense because herbivory + oviposition damaged soybean plants also attracted the natural enemy.

The lack of attraction of the egg parasitoid to oviposition damaged plants could be explained if the response of the plant is not systemic. When the stink bug lays eggs on the leaves there is a localized necrosis below and around the eggs (personal observation), which suggests a hypersensitive response (HR) by the plant, isolating the damaged area, in a similar way as for plant-pathogen responses (Walling 2000; Kaloshian and Walling 2005). What induces soybean plants to respond with necrosis to oviposition needs further study, but could be due to microorganisms or chemicals from the oviposition secretion that induce the HR. We are trying to elucidate this phenomenon by studying the chemistry of the saliva and the oviposition secretions.

The PRC analysis used in this work showed the main compounds induced by herbivore damage and the interaction between the damage time and the volatiles released by the soybean plant. The PRC analysis is a relatively new multivariate method that is commonly used to aid in impact assessments of pollutant stress on aquatic and terrestrial biological communities in ecotoxicological studies (van den Brink and ter

Braak 1999; van den Brink et al. 2003), but application to other ecological aspects (Torres and Ruberson 2005; Poelman et al. 2010) has proceeded rapidly. The great advantage of the PRC compared to other multivariate analysis is that it is possible to evaluate the variation of the compounds over time and the importance of each compound in a blend. Furthermore, there is no limitation on the number of variables and normality of the data is unnecessary.

The PRC results suggest that the increase of (*E,E*)- $\alpha$ -farnesene, methyl salicylate, (*Z*)-3-hexenyl acetate, and (*E*)-2-octen-1-ol in the total blend have an effect on parasitoid behavior, but the role of these compounds, individually, on the attraction of the egg parasitoid *T. podisi* still needs to be evaluated. The attraction of parasitoids and predators to herbivore induced volatiles is often attributed to the relative contribution of each compound in the blend (D'Alessandro et al. 2006, 2009; Pareja et al. 2009) and not all herbivore induced compounds are important for changing insect behavior. For example, two important compounds in the herbivore induced volatile blend, indole in maize, *Zea mays*, and methyl salicylate in *Arabidopsis* sp., were not the key compounds responsible for the attraction of the parasitoids tested (D'Alessandro et al. 2006, 2009; Snoeren et al. 2010).

*T. podisi* did not distinguish among the odors of damaged and undamaged plants for any treatment in cv Silvânia, probably because the volatile compounds released by undamaged and damaged Silvânia soybean are too similar for a discrimination. Vet et al. (1998) suggested that an insect does not discriminate between odor sources because it is not able to do so or because the odor is not in the right conditions for the discrimination, i.e., the compounds released by the plant are not in the correct concentration or proportion to be perceived by the natural enemies as a cue indicating the presence of the host. The egg parasitoid *T. podisi* discriminated between volatiles released from differently treated cv Dowling and IAC100, respectively. However, no preference for odor of any treatment of the susceptible Silvânia cultivar was detected; thus, we suggest that the susceptible cultivar was not induced by herbivore damage.

Herbivory induced plant volatiles are important cues for host foraging behavior of parasitoids. Therefore, maintaining and even enhancing the attractiveness of crop plants to natural enemies should be considered an important trait when breeding new crop varieties. However, these possibilities may sometimes be constrained by the effect of these changes on the attractiveness of the plant to herbivorous pests, as volatiles that attract more natural enemies could also attract more herbivores (Cortesero et al. 2000).

Thaler (1999) mentioned that it is advantageous for herbivores to avoid laying eggs on induced plants because such plants are likely to host other herbivores, which are potential competitors for second offspring herbivores, and can also attract a population of natural enemies. The results obtained in this work showed that *E. heros* does not use herbivore induced volatiles as cues to distinguish between damaged and undamaged plants, or to distinguish between cultivars, but *E. heros* females responded preferentially to undamaged soybean ( $\chi^2$ ,  $P=0.002$ ) compared to air, suggesting that *E. heros* uses the volatiles from soybean plants to locate its host-plant (results not shown).

The cv Dowling and IAC100 are known to have in their reproductive stage an antixenotic and antibiotic effect against aphids and stink bugs, respectively. (Li et al. 2004, 2008; Carrão-Panizzi et al. 1995). Recently, field experiments showed that population levels of stink bugs colonizing cv Dowling and cv IAC100 were lower than on cv Silvânia suggesting a differential resistance/susceptibility (Laumann et al. 2008). Different studies suggested that the resistance during the reproductive stage of soybean could be related to the amount of isoflavonoids (Rao et al. 1990; Hoffmann-Campo, et al. 2001; Piubelli et al. 2003, 2005). Experiments could be done to determine the amount of isoflavonoids during the different physiological stages of soybean plants to evaluate if there is a relation between direct and indirect defense and the quantities of volatile organic compounds.

In summary, the results suggest that the herbivorous stink bug *E. heros* induces the indirect defense of the resistant soybean cultivars Dowling and IAC100 and that the egg parasitoid *T. podisi* is attracted to the volatiles released by herbivory and herbivory+oviposition damaged plants of these cultivars. *E. heros* did not distinguish in olfactometer bioassays, neither between damaged and undamaged soybean nor between resistant and susceptible cultivars. In addition, the resistant cultivar Dowling and IAC100 showed consistency in the main volatile compounds induced: (*E,E*)- $\alpha$ -farnesene, methyl salicylate, (*Z*)-3-hexenyl acetate. Further laboratory studies are necessary to investigate the importance of these compounds in the attraction of *T. podisi*. Once understood, these volatiles compounds could help to develop new strategies for control of *E. heros* using natural enemies in soybean crops.

*Acknowledgements* We thank H. Santos and D. Tiburcio for helping with laboratory rearing of the insects, and Jeffrey Aldrich and Michael Birkett for kindly providing synthetic standards. We are grateful to Dr. Mark Horn International Consultant at

Embrapa Genetic Resources and Biotechnology and Martin Pareja for comments that greatly improved the manuscript and for revising the English. We also thank the Post-Graduate Animal Biology program of University of Brasília (UnB) for use of their facility. This work received financial support from the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq) through a grant to Mirian F.F. Michereff, International Foundation for Science IFS, Distrito Federal Research Foundation (FAP-DF) and Brazilian Corporation of Agricultural Research (EMBRAPA).

## References

- BARTLETT, R. 2008. Negative interactions between chemical resistance and predators affect fitness in soybeans. *Ecol. Entomol.* 33:673-678.
- BORGES, M., SCHMIDT, F. G. V., SUJII, E. R., MEDEIROS, M. A., MORI, K., ZARBIN, P. H. G., and FERREIRA, J. T. B. 1998. Field responses of stink bugs to the natural and synthetic pheromone of the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). *Physiol. Entomol.* 23:202-207.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C. and KITAMURA, K. 1995. Isoflavone content in Brazilian soybean cultivars. *Breed. Sci.* 45:295-300.
- CHEN, M. S. 2008. Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Science* 15:101-114.
- COLAZZA, S., FUCARINO, A., PERI, E., SALERNO, G., CONTI, E., and BIN, F. 2004a. Insect oviposition induces volatile emission in herbaceous plants that attracts egg parasitoids. *J. Exp. Biol.* 207:47-53.
- COLAZZA, S., MCELFRISH, J. S., and MILLAR, J. G. 2004b. Identification of volatile synomones, induced by *Nezara viridula* feeding and oviposition on bean spp., that attract the egg parasitoid *Trissolcus basalus*. *J. Chem. Ecol.* 30:945-964.
- CORTESERO, A. M., STAPEL, J. O., and LEWIS, W. J. 2000. Understanding and manipulating plant attributes to enhance biological control. *Biol. Control* 17:35-49.
- D'ALESSANDRO, M., HELD, M., TRIPONEZ, Y., and TURLINGS, T. C. J. 2006. The role of indole and other shikimic acid derived maize volatiles in the attraction of two parasitic wasps. *J. Chem. Ecol.* 32:2733-2748.
- D'ALESSANDRO, M., BRUNNER, V., VON MÉREY, G., and TURLINGS, T. C. J. 2009. Strong attraction of the parasitoid *Cotesia marginiventris* towards minor volatile compounds of maize. *J. Chem. Ecol.* 35:999-1008.
- De MORAES, C. M., MESCHER, M. C., and TUMLINSON, J. H. 2001. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature* 410:577-580.

- DICKE, M. 1999. Are herbivore-induced plant volatiles reliable indicators of herbivore identity to foraging carnivorous arthropods? *Entomol. Exp. Appl.* 91:131-142.
- FEHR, W. R., CAVINESS, C. E., BURMOOD, D. T., and PENNINGTON, J. S. 1971. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Science* 11:929-931.
- FRITZSCHE HOBALLAH, M. E. and TURLINGS, T. C. J. 2001. Experimental evidence that plants under caterpillar attack may benefit from attracting parasitoids. *Evol. Ecol. Res.* 3:553-565.
- GATEHOUSE, J. A. 2002. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytol.* 156: 145-169.
- GREEN, R. H. 1993. Application of repeated measures designs in environmental impact and monitoring studies. *Aust. J. Ecol.* 18:81-98.
- HEIL, M. 2008. Indirect defence via tritrophic interactions. *New. Phytol.* 178:41-61.
- HILKER, M. and MEINERS, T. 2006. Early herbivore alert: Insect eggs induce plant defense. *J. Chem. Ecol.* 32: 1379-1397.
- HOFFMANN-CAMPO, C. B., HARBORNE, J. B., and McCAFFERY, A. R. 2001. Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. *Entomol. Exp. Appl.* 98:181-194.
- HURLBERT, S. H. 1984. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecol. Monogr.* 54:187-211.
- JORGE, L. A. C., LAUMANN, R. A., BORGES, M., MORAES, M. C. B., CRUZ, R. A., MILARE, B. N., and PALHARES, L. 2005. Software para avaliação do comportamento de insetos. São Carlos, SP. Embrapa Instrumentação Agropecuária. Circular Técnica, Vol. 30, 7p.
- KALOSHIAN, I. and WALLING, L. L. 2005. Hemipterans as plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:491-521.
- LAUMANN R. A., FARIAS NETO, A. L., BLASSIOLI-MORAES, M. C., SILVA, A. P., VIEIRA, C. R., MORAES, S. V. P., HOFFMAN-CAMPO, C. B., and BORGES, M. 2008. Dinâmica populacional de percevejos (Hemiptera:Pentatomidae) em diferentes genótipos de soja. In: IX Simpósio Nacional Cerrado; II Simpósio Internacional Savanas Tropicais, Brasília, DF. Desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais: anais. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, <http://www.cpac.embrapa.br/download/747/t>
- LI, Y., HILL, C. B., and HARTMAN, G. L. 2004. Effect of three resistant soybean genotypes on the fecundity, mortality and maturation of soybean aphid (Homoptera: Aphididae). *J Econ. Entomol.* 97:1106-1111.

