



**Universidade de Brasília – UnB**  
**Instituto de Ciências Biológicas –IB**  
**Programa de Pós-graduação em Zoologia**

**Tese de Doutorado**

Ecologia comportamental de *Telenomus podisi* Ashamed (Hymenoptera:  
Scelionidae) e sua aplicação no controle biológico

**Ana Carolina Gomes Lagôa**

Brasília

2021



**Universidade de Brasília – UnB**  
**Instituto de Ciências Biológicas –IB**  
**Programa de Pós-graduação em Zoologia**

Ecologia comportamental de *Telenomus podisi* Ashamed (Hymenoptera:  
Scelionidae) e sua aplicação no controle biológico

Tese de doutorado apresentada  
ao programa de Pós-graduação  
em Zoologia como requisito  
parcial para a obtenção do título  
de Doutora em Zoologia.

**Ana Carolina Gomes Lagôa**

Orientador: Prof. Dr. Raul Alberto Laumann  
(Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

Brasília

2021



**Universidade de Brasília – UnB**  
**Instituto de Ciências Biológicas –IB**  
**Programa de Pós-graduação em Zoologia**

“Ecologia comportamental de *Telenomus podisi* Ashamed (Hymenoptera: Scelionidae) e sua aplicação no controle biológico”

Comissão Examinadora

---

**Prof. Dr. Raul Alberto Laumann**

Presidente / orientador  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

---

**Prof. Dr. Felipe Malheiros Gawryszewski**

Membro Titular Interno  
Departamento de Zoologia – UnB/IB

---

**Dr. Adeney de Freitas Bueno**

Membro Titular Externo  
Embrapa Soja

---

**Profa. Dra. Christian Sherley Araújo da Silva Torres**

Membro Titular Externo  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

**Profa. Dra. Marina Regina Frizzas**

Membro Suplente  
Departamento de Zoologia – UnB/IB

Brasília, 31 de maio de 2021

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao programa de Pós-Graduação em Zoologia da Universidade de Brasília (UnB) e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), especialmente ao Laboratório de Semioquímicos, pela oportunidade e apoio.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos. À Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Ao Decanato de Pós-Graduação (DPG) da Universidade de Brasília (UnB), pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador Dr. Raúl A. Laumann, que há alguns anos acreditou e deu oportunidade para uma estudante intrometida que o foi pedir estágio. Desde então, sigo o admirando e o respeitando como uma das maiores influências que tive na vida. Estou economizando palavras, porque quem o conhece sabe a pessoa maravilhosa, generosa, amiga e compreensiva que ele é. Hoje um ciclo se encerra, mas serei eternamente grata pela oportunidade e lembrarei sempre com carinho do meu querido orientador!

Ao Dr. Miguel Borges e a Dra. Maria Carolina Blassioli Moraes, pelo apoio e auxílio.

Aos amigos de labuta, Aline Dias, Michely Aquino, Marla Hassemmer, Mirian Michereff, Diego Magalhães, o apoio de vocês foi fundamental. Agradeço especialmente à “Michy”, sempre solícita, parceira, prestativa. Aos estudantes que me auxiliaram, especialmente às queridas Brunna Santana e Alice Freitas. Agradeço ao sr. Josafá pelo grande auxílio em campo.

À minha família muitíssimo amada. Agradeço aos meus pais, Nelson e Penha, minha irmã Tatiane e aos meus sobrinhos Pedro Joaquim e Maria Heloisa. Pois são meu porto seguro e motivo da minha alegria.

Agradeço com todo meu amor ao Pedro Togni, além da enorme ajuda profissional é meu companheiro de todas as horas e todos os momentos. Seu amor e dedicação são meu alento. Agradeço igualmente ao amado Bruno, seu carinho e afeto são benção na minha vida. Sem o amor, o companheirismo e o carinho dos dois, essa jornada não teria sido prazerosa.

Muito obrigada!

Aos meus amados pais,  
Nelson e Penha.  
Dedico e sempre dedicarei!

Ofereço este trabalho a todos que partiram, aos cientistas e aos profissionais da saúde que lutaram bravamente pela vida nesses tempos difíceis de pandemia!

*“Tudo em mim é a tendência para ser a seguir outra coisa; uma impaciência da alma consigo mesma, como uma criança inoportuna; um desassossego sempre crescente e sempre igual. Tudo me interessa e nada me prende.”*

Fernando Pessoa

## SUMÁRIO

RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	3
INTRODUÇÃO GERAL .....	5
Referências bibliográficas.....	15
CAPÍTULO 1	
Introdução .....	20
Materiais E Métodos .....	23
Resultados .....	37
Discussão .....	44
Referências Bibliográficas .....	52
CAPÍTULO 2	
Introdução .....	57
Materiais E Métodos .....	61
Resultados .....	72
Discussão .....	76
Referências Bibliográficas .....	83
CAPÍTULO 3	
Introdução .....	88
Materiais E Métodos .....	92
Resultados .....	109
Discussão .....	120
Referências Bibliográficas .....	125
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	130
APÊNDICE .....	132

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO GERAL

**Figura 1.** Diagrama das diferentes modalidades dos estímulos multimodais. Adaptado de Munoz e Blumstein (2012) e Partan e Marler (1999). ..... 12

### CAPÍTULO 1

**Figura 1.** (A) criação de parasitoides em sala climatizada. (B) vista geral das gaiolas de *Telenomus podisi*. (C) gaiola contendo (a) parasitoides recém-emergidos, (b) ovos de *Euschistus heros* parasitados, (c) dieta a base de mel. (D) *Telenomus podisi* parasitando uma postura de *E. heros*. (E) fêmea de *T. podisi*. ..... 24

**Figura 2.** Criação de *Euschistus heros* em sala climatizada. Vista geral das gaiolas de adultos e ninfas. Adulto de *E. heros*. ..... 25

**Figura 4.** (A) Arena de experimentação adaptada para bioensaios com fluxos de ar. (a) fluxômetro, (b) seringa com tratamentos (c), arena, (d) filtro de carvão ativado, (e) bombas (f) mangueira para o escoamento de ar. (B) seringa com (a) papel filtro onde foram aplicadas as soluções dos tratamentos ou o *n*-hexano (controle). ..... 28

**Figura 5.** Representação e imagens dos equipamentos utilizados para a propagação dos sinais vibratórios (SV) de fêmeas de *Euschistus heros*. (A) representação da arena de dupla escolha em contato com o alto-falante e, por sua vez, com o computador. Oscilograma representativo com suas características temporais e frequência dominante (média $\pm$  SE) dos sinais originais de fêmeas de *E. heros* usados nos bioensaios. (B) alto-falante ligado a uma (b) ponta plástica de pipeta em contato com a (a) parte interna da arena por um furo no vidro inferior. (C) alto-falante ligado a (a) massa de modelar junto a ponta plástica de pipeta. (D) Arena de dupla escolha com (a) um braço para o tratamento, onde o papel, em contato com a pipeta, não faz contato com o papel do (b) outro braço da arena. PD = duração do pulso (ms), RT= tempo de repetição do pulso (ms) DF = frequência dominante do sinal vibratório (Hz) ..... 30

**Figura 6.** Procedimentos para gerar rastros de *E. heros* em um dos braços da arena de dupla escolha. (a) tira de papelão delimitando o braço da arena para confinamento de duas fêmeas de *Euschistus heros*, (b) fita crepe, (c) fêmea de *E. heros*. ..... 31

**Figura 7.** Arena de dupla escolha com cartolina amarela em um dos braços da arena. .... 32

**Figura 8.** Esquema de todos os tratamentos nas três diferentes etapas avaliadas. (A) todos os tratamentos individualizados contrastados com o controle (primeira etapa). (B) combinações contrastadas com o controle (segunda etapa). (C) combinações contrastadas com cada componente da combinação (terceira etapa). (AL) área de liberação. .... 34

**Figura 9.** (A) Escolha inicial (proporção de insetos avaliados) de fêmeas de *Telenomus podisi* em diferentes tratamentos e seus respectivos controles (*n*-hexano ou sem tratamento). (B) média  $\pm$  SE do tempo de residência (s) de fêmeas de *T. podisi* em diferentes tratamentos e seus respectivos controles (*n*-hexano ou sem tratamento). (AF)  $\alpha$ -farneseno, (FS) 2,6,10-trimetil

tridecanoato de metila, (SV) sinais vibratórios, (RQ) rastros químicos, e (CA) cor amarela. Lado direito e lado esquerdo mostram a escolha inicial (A) e o tempo de residência (B) em bioensaios sem estímulos. \* Diferenças significativas entre os tratamentos (\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001) por análise de modelos lineares generalizados (GLM) com (A) distribuição binomial e (B) Poisson ou binomial negativo. Números entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum dos tratamentos após 3 minutos. .... 38

**Figura 10.** (A) Escolha inicial (proporção de insetos avaliados) de *Telenomus podisi* em diferentes combinações de estímulos comparadas ao controle (*n*-hexano ou sem tratamento). (B) média±SE do tempo de residência de *T. podisi* em diferentes combinações de estímulos em relação ao controle (*n*-hexano ou sem tratamento). (AF)  $\alpha$ -farneseno, (FS) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila, (SV) sinais vibratórios, (RQ) rastros químicos, e (CA) cor amarela. \* Diferenças significativas entre os tratamentos (\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001) por análise de modelos lineares generalizados (GLM) com (A) distribuição binomial e (B) Poisson ou binomial negativo. Números entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum dos tratamentos após 3 minutos..... 40

**Figura 11.** (A) Escolha inicial (proporção de insetos) de fêmeas de *Telenomus podisi* em diferentes combinações de estímulos comparadas a cada componente da combinação. (B) média ± SE do tempo de residência do parasitoide *T. podisi* em diferentes combinações de estímulos comparadas a cada componente da combinação. (AF)  $\alpha$ -farneseno, (FS) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila, (SV) sinais vibratórios, (RQ) rastros químicos, e (CA) cor amarela. \* Diferenças significativas entre os tratamentos (\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001) por análise de modelos lineares generalizados (GLM) com (A) distribuição binomial e (B) Poisson ou binomial negativo. Números entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum dos tratamentos após 3 minutos..... 43

## CAPÍTULO 2

**Figura 1.** Sequência hierárquica dos estímulos químicos e físicos utilizados pelo parasitoide de ovos *Telenomus podisi* quando forrageia por hospedeiros. Adaptado de Laumann et al. (2011). .... 59

**Figura 2.** Esquema dos desenhos experimentais nas três diferentes etapas avaliadas. (AL) área de liberação. .... 68

**Figura 3.** Condicionamento de *Telenomus podisi* aos semioquímicos voláteis  $\alpha$ -farneseno e 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila, separadamente. (A) vista geral da gaiola adaptada com (a) as fêmeas de *T. podisi* e (b) o papel filtro contendo o semioquímicos. (B) outro ângulo de visão da gaiola adaptada. (C) fundo da gaiola adaptada com (a) a tela de arame..... 69

**Figura 4.** Condicionamento de *Telenomus podisi* à vibração do substrato. (A) vista geral do condicionamento, (a) cartolina dentro da gaiola, (b) pequeno chumaço de algodão, (c) cartolina em contato com a ponta da pipeta plástica. (B) Vista superior da gaiola, (a) fita de cartolina, (b) fêmea de *T. podisi* em contato direto com a superfície vibrada. .... 70

**Figura 5.** Gaiola contendo duas fêmeas de *Euschistus heros* para deposição dos rastros químicos. (a) fêmea de *E. heros*. .... 71

**Figura 6.** Condicionamento de *Telenomus podisi* à cor amarela do substrato. (A) vista geral do condicionamento, (a) cartolina amarela dentro da gaiola, (b) fêmea de *T. podisi*. (B) Vista superior da gaiola. .... 71

**Figura 7.** (A) proporção da escolha inicial de *Telenomus podisi*. (B) média  $\pm$  SE do tempo de residência do parasitoide *T. podisi* para os diferentes estímulos oferecidos em cada braço da arena separadamente. (AF)  $\alpha$ -farneseno, (FS) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila, (SV) sinais vibratórios, (RQ) rastros químicos, e (CA) cor amarela, (se) sem experiência, (eAF) experiência em  $\alpha$ -farneseno, (eFS) experiência em 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila, (eSV) experiência em sinais vibratórios, (eRQ) experiência em rastros químicos, (eCA) experiência na cor amarela. \* Diferenças significativas entre os tratamentos (\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001) por análise de modelos lineares generalizados (GLM) com (A) distribuição binomial e (B) Poisson ou binomial negativo. Números entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum dos tratamentos após 3 minutos. .... 74

**Figura 8.** Modelo teórico das etapas de forrageamento de *Telenomus podisi* durante a busca por hospedeiros (ovos de *Euschistus heros*) considerando o comportamento inato e o aprendido. .... 81

### CAPÍTULO 3

**Figura 1.** Campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Cenargen. As distribuições das parcelas experimentais estão marcadas em vermelho. .... 94

**Figura 2.** Fitas amarelas (tratamento CA) em parcela de soja. .... 97

**Figura 3.** (A) Cartela com ovos sentinela coberta por filó. (B) cartela com ovos sentinela com abrigo feito com fundo de garrafa tipo PET, amarrados em uma planta de soja ..... 99

**Figura 4.** Arena para o experimento de deslocamento em parcelas com estacas, nas distâncias de 0,5, 1, 2, 4, 5 metros com ovos sentinela e 10 metros com cartelas adesivas amarelas. AL=área de liberação de fêmeas de *Telenomus podisi*. .... 101

**Figura 5.** (A) cartela com ovos sentinela junto ao abrigo de garrafa PET amarrada com barbante a uma estaca. (B) frasco de cultura para tecido com fêmeas de *Telenomus podisi*, preso com fita crepe na estaca central. .... 101

**Figura 6.** Arena para o experimento de deslocamento em parcelas com plantas de soja, nas distâncias de 0,5, 1, 2, 4, 5 metros com ovos sentinela e 10 metros com cartelas adesivas amarelas. AL=área de liberação de fêmeas de *Telenomus podisi*. .... 102

**Figura 7.** (A) cartela com ovos sentinela junto ao abrigo de garrafa PET amarrada com barbante a uma planta de soja. (B) frasco de cultura de tecidos com fêmeas de *Telenomus podisi*, preso com fita crepe na estaca central. A foto mostra o momento da liberação dos insetos. .... 102

**Figura 8.** (A) planta de soja com um semioquímico impregnado no septo (circulado em vermelho). (B) planta de soja com o tratamento visual feito de cartão plástico amarelo. .... 104

**Figura 9.** Arenas para os experimentos de atratividade dos estímulos com liberação e recaptura de *Telenomus podisi*. .... 106

**Figura 10.** Esquema da distribuição de tratamentos para o experimento de atratividade dos estímulos, onde foi avaliada a influência do (A)  $\alpha$ -farneseno (AF), 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila (FS) e a cor amarela (CA) separadamente no comportamento de *Telenomus podisi*. (B) AF e CA separadamente ou em conjunto. (C) FS e CA separadamente ou em conjunto. (D) AF e FS separadamente ou em conjunto. .... 107

**Figura 11.** Abundância (media  $\pm$  SE) de parasitoides totais (ACE) e *Telenomus podisi* (BDF) em função do tratamento e do experimento. (A) abundância total de parasitoides no experimento 1, (C) no experimento 2, e (E) no experimento 3. (B) abundância de *T. podisi* no experimento 1, (D) no experimento 2, e (F) no experimento 3. (AF)  $\alpha$ -farneseno; (FS) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila; (CA) cor amarela; (AFCA)  $\alpha$ -farneseno junto a cor amarela, (FSCA) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila junto a cor amarela; (MIX) combinação de AF, FS e CA; (CTRL) Controle. Letras distintas indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos. .... 110

**Figura 12.** Parasitismo (media  $\pm$  SE) de ovos sentinela de *Euschistus heros* em relação aos tratamentos e aos experimentos. (AF)  $\alpha$ -farneseno; (FS) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila; (CA) cor amarela; (AFCA)  $\alpha$ -farneseno junto a cor amarela, (FSCA) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila junto a cor amarela; (MIX) combinação de AF, FS e CA; (CTRL) controle. (A) primeiro experimento, (B) segundo experimento e (C) terceiro experimento. Letras distintas indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos. .... 112

**Figura 13.** Cartelas de ovos sentinela com predação de (A) formigas e (B) um ortóptero. (C) ovos completamente desalojados por ortópteros. .... 113

**Figura 14.** Proporção do controle biológico causado por (A) parasitismo e (B) predação dos ovos sentinela de *Euschistus heros*. .... 114

**Figura 15.** Importância relativa dos fatores individuais de mortalidade dos ovos sentinela de *Euschistus heros* em campo, para o  $R^2$  da regressão linear múltipla, no (A) primeiro experimento, (B) segundo experimento, e (C) terceiro experimento. .... 115

**Figura 16.** Abundância (media  $\pm$  SE) das espécies de percevejos pentatomídeos. Eh: *Euschistus heros*, Pg: *Piezodorus guildinii*, Ch: *Chinavia* sp., Ed: *Edessa meditabunda* (Fabricius), Dm: *Dichelops melacanthus* (Dallas, 1851), Df: *Dichelops furcatus* (Fabricius), Oe: *Oebalus* sp., *Nezara viridula* (L.). Letras distintas indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) na abundância entre as espécies. .... 117

**Figura 17.** Número médio (média  $\pm$  SE) de ovos parasitados por repetição em relação às distâncias em experimentos (A) realizado em estacas, (B) experimento realizado em plantas de soja. Letras distintas indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre as distâncias. .... 119

**Figura 18.** Parasitismo (media  $\pm$  SE) de ovos de *Euschistus heros* por *Telenomus podisi* em quatro testes distintos. (A) teste 1 (CA, AF, FS separadamente); (B) teste 2 (AF e CA juntos ou separados); (C) teste 3 (FS e CA juntos ou separados); (D) teste 4 (AF e FS juntos ou separados). (AF)  $\alpha$ -farneseno; (FS) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila; (CA) cor amarela; (AFCA)  $\alpha$ -farneseno junto a cor amarela; (FSCA) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila junto a cor amarela; (AFFS) combinação de AF e FS; (CTRL) Controle. Letras distintas indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre as distâncias. .... 120

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

**Tabela 1.** Combinações entre os estímulos químicos e físicos e seus respectivos controles utilizados nos bioensaios onde os estímulos foram combinados dois a dois. (AF)  $\alpha$ -farneseno, (FS) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila, (SV) sinais vibratórios, (RQ) rastros químicos, e (CA) cor amarela. Estão representados as respectivas quantidades e concentrações utilizadas por tratamento ..... 35

**Tabela 2.** Combinações entre os estímulos químicos e físicos (dois a dois) contrastados com cada componente da combinação. (AF)  $\alpha$ -farneseno, (FS) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila, (SV) sinais vibratórios, (RQ) rastros químicos, e (CA) cor amarela. Estão representados as respectivas quantidades e concentrações utilizadas por tratamento. .... 35

**Tabela 3.** Efeito dos tratamentos na escolha inicial e tempo de residência (s) (média  $\pm$  SE) de *Telenomus podisi* quando exposto a diferentes estímulos e os controles em uma arena de dupla escolha (“Y”). (AF)  $\alpha$ -farneseno, (FS) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila, (SV) sinais vibratórios, (RQ) rastros químicos, e (CA) cor amarela. .... 39

**Tabela 4.** Efeito dos tratamentos na escolha inicial e tempo de residência (s) (média  $\pm$  SE) de *Telenomus podisi* quando exposto a diferentes combinações de estímulos e os controles em uma arena de dupla escolha (“Y”). (AF)  $\alpha$ -farneseno, (FS) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila, (SV) sinais vibratórios, (RQ) rastros químicos, e (CA) cor amarela. .... 41

**Tabela 5.** Efeito dos tratamentos na escolha inicial e tempo de residência (s) (média  $\pm$  SE) de *Telenomus podisi* quando exposto a diferentes combinações de estímulos contrastados aos componentes da combinação em uma arena de dupla escolha (“Y”). (AF)  $\alpha$ -farneseno, (FS) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila, (SV) sinais vibratórios, (RQ) rastros químicos, e (CA) cor amarela. .... 43

### CAPÍTULO 2

**Tabela 1.** Tratamento oferecidos em cada braço da arena de dupla escolha (“Y”) separadamente, em testes sem experiência prévia de *Telenomus podisi*, e testes com experiência prévia para cada um dos estímulos avaliados. (AF)  $\alpha$ -farneseno, (FS) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila, (SV) sinais vibratórios, (RQ) rastros químicos, e (CA) cor amarela. . 68

### CAPÍTULO 3

**Tabela 1.** Tratamentos combinados e isolados utilizados nos experimentos em campo e seus respectivos números de repetições. .... 96

**Tabela 2.** Tratamentos combinados e isolados utilizados nos experimentos de atratividade e seus respectivos números de repetições. .... 103

## RESUMO

Os parasitoides de ovos da família Scelionidae são importantes agentes de controle biológico. Uma série de estímulos produzidos direta ou indiretamente por seus hospedeiros condicionam o comportamento de forrageamento desses insetos. Esse conhecimento é relevante para uma correta interpretação do comportamento de busca e seleção de hospedeiros pelos parasitoides e sua aplicação em estratégias de controle biológico. Esta tese teve como objetivo avaliar como os estímulos químicos e físicos afetam o comportamento de busca e seleção de hospedeiros do parasitoide de ovos *Telenomus podisi*, visando sua manipulação em campo. Para isso, a tese foi dividida em três capítulos. No primeiro capítulo foram realizados estudos em laboratório para avaliar a relação multimodal entre estímulos químicos, vibracionais e visuais na atratividade do parasitoide. Os resultados indicam que os estímulos supracitados não atuam de forma multimodal no comportamento do parasitoide. Apesar disso, o estímulo visual se sobressai aos demais estímulos. Portanto, o parasitoide responde a vários estímulos do, mas prefere aqueles estímulos mais confiáveis e mais próximos ao hospedeiro. No Capítulo 2, foi avaliada a hierarquia entre os mesmos estímulos avaliados no Capítulo 1 e a capacidade de resposta inata ou aprendida do parasitoide aos mesmos. De modo geral, *T. podisi* não tem preferência inata pela maioria dos estímulos quando contrastados entre si. O aprendizado não associativo causou habituação nos parasitoides apenas para os estímulos mais confiáveis. Com isso, foi proposto um novo modelo das etapas de forrageamento de *T. podisi* combinando comportamentos inatos e aprendidos. No Capítulo 3, foi testado como os diferentes estímulos estudados em laboratório poderiam atrair o parasitoide e favorecer o parasitismo de ovos em campo. O experimento foi realizado em três experimentos consecutivos ao longo de dois anos. A abundância dos parasitoides não foi afetada, e geral, pelos tratamentos. No entanto, as taxas de

parasitismo foram maiores nas parcelas com os voláteis de plantas e feromônio separadamente. Conclui-se que os estímulos químicos favorecem o parasitismo em campo, e que a cor do substrato apenas em curta distância favorece o forrageamento e a eficiência de *T. podisi*.

**Palavras-chave:** Inimigo natural, controle biológico conservativo, semioquímicos, estímulos multimodais, desvio infoquímico, aprendizagem não associativa.

## ABSTRACT

Egg parasitoids of the family Scelionidae are important biological control agents. A series of stimuli produced directly or indirectly by their hosts condition the foraging behavior of these insects. This knowledge is relevant for a correct interpretation of the foraging behavior of parasitoids and their application in biological control strategies. This thesis aimed to evaluate how chemical and physical stimuli and their manipulation affect the foraging behavior and host selection of the egg parasitoid *Telenomus podisi*, aiming its manipulation in the field. To this end, the thesis was divided into three chapters. In the first chapter, laboratory studies were conducted to evaluate the multimodal relationship between chemical, vibrational, and visual stimuli, related directly and indirectly to its host, on the attractiveness of the parasitoid. The results indicate that the stimuli mentioned above do not act in a multimodal way on the parasitoid behavior. Despite this, the visual stimulus outweighs the other stimuli. Therefore, the parasitoid responds to various stimuli from the environment and host but prefers those more reliable and closer stimuli to the host. In Chapter 2, the hierarchy between the same stimuli evaluated in Chapter 1 and the innate or learned responsiveness of the parasitoid to them was evaluated. In general, *T. podisi* has no innate preference for most stimuli when contrasted against each other. Non-associative learning caused habituation in the parasitoids only for the most reliable stimuli. With this, a new model of the foraging stages of *T. podisi* combining innate and learned behaviors was proposed. In Chapter 3, it was tested how the different stimuli studied in the laboratory could attract the parasitoid and favor egg parasitism in the field. The experiment was conducted in three consecutive fields over two years. The abundance of parasitoids was not affected, in general, by the treatments. However, the parasitism rates were higher in the plots with plant volatiles and pheromone separately. It is

concluded that chemical stimuli favor parasitism in the field and that color only at short distances favors foraging and efficiency of *T. podisi*.

**Key-words:** Natural enemy, conservative biological control, semiochemicals, multimodal stimuli, infochemical avoidance, non-associative learning

## INTRODUÇÃO GERAL

### **Parasitoide de ovos e seus hospedeiros**

Os parasitoides são insetos que utilizam como hospedeiro outro artrópode (Austin et al. 2005; Fatouros et al. 2020), geralmente insetos, para o desenvolvimento dos seus estágios imaturos, e neste processo levam o hospedeiro à morte (Godfray 1994). No caso dos parasitoides de ovos, o estágio imaturo se desenvolve dentro dos ovos do hospedeiro, sendo os himenópteros os principais representantes de parasitoides com esse hábito de vida. Dentro da ordem Hymenoptera, as famílias, Mymaridae, Trichogrammatidae e Scelionidae, o parasitismo dos ovos é a forma de vida predominante na maioria das espécies conhecidas (Austin et al. 2005). A família Scelionidae é composta por parasitoides idiobiontes que parasitam uma diversidade de ordens de insetos, por exemplo, Lepidoptera, Hemiptera e Coleoptera (Austin et al. 2005). Nessa família, existem três subfamílias descritas, Telenominae, Teleasinae, Scelioninae, sendo constituídas exclusivamente por parasitoides de ovos (Austin et al. 2005).

Telenominae contém espécies consideradas importantes agentes de controle biológico de pragas, por exemplo, os parasitoides de ovos *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Scelionidae: Telenominae) (Hoffmann-Campo et al. 2000). Assim como outros parasitoides de ovos, as espécies da subfamília Telenominae ocasionam a morte do hospedeiro seja por efeitos tóxicos de substâncias injetadas pela fêmea durante a oviposição ou pelo próprio crescimento do embrião do parasitoide que consome os nutrientes do hospedeiro (Borges et al. 1999; Corrêa-Ferreira e Panizzi 1999; Parra et al. 2002). *Telenomus podisi* está associado a percevejos predadores e fitófagos da família Pentatomidae, sendo os fitófagos considerados importantes pragas agrícolas (Torres et al. 1997; Panizzi 2013).

Os percevejos Pentatomidae têm distribuição mundial, com aproximadamente 5000 espécies, tanto fitófagas quanto predadoras (McPherson e McPherson, 2000). No Brasil, algumas das espécies fitófagas mais abundantes são: *Euchistus heros* (Fabricius), *Piezodorus guildini* (Westwood) e *Dichelops* spp. (Hoffmann-Campo et al. 2000). Tais espécies, especialmente *E. heros*, são consideradas pragas chave na cultura da soja (Aquino et al. 2019, Bueno et al. 2020), geralmente colonizam a planta entre o final do estágio vegetativo da cultura e início do reprodutivo, intensificando a reprodução juntamente com a formação das vagens (R3) (Corrêa-Ferreira 2005). Ao se alimentarem da seiva e das vagens e sementes, através da perfuração dos tecidos vegetais, adultos e ninfas dos percevejos, reduzem a quantidade ou inviabilizam a qualidade comercial dos grãos (Boethel et al. 2000; Corrêa-Ferreira et al. 2005).

O principal método utilizado para o controle destes insetos praga no Brasil é a aplicação de inseticidas químicos (Panizzi 2013; Bueno et al. 2015). Contudo, há uma série de problemas ambientais e para a saúde humana decorrentes desse uso (Pimentel 1995; Fearnside 2001; Ortega et al. 2005; Benedetti et al. 2013; Costa et al. 2014; Rundlöf et al. 2015). Adicionalmente, o uso indiscriminado destes produtos pode favorecer a seleção de populações resistentes de percevejos (Sosa-Gomez et al. 2001) e afetar negativamente os inimigos naturais (Salerno et al. 2002) que são responsáveis pela mortalidade desses insetos (Hoffmann-Campo et al. 2000).

Uma ferramenta importante para reduzir o uso de inseticidas é o controle biológico. Nesse contexto, o controle biológico se baseia na utilização dos inimigos naturais (predadores, parasitoides e entomopatógenos) para redução da população de pragas a níveis economicamente aceitáveis (Eilenberg et al. 2001). O controle biológico é classificado em quatro tipos diferentes: natural, conservativo, clássico e aumentativo (Eilenberg et al. 2001; Cock et al. 2010). O controle biológico natural é um serviço

ecossistêmico onde os organismos são controlados naturalmente sem nenhuma intervenção humana. O controle biológico conservativo consiste no favorecimento de inimigos naturais que ocorrem naturalmente a partir de práticas humanas. O controle biológico clássico consiste na liberação de um inimigo natural coletado geralmente na área de origem da praga. No controle biológico aumentativo o inimigo natural é produzido massalmente e liberado para o controle da praga (DeBach 1964; Waage e Greathead 1988; Eilenberg et al. 2001; Cock et al. 2010; van Lenteren 2012; van Lenteren et al. 2018). Contudo, é necessário conhecer as interações entre presa-predador e parasitoide-hospedeiros para que o controle seja eficiente, independente da estratégia aplicada. Nesta abordagem, a utilização de semioquímicos e estímulos de natureza física, que modulam o comportamento dos parasitoides, provenientes direta ou indiretamente do hospedeiro pode ser uma estratégia de controle biológico conservativo para incrementar o recrutamento e a eficiência das taxas de parasitismo (Meyhofer e Casas 1999; Conti et al. 2010; Laumann et al. 2011).

### **Comportamento de busca e seleção de hospedeiros de parasitoides**

Os parasitoides de ovos desenvolveram, ao longo de sua evolução, diversas estratégias comportamentais que os favoreceram durante o processo de busca e seleção por hospedeiros (Vinson 1984). Em geral, estes processos incluem uma sequência de comportamentos definidos como: localização do habitat, localização do hospedeiro, aceitação do hospedeiro, adequabilidade e regulação do hospedeiro (Vinson e Iwantsch 1980; Vinson 1984, 1998; van Alphen e Vet 1986; Steidle e van Loon 2002). A localização dos hospedeiros está diretamente relacionada a estímulos físicos e químicos encontrados no ambiente (Vinson 1975, 1984). Estes estímulos devem fornecer ao parasitoide confiabilidade, indicando a localização e as características do hospedeiro

(incluindo a identidade taxonômica), e detectabilidade, maximizando a detecção do mesmo (Vet e Dicke 1992).

Os parasitoides de ovos são animais diminutos, e seus hospedeiros são recursos finitos, inconspícuos e distribuídos em ambientes bastante heterogêneos e de difícil acesso (Fatouros et al. 2008). Dessa forma, esses insetos se especializaram para obter informação do ambiente direta ou indiretamente relacionada aos seus hospedeiros. Essa informação é obtida, principalmente, na forma de estímulos químicos. As substâncias químicas envolvidas na interação entre os organismos vivos se denominam semioquímicos (Law e Regnier 1971), sendo o termo subdividido em dois grandes grupos, os aleloquímicos e os feromônios. O primeiro é relacionado à interação química interespecífica e o segundo relacionado à comunicação química intraespecífica (Nordlund e Lewis 1976).

De acordo com Nordlund e Lewis (1976), os aleloquímicos são divididos em três subcategorias: alomônios, cairomônios e sinomônios. Cada subcategoria define qual dos indivíduos envolvidos na interação química é beneficiado ou prejudicado na interação intermediada pelos semioquímicos. Dessa forma, os alomônios são os semioquímicos envolvidos na interação favorável ao emissor e prejudicial ao receptor, os cairomônios são favoráveis aos receptores e prejudiciais aos emissores e os sinomônios são favoráveis tanto ao emissor quanto ao receptor (Dicke e Sabelis 1988). Por exemplo, muitas plantas liberam compostos voláteis quando estão em contato ou sofrem injúria alimentar por insetos fitófagos. Esses compostos químicos podem ser utilizados por predadores ou parasitoides desses insetos, dessa forma esses sinomônios são favoráveis aos emissores e receptores do sinal químico (Colazza et al. 2004).

A utilização de diferentes fontes de estímulos para manipular as ações dos parasitoides de ovos em laboratório e campo pode ser fundamental para a eficiência do

controle biológico de pragas (Hassell 2000; Mills e Wajnberg 2008). Em campo, os estímulos químicos e físicos podem favorecer o aumento das taxas de parasitismo, atraindo e/ou retendo os inimigos naturais em uma área de interesse (Kaplan 2012; Ayelo et al. 2021). Em laboratório, esses mecanismos de atração e retenção, podem ser estudados em menor escala e sem interferências, favorecendo a compreensão de modelos teóricos e aspectos básicos do comportamento dos insetos.

### **Estímulos relacionados ao comportamento de busca de hospedeiros por parasitoides de ovos de percevejos**

Em relação aos parasitoides de percevejos tem-se determinado que voláteis induzidos pela herbivoria de ninfas e adultos de percevejos induzem a produção e liberação em diversas plantas, como a soja, feijão, feijão guandu, milho, arroz e girassol um complexo de voláteis que atraem o parasitoide *T. podisi* (Moraes et al. 2008; Melo Machado et al. 2014; Dias et al. 2016). Estes compostos, conhecidos como voláteis induzidos por herbivoria (VPIHs) atuam como sinomônios, sendo parte importante das defesas contra herbívoros nas plantas e relevantes como pistas para orientar o parasitoide enquanto procura por hospedeiros. Outra fonte de semioquímicos com potencial para modificar os padrões de comportamento dos parasitoides de ovos Telenominae são os cairomônios voláteis produzidos pelos próprios hospedeiros. Neste sentido, voláteis dos percevejos como feromônios sexuais (Borges et al. 1998; Colazza et al. 1999; Conti et al. 2003) e compostos com função defensiva produzidos nas glândulas metatorácicas nos adultos e nas glândulas abdominais dorsais nas ninfas (Mattiacci et al. 1993; Laumann et al. 2009) são muito atrativos a esses parasitoides.

Os VPIHs e os cairomônios auxiliam o parasitoide na localização do habitat do hospedeiro. Uma vez no habitat do hospedeiro, os parasitoides Telenominae utilizam

estímulos químicos (voláteis ou não) e físicos para localizar o hospedeiro. As informações em relação ao uso de estímulos nesta etapa de forrageamento dos Telenominae ainda são escassas e fragmentadas. Mas sabe-se que são importantes nesse processo os cairomônios dos rastros do hospedeiro ("footprints"), constituídos de hidrocarbonetos cuticulares depositados nos substratos quando os insetos se locomovem (Colazza 1999; 2009; Borges et al. 2003; Lagôa et al. 2020), assim como, semioquímicos voláteis dos ovos do hospedeiro (Tognon et al. 2020). Estímulos físicos como sinais vibratórios emitidos durante a comunicação sexual dos percevejos, e cores do substrato e dos ovos, também tem efeito comprovado no comportamento de busca de hospedeiros por parasitoides (Laumann et al. 2011; Aquino et al. 2012). Entre esses estímulos a cor amarela é um superestímulo para *T. podisi*, possivelmente, por estar relacionada à cor do recurso alimentar e dos ovos dos hospedeiros (Aquino et al. 2011).

### **Atividade multimodal e hierarquia entre os estímulos**

A ecologia comportamental dos parasitoides da subfamília Telenominae, especialmente os mecanismos de busca e seleção de hospedeiros, ainda é pouco conhecida, havendo informações de aspectos isolados dentro das diferentes etapas de forrageamento e, em muitos casos, sem uma determinação precisa dos estímulos envolvidos nos comportamentos. Por exemplo, pouco se sabe da possível relação multimodal entre diferentes estímulos (químicos e físicos) e sua influência no comportamento dos parasitoides de ovos. Considerando-se que os ambientes naturais ou agrícolas onde os parasitoides de ovos e seus hospedeiros interagem são altamente heterogêneos, e que os estímulos possivelmente estão presentes simultaneamente, é necessário avaliar se há interação multimodal e como ela ocorre e interfere o forrageamento desses inimigos naturais.

Assim, a utilização de estímulos multimodais, que são compostos por mais de um sinal em mais de uma modalidade sensorial, pode contribuir para reduzir a incerteza ambiental (Partan e Marler 1999, 2005; Dall e Johnstone 2002; Hebets e Papaj 2005; Munoz e Blumstein 2012). Existem duas modalidades de estímulos multimodais, os **redundantes** e os **não redundantes**. Na primeira modalidade, o tipo de resposta do receptor para cada componente da combinação é a mesma, mas a resposta para os componentes combinados pode variar. A resposta é denominada **equivalente** quando a resposta à combinação dos estímulos é semelhante à observada para cada componente isoladamente. Também, a resposta pode ser **aprimorada**, quando a resposta à combinação de estímulos é maior e mais evidente (Partan e Marler 1999). Por fim, a resposta pode ser **divergente**, quando a resposta é distinta ao observado para cada componente (Munoz e Blumstein 2012) (Figura 1). Em relação aos estímulos multimodais não redundantes, sabe-se que cada componente do sinal multimodal incita uma resposta diferente no receptor (Partan e Marler 1999) (Figura 1). Nesse caso, quando os estímulos são combinados podem atuar de forma **independente** um do outro, também podem causar a **dominância** de um dos estímulos em relação ao outro, podem **modular** um estímulo em detrimento de outro, e por fim, pode haver uma resposta **emergente**, completamente distinta da esperada e observada para cada componente (Partan e Marler 1999) (Figura 1).

COMPONENTES SEPARADOS			SINAL COMPOSTO MULTIMODAL		
	Sinal	Resposta	Sinal	Resposta	
Redundante	A	→ □	A + B	→ □	Equivalente
	B	→ □	A + B	→ □	Aprimoramento
			A + B	→ ☆	Divergente
Não redundante	A	→ □	A + B	→ □ e ○	Independente
	B	→ ○	A + B	→ □	Dominante
			A + B	→ □ (ou □)	Modulante
			A + B	→ △	Emergente

**Figura 1.** Diagrama das diferentes modalidades dos estímulos multimodais. Adaptado de Munoz e Blumstein (2012) e Partan e Marler (1999).

Sabe-se que os estímulos são percebidos pelos parasitoides de forma inata, e que também são capazes de aprender a reconhecer e a relacionar estímulos à presença do hospedeiro através de experiência prévia (Vinson 1998). Esses estímulos podem atuar na taxia, ou seja, orientando os parasitoides à fonte do estímulo, ou de forma quinética, intensificando o seu padrão de movimento de busca pelo hospedeiro (Vilella e Della Lucia 2001). Portanto, para auxiliar o parasitoide na busca e localização, os estímulos devem indicar com precisão a localização e as características do hospedeiro (Vet e Dicke 1992). De acordo com o modelo teórico de Laumann et al. (2011), para *T. podisi*, os parasitoides seguem uma sequência hierárquica dos estímulos para localizar o hospedeiro em campo. Teoricamente, os primeiros estímulos usados são voláteis induzidos por herbivoria (VPIH), que se dispersam por uma área maior, seguido pelos feromônios do hospedeiro, os quais atuam como cairomônios. Esses compostos atuariam a longas distâncias atraindo o inimigo natural para a área. Em sequência, quando no habitat do hospedeiro, os parasitoides se guiariam pelos estímulos vibratórios provenientes da comunicação sexual

dos percevejos, pelos rastros químicos e por fim pela cor e outras características dos ovos. Esses estímulos encontrados no habitat do hospedeiro atuam retendo o inimigo natural na área e aumentariam a taxa de parasitismo.

