

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

**ECOLOGIA QUÍMICA DAS INTERAÇÕES TRI-TRÓFICAS PLANTAS-
PERCEVEJOS-PARASITÓIDES DE OVOS**

ANA PAULA SILVA LOPES

Brasília – DF

Julho 2011



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

**ECOLOGIA QUÍMICA DE INTERAÇÕES TRI-TRÓFICAS PLANTAS-
PERCEVEJOS-PARASITÓIDES DE OVOS**

ANA PAULA SILVA LOPES

Orientadora: Dra. Ivone Rezende Diniz

Co-orientador: Dr. Raúl Alberto Laumann

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Ecologia

Brasília – DF

Julho 2011

Aos meus amados pais,

Aos meus amados namorado e filho,

As minhas amadas irmã e sobrinhas,

Aos meus queridos orientadores.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia, pela oportunidade de realização do mestrado;

Aos docentes pelos ensinamentos, em especial a professora Dra. Mercedes Bustamante;

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

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

À banca examinadora, Dr Alexandre Specht, Helena C. Morais e John Du Vall Hay, pelas contribuições;

À pesquisadora Dra. Maria Carolina Blassioli Moraes, pelos ensinamentos e pela ajuda com as análises química e ao Dr. Miguel Borges pelos ensinamentos e pelo apoio;

À professora Dra. Ivone Rezende Diniz, por ter me aceitado na disciplina Biologia de Insetos como aluna especial e por me orientar durante o mestrado, pelo apoio durante a gravidez, paciência e compreensão e pelas dicas valiosas;

Ao pesquisador e co-orientador Dr. Raúl Alberto Laumann que tanto me ajudou, pela compreensão, e que nos momentos difíceis estava sempre ao meu lado me apoiando e dizendo palavras confortáveis;

Aos funcionários do laboratório Hélio Moreira e aos estagiários pelos auxílios na criação dos insetos; ao Márcio Wandré Oliveira no manuseio do equipamento de cromatografia e ajuda com a parte química. E por tornarem um ambiente de trabalho mais divertido;

Ao Jonatas Ferreira pela ajuda com as plantas, ao Diego Magalhães pela companhia nos finais de semana, discussões científicas. As meninas Isabella Grisi, Aline Dias, Samantha Silveira, Karem Lima por me ajudarem com o Cauã no laboratório e por tornarem o ambiente de trabalho agradável. A Cecília Vieira e a todos os colegas que eu tenha esquecido, porém não menos importante;

A todos do PCB que participaram direta ou indiretamente nessa parte de minha vida;

Aos amigos que conquistei durante o mestrado, em especial o Jonas e Sabrina.

À Michely Aquino que desde a graduação estamos juntas e agora no mestrado realizamos disciplinas juntas e sempre ao meu lado me ajudando com dicas e ensinamentos e por sua grande amizade e apoio;

À Mirian Michereff e Luciane Xavier que sempre me apoiaram e me ajudaram com o Cauã, nos momentos alegres e tristes me confortando com palavras carinhosas, e aconselhamentos científicos;

À Raquel Estolano que dividimos as angustias do mestrado e quando eu precisei foi babá do Cauã, a Míria Cerqueira por estar ao meu lado e a todos os amigos, que eu não mencionei, por compreenderem minha ausência momentânea, por torcerem pelo meu sucesso e por fazerem parte da minha vida mesmo que distante;

À minha Irmã Ana Cristina Silva Lopes e minhas sobrinhas Mariana Sayuri Lopes Miura e Luciana Ayumi Lopes Miura pelo amor e carinho;

Ao meu namorado Haony Alves da Silva, pela paciência, atenção, incentivo e amor. Ao meu filhote, Cauã Lopes Alves, que junto ao mestrado foi uma realização, que apesar de ser tão pequeno e ainda não entender o que se passa é uma criança que diferente do mestrado não me deixou noites em claro e não dava trabalho no laboratório quando eu tinha que levá-lo;

Aos meus pais, Antonio Teobaldo Lopes e Antonia de Jesus Silva Lopes pelo amor, apoio incondicional, pelo incentivo, dedicação, compreensão e paciência;

E principalmente a Deus, que me deu forças não só para o termino do mestrado, mas em situações muito difíceis que passei durante o mestrado e por te me dado presentes maravilhosos em minha vida, em especial minha família.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	6
Objetivo geral	6
Objetivos Específicos	6
HIPÓTESES	7
MATERIAL E MÉTODOS	8
Preparo das plantas para os experimentos	8
Insetos	9
Extração dos voláteis	10
Bioensaios em olfatômetro	12
Análise Estatística	15
RESULTADOS	17
Análise da emissão de voláteis	17
Bioensaios com parasitóides	23
DISCUSSÃO	29
CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
BIBLIOGRAFIA	35
ANEXOS	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sistema de Aeração de plantas. A- vista geral do sistema mostrando câmaras de aeração, B- Detalhe de uma câmara mostrando a entrada e saída de ar e a posição do filtro de carvão ativado e do adsorvente.

Figura 2. Olfatômetro em Y utilizado nos bioensaios para observação comportamental dos parasitóides: entrada dos estímulos (1), áreas de análise (2), área de liberação do inseto (3), escoamento do ar (4). As áreas coloridas representam o percurso dos odores no olfatômetro.

Figura 3: Montagem de olfatômetro em “Y” e outros equipamentos para condução de bioensaios: fluxômetro (1), umidificador (2), filtro de carvão ativado (3), câmara de vidro (4), entrada dos estímulos no olfatômetro (5), saída dos estímulos no olfatômetro (6).

Figura 4: Voláteis totais (Média \pm Desvio padrão) obtidos das plantas de soja sem percevejos (controle) e de plantas de soja de diferentes tratamentos e após diferentes períodos de herbivoria. Eh= plantas tratadas com quatro fêmeas de *E. heros*, Nv= plantas tratadas com quatro fêmeas *N. viridula*, EhNv= plantas tratadas com duas fêmeas de *E. heros* e duas fêmeas de *N. viridula*. Mesmas letras maiúsculas em cada tempo indicam diferenças não significativas entre os tratamentos. Mesmas letras minúsculas indicam diferenças não significativas entre as horas considerando o mesmo tratamento (MANOVA para medidas repetidas e contrastes entre os tratamentos, $P > 0,05$).

Figura 5: Comparação quantitativa (média \pm erro padrão) das misturas de voláteis de soja sem herbivoria (1), soja com herbivoria de quatro fêmeas de *E. heros* (2), soja com herbivoria de quatro fêmeas de *N. viridula* (3) e soja com herbivoria de duas fêmeas de *E. heros* + duas fêmeas de *N. viridula* (4) em 24, 48, 72 e 96h após o início dos experimentos. As letras representam os compostos: (Z)-3-hexen-1-ol (A), 6-metil-5-hepten-2-ona (B), (Z)-3-acetato de

hexenila (C), α -felandreno (D), limoneno (E), (*E*)- β -ocimene (F), salicilato de metila (G), benzotiazol (H), geranil acetona (I), β -cariofileno (J), α -farneseno (K), (*E,E*)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno (TMTT) (L).

Figura 6: Análises de variáveis canônicas (AVC) mostrando as diferenças na composição de voláteis de plantas de soja de diferentes tratamentos e após diferentes períodos de herbivoria. Eh= plantas tratadas com quatro fêmeas de *E. heros*, Nv= plantas tratadas com quatro fêmeas *N. viridula*, EhNv= plantas tratadas com duas fêmeas de *E. heros* e duas fêmeas de *N. viridula*, controle= planta sem percevejos. Os símbolos representam os *scores* individuais para cada amostra calculados a partir da AVC que maximiza a diferença entre os tratamentos nas duas dimensões consideradas (CV1 e CV2). As linhas representam os diferentes compostos presentes nas amostras, o comprimento de cada linha representa a importância (magnitude relativa) da contribuição de cada composto para diferenciação dos tratamentos. As letras representam os compostos (*Z*)-3-hexen-1-ol (A), 6-metil-5-hepten-2-ona (B), (*Z*)-3-acetato de hexenila (C), α -felandreno (D), limoneno (E), (*E*)- β -ocimene (F), salicilato de metila (G), benzotiazol (H), geranil acetona (I), β -cariofileno (J), α -farneseno (K), (*E,E*)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno (TMTT) (L).

Figura 7: Resposta do parasitóide *Te. podisi* em olfatômetro para voláteis de plantas de soja de diferentes tratamentos e após diferentes períodos de herbivoria. Eh = plantas tratadas com quatro fêmeas de *E. heros*, Nv = plantas tratadas com quatro fêmeas *N. viridula*, EhNv = plantas tratadas com duas fêmeas de *E. heros* + duas fêmeas de *N. viridula*, controle = planta sem percevejos e ar = ar filtrado e umidificado sem presença de plantas. (A) primeira escolha, (B) tempo de residência (média \pm Erro Padrão (EP)), (C) mudança de direção (média \pm EP) e (D) trajeto total (média \pm EP). Números entre parênteses indicam os parasitóides que não responderam aos estímulos. Asteriscos indicam diferenças significativas (* = 0,01 < P < 0,05, ** = 0,001 < P < 0,01 e *** = P < 0,001). Teste χ^2 para escolha inicial, teste de Wilcoxon para o tempo de residência e teste t para mudança de direção e trajeto total.

Figura 8: Resposta do parasitóide *Te. podisi* em olfatômetro aos tratamentos: Eh 72h= plantas tratadas com quatro fêmeas de *E. heros* após 72 h de iniciada a herbivoria, Nv 96h= plantas tratadas com quatro fêmeas de *N. viridula* após 96 h de iniciada a herbivoria e EhNv 72h= plantas tratadas com duas fêmeas de *E. heros* e duas fêmeas de *N. viridula* após 72 h de iniciada a herbivoria. (A) primeira escolha e (B) tempo de residência (Média ± EP). Asteriscos indicam diferenças significativas (* = 0,01 < P < 0,05, ** = 0,001 < P < 0,01 e *** = P < 0,001). Teste χ^2 para escolha inicial e teste de Wilcoxon para o tempo de residência.

Figura 9: Resposta do parasitóide *Tr. basalis* em olfatômetro para voláteis de plantas de soja de diferentes tratamentos e após diferentes períodos de herbivoria. Eh= plantas tratadas com quatro fêmeas de *E. heros*, Nv= plantas tratadas com quatro fêmeas *N. viridula*, EhNv= plantas tratadas com duas fêmeas de *E. heros* e duas fêmeas de *N. viridula*, controle= planta sem percevejos e ar= ar filtrado e umidificado sem presença de plantas.. (A) primeira escolha, (B) tempo de residência (média ± EP), (C) mudança de direção (média ± EP) e (D) trajeto total (média ± EP). Números entre parêntese indicam os parasitóides que não responderam aos estímulos. Asteriscos indicam diferenças significativas (* = 0,01 < P < 0,05, ** = 0,001 < P < 0,01 e *** = P < 0,001. Teste χ^2 para escolha inicial, teste de Wilcoxon para o tempo de residência e teste t para mudança de direção e trajeto total.