- LI, Y., ZOU, J., LI, M., BILGIN, D. D., VODKIN, L.O., HARTMAN, G. L., and CLOUGH, S. J. 2008. Soybean defense responses to the soybean aphid. *New. Phytol.* 179:185-195.
- LIN, C., SHEN, B., XU, Z., KÖLLNER, T. G., DEGENHARDT, J., and DOONER, H. 2008. Characterization of monoterpene synthase gene tps 26, the ortholog of a gene induced by insect herbivory in maize. *Plant Physiol.* 146:940-951.
- McPHERSON, R. M. and BUSS, G. R. 2007. Evaluation lepidopteran defoliation resistance in soybean breeding lines containing the stink bug (Hemiptera: Pentatomidae) resistance IAC100 cultivar in their pedigrees. *J. Econ. Entomol.* 100:962-968.
- MORAES, M. C. B., LAUMANN, R. A., PIRES, C. S. S., SUJII, E. R., and BORGES, M. 2005. Induced volatiles in soybean and pigeon pea plants artificially infested with the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, and their effect on the egg parasitoid, *Telenomus podisi*. *Entomol. Exp. Appl.* 115:227-237.
- MORAES, M. C. B., PAREJA, M., LAUMANN, R. A., HOFFMANN-CAMPO, C. B., and BORGES, M. 2008. Response of the parasitoid *Telenomus podisi* to induced volatiles from soybean damaged by stink bug herbivory and oviposition. *J. Plant. Int.* 3:1742-1756.
- PAREJA, M., MOHIB, A., BIRKETT, A. M., DUFOUR, S., and GLINWOOD, R. T. 2009. Multivariate statistics coupled to generalized linear models reveal complex use of chemicals cues by a parasitoid. *Anim. Behav.* 77:901-909.
- PIUBELLI, G. C., HOFFMANN-CAMPO, C. B., ARRUDA, I. C., FRANCHINI, J. C., and LARA, F. M. 2003. Flavonoid increase in soybean as a response to *Nezara viridula* injury and its effects on insect-feeding preference. *J.Chem. Ecol.* 29:1232-1232.
- PIUBELLI, G. C., HOFFMANN-CAMPO, C. B., MOSCARDI, F., MIYAKUBO, S. H., and OLIVEIRA, M. C. N. 2005. Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatilis*? *J. Chem. Ecol.* 31: 1509-1525.
- POELMAN, E. H., VAN LOON, J. J. A., VAN DAM, N. M., VET, L. E. M., and DICKE, M. 2010. Herbivore-induced plant responses in *Brassica oleracea* prevail over effects of constitutive resistance and result in enhanced herbivore attack. *Ecol. Entomol.* 35:240–247.
- PRICE, P. 1997. Insect ecology. 3rd edn. P. 874. John Wiley & Sons, New York.
- RAO, K. V., CHATTOPABHYAY, S. K., and CHANDRASEKHARA REDDY, G. 1990. Flavonoids with mosquito larval toxicity. *J. Agric. Food. Chem.* 38:1427-1430.
- RASMANN, S. and TURLINGS, T. C. J. 2008. First insights into specificity of belowground tritrophic interactions. *Oikos* 117:362-369.
- SAS Institute. 2001. SAS User's Guide: Statistics, version 8.2, 6nd edn. SAS Institute, Cary, NC.

- SNOEREN, T. A. L., MUMM, R., POELMAN, E. H., YANG, Y., PICHERSKY, E., and DICKE, M. 2010. The herbivore-induced plant volatile methyl salicylate negatively affects attraction of the parasitoid *Diadegma semiclausum*. *J. Chem. Ecol.* 36:479-489.
- ter BRAAK, C. J. F. and ŠMILAUER, P. 2002. CANOCO reference manual and user's guide to Canoco for Windows: software for canonical community ordination (version 4.5). Microcomputer Power, Ithaca, New York.
- THALER, J. S. 1999. Jasmonate-inducible plant defences cause increased parasitism of herbivores. *Nature* 399:686-688.
- TORRES, J. B., and RUBERSON, J. R. 2005. Canopy and ground-dwelling predatory arthropods in commercial Bt and non-Bt cotton fields: patterns and mechanisms. *Environ. Entomol.* 34:1242-1256.
- van den BRINK, P. J., and ter BRAAK, C. J. F. 1999. Principal response curves: analysis of time dependent multivariate responses of biological community to stress. *Environ. Toxicol. Chem.* 18:138-148.
- van den BRINK, P. J., van den BRINK, N. W., and ter BRAAK, C. J. F. 2003. Multivariate analysis of ecotoxicological data using ordination: demonstrations of utility on the basis of various examples. *Aust. J. Ecotoxicol.* 9:141-156.
- VET, L. E. M., van LENTEREN, J. C., HEYMANS, M., and MEELIS, E. 1983. An airflow olfactometer for measuring olfactory responses of hymenopterous parasitoids and other small insects. *Physiol. Entomol.* 8:97-106.
- VET, L. E. M., De JONG, A. G., FRANCHI, E., and PAPA, D. R. 1998. The effect of complete versus incomplete information on odour discrimination in a parasitic wasp. *Anim. Behav.* 55:1271-1279.
- von ENDE, C. N. 1993. Repeated-measures analysis: growth and other time-dependent measures. Pp. 113-137 in: S. Scheiner and J. Gurevitch (eds). *Design and Analysis of Ecological Experiments*. Chapman & Hall, New York.
- WALLING, L. L. 2000. The myriad plant responses to herbivores. *J. Plant Growth Regul.* 19:195-216.
- ZAR, J. H. 1998. *Biostatistical Analysis*. 1st edn. P. 929. Prentice Hall, London, UK.

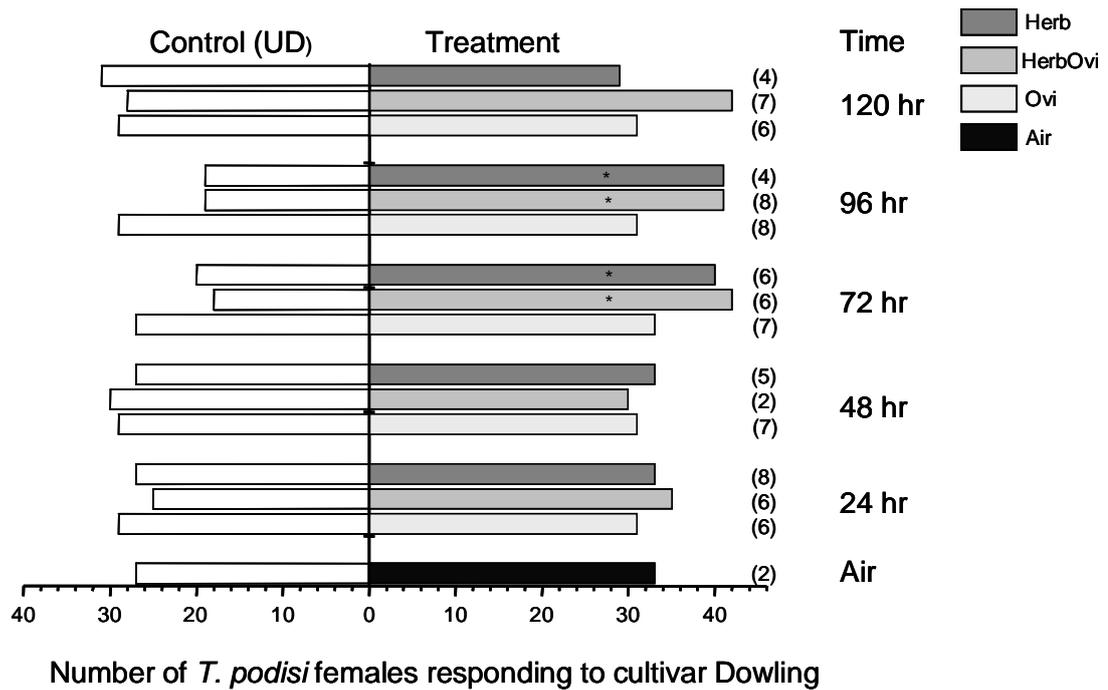


Fig. 1. Responses of the egg parasitoid *Telenomus podisi* in a Y-tube olfactometer to volatiles from soybean cultivar Dowling subjected to different treatments. UD: undamaged soybean, Ovi: soybean plant with oviposition damage, HerbOvi: soybean plant with herbivory+oviposition damage, Herb: soybean plant with herbivory damage. 24, 48, 72, 96 and 120 hr: time of plant treatment (induction time). Asterisks indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between parasitoid responses to volatiles from different treatments:  $\chi^2$  test on the proportion responding. Numbers in brackets represent the number of insects that did not respond to either of the treatments tested.

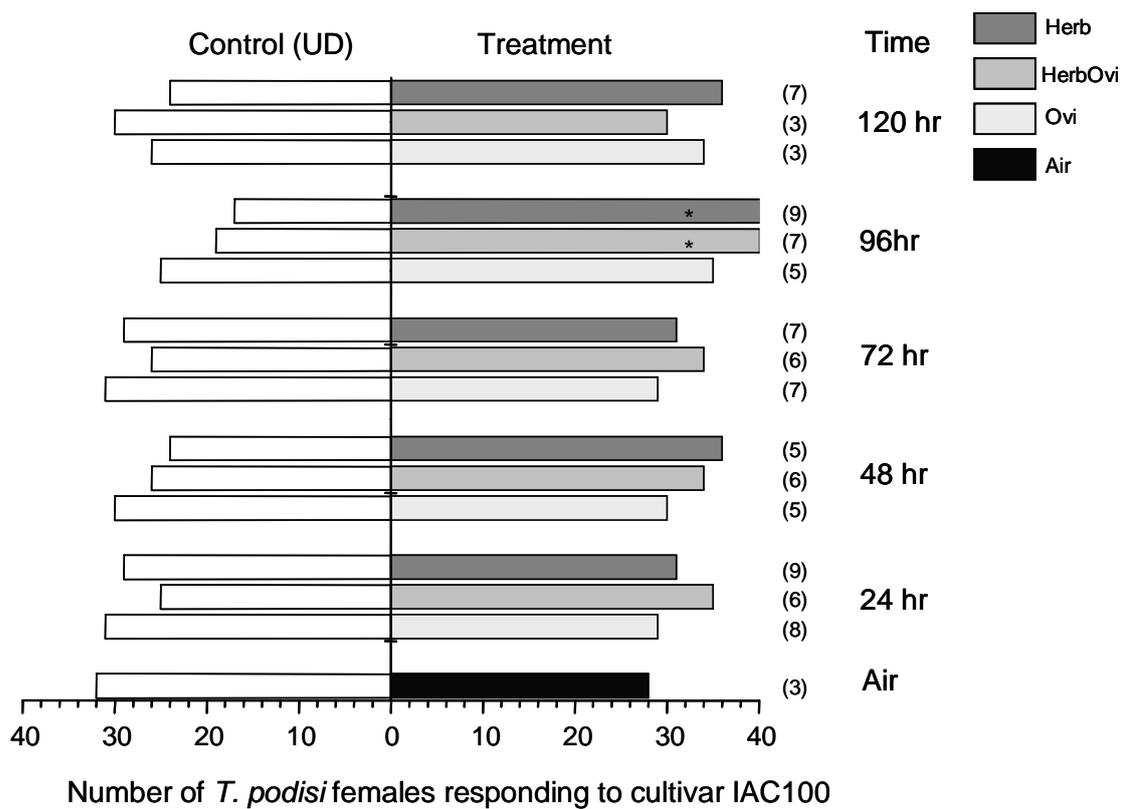
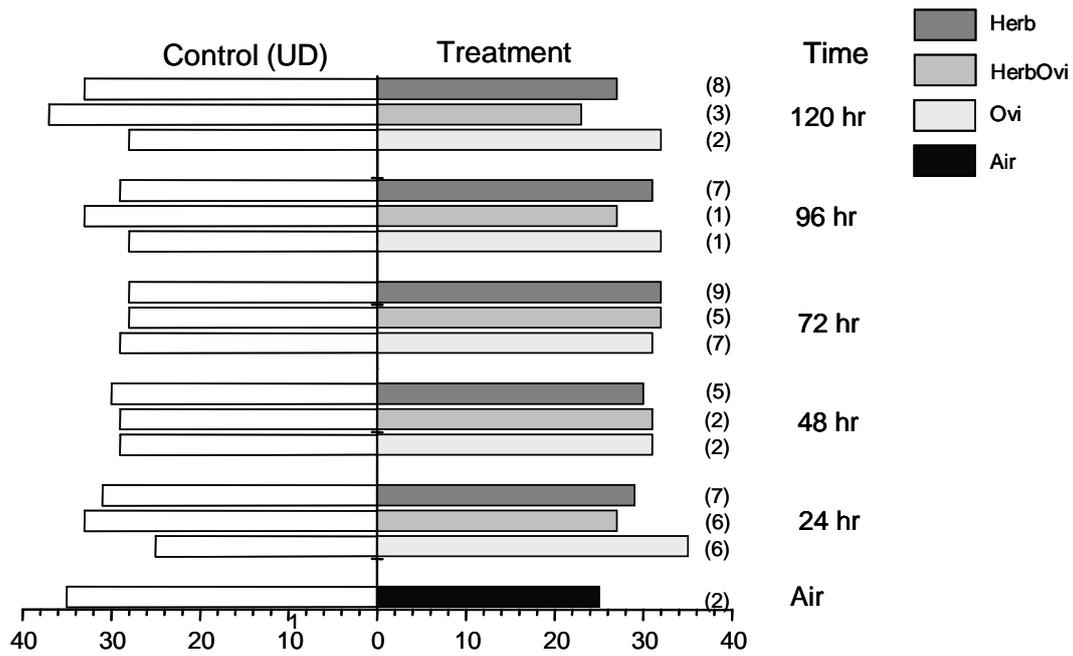


Fig. 2. Responses of the egg parasitoid *Telenomus podisi* in a Y-tube olfactometer to volatiles from soybean cultivar IAC100 subjected to different treatments. UD: undamaged soybean, Ovi: soybean plant with oviposition damage, HerbOvi: soybean plant with herbivory+oviposition damage, Herb: soybean plant with herbivory damage. 24, 48, 72, 96 and 120 hr: time of plant treatment (induction time). Asterisks indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between parasitoid responses to volatiles from different treatments:  $\chi^2$  test on the proportion responding. Numbers in brackets represent the number of insects that did not respond to either of the treatments tested.