### **Aplicabilidade do controle biológico de percevejos com parasitoides de ovos**

O manejo integrado de pragas (MIP) é um método que tem como finalidade racionalizar o uso de inseticidas ou acaricidas, prevenir ou retardar o ressurgimento de populações de pragas resistentes e preservar os insetos benéficos (Alastair 2003). Dentre as ferramentas de manejo utilizadas no MIP, o controle biológico tem mostrado boa aplicabilidade e eficiência no manejo de pragas em diferentes culturas em diversos países (van Lenteren et al. 2018). No Brasil Corrêa-Ferreira e Moscardi (1996) mostraram que liberações inoculativas sazonais de *Tissolcus basalis* (Wollaston) (Hymenoptera: Scelionidae) foram eficientes no controle do percevejo verde *N. viridula*. De forma similar, liberações de *T. podisi* propiciaram índices de parasitismo em ovos do percevejo marrom, *E. heros*, entre 50 a 70 % (Bueno et al 2020).

Contudo, a dificuldade na produção dos parasitoides de ovos de percevejos pentatomídeos, para os quais ainda não é disponível uma dieta artificial, tem dificultado a extensão destes programas no Brasil. No entanto, o manejo comportamental destes inimigos naturais com semioquímicos e estímulos físicos, bem como a manipulação da paisagem agrícola como uma ferramenta para incrementar o controle biológico conservativo, pode ser uma ação relevante para estimular o avanço deste e outros programas de controle biológico de percevejos (Borges et al. 2011). Estudos anteriores verificaram que o cairomônio (*E*)-2-hexenal, componente do feromônio de alarme dos percevejos, atraiu parasitoides de ovos para a área estudada (Laumann et al. 2009; Vieira et al. 2014). O mesmo resultado foi observado para o fitormônio indutor de defesa *cis*-

jasmona, porém, não foi observado o aumento das taxas de parasitismo de ovos de percevejo nem influência sobre a população de hospedeiros em campo em ambos os tratamentos (Vieira et al. 2013).

A partir desses estudos junto com a proposição de estratégias alternativas para uso dos semioquímicos e demais estímulos atrativos aos parasitoides, o desenvolvimento de novas pesquisas orientadas a estabelecer quais são os compostos com maior potencial, as formas mais eficientes de aplicação e técnicas de uso, são fundamentais para futura aplicação no MIP e aumentar a eficiência do controle biológico de pragas (Hassell 2000; Mills e Wajnberg 2008). Em laboratório, esses mecanismos de atração e retenção, podem ser estudados em menor escala e sem interferências, favorecendo a compreensão de modelos teóricos e aspectos básicos do comportamento dos insetos. Em campo, os estímulos químicos e físicos podem favorecer o aumento das taxas de parasitismo, atraindo e/ou retendo os inimigos naturais em uma área de interesse (Blassioli-Moraes et al. 2016; Vieira et al. 2013, 2014).

Portanto, esta tese de doutorado visa avançar nos conhecimentos a respeito da ecologia comportamental dos parasitoides de ovos *T. podisi*. O trabalho se orientou ao estudo da interação multimodal entre diferentes estímulos visando estabelecer os mecanismos e estratégias de uso pelos parasitoides. Uma vez identificados os principais estímulos e mecanismos de resposta utilizados pelos parasitoides, a etapa seguinte foi compreender como estes estímulos/comportamentos se integram num contexto mais amplo que inclui variações de resposta individuais e populacionais. Finalmente os conhecimentos adquiridos permitiram identificar os estímulos com maior potencial de uso em campo. Dessa forma, esta tese se estruturou em três capítulos, onde no primeiro foi avaliada a interação multimodal dos estímulos físicos e químicos e a resposta comportamental de *T. podisi* em condições de laboratório. No segundo capítulo foi

testado o modelo teórico de Laumann et al. (2011) e a resposta inata e aprendida dos parasitoides em relação a hierarquia dos estímulos. Por fim, no terceiro capítulo foi avaliada a utilização de estímulos multimodais na atratividade e retenção dos inimigos naturais em condições de campo, bem como as taxas de parasitismo de ovos de percevejos e o impacto na população desta praga.

A estrutura dos capítulos se apresenta em formato de artigo científico seguindo as normas de instrução aos autores da revista *Neotropical Entomology* disponíveis em <https://www.springer.com/journal/13744/submission-guidelines>.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aquino MSF, Dias AM, Borges M, Blassioli-Moraes MC, Laumann RA (2012) Influence of visual cues on host-searching and learning behaviour of the egg parasitoids *Telenomus podisi* and *Trissolcus basalis*. *Entomol Exp Appl* 145:162–174.
- Aquino MFS, Sujii ER, Borges M, Blassioli Moraes MC, Laumann RA (2019) Diversity of stink bug adults and their parasitoids in soybean crops in Brazil: influence of a latitudinal gradient and insecticide application intensity. *Environ Entomol* 48:105–113.
- Alastair O (2003) Integrated Pest Management for Resource-Poor African Farmers: Is the Emperor Naked? *World Develop* 31:831–845.
- Austin AD, Johnson NF, Downton M (2005) Systematics, evolution, and biology of scelionid and platygastriid wasps. *Annu Rev Entomol* 50:553–582.
- Ayelo PM, Pirk CWW, Yusuf AA, Chailleux A, Mohamed SA, Deletre E (2021) Exploring the Kairomone-Based Foraging Behaviour of Natural Enemies to Enhance Biological Control: A Review. *Front Ecol Evol* 9:641–974.
- Benedetti D, Nunesa E, Sarmiento M, Porto C, Santos CEI, Dias JF, Silva J (2013) Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: Evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays. *Mutat Res* 52:28–33.
- Blassioli-Moraes MC, Borges M, Michereff MFF, Magalhães MFF, Laumann RA (2016) Semiochemicals from plants and insects on the foraging behavior of Platygastriidae egg parasitoids. *Pesqui Agropecu Bras* 51:454–464.
- Boethel DJ; Russin JS; Wier AT; Layton MB, Mink JS, Boyd ML (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 KR, Moraes MCB, Aldrich JR (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 MLM, Sujii ER, Cavalcanti MG, Redígolo GF, Resck IS, Vilela EF (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, Moraes MCB, Laumann RA, Pareja M, Silva CC, Michereff MFF, Paula DB (2011) Chemical ecology studies in soybean crop in Brazil and their application to pest management. In: Ng T-B (ed) *Soybean-biochemistry, chemistry and physiology*. InTech Publishing, Rijeka, pp 31–p66.
- Borges M, Schmidt FGV, Sujii ER, Medeiros MA, Mori K, Zarbin PHG, Ferreira JTB (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.
- Bueno AF, Bortolotto OC, Pomari-Fernandes A, França-Neto JB (2015) Assessment of a more conservative stink bug economic threshold for managing stink bugs in Brazilian soybean production. *Crop Prot* 71:132–137.
- Bueno AF, Braz ÉC, Favetti BM, França-Neto JB, Silva GV (2020) Release of the egg parasitoid *Telenomus podisi* to manage the Neotropical Brown Stink Bug, *Euschistus heros*, in soybean production. *Crop Prot* 137:1–7.
- Cock MJW, van Lenteren JC, Brodeur J, Barratt BIP, Bigler F, Bolckmans K, Cònsoli FL, Haas F, Mason PG, Parra JRP (2010) Do new access and benefit sharing procedures under the convention on biological diversity threaten the future of biological control? *BioControl* 55:199–218.
- Colazza S, Salerno G, Wajnberg E (1999) Volatile and contact chemicals released by *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae) have a kairomonal effect on the egg parasitoid *Trissolcus basalus* (Hymenoptera: Scelionidae). *Biol Cont* 16:310–317.
- Colazza S, Fucarino A, Peri E, Salerno G, Conti E, Bin F (2004) Insect oviposition induces volatile emission in herbaceous plants that attracts egg parasitoids. *The J of Expe Biol* 207:47–53.
- Conti E, Salerno G, Bin F, Williams HJ, Vinson SB (2003) Chemical cues from *Murgantia histrionica* eliciting host location and recognition in the egg parasitoid *Trissolcus brochymenae*. *J Chem Ecol* 29:115–130.
- Conti E, Salerno G, Leombruni B, Frati F, Bin F (2010) Short-range allelochemicals from a plant-herbivore association: a singular case of oviposition-induced synomone for an egg parasitoid. *J Exp Biol* 213:3911–3919.
- Corrêa-Ferreira BS (2005) Suscetibilidade da soja a percevejos na fase anterior ao desenvolvimento das vagens. *Pesqui Agropec Bras* 40:1067–1072.
- Corrêa-Ferreira BS e Moscardi F (1996) Biological control of soybean stink bugs by inoculative releases of *Trissolcus basalus*. *Entomol Exp et Applic.* 79:1–7.
- Corrêa-Ferreira BS e Panizzi AR (1999) Percevejos da soja e seu manejo. *Embrapa-CNPSO.* 24:01–45.

- Costa EMC, Araujo EL, Maia AVP, Silva FEL, Bezerra CES, Silva JG (2014) Toxicity of insecticides used in the Brazilian melon crop to the honey bee *Apis mellifera* under laboratory conditions. *Apidol.* 45:34–44.
- Dall SRX, Johnstone RA (2002) Managing uncertainty: Information and insurance under the risk of starvation. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 357:1519–1526.
- DeBach P (1964) Biological control of insect pests and weeds. Reinhold, New York.
- Dias AM, Pareja M, Laia M, Blassioli-Moraes MC, Borges M, Laumann RA (2016) Attraction of *Telenomus podisi* to volatiles induced by *Euschistus heros* in three different plant species. *Arthropod Plant Interact* 10:419–428.
- Dicke M e Sabelis MW (1988) Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds. *Function Ecol* 2:131-139.
- Eilenberg J, Hajek A, Lomer C (2001) Suggestions for unifying the terminology. *BioControl* 46:387–400
- Fatouros NE, Cusumano A, Bin F, Polaszek A, van Lenteren JC (2020) How to escape from insect egg parasitoids: A review of potential factors explaining parasitoid absence across the Insecta. *Proc R Soc B* 287:20200344.
- Fatouros NE, Dicke M, Mumm R, Meiners T, Hilker M (2008) Foraging behavior of egg parasitoids exploiting chemical information. *Behav Ecol* 19:677–689.
- Fearnside PM (2001) Soybean cultivation as a threat to the environment in Brazil. *Environ Conserv* 28:23–38.
- Godfray HCJ (1994) Parasitoids, behavioural and evolutionary ecology. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. pp.473.
- Hassel MP (2000) Host-parasitoid population dynamics. *J Anim Ecol* 69:543–566.
- Hebets EA, Papaj DR (2005) Complex signal function: Developing a framework of testable hypotheses. *Behav Ecol Sociobiol* 57:197–214.
- Hoffmann-Campo CB, Moscardi F, Corrêa-Ferreira BS, Oliveira LJ, Sosa-Gómez DR, Panizzi AR, Corso IC, Gazzoni DL, Oliveira EB (2000) Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado. *Embrapa Soja.* 30:01–69.
- Kaplan I (2012) Attracting carnivorous arthropods with plant volatiles: the future of biocontrol or playing with fire? *Biol Control* 60:77–89.
- Lagôa ACG, Blassioli Moraes MC, Borges M, Laumann RA (2020) Selective responses of *Trissolcus basal* and *Telenomus podisi* to chemical footprints of preferred hosts. *Physiol Entomol* 45:60–71.
- Laumann RA, Aquino MFS, Moraes MCB, Pareja M, Borges M (2009) Response of the Egg Parasitoids *Trissolcus basal* and *Telenomus podisi* to Compounds from Defensive Secretions of Stink Bugs. *J Chem Ecol* 35:8–19.
- Laumann RA, Čokl A, Lopes APS, Ferreira JBC, Moraes MCB, Borges M (2011) Silent singers are not safe: Selective response of a parasitoid to substrate-borne vibratory signals of stink bugs. *Anim Behav* 82:1175–1183.
- Law JH, Regnier FE (1971) Pheromones. *Annu Rev Bio* 40:533-48.

- Mattiacci L, Vinson SB, Williams HJ; Aldrich JR; Bin F (1993) A long-range attractant kairomone for egg parasitoid *Trissolcus basalis*, isolated from defensive secretion of its host, *Nezara viridula*. *J Chem Ecol* 19:1167–1181.
- McPherson JE e McPherson RM (2000) Stink bugs of economic importance in America north of Mexico. CRC Press LLC, Boca Raton. pp.253.
- Melo-Machado RC, Sant'Ana J, Blassioli-Moraes MC, Laumann RA, Borges M (2014) Herbivory-induced plant volatiles from *Oryza sativa* and their influence on chemotaxis behaviour of *Tibraca limbativentris* Stal. (Hemiptera: Pentatomidae) and egg parasitoids. *Bul Entomol Res* 104:347–356.
- Meyhofer R e Casas J (1999) Vibratory stimuli in host location by parasitic wasps. *J. Insect Physiol* 45:967–971.
- Mills NJ e Wajnberg E (2008) Optimal foraging behavior and efficient biological control methods. In: Wajnberg E, Bernstein C, van Alphen JJM. Behavioural ecology of insect parasitoid. Blackwell Publishing, Oxford. pp.3–30.
- Moraes MCB, Pareja M, Laumann RA, Hoffmann-Campo CB, Borges M (2008) Response of the parasitoid *Telenomus podisi* to induced volatiles from soybean damaged by stink bug herbivory and oviposition. *J Plant Interact* 3:111–118.
- Munoz NE, Blumstein DT (2012) Multisensory perception in uncertain environments. *Behav Ecol* 23:457–462.
- Nordlund A e Lewis WJ (1976) Terminology of chemical-releasing stimuli in intra-specific and interspecific interactions. *J Chem Ecol* 2:211–220.
- Ortega E, Cavalett O, Bonifácio R, Watanabe M (2005) Brazilian soybean production: emergy analysis with an expanded scope. *Bul Sci Tech Soc* 25:323–334.
- Panizzi AR (2013) History and contemporary perspectives of the integrated pest management of soybean in Brazil. *Neotrop Entomol* 42:119–127.
- Parra JRP (2002) Criação massal de inimigos naturais. In: Parra JRP. Controle Biológico no Brasil – Parasitóides e Predadores. Editora Manole, São Paulo. pp143–161.
- Partan S, Marler P (1999) Communication goes multimodal. *Science* 283:1272–1273.
- Partan SR, Marler P (2005) Issues in the classification of multimodal communication signals. *Am Nat* 166:231–245.
- Pimentel D (1995) Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. *J Agr Environ Ethic* 8:17–29.
- Rundlöf M, Andersson GKS, Bommarco R, Fries I, Hederström V, Herbertsson L, Jonsson O, Klatt BK, Pedersen TR, Yourstone J, Smith HG (2015) Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. *Nature* 521:77–80.
- Salerno G, Colazza S, Conti E (2002) Sub-lethal effects of deltamethrin on walking behaviour and response to host kairomone of the egg parasitoid *Trissolcus basalis*. *Pest Manag Sci* 58:663–668.
- Sosa-Gómez DR, Corso IC, Morales M (2001) Insecticide Resistance to Endosulfan, Monocrotophos and Metamidophos in the Neotropical Brown Stink Bug, *Euschistus heros* (F.). *Neotrop Entomol* 30:317–320.
- Steidle JLM, van Loon JJA (2002) Chemoecology of parasitoid and predator oviposition behaviour. In: Hilker M, Meiners T (eds) Chemoecology of Insect Eggs and Egg

- Deposition. Blackwell, Berlin, pp 291–318.
- Tognon R, Santana J, Michereff MFF, Laumann RA, Borges M, Blassioli-Moraes MC, Redaelli LR (2020) Kairomones from *Euschistus heros* egg masses and their potential use for *Telenomus podisi* parasitism improvement. *Bull Entomol Res* 110:638–644.
- Torres JB, Pratisoli D, Zanuncio JC (1997) Exigências Térmicas e Potencial de Desenvolvimento dos Parasitoides *Telenomus podisi* Ashmead e *Trissolcus brochymenae* (Ashmead) em ovos do Percevejo Predador *Podisus nigrispinus* (Dallas). *An Soc Entomol Bras* 26:445–453.
- van Alphen JJM, Vet LEM (1986) An evolutionary approach to host finding and selection. In: Waage JK, Greathead DJ (eds) *Insect parasitoids*. Academic Press, pp 23–61.
- van Lenteren JC (2012) The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. *BioControl* 57:1–20.
- van Lenteren JC, Bolckmans K, Köhl J, Ravensberg WJ, Urbaneja A (2018) Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl* 63:39–59.
- Vet LEM, Dicke M (1992) Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annu Rev Entomol* 37: 141–172.
- Vieira CR, Blassioli-Moraes MC, Borges M, Pires CSS, Sujii ER, Laumann RA (2014) Field evaluation of (*E*)-2-hexenal efficacy for behavioral manipulation of egg parasitoids in soybean. *BioControl* 59:525–537.
- Vieira CR, Blassioli-Moraes MC, Borges M, Sujii ER, Laumann RA (2013) *cis*-Jasmone indirect action on egg parasitoids (Hymenoptera: Scelionidae) and its application in biological control of soybean stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae). *BioControl* 64:75–82.
- Vilella EF e Della Lucia TMC (2001) Feromônios de insetos – Biologia, química e aplicação. Holos Editora. pp206.
- Vinson SB (1975) Biochemical coevolution between parasitoids and their hosts. In: Price PW. *Evolutionary Strategies of Parasitic Insects and Mites*. Springer US. pp14–48.
- Vinson SB (1984) Parasitoid–host relationships. In: Bell WJ, Cardé RT (eds) *Chemical Ecology of Insects*. Chapman and Hall, London, pp205–233.
- Vinson SB (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.
- Vinson SB, Iwantsch GF (1980) Host Regulation by Insect Parasitoids. *Q Rev Biol* 55:143–165.
- Waage JK, Greathead DJ (1988) Biological control: challenges and opportunities. *Phil Trans R Soc Lond B* 318:111–128

## CAPÍTULO 1

### Respostas comportamentais de *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae) a estímulos multimodais

#### INTRODUÇÃO

Várias estratégias comportamentais evoluíram nos parasitoides tornando o processo de busca e seleção de hospedeiros mais eficiente (Vinson 1976). Em geral, esses processos incluem uma sequência de comportamentos definidos como: localização do habitat, localização do hospedeiro, aceitação do hospedeiro, adequação e regulação do hospedeiro (Vinson e Iwantsch 1980; van Alphen e Vet 1986; Vinson 1998; Steidle e van Loon 2002). Além disso, cada uma das etapas de busca e seleção de hospedeiros é condicionada por diferentes estímulos que fornecem informações em relação ao habitat ou hospedeiros (Price et al. 1980). Dessa forma, os parasitoides são guiados por estímulos físicos e químicos originados direta e indiretamente dos hospedeiros, mas também por estímulos do ambiente (Vinson 1975, 1984; van Alphen e Vet 1986). Os sinais utilizados pelo parasitoide devem ser confiáveis, indicando a localização e características do hospedeiro, e de alta detectabilidade, maximizando e facilitando sua detecção (Vet e Dicke 1992). No entanto, quanto mais detectável é um estímulo, menos confiável é, da mesma forma, quanto mais confiável é um estímulo menos detectável é no ambiente (Vet et al. 1990, 1995; Vet e Dick 1992). Portanto, as fêmeas de parasitoides utilizam informações provenientes de estímulos detectáveis e confiáveis para encontrar o hospedeiro de forma mais eficiente (van Alphen e Vet 1986; Vet et al. 1990, 1995; Vet e Dick 1992).

O comportamento de busca e seleção de hospedeiros dos parasitoides de ovos da subfamília Telenominae (Scelionidae), os quais parasitam ovos de percevejos, é relativamente bem conhecido com alguns estímulos identificados e associados a comportamentos específicos. A longa distância, os voláteis de plantas induzidos pela herbivoria de ninfas e adultos de percevejos atraem diferentes espécies de parasitoides Scelionidae (Colazza et al. 2004; Moraes et al. 2008; Michereff et al. 2011; Melo Machado et al. 2014; Dias et al. 2016). Além desses, os parasitoides de ovos utilizam os voláteis (caimônios) produzidos pelos próprios hospedeiros, como os feromônios sexuais (Borges et al. 1998b; Colazza et al. 1999; Conti et al. 2003) e compostos defensivos (Mattiacci et al. 1993; Laumann et al. 2009).

Uma vez no habitat do hospedeiro, os Telenominae usam semioquímicos voláteis e não voláteis (de contato), e estímulos físicos para localizar o hospedeiro. O maior volume de trabalhos realizados é sobre os semioquímicos de contato, como os rastros do hospedeiro (Colazza et al. 1999; Borges et al. 2003; Lagôa et al. 2020). Entretanto, estudos mostraram que estímulos físicos, como sinais vibratórios emitidos durante o comportamento reprodutivo de percevejos (Laumann et al. 2007, 2011), ou cores do substrato e ovos (Aquino et al. 2012) e voláteis dos ovos (Tognon et al. 2020) tem um efeito atrativo e arrestante comprovado no comportamento de busca desses parasitoides. Embora esse conhecimento descreva vários estímulos com efeitos táxicos ou quinéticos para os parasitoides (Laumann et al. 2011), os mecanismos de busca e seleção de hospedeiros, ainda não estão totalmente elucidados. Por exemplo, pouco se sabe sobre uma possível relação entre diferentes estímulos químicos e físicos, como essa informação se integra no cérebro do inseto, e de que forma condiciona o comportamento dos parasitoides.

Considerando que os ambientes naturais ou agrícolas, onde os parasitoides de ovos interagem com seus hospedeiros, são altamente heterogêneos e que os estímulos possivelmente estão presentes simultaneamente, e não de forma isolada, como usualmente se apresentam nos modelos experimentais (Partan e Marler 1999; Lim e Ben-Yakir 2020), é necessário avaliar essa possível interação de estímulos multimodais e a forma como as mesmas influenciam o comportamento dos parasitoides.

O forrageamento em ambientes naturais e agrícolas expõe os parasitoides à complexidade de estímulos, onde aqueles que fornecem informação se misturam com outros que podem ser considerados ruído ambiental. Assim, a utilização de estímulos multimodais, os quais são constituídos por sinais em mais de uma modalidade sensorial, pode contribuir para reduzir o grau de incerteza e dos ruídos ambientais (Partan e Marler 1999, 2005; Dall e Johnstone 2002; Hebets e Papaj 2005; Munoz e Blumstein 2012). Especialmente para parasitoides, parece ser uma estratégia fundamental na busca e seleção de hospedeiros a curtas distâncias (Aartsma et al. 2019).

Nos insetos parasitoides, que exploram recursos finitos e esporádicos, a alocação do tempo de forrageamento, seja para procura de hospedeiros ou de fontes de nutrientes, exige um balanço que pode condicionar o fitness imediato (deixar descendência) dos indivíduos (Vet et al. 1990; Lobdell et al. 2005). Nesse sentido, a plasticidade de resposta a estímulos, incluindo os multimodais, pode ser um fator determinante e tem sido considerada para propor um modelo de resposta onde cada estímulo percebido por um parasitoide possui um potencial de resposta característico e que esta resposta inata pode ser alterada pela experiência do inseto (Vet et al. 1995).

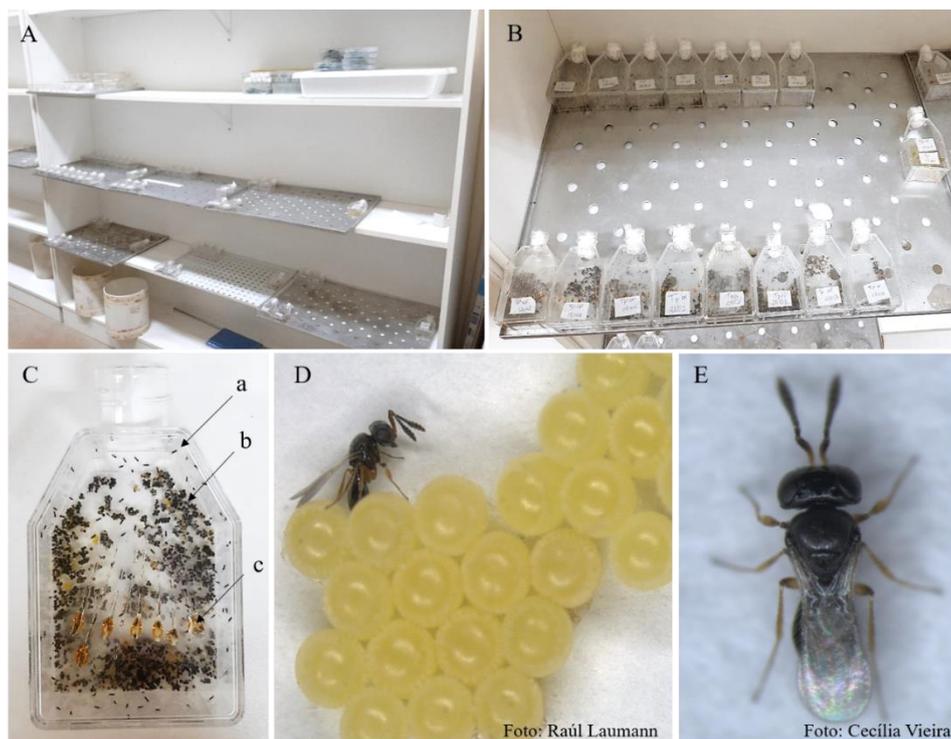
Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar, em condições controladas de laboratório, o comportamento de fêmeas do parasitoide de ovos *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Scelionidae) em resposta à diferentes combinações de estímulos

químicos, visuais e vibratórios. Portanto, para avaliar a eficiência e o incremento no comportamento de busca através do uso de sinais multimodais, foi proposta a hipótese de que havendo atração multimodal, a resposta é aumentada com a combinação de estímulos químicos, físicos e visuais.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### **Criação e manutenção dos insetos**

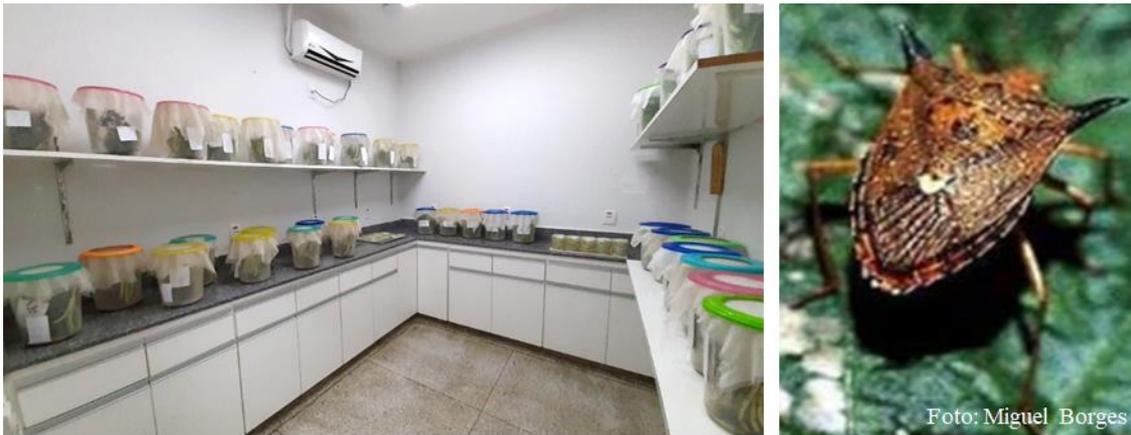
Os insetos foram obtidos de colônias previamente estabelecidas no Laboratório de Semioquímicos da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brasil, mantidos em sala climatizada, sob as condições de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $65 \pm 10\%$  UR e 14 horas de fotofase (Figuras 1, 2). Os parasitoides adultos foram alimentados com mel de abelhas puro e mantidos em gaiolas plásticas (frascos de cultura para tecidos de  $25\text{ cm}^3$ ; Biomedicals<sup>®</sup> ICN; MP Biomedicals, Irvine, Califórnia) (Figura 1). Ovos de *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae) (< 24 h) foram usados como hospedeiros e oferecidos às fêmeas acasaladas do parasitoide por um período de 24 horas para oviposição (Figura 1). Ovos parasitados foram mantidos nas mesmas condições ambientais, e as fêmeas recém-emergidas foram divididas em dois grupos: um grupo foi utilizado para a manutenção da colônia e o outro grupo foi utilizado nos bioensaios. Todas as fêmeas de *T. podisi* usadas nos bioensaios tinham idade entre 24 e 48 horas, estavam alimentadas e acasaladas, porém sem experiência de oviposição.



**Figura 1.** (A) criação de parasitoides em sala climatizada. (B) vista geral das gaiolas de *Telenomus podisi*. (C) gaiola contendo (a) parasitoides recém-emergidos, (b) ovos de *Euschistus heros* parasitados, (c) dieta a base de mel. (D) *Telenomus podisi* parasitando uma postura de *E. heros*. (E) fêmea de *T. podisi*.

O percevejo-marrom, *E. heros*, foi criado em recipientes plásticos de 8,0 l (gaiolas) com dieta natural a base de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L. [Asteraceae]), amendoim cru (*Arachis hypogaea* L. [Fabaceae]), soja (*Glycine max* L. [Fabaceae]), vagens verdes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L. [Fabaceae]) e buquês de boldo (*Plectranthus barbatus* Andrews [Lamiaceae]) colocados em potes com vermiculita hidratada. As gaiolas foram limpas e o alimento trocado três vezes por semana. No interior das gaiolas foram colocadas tiras de telas de voile (4 x 12 cm) como superfície de oviposição. Diariamente os ovos dos percevejos foram coletados do interior das gaiolas e separados, uma parte para a manutenção da criação de percevejos e outra parte para a manutenção da criação de parasitoides. Após a última muda, os adultos de *E.*

*heros* foram separados por sexo e mantidos em recipientes isolados. Fêmeas virgens de percevejos foram usadas nos experimentos com rastros químicos quando atingiram a maturidade sexual (10-12 dias na idade adulta) (Costa et al. 1998). Os parasitoides e percevejos foram mantidos em salas separadas.

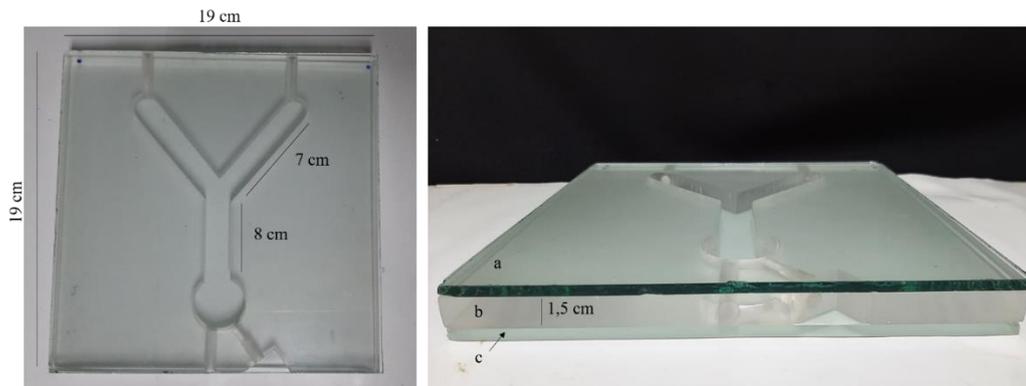


**Figura 2.** Criação de *Euschistus heros* em sala climatizada. Vista geral das gaiolas de adultos e ninfas. Adulto de *E. heros*.

## Bioensaios

### *Arenas experimentais e tratamentos*

Para avaliar o efeito de diferentes estímulos de forma individual ou combinada foram utilizadas arenas de dupla escolha formadas por um bloco quadrado de acrílico (19 x 19 cm) com uma cavidade em forma de Y (1 cm altura x 1.5 cm largura) (Figura 3). Essa cavidade foi fechada utilizando-se duas placas de vidro de 0,4 mm colocadas por cima e abaixo do bloco de acrílico (Figura 3). O tronco do Y mede 8,0 cm e cada braço mede 7 cm de comprimento. Esta arena foi adaptada para receber os diferentes tratamentos utilizados nos bioensaios.



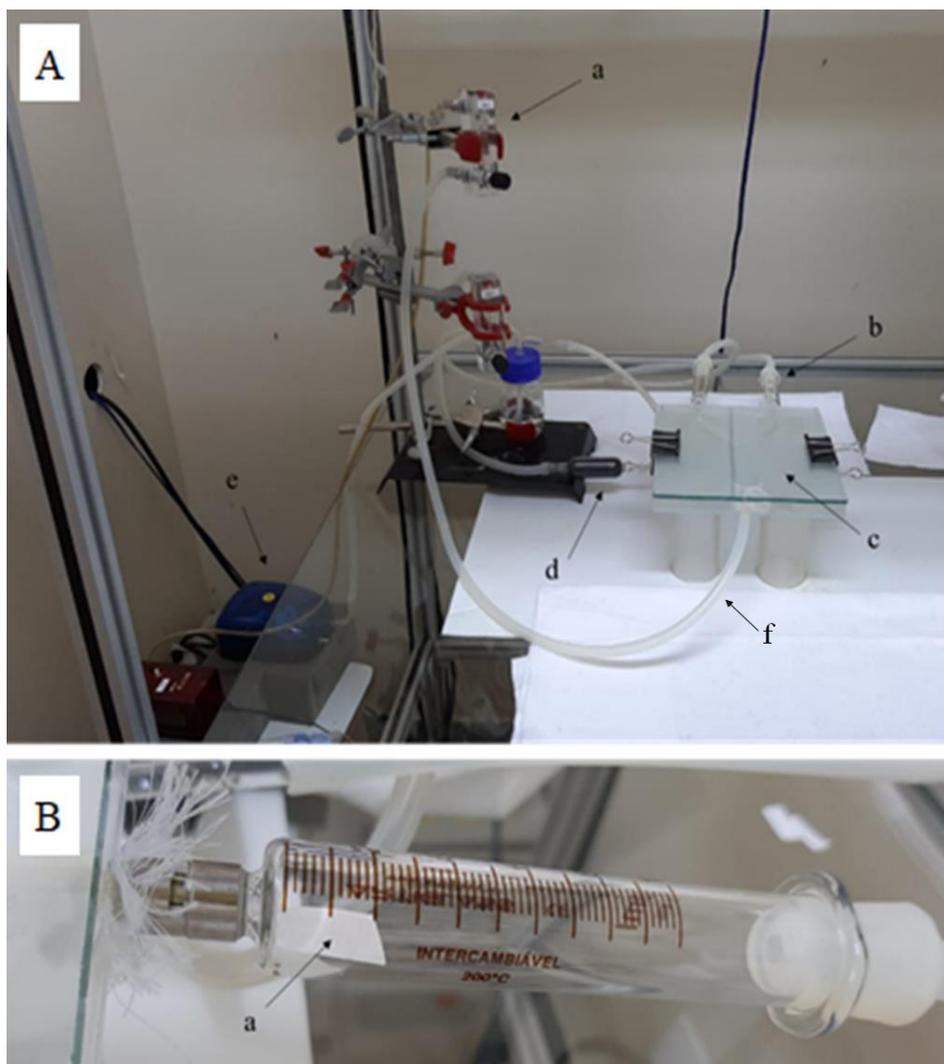
**Figura 3.** Arena de dupla escolha e suas respectivas medidas. (a) placa de vidro, (b) placa de acrílico e (c) placa de vidro.

Os tratamentos consistiram em estímulos químicos voláteis ( $\alpha$ -farneseno e 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila) e não voláteis (rastros químicos), estímulos mecânicos (vibração do substrato) e visuais (cor do substrato). A seleção destes estímulos considerou a comprovação previa de seus efeitos táxicos ou quinéticos para o parasitoides *T. podisi*. O (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno (doravante chamado AF) é um composto majoritário dos voláteis de soja com herbivoria de *E. heros* (Michereff et al. 2011), o 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila (doravante chamado FS) é um composto majoritário do feromônio sexual de *E. heros* (Borges et al. 1998a). Estes dois compostos tem sido relatados como atrativos para *T. podisi* a longa distância (Borges et al. 1999 para o componente do feromônio; Michereff et al. 2011, 2013 para o VPIH) e seriam os principais estímulos utilizados pelo parasitoide nas etapas de localização do habitat. Os sinais vibratórios (doravante chamado SV) são produzidos por *E. heros* durante o comportamento reprodutivo (Moraes et al 2005). É conhecido que *T. podisi* reconhece e responde preferencialmente a SV de fêmeas de *E. heros* sendo este estímulo um forte atrativo para as fêmeas desse parasitoide (Laumann et al. 2007; 2011). Rastros químicos (doravante chamado RQ), constituídos

por hidrocarbonetos cuticulares e depositados no substrato durante a locomoção dos insetos, são atrativos e arrestantes para fêmeas de *T. podisi*, que respondem preferencialmente para RQ de fêmeas de *E. heros* (Borges et al. 2003; Lagôa et al. 2020). Estímulos visuais, representados pela cor amarela, são fortemente atrativos para insetos parasitoides (Wäckers 1994; Lucchetta et al. 2008). Particularmente para *T. podisi* foi demonstrado que a cor amarela do substrato (doravante chamado CA) é um estímulo fortemente atrativo e que atua de forma inata (Aquino et al. 2012). Todos esses estímulos configuram os principais sinais utilizados por *T. podisi* como fonte de informação quando forrageia a longas e curtas distâncias, respectivamente (Laumann et al. 2011).

#### *Experimentos com semioquímicos voláteis*

Em experimentos contendo tratamentos com semioquímicos voláteis, foram utilizadas seringas de vidro de 5,0 ml (1,5 cm de diâmetro externo e 7 cm de comprimento; Arti-Glass, Due Carrare, Itália) que foram conectadas à arena experimental com mangueiras de silicone (Figura 4). No interior da arena foi estabelecida uma corrente de ar utilizando-se bombas de aquário. Uma das bombas foi conectada a um filtro com carvão ativado e a um umidificador (Figura 4). A corrente de ar estabelecida passou posteriormente pelas seringas com os tratamentos e, finalmente foi conduzida para a arena. No extremo oposto da entrada dos tratamentos (tronco da arena) foi adaptada uma bomba para succionar o ar. Desta maneira se estabeleceu um sistema de tipo “push-pull” com fluxo de ar de entrada de 0,4 lpm e fluxo de saída de 0,3 lpm. O fluxo foi regulado mediante fluxômetros e a diferença entre o fluxo de entrada e saída assegurou uma pressão positiva no interior do sistema que evitou a entrada de ar não filtrado e contaminação dos fluxos (Figura 4).