RESUMO

O presente trabalho trata de interações tri-tróficas mediadas por semioquímicos no sistema soja-percevejos-parasitóides de ovos. O estudo concentrou-se na avaliação da: (1) composição qualitativa e quantitativa dos voláteis liberados pelas plantas de soja após a herbivoria por percevejos *Euschistus heros* e *Nezara viridula*; (2) resposta dos parasitóides *Telenomus podisi* e *Trissocus basalus* aos voláteis de plantas após diferentes tempos de herbivoria pelos percevejos *E. heros* e *N. viridula* e (3) relação da resposta dos parasitóides aos voláteis de plantas induzidas pela herbivoria de percevejos *E. heros* e *N. viridula* e a preferência de hospedeiros. A composição química das misturas de voláteis liberados pelas plantas após a herbivoria de percevejos *E. heros*, *N. viridula* ou de ambos foi diferente tanto quantitativa como qualitativamente, como também quando comparada às plantas sem herbivoria (controle). O composto (Z) 3-hexen-1-ol foi mais relacionado ao tratamento de ambos os percevejos, *E. heros* + *N. viridula*; limoneno e α -farneseno aos tratamentos *E. heros* e *N. viridula* e 6-metil-5-hepten-2-ona foi associado ao controle. Bioensaios em olfatômetros com os voláteis de plantas dos diferentes tratamentos mostraram que o parasitóide *Te. podisi* apresenta resposta seletiva às plantas com herbivoria de seu hospedeiro preferencial, *E. heros*. O parasitóide *Tr. basalus* não discriminou entre os voláteis induzidos pela herbivoria das duas espécies de percevejos. Os resultados sugerem que a composição da comunidade de percevejos herbívoros que atacam a soja influencia o comportamento de busca de hospedeiros pelos parasitóides de ovos mediante a indução diferencial de defesas.

ABSTRACT

This work deals with the tri-trophic interactions mediated by semiochemicals in the system soybean-stink bug-egg parasitoids. The study focused on the evaluation of: (1) the qualitative and quantitative composition of volatiles released by plants after herbivory by the stink bugs *Euschistus heros* and *Nezara viridula*; (2) the response of the parasitoids *Telenomus podisi* and *Trissococcus basalis* to the volatiles of soybean plants at different times after injury by *E. heros* and *N. viridula* and (3) the relation between the parasitoid response to the volatiles induced by the injury by the stink bugs *E. heros* and *N. viridula* with the host preference of the parasitoids. The chemical composition of the volatiles mixtures released by soybean plants after the injury by the stink bugs *E. heros*, *N. viridula* or both showed quantitative and qualitative differences and were also different when compared to plants without injury (control). The compound (*Z*) 3-hexen-1-ol was most related to the treatment with both stink bugs, *E. heros* + *N. viridula*; limonene e α -farnesene to the treatments with *E. heros* and *N. viridula* and 6-metil-5-hepten-2-ona was associated to the control plants. Olfactometer bioassays with plant volatiles from the different treatments showed that the parasitoid *Te. podisi* had a selective response to the plants injured by their preferential host, *E. heros*. The parasitoid *Tr. basalis* did not discriminate between volatiles induced by the injury of the two stink bugs. The results suggest that the composition of the guild of herbivorous stink bugs that attack soybeans could influence the host searching behaviour of the egg parasitoids by inducing differential defenses.

INTRODUÇÃO

Durante o período evolutivo as plantas desenvolveram mecanismos de defesa em respostas à pressão de herbivoria por insetos sendo alguns deles selecionados e altamente adaptativos. Entre estes estão às defesas induzidas por herbívoros (DIHs) (Dicke & Sabelis 1988), que se manifestam após as injúrias que podem ser decorrentes de atividades alimentar ou de oviposição. As plantas atacadas liberam compostos voláteis que interferem nas interações tri-tróficas: planta - inseto herbívoro - inimigo natural. As DIH consistem em misturas de compostos químicos voláteis (Dudareva et al., 2006) derivados de ácidos graxos (principalmente alcoóis, aldeídos e ésteres), terpenóides e compostos fenólicos (Dicke & Baldwin 2010). Estes compostos podem ser produzidos no local da injúria ou através de um efeito sistêmico em diferentes locais da planta (Dudareva et al., 2006; Dicke & Baldwin 2010).

As DIHs podem agir diretamente sobre os herbívoros, repelindo ou afetando a biologia (de Moraes et al., 2001; Kessler & Baldwin 2001) ou indiretamente por atrair os inimigos naturais como insetos entomófagos ou nematóides patogênicos (Dudareva et al., 2006). Esses compostos voláteis podem ter ação ecológica valiosa, ao reduzirem as injúrias, atuarem como sinalizadores da presença de herbívoros e patógenos para as plantas vizinhas (Kessler & Baldwin 2001; Dudareva et al., 2006). Podem até mesmo alterar a dinâmica e as cadeias tróficas da comunidade (Potting et al., 1999; Kessler & Halitschke 2007). Desta maneira, as interações mediadas por semioquímicos (substâncias químicas voláteis envolvidas na comunicação entre organismos), e especificamente as DIHs, podem ser determinantes para o desenvolvimento e a manutenção da estrutura e dinâmica das comunidades terrestres (Dicke & Baldwin 2010).

Os voláteis específicos induzidos pela herbivoria são utilizados por inimigos naturais de insetos herbívoros para identificar substratos (plantas) onde existe uma alta probabilidade de encontrar hospedeiros (Vet & Dicke 1992; Vinson 1998; Steidle & van Loon 2002; Colazza et al., 2004; Moraes et al., 2005, 2008; Pareja et al., 2007; Fatouros et al., 2008). Devido à alta biomassa das plantas, as DIHs são sinais conspícuos e detectáveis pelos parasitóides (Hilker & McNeil 2008).

As fêmeas dos parasitóides utilizam, durante a busca e seleção de hospedeiros, sinais de naturezas diferentes entre os quais se destacam os semioquímicos (Vilela & Della Lucia 2001). Os sinais percebidos pelo inseto durante as etapas de localização do hábitat e do hospedeiro modificam os padrões de movimentação do parasitóide, podendo gerar respostas táxicas (de orientação) ou quinéticas (modificação do padrão geral de movimentação). Durante as etapas de reconhecimento e aceitação (seleção) esses sinais contribuem para identificar e selecionar o hospedeiro (Laumann et al., 2008).

As DIHs podem variar qualitativa ou quantitativamente de acordo com a espécie do herbívoro que causa a herbivoria na planta (Moraes et al., 2005), com a presença de diferentes espécies de herbívoros numa mesma planta (Shiojiri et al., 2001; Vos et al., 2001), com o tipo de hábito alimentar (mastigador ou sugador) do herbívoro (Moraes et al., 2005), com o estágio fisiológico (Dick & Hilker 2003) e, ainda, com a espécie da planta hospedeira (Moraes et al., 2005). Conseqüentemente, os parasitóides podem discriminar entre voláteis liberados por plantas não-danificadas daqueles de plantas que sofreram injúria pelos herbívoros e, ainda, entre voláteis induzidos por diferentes espécies de herbívoros (Steinberg et al., 1993; Tumlinson et al., 1993; Potting et al., 1999; Vet et al., 1995; Hoballah et al., 2001; Poppy & Sutherland 2004). Além disso, as plantas podem liberar os voláteis induzidos até mesmo antes da injúria causada pelo inseto, como no caso da liberação de voláteis após a oviposição por lepidópteros, que é anterior à injúria causada

pela alimentação da larva (Hilker & Meiners, 2010).

Nas últimas duas décadas o conhecimento das DIHs e sua ação sobre os inimigos naturais avançaram significativamente. Entretanto, muitos dos trabalhos desenvolvidos têm sido realizados com base em sistemas de estudo simples envolvendo plantas cultivadas, insetos-praga e seus inimigos naturais. Em geral, estes estudos incluem uma única espécie em cada um dos níveis tróficos considerados (Dicke & Baldwin 2010). Um dos aspectos que ainda precisa ser estudado com maior detalhe, mesmo em plantas cultivadas, é o das interações das plantas com mais de um herbívoro e como estas influenciam a busca e a seleção de hospedeiros pelos parasitóides. A presença de diferentes espécies de herbívoros pode afetar tanto a produção e liberação de DIHs como o comportamento dos parasitóides. Plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Castlemart) danificadas pela alimentação de larvas de *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) e de adultos de afídeos *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas, 1878) (Hemiptera: Aphididae) mostraram-se mais atrativas ao parasitóide *Cotesia marginiventris* (Cresson, 1865) (Hymenoptera: Braconidae) do que as que apresentavam apenas uma espécie de herbívoro ou estavam livres de insetos (Rodriguez-Saona et al., 2005). Plantas de feijão fava (*Phaseolus lunatus* L. cv Sieva) e de pepino (*Cucumis sativus* L. cv Lange Groene Giganten) sob herbivoria de *S. exigua* e do ácaro *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari: Tetranychidae) foram mais atrativas ao ácaro predador *Phytoseiulus persimilis* (Athias-Henriot, 1957) (Acari: Phytoseiidae) do que as danificadas apenas por uma espécie (de Boer et al., 2008).

A indução de defesas na soja (*Glycine max* (L.) Merrill.) é influenciada pela espécie, pelo estágio de desenvolvimento e pelo sexo do herbívoro que origina a injúria. Por exemplo, quando a planta de soja sofre herbivoria por fêmeas de *Euschistus heros* (Fabricius, 1791) (Heteroptera: Pentatomidae) libera mais voláteis do que quando é atacada

por ninfas ou por machos. A composição de voláteis em soja também pode variar em função do tipo de aparelho bucal do herbívoro como após injúria de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) (Moraes et al., 2005). Variações genótípicas e fenotípicas da planta hospedeira também podem influenciar na interação tri-trófica. As cultivares de soja resistentes ao ataque de percevejos, IAC-100 e Dowling, quando danificadas por herbivoria ou conjuntamente pela herbivoria e oviposição atraíram mais fêmeas de *Telenomus podisi* (Ashmead, 1881) (Hymenoptera: Scelionidae), quando comparadas às plantas sem qualquer tipo de injúria, enquanto a cultivar suscetível Silvânia não afetou o comportamento do parasitóide (Michereff et al., 2011).

Os parasitóides da Família Scelionidae são inimigos naturais importantes de percevejos (Hemiptera: Pentatomidae) e são utilizados com sucesso em programas de controle biológico em diferentes locais do mundo, incluindo o Brasil. Existem diversos relatos na literatura a respeito de uso de semioquímicos por estes parasitóides. Assim, é conhecido que as espécies *Trissolcus basalis* (Wollaston, 1858) (Hymenoptera: Scelionidae) (Colazza et al., 2004) e *Te. podisi* usam sinais químicos, emitidos pelas plantas (Moraes et al., 2005, 2008) e pistas químicas derivadas da comunicação intraespecífica dos hospedeiros (feromônios) para localização do hábitat e do hospedeiro a longa distância (Mattiacci et al., 1993; Borges et al., 1997; Colazza et al., 1999; Conti et al., 2003; Laumann et al., 2009).

Os parasitóides da família Scelionidae são oligófagos ou polífagos, mas apresentam preferência por ovos de determinadas espécies de percevejos, por exemplo, fêmeas de parasitóides *Tr. basalis* preferem ovipositar em ovos de *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) (Heteroptera: Pentatomidae) enquanto que as de *Te. podisi* prefere ovos de *E. heros* (Sujii et al., 2002). Da mesma maneira, herbívoros polífagos, como os percevejos, podem mostrar preferências por plantas hospedeiras. Entre as plantas cultivadas, por exemplo, *E.*

heros e *N. viridula* mostram preferência pela soja, enquanto que *Dichelops melacanthus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae) ataca preferencialmente o milho (*Zea mays*) ou trigo (*Triticum* spp.) (Panizzi et al., 2000).

Os resultados desses e de outros estudos criaram uma perspectiva de uso destes inimigos naturais no controle biológico, pois os semioquímicos interferem no comportamento de forrageamento e, assim, estes insetos poderiam ser manipulados para aumentar a sua eficiência como inimigos naturais de pragas. No Brasil, têm ocorrido avanços no estudo de parasitóides e sua aplicação no manejo de pragas. Mas, apesar desses avanços ainda há vários aspectos biológicos e ecológicos das espécies que necessitam ser conhecidos para que o manejo seja eficiente para o desenvolvimento de novas tecnologias para o uso eficaz no controle biológico.