Number of *T. podisi* females responding to cultivar Silvânia

Fig. 3. Responses of the egg parasitoid *Telenomus podisi* in a Y-tube olfactometer to volatiles from soybean cultivar Silvânia subjected to different treatments. UD: undamaged soybean, Ovi: soybean plant with oviposition damage, HerbOvi: soybean plant with herbivory+oviposition damage, Herb: soybean plant with herbivory damage. 24, 48, 72, 96 and 120 hr: time of plant treatment (induction time). Numbers in brackets represent the number of insects that did not respond to either of the treatments tested.

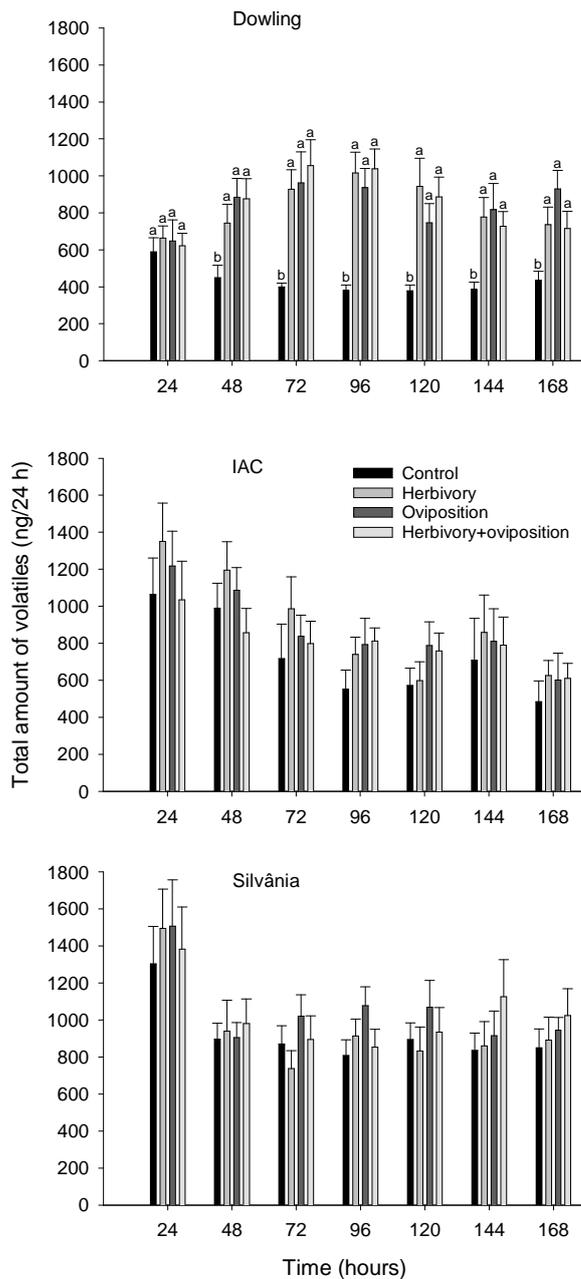


Fig. 4. Total amount of volatiles (mean  $\pm$  SEM) obtained from undamaged plants (control) and plants submitted to the treatments herbivory, oviposition, and herbivory+oviposition for soybean cultivars Dowling, IAC100, and Silvânia. The increase in the amount of volatiles released by damaged plants of cultivar Dowling was significant after 48 hr. For cultivars IAC100 and Silvânia there was no significant difference between treatments and its interactions with time (Manova for repeated measures,  $P > 0.05$ ). Means followed by the same letter within each sampling date are not significantly different by the Tukey's test at  $P > 0.05$ .

Table 1. Mean  $\pm$  standard error (in ng spanning from 72 to 96 hr after the start of damage) of volatile compounds collected from undamaged plants (UD) or plants submitted to treatments Herbivory (Herb), Oviposition (Ovi) and herbivory+oviposition (HerbOvi) damage for soybean cultivars Dowling, IAC100, and Silvânia.

Compounds	(ng 72- 96 hr) <sup>1</sup>			
	UD	Herb	Ovi	HerbOvip
<b>Dowling</b>				
Camphene	14.8 $\pm$ 2.4	17.9 $\pm$ 3.8	37.1 $\pm$ 9.6	26.4 $\pm$ 8.2
Benzaldehyde	13.6 $\pm$ 2.9	20.5 $\pm$ 4.2	18.4 $\pm$ 5.1	27.4 $\pm$ 9.9
(Z)-3-Hexenyl acetate	92.5 $\pm$ 19.0 <sup>a</sup>	226.4 $\pm$ 64.9 <sup>b</sup>	185.0 $\pm$ 39.2 <sup>a</sup>	278.6 $\pm$ 51.4 <sup>b</sup>
Limonene	31.2 $\pm$ 6.8	41.1 $\pm$ 8.0	62.9 $\pm$ 11.9	48.0 $\pm$ 9.5
(Z)-2-Octen-1-ol*	20.2 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	39.4 $\pm$ 10.9 <sup>a</sup>	85.4 $\pm$ 16.9 <sup>b</sup>	70.7 $\pm$ 17.2 <sup>b</sup>
(E)-2-Octen-1-ol*	50.6 $\pm$ 8.5 <sup>a</sup>	117.3 $\pm$ 21.4 <sup>b</sup>	218.9 $\pm$ 52.9 <sup>b</sup>	204.8 $\pm$ 60.6 <sup>b</sup>
Methyl salicylate	115.3 $\pm$ 8.4 <sup>a</sup>	437.8 $\pm$ 43.8 <sup>b</sup>	240.8 $\pm$ 39.5 <sup>b</sup>	462.6 $\pm$ 61.4 <sup>b</sup>
Benzothiazole	13.4 $\pm$ 2.4	24.6 $\pm$ 3.6	35.7 $\pm$ 14.1	15.0 $\pm$ 2.6
(E)-2-Decenal	9.1 $\pm$ 3.4	5.5 $\pm$ 1.3	17.9 $\pm$ 4.4	16.7 $\pm$ 4.8
$\beta$ -Caryophyllene	30.2 $\pm$ 8.5	54.2 $\pm$ 13.2	57.8 $\pm$ 12.9	50.6 $\pm$ 11.5
$\alpha$ -Humulene	42.6 $\pm$ 7.0	52.0 $\pm$ 10.6	92.1 $\pm$ 22.0	85.6 $\pm$ 16.9
(E,E)- $\alpha$ -Farnesene	213.8 $\pm$ 24.0 <sup>a</sup>	623.4 $\pm$ 75.1 <sup>b</sup>	526.2 $\pm$ 74.8 <sup>b</sup>	562.2 $\pm$ 66.9 <sup>b</sup>
TMTT	55.9 $\pm$ 10.7	114.0 $\pm$ 36.8	94.2 $\pm$ 25.9	90.9 $\pm$ 22.9
<b>IAC100</b>				
(E)-2-Hexenal	16.6 $\pm$ 7.9	32.0 $\pm$ 18.6	12.2 $\pm$ 6.3	39.1 $\pm$ 18.1
(E)-2-Hexen-1-ol	24.7 $\pm$ 10.4	12.2 $\pm$ 4.4	15.1 $\pm$ 6.4	13.5 $\pm$ 4.4
(Z)-3-Hexen-1-ol	29.8 $\pm$ 18.8	10.6 $\pm$ 2.6	20.3 $\pm$ 12.5	10.7 $\pm$ 2.4
Camphene	36.7 $\pm$ 13.4	48.4 $\pm$ 22.2	47.6 $\pm$ 16.9	29.1 $\pm$ 11.5
Benzaldehyde	37.2 $\pm$ 18.1	19.1 $\pm$ 4.7	32.1 $\pm$ 12.8	19.9 $\pm$ 4.2
(Z)-3-Hexenyl acetate	40.8 $\pm$ 16.3 <sup>a</sup>	123.3 $\pm$ 52.6 <sup>b</sup>	73.3 $\pm$ 19.0 <sup>a</sup>	97.2 $\pm$ 30.9 <sup>b</sup>
(E)-2-Hexenyl acetate	22.7 $\pm$ 16.8	52.8 $\pm$ 34.9	26.4 $\pm$ 11.9	17.2 $\pm$ 1.7
Limonene	87.7 $\pm$ 37.9	54.5 $\pm$ 13.3	110.6 $\pm$ 31.8	64.4 $\pm$ 22.5
(E)-Ocimene	51.1 $\pm$ 13.3	65.8 $\pm$ 15.6	102.3 $\pm$ 60.4	112.5 $\pm$ 18.3
Linalool	64.5 $\pm$ 18.4	94.0 $\pm$ 22.9	166.3 $\pm$ 58.8	118.9 $\pm$ 22.7
Methyl salicylate	36.6 $\pm$ 15.2 <sup>a</sup>	123.9 $\pm$ 9.8 <sup>b</sup>	78.9 $\pm$ 30.8 <sup>a</sup>	135.1 $\pm$ 50.1 <sup>b</sup>
Benzothiazole	15.7 $\pm$ 4.7	21.3 $\pm$ 42.6	14.5 $\pm$ 4.3	16.7 $\pm$ 4.2
Indole	20.0 $\pm$ 8.2	12.6 $\pm$ 3.7	21.0 $\pm$ 8.2	19.7 $\pm$ 4.2
$\beta$ -Caryophyllene	101.9 $\pm$ 43.5	89.2 $\pm$ 5.0	83.6 $\pm$ 21.3	90.3 $\pm$ 22.3
Geranyl acetone	107.7 $\pm$ 36.5	91.3 $\pm$ 28.3	122.5 $\pm$ 27.2	105.8 $\pm$ 26.8
$\alpha$ -Humulene	271.9 $\pm$ 68.7	126.9 $\pm$ 45.3	198.4 $\pm$ 65.4	279.2 $\pm$ 77.2
(E,E)- $\alpha$ -Farnesene	149.5 $\pm$ 42.7 <sup>a</sup>	362.9 $\pm$ 86.8 <sup>b</sup>	247.9 $\pm$ 64.3 <sup>a</sup>	354.2 $\pm$ 62.4 <sup>b</sup>
TMTT	67.3 $\pm$ 24.1	82.9 $\pm$ 18.9	84.1 $\pm$ 20.3	70.3 $\pm$ 17.9

Table 1. Continued.