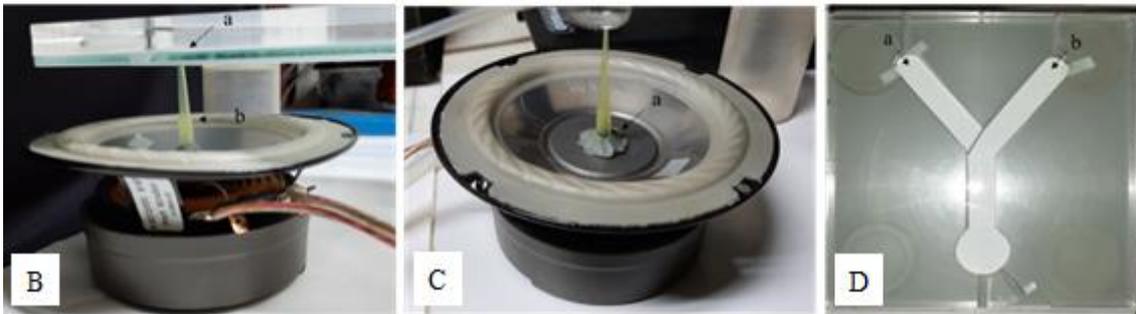
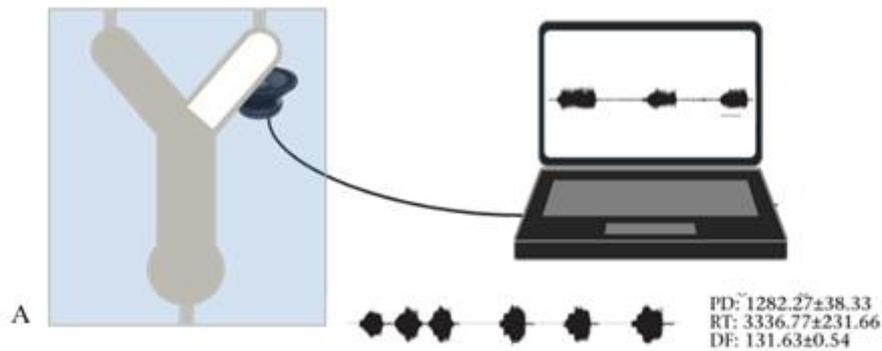
**Figura 4.** (A) Arena de experimentação adaptada para bioensaios com fluxos de ar. (a) fluxômetro, (b) seringa com tratamentos (c), arena, (d) filtro de carvão ativado, (e) bombas (f) mangueira para o escoamento de ar. (B) seringa com (a) papel filtro onde foram aplicadas as soluções dos tratamentos ou o *n*-hexano (controle).

Os semioquímicos voláteis (padrão Sigma Aldrich<sup>®</sup>) foram contrastados com *n*-hexano, ambos colocados em pedaços de papel filtro com aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> (80 g m<sup>-2</sup>, 205 μm de espessura, 14 μm de poro médio; Qualy J Prolab, Paraná, Brasil) com a utilização de capilares de vidro (Figura 4). Antes de serem colocados dentro das seringas de vidro, os papéis-filtro foram deixados à temperatura ambiente por 2 minutos até a evaporação do solvente. Dessa forma, 10 μL de AF na concentração de 0,002 mg/ml (dose

final 20 ng/papel de filtro) foi contrastado com 10  $\mu$ L de *n*-hexano. Esta concentração do AF foi selecionada baseada na resposta prévia do parasitoide em bioensaios de olfatometria (Michereff et al. 2013). Foi também contrastado 20  $\mu$ L de FS na concentração de 0,0001 mg/ml à 20  $\mu$ L de *n*-hexano. A concentração de FS também foi selecionada baseada na resposta prévia do parasitoide, sendo conhecidamente atrativa ao parasitoide *T. podisi* (Borges et al. 1999).

#### *Experimentos com vibração do substrato*

Nestes experimentos utilizou-se a gravação do canto de acasalamento (FS1) (ver apêndice) de uma fêmea virgem de *E. heros* com 10 dias de idade (Laumann et al. 2007). Esses sinais previamente gravados por Laumann et al. (2007), foram transmitidos por um computador com placa de som externa (Creative, Sound Blaster X-fi 5.1 Pro) utilizando o software Sound Forge 4.5 (Sonic Foundry Inc., Madison, Wisconsin, U.S.A.) para reprodução do arquivo. A vibração do substrato foi gerada seguindo a metodologia descrita em Laumann et al (2007). Um alto-falante conectado à placa de som do computador reproduziu as vibrações que foram transmitidas ao substrato por uma ponteira de pipeta plástica ajustada à membrana do alto-falante com massa de modelar (Figura 5). A ponta da pipeta foi colocada em contato com uma folha de cartolina branca com aproximadamente 1 mm de espessura que se encontrava dentro de um dos braços da arena, para isso, foi feito um furo na superfície inferior do vidro da arena (Figura 5). Dessa forma, a ponta da pipeta tocava o papel transmitindo a vibração da membrana do alto-falante para o substrato. Foram realizadas medições prévias para avaliar a propagação da vibração pelo papel no braço da arena contendo o tratamento (vibração) e no braço do controle.

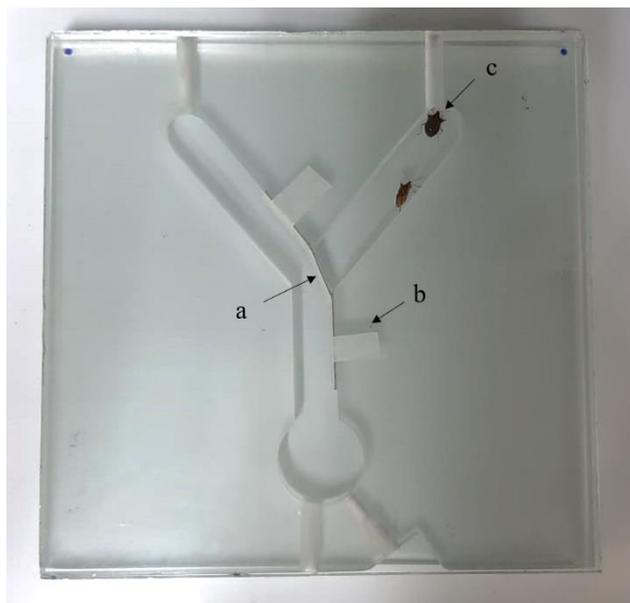


**Figura 5.** Representação e imagens dos equipamentos utilizados para a propagação dos sinais vibratórios (SV) de fêmeas de *Euschistus heros*. (A) representação da arena de dupla escolha em contato com o alto-falante e, por sua vez, com o computador. Oscilograma representativo com suas características temporais e frequência dominante (média± SE) dos sinais originais de fêmeas de *E. heros* usados nos bioensaios. (B) alto-falante ligado a uma (b) ponta plástica de pipeta em contato com a (a) parte interna da arena por um furo no vidro inferior. (C) alto-falante ligado a (a) massa de modelar junto a ponta plástica de pipeta. (D) Arena de dupla escolha com (a) um braço para o tratamento, onde o papel, em contato com a pipeta, não faz contato com o papel do (b) outro braço da arena. PD = duração do pulso (ms), RT= tempo de repetição do pulso (ms) DF = frequência dominante do sinal vibratório (Hz)

### *Experimentos com rastros químicos*

Nestes experimentos foram utilizadas arenas impregnadas com o rastro de *E. heros*. Para isto, foram utilizados os procedimentos descritos por Lagôa et al. (2020). Dessa forma, duas fêmeas de *E. heros* foram colocadas em um braço da arena

experimental e mantidas isoladas por uma tira de papelão e cobertas com placas de vidro (Figura 6). Os percevejos foram mantidos na arena por uma hora, para que pudessem caminhar e depositar os rastros na superfície do acrílico e do vidro. O outro braço da arena foi mantido limpo (Figura 6). Arenas com fezes ou qualquer outra contaminação não foram utilizadas nos bioensaios.



**Figura 6.** Procedimentos para gerar rastros de *E. heros* em um dos braços da arena de dupla escolha. (a) tira de papelão delimitando o braço da arena para confinamento de duas fêmeas de *Euschistus heros*, (b) fita crepe, (c) fêmea de *E. heros*.

#### *Experimentos come estímulos visuais*

No experimento em que foi avaliada a resposta do parasitoide à cor do substrato (CA), utilizou-se cartolina amarela (Reipel Color Set - amarelo n° 418) cortada aproximadamente um centímetro maior que o do braço da arena (laterais e parte posterior do braço), para que ficasse presa debaixo da placa de acrílico, e na parte anterior (início do braço da arena) a cartolina foi cortada rente à entrada (Figura 7). O outro braço e a parte central da arena não foram cobertos com nenhum substrato (Figura 7). As medidas espectrais da cartolina foram obtidas previamente por Aquino (2011) (ver apêndice).



**Figura 7.** Arena de dupla escolha com cartolina amarela em um dos braços da arena.

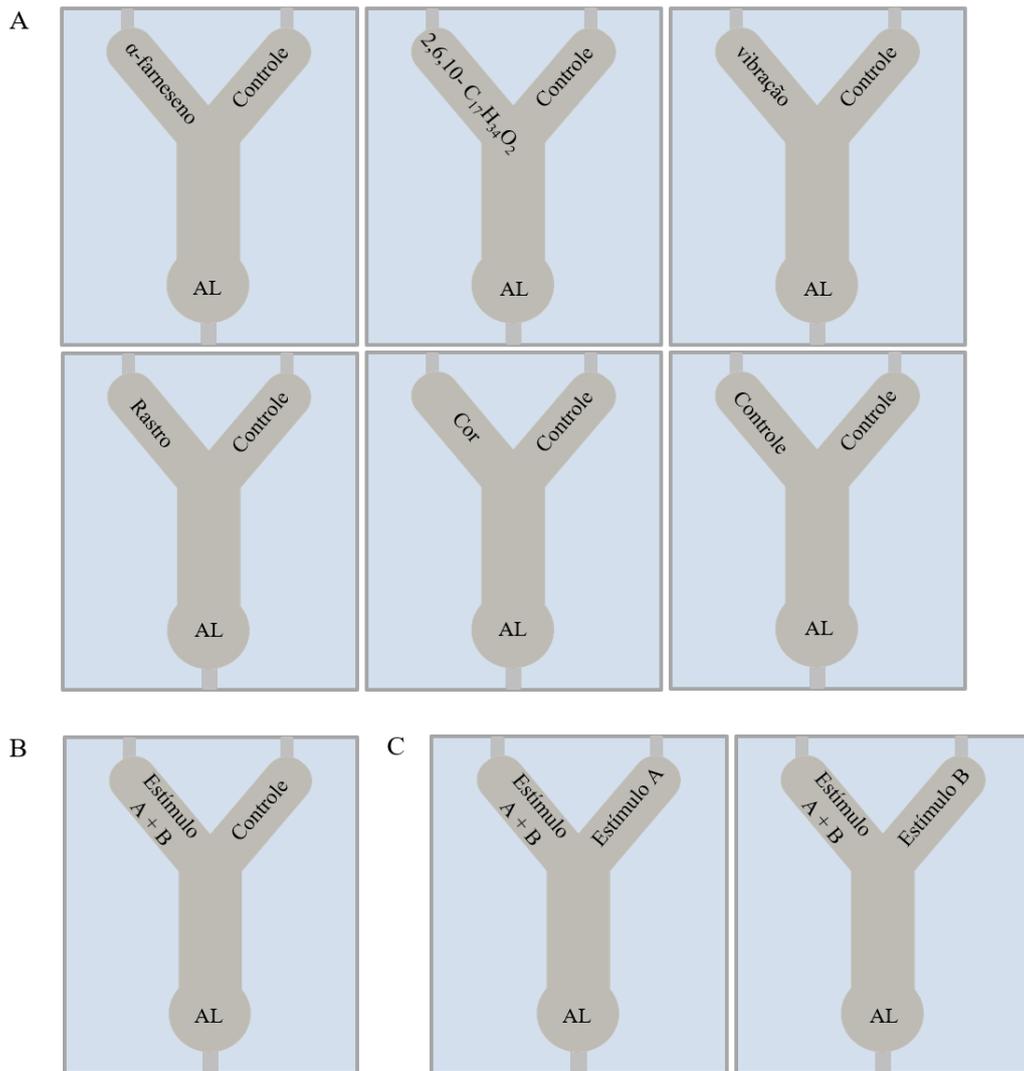
#### *Desenho experimental*

Cada bioensaio consistiu na observação do comportamento de uma fêmea de *T. podisi*. Todas as fêmeas usadas nos bioensaios tinham idade entre 24 e 48 horas, estavam alimentadas e acasaladas, porém sem experiência de oviposição. Todos os experimentos foram realizados em condições de laboratório em sala climatizada a 25 °C, no laboratório de Semioquímicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brasil. Previamente aos bioensaios as fêmeas de parasitoide foram separadas e mantidas em um pequeno tubo de vidro (1 cm de diâmetro externo e 4 cm de comprimento), por um período de no máximo 10 minutos, na sala de bioensaios para aclimatação.

Cada fêmea foi liberada delicadamente na base do tronco da arena (área de liberação) (Figura 8) e o seu comportamento observado por um período de 600 s. Foram registrados a escolha inicial e o tempo de residência. A escolha inicial foi considerada após 20 s da entrada do parasitoide em um dos braços da arena e o tempo de residência foi determinado pela soma do tempo em que cada parasitoide permaneceu parado ou

fornecendo em um dos braços da arena. Cada fêmea foi utilizada apenas uma vez e as posições dos braços da arena foram alternadas a cada cinco bioensaios, para evitar qualquer viés posicional na resposta do parasitoide. No momento da mudança de posição dos tratamentos as arenas acrílicas e os vidros foram substituídos por novos e os já utilizados foram lavados com detergente neutro e secos ao ar. Para cada combinação de tratamentos foram realizadas 40 repetições.

Os experimentos foram desenvolvidos em três etapas diferentes. Na primeira foi avaliado o comportamento das fêmeas de *T. podisi* quando oferecidos os tratamentos separadamente em um braço da arena versus o controle no outro braço (Figura 8). Na segunda etapa os tratamentos foram combinados em pares em um braço da arena e contrastados com o controle no outro braço (Figura 8, Tabela 1). Na terceira etapa foram combinados os tratamentos em pares em um braço da arena e no outro braço foi oferecido separadamente cada componente da combinação (Figura 8, Tabela 2). Em todas as etapas foram realizados bioensaios sem estímulos para comprovar a inexistência de qualquer viés derivado da montagem da arena ou iluminação da sala de bioensaios.



**Figura 8.** Esquema de todos os tratamentos nas três diferentes etapas avaliadas. (A) todos os tratamentos individualizados contrastados com o controle (primeira etapa). (B) combinações contrastadas com o controle (segunda etapa). (C) combinações contrastadas com cada componente da combinação (terceira etapa). (AL) área de liberação.

**Tabela 1.** Combinações entre os estímulos químicos e físicos e seus respectivos controles utilizados nos bioensaios onde os estímulos foram combinados dois a dois. (AF)  $\alpha$ -farneseno, (FS) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila, (SV) sinais vibratórios, (RQ) rastros químicos, e (CA) cor amarela. Estão representados as respectivas quantidades e concentrações utilizadas por tratamento.

Combinações	Controle
10 $\mu$ L AF (0,002 mg/ml) + 20 $\mu$ L FS (0,0001 mg/ml)	20 $\mu$ L de <i>n</i> -hexano
10 $\mu$ L AF (0,002 mg/ml) + SV	10 $\mu$ L de <i>n</i> -hexano
10 $\mu$ L AF (0,002 mg/ml) + RQ	10 $\mu$ L de <i>n</i> -hexano
10 $\mu$ L AF (0,002 mg/ml) + C	10 $\mu$ L de <i>n</i> -hexano
20 $\mu$ L FS (0,0001 mg/ml) + SV	20 $\mu$ L de <i>n</i> -hexano
20 $\mu$ L FS (0,0001 mg/ml) + RQ	20 $\mu$ L de <i>n</i> -hexano
20 $\mu$ L FS (0,0001 mg/ml) + C	20 $\mu$ L de <i>n</i> -hexano
SV + RQ	Sem tratamento
SV + C	Sem tratamento
RQ + C	Sem tratamento

**Tabela 2.** Combinações entre os estímulos químicos e físicos (dois a dois) contrastados com cada componente da combinação. (AF)  $\alpha$ -farneseno, (FS) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila, (SV) sinais vibratórios, (RQ) rastros químicos, e (CA) cor amarela. Estão representados as respectivas quantidades e concentrações utilizadas por tratamento.

Combinações	Componentes da combinação
10 $\mu$ L AF (0,002 mg/ml) + 20 $\mu$ L FS (0,0001 mg/ml)	10 $\mu$ L AF (0,002 mg/ml)

	20 µL FS (0,0001 mg/ml)
10 µL AF (0,002 mg/ml) + SV	10 µL AF (0,002 mg/ml) SV
10 µL AF (0,002 mg/ml) + RQ	10 µL AF (0,002 mg/ml) RQ
10 µL AF (0,002 mg/ml) + CA	10 µL AF (0,002 mg/ml) CA
20 µL FS (0,0001 mg/ml) + SV	20 µL FS (0,0001 mg/ml) SV
20 µL FS (0,0001 mg/ml) + RQ	20 µL FS (0,0001 mg/ml) RQ
20 µL FS (0,0001 mg/ml) + CA	20 µL FS (0,0001 mg/ml) CA
SV + RQ	SV RQ
SV + CA	SV CA
RQ + CA	RQ CA

### Análises estatísticas

Para avaliar o efeito dos tratamentos na escolha das fêmeas dos parasitoides foram utilizados modelos de regressão logística (GLM com distribuição binomial de erros). A hipótese de não preferência (distribuição da escolha igual a 50% em cada braço da arena)

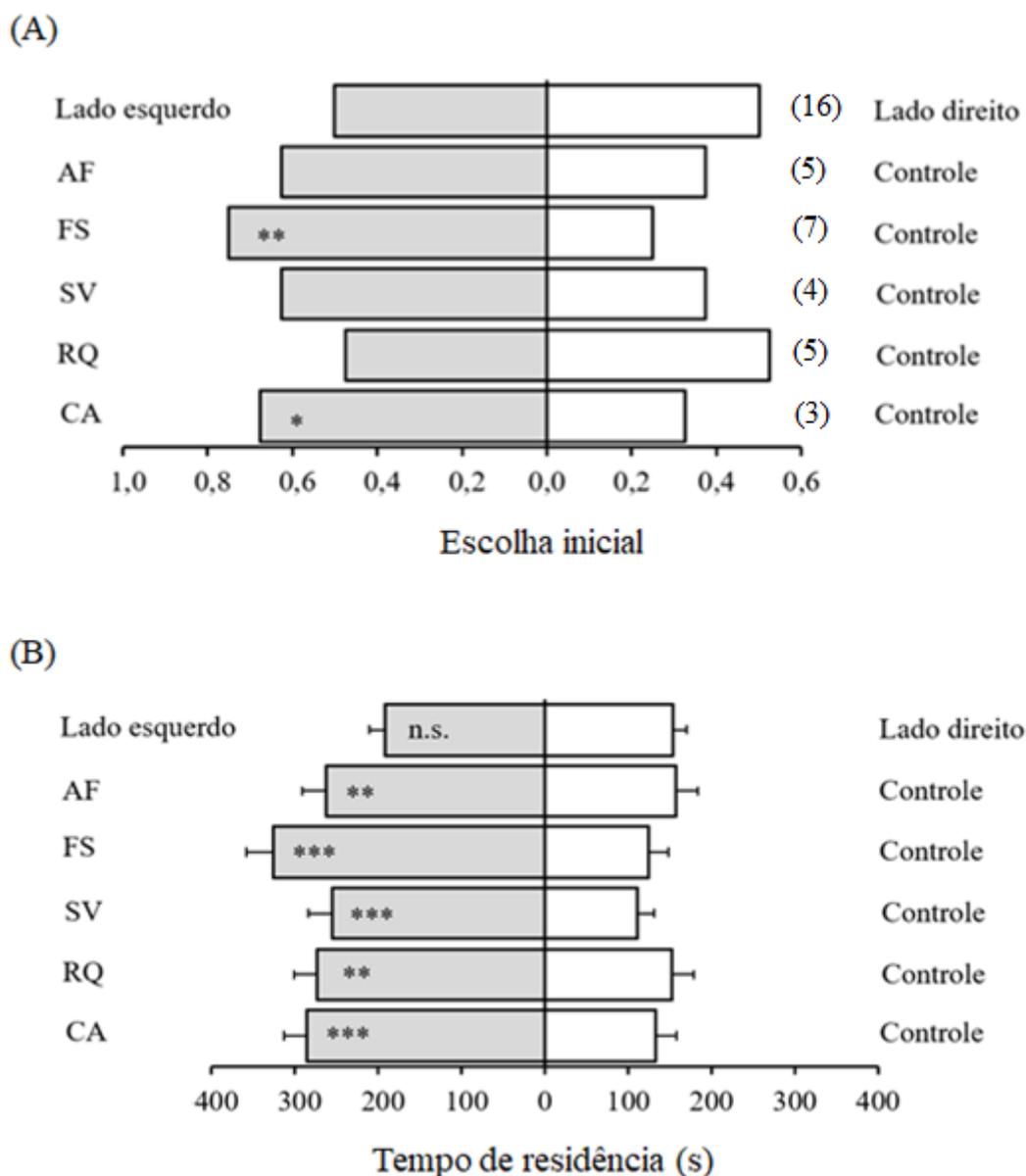
foi avaliada com o teste de  $\chi^2$  de Wald. O teste foi aplicado separadamente para cada combinação de tratamentos.

Para avaliar como o tempo de residência (variável resposta) é afetado pelos estímulos em relação ao controle ou aos tratamentos (variáveis preditoras) foi ajustado um Modelo Linear Generalizado (GLM) com distribuição de Poisson ou binomial negativo. O modelo foi ajustado separadamente para cada combinação de teste. A significância do modelo foi acessada pela Análise de Deviance (ANODEV). Todas as análises foram realizadas utilizando o software R (R Development Core Team, 2017).

## RESULTADOS

### **Primeira etapa – Tratamentos versus controle**

A escolha inicial dos parasitoides foi afetada apenas pela presença do FS e da CA em relação ao controle (Figura 9, Tabela 3). O tempo de residência dos parasitoides foi maior em todos os tratamentos quando comparados aos respectivos controles (Figura 9, Tabela 3). Não houve diferença entre os tempos de residência dos parasitoides em relação ao braço esquerdo e direito da arena, quando avaliados sem tratamentos em ambos (Figura 9, Tabela 3).



**Figura 9.** (A) Escolha inicial (proporção de insetos avaliados) de fêmeas de *Telenomus podisi* em diferentes tratamentos e seus respectivos controles (*n*-hexano ou sem tratamento). (B) média  $\pm$  SE do tempo de residência (s) de fêmeas de *T. podisi* em diferentes tratamentos e seus respectivos controles (*n*-hexano ou sem tratamento). (AF)  $\alpha$ -farneseno, (FS) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila, (SV) sinais vibratórios, (RQ) rastros químicos, e (CA) cor amarela. Lado direito e lado esquerdo mostram a escolha inicial (A) e o tempo de residência (B) em bioensaios sem estímulos. \* Diferenças significativas entre os tratamentos (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ) por análise de modelos lineares generalizados (GLM) com (A) distribuição binomial e (B) Poisson ou

binomial negativo. Números entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum dos tratamentos após 3 minutos.

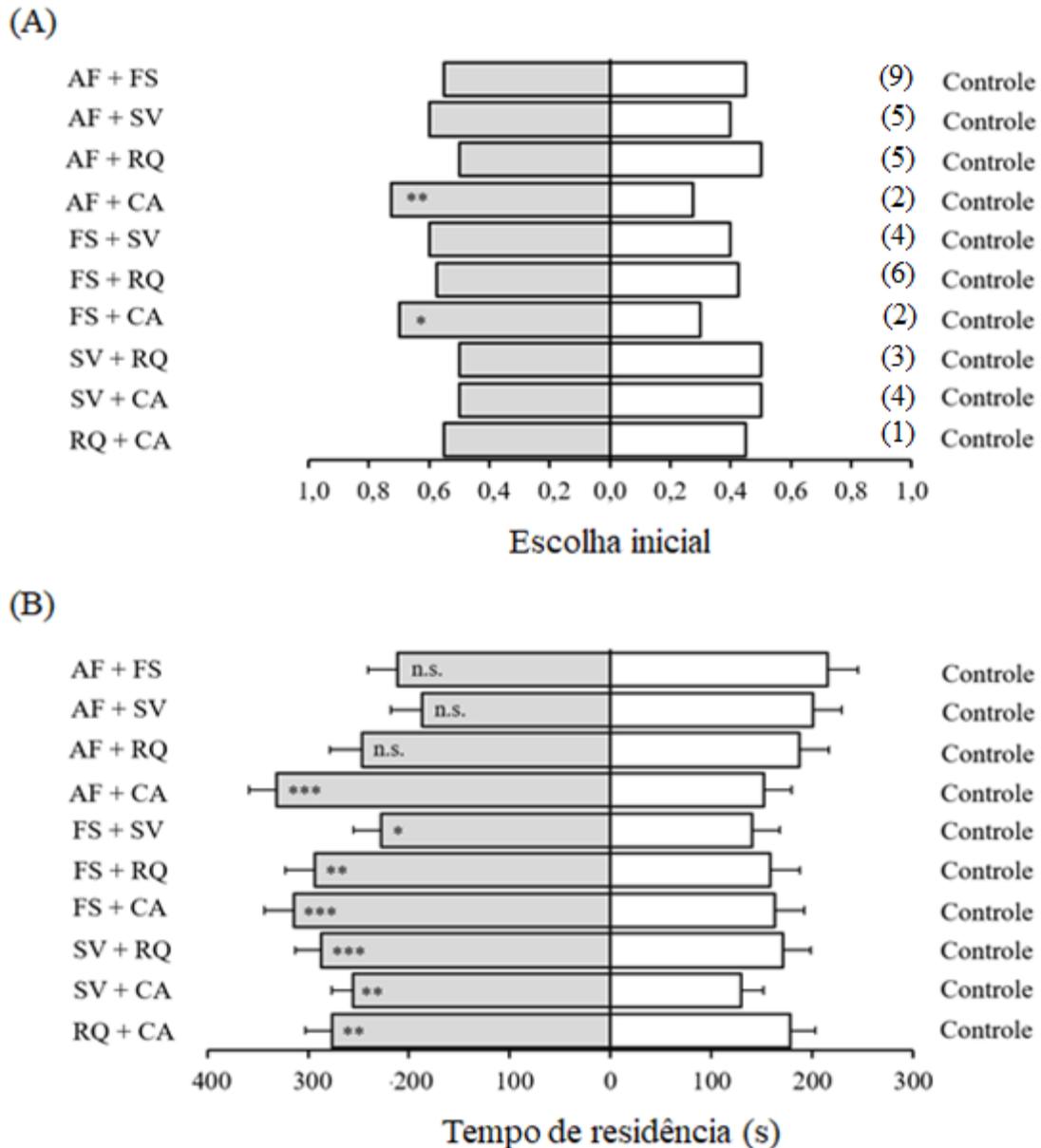
**Tabela 3.** Efeito dos tratamentos na escolha inicial e tempo de residência (s) (média  $\pm$  SE) de *Telenomus podisi* quando exposto a diferentes estímulos e os controles em uma arena de dupla escolha (“Y”). (AF)  $\alpha$ -farneseno, (FS) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila, (SV) sinais vibratórios, (RQ) rastros químicos, e (CA) cor amarela. Esquerdo x direito, escolha inicial e o tempo de residência em bioensaios sem estímulos.

Tratamento	Escolha inicial	Tempo de residência
AF	Z=1,394, g.l.=1; P=0,163	<b>F=10,678, g.l.=80, P=0,001</b>
FS	<b>Z=3,009, g.l.=1; P=0,002</b>	<b>F=24,633, g.l.=78, P&lt;0,0001</b>
SV	Z=1,564, g.l.=1; P=0,118	<b>F=6,7604, g.l.=78, P=0,009</b>
RQ	Z=-0,316, g.l.=1; P=0,752	<b>F=5,1976, g.l.=78, P=0,022</b>
CA	<b>Z=2,165, g.l.=1; P=0,030</b>	<b>F=14,82, g.l.=78, P=0,0001</b>
Esquerdo x direito	Z=0, g.l.=1; P=1	F=0,93865, g.l.=78, P=0,332

Resultados significativos foram destacados em negrito

### Segunda Etapa – Tratamentos combinados versus controle

A escolha inicial dos parasitoides foi influenciada apenas pelas combinações de AF + CA e FS + CA em relação ao controle (Figura 10, Tabela 4). O tempo de residência do parasitoide foi maior em todas as combinações de tratamentos em relação ao controle, com exceção para os tratamentos combinados AF + FS, AF + SV e AF + RQ (Figura 10, Tabela 4).



**Figura 10.** (A) Escolha inicial (proporção de insetos avaliados) de *Telenomus podisi* em diferentes combinações de estímulos comparadas ao controle (*n*-hexano ou sem tratamento). (B) média±SE do tempo de residência de *T. podisi* em diferentes combinações de estímulos em relação ao controle (*n*-hexano ou sem tratamento). (AF)  $\alpha$ -farneseno, (FS) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila, (SV) sinais vibratórios, (RQ) rastros químicos, e (CA) cor amarela. \* Diferenças significativas entre os tratamentos (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ) por análise de modelos lineares generalizados (GLM) com (A) distribuição binomial e (B) Poisson ou binomial negativo. Números entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum dos tratamentos após 3 minutos.

**Tabela 4.** Efeito dos tratamentos na escolha inicial e tempo de residência (s) (média  $\pm$  SE) de *Telenomus podisi* quando exposto a diferentes combinações de estímulos e os controles em uma arena de dupla escolha (“Y”). (AF)  $\alpha$ -farneseno, (FS) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila, (SV) sinais vibratórios, (RQ) rastros químicos, e (CA) cor amarela.

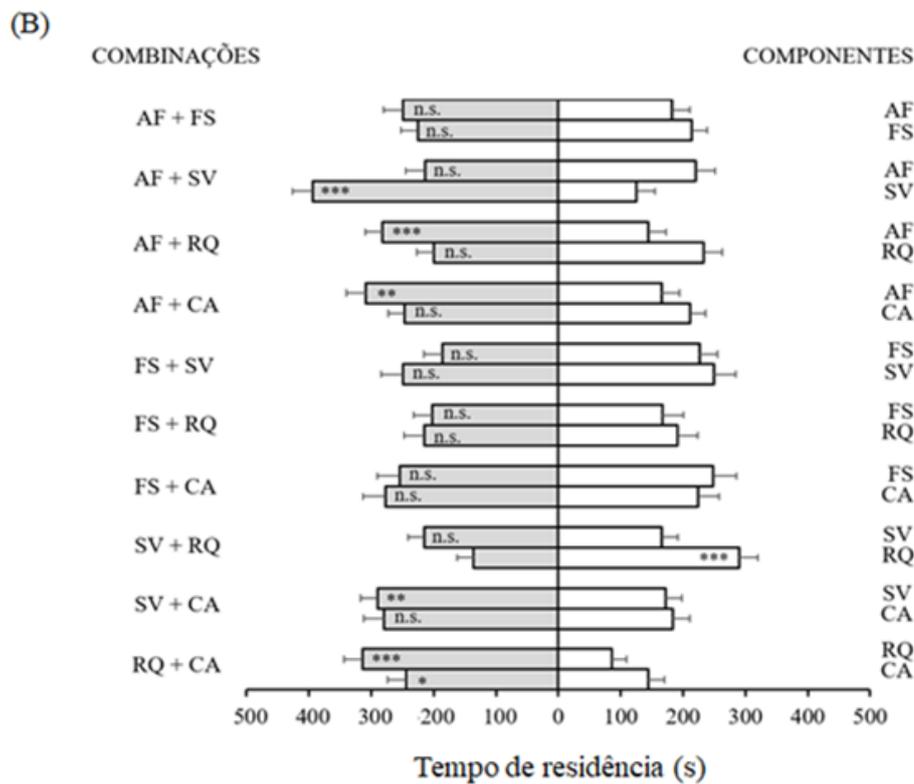
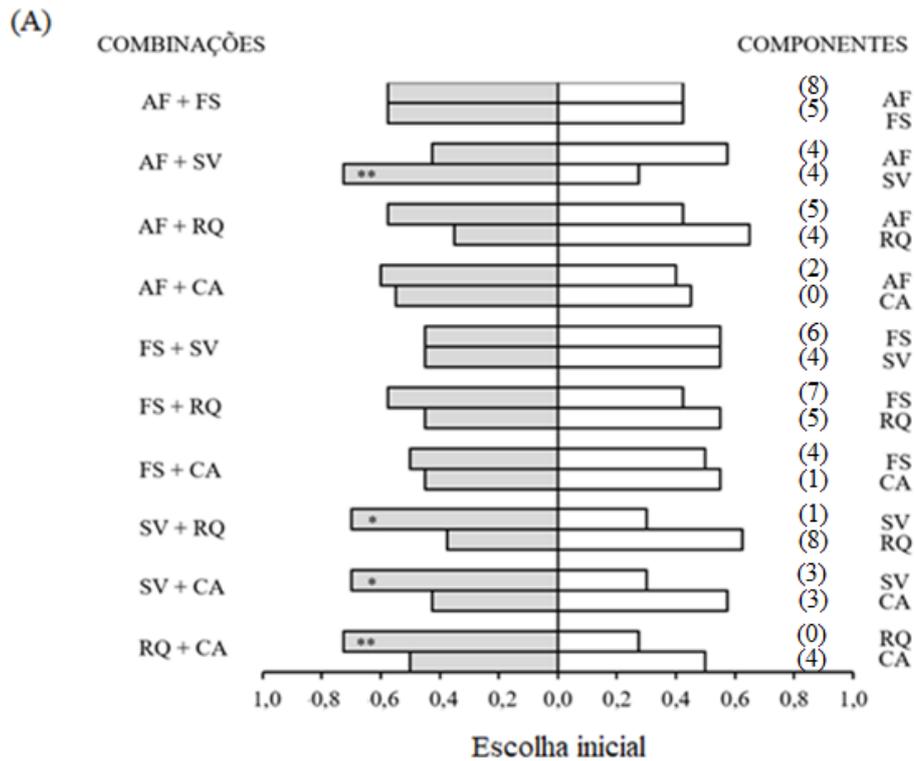
<b>Tratamento</b>	<b>Escolha inicial</b>	<b>Tempo de residência</b>
AF + FS	Z=0,631, g.l.=1; P=0,528	F=0,523, g.l.=78, P=0,470
AF + SV	Z=1,256, g.l.=1; P=0,209	F=0,550, g.l.=78, P=0,458
AF + RQ	Z=0, g.l.=1; P=1	F=0,026, g.l.=78, P=0,871
AF + CA	<b>Z=2,738, g.l.=1; P=0,006</b>	<b>F=16,654, g.l.=78, P&lt;0,0001</b>
FS + SV	Z=1,256, g.l.=1; P=0,209	F=3,496, g.l.=78, P>0,061
FS + RQ	Z=0,945, g.l.=1; P=0,345	<b>F=10,671, g.l.=78, P=0,001</b>
FS + CA	<b>Z=2,456, g.l.=1; P=0,014</b>	<b>F=10,046, g.l.=78, P=0,001</b>
SV + RQ	Z=1,564, g.l.=1; P=0,118	<b>F=8,465, g.l.=78, P=0,003</b>
SV + CA	Z=1,564, g.l.=1; P=0,118	<b>F=7,092, g.l.=78, P=0,007</b>
RQ + CA	Z=0,631, g.l.=1; P>0,528	<b>F=4,716, g.l.=78, P=0,030</b>

Resultados significativos foram destacados em negrito

### **Terceira etapa – Tratamentos combinados versus cada componente da combinação**

Considerando a escolha inicial, os parasitoides preferiram apenas as combinações AF + SV quando comparada ao SV; SV + RQ quando comparada ao SV; SV + CA quando comparada ao SV; e RQ + CA quando comparada ao RQ (Figura 11, Tabela 5). O tempo de residência dos parasitoides foi maior nas combinações AF + SV em comparação a SV;

AF + RQ em comparação aos AF, AF + CA em relação aos AF; SV + CA em relação a SV, RQ + CA em relação ao RQ, e preferiram ao RQ em relação à combinação do SV + RQ (Figura 11, Tabela 5).



**Figura 11.** (A) Escolha inicial (proporção de insetos) de fêmeas de *Telenomus podisi* em diferentes combinações de estímulos comparadas a cada componente da combinação. (B) média  $\pm$  SE do tempo de residência do parasitoide *T. podisi* em diferentes combinações de estímulos comparadas a cada componente da combinação. (AF)  $\alpha$ -farneseno, (FS) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila, (SV) sinais vibratórios, (RQ) rastros químicos, e (CA) cor amarela. \* Diferenças significativas entre os tratamentos (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ) por análise de modelos lineares generalizados (GLM) com (A) distribuição binomial e (B) Poisson ou binomial negativo. Números entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum dos tratamentos após 3 minutos.

**Tabela 5.** Efeito dos tratamentos na escolha inicial e tempo de residência (s) (média  $\pm$  SE) de *Telenomus podisi* quando exposto a diferentes combinações de estímulos contrastados aos componentes da combinação em uma arena de dupla escolha (“Y”). (AF)  $\alpha$ -farneseno, (FS) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila, (SV) sinais vibratórios, (RQ) rastros químicos, e (CA) cor amarela.

Tratamento combinado	Componentes	Escolha inicial	Tempo de residência
AF + FS	AF	$Z=0,945$ , g.l.=1; $P=0,345$	$F=1,735$ , g.l.=78, $P=0,188$
	FS	$Z=0,945$ , g.l.=1; $P=0,345$	$F=0,179$ , g.l.=78, $P=0,672$
AF + SV	AF	$Z=0,945$ , g.l.=1; $P=0,345$	$F=0,489$ , g.l.=78, $P=0,484$
	FS	<b><math>Z=2,738</math>, g.l.=1; <math>P=0,006</math></b>	<b><math>F=15,528</math>, g.l.=78, <math>P&lt;0,0001</math></b>
AF + RQ	AF	$Z=0,945$ , g.l.=1; $P=0,345$	<b><math>F=11,122</math>, g.l.=78, <math>P=0,0008</math></b>
	RQ	$Z=-1,867$ , g.l.=1; $P=0,062$	$F=1,0031$ , g.l.=78, $P=0,316$
AF + CA	AF	$Z=1,256$ , g.l.=1; $P=0,209$	<b><math>F=8,146</math>, g.l.=78, <math>P=0,004</math></b>
	CA	$Z=0,631$ , g.l.=1; $P=0,528$	$F=0,344$ , g.l.=78, $P=0,558$
FS + SV	FS	$Z=-0,631$ , g.l.=1; $P=0,528$	$F=2,143$ , g.l.=78, $P=0,143$
	SV	$Z=-0,631$ , g.l.=1; $P=0,528$	$F=0,063$ , g.l.=78, $P=0,802$
FS + RQ	FS	$Z=0,945$ , g.l.=1; $P=0,345$	$F=0,788$ , g.l.=78, $P=0,375$
	RQ	$Z=-0,631$ , g.l.=1; $P=0,528$	$F=0,106$ , g.l.=78, $P=0,745$
FS + CA	FS	$Z=0$ , g.l.=1; $P=1$	$F=0,012$ , g.l.=78, $P=0,910$

	CA	$Z=-0,631, \text{ g.l.}=1; P=0,528$	$F=0,139, \text{ g.l.}=78, P=0,709$
SV + RQ	SV	<b><math>Z=2,456, \text{ g.l.}=1; P=0,014</math></b>	$F=1,644, \text{ g.l.}=78, P=0,200$
	RQ	$Z=-1,564, \text{ g.l.}=1; P=0,118$	<b><math>F=7,704, \text{ g.l.}=78, P=0,005</math></b>
SV + CA	SV	<b><math>Z=2,456, \text{ g.l.}=1; P=0,014</math></b>	<b><math>F=5,265, \text{ g.l.}=78, P=0,022</math></b>
	CA	$Z=-0,945, \text{ g.l.}=1; P=0,345$	$F=0,939, \text{ g.l.}=78, P=0,332$
RQ + CA	RQ	<b><math>Z=2,738, \text{ g.l.}=1; P=0,006</math></b>	<b><math>F=19,745, \text{ g.l.}=78, P&lt;0,0001</math></b>
	CA	$Z=0, \text{ g.l.}=1; P=1$	$F=3,500, \text{ g.l.}=68, P=0,061$

---

Resultados significativos foram destacados em negrito

## DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que avaliou o efeito de combinações de estímulos de diferentes naturezas no comportamento de forrageamento de fêmeas de um parasitoide de ovos da família Scelionidae. Esses estímulos configuram os principais sinais utilizados por *T. podisi* como fonte de informação quando forrageia a longas e curtas distâncias (Laumann et al. 2011).