A informação disponível do sistema tri-trófico soja - percevejos - parasitóides de ovos (Hymenoptera: Scelionidae) indica que as plantas de soja liberam uma mistura de voláteis em resposta à injúria causada pela alimentação de ninfas e adultos do percevejo *E. heros* e estes voláteis atraem o parasitóide *Te. podisi* (Moraes et al., 2005). Assim, este trabalho pretendeu ir além ao estudar o mesmo sistema tri-trófico e os semioquímicos, mas incluindo outra espécie de percevejo e de parasitóide e estudando a interação entre esses agentes. Além disso, a preferência do parasitóide foi mais uma variável considerada nas análises.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Estudar as interações tri-tróficas mediadas por semioquímicos do sistema soja-percevejo-parasitóide de ovos para avaliar a especificidade de resposta dos parasitóides.

Objetivos Específicos

1. Identificar a composição qualitativa e quantitativa dos perfis químicos emitidos pelas plantas de soja quando danificadas pelos percevejos *E. heros* e *N. viridula*.
2. Verificar se os parasitóides *Te. podisi* e *Tr. basalis* respondem diferencialmente aos voláteis de plantas de soja quando danificadas pelos percevejos *E. heros* e *N. viridula*.
3. Verificar se a resposta dos parasitóides aos voláteis emitidos por plantas de soja induzidas pelos percevejos *E. heros* e *N. viridula* está relacionada com a preferência de hospedeiros dos parasitóides.

HIPÓTESES

1- A injúria causada pela herbivoria de *E. heros* e *N. viridula* influencia a composição qualitativa e quantitativa dos voláteis emitidos pelas plantas de soja e a resposta dos parasitóides de ovos, *Te. podisi* e *Tr. basalis*.

Predições:

- Espera-se que os perfis qualitativos e quantitativos de voláteis emitidos por plantas de soja danificadas por *E. heros*, por *N. viridula*, ou por ambos os insetos sejam diferentes.
- Espera-se que os parasitóides *Te. podisi* e *Tr. basalis* sejam atraídos diferentemente pelos voláteis emitidos pelas plantas de soja danificadas pelas duas espécies de percevejos.

2- A preferência de hospedeiros dos parasitóides de ovos *Te. podisi* e *Tr. basalis* influencia a resposta aos voláteis induzidos de planta de soja após a injúria causada pela herbivoria de *E. heros* e *N. viridula*.

Predições:

- Espera-se que o parasitóide *Te. podisi* responda aos voláteis induzidos nas plantas de soja pelo seu hospedeiro preferencial, o percevejo *E. heros*.
- Espera-se que o parasitóide *Tr. basalis* responda aos voláteis, liberados pelas plantas de soja, induzidos pelo seu hospedeiro preferencial, o percevejo *N. viridula*.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioecologia e Semioquímicos de Insetos, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN, Brasília-DF, no período de julho de 2009 a abril de 2011.

Preparo das plantas para os experimentos

Sementes de soja da cultivar Conquista foram plantadas em vasos plásticos (de 7.0 cm altura, com diâmetro externo de 9.0 cm na parte superior e 6.0 cm na parte inferior) contendo solo esterilizado e substrato orgânico na proporção 1:1. Os vasos foram mantidos em sala climatizada a 25°C, 60-70% de umidade relativa e fotoperíodo de 14:10 L:O.

Para a realização dos experimentos foram utilizadas plantas no estágio vegetativo V5 (quinto ramo de folhas compostas após os cotilédones) (Ritchie et al., 1982), estágio que, nas condições ambientais utilizadas, foi atingido após 30 a 35 dias da germinação. Neste estágio as plantas foram retiradas dos vasos, juntamente com o solo que em seguida foi envolvido com papel alumínio para evitar contaminação pelos voláteis do mesmo, e transferidos para câmaras de vidro de 14 L para coleta de voláteis ou para recipientes de vidro de 3 L para serem utilizadas nos bioensaios.

Previamente aos bioensaios, as plantas foram mantidas em sacos plásticos de polietileno microperefurados sofrendo herbivoria por quatro fêmeas adultas virgens (4 a 5 dias após tornarem-se adultos) dos percevejos *E. heros*, *N. viridula* ou ambos (2 insetos de cada espécie/planta) nos períodos de 48 h, 72 h e 96 h e sem herbivoria (plantas controle). Para evitar sinalização química, estas plantas, danificadas e não danificadas pelos insetos, foram mantidas em salas separadas antes de serem utilizadas nos bioensaios.

Insetos

Os insetos utilizados foram mantidos em colônias no laboratório, de acordo com a metodologia descrita em Laumann et al. (2005) e Borges et al. (2006). As colônias foram acondicionadas em câmaras climatizadas a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, $65 \pm 10\%$ UR e 14:10 L:D fotoperíodo.

Os percevejos *E. heros* e *N. viridula* foram mantidos em gaiolas plásticas (8 L) e alimentados com sementes de girassol (*Helianthus annuus* (L.)), grãos de soja, amendoim (*Arachis hypogaea* (L.)) e vagem verde (*Phaseolus vulgaris* (L.)). Para *N. viridula* foram oferecidas, como complemento alimentar, plantas de soja no estágio vegetativo. Os ovos dos percevejos foram coletados diariamente e colocados em placas de Petri. Após a eclosão as ninfas foram alimentadas com vagem de feijão e sementes anteriormente citadas, e após a terceira muda foram transferidas para gaiolas. Os adultos e ninfas foram separados em diferentes gaiolas. Para os experimentos, machos e fêmeas foram separados depois da última muda, antes de atingirem a maturidade sexual (média de 5 dias de idade na fase adulta).

Os parasitóides de ovos (*Te. podisi* e *Tr. basalis*) foram criados em gaiolas de plástico (frascos para cultura de tecidos de 25 cm^3 - ICN Biomedicals) e alimentados com mel puro. Ovos de *E. heros* foram oferecidos às fêmeas dos parasitóides para oviposição durante 48h. Após este período, os ovos foram removidos e transferidos para gaiolas plásticas para permitir o desenvolvimento dos estágios imaturos do parasitóide. Para os bioensaios foram utilizadas fêmeas de 24-48 h de idade sem experiência de oviposição e mantidas previamente com machos para acasalamento.

Extração dos voláteis

A extração de voláteis de plantas de soja foi realizada com a técnica de aeração (Figura 1). As plantas foram colocadas em câmaras de vidro (10 L) fechadas através das quais se estabeleceu uma circulação de ar filtrado com carvão ativado. A entrada do ar nas câmaras foi estabelecida através de um orifício lateral. O ar foi bombeado ao interior das câmaras com um compressor de ar a um fluxo de 1.0 L/min, controlado através de um regulador de fluxo. A saída de ar foi estabelecida por um orifício na parte superior da câmara onde foi conectado um tubo de vidro com adsorvente Super Q (100 mg, 80-100mesh, Alltech PA, USA). O tubo foi conectado a uma bomba de sucção que mantinha uma vazão de 0,6 L/min. Desta maneira, pelas diferenças de fluxo na entrada e saída de ar, o sistema trabalhou com pressão positiva no interior das câmaras evitando a contaminação das amostras por não permitir a entrada de ar do ambiente (não filtrado) e

Para obtenção das amostras, as plantas de soja dos diferentes tratamentos foram introduzidas nas câmaras de aeração. Foram realizados quatro conjuntos de aerações e em cada um foram dispostas três câmaras de cada tratamento: (1) quatro fêmeas de *E. heros*, (2) quatro fêmeas de *N. viridula*, (3) duas fêmeas de *E. heros*+duas fêmeas de *N. viridula* e (4) controle (plantas sem herbivoria), totalizando 12 repetições de cada tratamento. Os voláteis liberados pelas plantas foram coletados nos tubos de vidro com adsorvente Super Q em intervalos de 24 h durante quatro dias consecutivos.

Os voláteis coletados foram eluídos com solvente orgânico n-hexano (500 µl) e pré-concentrados a 50 µl sob fluxo de nitrogênio. Posteriormente, foi adicionado em cada extrato 2 µl de Ethyl-4-decenoato (100 µg/ml) (como referência, padrão interno (PI)). Os extratos assim preparados foram armazenados em freezer (- 20 °C) até o momento da análise.

As análises químicas foram conduzidas utilizando cromatografia gasosa (CG-Agilent Technologies 7890A GC System) com detector FID utilizando uma coluna DB-5 de 60 m x 320 μm e diâmetro interno de 1 μm . Para as análises foi utilizado um programa de incremento de temperatura, com a primeira de 50°C/1 min e um aumento de 15°C/min até atingir 250°C/1 min. Um microlitro (1 μl) de cada amostra foi injetado usando o modo “splitless” tendo hélio como gás de transporte. Os voláteis liberados pelas plantas em cada período de 24 h foram quantificados por comparação com a área dos picos do padrão interno (Ethyl-4-decenoato).

Para identificação dos compostos foi utilizada cromatografia gasosa acoplada á espectrometria de massas (CG-MS, Agilent Technologies 5975C MSD) com ionização por impacto de elétrons (energia de ionização de 70eV) com analisador quadrupolar. A identificação dos compostos foi realizada comparando-se o padrão de fragmentação do composto com aquele obtido de dados da biblioteca de espectro de massas (NIST 2009 e Wiley 2009). As identificações dos compostos foram confirmadas pela comparação do padrão de fragmentação e pelo índice de Kováts (KI). Para a confirmação, o padrão de fragmentação e o KI foram comparados com os dados obtidos dos padrões autênticos, sempre que disponíveis, que foram injetados no GC-MS nas mesmas condições das amostras.



Figura 1: Sistema de Aeração de plantas. A- vista geral do sistema mostrando câmaras de aeração, B- Detalhe de uma câmara mostrando a entrada e saída de ar e a posição do filtro de carvão ativado e do adsorvente.

Bioensaios em olfatômetro

Para verificar a influência dos voláteis liberados pelas plantas no comportamento dos parasitóides foram realizados bioensaios em olfatômetros.

Utilizou-se um olfatômetro confeccionado em uma placa de acrílico com um orifício no centro, em formato de Y, com o corpo central de 7,7 x 1,3 cm e dois braços de 7,0 x 1,7 cm cada um. O olfatômetro foi fechado na parte superior e inferior utilizando duas placas de vidro (Figura 2). O ar foi conduzido ao interior do olfatômetro (Figura 2-1) por uma bomba de aquário num sistema de bombeamento e sucção. Antes da entrada no sistema, o ar foi filtrado em carvão ativado, regulado por fluxômetro (0,6 l/min) e umidificado. Posteriormente, o ar foi conduzido, por mangueiras de silicone, às duas câmaras de vidro onde estavam as plantas. Após a passagem pelas plantas o ar foi transportado, também em mangueiras de silicone, até os braços do olfatômetro (Figura 2-2). Para escoamento do ar, uma bomba de sucção foi ligada no extremo oposto à entrada de ar do olfatômetro (0,2 l/mim) (Figura 2-3 e 1-4). A Figura 3 detalha o equipamento

utilizado nos bioensaios. O olfatômetro foi iluminado desde acima por duas lâmpadas fluorescentes (40 W) e desde abaixo por duas lâmpadas infravermelhas (emissão a 950 nm por 108 LEDs)

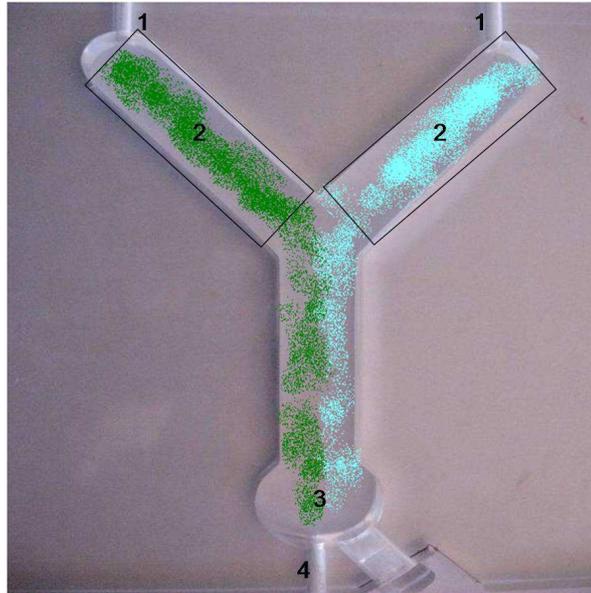


Figura 2. Olfatômetro em Y utilizado nos bioensaios para observação comportamental dos parasitóides: entrada dos estímulos (1), áreas de análise (2), área de liberação do inseto (3), escoamento do ar (4). As áreas coloridas representam o percurso dos odores no olfatômetro.