Compounds	(ng 72- 96 hr) <sup>1</sup>			
	UD	Herb	Ovi	HerbOvi
<b>Silvânia</b>				
( <i>E</i> )-2-Hexenal	26.1 ± 12.1	52.7 ± 19.8	64.7 ± 23.6	47.6 ± 18.7
( <i>E</i> )-2-Hexen-1-ol	35.7 ± 7.6	20.9 ± 6.0	41.2 ± 11.4	45.5 ± 13.1
( <i>Z</i> )-3-Hexen-1-ol	26.2 ± 7.1	20.8 ± 9.8	42.4 ± 12.8	32.8 ± 10.2
Camphene	42.9 ± 6.1	83.2 ± 36.2	79.6 ± 24.9	46.5 ± 7.7
Benzaldehyde	21.0 ± 4.3	19.0 ± 2.7	50.2 ± 11.3	48.0 ± 14.2
( <i>Z</i> )-3-Hexenyl acetate	86.2 ± 19.4	52.1 ± 22.9	75.6 ± 24.5	76.4 ± 30.9
Limonene	74.4 ± 16.9	96.9 ± 18.6	175.3 ± 38.8	137.2 ± 28.6
( <i>E</i> )-Ocimene	105.5 ± 22.2	119.7 ± 26.1	179.9 ± 18.9	152.9 ± 32.9
Linalool	134.7 ± 20.6	144.9 ± 24.0	169.3 ± 27.9	141.5 ± 21.3
DMNT	41.5 ± 11.7	46.2 ± 11.1	61.0 ± 9.9	44.0 ± 9.2
Methyl salicylate	30.1 ± 8.8	46.3 ± 11.8	45.9 ± 11.3	46.5 ± 11.6
Benzothiazole	13.9 ± 2.9	19.4 ± 6.3	13.4 ± 3.5	23.7 ± 8.9
β-Caryophyllene	31.3 ± 9.2	92.1 ± 37.2	41.5 ± 13.1	42.7 ± 18.2
Geranyl acetone	138.8 ± 30.8	164.5 ± 29.2	167.1 ± 38.5	138.6 ± 38.3
α-Humulene	140.0 ± 27.3	192.6 ± 39.8	226.0 ± 62.9	219.7 ± 53.0
( <i>E,E</i> )-α-Farnesene	153.8 ± 25.1	123.3 ± 19.2	222.8 ± 46.5	201.8 ± 44.4
TMTT	66.7 ± 15.8	44.6 ± 15.1	72.4 ± 19.4	49.8 ± 17.4

<sup>1</sup>Mean values (± SEM) calculated from 22 samples obtained by aerations during the period spanning 72-96 hr after the start of damage. Means followed by the same letter within a line are not significantly different by the MANOVA at P > 0.05. TMTT ((*E,E*)-4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene), DMNT ((*E*)-4,8-dimethylnona-1,3,7-triene).

\*Tentatively identified compounds.

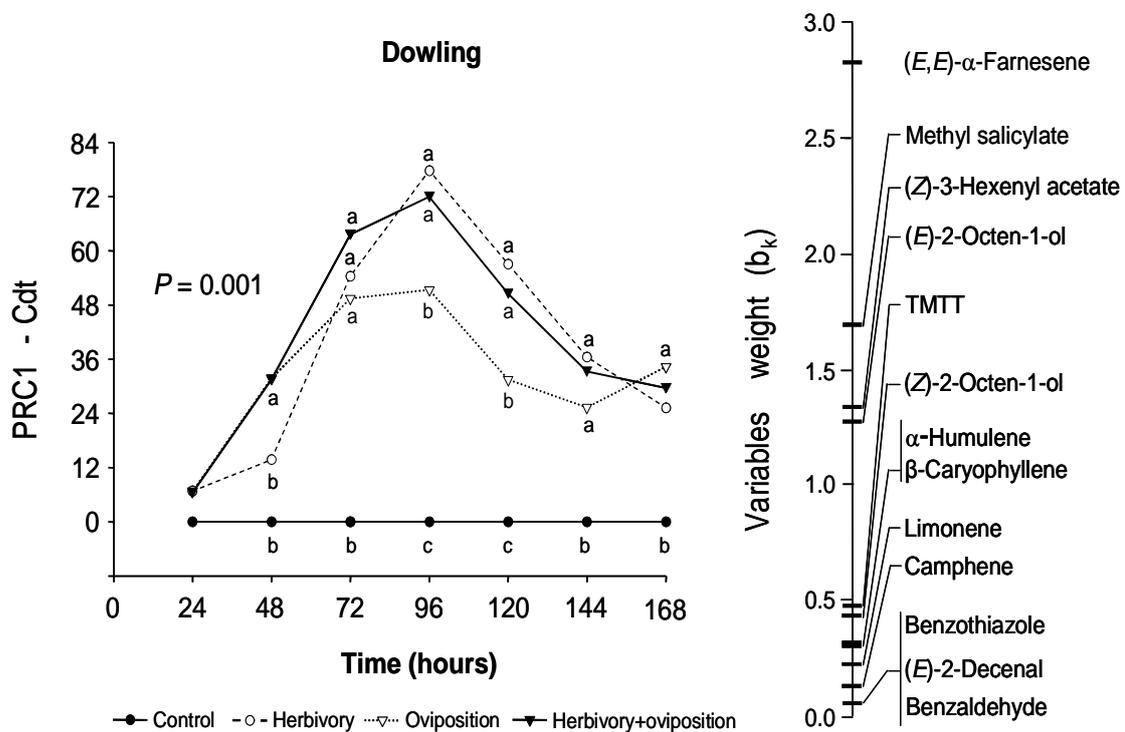


Fig. 5. PRC diagram and variables weights ( $b_k$ ) based on volatile blends released by soybean plants of the cultivar Dowling, on seven sampling days. The lines represent the response pattern of soybean plants to different treatments in time. The  $P$ -value indicates significance of the PRC diagram over all sampling times based on F-type permutation test. On each date, values of  $C_{dt}$  differ significantly between treatments that do not share the same letter code (a-c); shared or omitted letter codes denote contrasts that do not differ significantly by the Monte Carlo permutation tests at  $P < 0.05$ . The higher (absolute values) the variable weight, the more closely the compound response pattern follows the deviation pattern (from the control,  $C_{dt} = 0$  line) indicated on the PRC.

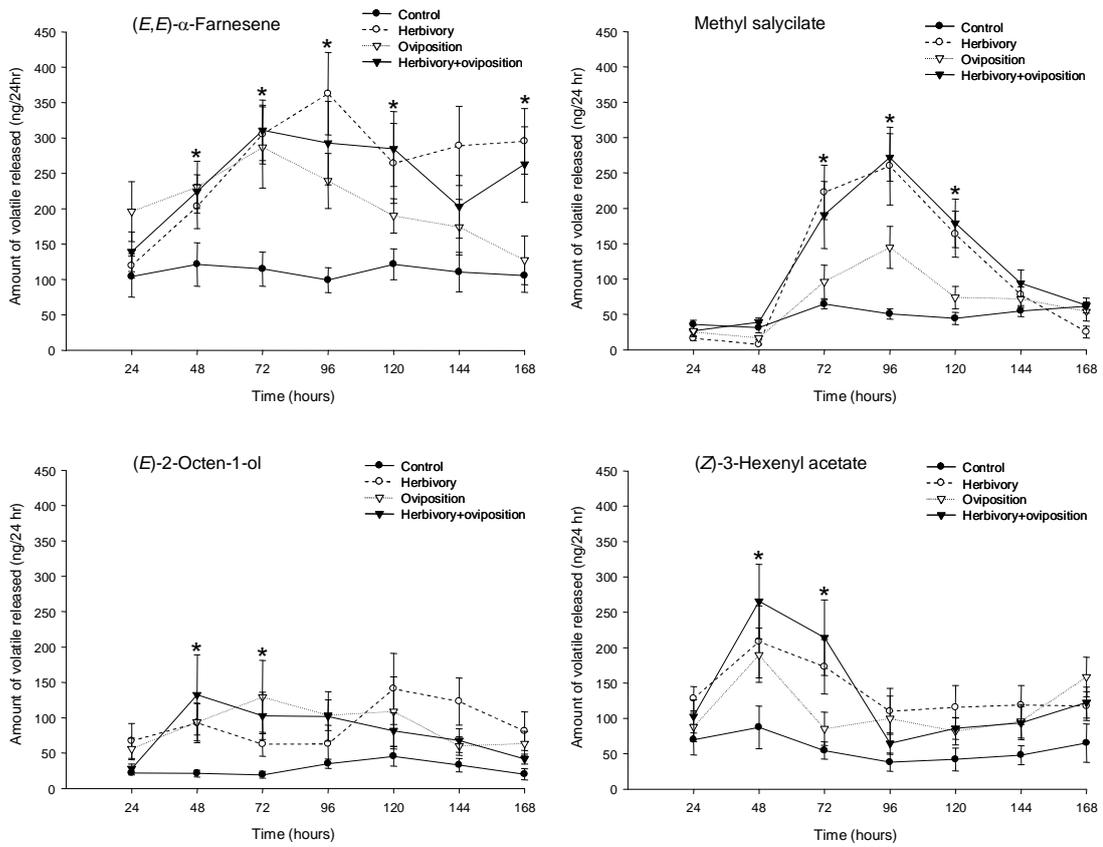


Fig. 6. Principal volatile compounds released (mean  $\pm$  SEM) by undamaged soybean (control) and soybean plants submitted to herbivory, oviposition and herbivory+oviposition damage, for cultivar Dowling. Bars represent the standard error of the mean. Means marked with an asterisk indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between induction treatments and control (within a sampling date),  $t$  test.

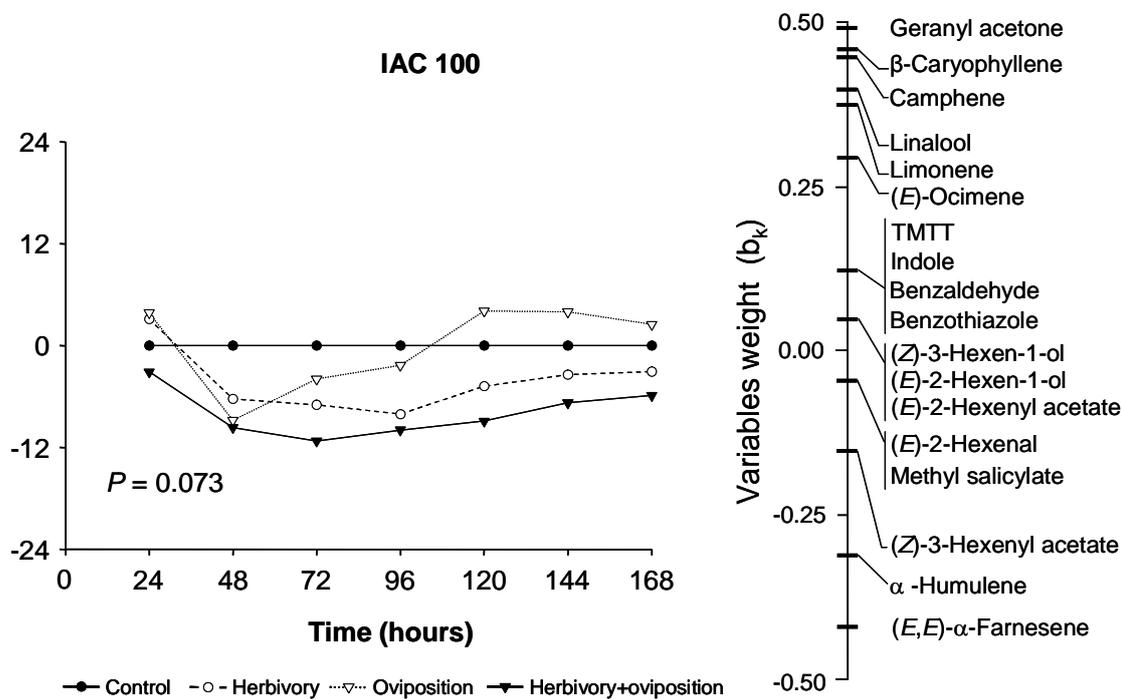


Fig. 7. PRC diagram and variables weights ( $b_k$ ) based on volatile blends released by soybean plants of the cultivar IAC 100, on seven sampling occasions. The lines represent the response pattern of soybean plants to different treatments in time. The  $P$ -value indicates significance of the PRC diagram over all sampling times based on F-type permutation test. The first PRC did not display a significant part of the treatment variance (Monte Carlo permutation test,  $P > 0.05$ ), indicating that no significant induction treatment effect on the volatile blend composition was detected. All compounds showed low values for the variables weights ( $b_k < 0.5$ ).