Assim como o observado para outras espécies de parasitoides (Rondoni et al. 2017; Boyle et al. 2020; Ohsaki et al. 2020; Rodriguez-Saona et al. 2020; Sevarika et al. 2021), a busca e seleção de hospedeiros por *T. podisi* é baseada em estímulos químicos e físicos direta ou indiretamente relacionados aos hospedeiros (Borges et al. 1999; Laumann et al. 2007; Aquino et al. 2012; Michereff et al. 2013; Tognon et al. 2020; Lagôa et al. 2020). Os resultados obtidos nos bioensaios em arenas experimentais de dupla escolha mostram que: (1) quando considerado o tempo de residência, todos os estímulos avaliados de forma individual, foram atrativos para *T. podisi*, o que corrobora trabalhos prévios (Borges et al. 1999; Laumann et al. 2007; Aquino et al. 2012; Michereff et al. 2013; Lagôa et al. 2020); (2) quando esses estímulos foram combinados e testados contra

o controle, foi observada a influência da cor e dos rastros químicos na atratividade dos parasitoides. Uma vez que, para todos os estímulos combinados à cor, e para a maioria combinada ao rastro, o tempo de residência no braço da arena foi maior; e (3) quando esses estímulos foram combinados e testados contra cada componente da combinação, foi observada principalmente a influência da cor amarela, mostrando-se um estímulo determinante na atratividade do parasitoide a curtas distâncias, na maioria dos testes.

Na primeira etapa, portanto, foi observado que isoladamente o AF, (Michereff et al. 2013, 2011), o FS (Borges et al. 1998b), SV (Laumann et al. 2007), RQ (Borges et al. 2003; Lagôa et al. 2020) e a CA (Aquino et al. 2012), todos estímulos relacionados a *E. heros*, hospedeiro preferencial de *T. podisi* (Sujii et al. 2002), incitaram uma forte relação de atração e retenção dos parasitoides. Esse comportamento inato pode ser uma evidência da intrincada relação evolutiva entre *T. podisi* e seu hospedeiro preferencial, assim como observado para outras espécies de parasitoides da família Scelionidae e hospedeiros pentatomídeos (Salerno et al. 2006).

Na segunda etapa foi observado que a escolha inicial foi maior apenas para as combinações do AF com CA e do FS com CA. Há nessas combinações dois estímulos detectáveis, os voláteis (Vet e Dicke 1992), e a cor amarela (Aquino et al. 2012). Isto sugere que estas combinações podem ser efetivas na atração e retenção dos parasitoides, uma vez que, também houve maior permanência no braço da arena contendo essas duas combinações. Foi verificada, portanto, a importância dos estímulos visuais, pois, todos os demais estímulos combinados à cor do substrato retiveram os parasitoides nas áreas tratadas. Em himenópteros e outros insetos há uma preferência inata pela cor amarela (Wäckers 1994; Lucchetta et al. 2008; Pérez et al. 2012; Damien et al. 2019; Cavaletto et al. 2020; Lim and Ben-Yakir 2020). O espectro das tonalidades amarelas inclui ainda a faixa do verde e por isso, nos insetos, essa cor pode ser associada à cor das flores e da

folhagem das plantas hospedeiras (Wäckers 1994; Lucchetta et al. 2008). *Telenomus podisi*, assim como outros parasitoides, dependem dos carboidratos para produzir e maturar seus ovos, e para sua sobrevivência (Wäckers, 1994; McIntosh et al. 2020). Portanto, o reconhecimento das cores, especialmente a amarela, pode atuar na orientação às fontes alimentares (Hatt et al. 2018). A cor também pode orientar os parasitoides ao hospedeiro. Neste caso, é possível que a predileção de *T. podisi* pela cor amarela (Aquino et al. 2012) também ocorra por serem amarelos os ovos de seu hospedeiro preferencial (Sujii et al. 2002). A resposta para cores relacionadas aos seus hospedeiros é um fato comprovado em parasitoides, como por exemplo, no caso de *Trichogramma ostriniae* Pang & Chen (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (Lobdell et al. 2005). Portanto, a cor pode além de um sinal detectável ser também confiável. Dessa forma, a atratividade para a cor pode estar associada não somente ao recurso alimentar (fitness de longo prazo), mas especialmente ao fitness imediato, que é a produção de descendência (Lobdell et al. 2005). Isto é reforçado pelo fato de que as fêmeas avaliadas neste trabalho estarem alimentadas. Adicionalmente, a cor é também importante na aprendizagem dos parasitoides como previamente reportado para *Psytalia concolor* (Szépligeti) (Hymenoptera: Braconidae), em que a cor é a principal informação usada na aprendizagem associativa (Benelli e Canale 2012).

Não há informações robustas, até o momento, sobre como se estrutura a visão de um inseto parasitoide (Aartsma et al. 2019), tampouco sobre como os aspectos fisiológicos e neurológicos da visão das cores interagem com as escolhas comportamentais e como ocorre o processamento de cores no cérebro (Lebhardt e Desplan, 2017; Kooi et al. 2021). Todos os insetos da ordem Hymenoptera são tricromatas com fotorreceptores sensíveis a UV, azul e verde (Kooi et al. 2021), e a percepção da cor amarela, especificamente, se dá pelo entrada positiva de receptores

verdes juntamente com uma entrada negativa de receptores azuis no olho do inseto, denominado "mecanismo oponente de cor verde-azul" (Döring et al. 2009, 2012). Outras discussões importantes tratam da miniaturização dos olhos e do corpo dos parasitoides (Fischer et al. 2019; Mohr et al. 2020), e conseqüentemente a menor complexidade da visão (Makarova et al. 2015; Gardner e Hoffmann 2020), e a maior importância dos sinais olfatórios (Lim e Ben-Yakir 2020). No entanto, o tamanho corporal possivelmente não se correlaciona com a acuidade visual (Feller et al. 2021). Quando estímulos visuais e odores provenientes dos hospedeiros de *T. ostrinia* foram contrastados, o parasitoide preferiu os estímulos visuais, sugerindo que possivelmente a orientação visual era o mecanismo de localização a curtas distâncias (Gardner and Hoffmann 2020). Ademais, diferente do proposto por Lim e Ben-Yakir (2020), em que os olhos de parasitoides de modo geral, por serem pequenos, tem papel secundário no forrageamento, os resultados deste trabalho, assim como previamente observado Gardner e Hoffmann (2020), sugerem que, pelo menos em curtas distâncias, a visão da cor amarela do substrato, em comparação a demais estímulos, tem um papel primordial na orientação dos parasitoides quando forrageiam por hospedeiros.

As demais combinações que retiveram os parasitoides na segunda etapa experimental foram as contendo o FS com RQ (estímulo detectável + confiável) e SV com RQ (confiável + confiável). Sendo, portanto, o rastro também importante na atratividade e retenção dos parasitoides, uma vez que, junto a ele todos os estímulos, exceto o AF, foram atrativos a *T. podisi*. Este resultado pode ser um indício de que o parasitoide, de forma inata, interpreta esses sinais, a cor e os rastros, como sendo mais confiáveis por estarem mais próximo aos ovos de *E. heros*, dada uma possível sequência hierárquica dos estímulos (Laumann et al. 2011).

Outro resultado interessante, ainda na segunda etapa, foi que nenhuma combinação contendo AF, exceto quando combinados à cor, causaram a atração ou retenção dos parasitoides nas áreas tratadas. Talvez, a combinação de AF e os outros estímulos não causem efeito atrativo no parasitoide por estarem muito distantes temporal e espacialmente numa possível escala hierárquica dos estímulos, onde AF estaria relacionado a etapa anterior ao encontro do habitat do hospedeiro, sendo considerado um estímulo de longas distâncias, e os demais estímulos relacionados ao habitat do hospedeiro, atuando a curtas distâncias (Laumann et al. 2011). Portanto, possivelmente, essas combinações de estímulos com AF não seriam observadas na natureza. Ademais, esperava-se que houvesse, principalmente, uma relação entre os voláteis avaliados, com um incremento no forrageamento dos parasitoides. No entanto, observou-se que estes juntos não são atrativos porque, provavelmente, causam alguma interferência sensorial nos insetos, possivelmente pela complexidade dos semioquímicos e principalmente por suas diferentes propriedades, e também porque requerem muito mais tipos de receptores do que em comparação aos sistemas visuais e de receptores mecânicos (Haverkamp et al. 2018). Além disso, em ambientes complexos, com muitas informações químicas disponíveis, é possível que apenas um composto seja suficiente para transmitir informações confiáveis (Haverkamp et al. 2018). Porém, para responder a esta questão, outros testes devem ser realizados.

É possível que, assim como demais organismos de níveis tróficos superiores, em *T. podisi* as primeiras etapas de forrageamento sejam baseadas em estímulos unimodais, como os voláteis de plantas induzidos por herbivoria (VPIH) (Aartsma et al. 2019). Posteriormente podem utilizar a integração multimodal para diminuir as incertezas e os ruídos ambientais (Aartsma et al. 2019; Partan e Marler, 1999). No entanto, se carece de informações a respeito das interações de estímulos provenientes de diferentes fontes

(plantas e ovos, por exemplo) no forrageamento de outras espécies de parasitoides. Outro fato importante, é que a relação multimodal entre estímulos visuais e olfativos parece mais comum, ou pelo menos mais estudada, quando esses estímulos estão relacionados ao mesmo recurso, por exemplo, características de odor e cor de uma mesma planta (Campbell e Borden 2009), do hospedeiro (Liu 2019) ou dos ovos (Aquino et al. 2012; Borges et al. 1998). Ainda assim, as características dos sinais podem não ser totalmente confiáveis, uma vez que, muitos estímulos olfativos e visuais são bastante generalizados e difundidos no ambiente (Campbell e Borden 2009). Observando apenas os resultados até a segunda etapa de experimentos, se poderia concluir que estas combinações atrativas seriam estímulos multimodais redundantes. Uma vez que, suas médias do tempo de permanência foram similares às medias observadas para os estímulos avaliados separadamente. No entanto, se obteve uma outra perspectiva a partir dos resultados da terceira etapa.

Na terceira etapa experimental, onde as combinações de tratamentos foram contrastadas com os estímulos oferecidos de forma individual, os resultados sugerem que há a predominância da cor amarela na maioria dos casos, e do rastro em alguns casos. No entanto, diferente do esperado e do observado no segundo experimento, não há nos resultados um caso de estímulos multimodais redundantes (Partan e Marler 1999; Munoz e Blumstein 2012). Os resultados sugerem que, possivelmente, os estímulos visuais e os rastros se sobrepõem em relação aos demais estímulos combinados. Adicionalmente, não se trata também de um estímulo multimodal não redundante, pois os estímulos separadamente incitam a mesma resposta comportamental no parasitoide. Dessa forma, é possível que, os parasitoides identifiquem os rastros químicos e a cor amarela, dentre os tratamentos estudados, como estímulos mais confiáveis, que indicam a provável presença de hospedeiros nas proximidades como propõe o modelo de Laumann et al. (2011). A

hipótese de hierarquia é novamente corroborada quando foram contrastados o rastro e a cor. Neste caso, a cor se sobrepôs ao rastro. Observa-se, portanto, a importância do desenho experimental num trabalho que avalia possíveis relações multimodais dos estímulos. Uma vez que, se fosse considerada apenas a combinação dos estímulos em relação ao controle, como é comum em estudos sobre estímulos multimodais, se poderia sugerir a atuação multimodal redundante e equivalente segundo o definido por Munoz e Blumstein (2012) e Partan e Marler (1999).

Numa condição de campo, os estímulos poderiam atuar de forma multimodal diminuindo as incertezas em um ambiente ruidoso (Partan e Marler 1999; Dall e Johnstone 2002; Munoz e Blumstein 2012). Mas nos testes de laboratório não se observou essa relação de incremento multimodal na atração e retenção dos parasitoides. Outra sugestão seria que o forrageamento dependeria do aprendizado tanto quanto de uma capacidade inata dos parasitoides em perceber os estímulos de forma multimodal. Possivelmente por isso, são bastante desenvolvidos no cérebro dos parasitoides os corpos de cogumelo responsáveis pelo aprendizado, porém também pela interpretação multimodal dos estímulos (van den Berg 2009; Groothuis e Smid 2017). Ademais, não se pode desconsiderar o comportamento baseado em estímulos multimodais, uma vez que o parasitoide poderia utilizar a combinação de demais estímulos como forma de evitar locais inadequados, sendo, portanto, adaptativa uma estratégia que evite estímulos multimodais de forma inata ou aprendida (comportamento decremental) (Campbell e Borden 2009).

Comparados aos insetos com outros hábitos de vida, por exemplo herbívoros, os parasitoides têm sequências comportamentais sequencialmente mais longas para alcançar o recurso (Aartsma et al. 2019). Possivelmente por isso que eles são capazes de interpretar e reconhecer estímulos diversos provenientes de diferentes fontes e naturezas, para

incrementar o forrageamento e minimizar o tempo de busca. Destaca-se que os sistemas sensoriais de insetos evoluíram para perceber as informações mais confiáveis para encontrar o recurso (Aartsma et al. 2019), e os estímulos mais confiáveis aos parasitoides de ovos são os relacionados às características dos ovos, portanto, pouco detectáveis. No entanto, a cor amarela que neste trabalho foi considerada um estímulo associado diretamente a cor do ovo (confiável) do hospedeiro preferencial, é também um estímulo bastante detectável e que causa atração inata em himenópteros de modo geral (Wäckers 1994; Lucchetta et al. 2008).

Portanto, embora todos os estímulos avaliados sejam importantes durante o forrageamento de *T. podisi*, o estímulo visual foi um sinal determinante e influenciou a resposta do parasitoide a estímulos de outra natureza. Adicionalmente, *T. podisi* parece não processar as combinações avaliadas neste estudo de forma multimodal, sendo a cor amarela um superestímulo que se sobressai em relação a outros estímulos. O mesmo parece que acontece com os rastros. Isso talvez tenha sido influenciado pelo tipo de arena utilizada, que colocou o inseto numa situação de procura em curtas distâncias, mais do que em longas distâncias, o que possivelmente favoreceria a resposta aos voláteis. É possível que haja a percepção hierárquica dos estímulos para cada etapa de forrageamento, sendo cada etapa “dominada” por um ou poucos sinais específicos (Webster e Cardé, 2017). Neste caso, a curtas distâncias, há predominância dos estímulos visuais e dos rastros em detrimento de outros. Adicionalmente, de forma contrária ao proposto por Aartsma et al. (2019), aparentemente *T. podisi* utiliza informações unimodais a curtas distâncias durante o forrageamento por hospedeiros. No entanto, também é necessário averiguar o padrão de resposta desses parasitoides nas etapas de forrageamento a longas distâncias, e avaliar se em um contexto de campo a utilização da

cor junto a estímulos voláteis poderia ser uma tática de incremento na atratividade e retenção dos parasitoides.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aartsma Y, Cusumano A, Fernández de Bobadilla M, Rusman Q, Vosteen I, Poelman EH (2019) Understanding insect foraging in complex habitats by comparing trophic levels: insights from specialist host-parasitoid-hyperparasitoid systems. *Curr Opin Insect Sci* 32:54–60.
- Aquino MSF (2011) Estudo do comportamento de busca e seleção de hospedeiros dos parasitoides de ovos *Trissolcus basalis* e *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae). Repositório Institucional da Universidade de Brasília.
- Aquino MSF, Dias AM, Borges M, Blassioli-Moraes MC, Laumann RA (2012) Influence of visual cues on host-searching and learning behaviour of the egg parasitoids *Telenomus podisi* and *Trissolcus basalis*. *Entomol Exp Appl* 145:162–174.
- Benelli G, Canale A (2012) Learning of visual cues in the fruit fly parasitoid *Psytalia concolor* (Szépligeti) (Hymenoptera: Braconidae). *BioControl* 57:767–777.
- Borges M, Colazza S, Ramirez-Lucas P, Chauhan KR, Moraes MCB, Aldrich JR (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 MLM, Sujii ER, Cavalcanti MG, Redígolo GF, Resck IS, Vilela EF (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, Mori K, Costa MLM, Sujii ER (1998a) Behavioural evidence of methyl-2,6,10-trimethyltridecanoate as a sex pheromone of *Euschistus heros* (Het., Pentatomidae). *J Appl Entomol* 122:335–338
- Borges M, Schmidt FGV, Sujii ER, Medeiros MA, Mori K, Zarbin PHG, Ferreira JTB (1998b) 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.
- Boyle SM, Weber DC, Hough-Goldstein J, Hoelmer KA (2020) Host Kairomones Influence Searching Behavior of *Trissolcus japonicus* (Hymenoptera: Scelionidae), a Parasitoid of *Halyomorpha halys* (Heteroptera: Pentatomidae). *Environ Entomol* 49:15–20.
- Bueno AF, Braz EC, Favetti BM, França-Neto JB, Silva GV (2020) Release of the egg parasitoid *Telenomus podisi* to manage the Neotropical Brown Stink Bug, *Euschistus heros*, in soybean production. *Crop Prot* 137:1–7.
- Campbell SA, Borden JH (2009) Additive and synergistic integration of multimodal cues of both hosts and non-hosts during host selection by woodboring insects. *Oikos* 118:553–563.

- Cavaletto G, Faccoli M, Marini L, Spaethe C, Giannone F, Moino S, Rassati D (2020) Exploiting trap color to improve surveys of longhorn beetles. *J Pest Sci* (2004). <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01303-w>
- Colazza S, Salerno G, Wajnberg E (1999) Volatile and contact chemicals released by *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae) have a kairomonal effect on the egg parasitoid *Trissolcus basalis* (Hymenoptera: Scelionidae). *Biol Cont* 16:310–317.
- Colazza S, Fucarino A, Peri E, Salerno G, Conti E, Bin F (2004) Insect oviposition induces volatile emission in herbaceous plants that attracts egg parasitoids. *The J of Expe Biol* 207:47–53.
- Conti E, Salerno G, Bin F, Williams HJ, Vinson SB (2003) Chemical cues from *Murgantia histrionica* eliciting host location and recognition in the egg parasitoid *Trissolcus brochymenae*. *J Chem Ecol* 29:115–130.
- Costa MLM, Borges M, Vilela EF (1998) Biologia reprodutiva de *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae). *An da Soc Entomológica do Bras* 27:559–568.
- Dall SRX, Johnstone RA (2002) Managing uncertainty: Information and insurance under the risk of starvation. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 357:1519–1526.
- Damien M, Barascou L, Ridel A, Baaren JV, Lann CL (2019) Food or host: do physiological state and flower type affect foraging decisions of parasitoids? *Behav Ecol Sociobiol* 73:156.
- Dias AM, Pareja M, Laia M, Blassioli-Moraes MC, Borges M, Laumann RA (2016) Attraction of *Telenomus podisi* to volatiles induced by *Euschistus heros* in three different plant species. *Arthropod Plant Interact* 10:419–428.
- Döring TF, Archetti M, Hardie J, et al (2009) Autumn leaves seen through herbivore eyes. *Proc R Soc B* 276:121–127
- Döring TF, Skellern M, Watts N, Cook SM (2012) Colour choice behaviour in the pollen beetle *Meligethes aeneus* (Coleoptera: Nitidulidae). *Physiol Entomol* 37:360–378.
- Feller KD, Sharkey CR, McDuffee-Altekruse A, Bracken-Grissom DH, Lord NP, Porter ML, Schweikert LE (2021) Surf and turf vision: Patterns and predictors of visual acuity in compound eye evolution. *Arthropod Struct Dev* 60:101002.
- Fischer S, Lu Z, Meinertzhagen IA (2019) Arthropod Structure & Development Three-dimensional ultrastructural organization of the ommatidium of the minute parasitoid wasp *Trichogramma evanescens*. *Arthropod Struct Dev* 48:35–48.
- Gardner J, Hoffmann MP (2020) How important is vision in short-range host-finding by *Trichogramma ostriniae* used for augmentative biological control? *Biocontrol Sci Technol* 30:531–547.
- Groothuis J, Smid HM (2017) *Nasonia* Parasitic Wasps Escape from Haller's Rule by Diphasic, Partially Isometric Brain-Body Size Scaling and Selective Neuropil Adaptations. *Brain Behav Evol* 90:243–254.
- Hatt S, Uyttenbroeck R, Lopes T, Chen JL, Piqueray J, Monty A, Francis F (2018) Effect of flower traits and hosts on the abundance of parasitoids in perennial multiple species wildflower strips sown within oilseed rape (*Brassica napus*) crops. *Arthropod Plant Interact* 12:787–797.
- Haverkamp A, Hansson BS, Knaden M (2018) Combinatorial codes and labeled lines: How insects use olfactory cues to find and judge food, mates, and oviposition sites

- in complex environments. *Front Physiol* 9:1–8.
- Hebets EA, Papaj DR (2005) Complex signal function: Developing a framework of testable hypotheses. *Behav Ecol Sociobiol* 57:197–214.
- Kooi CJ Van Der, Stavenga DG, Arikawa K (2021) Evolution of Insect Color Vision : From Spectral Sensitivity to Visual Ecology. *Annu Rev Entomol* 66:435–61.
- Lagôa ACG, Blassioli Moraes MC, Borges M, Laumann RA (2020) Selective responses of *Trissolcus basalis* and *Telenomus podisi* to chemical footprints of preferred hosts. *Physiol Entomol* 45:60–71.
- Laumann RA, Aquino MFS, Moraes MCB, Pareja M, Borges M (2009) Response of the Egg Parasitoids *Trissolcus basalis* and *Telenomus podisi* to Compounds from Defensive Secretions of Stink Bugs. *J Chem Ecol* 35:8–19.
- Laumann RA, Čokl A, Lopes APS, Ferreira JBC, Moraes MCB, Borges M (2011) Silent singers are not safe: Selective response of a parasitoid to substrate-borne vibratory signals of stink bugs. *Anim Behav* 82:1175–1183.
- Laumann RA, Moraes MCB, Čokl A, Borges M (2007) Eavesdropping on sexual vibratory signals of stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) by the egg parasitoid *Telenomus podisi*. *Anim Behav* 73:637–649.
- Lebhardt F, Desplan C (2017) Retinal perception and ecological significance of color vision in insects. *Curr Opin Insect Sci* 24:75–83.
- Lewis WJ, Jones RL, Nordlund DA, Sparks AN (1975) Kairomones and their use for management of entomophagous insects: I. Evaluation for increasing rates of parasitization by *Trichogramma* spp. in the field. *J Chem Ecol* 1:343–347.
- Lim UT, Ben-Yakir D (2020) Visual sensory systems of predatory and parasitic arthropods. *Biocontrol Sci Technol* 30:728–739.
- Liu MZ (2019) Multimodal strategies of host-seeking mosquitoes. Repositório Institucional The Rockefeller University.
- Lobdell CE, Yong TH, Hoffmann MP (2005) Host color preferences and short-range searching behavior of the egg parasitoid *Trichogramma ostriniae*. *Entomol Exp Appl* 116:127–134.
- Lucchetta P, Bernstein C, Théry M, Lazzari C, Desouhant E (2008) Foraging and associative learning of visual signals in a parasitic wasp. *Anim Cogn* 11:525–533.
- Makarova A, Polilov A, Fischer S (2015) Comparative morphological analysis of compound eye miniaturization in minute hymenoptera. *Arthropod Struct Dev* 44:21–32.
- Mattiacci L, Vinson SB, Williams HJ; Aldrich JR; Bin F (1993) A long-range attractant kairomone for egg parasitoid *Trissolcus basalis*, isolated from defensive secretion of its host, *Nezara viridula*. *J Chem Ecol* 19:1167–1181.
- Mcintosh HR, Skillman VP, Galindo G, Lee JC (2020) Floral Resources for *Trissolcus japonicus*, a Parasitoid of *Halyomorpha halys*. 413: <https://doi.org/10.3390/insects11070413>
- Melo-Machado RC, Sant'Ana J, Blassioli-Moraes MC, Laumann RA, Borges M (2014) Herbivory-induced plant volatiles from *Oryza sativa* and their influence on chemotaxis behaviour of *Tibraca limbativentris* Stal. (Hemiptera: Pentatomidae)

- and egg parasitoids. *Bul Entomol Res* 104:347–356.
- Michereff MFF, Borges M, Laumann RA, Diniz IR, Blassioli-Moraes MC (2013) Influence of volatile compounds from herbivore-damaged soybean plants on searching behavior of the egg parasitoid *Telenomus podisi*. *Entomol Exp Appl* 147:9–17.
- Michereff MFF, Laumann RA, Borges M, Michereff-Filho M, Diniz IR, Neto ALF, Moreae MCB (2011) Volatiles Mediating a Plant-Herbivore-Natural Enemy Interaction in Resistant and Susceptible Soybean Cultivars. *J Chem Ecol* 37:273–285.
- Mohr T, Meinertzhagen IA, Fischer S (2020) Novel type of sub-retinal pigment shield in the miniaturized compound eye of *Trichogramma evanescens*. 528:167–174.
- Moraes MCB, Laumann R, Sujii ER, Pires C, 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 MCB, Pareja M, Laumann RA, Hoffmann-Campo CB, Borges M (2008) Response of the parasitoid *Telenomus podisi* to induced volatiles from soybean damaged by stink bug herbivory and oviposition. *J Plant Interact* 3:111–118.
- Munoz NE, Blumstein DT (2012) Multisensory perception in uncertain environments. *Behav Ecol* 23:457–462.
- Ohsaki B, Shingyouchi T, Sato Y, Kainoh Y (2020) Host recognition by the egg–larval parasitoid *Chelonus inanitus*: effects of physical and chemical cues. *Entomol Exp Appl* 168:742–751.
- Partan S, Marler P (1999) Communication goes multimodal. *Science* 283:1272–1273.
- Partan SR, Marler P (2005) Issues in the classification of multimodal communication signals. *Am Nat* 166:231–245.
- Pérez J, Rojas JC, Montoya P, Kiedo P, González FJ, Castillo A (2012) Size, shape and hue modulate attraction and landing responses of the braconid parasitoid *Fopius arisanus* to fruit odour-baited visual targets. *BioControl* 57:405–414.
- Price PW, Bouton CE, Gross P, et al (1980) Interactions Among Three Trophic Levels: Influence of Plants on Interactions Between Insect Herbivores and Natural Enemies. *Annu Rev Ecol Syst* 11:41–65.
- R Core Team, 2017. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Austria, <https://www.R-project.org>.
- Rankin CH (2009) Introduction to special issue of neurobiology of learning and memory on habituation. *Neurobiol Learn Mem* 92:125–126. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.09.010>
- Rodriguez-Saona C, Urbaneja-Bernat P, Salamanca J, Garzón-Tovar V (2020) Interactive effects of an herbivore-induced plant volatile and color on an insect community in cranberry. *Insects* 11:1–13.
- Rondoni G, Bertoldi V, Malek R, Foti MC, Peri E, Maistrello L, Haye T, Conti E (2017) Native egg parasitoids recorded from the invasive *Halyomorpha halys* successfully exploit volatiles emitted by the plant–herbivore complex. *J Pest Sci* (2004) 90:1087–1095.

- Salerno G, Conti E, Peri E, Colazza E, Bin F (2006) Kairomone involvement in the host specificity of the egg parasitoid *Trissolcus basalus* (Hymenoptera: Scelionidae). *Eur J Entomol* 103:311–318.
- Sevarika M, Foti MC, Peri E, Colazza S, Wajnberg E (2021) Genetic variation in the behavioural mechanisms involved in the response of the egg parasitoid *Trissolcus brochymenae* to contact chemical cues left by the pest *Murgantia histrionica*. *Ecol Entomol* 46:100–105.
- Steidle JLM, van Loon JJA (2002) Chemoecology of parasitoid and predator oviposition behaviour. In: Hilker M, Meiners T (eds) *Chemoecology of Insect Eggs and Egg Deposition*. Blackwell, Berlin, pp 291–318
- Sujii ER, Costa MLM, Pires CSS, Colazza S, Borges M (2002) Inter and intra-guild interactions in egg parasitoid species of the soybean stink bug complex. *Pesqui Agropecu Bras* 37:1541–1549.
- Tognon R, Santana J, Michereff MFF, Laumann RA, Borges M, Blassioli-Moraes MC, Redaelli LR (2020) Kairomones from *Euschistus heros* egg masses and their potential use for *Telenomus podisi* parasitism improvement. *Bull Entomol Res* 110:638–644.
- van Alphen JJM, Vet LEM (1986) An evolutionary approach to host finding and selection. In: Waage JK, Greathead DJ (eds) *Insect parasitoids*. Academic Press, pp 23–61.
- van den Berg M (2009) Tailor-made memory : natural differences in associative olfactory learning in two closely related wasp species. *Repositório Intitucional da Universidade de Wageningen*.
- Vet LEM, Dicke M (1992) Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annu Rev Entomol Vol* 37 141–172.
- Vet LEM, Lewis WJ, Cardé RT (1995) Parasitoid Foraging and Learning. In: *Chemical Ecology of Insects 2*. Springer US, Boston, MA, pp 65–101.
- Vet LEM, Lewis WJ, Papaj DR, van Lenteren JC (1990) A variable-response model for parasitoid foraging behavior. *J Insect Behav* 3:471–490.
- Vinson SB (1975) Biochemical Coevolution between Parasitoids and their Hosts. *Evol Strateg Parasit Insects Mites* 14–48.
- Vinson SB (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.
- Vinson SB (1976) Host Selection by Insect Parasitoids. *Annu Rev Entomol* 21:109–133.
- Vinson SB (1984) Parasitoid-Host Relationship. In: Bell WJ, Cardé RT (eds) *Chemical Ecology of Insects*. Springer US, Boston, MA, pp 205–233.
- Vinson SB, Iwantsch GF (1980) Host Regulation by Insect Parasitoids. *Q Rev Biol* 55:143–165.
- Wäckers FL (1994) The effect of food deprivation on the innate visual and olfactory preferences in the parasitoid *Cotesia rubecula*. *J Insect Physiol* 40:641–649.
- Webster B, Cardé RT (2017) Use of habitat odour by host-seeking insects. 44:1241–1249.

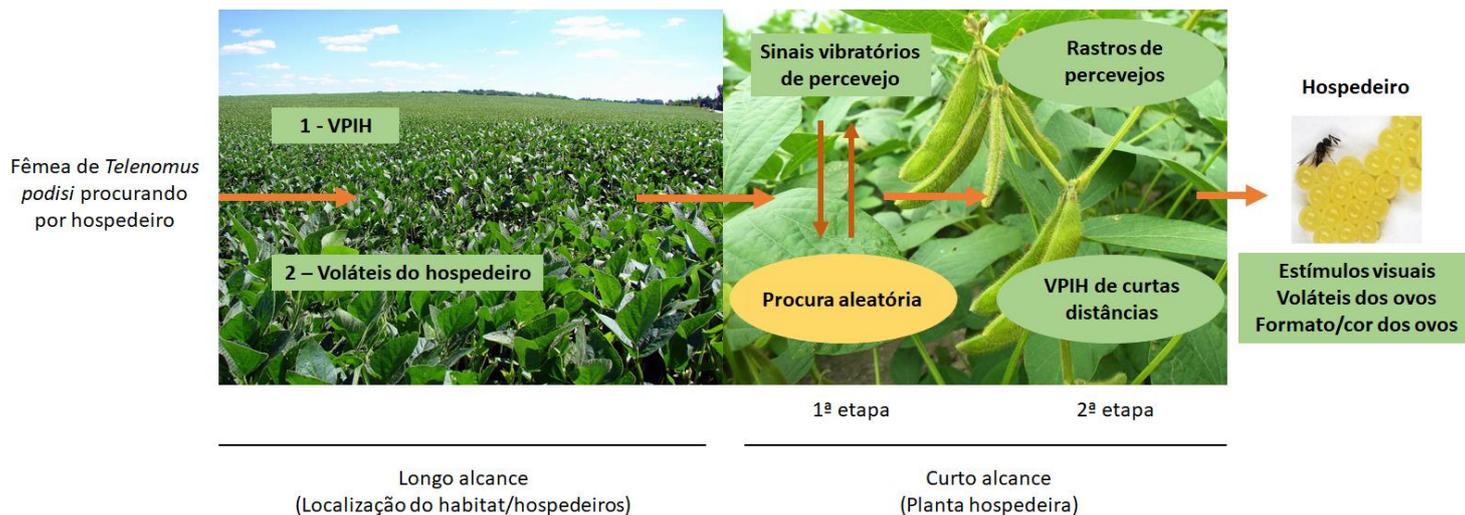
## CAPÍTULO 2

### Resposta de *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae) a sequências hierárquicas de estímulos

#### INTRODUÇÃO

Os ovos dos insetos são estruturas inconspícuas, devido seu pequeno tamanho e por serem depositados, em geral, protegidos na vegetação (Fatouros et al. 2008). Esta característica e a heterogeneidade dos ambientes naturais são desafios durante a busca e seleção de hospedeiros para os parasitoides de ovos. Assim, diversas estratégias comportamentais foram selecionadas de modo a maximizar a busca e seleção por hospedeiros que asseguram o seu sucesso reprodutivo (Vinson 1984). Em geral, estes processos incluem uma sequência de comportamentos definidos como: localização do habitat, localização do hospedeiro, aceitação do hospedeiro, adequabilidade e regulação do hospedeiro (Vinson e Iwantsch 1980; Vinson 1984, 1998; van Alphen e Vet 1986; Steidle e van Loon 2002). As respostas comportamentais de insetos são baseadas na percepção de estímulos físicos e químicos encontrados no ambiente (Vinson 1975, 1984) e percebidos a longas ou curtas distâncias pelos parasitoides (Laumann et al. 2011). Esses estímulos podem ser discriminados de forma inata pelos parasitoides (Vet et al. 1995). Além disso, é possível que os parasitoides reconheçam de forma inata a hierarquia desses estímulos. Ou seja, os parasitoides são capazes de identificar os estímulos mais distantes e os mais próximos ao recurso numa sequência de etapas (Vinson 1976; Laumann et al. 2011).

Laumann et al. (2011) e Blassioli-Moraes et al. (2016), hipotetizaram que para o parasitoide de ovos *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Scelionidae) a hierarquia dos estímulos de longas e curtas distâncias se organiza inicialmente entre os estímulos de longas distâncias que são voláteis de longo alcance, como os voláteis de plantas induzidos por herbivoria (VPIH) e os feromônios sexuais (Borges et al. 1998b; Moraes et al. 2008; Michereff et al. 2011; Dias et al. 2016) e de alarme (Laumann et al. 2009) dos seus hospedeiros. Neste caso, os VPIH seriam mais conspícuos e, portanto, os primeiros sinais acessados durante a busca pelo habitat dos hospedeiros. Os sinais voláteis de longo alcance estimulam o movimento táxico orientado do parasitoide. Quando no habitat do hospedeiro, os parasitoides se guiam por estímulos menos conspícuos de natureza química e física, ou seja, sinais de curto ou menor alcance como os visuais e os sonoros. Nesse contexto, os sinais vibratórios seriam os próximos desta etapa (Laumann et al. 2007, 2011), seguido pelos rastros químicos (Borges et al. 2003; Lagôa et al. 2020) e por fim, pelas características dos ovos, como cor (Aquino et al. 2012), formato (Borges et al. 1998b) e semioquímicos (Tognon et al. 2020) (Figura 1). Nessas etapas a curtas distâncias, o parasitoide desenvolve movimentos direcionais (táxicos) para a vibração, ou ao acaso no habitat. Quando em contato com os demais estímulos desta etapa, os parasitoides podem aumentar a quinese (mudanças nos padrões de movimentação) ou o repouso (arrestamento).



**Figura 1.** Sequência hierárquica dos estímulos químicos e físicos utilizados pelo parasitoide de ovos *Telenomus podisi* quando forrageia por hospedeiros. Adaptado de Laumann et al. (2011).

O comportamento inato é uma estratégia adaptativa fundamental na busca e seleção de hospedeiros (Steidle e van Loon 2002; Fatouros et al. 2008; Haverkamp e Smid 2020), no entanto, os parasitoides são capazes de aprender com o ambiente e assim podem mudar o padrão de resposta decorrente de novas experiências. Essa capacidade é expressa geneticamente (Fischbach e Heisenberg 1984; Vet et al. 1990; van Nouhuys e Via 1999; Sevarika et al. 2021), e é crucial para a sobrevivência e o sucesso reprodutivo de parasitoides (Vet et al. 1995). Portanto, os parasitoides podem aprender com várias experiências durante as etapas de forrageamento, essas experiências podem moldar a seleção de hospedeiros e estratégias de localização subsequentes. O aprendizado pode ser associativo, quando após a experiência o inseto tem um reforço positivo, por exemplo, o encontro dos hospedeiros e consequente oviposição (aprendizagem apetitiva), ou negativo, por uma punição, como a presença de odores nocivos (aprendizagem aversiva) (Little et al. 2019; Haverkamp e Smid 2020). No entanto, há outra forma de aprendizado bastante negligenciada em estudos comportamentais de parasitoides, o aprendizado não

associativo. Neste caso, o contato prévio, sem reforço positivo ou negativo, pode levar a sensibilização ou a habituação do parasitoide (Haverkamp e Smid 2020). De modo geral, a sensibilização está relacionada ao aumento da resposta do indivíduo a um determinado estímulo (Groves e Thompson 1970; Haverkamp e Smid 2020), já na habituação há uma diminuição da resposta do comportamental a um estímulo apresentado repetidamente ou por um tempo prolongado sem recompensa ou punição (Thompson e Spencer 1966; Rankin et al. 2009). Apesar da pouca informação acerca da habituação em parasitoides, especialmente nos insetos da família Scelionidae, esta é uma estratégia onipresente entre os animais (Abram et al. 2017), e tem um papel essencial na diminuição do tempo de forrageamento em locais que não são ou deixaram de ser lucrativos (Waage 1978).

Como já mencionado, o aprendizado dos parasitoides é geralmente avaliado em testes de aprendizagem associativa, mas avaliar o aprendizado não associativo pode ser importante para compreender como as escolhas comportamentais do parasitoide ocorrem de uma forma mais “simples” (Rankin et al. 2009; Little et al. 2019) e especialmente sem um reforço positivo, o que inclusive, pode condicionar a resposta dos insetos a estímulos não favoráveis (Kawamata et al. 2018). Para tanto, neste trabalho avaliou-se a resposta inata e o aprendizado não associativo de *T. podisi* aos principais estímulos associados direta ou indiretamente ao seu hospedeiro preferencial *Euschistus heros* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae). Espera-se que quando os estímulos forem oferecidos aos parasitoides sem experiência, haja preferência inata pelos estímulos subsequentes na sequencia hierárquica, ou seja, terão preferência pelos estímulos que estiverem relacionados mais diretamente ao micro-habitat do hospedeiro. Porém, quando os parasitoides tiverem a experiência prévia a um estímulo, é esperado que este tenha uma resposta menor ao estímulo previamente condicionado, havendo a habituação, como observado para o parasitoide de ovos *Trissolcus basalis* (Wollaston) (Hym.: Scelionidae)

habituação aos rastros químicos de *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae) (Abram et al. 2017). Isto sugere que os parasitoides reconhecem os estímulos presentes no ambiente e preferem, de forma inata, estímulos cada vez mais relacionados ao hospedeiro final. Ou quando experientes, porém sem o reforço positivo, podem alterar o padrão comportamental e inclusive podem forragear em etapas anteriores da sequência hierárquica. Além disso, sugere-se que esses insetos apresentam grande plasticidade comportamental, e portanto, são capazes de se adaptar a informações e experiências novas, avaliando a relevância das informações disponíveis e priorizando-as de acordo com sua confiabilidade (Dukas 2008).