Figura 3: Olfatômetro em “Y” e outros equipamentos para condução de bioensaios: fluxômetro (1), umidificador (2), filtro de carvão ativado (3), câmara de vidro (4), entrada dos estímulos no olfatômetro (5), saída dos estímulos no olfatômetro (6).

Fêmeas de *Te. podisi* e *Tr. basalis* foram colocadas individualmente no olfatômetro, na área de liberação (Figura 2–3). Para evitar a qualquer influência na resposta dos insetos a posição dos tratamentos foi cambiada a cada 3 a 5 bioensaios. Para evitar problemas com pseudoreplicas as plantas utilizadas foram cambiadas a cada 5 bioensaios.

O comportamento foi monitorado por um período de 10 minutos, com um sistema formado por uma câmara CCD (Sony SPT M324CE, com uma lente zoom 4-50 mm/F1:1.6 montada com um filtro infravermelho) acoplada a um software de captura e processamento de imagens (software SACAM) (Jorge et al., 2006). As variáveis medidas foram: (1) escolha inicial (área do olfatômetro onde o inseto entra em primeiro lugar), (2) tempo de residência em diferentes áreas do olfatômetro (tratamento e controle) (s), (3) mudança de direção (número de variações na direção do movimento/s) e (4) trajeto total (mm).

Para os bioensaios foram realizadas de 50 a 60 repetições para as seguintes combinações de tratamentos:

- Soja com herbivoria de *E. heros* X Controle (planta de soja sem herbivoria)
- Soja com herbivoria de *N. viridula* X Controle (planta de soja sem herbivoria)
- Soja com herbivoria de *E. heros* e *N. viridula* X Controle (planta de soja sem herbivoria)
- Soja com herbivoria de *E. heros* X Soja com herbivoria de *N. viridula*
- Soja com herbivoria de *E. heros* e de *N. viridula* X Soja com herbivoria de *N. viridula*
- Soja com herbivoria de *E. heros* e de *N. viridula* X Soja com herbivoria de *E. heros*
- Controle (planta de soja sem herbivoria X Ar (filtrado e umedecido))

Análise Estatística

Os valores de escolha por um determinado tratamento em cada combinação avaliada foram analisados por regressão logística para estimar a probabilidade de escolha de cada um dos tratamentos. O teste de χ^2 de Wald foi utilizado para avaliar a hipótese de não preferência (50% de probabilidade de escolha para cada área do olfatómetro) por um tratamento particular. Para comparar os valores médios do tempo de residência nas diferentes áreas foi utilizado o teste de Wilcoxon, as outras variáveis (mudança de direção e trajeto total) quantificadas nos bioensaios em olfatómetro foram analisadas com teste t pareado.

O total de voláteis liberado pelas plantas dos diferentes tratamentos ao longo do tempo foi analisado através de um modelo linear generalizado utilizando distribuição Gaussiana de erros e log como função de ligação e tempo e tratamento como fatores (fontes de variação). O efeito de tempo e tratamento foi analisado através de Análise de Deviança e para comparar a quantidade de voláteis liberados pelas plantas de diferentes tratamentos em cada tempo e pelas plantas de um mesmo tratamento ao longo do tempo

foram utilizados contrastes par a par ($P = 0.05$). Para análise da composição dos voláteis (qualitativa e quantitativa) e a variação da contribuição relativa dos diferentes compostos nas misturas de voláteis dos diferentes tratamentos foi utilizada uma análise composicional (log-ratio) (Aitchison, 1986). Para isto foi considerada a composição de cada composto para a mistura total, a concentração de cada composto foi convertida a uma proporção do total, os valores zero corrigidos segundo Aitchison (1986) e posteriormente expressos como a proporção de um componente individual (neste caso foi utilizado o PI), para finalmente convertê-los em logaritmo. Os dados assim tratados foram analisados pela variância multivariada (MANOVA) computando a significância entre diferentes tratamentos pelo teste F. Para caracterizar os compostos da mistura com maior contribuição para separação entre tratamentos em cada tempo avaliado, foram conduzidas análises de variáveis canônicas (CVA). Esta análise fornece uma combinação linear entre as variáveis que melhor discriminam os níveis de um fator. Neste caso foram utilizados como diferentes níveis de tratamentos (controle, Eh, Nv e Eh+Nv). Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa R 2.10.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM 2009).

RESULTADOS

Análise da emissão de voláteis

A quantidade total de voláteis liberados pelas plantas de soja foi influenciada pelo tempo de permanência dos insetos na planta (Análise de Deviança $z = 532,91$, $p < 0,001$), pelos diferentes tratamentos com insetos (Análise de Deviança $z = 949,75$, $p < 0,001$) e pela interação entre estes dois fatores (Análise de Deviança $z = 524,6$, $p < 0,001$) (Figura 4). Após 24 h de iniciados os experimentos, as plantas dos tratamentos *E. heros*, *N. viridula* e *E. heros* + *N. viridula* liberaram uma quantidade de voláteis, significativamente, maior que a das plantas controle (análise de contrastes $P < 0,05$). Após 48 h de herbivoria os tratamentos *E. heros* e *N. viridula* não diferenciaram entre si, porém liberaram maior quantidade de voláteis do que as plantas dos tratamentos controle e *E. heros* + *N. viridula* (análise de contrastes, $P = 0,01$ e $0,002$, respectivamente) (Figura 4). As plantas com herbivoria de fêmeas de *E. heros* no tempo de 72 h e 96 h liberaram maior quantidade de voláteis que as plantas dos demais tratamentos (análise de contrastes, $P < 0,001$) (Figura 4).

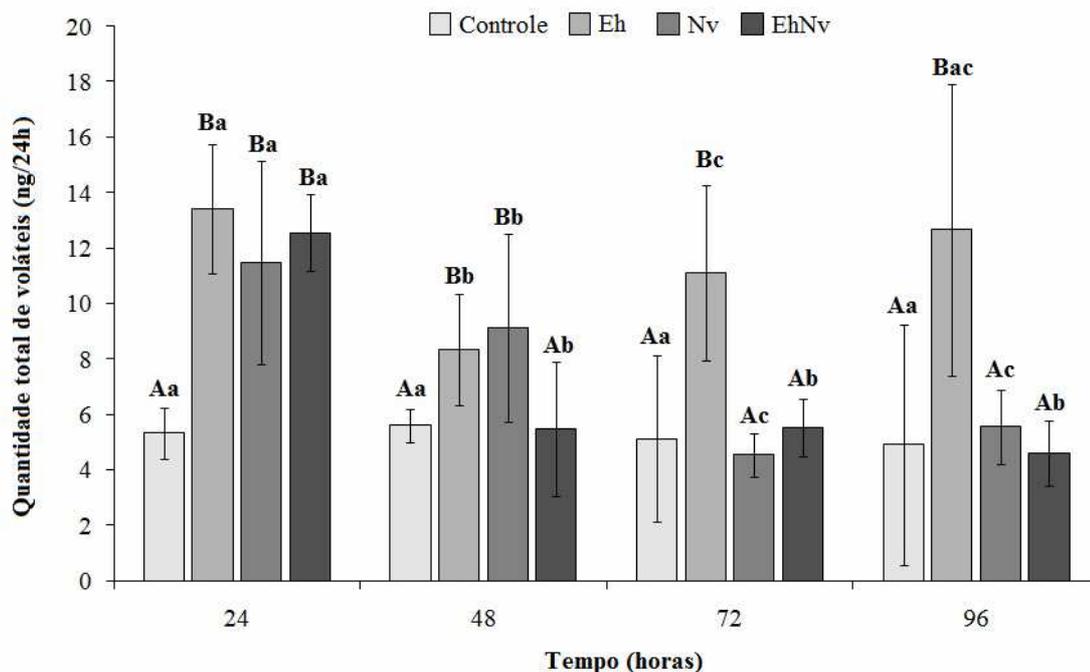


Figura 4: Voláteis totais (Média \pm Desvio padrão) obtidos das plantas de soja sem percevejos (controle) e de plantas de soja de diferentes tratamentos e após diferentes períodos de herbivoria. Eh= plantas tratadas com quatro fêmeas de *E. heros*, Nv= plantas tratadas com quatro fêmeas *N. viridula*, EhNv= plantas tratadas com duas fêmeas de *E. heros* e duas fêmeas de *N. viridula*. Mesmas letras maiúsculas em cada tempo indicam diferenças não significativas entre os tratamentos. Mesmas letras minúsculas indicam diferenças não significativas entre as horas considerando o mesmo tratamento (MANOVA para medidas repetidas e contrastes entre os tratamentos, $P > 0,05$).

A herbivoria desencadeada por uma ou por duas espécies de percevejos influenciou a quantidade total de voláteis no mesmo tratamento entre os diferentes períodos (Figura 4). Foram identificados 12 compostos (Anexo 1) presentes na mistura de voláteis liberados pelas plantas de soja sem herbivoria (controle) ou com herbivoria de *E. heros*, *N. viridula* e de ambas as espécies. Esses compostos foram encontrados em todos os tratamentos. Porém, no controle, os compostos (Z) 3-hexen-1-ol (A) e geranyl acetona (I) somente foram liberados pela planta em 24 h depois de iniciado o experimento; o composto α -felandreno (D) foi liberado em 48 h e 96 h e o composto limoneno (E) em 24 h e 48 h. No tratamento

com *E. heros* + *N. viridula* o composto α -felandreno (D) foi liberado pela planta somente 24 h pós a herbivoria e o composto geranyl acetona (I) não foi liberado pelas plantas em 48 h. As plantas de soja quando sofreram herbivoria de *E. heros* ou *N. viridula* liberaram todos os compostos identificados em todos os tempos dos tratamentos (Figura 5) (Anexo 2).

As misturas de voláteis liberados pelas plantas dos diferentes tratamentos mostraram diferenças significativas na sua composição ao longo do tempo (análise de log-ratio por Manova, $F_{36,98}=118,2$, $P < 0,005$, Wilks $\lambda = 1,36 \times 10^{-5}$, $F_{36,98}=55,27$, $P < 0,005$, Wilks $\lambda = 0,0012$, $F_{36,98}=155$, $P < 0,005$, Wilks $\lambda = 6,22 \times 10^{-6}$ e $F_{36,98}=61,24$, $P < 0,005$, Wilks $\lambda = 8,95 \times 10^{-5}$ para 24 h, 48 h, 72 h e 96 h respectivamente) (Figura 6). As análises de variáveis canônicas mostraram que, para todos os intervalos de tempo considerados, as duas primeiras dimensões explicam mais de 95% da variação total, sendo assim somente estas duas dimensões foram analisadas.