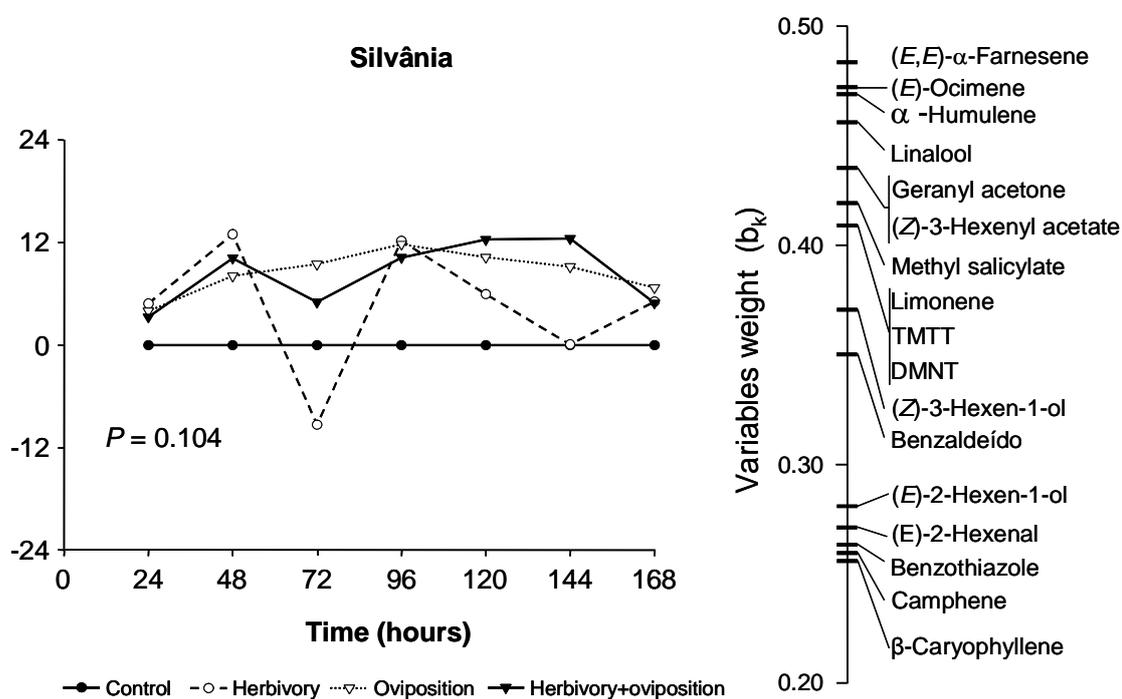
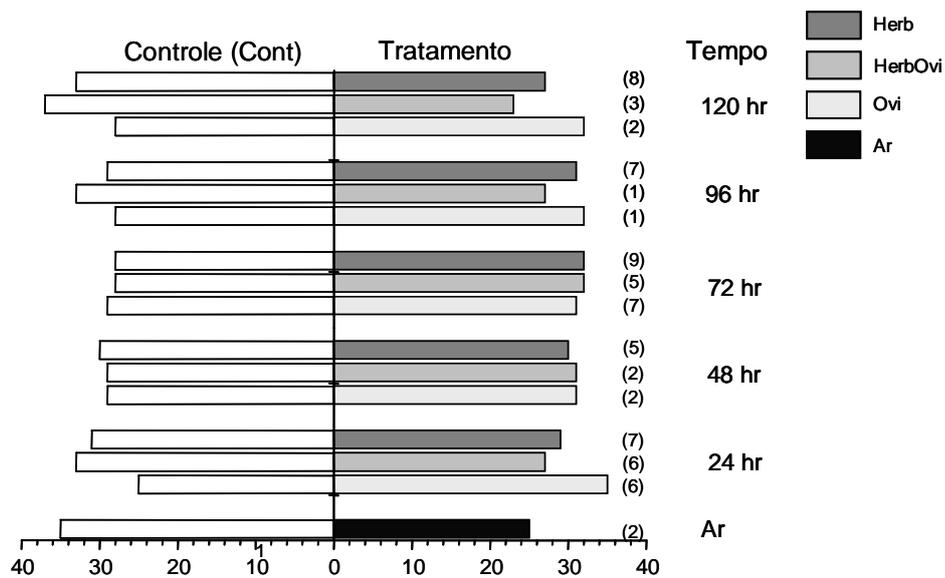
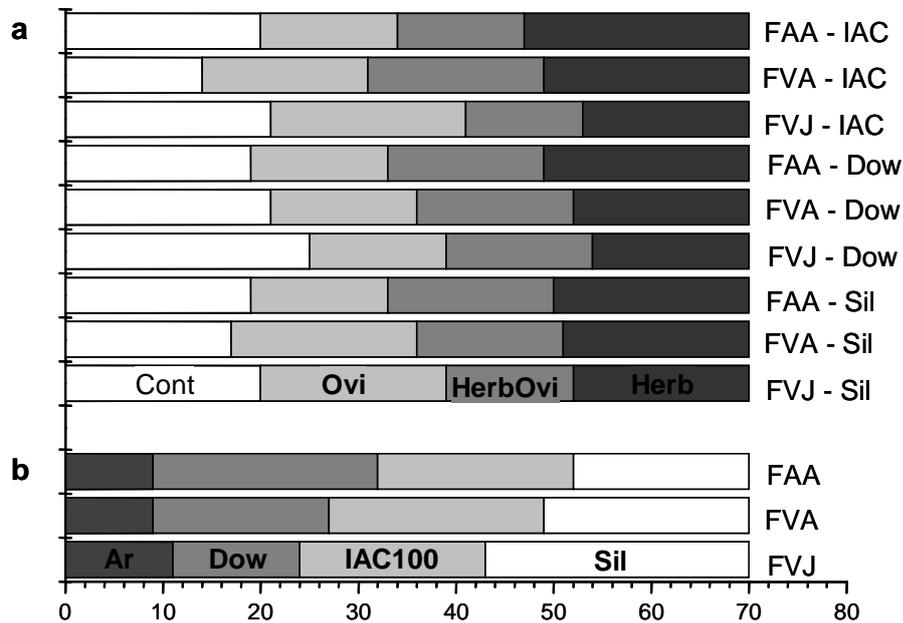


Fig. 8. PRC diagram and variables weights ( $b_k$ ) based on volatile blends released by soybean plants of the cultivar Silvânia, on seven sampling occasions. The lines represent the response pattern of soybean plants to different treatments in time. The  $P$ -value indicates significance of the PRC diagram over all sampling times based on F-type permutation test. The first PRC did not display a significant part of the treatment variance (Monte Carlo permutation test,  $P > 0.05$ ), indicating that no significant induction treatment effect on the volatile blend composition was detected. All compounds showed low values for the variables weights ( $b_k < 0.5$ ).

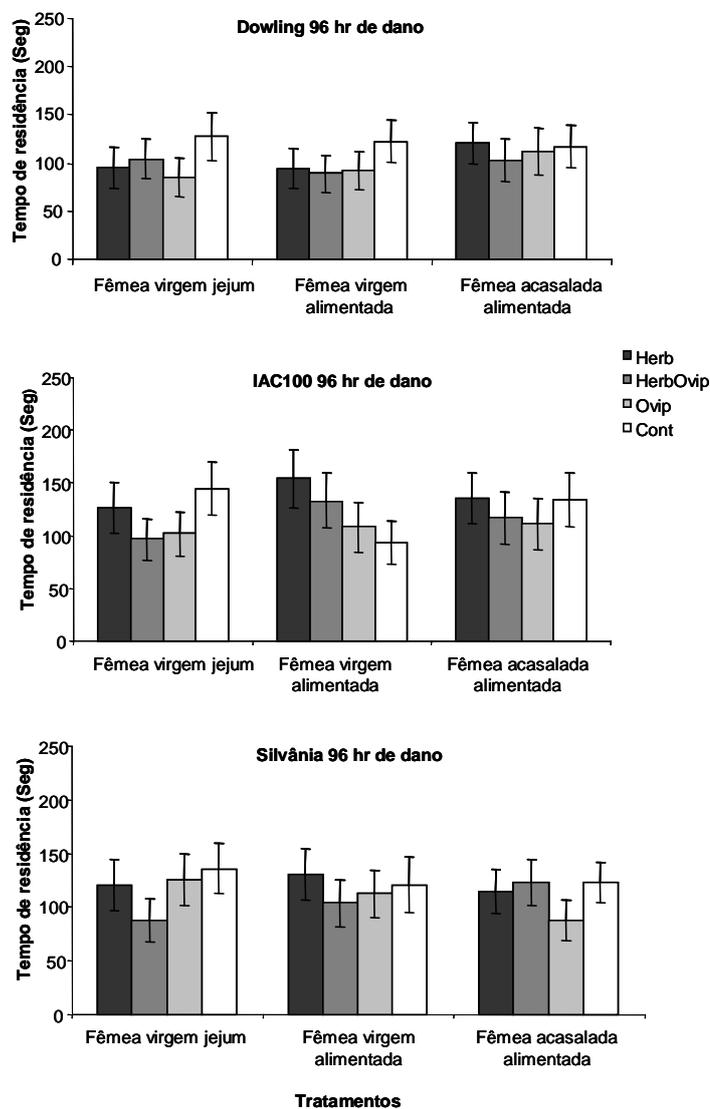
**Anexo 3 - Figuras Cujos Resultados Não Foram Significativos - Capítulo II - Voláteis Mediadores da Interação Planta-Herbívoro-Inimigo Natural em Cultivares de Soja Resistente e Suscetível.**



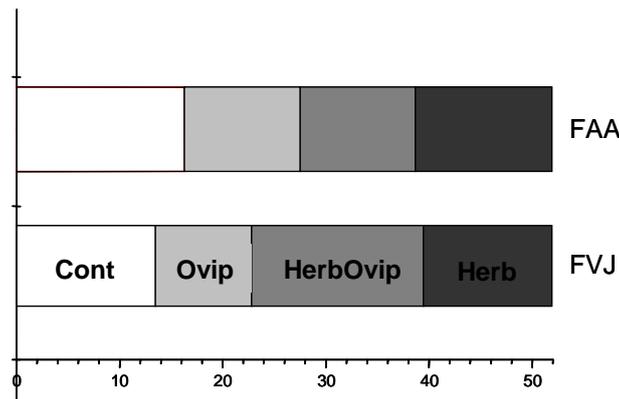
Anexo 3.1. Respostas de fêmeas de *Telenomus podisi* no olfatômetro em “Y” para a cultivar de soja Silvânia submetida a diferentes tratamentos. Cont: planta não atacada, Ovi: com oviposição, HerbOvip: com herbivoria+oviposição e Herb: com herbivoria. 24, 48, 72, 96 e 120 hr = tempo depois do início dos tratamentos (indução da planta). Números entre parênteses representam o número de insetos que não responderam a nenhum dos tratamentos.



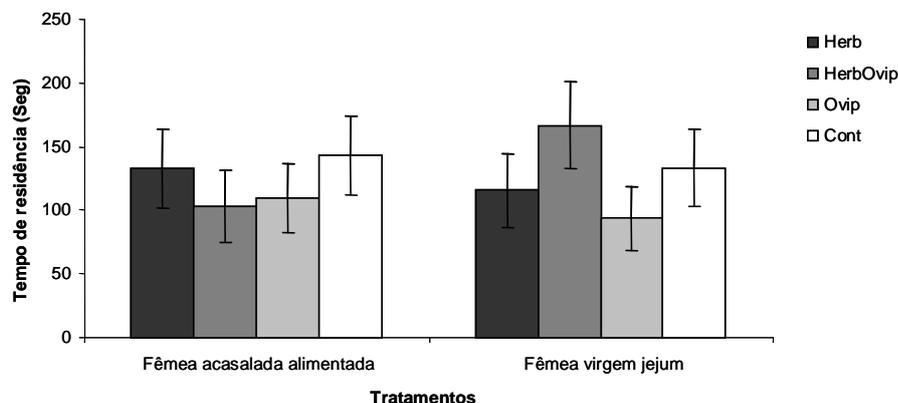
Anexo 3.2. Respostas de fêmeas de *Euschistus heros* no olfatômetro de quatro escolhas para: (a) plantas de soja submetidas a diferentes tratamentos, 96 hr após o início dos tratamentos. Cont: planta não atacada, Ovi: com oviposição, HerbOvip: com herbivoria+oviposição e Herb: com herbivoria. DOW: cultivar Dowling não atacada, IAC100: cultivar IAC100 não atacada e SIL: cultivar Silvânia não atacada. FAA: fêmea acasalada alimentada, FVA: fêmea virgem alimentada e FVJ: fêmea virgem em jejum. (b) plantas não atacadas de cada cultivar e ar com fêmeas em diferentes estados fisiológicos. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para todas as combinações ( $\chi^2$ ,  $P>0.05$ ).