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi estabelecer a hierarquia de uso dos diferentes estímulos durante o comportamento de busca de *T. podisi*. Também se avaliou como a experiência e o aprendizado condicionam o comportamento dos parasitoides frente aos estímulos oferecidos em sequência hierárquica. Portanto, a partir do modelo teórico proposto por Laumann et al. (2011), as hipóteses do trabalho preveem que (1) a resposta a sinais segue uma hierarquia relacionada com a sequência proposta no modelo teórico e (2) as experiências prévias com estímulos relacionados a diferentes etapas do comportamento de busca de hospedeiros, condiciona a resposta a sinais na sequência de estímulos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### **Criação e manutenção dos insetos**

Os insetos foram obtidos de colônias previamente estabelecidas no Laboratório de Semioquímicos da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brasil, mantidos em sala climatizada, sob as condições de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $65 \pm 10\%$  UR e 14 horas de

fotofase. Os parasitoides adultos foram alimentados com mel de abelhas puro e mantidos em gaiolas plásticas (frascos de cultura para tecidos de 25 cm<sup>3</sup>; Biomedicals® ICN; MP Biomedicals, Irvine, Califórnia). Ovos de *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae) (< 24 h) foram usados como hospedeiros e oferecidos às fêmeas acasaladas do parasitoide por um período de 24 horas para oviposição. Ovos parasitados foram mantidos nas mesmas condições ambientais, e as fêmeas recém-emergidas foram divididas em dois grupos: um grupo foi utilizado para a manutenção da colônia e o outro grupo foi utilizado nos bioensaios. Todas as fêmeas de *T. podisi* usadas nos bioensaios tinham idade entre 24 e 48 horas, estavam alimentadas e acasaladas, porém sem experiência de oviposição.

O percevejo-marrom, *E. heros*, foi criado em recipientes plásticos de 8,0 l (gaiolas) com dieta natural a base de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L. [Asteraceae]), amendoim cru (*Arachis hypogaea* L. [Fabaceae]), soja (*Glycine max* L. [Fabaceae]), vagens verdes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L. [Fabaceae]) e buquês de boldo (*Plectranthus barbatus* Andrews [Lamiaceae]) colocados em potes com vermiculita hidratada. As gaiolas foram limpas e o alimento trocado três vezes por semana. No interior das gaiolas foram colocadas tiras de telas de voile (4 x 12 cm) como superfície de oviposição. Diariamente os ovos dos percevejos foram coletados do interior das gaiolas e separados, uma parte para a manutenção da criação de percevejos e outra parte para a manutenção da criação de parasitoides. Após a última muda, os adultos de *E. heros* foram separados por sexo e mantidos em recipientes isolados. Fêmeas virgens de percevejos foram usadas nos experimentos com rastros químicos quando atingiram a maturidade sexual (10-12 dias na idade adulta) (Costa et al. 1998). Os parasitoides e percevejos foram mantidos em salas separadas.

## Bioensaios

### *Arenas experimentais e tratamentos*

Para avaliar o efeito de diferentes estímulos de forma individual ou combinada foram utilizadas arenas de dupla escolha formadas por um bloco quadrado de acrílico (19 x 19 cm) com uma cavidade em forma de Y (1 cm altura x 1.5 cm largura). Essa cavidade foi fechada utilizando-se duas placas de vidro de 0,4 mm colocadas por cima e abaixo do bloco de acrílico. O tronco do Y mede 8,0 cm e cada braço mede 7 cm de comprimento. Esta arena foi adaptada para receber os diferentes tratamentos utilizados nos bioensaios.

Os tratamentos consistiram em estímulos químicos voláteis ( $\alpha$ -farneseno e 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila) e não voláteis (rastros químicos), estímulos mecânicos (vibração do substrato) e visuais (cor do substrato). A seleção destes estímulos considerou a comprovação previa de seus efeitos táticos ou quinéticos para o parasitoides *T. podisi*. O (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno (doravante chamado AF) é um composto majoritário dos voláteis de soja com herbivoria de *E. heros* (Michereff et al. 2011), o 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila (doravante chamado FS) é um composto majoritário do feromônio sexual de *E. heros* (Borges et al. 1998a). Estes dois compostos tem sido relatados como atrativos para *T. podisi* a longa distância (Borges et al. 1999 para o componente do feromônio; Michereff et al. 2011, 2013 para o VPIH) e seriam os principais estímulos utilizados pelo parasitoide nas etapas de localização do habitat. Os sinais vibratórios (doravante chamado SV) são produzidos por *E. heros* durante o comportamento reprodutivo (Blassioli Moraes et al. 2005). É conhecido que *T. podisi* reconhece e responde preferencialmente a SV de fêmeas de *E. heros* sendo este estímulo um forte atrativo para as fêmeas desse parasitoide (Laumann et al. 2007; 2011). Rastros químicos (doravante chamado RQ), constituídos por hidrocarbonetos cuticulares e depositados no substrato durante a locomoção dos insetos, são atrativos e arrestantes para fêmeas de *T. podisi*, que respondem

preferencialmente para RQ de fêmeas de *E. heros* (Borges et al. 2003; Lagôa et al. 2020). Estímulos visuais, representados pela cor amarela, são fortemente atrativos para insetos parasitoides (Wäckers 1994; Lucchetta et al. 2008). Particularmente para *T. podisi* foi demonstrado que a cor amarela do substrato (doravante chamado CA) é um estímulo fortemente atrativo e que atua de forma inata (Aquino et al. 2012). Todos esses estímulos configuram os principais sinais utilizados por *T. podisi* como fonte de informação quando forrageia a longas e curtas distâncias, respectivamente (Laumann et al. 2011).

#### *Experimentos com semioquímicos voláteis*

Em experimentos contendo tratamentos com semioquímicos voláteis, foram utilizadas seringas de vidro de 5,0 ml (1,5 cm de diâmetro externo e 7 cm de comprimento; Arti-Glass, Due Carrare, Itália) que foram conectadas à arena experimental com mangueiras de silicone. No interior da arena foi estabelecida uma corrente de ar utilizando-se bombas de aquário. Uma das bombas foi conectada a um filtro com carvão ativado e a um umidificador. A corrente de ar estabelecida passou posteriormente pelas seringas com os tratamentos e, finalmente foi conduzida para a arena. No extremo oposto da entrada dos tratamentos (tronco da arena) foi adaptada uma bomba para succionar o ar. Desta maneira se estabeleceu um sistema de tipo “push-pull” com fluxo de ar de entrada de 0,4 lpm e fluxo de saída de 0,3 lpm. O fluxo foi regulado mediante fluxômetros e a diferença entre o fluxo de entrada e saída assegurou uma pressão positiva no interior do sistema que evitou a entrada de ar não filtrado e contaminação dos fluxos.

Os semioquímicos voláteis (padrão Sigma Aldrich®) foram contrastados com *n*-hexano, ambos colocados em pedaços de papel filtro com aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> (80 g m<sup>-2</sup>, 205 µm de espessura, 14 µm de poro médio; Qualy J Prolab, Paraná, Brasil) com a utilização de capilares de vidro. Antes de serem colocados dentro das seringas de vidro,

os papeis-filtro foram deixados à temperatura ambiente por 2 minutos até a evaporação do solvente. Dessa forma, 10 µL de AF na concentração de 0,002 mg/ml (dose final 20 ng/papel de filtro) foi contrastado com 10 µL de *n*-hexano. Esta concentração do AF foi selecionada baseada na resposta prévia do parasitoide em bioensaios de olfatometria (Michereff et al. 2013). Foi também contrastado 20 µL de FS na concentração de 0,0001 mg/ml à 20 µL de *n*-hexano. A concentração de FS também foi selecionada baseada na resposta prévia do parasitoide, sendo conhecidamente atrativa ao parasitoide *T. podisi* (Borges et al. 1999).

#### *Experimentos com vibração do substrato*

Nestes experimentos utilizou-se a gravação do canto de acasalamento (FS1) (ver apêndice) de uma fêmea virgem de *E. heros* com 10 dias de idade (Laumann et al. 2007). Esses sinais previamente gravados por Laumann et al. (2007), foram transmitidos por um computador com placa de som externa (Creative, Sound Blaster X-fi 5.1 Pro) utilizando o software Sound Forge 4.5 (Sonic Foundry Inc., Madison, Wisconsin, U.S.A.) para reprodução do arquivo. A vibração do substrato foi gerada seguindo a metodologia descrita em Laumann et al (2007). Um alto-falante conectado à placa de som do computador reproduziu as vibrações que foram transmitidas ao substrato por uma ponteira de pipeta plástica ajustada à membrana do alto-falante com massa de modelar. A ponta da pipeta foi colocada em contato com uma folha de cartolina branca com aproximadamente 1 mm de espessura que se encontrava dentro de um dos braços da arena, para isso, foi feito um furo na superfície inferior do vidro da arena. Dessa forma, a ponta da pipeta tocava o papel transmitindo a vibração da membrana do alto-falante para o substrato. Foram realizadas medições prévias para avaliar a propagação da vibração pelo papel no braço da arena contendo o tratamento (vibração) e no braço do controle.

### *Experimentos com rastros químicos*

Nestes experimentos foram utilizadas arenas impregnadas com o rastro de *E. heros*. Para isto, foram utilizados os procedimentos descritos por Lagôa et al. (2020). Dessa forma, duas fêmeas de *E. heros* foram colocadas em um braço da arena experimental e mantidas isoladas por uma tira de papelão e cobertas com placas de vidro. Os percevejos foram mantidos na arena por uma hora, para que pudessem caminhar e depositar os rastros na superfície do acrílico e do vidro. O outro braço da arena foi mantido limpo. Arenas com fezes ou qualquer outra contaminação não foram utilizadas nos bioensaios.

### *Experimentos com estímulos visuais*

No experimento em que foi avaliada a resposta do parasitoide à cor do substrato (CA), utilizou-se cartolina amarela (Reipel Color Set - amarelo nº 418) cortada aproximadamente um centímetro maior que o do braço da arena (laterais e parte posterior do braço), para que ficasse presa debaixo da placa de acrílico, e na parte anterior (início do braço da arena) a cartolina foi cortada rente à entrada. O outro braço e a parte central da arena não foram cobertos com nenhum substrato. As medidas espectrais da cartolina foram obtidas previamente por Aquino (2011) (ver apêndice).

### *Desenho experimental*

Cada bioensaio consistiu na observação do comportamento de uma fêmea de *T. podisi*. Todas as fêmeas usadas nos bioensaios tinham idade entre 24 e 48 horas, estavam alimentadas e acasaladas, porém sem experiência de oviposição. Todos os experimentos

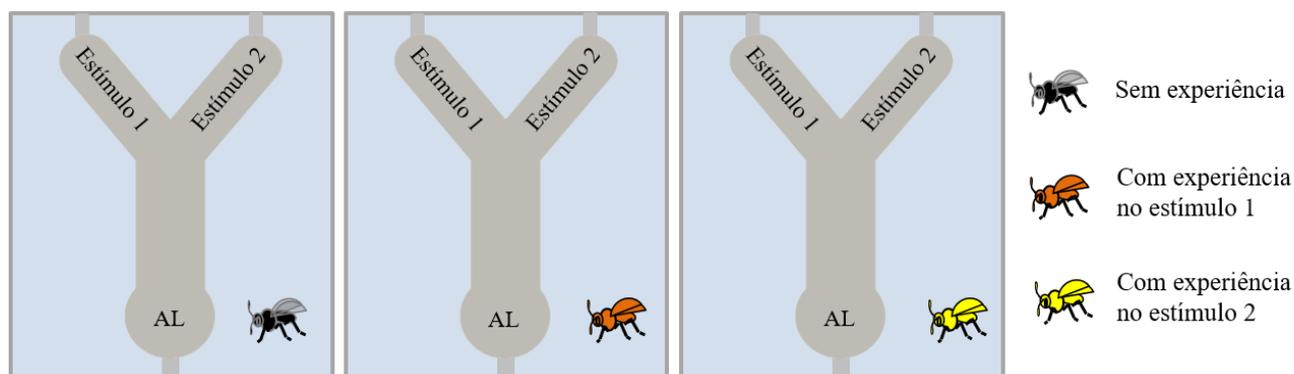
foram realizados em condições de laboratório em sala climatizada a 25 °C, no laboratório de Semioquímicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brasil.

Cada fêmea foi liberada delicadamente na base do tronco da arena (área de liberação) e o seu comportamento observado por um período de 600 s. Foram registrados a escolha inicial e o tempo de residência. A escolha inicial foi considerada após 20 s da entrada do parasitoide em um dos braços da arena e o tempo de residência foi determinado pela soma do tempo em que cada parasitoide permaneceu parado ou forrageando em um dos braços da arena. Cada fêmea foi utilizada apenas uma vez e as posições dos braços da arena foram alternadas a cada cinco bioensaios, para evitar qualquer viés posicional na resposta do parasitoide. No momento da mudança de posição dos tratamentos as arenas acrílicas e os vidros foram substituídos por novos e os já utilizados foram lavados com água e detergente neutro e secos ao ar. Para cada combinação de tratamentos foram realizadas 40 repetições.

#### *Condicionamento comportamental de T. podisi aos estímulos químicos e físicos*

Os experimentos foram separados em três testes diferentes. No primeiro foi avaliada a preferência do parasitoide, sem experiência prévia com quaisquer estímulos, por um dos estímulos oferecidos em arena de dupla escolha (Figura 2, Tabela 1). O segundo teste foi conduzido tal qual o primeiro, no entanto, os parasitoides testados tiveram o contato prévio com o primeiro estímulo da sequência avaliada (Figura 2, Tabela 1). O terceiro teste foi conduzido como o segundo teste. No entanto, o condicionamento prévio foi feito para o segundo estímulo da sequência avaliada (Figura 2, Tabela 1). Foram quatro blocos de estímulos contrastados (Tabela 1), que correspondem a sequência hierárquica dos estímulos atrativos a *T. podisi* (semioquímicos voláteis (doravante chamados AF e FS) > sinais vibratórios (doravante chamado SV) > rastros químicos

(doravante chamado RQ) > cor amarela do substrato (doravante chamada CA)) (Laumann et al. 2011).



**Figura 2.** Esquema dos desenhos experimentais nas três diferentes etapas avaliadas. (AL) área de liberação.

**Tabela 1.** Tratamento oferecidos em cada braço da arena de dupla escolha (“Y”) separadamente, em testes sem experiência prévia de *Telenomus podisi*, e testes com experiência prévia para cada um dos estímulos avaliados. (AF)  $\alpha$ -farneseno, (FS) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila, (SV) sinais vibratórios, (RQ) rastros químicos, e (CA) cor amarela.

Tratamento 1		Tratamento 2	
AF	vs.	FS	
FS	vs.	SV	
SV	vs.	RQ	
RQ	vs.	CA	

O condicionamento foi realizado por 30 a 40 min, onde fêmeas de *T. podisi* foram mantidas em gaiolas plásticas (frascos de cultura para tecidos de 25 cm<sup>3</sup>; Biomedicals®

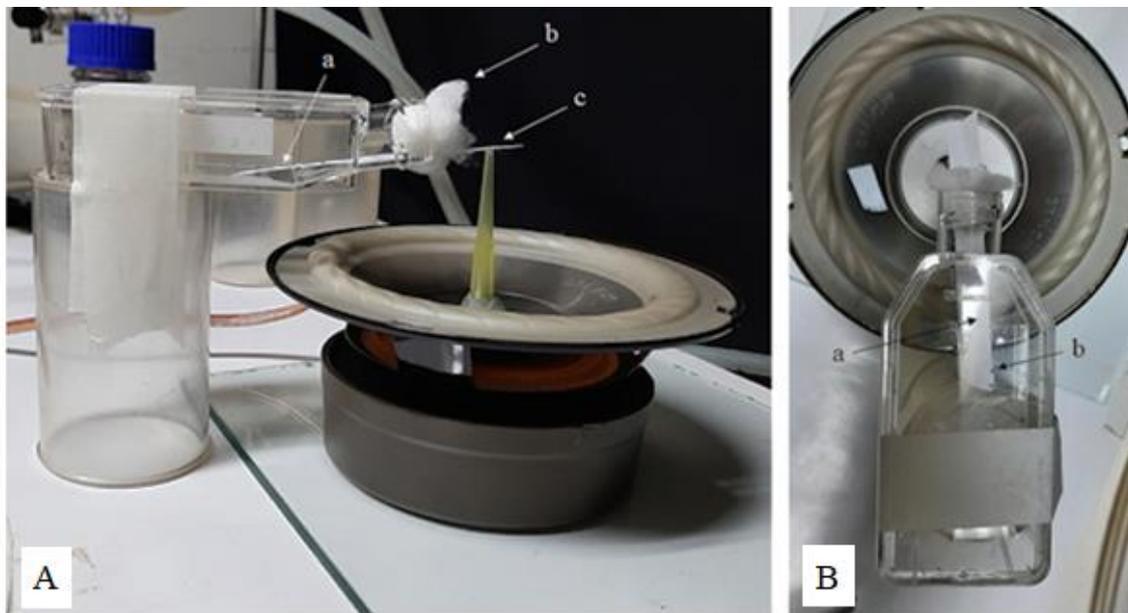
ICN; MP Biomedicals, Irvine, Califórnia) adaptadas para cada tipo de tratamento. Para o condicionamento com os semioquímicos voláteis, a gaiola foi adaptada sendo retirado o fundo da gaiola e colocado uma tela de arame para a ventilação da gaiola e diminuição da saturação interna pelos voláteis (Figura 3). As quantidades e concentrações dos tratamentos foram as mesmas utilizadas nos bioensaios, sendo utilizado, portanto, 10  $\mu$ L  $\alpha$ -farneseno na concentração de 0,002 mg/ml e 20  $\mu$ L 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila na concentração de 0,0001 mg/ml. Os semioquímicos foram colocados em papéis filtro e após 2 min em temperatura ambiente para a evaporação do solvente, foram deixados dentro da gaiola junto às fêmeas de *T. podisi* (Figura 3).



**Figura 3.** Condicionamento de *Telenomus podisi* aos semioquímicos voláteis  $\alpha$ -farneseno e 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila, separadamente. (A) vista geral da gaiola adaptada com (a) as fêmeas de *T. podisi* e (b) o papel filtro contendo o semioquímicos. (B) outro ângulo de visão da gaiola adaptada. (C) fundo da gaiola adaptada com (a) a tela de arame.

Para o condicionamento dos parasitoides nos sinais vibratórios uma nova gaiola foi utilizada. No interior da gaiola foi colocada uma tira de cartolina branca que estava conectada à ponta de uma pipeta plástica, que por sua vez, estava conectada à membrana

de um alto falante através de massa plástica de modelar (Figura 4). A entrada da gaiola foi fechada delicadamente com um pequeno chumaço de algodão (Figura 4). Utilizou-se a gravação do canto de acasalamento de uma fêmea virgem de *E. heros* com 10 dias de idade (Laumann et al. 2007). Esses sinais foram transmitidos por um computador com placa de som externa (Creative, Sound Blaster X-fi 5.1 Pro) utilizando o software Sound Forge 4.5 (Sonic Foundry Inc., Madison, Wisconsin, U.S.A.) para reprodução do sinal vibratório. Esse sistema foi conectado a um alto-falante que foi ligado ao sistema de condicionamento supracitado.



**Figura 4.** Condicionamento de *Telenomus podisi* à vibração do substrato. (A) vista geral do condicionamento, (a) cartolina dentro da gaiola, (b) pequeno chumaço de algodão, (c) cartolina em contato com a ponta da pipeta plástica. (B) Vista superior da gaiola, (a) fita de cartolina, (b) fêmea de *T. podisi* em contato direto com a superfície vibrada.

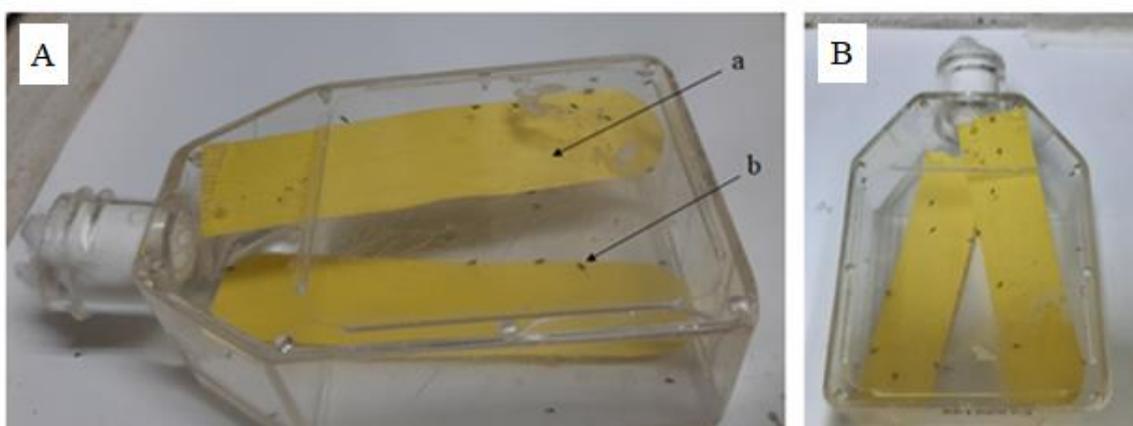
Por sua vez, o condicionamento do parasitoide nos rastros químicos foi conduzido em uma gaiola, onde em seu interior foram liberadas previamente duas fêmeas de *E. heros* por 1 hora (Figura 5). Gaiolas com quaisquer contaminações (fezes, saliva, oviposição)

foram descartadas. Depois deste período de deposição dos rastros, os percevejos foram retirados e as fêmeas de *T. podisi* liberadas dentro da gaiola.



**Figura 5.** Gaiola contendo duas fêmeas de *Euschistus heros* para deposição dos rastros químicos. (a) fêmea de *E. heros*.

Para o condicionamento ao substrato colorido, no interior de outra gaiola foram colocadas tiras de cartolina amarela (Reipel Color Set - amarelo n° 418) junto às fêmeas de parasitoide (Figura 6).



**Figura 6.** Condicionamento de *Telenomus podisi* à cor amarela do substrato. (A) vista geral do condicionamento, (a) cartolina amarela dentro da gaiola, (b) fêmea de *T. podisi*. (B) Vista superior da gaiola.

## **Análises estatísticas**

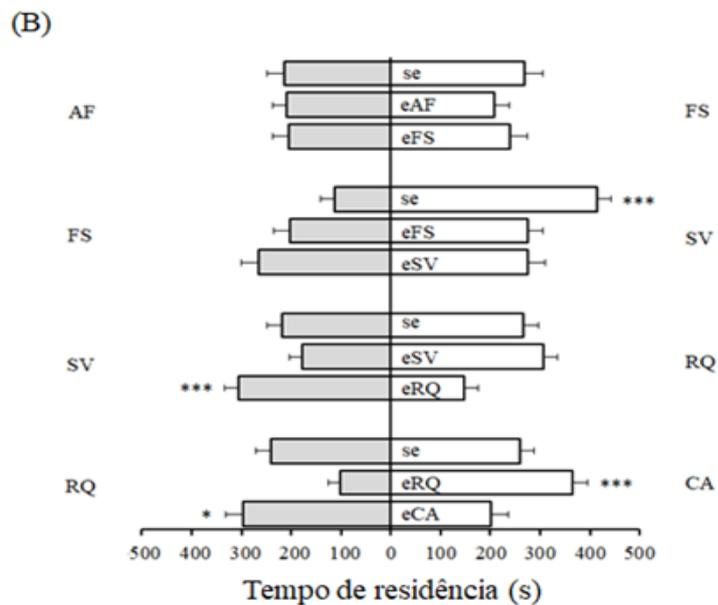
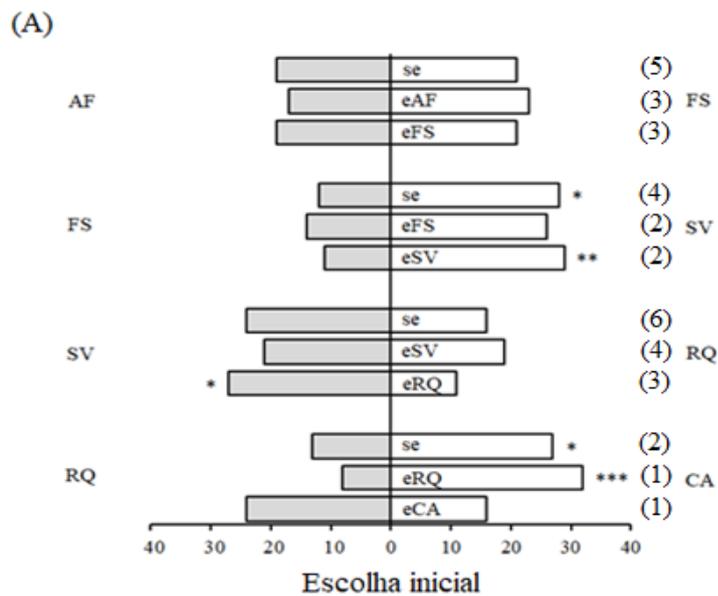
Para determinar a preferência por algum dos estímulos, a proporção de escolhas iniciais entre tratamentos ou controle foi comparada utilizando um modelo de regressão logística (GLM com distribuição binomial de erros). A hipótese de não preferência (distribuição da escolha igual a 50% em cada braço da arena) foi avaliada com o teste de  $\chi^2$  de Wald. O teste foi aplicado separadamente para cada parasitoide e para cada combinação de tratamentos.

Para avaliar como o tempo de residência (variável resposta) é afetado pelos estímulos em relação ao controle ou aos tratamentos (variáveis preditoras) foi ajustado um Modelo Linear Generalizado (GLM) com distribuição de Poisson ou binomial negativo. O modelo foi ajustado separadamente para cada combinação de tratamentos e condições das fêmeas. A significância dos fatores foi acessada pela Análise de Deviance (ANODEV). Todas as análises foram realizadas utilizando o software R (R Development Core Team, 2017) a um nível de significância de 5%.

## **RESULTADOS**

Nos experimentos em que foram avaliadas as respostas de *T. podisi* à escolha de AF vs. FS não foi observada diferenças na escolha inicial e no tempo de residência dos parasitoides sem experiência prévia ou com experiência prévia com AF ou FS, separadamente (Figura 1, Tabela 2). Quanto a resposta de *T. podisi* ao FS vs. SV, houve preferência inicial pelos SV nos testes sem experiência prévia e com experiência prévia em SV. O tempo de residência foi significativamente maior apenas no braço da arena contendo SV no teste sem experiência prévia (Figura 1, Tabela 2). Quando avaliada a resposta do parasitoide ao SV vs. RQ, foi observada que a escolha inicial e o tempo de

residência foram afetados apenas pelo SV nos testes com experiência prévia em RQ (Figura 1, Tabela 2). A escolha inicial do parasitoide quando comparados os RQ e a CA foi maior para o braço da arena contendo CA nos testes sem experiência prévia e com experiência prévia em RQ. O tempo de residência foi maior na CA no teste com experiência em RQ, e foi maior em RQ no teste com experiência em CA (Figura 1, Tabela 2).



**Figura 7.** (A) proporção da escolha inicial de *Telenomus podisi*. (B) média  $\pm$  SE do tempo de residência do parasitoide *T. podisi* para os diferentes estímulos oferecidos em cada braço da arena separadamente. (AF)  $\alpha$ -farneseno, (FS) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila, (SV) sinais vibratórios, (RQ) rastros químicos, e (CA) cor amarela, (se) sem experiência, (eAF) experiência em  $\alpha$ -farneseno, (eFS) experiência em 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila, (eSV) experiência em sinais vibratórios, (eRQ) experiência em rastros químicos, (eCA) experiência na cor amarela. \* Diferenças significativas entre os tratamentos (\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001) por análise de modelos lineares generalizados (GLM) com (A) distribuição binomial e (B) Poisson ou binomial negativo. Números entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum dos tratamentos após 3 minutos.

**Tabela 2.** Efeito dos tratamentos na escolha inicial e tempo de residência (s) (média  $\pm$  SE) de *Telenomus podisi* quando exposto a diferentes estímulos oferecidos em cada braço da arena de dupla escolha (“Y”), separadamente em testes sem experiência prévia de *T. podisi*, e testes com experiência prévia para cada um dos estímulos avaliados. (AF)  $\alpha$ -farneseno, (FS) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila, (SV) sinais vibratórios, (RQ) rastros químicos, e (CA) cor amarela.

Tratamento	Sem experiência		Experiência (1)		Experiência (2)	
	Escolha inicial	Tempo de residência	Escolha inicial	Tempo de residência	Escolha inicial	Tempo de residência
AF (1) vs. FS (2)	Z=-0,316, <i>df</i> =1, P=0,752	$\chi^2 = 0,552$ , <i>df</i> =1, P=0,457	Z=-0,945, <i>df</i> =1, P=0,345	$\chi^2=0,065$ , <i>df</i> =1, P=0,799	Z=-0,316, <i>df</i> =1, P=0,752	$\chi^2=0,435$ , <i>df</i> =1, P=0,509
FS (1) vs. SV (2)	Z=-2,456, <i>df</i> =1, P=0,014	$\chi^2=38,237$ , <i>df</i> =1, P<000,1	Z=-1,867, <i>df</i> =1, P=0,062	$\chi^2=2,496$ , <i>df</i> =1, P=0,114	Z=-2,738, <i>df</i> =1, P=0,006	$\chi^2=0,859$ , <i>df</i> =1, P=0,354
SV (1) vs. RQ (2)	Z=1,256, <i>df</i> =1, P=0,209	$\chi^2=0,218$ , <i>df</i> =1, P=0,641	Z=0,316, <i>df</i> =1, P=0,752	$\chi^2=2,897$ , <i>df</i> =1, P=0,089	Z=2,51, <i>df</i> =1, P=0,012	$\chi^2=19,129$ , <i>df</i> =1, P<000,1
RQ (1) vs. CA (2)	Z=-2,165, <i>df</i> =1, P=0,030	$\chi^2=0,930$ , <i>df</i> =1, P=0,335	Z=-3,507, <i>df</i> =1, P=0,0004	$\chi^2=27,534$ , <i>df</i> =1, P<000,1	Z=1,256, <i>df</i> =1, P=0,209	$\chi^2=4,649$ , <i>df</i> =1, P=0,031

## DISCUSSÃO

Este trabalho representa o primeiro esforço de análise do comportamento de forrageamento de um parasitoide, em relação a possível sequência hierárquica de estímulos. Ademais, foi avaliada a resposta do parasitoide inexperiente (resposta inata) e com experiência (aprendizado não associativo) a diferentes estímulos. Ao serem contrastados os semioquímicos (AF vs. FS) não foi observada preferência pela fêmea do parasitoide (experientes ou inexperientes) por nenhum destes tratamentos. No entanto, houve preferência inata (indicada pela escolha inicial e tempo de residência) pelo SV em relação ao FS, e também aprendida nos parasitoides com experiência em SV (manifestada neste caso pelo tempo de residência). Entre SV e RQ não foi observada a preferência inata por nenhum dos tratamentos, no entanto, foi observada a preferência por SV apenas para os parasitoides condicionados a RQ. Quando contrastado RQ e CA, o parasitoide apresentou resposta inata inicial para a cor, porém continuou forrageando alternando a procura direcionada e a aleatória entre os dois tratamentos. Ambos os parasitoides experientes (RQ e CA) forragearam mais tempo no tratamento oposto ao condicionado.

A partir dos resultados obtidos é sugerido que os modelos teóricos anteriores, assim como a hipótese deste trabalho foram corroborados em parte. Foi observado uma forte escolha inata por um estímulo de curtas distâncias (CD), o SV, em relação a um estímulo de longas distâncias (LD) (FS), sugerindo que a percepção de estímulos que atuam em diferentes escalas espaciais tem componentes comportamentais diferenciados o que pode estar relacionado com a sequência hierárquica da utilização destes estímulos durante o forrageamento. A partir dos resultados apresentados no Capítulo 1 e neste capítulo é possível concluir que o comportamento de forrageamento de *T. podisi* é claramente influenciado e modulado por estímulos que atuam sobretudo em forma individual e sequencial. No entanto, e em concordância com o proposto no modelo de

Laumann et al. (2011), nas diferentes etapas do forrageamento o parasitoide pode apresentar busca aleatória não sendo orientado por nenhum estímulo particular. O sugerido é que as fêmeas de *T. podisi* distribuíram o tempo de procura em ambos os tratamentos (tempo de residência similar) (AF vs. FS, SV vs. RQ e RQ vs. CA), pela alternância da movimentação táxica e quinética nos tratamentos (observação pessoal) (Figura 8).

Seria esperado que os parasitoides experientes apresentassem habituação ao estímulo condicionado, mostrando respostas preferenciais ao estímulo contrastado com ele, que representa o estímulo seguinte na sequência de comportamentos do parasitoide. A habituação é um processo fundamental de sobrevivência em uma enorme variedade de seres vivos, desde os menos complexos como protozoários unicelulares à seres humanos (Rankin 2009; Estrada et al. 2020; Varnon e Adams et al. 2021; Smith-Ferguson et al. 2021; Giunti et al. 2021), considerada a base para tipos de aprendizagens mais complexos (Rankin et al. 2009), porém pouco estudada em parasitoides. No entanto, esse padrão foi observado apenas para parasitoides que depois do condicionamento a RQ tiveram a opção de escolha por SV ou CA, e para os parasitoides com experiência em CA quando oferecido RQ. Uma das definições de habituação clássica, considerada uma das formas mais simples de aprendizagem, prevê que o animal dispensará gradualmente menos tempo em áreas onde não há um reforço positivo (Giles e Rankin 2009; Rankin 2009; Rankin et al. 2009). Era esperado que em todos os testes com condicionamento prévio fosse observada a habituação clássica dos parasitoides, preferindo o estímulo na sequência. No entanto, os resultados sugerem que este fenômeno pode acontecer somente quando fêmeas de *T. podisi* foram expostas a estímulos que atuam a curta distância. Como observado, há escolha inata por rastros químicos (RQ) de *E. heros* por *T. podisi* oferecido isoladamente (Capítulo 1; Lagôa et al. 2020), no entanto, a resposta é modificada pela

experiência sem recompensa, havendo diminuição da intensidade da resposta pelo RQ e consequente escolha por outros estímulos. Isto pode ser influenciado por uma maior estimulação do parasitoide para aumentar os comportamentos de procura por estímulos de curta distância relacionados a alta probabilidade de encontro do hospedeiro.

Um padrão similar de habituação ao RQ foi observado para o parasitoide *T. basalis* aos rastros de *N. viridula* (Abram et al. 2017; Boyle et al. 2020), mas a resposta inata ao RQ pode ser restaurada por um reforço positivo (recompensa) encontrado na mesma área, por exemplo uma chance de oviposição (Peri et al. 2016). No entanto, esses autores não avaliaram a possibilidade de escolha do parasitoide habituado por outro estímulo. Colocando mais esta camada na observação comportamental de *T. podisi*, é possível sugerir que o comportamento deste parasitoide é bastante plástico com mudanças rápidas em relação à resposta a estímulos específicos, pelo menos em situações a curtas distâncias.

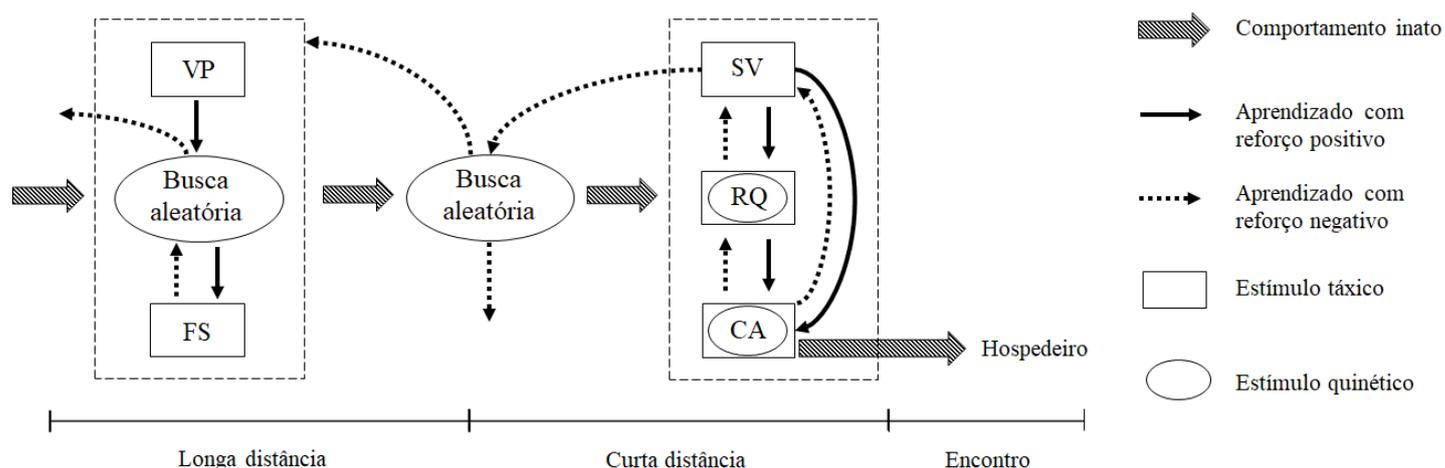
Outra possível hipótese para os padrões observados para RQ e CA, é que a janela de tempo para a habituação de uma parasitoide a um desses sinais é menor do que a janela de tempo para os demais estímulos. Porém, não foram encontrados trabalhos prévios reportando a habituação de um parasitoide a um volátil condicionado em laboratório, assim como não foi testado anteriormente o condicionamento de um parasitoide aos sinais vibratórios do hospedeiro, que permitam uma comparação adequada. Por outro lado, uma hipótese adicional sugere que tenha ocorrido uma situação de desabituação (Rankin et al. 2009) dos estímulos AF, FS e SV. A desabituação é também um comportamento de aprendizado não associativo, que prevê que um organismo quando habituado a um estímulo pode desabituar-se dele quando apresentado outro estímulo diferente, ou seja, volta a ser responsivo ao estímulo originalmente habituado após o contato com outro estímulo (Rankin et al. 2009). Apesar de não ter sido encontrado nenhum outro caso de

desabituação para parasitoides de ovos na literatura, existem trabalhos conduzidos especialmente com humanos e outros vertebrados (Thompson 2009), também com invertebrados, por exemplo, a lesma do mar *Aplysia sp.* (Opisthobranchia: Aplysiidae) (Gover e Abrams 2009), crustáceos isópodes (Hackl e Robertson 2019), *Manduca sexta* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae) (Wiel e Weeks 1996), *Drosophila* spp. (Diptera: Drosophilidae) (Engel e Wu 2009), *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) (Haupt e Klemm 2005), *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae) (Giunti et al. 2021).

Baseado nestes resultados e em trabalhos prévios (Laumann et al. 2011; Blassioli-Moraes et al. 2016), se propõe um novo modelo teórico das etapas de forrageamento de *T. podisi* durante a busca por hospedeiros (Figura 8). O modelo sugere que existem dois locais de forrageamento, um a longas distâncias (LD) e outro a curtas distâncias (CD). No LD, o parasitoide é atraído inicialmente de forma inata pelos semioquímicos voláteis relacionados direta e indiretamente ao hospedeiro. Neste momento o parasitoide pode ter sido atraído tanto pelo AF quanto pelo FS (porém, principalmente AF por ser mais conspicuo), estimulando uma busca direcional (movimentação táxica rápida e constante (observação pessoal)). Se ele encontrar primeiro o volátil de planta (doravante chamado VP), começa a forragear aleatoriamente e pode encontrar o FS (reforço positivo) ou mesmo o habitat do hospedeiro (reforço positivo) e então começar novamente e de forma inata uma busca aleatória por demais sinais / pistas do hospedeiro. Se o parasitoide estiver forrageando e não encontrar nenhum outro sinal ele abandona o local. Se, no entanto, ele encontrou inicialmente o FS, começa uma busca aleatória, podendo tanto encontrar o AF, ou o habitat do hospedeiro (planta onde há a emissão do semioquímico), assim como pode não encontrar nenhum outro sinal e abandonar o local.