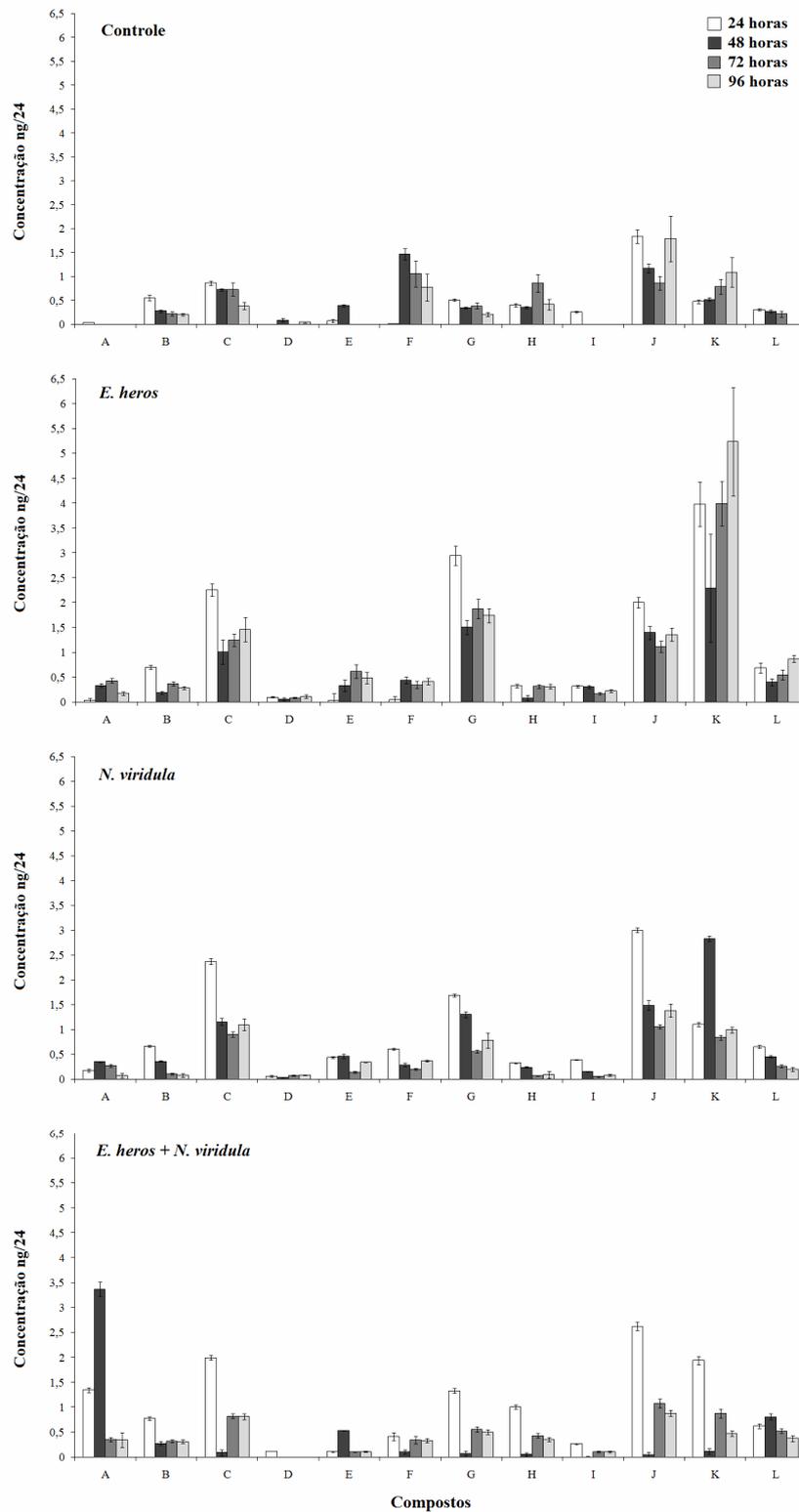


Figura 5: Comparação quantitativa (média \pm erro padrão) das misturas de voláteis de soja sem herbivoria (Controle), soja com herbivoria de quatro fêmeas de *E. heros*, soja com herbivoria de quatro fêmeas de *N. viridula* e soja com herbivoria de duas fêmeas de *E. heros* + duas fêmeas de *N. viridula* em 24, 48, 72 e 96h após o início dos experimentos. As letras representam os compostos: (Z)-3-hexen-1-ol (A), 6-metil-5-hepten-2-ona (B), (Z)-3-20

acetato de hexenila (C), α -felandreno (D), limoneno (E), (*E*)- β -ocimene (F), salicilato de metila (G), benzotiazol (H), geranil acetona (I), β -cariofileno (J), α -farneseno (K), (*E,E*)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno (TMTT) (L).

As plantas danificadas por fêmeas *E. heros* + *N. viridula* e as plantas controle se separaram dos tratamentos com fêmeas de *E. heros* ou *N. viridula* em todos os tempos (Figura 6).

O tratamento de *E. heros* + *N. viridula* foi caracterizado por uma alta proporção relativa do composto (*Z*)-3-hexen-1-ol (A). Em 24 h pós herbivoria a proporção relativa do composto (*Z*)-3-acetato de hexenila (C) esteve associada aos tratamentos *E. heros* + *N. viridula* e *N. viridula*; α -felandreno (D) e salicilato de metila (G) estiveram associados ao tratamento *E. heros* e 6-metil-5-hepten-2-ona (B) associado ao controle (Figura 6A). Em 48 h de herbivoria os tratamentos *E. heros* e *N. viridula* foram caracterizados por uma alta proporção relativa dos compostos salicilato de metila (G) e geranil acetona (I) (Figura 6B). Em 72 h de herbivoria limoneno (E) e α -farneseno (K) foram importantes para caracterizar os tratamentos *E. heros* e *N. viridula* (Figura 6C). Em 96 h de herbivoria os compostos limoneno (E) e (*E,E*)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno (TMTT) (L) estiveram associados aos tratamentos *E. heros* e *N. viridula* e o composto (*Z*)-3-acetato de hexenila (C) junto ao anteriormente mencionado, (*Z*)-3-hexen-1-ol, mostraram uma proporção relativa maior no tratamento *E. Heros* + *N. viridula* (Figura 6D).

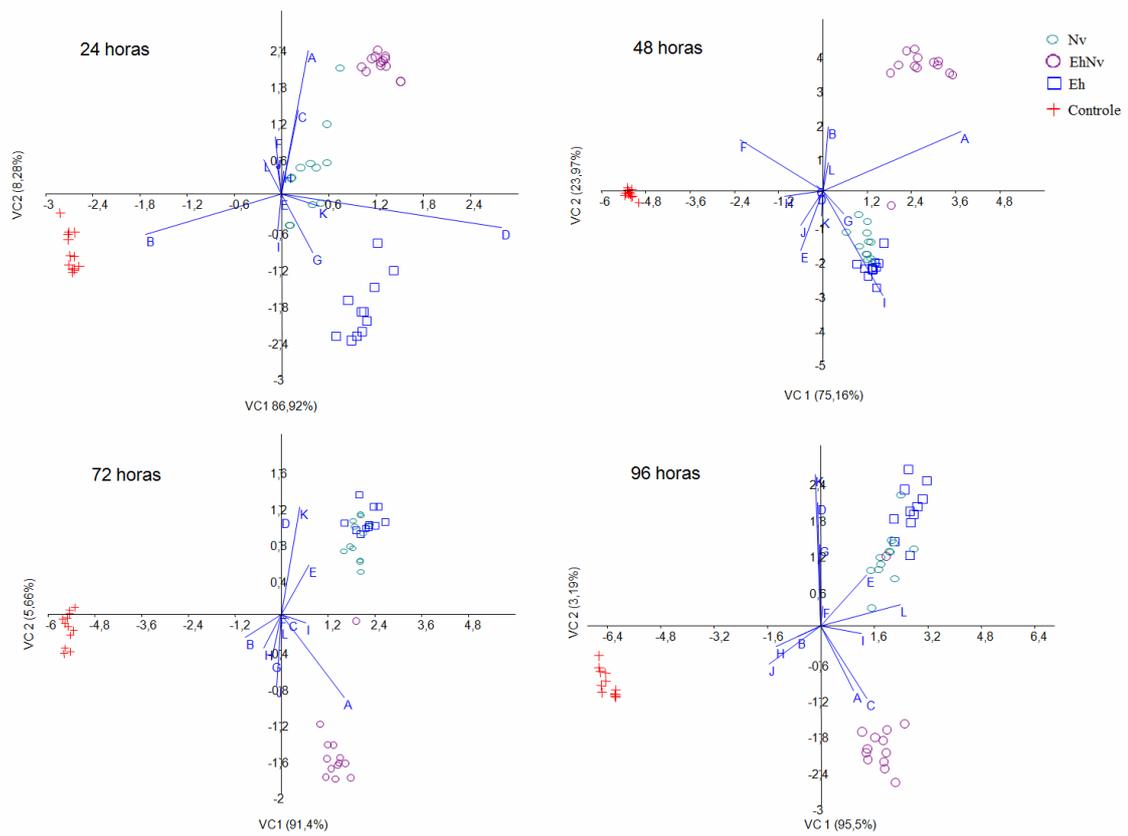


Figura 6: Análises de variáveis canônicas (AVC) mostrando as diferenças na composição de voláteis de plantas de soja de diferentes tratamentos e após diferentes períodos de herbivoria. Eh= plantas tratadas com quatro fêmeas de *E. heros*, Nv= plantas tratadas com quatro fêmeas *N. viridula*, EhNv= plantas tratadas com duas fêmeas de *E. heros* e duas fêmeas de *N. viridula*, controle= planta sem percevejos. Os símbolos representam os *scores* individuais para cada amostra calculados a partir da AVC que maximiza a diferença entre os tratamentos nas duas dimensões consideradas (CV1 e CV2). As linhas representam os diferentes compostos presentes nas amostras, o comprimento de cada linha representa a importância (magnitude relativa) da contribuição de cada composto para diferenciação dos tratamentos. As letras representam os compostos (*Z*)-3-hexen-1-ol (A), 6-metil-5-hepten-2-ona (B), (*Z*)-3-acetato de hexenila (C), α -felandreno (D), limoneno (E), (*E*)- β -ocimene (F), salicilato de metila (G), benzotiazol (H), geranyl acetona (I), β -cariofileno (J), α -farneseno (K), (*E,E*)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno (TMTT) (L).

Bioensaios com parasitóides

Nos bioensaios em olfatômetro, o parasitóide *Te. podisi* mostrou preferência por plantas com herbivoria de *E. heros* após 72 h de iniciados os tratamentos em relação às plantas sem herbivoria (controle) ($\chi^2_{1} = 4,28$; $n = 50$; $p = 0,03$) (Figura 7A). Quando contrastadas as plantas danificadas por *N. viridula* ou *E. heros* + *N. viridula* com plantas controle, *Te. podisi* não mostrou preferência de escolha (Figura 7A).

Ao considerar o tempo de residência, os tratamentos *E. heros* + *N. viridula* com herbivoria de 72 h e *N. viridula* com herbivoria de 96 h, quando contrastados com plantas controle, retiveram as fêmeas de *Te. podisi* em intervalos de tempo significativamente maiores (Teste de Wilcoxon $W = 1.340,00$; $n = 50$; $p < 0,001$ e $t = -2,12$; $n = 50$; $p = 0,039$ respectivamente) (Figura 7B). Os voláteis de plantas de soja não danificadas por percevejos também retiveram as fêmeas de *Te. podisi* nas áreas do olfatômetro tratadas em comparação à área do olfatômetro que recebeu somente ar filtrado e umidificado (Teste de Wilcoxon $W = -1.045,0$, $n = 50$, $p < 0,001$) (Figura 7B).