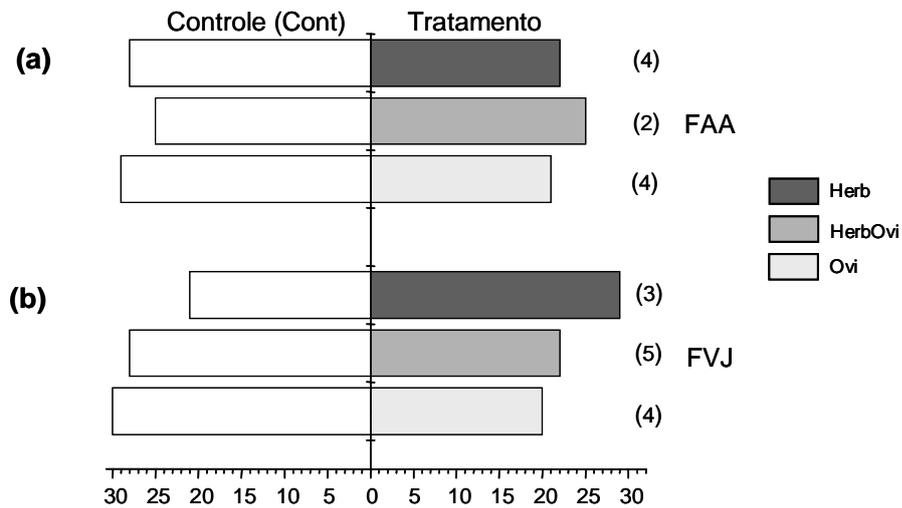
Anexo 3.3. Tempo de residência (em segundos) das fêmeas de *E. heros* no olfatômetro de quatro escolhas para plantas de soja das cultivares Dowling, IAC100 e Silvânia submetidas a diferentes tratamentos, 96 hr após o início da injúria. Cont: planta não atacada, Ovi: com oviposição, HerbOvip: com herbivoria+oviposição e Herb: com herbivoria. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para cada estado fisiológico das fêmeas testadas (Kruskal-Wallis,  $P>0.05$ ).



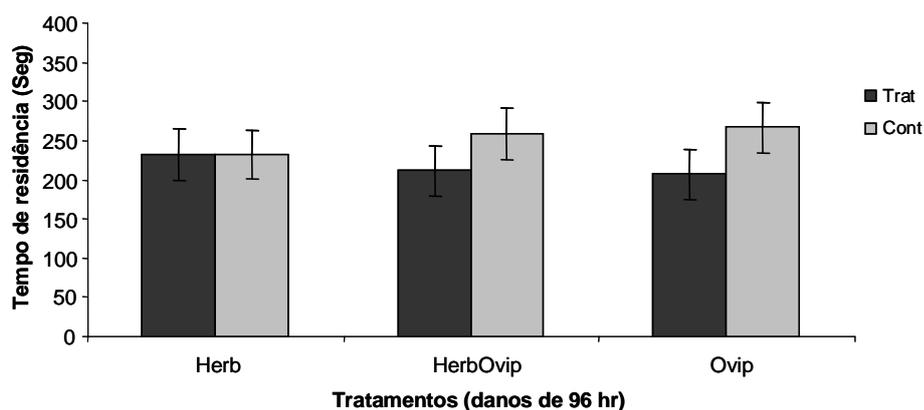
Anexo 3.4. Respostas das fêmeas de *Euschistus heros* no olfatômetro de quatro escolhas para plantas de soja da cultivar Dowling submetidas a diferentes tratamentos, 24 hr após o início da injúria. Cont: planta não atacada, Ovi: com oviposição, HerbOvip: com herbivoria+oviposição e Herb: com herbivoria. FAA: fêmea acasalada alimentada e FVJ: fêmea virgem em jejum. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para cada estado fisiológico das fêmeas testadas ( $\chi^2$ ,  $P>0.05$ ).



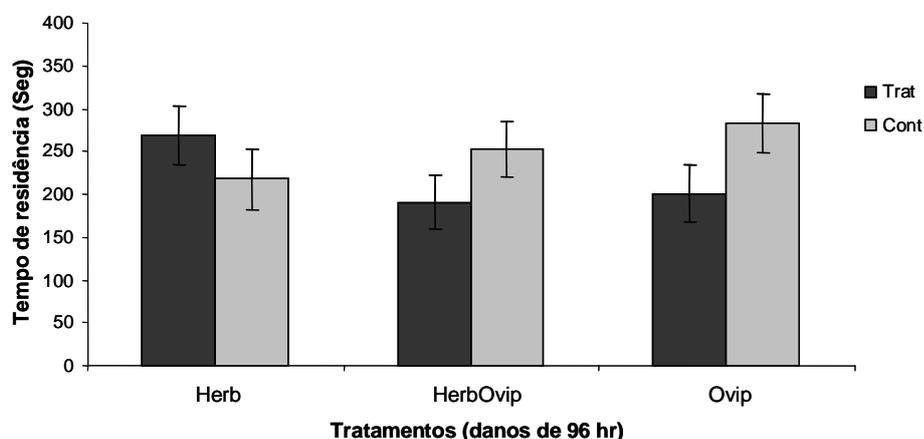
Anexo 3.5. Tempo de residência (em segundos) das fêmeas de *E. heros* no olfatômetro de quatro escolhas para plantas de soja da cultivar Dowling submetidas a diferentes tratamentos, 24 hr após o início da injúria. Cont: planta atacada, Ovi: com oviposição, HerbOvip: com herbivoria+oviposição e Herb: com herbivoria. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para cada estado fisiológico das fêmeas testadas (Kruskal-Wallis,  $P>0.05$ ).



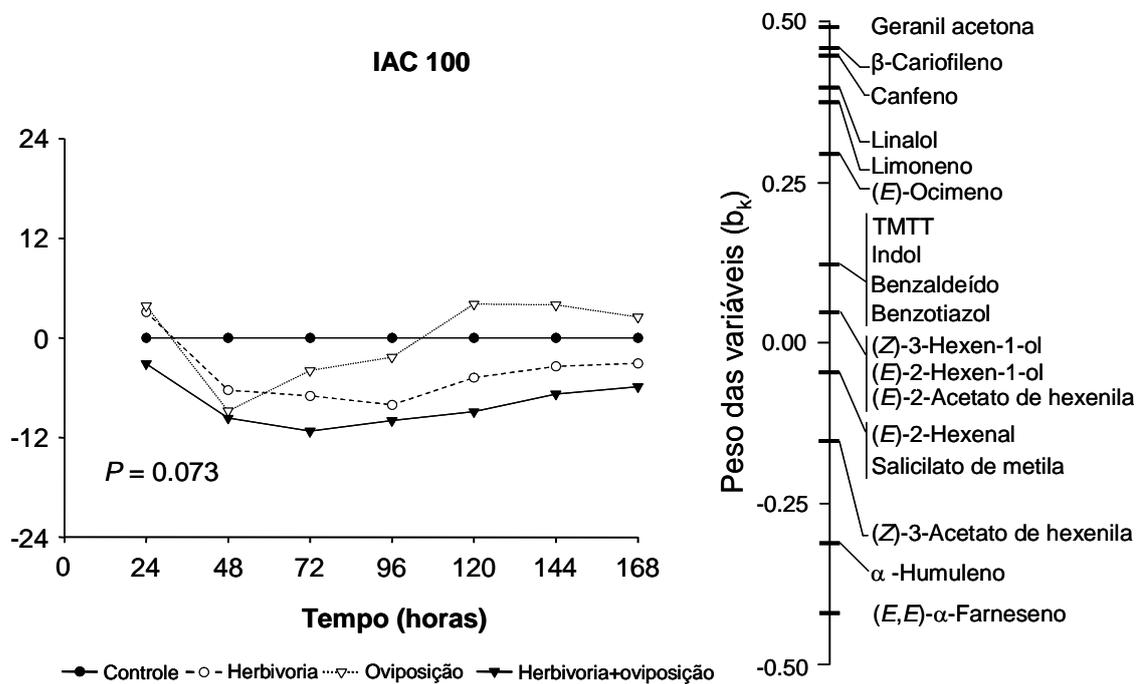
Anexo 3.6. Respostas de fêmeas de *Euschistus heros* no olfatômetro em “Y” para plantas de soja da cultivar Dowling submetidas a diferentes tratamentos, 96 hr após o início da injúria. Cont: planta não atacada, Ovi: com oviposição, HerbOvip: com herbivoria+oviposição e Herb: com herbivoria. (a) FAA: fêmea acasalada alimentada e (b) FVJ: fêmea virgem em jejum. Os números entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum dos tratamentos. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para cada estado fisiológico das fêmeas testadas ( $\chi^2$ ,  $P>0.05$ ).



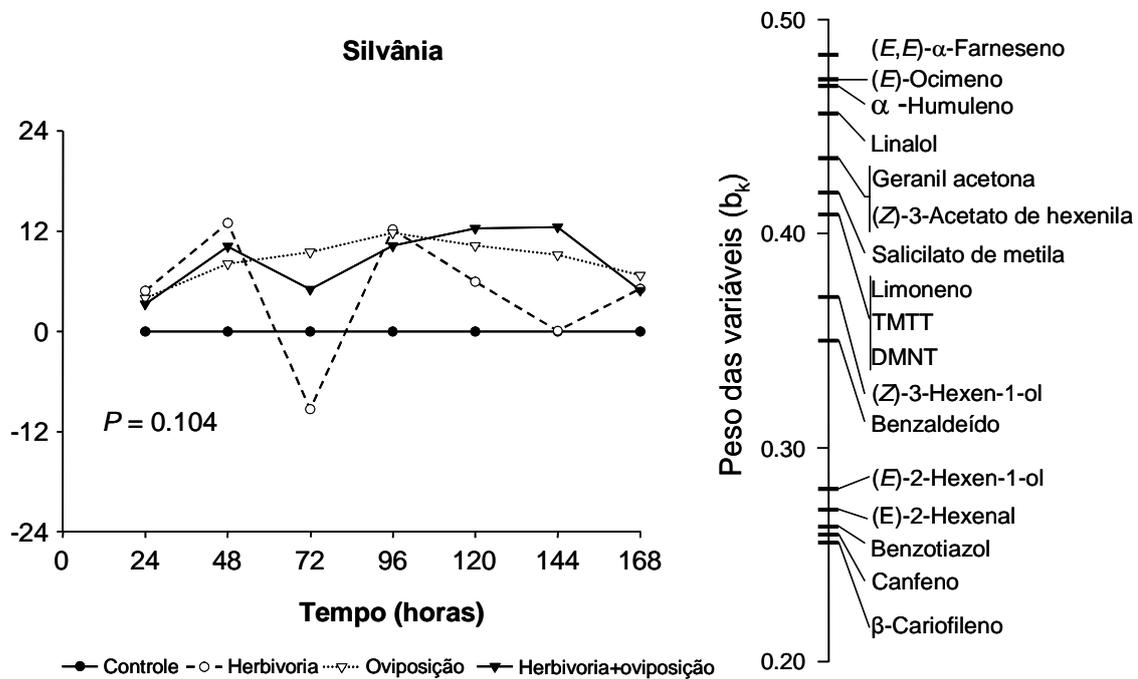
Anexo 3.7. Tempo de residência (em segundos) das fêmeas acasaladas alimentadas de *E. heros* no olfatômetro em “Y” para plantas de soja da cultivar Dowling submetidas a diferentes tratamentos, 96 hr após o início da injúria. Cont: planta não atacada, Ovi: com oviposição, HerbOvip: com herbivoria+oviposição e Herb: com herbivoria. Não houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste *t* pareado, a 5% de probabilidade.