Durante a procura randômica, iniciada no habitat, e a ser exposta a estímulos de CD, *T. podisi* responderia, inicialmente, de forma inata aos mesmos. É sugerido que neste

local o parasitoide pode encontrar aleatoriamente qualquer um dos estímulos, no entanto aqueles mais conspícuos são mais prováveis de serem percebidos primeiro, por exemplo os SV, porém não há a preferência inicial por nenhum deles. O padrão geral de forrageamento em CD será o mesmo entre os estímulos, salvo quando o parasitoide já encontrou o hospedeiro ou sinais muito próximos aos seu micro-habitat, como os voláteis dos ovos (Tognon et al. 2020), cola de aderência dos ovos (Conti et al. 2003) e mesmo a cor dos ovos (Aquino et al. 2012). Se o parasitoide neste local tem contato com o SV, há a possibilidade de encontrar outro sinal como o RQ ou a CA (reforço positivo) ou pode não encontrar nenhum outro sinal. Isto faz o parasitoide iniciar uma nova busca aleatória abandonando esse local e reiniciando a busca a LD. Se, no entanto, encontrar posteriormente ao SV o RQ (reforço positivo) ele continua forrageando, porém, o movimento fica mais lento (quinese), com paradas frequentes durante o forrageamento nas áreas com RQ (observação pessoal), ainda assim o movimento pode ser aleatório sendo alternado o forrageamento entre SV e RQ. No entanto, se a experiência prévia for em RQ o parasitoide apresentará o comportamento de habituação clássica, preferindo forragear em outro estímulo, e isto foi verificado para parasitoides que, depois do condicionamento em RQ, tiveram a opção de escolha por SV ou CA. Esse padrão de habituação também foi observado nos parasitoides com experiência em CA quando oferecido RQ.



**Figura 8.** Modelo teórico das etapas de forrageamento de *Telenomus podisi* durante a busca por hospedeiros (ovos de *Euschistus heros*) considerando o comportamento inato e o aprendido.

Independente da discussão realizada, para parasitoides, a escolha entre permanecer forrageando e sair do local de forrageio é influenciada principalmente pelo tempo de forrageamento, uma vez que, a maioria das espécies de parasitoides são limitadas no tempo, incapazes de encontrar hospedeiros suficientes para colocar todos os seus ovos antes de morrerem (Waage 1979; Nelson e Roitberg 1995; Wajnberg 2006). Portanto, a plasticidade de comportamentos e possibilidade de mudar os estímulos utilizados durante o forrageamento podem ser uma vantagem adaptativa para fêmeas de parasitoides, especialmente para aquelas com hospedeiros distribuídos de forma irregular no ambiente, sendo o sucesso reprodutivo intimamente ligado ao balanço entre o tempo de forrageamento em locais adequados e inadequados (Nelson e Roitberg 1995).

É importante ressaltar que o complexo processo de forrageamento e uso de estímulos pelos parasitoides na natureza sofre interferência de muitas variáveis abióticas e bióticas, por exemplo temperatura e pressão atmosférica (Abram et al. 2015; Moiroux et al. 2015; Augustin et al. 2020), a competição intraespecífica e interespecífica entre

fêmeas de parasitoide (Kishani Farahani et al. 2019; Iranipour et al. 2020), interação com outros insetos (Tena et al. 2017; Milosavljevic et al. 2021), as condições fisiológicas das fêmeas (Farahani et al. 2021) e também da aprendizagem associativa (Bertoldi et al. 2021; de Bruijn et al. 2021). Em certa medida, algumas das proposições do modelo de forrageamento deste trabalho podem ser hipóteses que pretendem incluir, pelo menos em parte, a enorme complexidade do comportamento de forrageamento dos parasitoide por hospedeiros.

Observadas as características dos ovos e da distribuição dos hospedeiros em agroecossistemas, é possível presumir que o forrageamento do parasitoide de ovos e a sua resposta aos estímulos relacionados direta e indiretamente ao hospedeiro seria mais complexo do que modelos teóricos anteriores propõem. Uma série de variáveis influenciam o processo de busca por hospedeiros, e a determinação do tempo alocado em cada local está intimamente relacionada à essas variáveis. Portanto, considerando a capacidade inata dos parasitoides em encontrar os estímulos e a notável atração que estes causam a eles, e também possíveis encontros sem recompensa causando a habituação em relação aos estímulos encontrados previamente, foi proposto um modelo que considera as possíveis situações e os comportamentos dos parasitoides quando forrageiam e encontram ao longo do processo, estímulos diretamente e indiretamente relacionados aos ovos. Neste modelo, é proposto que a resposta a estímulos nos parasitoides pode ser feita de forma inata e aprendida, e essas duas modalidades interagem de forma complexa e permeada por tomadas de decisões rápidas. Testes conduzidos em laboratório são importantes para compreender padrões comportamentais sem interferência ambiental, no entanto, testes em campo são fundamentais para uma melhor compreensão do comportamento de busca por hospedeiros e sua complexidade em ambientes naturais ou agroecossistemas. Porém, há uma evidente problemática metodológica quanto aos

experimentos em campo, o que dificulta a compreensão do aprendizado e das tomadas de decisões pelos insetos (de Bruijn et al. 2021). É crucial que novas ferramentas sejam utilizadas (e.g. um sistema multi-câmera de monitoramento de parasitoides em campo), e desenvolvidas para que seja possível fazer projeções mais robustas e realistas acerca do comportamento de parasitoides na complexidade do ambiente (de Bruijn et al. 2021).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abram PK, Cusumano A, Abram K, Colazza S, Peri E (2017) Testing the habituation assumption underlying models of parasitoid foraging behavior. *PeerJ* 2017:1–11.
- Abram PK, Cusumano A, Peri E, Brodeur J, Boivin G, Colazza S (2015) Thermal stress affects patch time allocation by preventing forgetting in a parasitoid wasp. *Behav Ecol* 26:1326–1334.
- Aquino MSF (2011) Estudo do comportamento de busca e seleção de hospedeiros dos parasitoides de ovos *Trissolcus basal* e *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae). Repositório Institucional da Universidade de Brasília.
- Aquino MSF, Dias AM, Borges M, Blassioli-Moraes MC, Laumann RA (2012) Influence of visual cues on host-searching and learning behaviour of the egg parasitoids *Telenomus podisi* and *Trissolcus basal*. *Entomol Exp Appl* 145:162–174.
- Augustin J, Boivin G, Brodeur J, Bourgeois G (2020) Effect of temperature on the walking behaviour of an egg parasitoid: disentangling kinetic response from integrated response. *Ecol Entomol* 45:741–750.
- Bertoldi V, Rondoni G, Peri E, Conti E, Brodeur J (2021) Learning can be detrimental for a parasitic wasp. *PLoS One* 16:11–13.
- Blassioli-Moraes MC, Borges M, Michereff MFF, Magalhães MFF, Laumann RA (2016) Semiochemicals from plants and insects on the foraging behavior of Platygastriidae egg parasitoids. *Pesqui Agropecu Bras* 51:454–464.
- Blassioli-Moraes MC, Laumann RA, Sujii ER, Pires C, 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.
- Borges M, Colazza S, Ramirez-Lucas P, Chauhan KR, Moraes MCB, Aldrich JR (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 MLM, Sujii ER, Cavalcanti MG, Redígolo GF, Resck IS, Vilela EF (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, Mori K, Costa MLM, Sujii ER (1998a) Behavioural evidence of methyl-2,6,10-trimethyltridecanoate as a sex pheromone of *Euschistus heros* (Het., Pentatomidae). *J Appl Entomol* 122:335–338
- Borges M, Schmidt FGV, Sujii ER, Medeiros MA, Mori K, Zarbin PHG, Ferreira JTB (1998b) 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.
- Boyle SM, Weber DC, Hough-Goldstein J, Hoelmer KA (2020) Host Kairomones Influence Searching Behavior of *Trissolcus japonicus* (Hymenoptera: Scelionidae), a Parasitoid of *Halyomorpha halys* (Heteroptera: Pentatomidae). *Environ Entomol* 49:15–20.
- Conti E, Salerno G, Bin F, Williams HJ, Vinson SB (2003) Chemical cues from *Murgantia histrionica* eliciting host location and recognition in the egg parasitoid *Trissolcus brochymenae*. *J Chem Ecol* 29:115–130.
- Costa MLM, Borges M, Vilela EF (1998) Biologia reprodutiva de *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae). *An da Soc Entomológica do Bras* 27:559–568.
- de Bruijn JAC, Vosteen I, Vet LEM, Smid HM, de Boer JG (2021) Multi-camera field monitoring reveals costs of learning for parasitoid foraging behaviour. *J Anim Ecol* 0–2.
- Dias AM, Pareja M, Laia M, Blassioli-Moraes MC, Borges M, Laumann RA (2016) Attraction of *Telenomus podisi* to volatiles induced by *Euschistus heros* in three different plant species. *Arthropod Plant Interact* 10:419–428.
- Dukas R (2008) Evolutionary biology of insect learning. *Annu Rev Entomol* 53:145–160.
- Engel JE, Wu C (2009) Neurobiology of Learning and Memory Neurogenetic approaches to habituation and dishabituation in *Drosophila*. *Neurobiol Learn Mem* 92:166–175.
- Estrada S, Richards C, Gee DG, Baskin-sommers A (2020) Exposure to Violence and Nonassociative Learning Capability Confer Risk for Violent Behavior. 129:748–759.
- Farahani HK, Moghadassi Y, Pierre J, Kraus S (2021) Poor adult nutrition impairs learning and memory in a parasitoid. <https://doi.org/10.1101/2021.01.09.426073>
- Fatouros NE, Dicke M, Mumm R, Meiners T, Hilker M (2008) Foraging behavior of egg parasitoids exploiting chemical information. *Behav Ecol* 19:677–689.
- Fischbach KF, Heisenberg M (1984) Neurogenetics and behaviour in insects. *J Exp Biol* 112:65–93.
- Giles AC, Rankin CH (2009) Behavioral and genetic characterization of habituation using *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiol Learn Mem* 92:139–146.
- Giunti G, Campolo O, Laudani F, Zappalà L, Palmieri V (2021) Bioactivity of essential oil-based nano-biopesticides toward *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *Ind Crops Prod* 162:113257.
- Gover TD, Abrams TW (2009) Insights into a molecular switch that gates sensory neuron synapses during habituation in *Aplysia*. *Neurobiol Learn Mem* 92:155–165.
- Groves PM, Thompson RF (1970) Habituation: A dual-process theory. *Psychol Rev*

77:419–450.

- Hackl AN, Robertson MW (2019) Habituation and dishabituation to a heat stimulus by woodlice, *Armadillidium vulgare* (Isopoda: Armadillidiidae). *Bios* 90:239–244
- Hatt S, Uyttenbroeck R, Lopes T, et al (2018) Effect of flower traits and hosts on the abundance of parasitoids in perennial multiple species wildflower strips sown within oilseed rape (*Brassica napus*) crops. *Arthropod Plant Interact* 12:787–797. <https://doi.org/10.1007/s11829-017-9567-8>
- Haupt SS, Klemt W (2005) Habituation and dishabituation of exploratory and appetitive responses in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Behav Brain Res* 165:12–17.
- Haverkamp A, Smid HM (2020) A neuronal arms race: the role of learning in parasitoid–host interactions. *Curr Opin Insect Sci* 42:47–54
- Iranipour S, Benamoleai P, Asgari S, Michaud JP (2020) Foraging egg parasitoids, *Trissolcus vassilievi* (Hymenoptera: Platygasteridae), respond to host density and conspecific competitors in a patchy laboratory environment. *J Econ Entomol* 113:760–769.
- Kawamata R, Sato Y, Suzuki M, Kainoh Y (2018) Color Preference and Associative Color Learning in a Parasitoid Wasp, *Ascogaster reticulata* (Hymenoptera: Braconidae). *J Ins Behav* 31:523–534.
- Kishani Farahani H, Moghadassi Y, Alford L, van Baaren J (2019) Effect of interference and exploitative competition on associative learning by a parasitoid wasp: a mechanism for ideal free distribution? *Anim Behav* 151:157–163.
- Lagôa ACG, Blassioli Moraes MC, Borges M, Laumann RA (2020) Selective responses of *Trissolcus basal* and *Telenomus podisi* to chemical footprints of preferred hosts. *Physiol Entomol* 45:60–71.
- Laumann RA, Aquino MFS, Moraes MCB, Pareja M, Borges M (2009) Response of the Egg Parasitoids *Trissolcus basal* and *Telenomus podisi* to Compounds from Defensive Secretions of Stink Bugs. *J Chem Ecol* 35:8–19.
- Laumann RA, Čokl A, Lopes APS, Ferreira JBC, Moraes MCB, Borges M (2011) Silent singers are not safe: Selective response of a parasitoid to substrate-borne vibratory signals of stink bugs. *Anim Behav* 82:1175–1183.
- Laumann RA, Moraes MCB, Čokl A, Borges M (2007) Eavesdropping on sexual vibratory signals of stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) by the egg parasitoid *Telenomus podisi*. *Anim Behav* 73:637–649.
- Little CM, Chapman TW, Hillier NK (2019) Considerations for insect learning in integrated pest management. *J Insect Sci* 19:1–14.
- Lucchetta P, Bernstein C, Théry M, Lazzari C, Desouhant E (2008) Foraging and associative learning of visual signals in a parasitic wasp. *Anim Cogn* 11:525–533.
- Michereff MFF, Borges M, Laumann RA, Diniz IR, Blassioli-Moraes MC (2013) Influence of volatile compounds from herbivore-damaged soybean plants on searching behavior of the egg parasitoid *Telenomus podisi*. *Entomol Exp Appl* 147:9–17.
- Michereff MFF, Laumann RA, Borges M, Michereff-Filho M, Diniz IR, Neto ALF, Moreae MCB (2011) Volatiles Mediating a Plant-Herbivore-Natural Enemy Interaction in Resistant and Susceptible Soybean Cultivars. *J Chem Ecol* 37:273–

- Milosavljevic I, Morgan DJW, Massie RE, Hoddle MS (2021) Density dependent mortality, climate, and Argentine ants affect population dynamics of an invasive citrus pest, *Diaphorina citri*, and its specialist parasitoid, *Tamarixia radiata*, in Southern California, USA. *Biol Control* 159: 104627 .
- Moiroux J, Boivin G, Brodeur J (2015) Temperature influences host instar selection in an aphid parasitoid: support for the relative fitness rule. *Biol J Linn Soc* 115:792–801.
- Moraes MCB, Pareja M, Laumann RA, Hoffmann-Campo CB, Borges M (2008) Response of the parasitoid *Telenomus podisi* to induced volatiles from soybean damaged by stink bug herbivory and oviposition. *J Plant Interact* 3:111–118.
- Nelson JM, Roitberg BD (1995) Flexible patch time allocation by the leafminer parasitoid, *Opius dimidiatus*. *Ecol Entomol* 20:245–252.
- Peri E, Salerno G, Slimani T, Frati F, Conti E, Colazza S, Cosumano A (2016) The response of an egg parasitoid to substrate-borne semiochemicals is affected by previous experience. *Sci Rep* 6:1–8.
- R Core Team, 2017. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Austria, <https://www.R-project.org>.
- Rankin CH (2009) Introduction to special issue of neurobiology of learning and memory on habituation. *Neurobiol Learn Mem* 92:125–126.
- Rankin CH, Abrams T, Barry RJ, Bhatnagar S, Clayton DF, Colombo J, Coppola G, Geyer MA, Glanzman DL, Marsland S, McSweeney K, Wilson DA, Wum C, Thompson RF (2009) Habituation revisited: An updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. *Neurobiol Learn Mem* 92:135–138.
- Sevarika M, Foti MC, Peri E, Colazza S, Wajnberg E (2021) Genetic variation in the behavioural mechanisms involved in the response of the egg parasitoid *Trissolcus brochymenae* to contact chemical cues left by the pest *Murgantia histrionica*. *Ecol Entomol* 46:100–105.
- Smith-Ferguson J, Burnham TC, Beekman M (2021) Experience shapes future foraging decisions in a brainless organism. *Adapt Behav*. <https://doi.org/10.1177/1059712321994684>
- Steidle JLM, van Loon JJA (2002) Chemoecology of parasitoid and predator oviposition behaviour. In: Hilker M, Meiners T (eds) *Chemoecology of Insect Eggs and Egg Deposition*. Blackwell, Berlin, pp 291–318
- Tena A, Stouthamer R, Hoddle MS (2017) Effect of host deprivation on the foraging behavior of the Asian citrus psyllid parasitoid *Tamarixia radiata*: observations from the laboratory and the field. *Entomol Exp Appl* 163:51–59.
- Thompson RF (2009) Habituation: A history. *Neurobiol Learn Mem* 92:127–134.
- Thompson RF, Spencer WA (1966) Habituation: A model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychol Rev* 73:16–43.
- Tognon R, Santana J, Michereff MFF, Laumann RA, Borges M, Blassioli-Moraes MC, Redaelli LR (2020) Kairomones from *Euschistus heros* egg masses and their potential use for *Telenomus podisi* parasitism improvement. *Bull Entomol Res* 110:638–644.

- van Alphen JJM, Vet LEM (1986) An evolutionary approach to host finding and selection. In: Waage JK, Greathead DJ (eds) *Insect parasitoids*. Academic Press, pp 23–61.
- van Nouhuys S, Via S (1999) Natural selection and genetic differentiation of behavior between parasitoids from wild and cultivated habitats. *Heredity (Edinb)* 83:127–137.
- Vet LEM, Lewis WJ, Cardé RT (1995) Parasitoid Foraging and Learning. In: *Chemical Ecology of Insects 2*. Springer US, Boston, MA, pp 65–101.
- Vet LEM, Lewis WJ, Papaj DR, van Lenteren JC (1990) A variable-response model for parasitoid foraging behavior. *J Insect Behav* 3:471–490.
- Vinson SB (1975) Biochemical Coevolution between Parasitoids and their Hosts. *Evol Strateg Parasit Insects Mites* 14–48.
- Vinson SB (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.
- Vinson SB (1976) Host Selection by Insect Parasitoids. *Annu Rev Entomol* 21:109–133.
- Vinson SB (1984) Parasitoid-Host Relationship. In: Bell WJ, Cardé RT (eds) *Chemical Ecology of Insects*. Springer US, Boston, MA, pp 205–233.
- Vinson SB, Iwantsch GF (1980) Host Regulation by Insect Parasitoids. *Q Rev Biol* 55:143–165.
- Waage JK (1978) Arrestment responses of the parasitoid, *Nemeritis canescens*, to a contact chemical produced by its host, *Plodia interpunctella*. *Physiol Entomol* (1978) 3:135–146
- Wäckers FL (1994) The effect of food deprivation on the innate visual and olfactory preferences in the parasitoid *Cotesia rubecula*. *J Insect Physiol* 40:641–649.
- Wajnberg É (2006) Time allocation strategies in insect parasitoids: From ultimate predictions to proximate behavioral mechanisms. *Behav Ecol Sociobiol* 60:589–611.
- Wiel DE, Weeks JC (1996) Habituation and Dishabituation of the Proleg Withdrawal Reflex in Larvae of the Sphinx Hawk , *Manduca sexta*. *Behav Neuro* 110:1133-1114.

## CAPÍTULO 3

### Potencial de uso de semioquímicos e estímulo visual para controle biológico conservativo de percevejos com parasitoides de ovos

#### INTRODUÇÃO

Os parasitoides são insetos que dependem de um hospedeiro para se reproduzirem. Esses hospedeiros são em sua maioria outros insetos, que podem ser parasitados tanto na fase jovem (ovos e larvas/ninfas) como na fase adulta (Eggleton e Belshaw 1992; Fatouros et al. 2020). Independente do estágio do hospedeiro, os parasitoides dependem de uma variedade de estratégias e sinais ambientais e provenientes dos hospedeiros para encontra-los e ter sucesso reprodutivo (Vinson 1984, 1998; van Alphen e Vet 1986; Steidle e van Loon 2002; Godfray 2016). Esse processo, por melhor que tenha sido explicado e sistematizado por diversos autores, ainda é surpreendente em sua complexidade e de certa forma imprevisibilidade, como constatado nos primeiro e segundo capítulos desta tese.

A maioria dos trabalhos que avaliaram a resposta de parasitoides a estímulos ambientais e dos hospedeiros foram realizados em laboratório, em ambientes controlados e previsíveis. É evidente a importância desses testes, pois em laboratório, os mecanismos comportamentais, podem ser estudados em menor escala e sem interferências, favorecendo a compreensão de modelos teóricos e aspectos básicos do comportamento dos insetos. No entanto, é fundamental que as perguntas e respostas obtidas em laboratório sejam testadas em condições de campo, senão o entendimento desse

conhecimento no âmbito do controle biológico de pragas será incompleto e defasado. Ambientes naturais são diferentes dos ambientes controlados, e a interação dos parasitoides com inúmeras variáveis bióticas e abióticas influenciam largamente o comportamento de busca e seleção de hospedeiros podendo implicar negativamente na capacidade desses insetos de prover serviços ecossistêmicos (Rousse et al. 2009).

Portanto, é premente realizar esforços para estudar em condições de campo a influência de diferentes estímulos no forrageamento dos inimigos naturais e como esta interação condiciona o sucesso dos mesmos como agentes de controle biológico. Alguns autores se propuseram a compreender as dinâmicas entre parasitoides e hospedeiros em ambientes naturais e agrícolas e os estímulos relacionados a estas interações. Alguns dos trabalhos pioneiros avaliaram a resposta de tricogramatídeos a semioquímicos como o tricosano e (Z)-7-hexadecenal, (Z)-9-hexadecenal, provenientes do hospedeiro *Heliothis zea* (Boddie). Os resultados mostraram a maior atratividade dos parasitoides e maior parasitismo dos ovos do hospedeiro em parcelas contendo os semioquímicos (Lewis et al. 1975, 1982).

Para os parasitoides Telenominae (Scelionidae) é estabelecido que uma diversidade de estímulos químicos e físicos são bastante atrativos e arrestantes em condições de laboratório, como observado nos capítulos anteriores desta tese. Desses, os semioquímicos foram os avaliados até o momento em testes de campo. Vieira et al. (2013) pulverizaram *cis*-jasmone em campo comercial e experimental de soja e observaram que o tratamento atraiu e aumentou a população de Scelionidae, mas não teve efeito na ocorrência e intensidade do parasitismo. O *cis*-jasmone pulverizado na soja promove a liberação de VPIHs semelhantes aos induzidos por injúrias de percevejos (Pentatomidae), e atraem o parasitoide *Telenomus podisi* (Ashmead) em condições de laboratório (Moraes et al. 2005, 2008, 2009). Michereff et al. (dados não publicados) verificaram o aumento

da atratividade de *T. podisi* e demais parasitoides em parcelas tratadas com (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno e salicilato de metila, separadamente e combinados. Ambos os tratamentos são compostos majoritários dos VPIHs de pentatomídeos na soja e atrativos ao *T. podisi* (Michereff et al. 2013). É também comprovada que iscas contendo 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila, o composto majoritário do feromônio sexual de *Euschistus heros* (Fabricius) (Borges e Aldrich 1994; Zhang et al. 2003), aumentam o recrutamento de parasitoides Telenominae, especialmente *T. podisi* (67% - 85) em campos de soja (Borges et al. 1998b) e em testes de laboratório (Borges et al. 1999). Adicionalmente, a liberação do (*E*)-2-hexenal sintético, a partir de septos de borracha em campo de soja, aumentou a abundância de *Trissolcus* spp. (Hymenoptera: Scelionidae: Telenominae) em áreas tratadas, junto a maior intensidade de parasitismo em testes de curto prazo. No entanto, em experimentos de longo prazo o cairomônio não influenciou a abundância de Telenominae ou os níveis de parasitismo, mas aumentou a predação de ovos (Vieira et al. 2014). O (*E*)-2-hexenal é um dos compostos majoritários das secreções das glândulas metatorácicas de percevejos pentatomídeos (Aldrich et al. 1995; Pareja et al. 2007), sendo comprovada a atratividade por *T. podisi* e *Trissolcus basal* (Wollaston) (Laumann et al. 2009). Apesar dos trabalhos supracitados terem verificado a atratividade de Telenominae, especialmente *T. podisi*, aos semioquímicos de plantas e hospedeiros, sua aplicação em campo não levou, em sua maioria, ao aumento das taxas de parasitismo. Ademais, trabalhos em campo verificando a atuação de outros sinais atrativos isoladamente ou combinados (i.e. multimodal), como sinais vibratórios e visuais, ainda não foram realizados para esse grupo.

Os parasitoides Telenominae são os principais inimigos naturais de percevejos fitófagos, e potenciais agentes de controle biológico dessas pragas (Pacheco e Corrêa-ferreira 2000), sendo *T. podisi* o principal parasitoide de ovos reportado para *E. heros* em

campo e laboratório (Corrêa-Ferreira and Moscardi 1996; Medeiros et al. 1997; Borges et al. 1998b; Pacheco and Corrêa-ferreira 2000; Sujii et al. 2002). *Euschistus heros* é atualmente a principal praga da cultura da soja no Brasil (Aquino et al. 2019, Bueno et al. 2020). Esses parasitoides podem ser utilizados com sucesso em programas de controle biológico aumentativo em soja (Corrêa-Ferreira e Moscardi 1996; Bueno et al. 2020). Corrêa-Ferreira e Moscardi (1996) fizeram liberações massais de 15.000 *Trissolcus basalis* (Fabricius) adultos por ha, o que ocasionou uma redução de 54% a 58% na densidade populacional dos hospedeiros. Alinhado a esses resultados, o trabalho de Bueno et al. (2020) mostrou que a liberação inoculativa de 18.750 pupas de *T. podisi* aumentou o parasitismo de ovos de em 50% a 70%. No entanto, a criação desses inimigos naturais, tanto pelo fato de não se dispor de dietas artificiais, quanto por requerer a produção dos seus hospedeiros em larga escala, e também por se cumprir uma série de normas-padrão e de qualidade, eleva os custos de produção o que pode ser uma barreira para a implementação em larga escala deste método de controle no Brasil (Parra et al. 2002; Prezotti e Parra 2002). Dessa forma, o manejo comportamental dos parasitoides, a partir de semioquímicos e sinais físicos, pode ser uma ferramenta para recrutar e incrementar suas populações em áreas cultivadas visando o controle biológico conservativo (Borges et al. 2011), uma vez que nesta modalidade de controle biológico, é feita a manipulação dos inimigos naturais e/ou da paisagem agrícola favorecendo esses agentes de controle (Eilenberg et al. 2001).

Estudos prévios mostraram que, além da atratividade conhecida de *T. podisi* por estímulos químicos e físicos separadamente, as combinações multimodais de  $\alpha$ -farneseno com um substrato amarelo e do 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila também com um substrato amarelo, aumentam o recrutamento inicial desse parasitoide em testes de laboratório. Entretanto, ainda não existem resultados da ação destes estímulos

multimodais em campo. Esse foco é de especial importância, porque é possível que esses estímulos coexistam no ambiente fornecendo informações mais robustas ao parasitoide sobre a presença de hospedeiros. Compreender este processo, de modo a manipular o comportamento do parasitoide em campo, pode ser vantajoso para as práticas de manejo de pragas através do controle biológico conservativo.

Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial de uso de semioquímicos e estímulos físicos para o controle biológico conservativo do percevejo *E. heros* em campo por parasitoides. Especificamente, avaliar a utilização de (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno, o 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila e um estímulo visual (cor amarela do substrato), e a combinação multimodal destes estímulos como potencial ferramenta no controle biológico conservativo. Nesse sentido, a hipótese do presente trabalho prediz que os índices de parasitismo e recrutamento de parasitoides são incrementados em parcelas tratadas com a combinação multimodal dos semioquímicos voláteis junto ao estímulo visual.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### **Criação e manutenção dos insetos**

Os insetos foram obtidos de colônias previamente estabelecidas no Laboratório de Semioquímicos da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brasil, mantidos em sala climatizada, sob as condições de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $65 \pm 10\%$  UR e 14 horas de fotofase. Os parasitoides adultos foram alimentados com mel de abelhas puro e mantidos em gaiolas plásticas (frascos de cultura para tecidos de  $25\text{ cm}^3$ ; Biomedicals® ICN; MP Biomedicals, Irvine, Califórnia). Ovos de *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae) (< 24 h) foram usados como hospedeiros e oferecidos às fêmeas acasaladas

do parasitoide por um período de 24 horas para oviposição. Ovos parasitados foram mantidos nas mesmas condições ambientais, e as fêmeas recém-emergidas foram divididas em dois grupos: um grupo foi utilizado para a manutenção da colônia e o outro grupo foi utilizado nos bioensaios. Todas as fêmeas de *T. podisi* usadas nos bioensaios tinham idade entre 24 e 48 horas, estavam alimentadas e acasaladas, porém sem experiência de oviposição.

O percevejo-marrom, *E. heros*, foi criado em recipientes plásticos de 8,0 l (gaiolas) com dieta natural a base de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L. [Asteraceae]), amendoim cru (*Arachis hypogaea* L. [Fabaceae]), soja (*Glycine max* L. [Fabaceae]), vagens verdes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L. [Fabaceae]) e buquês de boldo (*Plectranthus barbatus* Andrews [Lamiaceae]) colocados em potes com vermiculita hidratada. As gaiolas foram limpas e o alimento trocado três vezes por semana. No interior das gaiolas foram colocadas tiras de telas de voile (4 x 12 cm) como superfície de oviposição. Diariamente os ovos dos percevejos foram coletados do interior das gaiolas e separados, uma parte para a manutenção da criação de percevejos e outra parte para a manutenção da criação de parasitoides. Após a última muda, os adultos de *E. heros* foram separados por sexo e mantidos em recipientes isolados. Fêmeas virgens de percevejos foram usadas nos experimentos com rastros químicos quando atingiram a maturidade sexual (10-12 dias na idade adulta) (Costa et al. 1998). Os parasitoides e percevejos foram mantidos em salas separadas.

## **Experimentos em parcelas experimentais**

### *Área experimental*

Os experimentos foram realizados no campo experimental da Embrapa Cenargen (15°43'50"S e 47°53'59"W) em uma área de aproximadamente 0,55 ha por dois anos consecutivos. Os experimentos foram desenvolvidos em 20 parcelas distribuídas no campo experimental (Figura 1). As parcelas tinham 5 m x 5 m e foram espaçadas em 10 m na mesma fileira e em 30 metros entre fileiras. As parcelas foram cultivadas com soja var. BRS 7880 sendo 10 linhas de soja por parcela. A área foi adubada com adubo NPK 4-14-8 antes do plantio, aproximadamente 20 dias depois do plantio foi realizada uma adubação de cobertura com NPK 10-10-10. As parcelas do primeiro experimento, executado entre janeiro e fevereiro de 2020, foram plantadas em dezembro de 2019, as parcelas do segundo experimento, executado entre março e abril de 2020 foram plantadas no final de janeiro de 2020 e as parcelas do terceiro experimento, executado entre janeiro e março de 2021, foram plantadas em dezembro de 2020. As avaliações começaram no início do período reprodutivo da planta, entre R2 e R3.



**Figura 1.** Campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Cenargen. As distribuições das parcelas experimentais estão marcadas em vermelho.

## *Tratamentos*

Foram utilizados semioquímicos e um atrativo amarelo para *T. podisi*, avaliados separadamente e em conjunto (Tabela 1). As combinações de estímulos foram selecionadas de acordo com os resultados do segundo teste do primeiro capítulo desta tese, pois aumentam o recrutamento inicial desse parasitoide em testes de laboratório. Os semioquímicos foram (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno puro (doravante chamado de AF) (padrão Sigma Aldrich®), na dosagem de 1 mg do composto/septo de borracha e o 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila puro (doravante chamado de FS) (padrão Sigma Aldrich®) aplicados em septos de borracha na dosagem de 1 mg do composto/septo, segundo o relatado em Borges et al. (1998b) e Michereff et al. (comunicação pessoal, dados não publicados).

Os semioquímicos foram aplicados separadamente, com auxílio de micropipeta, em septos de borracha (ISCA Technologies) na quantidade de 100  $\mu$ l da diluição de 10 mg/ml de AF ou FS separadamente. A impregnação dos septos de borracha foi realizada em laboratório. Após a aplicação no septo foi permitido que o solvente evaporasse livremente mantendo os septos a temperatura ambiente. Posteriormente os septos foram guardados em freezer até a utilização em campo. O controle consistiu em septos impregnados apenas com 100  $\mu$ l de *n*-hexano. Para coloca-los no campo, os septos foram protegidos por abrigos confeccionados com fundos de garrafa tipo PET, e presos utilizando arame a uma estaca de madeira localizada no centro de cada parcela. O estímulo visual consistiu em fitas amarelas (5 fitas/parcela) de tecido TNT dispostas entre as fileiras de soja (doravante chamado de CA) (Figura 2). Cada fita tinha 10 cm x 6 m, foram presas a barbantes amarrados a 4 estacas de madeira colocadas nos vértices da parcela (Figura 2). Foi testada previamente a atratividade de *T. podisi* pela cor do tecido em teste de dupla escolha realizado em laboratório. Nas parcelas contendo a combinação

entre os tratamentos AF e CA (doravante chamado de AFCA) e de FS e CA (doravante chamado de FSCA), os tratamentos foram organizados nas parcelas como descrito anteriormente para cada tratamento separadamente. Nas parcelas contendo a combinação de AF, FS e CA (doravante chamado de MIX) os tratamentos foram organizados na parcela como já descrito, e os semioquímicos (AF e FA) foram colocados em diferentes septos de borracha, para evitar alguma interação indesejável entre os compostos, e cobertos pelo mesmo abrigo de garrafa PET.

**Tabela 1.** Tratamentos combinados e isolados utilizados nos experimentos em campo e seus respectivos números de repetições.

Tratamentos	n° de parcelas
AF	3
FS	3
CA	3
AF + CA	3
FS + CA	3
AF + FS + CA (MIX)	2
Controle	3



**Figura 2.** Fitas amarelas (tratamento CA) em parcela de soja.

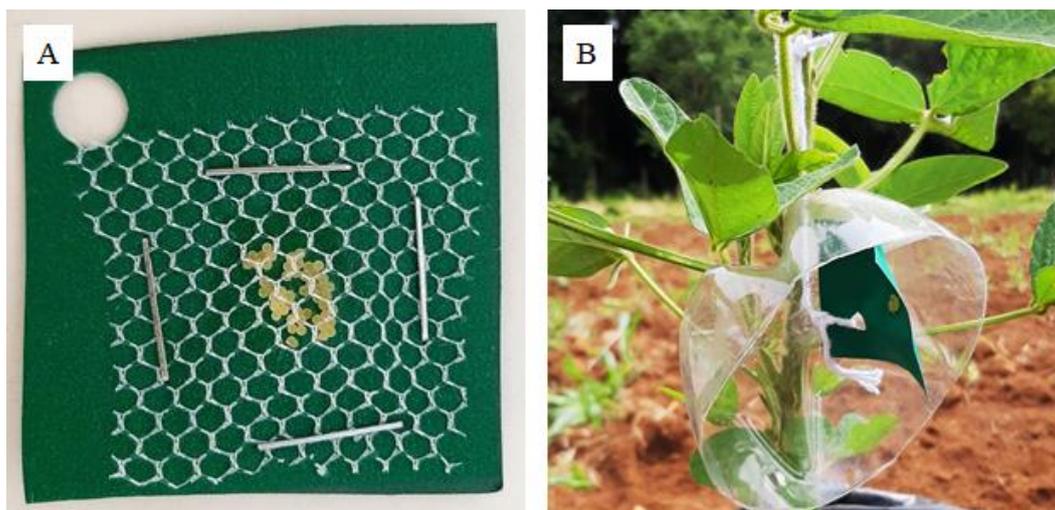
### *Desenho experimental*

Os tratamentos e o controle (Tabela 1) foram distribuídos aleatoriamente por sorteio nas parcelas, e em cada experimento um sorteio novo foi realizado. Foram realizadas três repetições para cada tratamento e controle, no entanto, as parcelas com todos os tratamentos combinados (MIX) foram repetidas 2 vezes por falta de espaço na área experimental. Para a avaliação do parasitismo foram distribuídos aleatoriamente e semanalmente em cada parcela, 3 cartelas (cartolina de cor verde de 4 cm x 4 cm) com ovos de *E. heros* (ovos sentinela). Os ovos provenientes da colônia de laboratório e coletados diariamente (< 24 h após oviposição) foram colados com goma arábica e cobertos com filó (3 cm x 3 cm) para evitar que fossem retirados da cartela por predadores (Figura 3). Em cada cartela foram colados 50 ovos, totalizando 150 ovos por parcela. Cada cartela com ovos sentinela foi coberta por um “guarda-chuva” confeccionado com

fundo de garrafa tipo PET, servindo de abrigo contra a chuva (Figura 3). Os ovos sentinela e o abrigo foram amarrados com barbante a uma planta de soja. Os ovos ficaram expostos por 3 dias (sexta-feira à segunda-feira) e em seguida coletados e transportados ao laboratório, onde foram acondicionados em tubos de ensaio de vidro (7 cm x 1 cm de diâmetro) tampados com um chumaço de algodão e mantidos em sala climatizada, com as mesmas condições que aquelas para a criação dos insetos descritas previamente, para avaliar a emergência de parasitoides.

A comunidade de parasitoides de ovos foi monitorada semanalmente por meio de armadilhas adesivas amarelas Biotrap<sup>®</sup> (BioControle Métodos de Controle de Pragas Ltda.). No primeiro experimento, uma armadilha adesiva amarela, com 24 x 15 cm, foi posicionada no centro de cada parcela. No segundo e terceiro experimentos foram distribuídas aleatoriamente na parcela 3 cartelas adesivas com 15 x 12 cm. Essas armadilhas ficaram expostas por 4 dias (segunda-feira à sexta-feira) em campo e em seguida transportadas para o laboratório. Fêmeas e machos de *T. podisi* foram identificados, os parasitoides de outras famílias foram apenas quantificados.

Para o monitoramento e estimativa da abundância e riqueza de percevejos, foi realizada a técnica do pano de batida semanalmente. O pano de batida consistiu em um retângulo plástico vinílico flexível com aproximadamente 1,00 m x 0,70 m, preso nas laterais a cabos de madeira. Foram identificadas a espécie e o estágio dos percevejos e depois foram devolvidos para a parcela. Foram realizadas 3 amostragens aleatorizadas por parcela semanalmente.



**Figura 3.** (A) Cartela com ovos sentinela coberta por filó. (B) cartela com ovos sentinela com abrigo feito com fundo de garrafa tipo PET, amarrados em uma planta de soja.