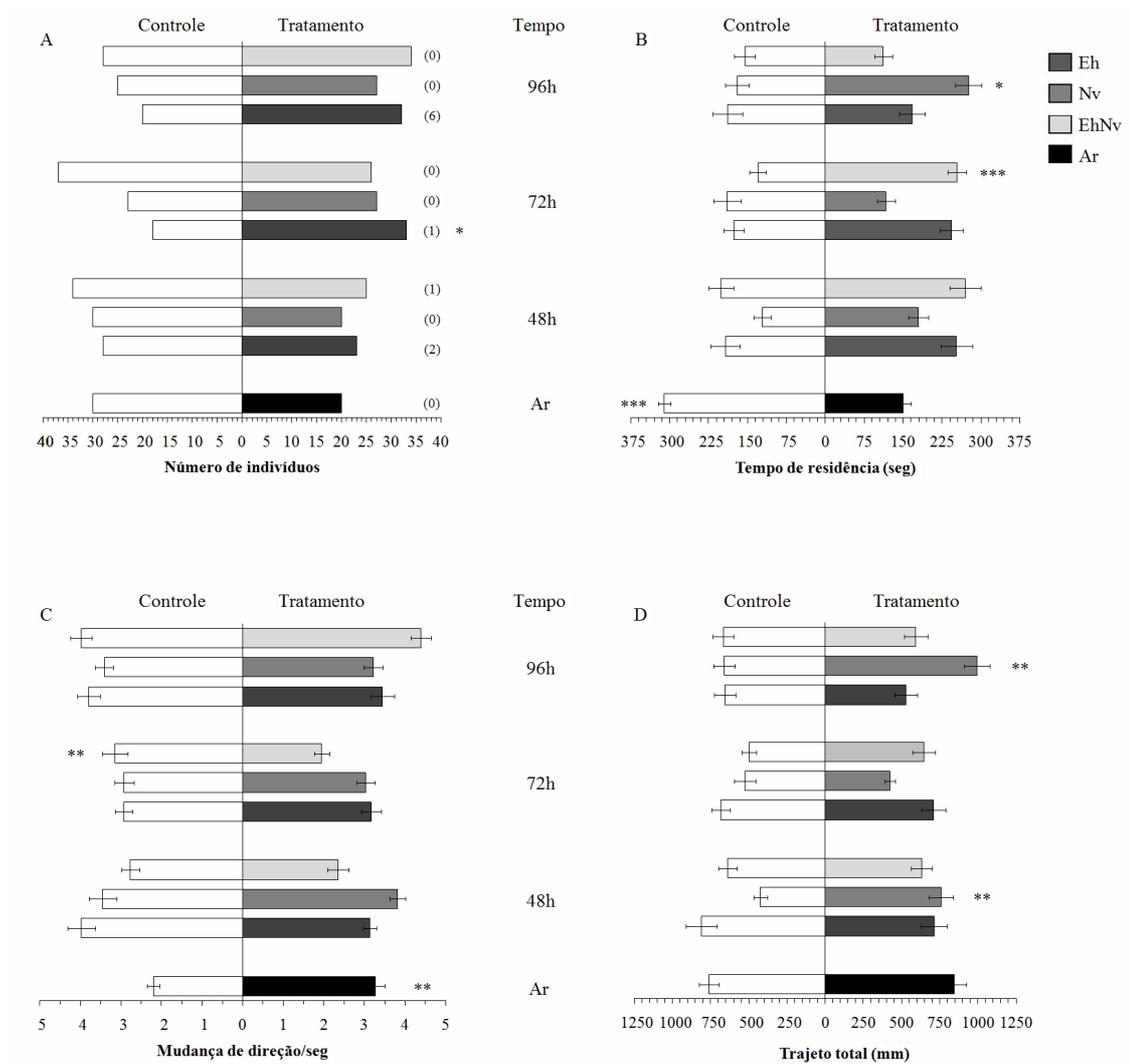


Figura 7: Resposta do parasitóide *Te. podisi* em olfatômetro para voláteis de plantas de soja de diferentes tratamentos e após diferentes períodos de herbivoria. Eh = plantas tratadas com quatro fêmeas de *E. heros*, Nv = plantas tratadas com quatro fêmeas *N. viridula*, EhNv = plantas tratadas com duas fêmeas de *E. heros* + duas fêmeas de *N. viridula*, controle = planta sem percevejos e ar = ar filtrado e umidificado sem presença de plantas. (A) primeira escolha, (B) tempo de residência (média \pm Erro Padrão (EP)), (C) mudança de direção (média \pm EP) e (D) trajeto total (média \pm EP). Números entre parênteses indicam os parasitóides que não responderam aos estímulos. Asteriscos indicam diferenças significativas (* = $0,01 < P < 0,05$, ** = $0,001 < P < 0,01$ e *** = $P < 0,001$). Teste χ^2 para escolha inicial, teste de Wilcoxon para o tempo de residência e teste t para mudança de direção e trajeto total.

Os parâmetros utilizados para analisar o padrão geral de movimento dos parasitóides não foram influenciados, em grande medida, pelos voláteis das plantas dos diferentes tratamentos. Foram encontradas diferenças significativas para o número de mudanças na direção do percurso das fêmeas de *Te. podisi* quando contrastados com voláteis de plantas controle (Teste $t = 3.690,0$, $n = 62$, $p = 0,006$) versus voláteis de plantas do tratamento *E. heros* + *N. viridula* 72 h e também para voláteis de plantas controle em comparação ao ar filtrado e umidificado (Teste $t = 2.075,0$, $n = 50$, $p = 0,002$) (Figura 7C). O trajeto total nas diferentes áreas do olfatômetro mostrou diferenças significativas para os voláteis de plantas dos tratamentos *N. viridula* 48h e 96 h quando comparados aos voláteis de plantas controle (Teste $t = 2.370,0$, $n = 46$, $p = 0,003$; Teste $t = -3,08$, $n = 48$, $p = 0,003$, respectivamente) (Figura 7D).

Pelo fato das fêmeas de *Te. podisi* apresentarem resposta aos tratamentos de herbivoria de *E. heros* 72 h, *E. heros* + *N. viridula* 72h e *N. viridula* 96 h, os mesmos foram contrastados entre si, a fim de avaliar a preferência por algum destes tratamentos.

Para a escolha inicial, o parasitóide *Te. podisi* respondeu positivamente ao tratamento *E. heros* 72 h quando contrastado com *E. heros* + *N. viridula* 72 h e *N. viridula* 96 h ($\chi^2_1 = 7,54$, $n = 50$ $p = 0,006$ e $\chi^2_1 = 8,99$, $n = 50$ $p = 0,002$ respectivamente) e ao tratamento *E. heros* + *N. viridula* 72 h quando comparado ao tratamento *N. viridula* 96 h ($\chi^2_1 = 5,45$, $n = 50$ $p = 0,019$) (Figura 8A).

O parasitóide permaneceu maior tempo no braço do olfatômetro que apresentava os tratamentos de *E. heros* 72 h contrastado com *N. viridula* 96 h e *E. heros* + *N. viridula* ($W = -573,00$, $n = 50$, $p = 0,006$; $W = -405,000$, $n = 50$, $p = 0,05$, respectivamente) e *E. heros* + *N. viridula* 72 h quando comparado a *N. viridula* 96 h ($W = 4,21$, $n = 51$, $p < 0,001$) (Figura 8B).

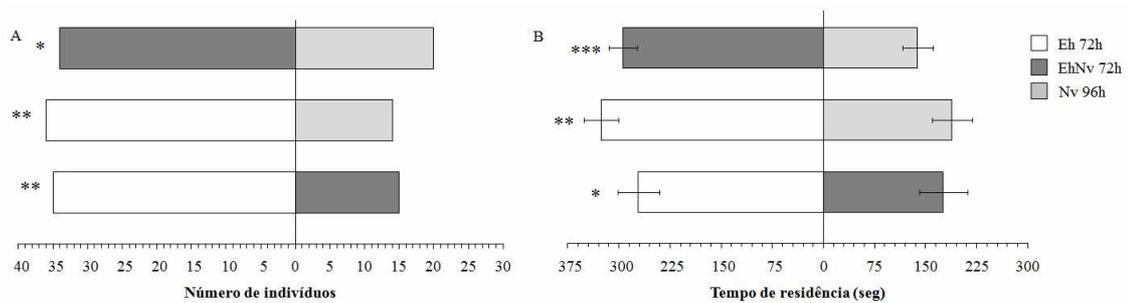


Figura 8: Resposta do parasitóide *Te. podisi* em olfatômetro aos tratamentos: Eh 72h= plantas tratadas com quatro fêmeas de *E. heros* após 72 h de iniciada a herbivoria, Nv 96h= plantas tratadas com quatro fêmeas de *N. viridula* após 96 h de iniciada a herbivoria e EhNv 72h= plantas tratadas com duas fêmeas de *E. heros* e duas fêmeas de *N. viridula* após 72 h de iniciada a herbivoria. (A) primeira escolha e (B) tempo de residência (Média \pm EP). Asteriscos indicam diferenças significativas (* = 0,01 < P < 0,05, ** = 0,001 < P < 0,01 e *** = P < 0,001). Teste χ^2 para escolha inicial e teste de Wilcoxon para o tempo de residência.

A escolha inicial do parasitóide *Tr. basalis* foi semelhante para voláteis de plantas dos tratamentos em todos os intervalos de tempo considerados em relação aos voláteis de plantas sem herbivoria (controle) (Figura 9A).

O parasitóide *Tr. basalis* permaneceu por mais tempo no braço do olfatômetro com o tratamento controle (W = 743,00, n = 50, p < 0,001) em comparação ao ar, e no tratamento *N. viridula* 96 h (T = 453,00, n = 50, p = 0,02), quando contrastado com controle (Figura 9B). As fêmeas de *Tr. basalis* permaneceram em intervalos de tempo similares nos braços do olfatômetro tratados com voláteis de plantas nas diferentes combinações de tratamentos avaliadas. *Tr. basalis* mostrou maior atividade de busca, avaliada através do parâmetro mudança de direção, na área do olfatômetro que continha ar filtrado e umidificado em relação ao controle (T = 1.948,00, p < 0,001) e o controle (T = 1.675,00, p = 0,03) em relação às áreas tratadas com voláteis das plantas com herbivoria de *E. heros* + *N. viridula* 96 h. (Figuras 6C). Os voláteis de plantas dos tratamentos *E. heros* 48 h, *N. viridula* 48 h e *E. Heros* + *N. viridula* 96 h também estimularam o comportamento

de busca das fêmeas de *Tr. basalis*. Neste caso, o trajeto total percorrido nas áreas mencionadas foi significativamente maior quando comparado ao das áreas tratadas com voláteis de plantas controle (T = 1.696,00, n = 38, p = 0,002; T = 1662,00, n = 39 p = 0,01 e T = 2.217,00, n = 46, p = 0,02 para *E. heros* 48 h, *N. viridula* 48 h e *E. heros* + *N. viridula* 96 h vs plantas controle respectivamente) (Figura 9D).