Anexo 3.8. Tempo de residência (em segundos) das fêmeas virgens em jejum de *E. heros* no olfatômetro em “Y” para plantas de soja da cultivar Dowling submetidas a diferentes tratamentos, 96 hr após o início da injúria. Cont: planta não atacada, Ovi: com oviposição, HerbOvip: com herbivoria+oviposição e Herb: com herbivoria. Não houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste *t* pareado, a 5% de probabilidade.

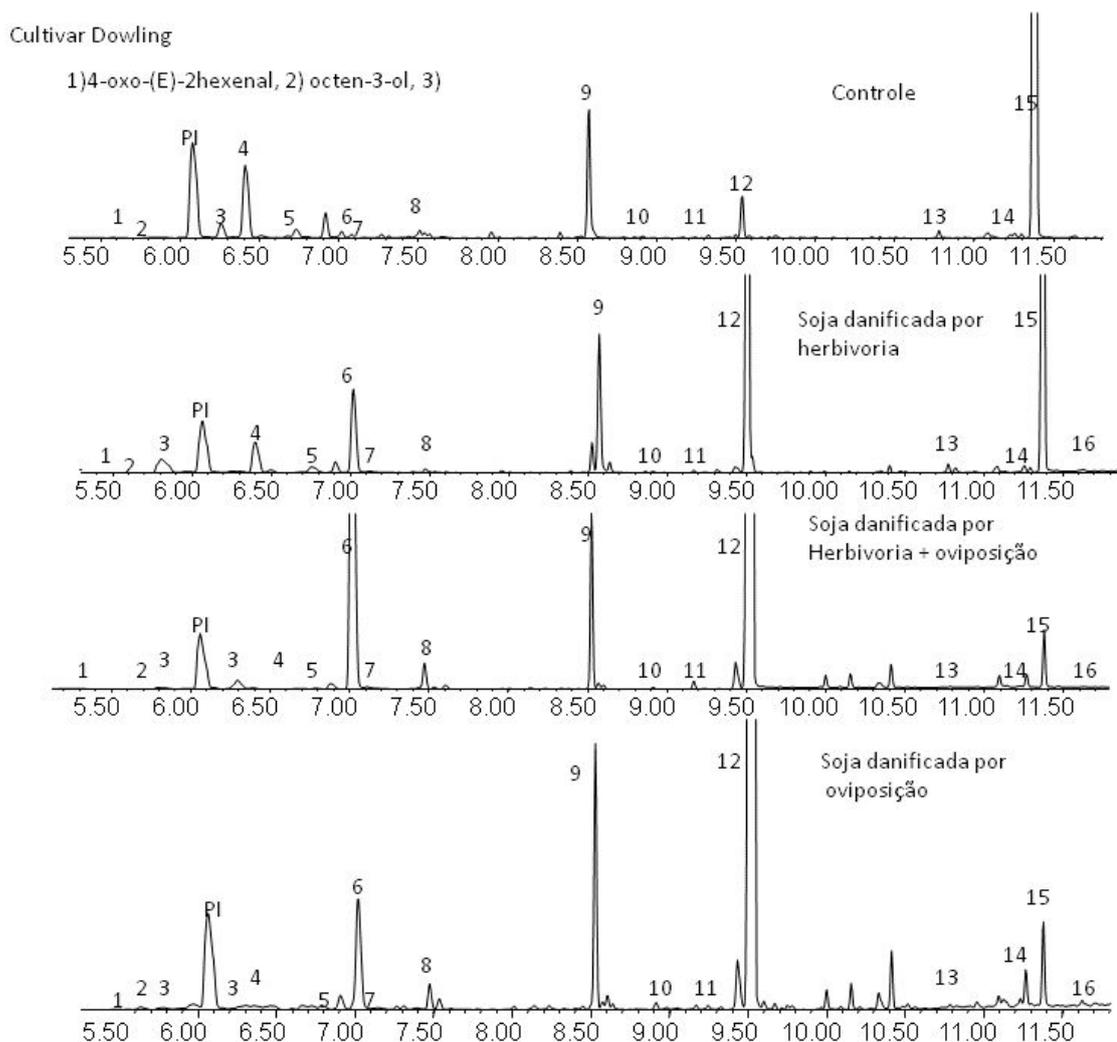


Anexo 3.9. Diagrama de PRC e peso das variáveis ( $b_k$ ), baseados na mistura dos voláteis liberados por plantas da cultivar IAC100, em sete dias de amostragem. As linhas representam o padrão de resposta das plantas de soja aos diferentes tratamentos no tempo. O valor de P indica a significância do primeiro eixo do diagrama de PRC sobre todas as horas, baseada no teste de permutação de Monte Carlo, com estatística semelhante ao teste F. O primeiro eixo da PRC não mostrou significância na variação dos tratamentos (permutação do teste de Monte Carlo,  $P > 0.05$ ), indicando que não houve efeito da indução dos voláteis na mistura. Todos os compostos apresentaram baixos valores para o peso da variável ( $b_k < 0.5$ ).

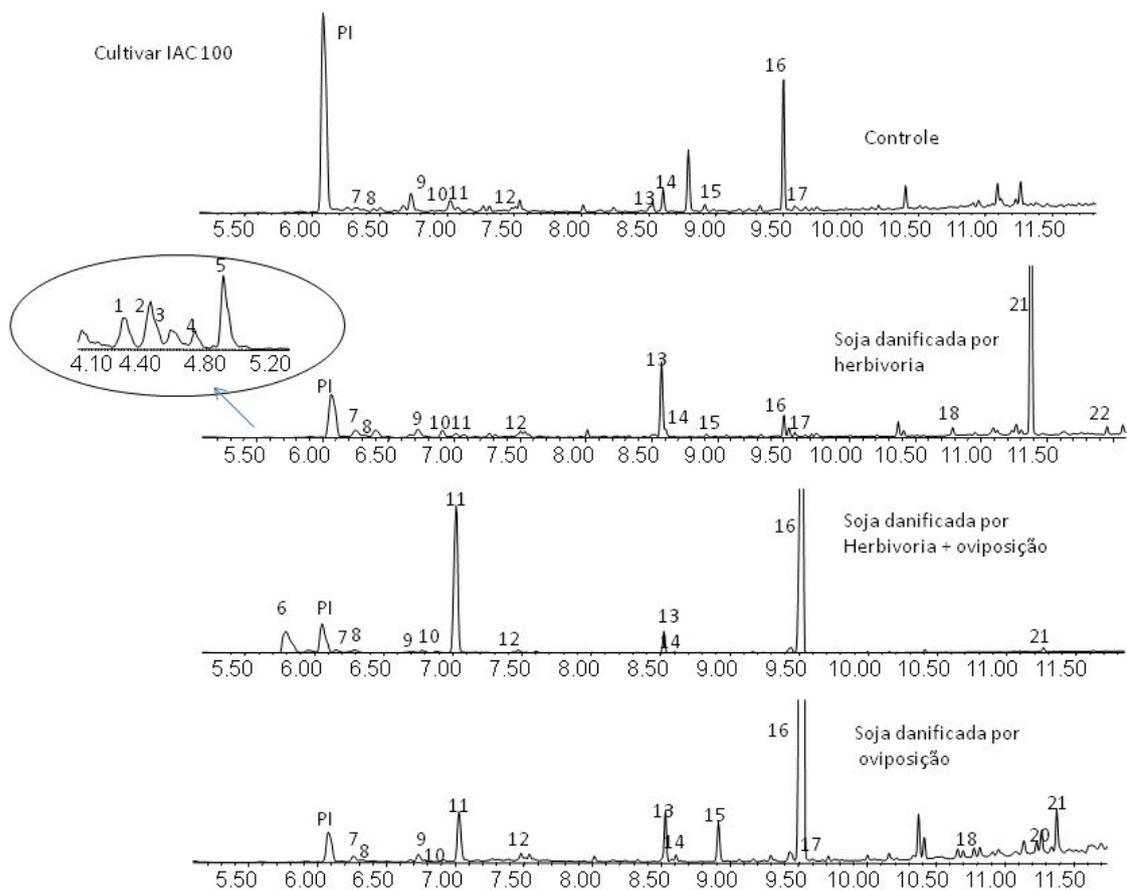


Anexo 3.10. Diagrama de PRC e peso das variáveis ( $b_k$ ), baseados na mistura dos voláteis liberados por plantas da cultivar Silvânia, em sete dias de amostragem. As linhas representam o padrão de resposta das plantas de soja aos diferentes tratamentos no tempo. O valor de *P* indica a significância do primeiro eixo do diagrama de PRC sobre todas as horas, baseada no teste de permutação de Monte Carlo, com estatística semelhante ao teste *F*. O primeiro eixo da PRC não mostrou significância na variação dos tratamentos (permutação do teste de Monte Carlo,  $P > 0.05$ ), indicando que não houve efeito da indução dos voláteis na mistura. Todos os compostos apresentaram baixos valores para o peso da variável ( $b_k < 0.5$ ).

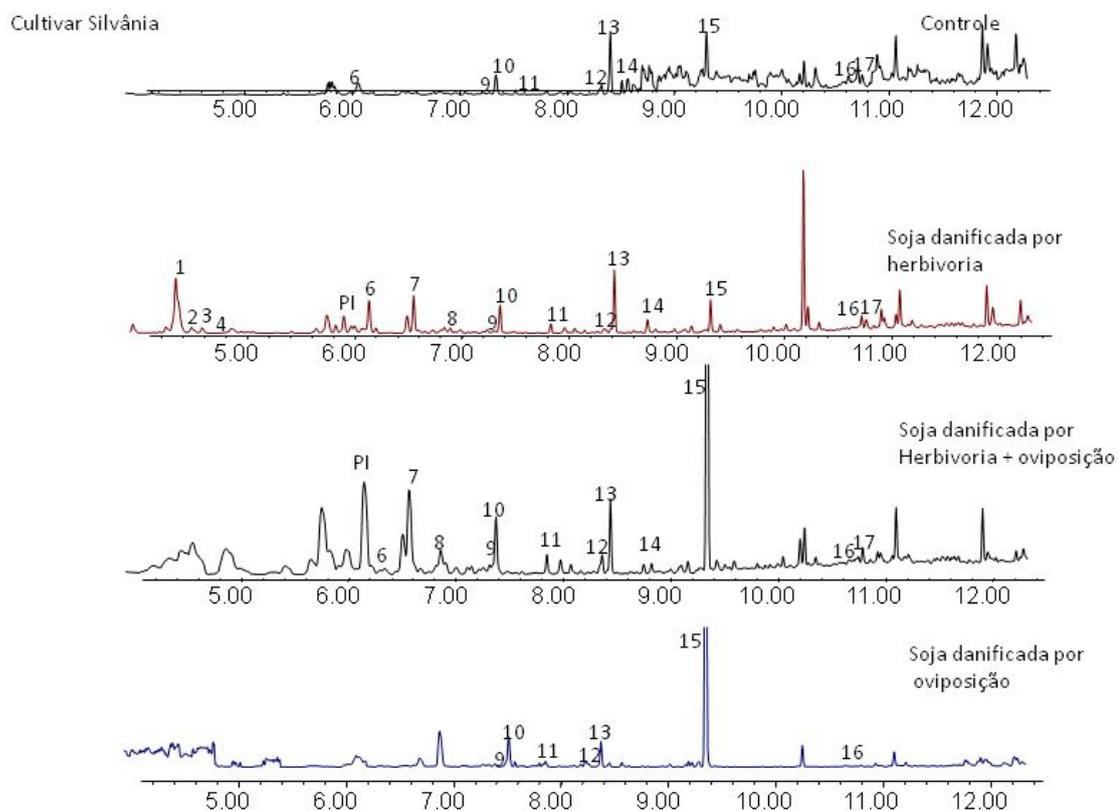
**Anexo 4 - Perfis Cromatográficos das Cultivares de Soja Dowling, IAC100 e Silvânia Submetidas à Herbivoria, Herbivoria+Oviposição e Oviposição e Plantas Não Atacadas.**



Anexo 4.1. Perfil cromatográfico mostrando os principais compostos identificados nos extratos de aeração da soja cultivar Dowling nos diferentes tratamentos. 1) canfeno, 2) benzaldeído, 3) 4-oxo-(*E*)-2-hexenal, 4) (*Z*)-3-acetato de hexenila, 5) limoneno, 6) (*Z*)-2-octen-1-ol, 7) (*E*)-2-octen-1-ol, 8) undecano, 9) salicilato de metila, 10) benzotiazol, 11) (*E*)-2-decenal, 12) tridecano, 13)  $\beta$ -cariofileno, 14)  $\alpha$ -humuleno, 15) (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno, 16) TMTT. Alguns compostos que são liberados e específicos dos insetos não foram usados na análise estatística como: o 4-oxo-(*E*)-2-hexenal e o tridecano.