### **Experimentos de liberação e recaptura: capacidade de deslocamento dos parasitoides e atratividade dos estímulos**

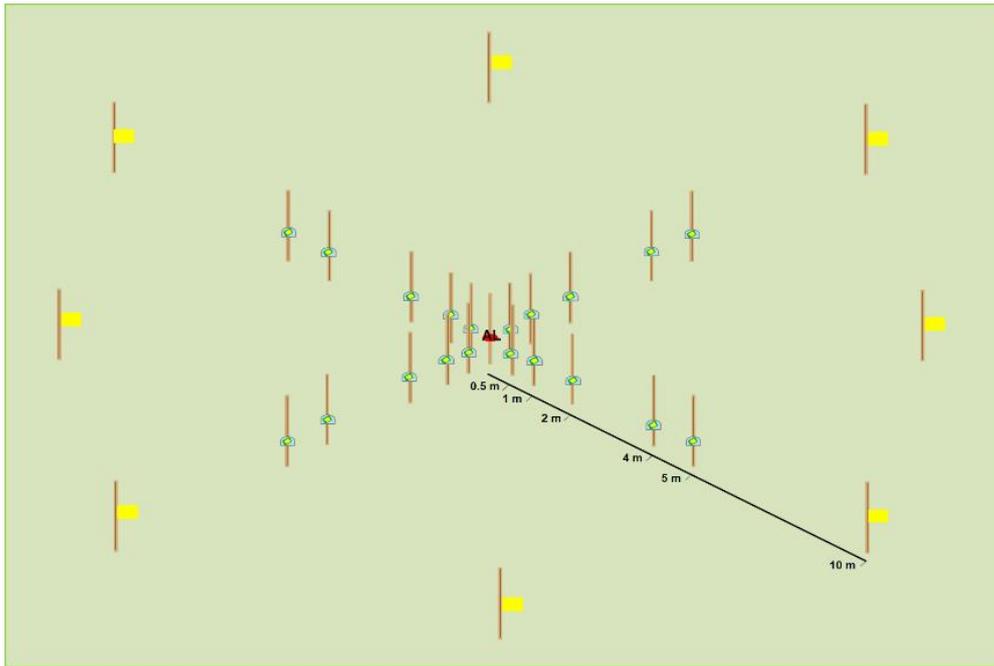
#### *Área*

Os experimentos foram realizados no campo experimental da Embrapa Cenargen (15°43'50"S e 47°53'59"W) entre dezembro de 2020 e o início de janeiro de 2021.

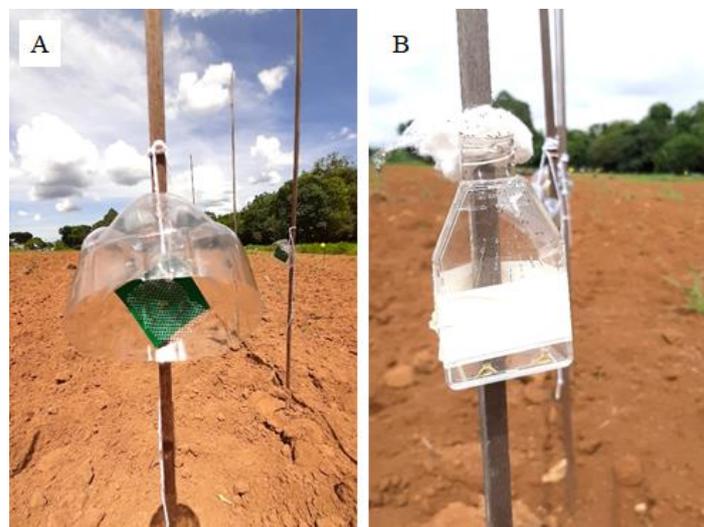
#### *Experimentos prévios para determinar a distância de deslocamento do parasitoide*

Dois experimentos foram realizados previamente ao teste de atratividade dos estímulos, num deles utilizaram-se estacas de madeira e no outro plantas de soja. Ambos foram conduzidos para avaliar a capacidade de deslocamento de *T. podisi* e determinar as distâncias utilizadas nos testes de atratividade. As distâncias avaliadas foram organizadas em “cruz” (Figuras 4 e 6). No centro da arena em “cruz” foi colocada uma estaca onde 300 fêmeas de *T. podisi* foram liberadas (Figuras 4 e 6), em cada repetição. As distâncias

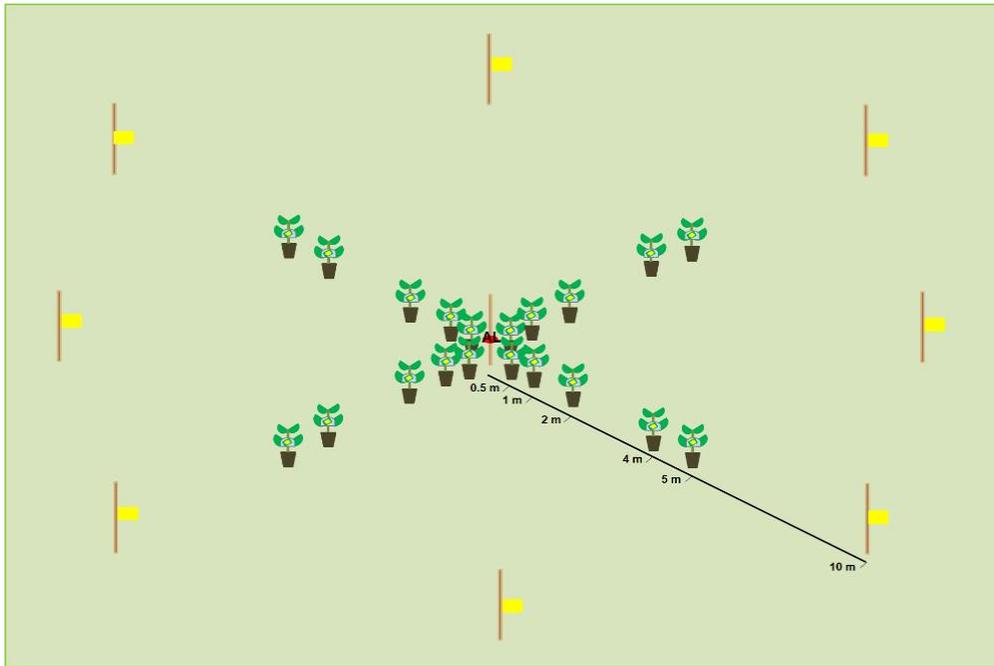
avaliadas foram 0,5, 1, 2, 4, 5 m a partir do ponto central, demarcadas por estacas ou plantas de soja (4 em cada distância) em forma de cruz considerando os 4 principais pontos cardeais. As plantas de soja foram produzidas em sacos de plantio de 5 l. Foi utilizada a variedade de soja BRS 7880, e o solo foi adubado com NPK 4-14-8. As plantas foram utilizadas quando estava no estágio V4 a V6. Nas estacas ou nas plantas foram colocadas as cartelas com ovos sentinela frescos que serviram para amostragem do deslocamento dos insetos. Adicionalmente foram colocadas a 10 m do ponto central oito estacas (quatro nos principais pontos cardeais e quatro intermediárias entre eles) onde se acondicionou uma armadilha adesiva amarela. Na estaca central foi colocado um frasco de cultura para tecido de 25 cm<sup>3</sup> (Biomedicals® ICN; MP Biomedicals, Irvine, Califórnia), com 300 fêmeas de *T. podisi* proveniente da criação de laboratório (Figuras 5 e 7). As fêmeas estavam alimentadas e acasaladas, porém, sem experiência de oviposição. Esses experimentos foram repetidos 5 vezes em cada desenho. Os ovos sentinela, as cartelas adesivas e os parasitoides foram liberados no experimento de 6:00 às 7:00 horas da manhã. Depois de 24 horas, os ovos e as cartelas foram retirados do campo. Os experimentos foram realizados com intervalos de 24 h entre cada repetição.



**Figura 4.** Arena para o experimento de deslocamento em parcelas com estacas, nas distâncias de 0,5, 1, 2, 4, 5 metros com ovos sentinela e 10 metros com cartelas adesivas amarelas. AL=área de liberação de fêmeas de *Telenomus podisi*.



**Figura 5.** (A) cartela com ovos sentinela junto ao abrigo de garrafa PET amarrada com barbante a uma estaca. (B) frasco de cultura para tecido com fêmeas de *Telenomus podisi*, preso com fita crepe na estaca central.



**Figura 6.** Arena para o experimento de deslocamento em parcelas com plantas de soja, nas distâncias de 0,5, 1, 2, 4, 5 metros com ovos sentinela e 10 metros com cartelas adesivas amarelas. AL=área de liberação de fêmeas de *Telenomus podisi*.



**Figura 7.** (A) cartela com ovos sentinela junto ao abrigo de garrafa PET amarrada com barbante a uma planta de soja. (B) frasco de cultura de tecidos com fêmeas de *Telenomus podisi*, preso com fita crepe na estaca central. A foto mostra o momento da liberação dos insetos.

## *Experimentos para avaliar a atratividade de semioquímicos e estímulos visuais*

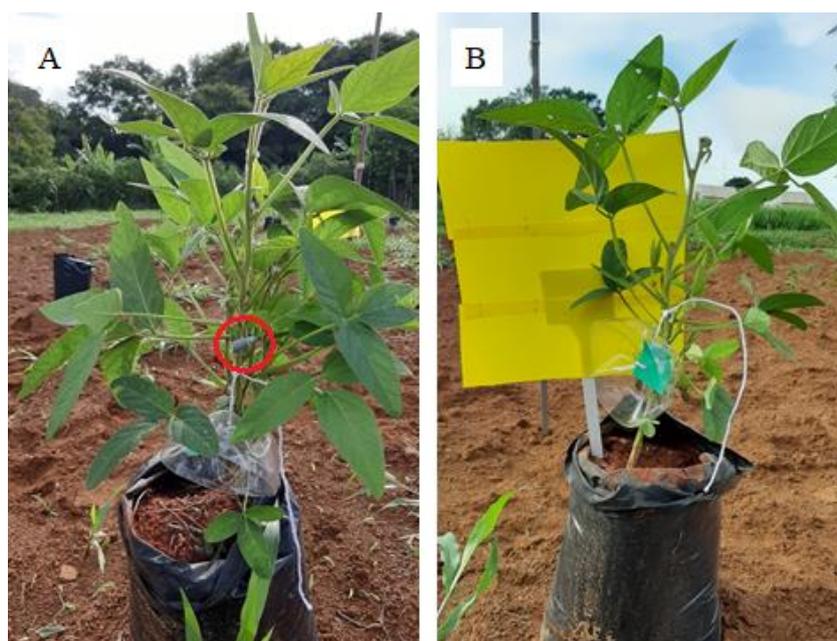
### Tratamentos

Os semioquímicos utilizados nestes experimentos foram AF e FS ambos na dosagem de 1 mg/septo, preparados segundo o descrito previamente e colocados separadamente em septos de borracha. Os septos foram amarrados em plantas de soja com um arame. O estímulo visual consistiu em um atrativo amarelo (doravante chamado de CA), elaborado com um cartão plástico com aproximadamente 30 cm x 25 cm preso a uma estaca de plástico e fincado no solo próximo ao caule da planta (Figura 8). A atratividade de *T. podisi* pelo material plástico amarelo foi avaliada previamente em teste de dupla escolha realizado em laboratório. Foram realizados 4 experimentos, no primeiro foram testados o AF, FS e CA separadamente; no segundo teste foram avaliados os semioquímicos AF e FS separadamente e combinados; no terceiro teste foram avaliados o AF e CA separadamente e combinados; no quarto teste foram avaliados o FS e CA separadamente e combinados (Tabela 2). Nos tratamentos com combinações de semioquímicos, cada septo foi impregnado com cada composto separadamente, para evitar alguma interação indesejável entre os compostos. Todos os experimentos foram repetidos 3 vezes e cada tratamento avaliado nos diferentes testes também foi replicado 3 vezes (tabela 2). O controle consistiu em uma planta de soja sem nenhum tratamento.

**Tabela 2.** Tratamentos combinados e isolados utilizados nos experimentos de atratividade e seus respectivos números de repetições.

Experimento	Tratamentos	nº de repetições	nº de cada tratamento por arena
1	AF	3	3
	FS		3

	CA		3
	Controle		3
2	AF	3	3
	FS		3
	AF + FS		3
	Controle		3
3	AF	3	3
	CA		3
	AF + CA		3
	Controle		3
4	FS	3	3
	CA		3
	FS + CA		3
	Controle		3



**Figura 8.** (A) planta de soja com um semioquímico impregnado no septo (circulado em vermelho). (B) planta de soja com o tratamento visual feito de cartão plástico amarelo.

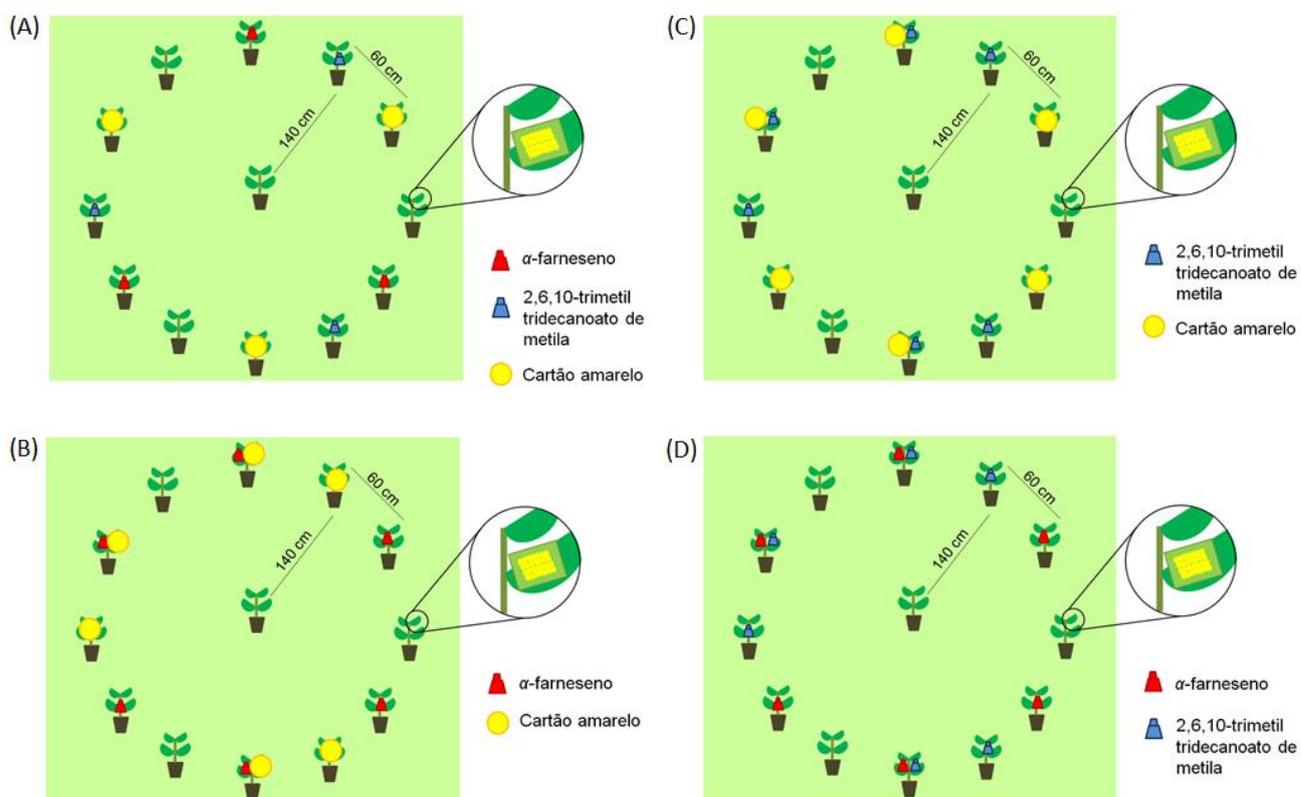
*Desenho experimental*

Foi utilizado o mesmo desenho experimental em todos os 4 experimentos de atratividade. As dimensões das arenas experimentais foram baseadas nos resultados dos experimentos realizados previamente. As arenas foram formadas por 12 sacos com

plantas de soja distribuídas em forma equidistante (60 cm de distância entre cada planta) num círculo com diâmetro de 2,80 m, distante a 1,4 m do ponto central da arena. No centro do círculo foi colocada uma estaca de madeira que serviu como ponto de liberação de 150 fêmeas de *T. podisi* (Figura 9), proveniente da criação de laboratório, todas alimentadas e acasaladas, porém, sem experiência de oviposição. As fêmeas de parasitoide foram colocadas em um frasco de cultura para tecido de 25 cm<sup>3</sup> (Biomedicals® ICN; MP Biomedicals, Irvine, Califórnia), preso com fita crepe na estaca central (Figuras 9). Os tratamentos foram distribuídos sequencialmente (Figuras 10) conforme descrito na Tabela 2. Todas as plantas receberam uma cartela com 30 ovos sentinela, junto ao abrigo de garrafa PET, amarrada com barbante, para a avaliação das taxas de parasitismo associada aos diferentes tratamentos e controle. Para avaliar a abundância/recaptura de parasitoides foram colocadas a 1 m de distância de cada planta (2,4 m do ponto central da arena) uma estaca de madeira com uma armadilha adesiva amarela Biotrap® (BioControle Métodos de Controle de Pragas Ltda.) medindo 15 x 12 cm (Figura 9). Os ovos sentinela, as cartelas adesivas e os parasitoides foram liberados na arena de 6:00 às 7:00 horas da manhã. Depois de 24 horas, os ovos e as cartelas foram retirados do campo. As cartelas com ovos foram colocadas em tubetes de vidro e mantidas em sala climatizada. Os experimentos foram realizados com intervalos de 48 h entre cada repetição.



**Figura 9.** Arenas para os experimentos de atratividade dos estímulos com liberação e recaptura de *Telenomus podisi*.



**Figura 10.** Esquema da distribuição de tratamentos para o experimento de atratividade dos estímulos, onde foi avaliada a influência do (A)  $\alpha$ -farneseno (AF), 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila (FS) e a cor amarela (CA) separadamente no comportamento de *Telenomus podisi*. (B) AF e CA separadamente ou em conjunto. (C) FS e CA separadamente ou em conjunto. (D) AF e FS separadamente ou em conjunto.

### **Análises estatísticas**

Tendo em vista que todas as variáveis testadas diferiram significativamente entre os diferentes experimentos realizados, optou-se por realizar as análises separadamente para cada um dos experimentos. Portanto, para testar se os tratamentos afetaram a abundância de parasitoides e de *T. podisi* foi ajustado um Modelo Misto Linear (LME), usando o método de máxima verossimilhança (ML). Neste modelo, a abundância total dos parasitoides em cada parcela em cada estágio da fenológica da cultura, assim como a abundância total de *T. podisi* em cada estágio fenológico da cultura foram utilizadas como variáveis resposta e os tratamentos como variável explicativa. O estágio fenológico da soja e a identidade das parcelas foram incluídos como variáveis aleatórias. Para cada variável resposta foi ajustado um modelo separadamente. A significância das variáveis foi verificada através de uma ANODEV com um teste-F. As diferenças entre os níveis das variáveis foram testadas por uma análise de contraste de modelos. Por fim, foi realizada uma análise de resíduos para verificar a qualidade do modelo ajustado (Crawley 2007). A mesma abordagem foi utilizada para avaliar se o parasitismo dos ovos sentinela diferiu entre os tratamentos em cada um dos experimentos separadamente. Nessa análise, o número total de ovos parasitados por parcela (soma dos ovos parasitados por parcela em cada estágio fenológico da soja) foi utilizado como variável resposta.

Para avaliar como o controle biológico em geral contribui para a mortalidade dos ovos sentinela foi realizada uma outra análise considerando os ovos parasitados e os ovos

predados em cada um dos experimentos separadamente. Somou-se ao número de ovos parasitados o número de ovos predados em cada parcela para obter a proporção de ovos mortos por controle biológico. Ao adotar este procedimento, foi possível observar como a mortalidade por controle biológico (parasitismo + predação) variou entre os experimentos. Como foram observados outros fatores de mortalidade atuando de forma conjunta a predação e ao parasitismo ao longo dos experimentos, foi avaliado como esses fatores em conjunto contribuíram para a mortalidade total observada dos ovos sentinela. Para isso, foi considerada a mortalidade causada por fatores bióticos (parasitismo, predação e ninfas malogradas) e abióticos (ressecamento) em conjunto. Os ovos ressecados foram considerados aqueles completamente murchos e desidratados. Foi então ajustada uma regressão linear múltipla entre a mortalidade total observada e a mortalidade parcial causada por cada fator de mortalidade separadamente, seguindo o método proposto por Frizzo et al. (2020). A contribuição de cada fator de mortalidade para o modelo foi quantificada com a função *lmg* do pacote *relaimpo* (Grömping 2006). Essa função calcula a contribuição de cada variável preditora para o  $R^2$  total observado na regressão múltipla. Nessa lógica, é possível observar a contribuição e importância relativa de cada fator de mortalidade para a mortalidade total observada (Frizzo et al. 2020).

Para avaliar se a abundância de espécies de percevejos varia entre os três experimentos, foi ajustado um Modelo Misto Linear (LME), usando o método de máxima verossimilhança (ML), conforme descrito anteriormente. Contudo, nessa análise foi verificado se a abundância de percevejos (variável resposta) variou entre as espécies (variável explicativa). O estágio fenológico da soja e a identidade das parcelas foram utilizados como fatores aleatórios no modelo. Para essa análise, os dados foram

logaritimizados para diminuir as diferenças das espécies entre os anos e torná-las mais comparáveis entre os experimentos.

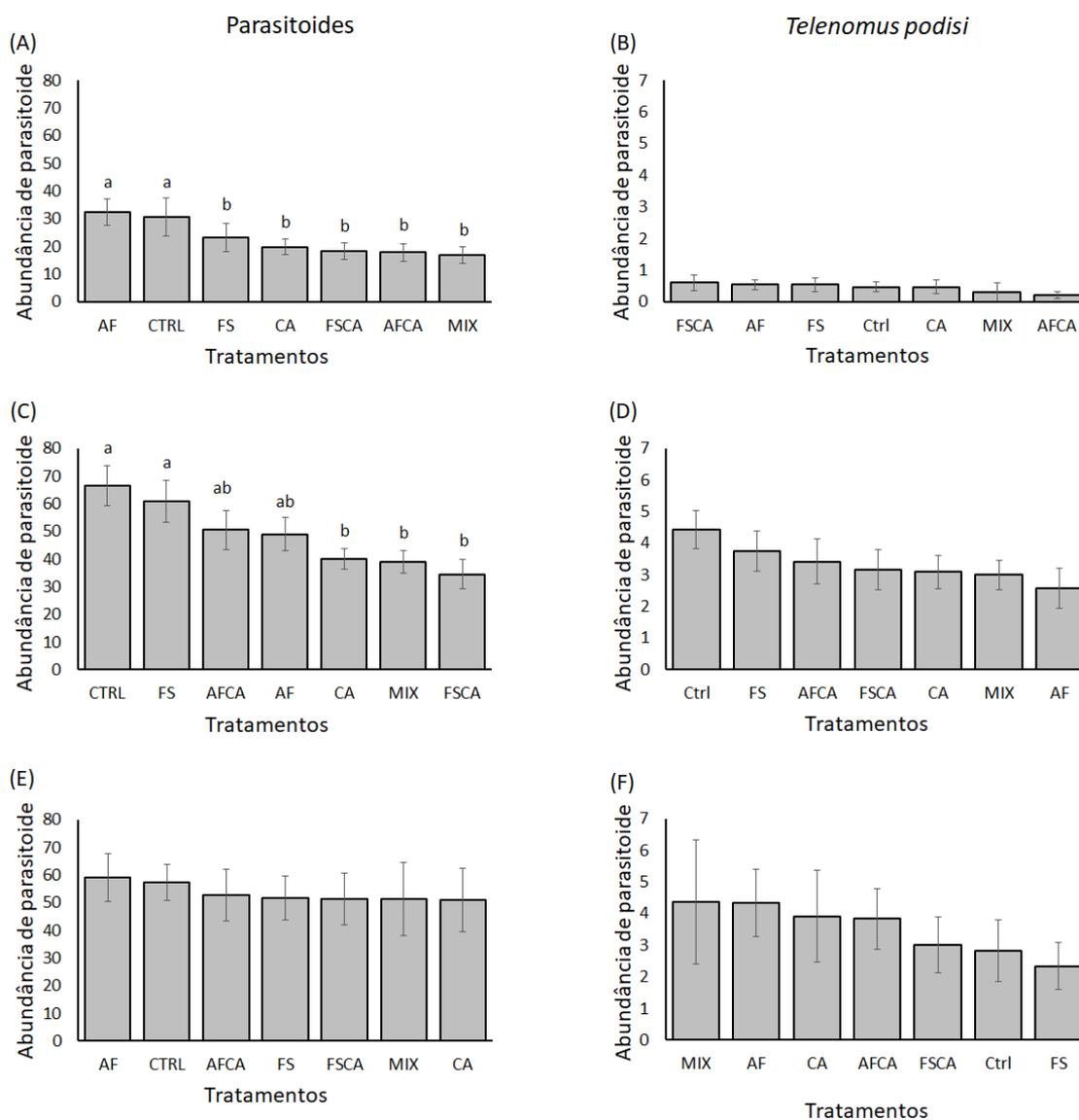
Para avaliar o efeito dos tratamentos no parasitismo de ovos por *T. podisi* em diferentes distâncias nos testes em arenas, foi ajustado um GLM com distribuição binomial negativa, devido a sobredispersão dos dados. Foi adotado o mesmo procedimento descrito para os modelos mistos descritos acima. Porém, a significância dos modelos foi acessada com uma Análise de Deviance com um teste Chi. O número total de ovos parasitados nas diferentes distâncias ou o número total de parasitoides nas armadilhas em cada distância foram considerados como variável resposta e as distâncias da área de liberação ou os tratamentos foram utilizados como variáveis explicativas. Para cada conjunto de variável resposta e explicativa em cada um dos experimentos realizados, foi ajustado um GLM separadamente. Demais procedimentos seguiram conforme descrito acima. Todas as análises foram realizadas utilizando o software R (R Development Core Team, 2017) a um nível de significância de 5%.

## RESULTADOS

### **Experimento em parcelas experimentais**

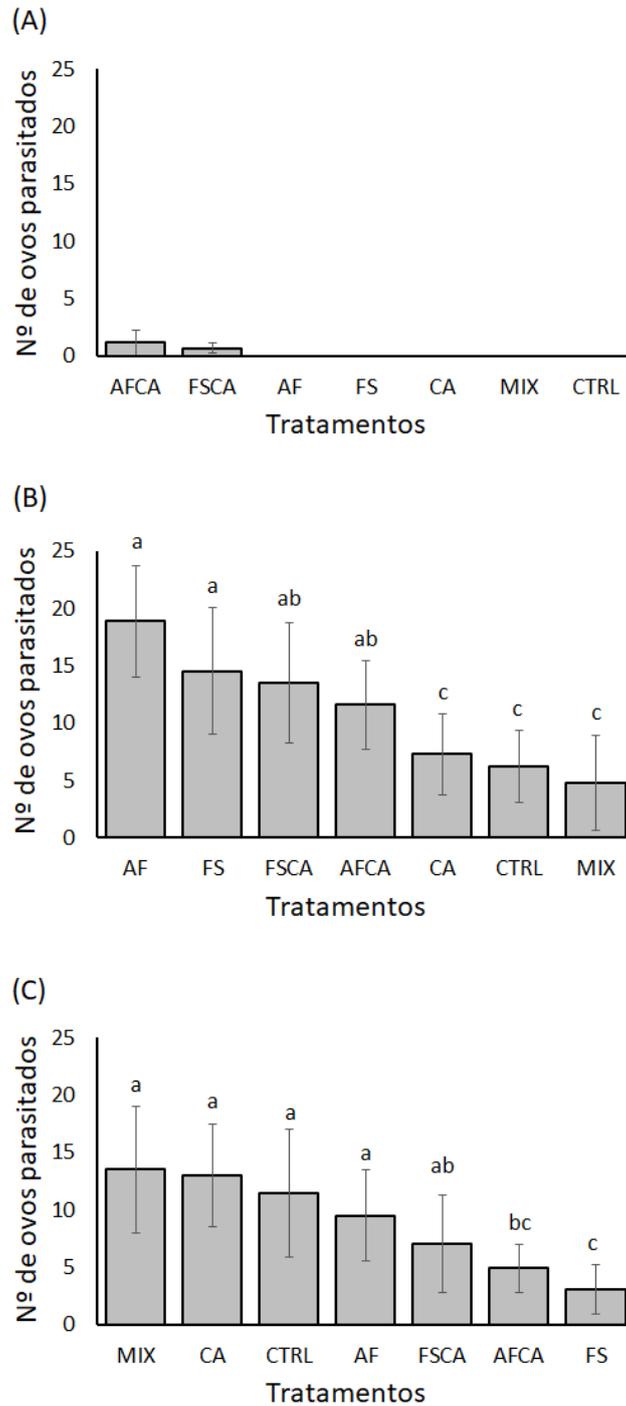
A abundância dos parasitoides diferiu entre os tratamentos no primeiro experimento ( $F=2,47$ ; g.l.= 6,  $P=0,0297$ ), no segundo ( $F=5,51$ , g.l.= 6,  $P<0,0001$ ), mas não no terceiro experimento ( $F=0,52$ ; g.l.= 6,  $P=0,7921$ ). Com exceção do terceiro experimento os tratamentos afetaram negativamente a atração dos parasitoides em campo. Apenas o tratamento AF (experimento 1) e FS foram semelhantes ao controle quanto a atração dos parasitoides (Figura 11ACE). Diferente do observado para os parasitoides em geral, a abundância de *T. podisi* não foi afetada pelos tratamentos no primeiro

experimento ( $F=0,51$ ; g.l.= 6,  $P=0,7991$ ), no segundo experimento ( $F=1,08$ ; g.l.= 6,  $P=0,3824$ ) e no terceiro experimento ( $F=1,35$ ; g.l.= 6,  $P=0,2488$ ) (Figura 11BDF).



**Figura 11.** Abundância (media  $\pm$  SE) de parasitoides totais (ACE) e *Telenomus podisi* (BDF) em função do tratamento e do experimento. (A) abundância total de parasitoides no experimento 1, (C) no experimento 2, e (E) no experimento 3. (B) abundância de *T. podisi* no experimento 1, (D) no experimento 2, e (F) no experimento 3. (AF)  $\alpha$ -farneseno; (FS) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila; (CA) cor amarela; (AFCA)  $\alpha$ -farneseno junto a cor amarela, (FSCA) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila junto a cor amarela; (MIX) combinação de AF, FS e CA; (CTRL) Controle. Letras distintas indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos.

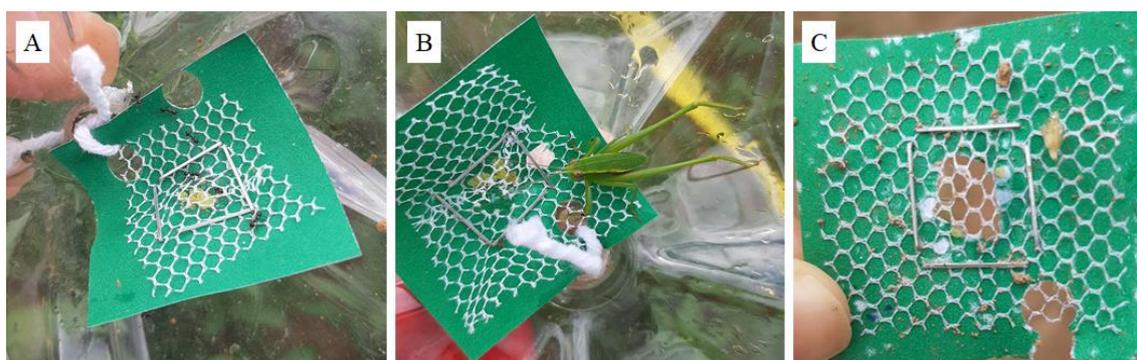
Foi observado que *T. podisi* foi o único parasitoide responsável pelo parasitismo observado nos ovos sentinela em todos os experimentos. Apesar disso, a taxa de parasitismo não variou entre os tratamentos no primeiro experimento ( $F=0,91$ ; g.l.= 6,  $P=0,7991$ ), mas variou entre os tratamentos do segundo ( $F=32,84$ ; g.l.= 6,  $P<0,001$ ) e terceiro experimento ( $F=22,68$ ; g.l.= 6,  $P<0,0001$ ). Apenas os tratamentos AF e FS incrementaram o parasitismo em relação ao controle apenas no segundo experimento (Figura 12). Dentre esses, apenas AF não interferiu negativamente na taxa de parasitismo dos ovos sentinela em nenhum dos experimentos, tendo no máximo um efeito neutro. Já os demais tratamentos tiveram um efeito neutro ou negativo dependendo do experimento. Ainda assim, a resposta do parasitismo aos tratamentos é bastante variável entre os experimentos (Figura 12).



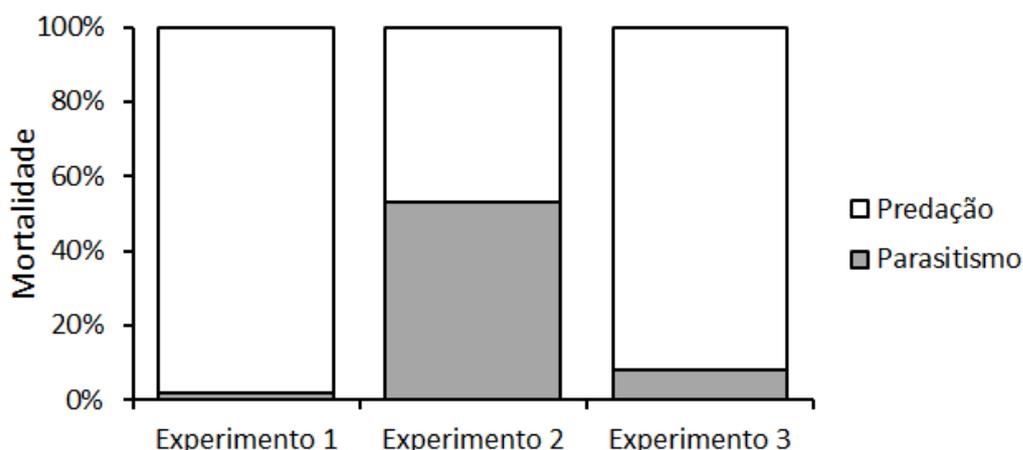
**Figura 12.** Parasitismo (media  $\pm$  SE) de ovos sentinela de *Euschistus heros* em relação aos tratamentos e aos experimentos. (AF)  $\alpha$ -farneseno; (FS) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila; (CA) cor amarela; (AFCA)  $\alpha$ -farneseno junto a cor amarela, (FSCA) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila junto a cor amarela; (MIX) combinação de AF, FS e CA; (CTRL) controle. (A) primeiro experimento, (B) segundo experimento e (C) terceiro

experimento. Letras distintas indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos.

A taxa de predação foi alta e maior que o parasitismo dos ovos no primeiro e terceiro experimentos, o que pode ter mascarado os resultados para taxa de parasitismo em função dos tratamentos. Porém, no experimento com menor predação e maior parasitismo, foi observada a influência positiva de AF e FS na taxa de parasitismo dos ovos (Figuras 12, 14, 15). A análise de proporções revelou que as causas de mortalidade parciais dos ovos sentinela variaram entre os campos. Foram observadas duas causas de mortalidade por controle biológico, o parasitismo por *T. podisi* e também a predação por formigas e ortópteros (Figura 13). No primeiro campo, o parasitismo foi responsável por 1,8% das mortes dos ovos, enquanto a predação foi responsável por 99% das mortes. No segundo campo o parasitismo causou 53% das mortes dos ovos e a predação responsável por 47%. No terceiro campo a proporção de parasitismo voltou a diminuir, chegando a 8% das causas de morte por controle biológico em comparação a 92% de mortes causadas por predação.



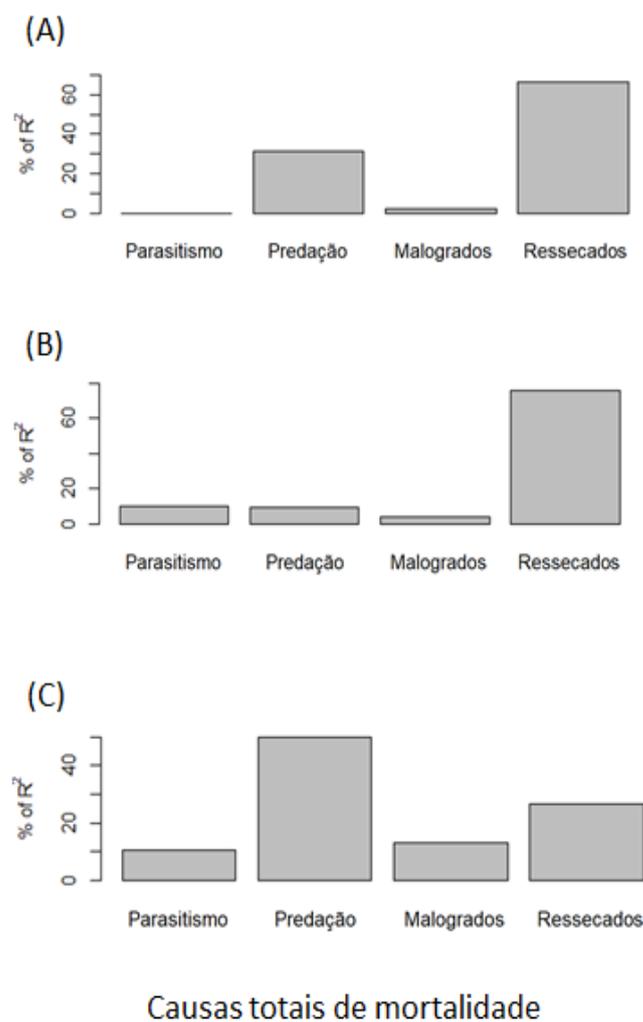
**Figura 13.** Cartelas de ovos sentinela com predação de (A) formigas e (B) um ortóptero. (C) ovos completamente desalojados por ortópteros.



**Figura 14.** Proporção do controle biológico causado por (A) parasitismo e (B) predação dos ovos sentinela de *Euschistus heros*.