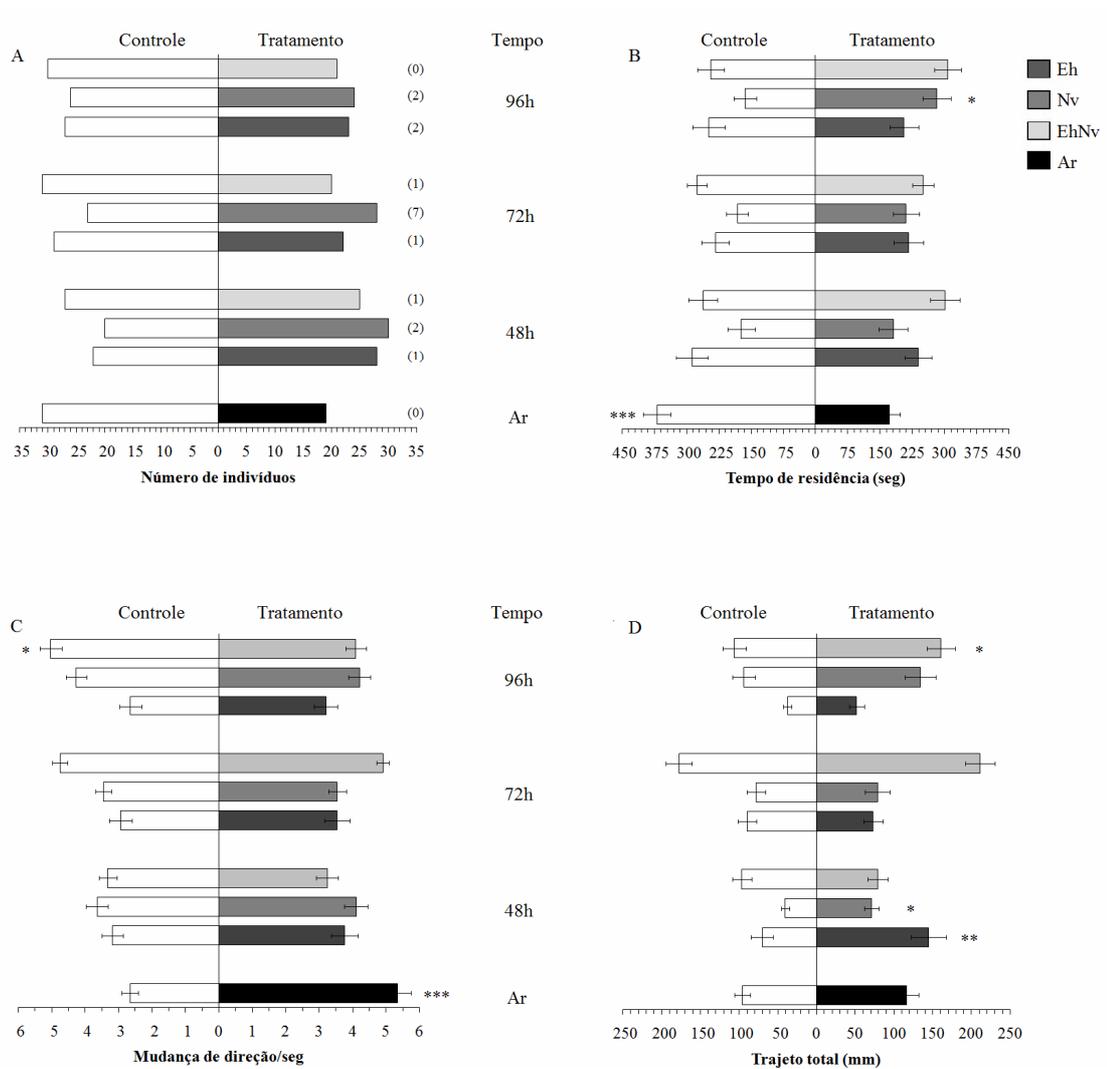


Figura 9: Resposta do parasitóide *Tr. basalis* em olfatômetro para voláteis de plantas de soja de diferentes tratamentos e após diferentes períodos de herbivoria. Eh= plantas tratadas com quatro fêmeas de *E. heros*, Nv= plantas tratadas com quatro fêmeas *N. viridula*, EhNv= plantas tratadas com duas fêmeas de *E. heros* e duas fêmeas de *N. viridula*, controle= planta sem percevejos e ar= ar filtrado e umidificado sem presença de plantas. (A) primeira escolha, (B) tempo de residência (média ± EP), (C) mudança de direção (média ± EP) e (D) trajeto total (média ± EP). Números entre parêntese indicam os parasitóides que não responderam aos estímulos. Asteriscos indicam diferenças significativas (* = 0,01 < P < 0,05, ** = 0,001 < P < 0,01 e *** = P < 0,001. Teste χ^2 para escolha inicial, teste de Wilcoxon para o tempo de residência e teste t para mudança de direção e trajeto total.

DISCUSSÃO

A composição de voláteis encontrada neste trabalho é similar à previamente relatada para outras variedades de soja (BR16, Dowling, IAC 100 e Silvânia) após a herbivoria de percevejos (Moraes et al., 2008, 2009; Michereff et al., 2011) ou por tratamentos com o fitohormônio *cis*-jasmone, que é um ativador das vias metabólicas que levam à produção das defesas induzidas (Moraes et al., 2009). Porém as concentrações relativas dos compostos foram diferentes daquelas previamente relatadas. Neste caso, as diferenças podem dever-se aos diferentes estágios de soja utilizados nos trabalhos anteriores (V3, vegetativo 3) (Moraes et al., 2008, 2009, Michereff et al., 2011) e neste trabalho (V5, vegetativo 5). O estágio V5 é o mais próximo da floração e do início da etapa reprodutiva. Assim, pode-se sugerir que a diferença na produção de voláteis em relação aos estágios vegetativos iniciais pode ser devido ao fato da planta estar começando a investir mais recursos na reprodução.

A resposta preferencial das fêmeas de *Te. podisi* observada para os voláteis de soja após a herbivoria de *E. heros*, está relacionado com a preferência desta espécie de parasitóide por ovos de *E. heros* como hospedeiro, em comparação com outras espécies de percevejos, adicionalmente *Te. podisi* apresenta maiores taxas de parasitismo e de sobrevivência (Sujii et al., 2002). Assim nossos resultados sugerem que a resposta específica para os voláteis induzidos pela alimentação deste percevejo poderia conferir uma clara vantagem seletiva para o parasitóide que poderia utilizar este sinal para o forrageamento em locais de incidência do hospedeiro o que certamente favoreceria um desenvolvimento mais eficiente. Este resultado coincide também com estudos prévios da resposta deste parasitóide às defesas induzidas em soja, após a herbivoria de *E. heros* (Moraes et al., 2005; 2008).

Apesar das fêmeas de *Te. podisi* responder positivamente aos voláteis induzidos pela herbivoria de *E. heros*, estes compostos não foram eficientes para retê-los na área do olfatômetro (tempo de residência). Provavelmente, as fêmeas desta espécie necessitem de outros estímulos para confirmar a localização do hospedeiro, como feromônios sexual ou de alarme. É conhecido que este parasitóide responde aos compostos de comunicação intraespecífica de percevejos (Borges et al., 1997; Pires et al., 2001; Sujii et al., 2002; Laumann et al., 2009), assim estes sinais em conjunto com os voláteis induzidos poderiam atuar sinergicamente, facilitando a localização de hospedeiros pelo parasitóide.

Os resultados obtidos mostraram a especificidade do parasitóide *Te. podisi* a seu hospedeiro *E. heros*. Como ocorre com o parasitóide *Cotesia plutellae* (Kurdjumov, 1912) (Hymenoptera: Braconidae) o qual prefere plantas com dano de seu hospedeiro *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) do que aquelas plantas cujos voláteis foram induzidos por herbivoria de espécie não hospedeira ou por várias espécies de herbívoros (Shiojiri et al., 2000).

Para o parasitóide *Tr. basalis*, os voláteis induzidos pela herbivoria não foram suficientes para estimular a sua atração aos hospedeiros. No entanto, o parasitóide permaneceu maior tempo na área do olfatômetro tratada com planta danificada por *N. viridula*. Para a atratividade, provavelmente, seja necessária a associação da herbivoria com outro tipo de dano, como ocorreu com essa mesma espécie de parasitóide em resposta ao dano de herbivoria causado por *N. viridula* em plantas de feijão *Vicia faba* L., 1753 (Fabales: Fabaceae). Nesse caso, o parasitóide *Tr. basalis* respondeu aos voláteis apenas quando estes foram resultados da combinação de dano de herbivoria e de oviposição por *N. viridula* (Colazza et al., 2004). Os compostos químicos voláteis liberados unicamente pelo dano de herbivoria podem estar em baixa concentração e, possivelmente, não serem suficientes para a atração do parasitóide.

A indução de voláteis decorrente da herbivoria de mais de uma espécie de percevejo afetou a resposta dos parasitóides. O parasitóide *Te. podisi*, diferentemente de *Tr. basal* parece discriminar os compostos induzidos por seu hospedeiro preferencial. Os compostos (Z) 3-hexen-1-ol (A), limoneno (E) e α -farneseno (K) podem ter influenciado o comportamento do parasitóide *Te. podisi*, a partir de 72 h de herbivoria de *E. heros*. Estes compostos se destacaram dos demais presentes na mistura de voláteis e estão associados com os tratamentos *E. heros* + *N. viridula* ((Z) 3-hexen-1-ol (A)), *E. heros* e *N. viridula* (limoneno (E) e α -farneseno (K)). Entretanto, a especificidade de resposta pode estar baseada não somente na presença em maior concentração de um determinado composto, mas também na relação qualitativa e quantitativa destes compostos com o total da mistura emitida após a indução de herbivoria (Hilker & McNeil, 2008).

Estas hipóteses devem ser avaliadas em novos conjuntos de bioensaios que considerem maior tempo de interação do herbívoro com a planta e compostos produzidos individualmente em cada tratamento, para estabelecer se as diferenças observadas no perfil de voláteis são as responsáveis pela resposta diferencial do parasitóide.

Os resultados confirmam a hipótese de que diferentes espécies de percevejos induzem a produção de voláteis pelas plantas de forma diferente (Moraes et al. 2005). Em soja, os percevejos *E. heros* e *N. viridula* causam injúrias diferentes (Corrêa-Ferreira 2002; Depieri & Panizzi 2011) o que pode estar relacionado com a toxicidade dos componentes da saliva de cada espécie. Tanto em insetos mastigadores quanto sugadores já foram detectadas substâncias na saliva que são responsáveis pela indução de defesas em plantas (Arimura et al., 2005). Sendo assim, o potencial de dano de cada espécie pode estar correlacionado com uma série de características fisiológicas de cada espécie que são capazes de induzir as defesas em soja. Estas hipóteses devem ser avaliadas estudando a

composição da saliva de diferentes espécies de percevejos e isolando os possíveis indutores presentes na mesma.

Houve maior atratividade do parasitóide de ovos *Te. podisi* para voláteis de plantas induzidas por *E. heros* do que para voláteis da planta controle, como também para aqueles induzidos por ambas as espécies ou para aqueles induzidos por *N. viridula*. Esse resultado contrasta com o observado no ácaro predador *Phytoseiulus persimilis* (Athias-Henriot, 1957) (Mesostigmata: Phytoseiidae) que prefere voláteis de plantas de feijão e de pepino quando são induzidos pela herbivoria de mais de uma espécie simultaneamente (de Boer et al., 2008). *Te. podisi* parece reconhecer os voláteis induzidos pelo seu hospedeiro preferencial. Assim, sugere-se que os voláteis induzidos pela herbivoria de ambas as espécies estejam silenciando a indução de *E. heros*.