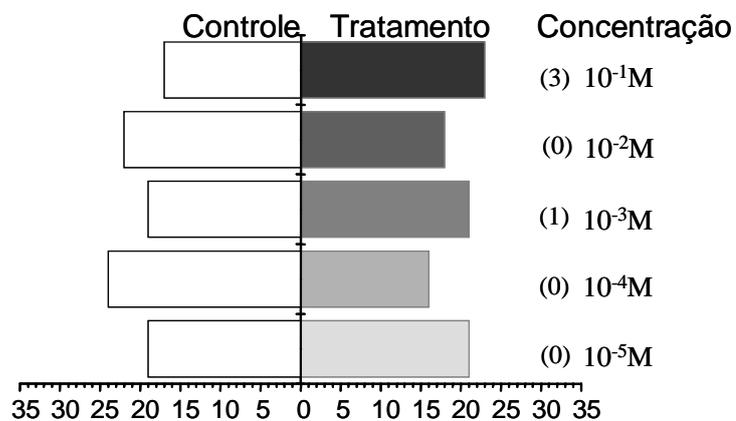


Anexo 4.2. Perfil cromatográfico mostrando os principais compostos identificados nos extratos de aeração da soja cultivar IAC100 nos diferentes tratamentos. 1) (*E*)-2-hexenal, 2) (*E*)-2-hexen-1-ol. 3) (*Z*)-3-hexen-1-ol, 4) canfeno, 5) benzaldeído, 6) 4-oxo- (*E*)-2-hexenal, 7) (*Z*)-3-acetato de hexenila, 8) (*E*)-2-acetato de hexenila, 9) limoneno, 10) (*E*)-ocimeno, 11) (*E*)-2-octenal, 12) linalol, 13) dodecano, 14) salicilato de metila, 15) benzotiazol, 16) tridecano, 17) indol, 18)  $\beta$ -cariofileno, 19) geranyl acetona, 20)  $\alpha$ -humuleno, 21) (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno, 22) TMTT.

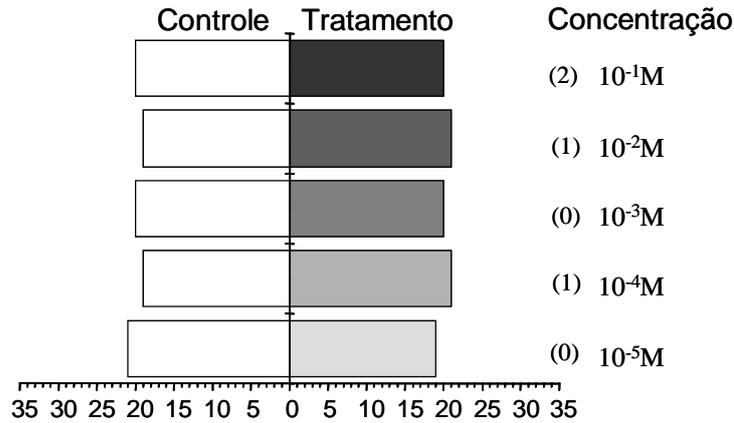


Anexo 4.3. Perfil cromatográfico mostrando os principais compostos identificados nos extratos de aeração da soja cultivar Silvânia submetida aos diferentes tratamentos. 1) (*E*)-2-hexenal, 2) (*E*)-2-hexen-1-ol, 3) (*Z*)-3-hexen-1-ol, 4) canfeno, 5) benzaldeído, 6) (*Z*)-3-acetato de hexenila, 7) limoneno, 8) (*E*)-ocimeno, 9) linalol, 10) undecano, 11)DMNT, 12) salicilato de metila, 13) decanal, 14) benzotiazol, 15) tridecano, 16)  $\beta$ -cariofileno, 17) geranil acetona, 18)  $\alpha$ -humuleno, 19) (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno, 20) TMTT.

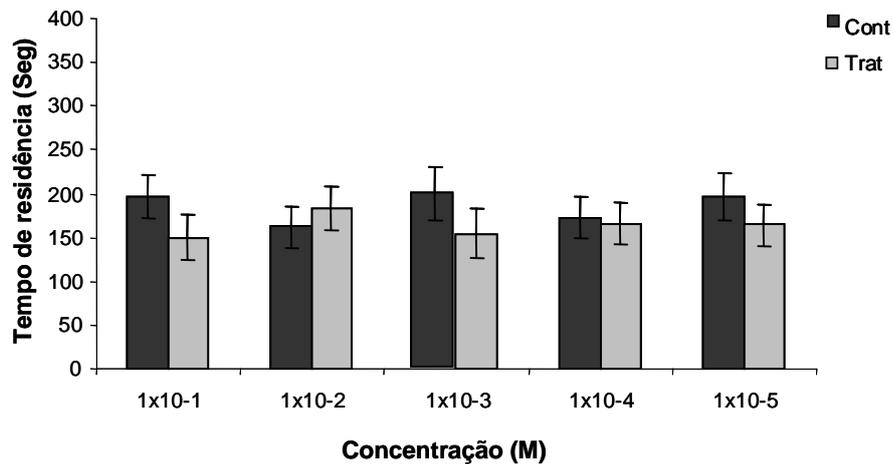
**Anexo 5 - Figuras Cujos Resultados Não Foram Significativos - Capítulo III - Efeito dos Compostos (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno, salicilato de metila e (*Z*)-3-acetato de hexenila no Comportamento do *Telenomus podisi* Parasitóide de Ovos de *Euschistus heros***



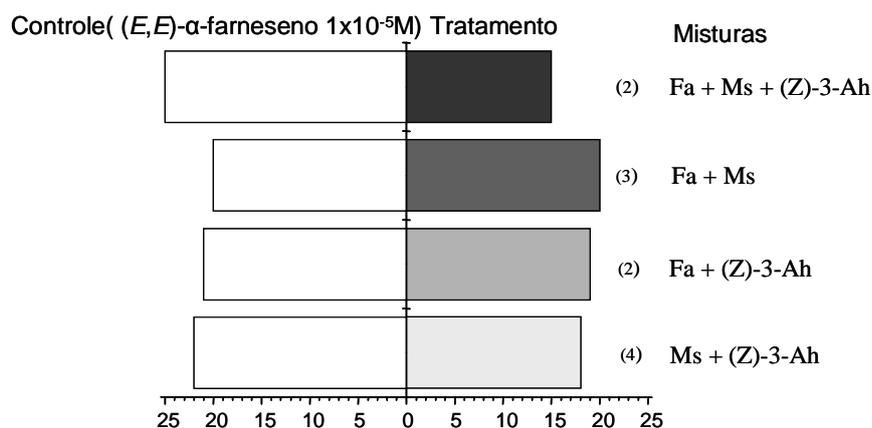
Anexo 5.1. Respostas de fêmeas de *T. podisi* no olfatômetro em “Y” para diferentes concentrações do composto salicilato de metila ou hexano (controle). Não houve diferença significativa entre os tratamentos para todas as concentrações ( $\chi^2$ ,  $P>0.05$ ). Números entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum dos tratamentos.



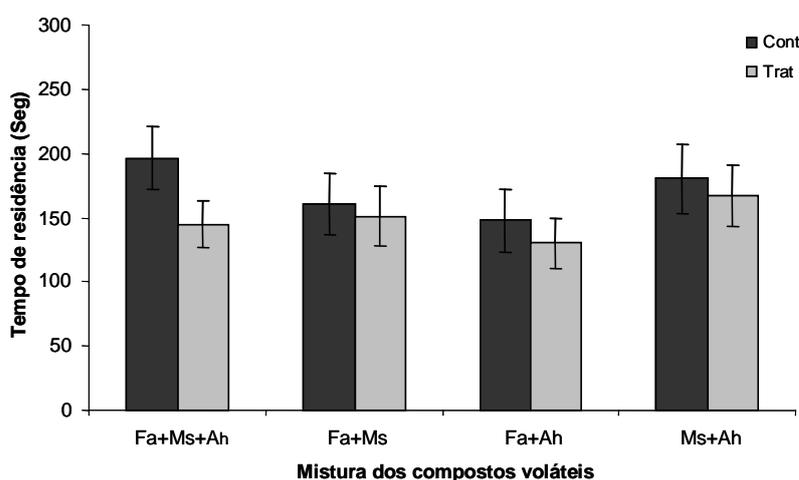
Anexo 5.2. Respostas de fêmeas de *T. podisi* no olfatômetro em “Y” para diferentes concentrações do composto (Z)-3-acetato de hexenila ou hexano (controle). Não houve diferença significativa entre os tratamentos para todas as concentrações ( $\chi^2$ ,  $P>0.05$ ). Números entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum dos tratamentos.



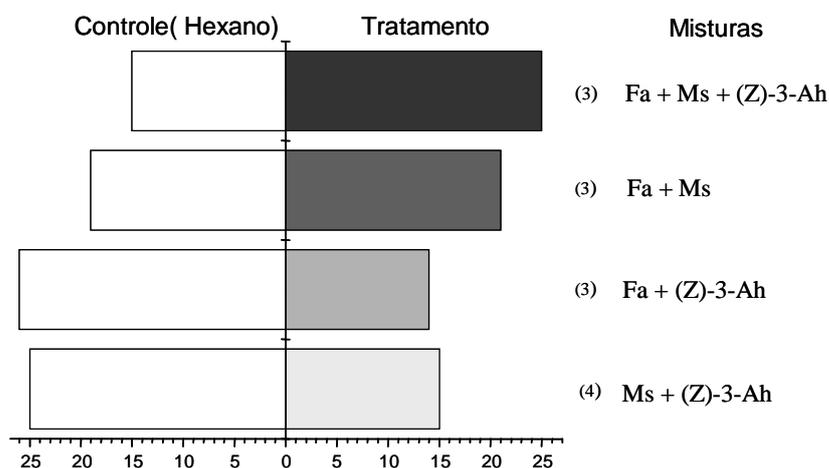
Anexo 5.3. Tempo de residência (em segundos) das fêmeas de *T. podisi* no olfatômetro em “Y” para as diferentes concentrações do composto (Z)-3-acetato de hexenila. Não houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste *t* pareado, a 5% de probabilidade.



Anexo 5.4. Respostas de fêmeas de *T. podisi* no olfatômetro em “Y” para diferentes misturas dos compostos Fa: (*E,E*)-α-farneseno, Ms: salicilato de metila e (*Z*)-3-Ah: (*Z*)-3-acetato de hexenila; controle: (*E,E*)-α-farneseno. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para todas as concentrações ( $\chi^2$ ,  $P > 0.05$ ). Números entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum dos tratamentos.



Anexo 5.5. Tempo de residência (em segundos) das fêmeas de *T. podisi* no olfatômetro em “Y” para as diferentes misturas dos compostos Fa: (*E,E*)-α-farneseno, Ms: salicilato de metila e (*Z*)-3-Ah: (*Z*)-3-acetato de hexenila; controle: (*E,E*)-α-farneseno. Não houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste *t* pareado, a 5% de probabilidade.



Anexo 5.6. Respostas de fêmeas de *T. podisi* no olfatômetro em “Y” para diferentes misturas dos compostos Fa: (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno, Ms: salicilato de metila e (Z)-3-Ah: (Z)-3-acetato de hexenila; controle: hexano. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para todas as concentrações ( $\chi^2$ ,  $P > 0.05$ ). Números entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum dos tratamentos.