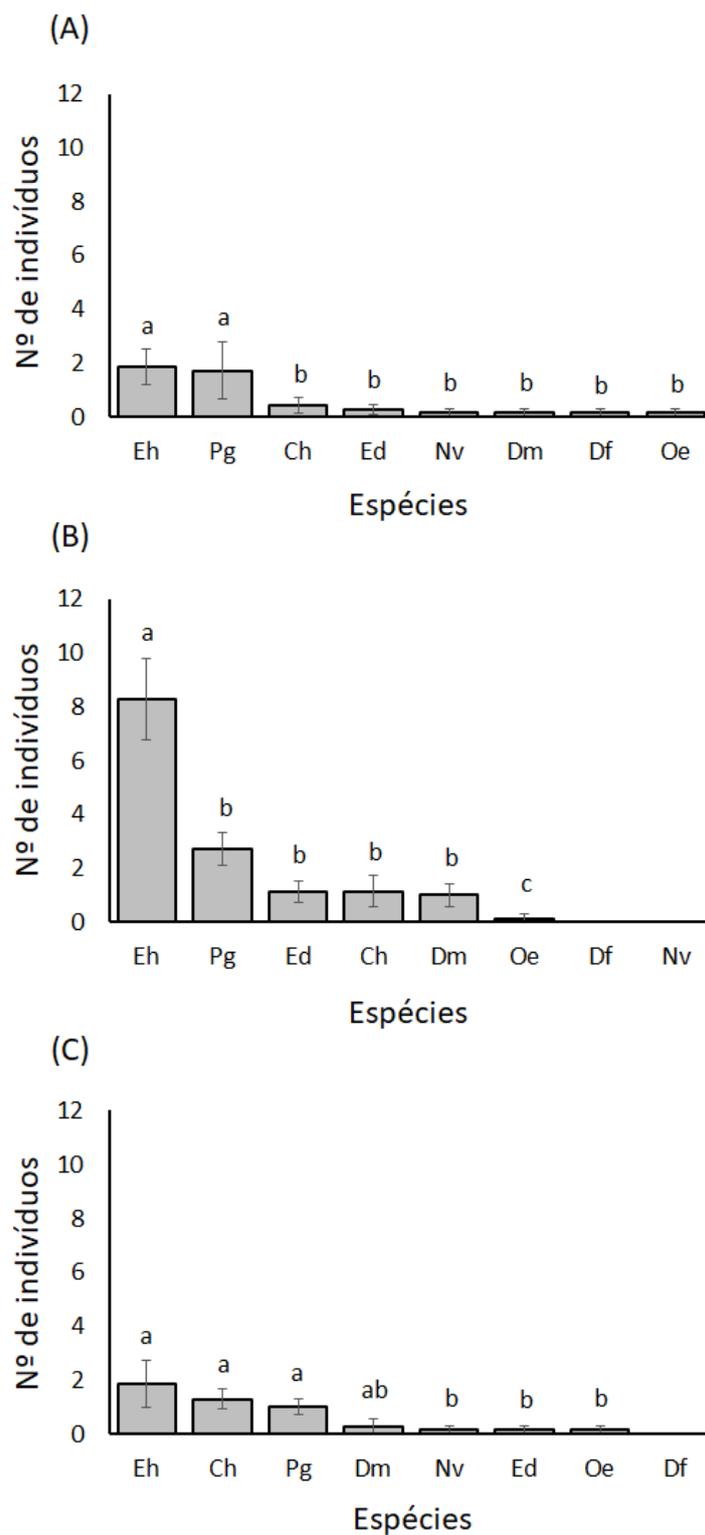
A análise de regressão múltipla revelou que as causas totais de mortalidade dos ovos sentinela (por controle biológico, causas abióticas e mortalidade natural do hospedeiro) também variaram entre os experimentos, confirmado o padrão descrito anteriormente de forma quantitativa. Isso ocorreu, pois, a mortalidade total é composta pelos valores parciais de mortalidade por cada um dos fatores de mortalidade avaliados no experimento. No primeiro experimento, o parasitismo explicou menos de 5%, a predação explicou aproximadamente 30% da variação na mortalidade. No entanto, a principal causa de mortalidade foi o ressecamento dos ovos, que explicou aproximadamente 65% da variação dos valores de  $R^2$  ( $R^2=0,9997$ , g.l.=3,  $F=7,623$ ,  $P<0,0001$ ) (Figura 15). Esses valores variaram para os demais experimentos, sendo que no experimento 2, o parasitismo foi mais importante do que a predação, explicando 10% e 9% da variação na mortalidade, respectivamente. Ainda assim, nesse experimento o ressecamento dos ovos foi novamente a principal causa da mortalidade dos ovos, explicando 77% da variação dos valores de  $R^2$  ( $R^2= 0,9996$ , g.l.=3,  $F=6,77$ ,  $P<0,0001$ ) (Figura 15). No terceiro experimento a predação dos ovos foi responsável por explicar

50% da variação dos valores de  $R^2$ , seguido do ressecamento dos ovos (26%). O parasitismo explicou 11% da variação na mortalidade, sendo a menor porcentagem de mortalidade nesse experimento ( $R^2= 0,9981$ , g.l.=3,  $F=1,022$ ,  $P<0,0001$ ) (Figura 15). Esses resultados indicam que os fatores bióticos e abióticos foram responsáveis pela mortalidade dos ovos e que os fatores chave de mortalidade causados por agentes de controle biológico (e.g. parasitoides, formigas, ortópteros) variam de importância entre os experimentos.



**Figura 15.** Importância relativa dos fatores individuais de mortalidade dos ovos sentinela de *Euschistus heros* em campo, para o  $R^2$  da regressão linear múltipla, no (A) primeiro experimento, (B) segundo experimento, e (C) terceiro experimento.

Quanto a abundância dos percevejos houve diferença significativa entre as espécies no experimento 1 ( $F=3,24$ , g.l.=7,  $P=0,0078$ ), no experimento 2 ( $F=20,79$ , g.l.=7,  $P<0,0001$ ) e no experimento 3 ( $F=4,24$ , g.l.=7,  $P=0,0013$ ). Foram amostradas 8 espécies de pentatomídeos no total. Dentre essas *E. heros*, *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) e *Chinavia* sp. (Orian) foram as mais abundantes, independente do experimento (Figura 16). Em todas os experimentos *E. heros* foi a espécie mais abundante, as demais espécies variam a abundância entre os experimentos, mas *P. guildinii* e *Chinavia* sp. estavam sempre entre as mais abundantes depois de *E. heros* (Figura 16).

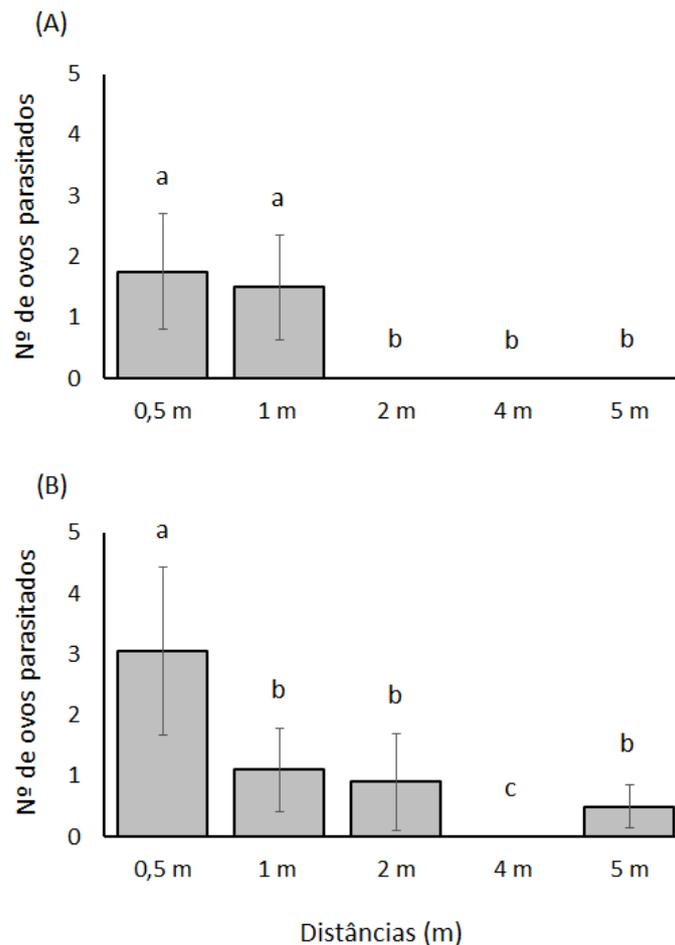


**Figura 16.** Abundância (média  $\pm$  SE) das espécies de percevejos pentatomídeos. Eh: *Euschistus heros*, Pg: *Piezodorus guildinii*, Ch: *Chinavia* sp., Ed: *Edessa meditabunda* (Fabricius), Dm: *Dichelops melacanthus* (Dallas, 1851), Df: *Dichelops furcatus*

(Fabricius), Oe: *Oebalus* sp., *Nezara viridula* (L.). Letras distintas indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) na abundância entre as espécies.

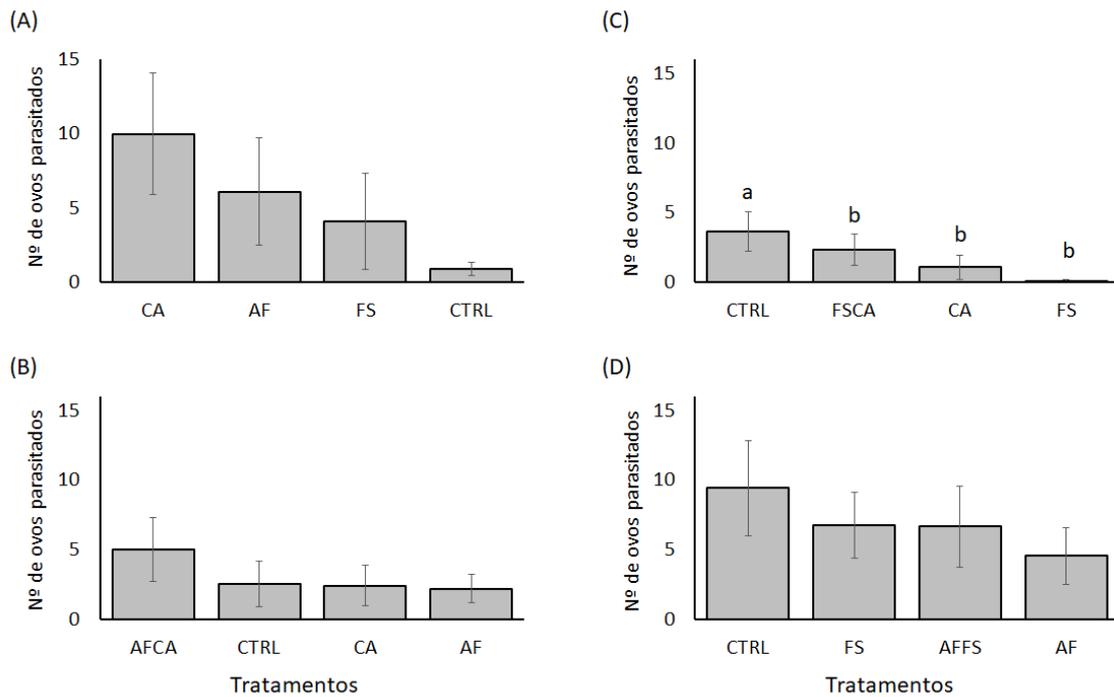
### **Experimentos de liberação e recaptura: capacidade de deslocamento dos parasitoides e atratividade dos estímulos**

Os resultados para o teste de deslocamento mostraram que o parasitoide se deslocou a distâncias maiores nas plantas do que nas estacas (Figura 17). Os ovos sentinela foram mais parasitados quando colocados em plantas a distância de 0,5 m do ponto de liberação ( $\chi^2 = -4,101$ ,  $df = 4$ ,  $P < 0,001$ ), no entanto, foram encontrados ovos parasitados nas distâncias até 5 m do ponto de liberação dos parasitoides ( $\chi^2 = -2,067$ ,  $df = 4$ ,  $P = 0,1902$ ) (Figura 17). Nas estacas, os parasitoides se deslocaram a no máximo 1 m, sendo encontrados igualmente nas duas primeiras distâncias avaliadas ( $\chi^2 = -0,620$ ,  $df = 4$ ,  $P = 0,962$ ) (Figura 17). Não houve diferença na recaptura de *T. podisi* em cartelas adesivas a 10 m nas plantas (n 21) e nas estacas (n 13) ( $\chi^2 = 83,331$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0,1681$ ). O que indica que os parasitoides podem se deslocar até pelo menos 10 metros do ponto de liberação.



**Figura 17.** Número médio (média  $\pm$  SE) de ovos parasitados por repetição em relação às distâncias em experimentos (A) realizado em estacas, (B) experimento realizado em plantas de soja. Letras distintas indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre as distâncias.

Nos experimentos de atração por estímulos foi observado o efeito dos tratamentos apenas no teste 3, sendo maior o parasitismo dos ovos associados ao controle ( $\chi^2=28,775$ ,  $df=3$ ,  $P=0,0133$ ) (Figura 18). Não houve efeito dos tratamentos na abundância (inseto por cartela adesiva) de *T. podisi* ou qualquer outro parasitoide, com exceção para o teste 2 (AF e CA), sendo observada maior abundância de *T. podisi* no controle ( $\chi^2=2,148$ ,  $df=3$ ,  $P=0,0317$ ).



**Figura 18.** Parasitismo (media  $\pm$  SE) de ovos de *Euschistus heros* por *Telenomus podisi* em quatro testes distintos. (A) teste 1 (CA, AF, FS separadamente); (B) teste 2 (AF e CA juntos ou separados); (C) teste 3 (FS e CA juntos ou separados); (D) teste 4 (AF e FS juntos ou separados). (AF)  $\alpha$ -farneseno; (FS) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila; (CA) cor amarela; (AFCA)  $\alpha$ -farneseno junto a cor amarela; (FSCA) 2,6,10-trimetil tridecanoato de metila junto a cor amarela; (AFFS) combinação de AF e FS; (CTRL) Controle. Letras distintas indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre as distâncias.

## DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo de campo a avaliar o efeito das combinações de diferentes semioquímicos junto a um estímulo visual, na abundância de parasitoides da família Scelionidae e no parasitismo de ovos, bem como, para a população de seus hospedeiros pentatomídeos. De modo geral, a abundância total de parasitoides e de *T. podisi* não foi afetada positivamente por nenhum tratamento, assim como a população de percevejos.

Foram identificadas 8 espécies de percevejos e *E. heros* sempre foi mais abundante em todas os experimentos, no entanto, o número de percevejos foi baixo. Os ovos foram parasitados unicamente por *T. podisi*, possivelmente por ser o Scelionidae mais abundante em ovos de *E. heros* em cultura de soja (Yeorgan 1979; Corrêa-Ferreira e Moscardi 1996; Tillman 2010). Apenas os tratamentos AF e FS incrementaram o parasitismo em relação ao controle. No entanto, apenas AF não interferiu negativamente na taxa de parasitismo nos três experimentos. Apesar disso, o parasitismo não foi a principal causa de controle biológico, sendo superior à predação apenas no segundo experimento. Quanto aos fatores totais de mortalidade dos ovos, o ressecamento foi geralmente maior, seguido da predação e do parasitismo. Quanto aos testes de liberação e recaptura, foi observado que a capacidade de deslocamento com parasitismo é maior na presença das plantas, chegando até 5 m de distância. Adicionalmente, os parasitoides foram capturados em cartelas adesivas a 10 m dos pontos de liberação (experimentos com planta e com estaca). De modo geral, não houve efeito dos tratamentos no parasitismo e na abundância de *T. podisi* e demais parasitoides nos testes que avaliaram a atratividade dos estímulos em arenas de curta distância até 2,40 m dos pontos de liberação dos parasitoides.

Não foram observadas uma maior atratividade e maiores taxas de parasitismo quando os semioquímicos estavam associados ao estímulo visual (combinação multimodal), como proposto na hipótese deste trabalho. Entretanto, este resultado se alinha a hipótese de que para os parasitoides as primeiras etapas de forrageamento são baseadas em estímulos unimodais, como os voláteis de plantas induzidos por herbivoria (VPIH) (Aartsma et al. 2019), e posteriormente utilizariam a integração multimodal de diferentes estímulos para diminuir as incertezas ambientais favorecendo o encontro do hospedeiro (Aartsma et al. 2019; Partan e Marler 1999). Nesse sentido, os tratamentos unimodais atuariam atraído o parasitoide a longas distâncias e quando o inimigo natural

está no habitat do hospedeiro (e.g. planta de soja) os estímulos de curtas distâncias seriam utilizados de forma multimodal. No entanto, a partir de resultados anteriores (capítulo 1), aparentemente *T. podisi* também não responde a estímulos multimodais a curtas distâncias. Testes futuros devem ser conduzidos para avaliar como os estímulos atuam e se integram no cérebro de *T. podisi*, para a compreensão da atuação dos sinais químicos e físicos a nível fisiológico.

Os tratamentos que incrementaram o parasitismo de *T. podisi* foram os semioquímicos AF e FS. Esse resultado corrobora o observado previamente em testes de laboratório e em experimentos de campo, onde foi observada a atratividade dos parasitoides por esses tratamentos (Borges et al. 1998b, 1999; Michereff et al. 2013, dados não publicados). Entretanto, é a primeira vez que foi observado o aumento do parasitismo relacionado a estes estímulos (AF e FS). No entanto, o efeito positivo de AF e FS nas taxas de parasitismo foi observada apenas no experimento 2, isso pode ser explicado, em parte, pelo fato de que nos demais experimentos houve uma alta taxa de ovos predados. A predação pode ter mascarado os resultados das taxas de parasitismo em função dos tratamentos. Porém, no experimento onde o parasitismo foi maior que a predação, observou-se a influência de AF e FS, sendo um indício da atuação desses semioquímicos.

Portanto, quando avaliada apenas as taxas de mortalidade dos ovos por controle biológico, foi observado que o parasitismo chegou a 53% no segundo experimento, no entanto, nos demais experimentos representou menos de 10% das mortes dos ovos. Apesar da evidente importância de parasitoides como agentes de controle biológico de percevejos pentatomídeos (Zerbino e Panizzi 2019), e de ter sido observada a influência de semioquímicos na atração e retenção desses inimigos naturais, tanto a abundância quanto o parasitismo dos ovos foram baixos, o que diverge bastante de outros trabalhos que verificaram altas taxas de parasitismo em ovos de pentatomídeos em campo (Corrêa-

Ferreira e Moscardi 1996; Medeiros et al. 1997; Pacheco e Corrêa-Ferreira 2000; Bueno et al. 2020). No entanto, Corrêa-Ferreira e Moscardi (1996) e Bueno et al. (2020) fizeram a liberação de inimigos naturais em áreas agrícolas, visando o controle biológico aumentativo. A produção de parasitoides de ovos de percevejos pode ser uma barreira para a implementação do controle biológico destas pragas no Brasil. No entanto, empresas nacionais e estrangeiras com representação no país vem aumentando seu portfólio de agentes de controle. Em relação a *T. podisi* recentemente foi aprovado pelo MAPA o uso dessa espécie na agricultura orgânica como agentes macrobiológicos de controle (Togni et al. 2019), sendo hoje uma espécie produzida e comercializada no país (Koppert Biological Systems).

As demais causas de mortalidade dos ovos sentinela foram o ressecamento seguido pela predação. Estressores abióticos como a temperatura que causa desidratação é provavelmente um dos fatores de maior impacto na sobrevivência de ovos de insetos (Farnesi et al. 2017; Guerra-Grenier et al. 2021; Ogburn et al. 2021). Em 2020 foram observadas as maiores perdas de ovos por desidratação, o que pode ser explicado por veranicos durante fevereiro e março. Outra causa pode ter sido a maior exposição dos ovos sentinela quando a soja estava menor, expondo os ovos a radiação, e possivelmente criando um bolsão de calor debaixo do abrigo feito de garrafa do tipo PET. No entanto, essas são considerações que devem ser testadas em campo.

A predação foi, de modo geral, a principal causa biótica de mortalidade dos ovos sentinela. A predação de ovos de percevejos pentatomídeos em campo foi observado por diversos autores. Tillman et al. (2020) observaram que a predação de ovos de *Halyomorpha halys* (Stål) na soja atingiu níveis muito elevados (90,3% a 96,3%). Esse resultado se alinha a outros trabalhos, onde mais de 80% do controle biológico dos ovos de *H. halys* foram provenientes da predação (Ogburn et al. 2016; Morrison et al. 2018).

A predação foi também a causa da mortalidade de ovos de *Euschistus servus* (Say) e *Nezara viridula* (L.) especialmente por formigas e ortópteros (Tillman 2010), sendo pra *N. viridula* observada 18 espécies de insetos e 6 espécies de aranhas predadores (Stam et al. 1987). Neste trabalho, a predação foi maior em relação ao parasitismo no primeiro e terceiro experimentos, representando 30% e 50% das causas totais de morte dos ovos, respectivamente. No segundo campo foi observada uma taxa similar entre esses fatores, porém maior para o parasitismo, sendo de aproximadamente 10%, em comparação a 9% da predação, semelhante ao observado por (Vieira et al. 2014). Isso é importante, pois mostra uma flutuação entre o parasitismo e a predação de ovos de percevejos pentatomídeos em área agrícolas (Tillman 2010). Essa dinâmica deve ser considerada em programas de controle biológico, uma vez que predadores são benéficos como inimigos naturais, mas podem causar a morte de outros agentes de controle biológico (Parra 2014). Outra discussão importante é que, aparentemente, cartelas de ovos sentinela são mais vulneráveis a predadores do que ovos postos naturalmente (Tillman et al. 2020). Adicionalmente, ovos de *H. halys* postos naturalmente são mais parasitados do que ovos sentinela, possivelmente pela presença de caimônios na superfície dos ovos, que são perdidos quando são manipulados previamente em laboratório (Jones et al. 2014).

Quanto aos resultados dos testes de liberação e recaptura realizado em arenas, dado o baixo parasitismo em todos os tratamentos, é sugerido que a liberação massal não implica em parasitismo dos ovos em curto prazo (24h), sendo possivelmente melhor estabelecido depois de um período maior e/ou em mais gerações do inimigo natural na área. No entanto, isso deverá ser testado em experimentos em campo. Adicionalmente, foi observado que *T. podisi* tem a capacidade de dispersão com parasitismo em distâncias de 5 m, e de dispersão no ambiente para distâncias maiores de 10 metros, segundo o observado nas cartelas adesivas amarelas. Esse resultado se alinha ao observado para

outros Scelionidae. Foti et al. (2019) observaram que o parasitoide *T. basalis* se desloca a até 14 m, mas as taxas de parasitismo dos ovos são maiores a 3 metros de distância. Já o parasitoide de ovos *Gryon gallardoi* (Brethes) tem uma capacidade de dispersão de 7,6 m/dia (Canto-Silva et al. 2006). Os parasitoides são importantes inimigos naturais de percevejos pentatomídeos pragas (Corrêa-Ferreira e Moscardi 1996; Zerbino e Panizzi 2019). No entanto, neste trabalho foi observado que sua contribuição como agente de controle biológico de ovos sentinela de *E. heros* foi baixa. Ainda assim, é importante ressaltar que o parasitismo foi maior nas parcelas contendo semioquímicos relacionados ao hospedeiro, mostrando a capacidade desse inseto de se orientar e escolher locais mais adequados. Adicionalmente, é sugerido que sejam realizados testes futuros, em áreas experimentais e comerciais maiores, considerando a atuação desses semioquímicos junto a liberação massal periódica de parasitoides. Possivelmente, essa será uma estratégia de sucesso no controle de percevejos pentatomídeos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aartsma Y, Cusumano A, Fernández de Bobadilla M, Rusman Q, Vosteen I, Poelman EH (2019) Understanding insect foraging in complex habitats by comparing trophic levels: insights from specialist host-parasitoid-hyperparasitoid systems. *Curr Opin Insect Sci* 32:54–60.
- Aldrich JR, Rosi MC, Bin F (1995) Behavioral correlates for minor volatile compounds from stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *J Chem Ecol* 21:1907–1920.
- Aquino MFS, Sujii ER, Borges M, Blassioli Moraes MC, Laumann RA (2019) Diversity of stink bug adults and their parasitoids in soybean crops in Brazil: influence of a latitudinal gradient and insecticide application intensity. *Environ Entomol* 48:105–113.
- Borges M, Costa MLM, Sujii ER, Cavalcanti MG, Redígolo GF, Resck IS, Vilela EF (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, Moraes MCB, Laumann RA, Pareja M, Silva CC, Michereff MFF, Paula DB (2011) Chemical ecology studies in soybean crop in Brazil and their application to

- pest management. In: Ng T-B (ed) Soybean-biochemistry, chemistry and physiology. InTech Publishing, Rijeka, pp p31–p66.
- Borges M, Mori K, Costa MLM, Sujii ER (1998a) Behavioural evidence of methyl-2,6,10-trimethyltridecanoate as a sex pheromone of *Euschistus heros* (Het., Pentatomidae). *J Appl Entomol* 122:335–338
- Borges M, Schmidt FGV, Sujii ER, Medeiros MA, Mori K, Zarbin PHG, Ferreira JTB (1998b) 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.
- Bueno AF, Braz ÉC, Favetti BM, França-Neto JB, Silva GV (2020) Release of the egg parasitoid *Telenomus podisi* to manage the Neotropical Brown Stink Bug, *Euschistus heros*, in soybean production. *Crop Prot* 137:1–7.
- Canto-Silva CR, Kolberg R, Romanowski HP, Redaelli LR (2006) Dispersal of the egg parasitoid *Gryon gallardoi* (Brethes) (Hymenoptera: Scelionidae) in tobacco crops. *Brazilian J Biol* 66:9–17.
- Corrêa-Ferreira BS, Moscardi F (1996) Biological control of soybean stink bugs by inoculative releases of *Trissolcus basalidis*. *Entomol Exp Appl* 79:1–7.
- Costa MLM, Borges M, Vilela EF (1998) Biologia reprodutiva de *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae). *An da Soc Entomológica do Bras* 27:559–568.
- Crawley MJ (2007) *The R book*. Wiley, Chichester.
- Eggleton P, Belshaw R (1992) *Insect Parasitoids: An Evolutionary Overview*. 337:1–20.
- Eilenberg J, Hajek A, Lomer C (2001) Suggestions for unifying the terminology. *BioControl* 46:387–400.
- Farnesi LC, Vargas HCM, Valle D, Rezende GL (2017) Darker eggs of mosquitoes resist more to dry conditions: Melanin enhances serosal cuticle contribution in egg resistance to desiccation in *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* vectors. 1–20
- Fatouros NE, Cusumano A, Bin F, Polaszek A, van Lenteren JC (2020) How to escape from insect egg parasitoids: A review of potential factors explaining parasitoid absence across the Insecta. *Proc R Soc B* 287:20200344.
- Foti MC, Peri E, Wajnberg E, Colazza S, Rastás M (2019) Contrasting olfactory responses of two egg parasitoids to buckwheat floral scent are reflected in field parasitism rates. *J Pest Sci* (2004) 92:747–756.
- Frizzo TLM, Souza LM, Sujii ER, Togni PHB (2020) Ants provide biological control on tropical organic farms influenced by local and landscape factors. *Biol Control* 51:104378.
- Godfray HCJ (2016) Four decades of parasitoid science. *Entomol Exp Appl* 159:135–146.
- Guerra-Grenier E, Abram PK, Brodeur J (2021) Asymmetries affecting aggressive contests between solitary parasitoids: The effect of host species. *Behav Ecol* 31:1391–1400.
- Grömping U (2006) Relative importance for linear regression in R: the package relaimpo. *J Stat Sotw* 17:1–27.
- Jones AL, Jennings DE, Hooks CRR, Shrewsbury PM (2014) Sentinel eggs underestimate rates of parasitism of the exotic brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys*. *Biol Control* 78:61–66.

- Koppert Biological Systems, O Produto Ideal.
- Laumann RA, Aquino MFS, Moraes MCB, Pareja M, Borges M (2009) Response of the Egg Parasitoids *Trissolcus basalus* and *Telenomus podisi* to Compounds from Defensive Secretions of Stink Bugs. *J Chem Ecol* 35:8–19.
- Lewis WJ, Jones RL, Nordlund DA, Sparks AN (1975) Kairomones and their use for management of entomophagous insects: I. Evaluation for increasing rates of parasitization by *Trichogramma* spp. in the field. *J Chem Ecol* 1:343–347.
- Lewis WJ, Nordlund DA, Gueldner RC, Teal PEA, Tumlinson JH (1982) XIII. Kairomonal Activity for *Trichogramma* spp. of Abdominal Tips, Excretion, and a Synthetic Sex Pheromone Blend of *Heliothis zea* (Boddie) Moths. *J Chem Ecol* 8:1323–1331.
- Medeiros MA, Schimidt FVG, Loiacono MS, Carvalho VF, Borges M (1997) Parasitismo e predação em ovos de *Euschistus heros* (Fab.) (Heteroptera: Pentatomidae) no Distrito Federal, Brasil. *An da Soc Entomológica do Bras* 26:397–401.
- Michereff MFF, Borges M, Laumann RA, Diniz IR, Blassioli-Moraes MC (2013) Influence of volatile compounds from herbivore-damaged soybean plants on searching behavior of the egg parasitoid *Telenomus podisi*. *Entomol Exp Appl* 147:9–17.
- Moraes MCB, Laumann R, Sujii ER, Pires C, 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 MCB, Pareja M, Laumann RA, Hoffmann-Campo CB, Borges M (2008) Response of the parasitoid *Telenomus podisi* to induced volatiles from soybean damaged by stink bug herbivory and oviposition. *J Plant Interact* 3:111–118.
- Morrison WR, Blaauw BR, Nielsen AL, Talamas E, Leskey TC (2018) Predation and parasitism by native and exotic natural enemies of *Halymorpha halys* (Stål) (Hemiptera: Pentatomidae) eggs augmented with semiochemicals and differing host stimuli. *Biol Control* 121:140–150.
- Ogburn EC, Bessin R, Dieckhoff C, Dobson R, Grieshop M, Hoelmer KA, Mathews C, Moore J, Nielsen AL, Poley K, Pote JM, Rogers M, Welty C, Walgenbach JF (2016) Natural enemy impact on eggs of the invasive brown marmorated stink bug, *Halymorpha halys* (Stål) ( Hemiptera : Pentatomidae ), in organic agroecosystems : A regional assessment. *Biol Control* 101:39–51.
- Ogburn EC, Heintz-botz AS, Talamas EJ, Walgenbach JF (2021) Biological control of *Halymorpha halys* (Stål) ( Hemiptera : Pentatomidae ) in apple orchards versus corn fields and their adjacent woody habitats: High versus low pesticide-input agroecosystems. *Biol Control* 152:104457.
- Pacheco DJ, Corrêa-ferreira BS (2000) Parasitismo de *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Scelionidae) em Populações de Percevejos Pragas da Soja. *An da Soc Entomol do Bras* 29:295–302.
- Pareja M, Borges M, Laumann A, Moraes MCB (2007) Inter- and intraspecific variation in defensive compounds produced by five neotropical stink bug species (Hemiptera: Pentatomidae). *J Insect Physiol* 53:639–648.
- Parra JRP (2014) Biological control in Brazil: An overview. *Sci Agric* 71:420–429.

- Parra JRP (2002) Criação massal de inimigos naturais. In: Parra JRP. Controle Biológico no Brasil – Parasitóides e Predadores. Editora Manole, São Paulo. pp143–161.
- Partan S, Marler P (1999) Communication goes multimodal. *Science* 283:1272–1273.
- R Core Team, 2017. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Austria, <https://www.R-project.org>.
- Rousse P, Gourdon F, Roubaud M, Chiroleu F, Quilici S (2009) Biotic and Abiotic Factors Affecting the Flight Activity of *Fopius arisanus*, an Egg-Pupal Parasitoid of Fruit Fly Pests. *Physiol Ecol* 38:896–903.
- Stam PA, Newsom LD, Lambremont EN (1987) Predation and Food as Factors Affecting Survival of *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae) in a Soybean Ecosystem. *Environ Entomol* 16:1211–1216.
- Steidle JLM, van Loon JJA (2002) Chemoecology of parasitoid and predator oviposition behaviour. In: Hilker M, Meiners T (eds) *Chemoecology of Insect Eggs and Egg Deposition*. Blackwell, Berlin, pp 291–318.
- Sujii ER, Costa MLM, Pires CSS, Colazza S, Borges M (2002) Inter and intra-guild interactions in egg parasitoid species of the soybean stink bug complex. *Pesqui Agropecu Bras* 37:1541–1549.
- Tillman PG (2010) Parasitism and predation of stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) eggs in Georgia corn fields. *Environ Entomol* 39:1184–1194.
- Tillmann G, Toews M, Blaauw B, Sial A, Cottrell T, Talamas E, Buntin D, Joseph S, Balusu R, Fadamiro H, Lahiri S, Patel D (2020) Parasitism and predation of sentinel eggs of the invasive brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Stål) (Hemiptera: Pentatomidae), in the southeastern US. *Biol Control* 145:104247.
- Togni PHB, Venzon M, Lagôa ACG, Sujii ER (2019) Brazilian Legislation Leaning Towards Fast Registration of Biological Control Agents to Benefit Organic Agriculture. *Neotrop Entomol* 48:175–185.
- van Alphen JJM, Vet LEM (1986) An evolutionary approach to host finding and selection. In: Waage JK, Greathead DJ (eds) *Insect parasitoids*. Academic Press, pp 23–61.
- Vieira CR, Blassioli-Moraes MC, Borges M, Pires CSS, Sujii ER, Laumann RA (2014) Field evaluation of (*E*)-2-hexenal efficacy for behavioral manipulation of egg parasitoids in soybean. *BioControl* 59:525–537.
- Vieira CR, Blassioli-Moraes MC, Borges M, Sujii ER, Laumann RA (2013) *cis*-Jasmone indirect action on egg parasitoids (Hymenoptera: Scelionidae) and its application in biological control of soybean stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae). *BioControl* 64:75–82.
- Vinson SB (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.
- Vinson SB (1984) Parasitoid-Host Relationship. In: Bell WJ, Cardé RT (eds) *Chemical Ecology of Insects*. Springer US, Boston, MA, pp 205–233.
- Yeorgan KV (1979) Parasitism and predation of stink bug eggs in soybean and alfalfa fields. *Environ Entomol* 8:715–719.

- Zerbino MS, Panizzi AR (2019) The underestimated role of pest pentatomid parasitoids in Southern South America. *Arthropod Plant Interact* 13:703–718.
- Zhang A, Borges M, Aldrich JR, Camp M (2003) Stimulatory male volatiles for the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae). *Neotrop Entomol* 32:713–717.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho enriquece o conhecimento acerca do comportamento de forrageamento de *Telenomus podisi*. Foi possível avaliar que existe uma dinâmica comportamental dos parasitoides a longas e curtas distâncias mediada por estímulos direta e indiretamente relacionados ao hospedeiro, e essa dinâmica é bastante plástica e complexa, ademais, causada por tomadas de decisões rápidas. Foi possível observar que estímulos como a cor e o rastro tem papel crucial no encontro com o hospedeiro a curtas distâncias, e a longas distâncias os voláteis de plantas e o feromônio do hospedeiro tem maior potencial em atraí-lo revertendo essa atração em parasitismo de ovos.

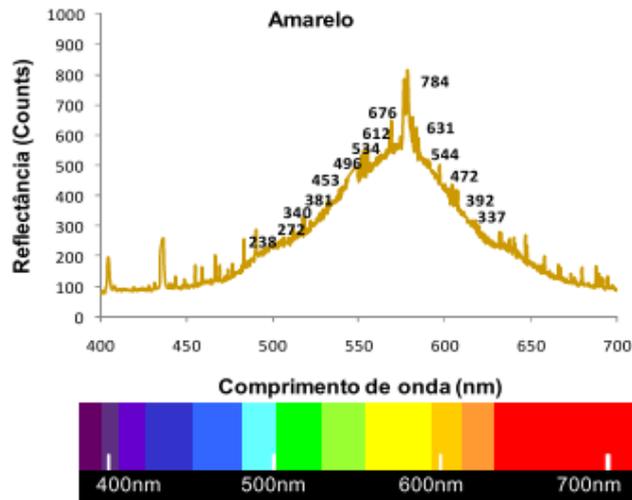
*Telenomus podisi* utiliza as informações de estímulos unimodais a curtas distâncias, e embora todos os estímulos avaliados sejam importantes durante o seu forrageamento, o estímulo visual e o rastro foram sinais determinantes e influenciaram a resposta do parasitoide a estímulos de outra natureza. Portanto, o parasitoide responde a vários estímulos do ambiente e do hospedeiro, mas prefere aqueles estímulos mais confiáveis e mais próximos ao seu micro-habitat. Assim como avaliado em testes de curtas distâncias, o parasitoide também utiliza informações unimodais para encontrar o recurso a longas distâncias. No entanto, a longas distâncias os semioquímicos voláteis separadamente tem maior potencial em incrementar o forrageamento dos parasitoides resultando em maiores taxas de parasitismo dos ovos dos hospedeiros em campo. Adicionalmente, foi proposto um modelo das etapas de forrageamento de *T. podisi* combinando comportamentos inatos e aprendidos. O modelo se baseou nas respostas do parasitoide a estímulos diretamente e indiretamente relacionados aos ovos, que atuam a longas e curtas distâncias. O parasitoide tem atração inata por todos os estímulos avaliados separadamente, mas quando foram contrastados entre si, de modo geral, não foi

observada escolha por nenhum. No entanto, foi observado que o parasitoide é capaz de distinguir e preferir um estímulo confiável que atua a curtas distâncias em relação a um estímulo detectável de longas distâncias. Porém a linearidade hierárquica dos estímulos no forrageamento de *T. podisi* não foi observada.

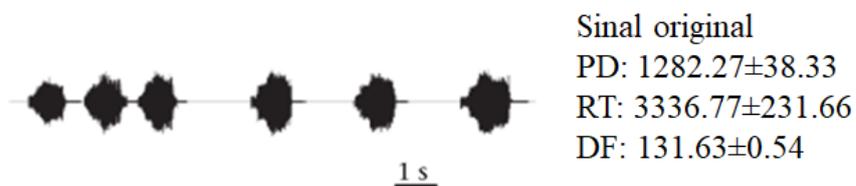
As informações disponíveis nesta tese podem ser importantes quando consideradas em estratégias de controle biológico conservativo de percevejos pentatomídeos. A utilização de semioquímicos voláteis atrativos aos parasitoides poderia aumentar o recrutamento dos inimigos naturais e conseqüentemente aumentariam as taxas de parasitismo de ovos em campo. Além disso, os testes realizados em laboratório, simulando o forrageamento de *T. podisi* em curtas distâncias (i.e. micro-habitat do hospedeiro), fornecem informações cruciais sobre o padrão comportamental dos parasitoides numa menor escala e sem interferências ambientais favorecendo a compreensão de modelos teóricos e aspectos básicos do comportamento dos insetos.

## APÊNDICE

### CAPÍTULO 1 - Material suplementar referente ao Capítulo 1



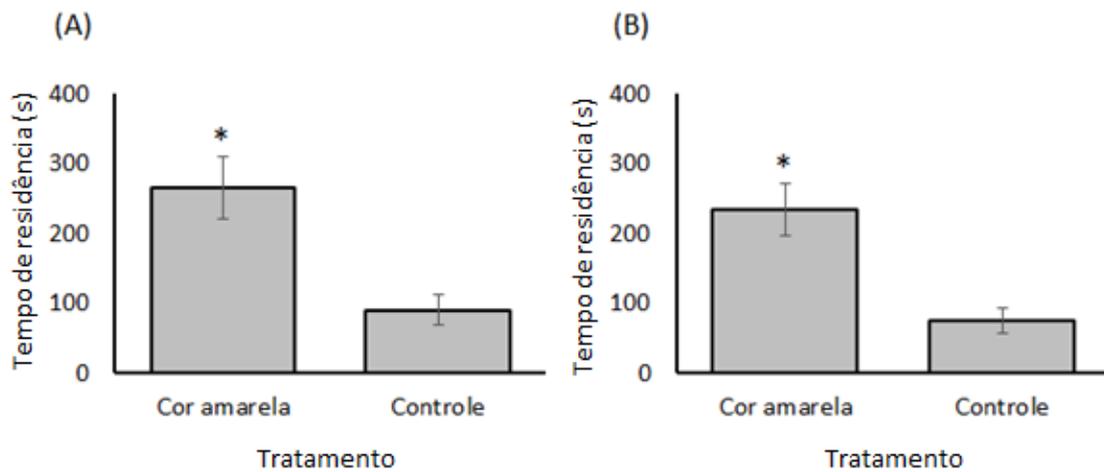
**Apêndice 1.1.** Medidas de fótons refletidos pelo substrato amarelo seguida pela faixa do espectro eletromagnético visível. Os números posicionados sobre os picos em cada figura representam a refletância do comprimento de onda emitido por cada cor de substrato. Adaptado de Aquino (2011).



$N/n=16/3$  em todos os parâmetros

**Apêndice 1.2.** Oscilograma representativo, características temporais e frequência dominante (média ± SE) do sinal original usado nos bioensaios. O oscilograma representa seis pulsos de uma canção feminina (MS1). PD: duração do pulso; RT: tempo de repetição; DF: frequência dominante. N = número de pulsos, n = número de sinais (indivíduos). Adaptado de Laumann et al. (2007).

CAPÍTULO 2 - Material suplementar referente ao Capítulo 2



**Apêndice 2.1.** Média  $\pm$  SE do tempo de residência (s) de fêmeas de *Telenomus podisi* nos tratamentos que consistiram em uma fita de tecido TNT amarelo (A) ( $\chi^2= 5306,9$ ,  $df=1$ ,  $P<0,001$ ), e um cartão amarelo plástico (B) ( $\chi^2= 4084,5$ ,  $df=1$ ,  $P<0,001$ ) e seus respectivos controles. \* Diferenças significativas entre os tratamentos ( $P<0,05$ ) por análise de modelos lineares generalizados (GLM).