É conhecido que os voláteis induzidos por herbivoria influenciam na colonização de herbívoros subseqüentes durante a seleção de plantas hospedeiras para alimentação ou oviposição (Shiojiri et al., 2002; Dicke & Baldwin 2010). As injúrias de múltiplas espécies de herbívoros podem afetar as interações entre plantas e inimigos naturais pela mudança na composição de voláteis emitidos pelas plantas (Shiojiri et al., 2001; Vos et al. 2001). Essa interferência depende da espécie de planta e da composição de herbívoros presentes. Resultados prévios parecem ser contraditórios, enquanto alguns parasitóides e predadores podem ser mais atraídos aos voláteis produzidos pelas injúrias de mais de uma espécie de herbívoro (Shiojiri et al., 2002; De Boer et al., 2004, 2008; Moayeri et al., 2007) outros preferem voláteis liberados após herbivoria de uma única espécie (Shiojiri et al., 2001). A atração preferencial para odores oriundos de herbivoria múltipla parece ser associada às maiores emissões de compostos voláteis específicos e, assim, é possível a maior detecção de sinais relacionados com a presença do hospedeiro ou presa preferencial. Enquanto a não atratividade para os voláteis de plantas decorrentes de herbivoria múltipla

provavelmente deve ser devido à supressão da indução de voláteis por outras espécies e que são utilizados pelos inimigos naturais durante seu comportamento de busca de hospedeiros, reduzindo assim o risco de parasitismo ou de predação.

Nos sistemas de cultivo de soja as plantas são atacadas por um complexo de percevejos pragas. A comunicação interespecífica entre a planta, os percevejos e os parasitóides podem interferir na colonização desses insetos herbívoros e, conseqüentemente, na atração e desempenho dos parasitóides. Os resultados mostraram que o parasitóide *Te. podisi* responde seletivamente aos voláteis induzidos pela injúria causada pela herbivoria de seu hospedeiro preferencial, *E. heros*. Entretanto *Tr. basalis* não mostrou a mesma seletividade de resposta. A resposta diferencial dos parasitóides para defesa induzida em soja poderia alterar a composição da comunidade de parasitóides, quando as guildas de percevejos apresentam diferente composição de espécies, com conseqüências praticas para o manejo destes em programas de controle biológico.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram alteração no perfil dos compostos químicos induzidos em plantas de soja após a herbivoria dos percevejos *E. heros*, *N. viridula* ou de ambos. As variações na composição de voláteis das plantas danificadas por diferentes combinações de percevejos influenciaram o comportamento dos parasitóides de ovos. O parasitóide *Te. podisi*, diferentemente de *Tr. basalis* parece discriminar os compostos induzidos por seu hospedeiro preferencial, *E. heros* e utiliza-os para se orientar durante a busca de hospedeiros.

A ausência de resposta do parasitóide *Tr. basalis* pode ter sido influenciada pelo curto tempo de exposição das plantas à herbivoria de percevejos (especialmente seu hospedeiro preferencial, *N. viridula*) ou pode indicar que esta espécie utiliza outros sinais ou uma mistura deles durante a busca de hospedeiros. Estes resultados confirmam parcialmente as hipóteses testadas neste trabalho.

A composição da comunidade de percevejos herbívoros que atacam a soja pode influenciar o comportamento de busca de hospedeiros dos parasitóides de ovos mediante a indução diferencial de defesas. Trabalhos futuros devem ser orientados a estabelecer qual(ais) composto(s) das misturas induzidas são responsáveis pela atração de *Te. podisi*, qual o efeito da herbivoria dos percevejos ao longo do tempo, como a herbivoria dos percevejos influencia as defesas de soja em diferentes estágios fisiológicos da planta e aprofundar os conhecimentos sobre os mecanismos e conseqüências ecológicas do uso de defesas induzidas pelos parasitóides *Te. podisi* e *Tr. basalis*.

A interação dos sinais químicos com outros de diferente natureza (visuais, sonoros, vibratórios) também é um dos aspectos que deve ser considerado em futuros trabalhos já que estes insetos podem obter informações mais precisas e confiáveis do ambiente onde forrageiam por um sistema multimodal de sinais e de pistas.

BIBLIOGRAFIA

- AITCHISON J. 1986. The statistical analysis of compositional data. Chapman & Hall, Inc, Bristol.
- ARIMURA, G.I., KOST, C. e BOLAND, W. 2005. Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochim. Biophys. Acta* 1734: 91-111.
- BORGES, M., FERREIRA, L.T., COSTA, M.L.M., SCARPATI, M.V., SANTOS, H.M., LOURENÇO, R.T. 1997. Semioquímicos associados aos parasitóides *Trissolcus basalis* e *Telenomus podisi*, para o controle dos percevejos, *Nezara viridula* e *Euschistus heros*, pragas da soja. Brasília: Embrapa – Cenargen. Comunicado Técnico.
- BORGES, M., LAUMANN, R.A., SILVA, C.C.A., MORAES, M.C.B., SANTOS, H.M., RIBEIRO, D.T. 2006. Metodologias de criação e manejo de colônias de percevejos da soja (Hemiptera-Pentatomidae) para estudos de comportamento e ecologia química. Brasília: Embrapa – Cenargen. 18p. Documento n. 182.
- 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. *J. Exp. Biol.* 207: 47-53.
- COLAZZA, S., SALERNO, G., WAJNBERG, E. 1999. Volatile contact chemicals released by *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae) have a kairomonal effect on the egg parasitoid *Trissolcus basalis* (Hymenoptera: Scelionidae). *Biol. Control* 16: 310-317.

- CONTI, E., SALERNO, G., BIN, F., WILLIAMS, H.J, VINSON, S.B. 2003. Chemical cues from *Murgantva histrionica* eliciting host location and recognition in the egg parasitoid *Trissolcus brochymenae*. *J. Chem. Ecol.* 29: 115-130.
- CORRÊA-FERREIRA, B.S. 2002. *Trissolcus basal* para o controle de percevejos da soja. In: J.R.P Parra (ed.). Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. Manole Ltda, São Paulo. p 449-476.
- de BOER, J.G., HORDIJK, C.A, POSTHUMUS, M.A., DICKE, M. 2008. Prey and non-prey arthropods sharing a host plant: effects on induced volatile emission and predator attraction. *J. Chem. Ecol.* 34: 281–290.
- de BOER, J.G., POSTHUMUS, M.A., DICKE, M. 2004. Identification of volatiles that are used in discrimination between plants infested with prey or nonprey herbivores by a predatory mite. *J. Chem. Ecol.* 30: 2215-2230.
- de MORAES, C.M., MESCHEER, M.C., TURLINSON, J.H. 2001. Caterpillar induced nocturnal plant volatiles repel nonspecific females. *Nature* 410: 577–580.
- DEPIERI, R.A., PANIZZI, A.R. 2011. Duration of feeding and superficial and in-depth damage to soybean seed by selected species of stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *Neotrop. Entomol.* 40: 197-203.
- DICKE, M., BALDWIN, I.T. 2010. The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the 'cry for help'. *Trends Plant Sci.* 15(3): 167-175.
- DICKE, M., HILKER, M. 2003. Induced plant defences: from molecular biology to evolutionary ecology. *Basic Appl. Ecol.* 4: 3-14.

- DICKE, M., SABELIS, M.W. 1988. How plants obtain predatory mites as bodyguards. *Netherlands J. Zoo.* 38: 148–165.
- DUDAREVA, N., NEGRE, F., NAGEGOWDA, D.A., ORLOVA, I. 2006. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Crit. Rev. Plant Sci.* 25: 417–440.
- FATOUROS, N.E., DICKE, M., MUMM, R., MEINERS, T., HILKER, M. 2008. Foraging behavior of egg parasitoids exploiting chemical information. *Behav. Ecol.* 19: 677-689.
- HILKER, M., MCNEIL, J. 2008. Chemical and behavioral ecology in insect parasitoids: how to behave optimally in a complex odorous environment. In: Behavioral ecology of insect parasitoids (Ed. Wajnberg, E., Bernstein, C., van Alphen, J. J. M), p 92–112. Oxford: Blackwell Publishing.
- HILKER, M., MEINERS, T. 2010. How do plants “notice” attack by herbivorous arthropods? *Biol. Rev.* 85: 267–280.
- HOBALLAH, M. E.F., TURLINGS, T. C. J. 2001. Experimental evidence that plants under caterpillar attack may benefit from attracting parasitoids. *Evol. Ecol. Res.* 3: 553-565.
- JORGE, L.A.C., LAUMANN, R.A., BORGES, M., MORAES, M.C.B., CRUZ, R.A., MILARE, B.N., PALHARES, L. 2005. Software para avaliação do comportamento de insetos. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária. Circular Técnica, n. 30, 7p.
- KESSLER, A., BALDWIN, I.T. 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*, 291: 2142–2143.

- KESSLER, A., HALITSCHKE, R. 2007. Specificity and complexity: the impact of herbivore-induced plant responses on arthropod community structure. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 409–414.
- LAUMANN, R.A., AQUINO, M.F.S., MORAES, M.C.B., 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, R.A., MORAES, M.C.B., ČOKL, A., BORGES, M. 2005. Metodologias para estudo da comunicação vibracional de insetos e sua aplicação ao manejo de pragas. Documento Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 30p. Documento n. 152.
- LAUMANN, R. A, MORAES, M.C.B., PAREJA, M. , ALARCÃO, G.C. , BOTELHO, A.C. , MAIA, A.N.H. , LEONARDECZ NETO, E., BORGES, M. 2008. Comparative biology and functional response of *Trissolcus* spp. (Hymenoptera: Scelionidae) and implications for stink-bugs (Hemiptera: Pentatomidae) biological control. *Biol. Control* 44: 32-41.
- MATTIACCI, L., VINSON, S.B., WILLIAMS, H.J., ALDRICH, J.R., BIN, F. 1993. A long-range attractant kairomone for egg parasitoid *Trissolcus basal*, isolated from defensive secretion of its host, *Nezara viridula*. *J Chem Ecol* 19: 1167-1181.
- MICHEREFF, M.F.F., LAUMANN R.A., BORGES, M., MICHEREFF-FILHO M., DINIZ I.R., FARIAS NETO, A.L., MORAES M.C.B. 2011. Volatiles mediating a plant-herbivore-natural enemy interaction in resistant and susceptible soybean cultivars. *J. Chem. Ecol.* 37: 273–285.

- MOAYERI, H.R.S., ASHOURI, A., POLL, L. E ENKEGAARD, A. 2007. Olfactory response of a predatory mirid to herbivore induced plant volatiles: multiple herbivory vs. single herbivory. *J. Appl. Entomol.* 131: 326–332.
- MORAES, M.C.B., LAUMANN, R.A., PAREJA, M., SERENO, F.T.P.S., MICHEREFF M.F.F., BIRKETT, M.A., ICKETT, J.A., BORGES, M. 2009. Attraction of the stink bug egg parasitoid *Telenomus podisi* to defence signals from soybean activated by treatment with *cis*-jasmone. *Entomol. Exp. Appl.* 131: 178-188.
- MORAES, M.C.B., LAUMANN, R.A., PIRES, C.S.S., SUJII, E.R., BORGES, M. 2005. Induced volatiles in soybean and pigeon pea plants artificially infested with the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, and their effect on the egg parasitoid, *Telenomus podisi*. *Entomol. Exp. Appl.* 115: 227-237.
- MORAES, M.C.B., PAREJA, M., LAUMANN, R.A., HOFFMANN-CAMPO, C.B., BORGES, M. 2008. Response of the parasitoid *Telenomus podisi* to induced volatiles from soybean damaged by stink bug herbivory and oviposition. *J. Plant. Int.* 3: 1742- 1756.
- PANIZZI, A.R., MCPHERSON, J.E., JAMES, D.G., JAVAHERY, M. e MCPHERSON, R.M. 2000. Stink Bugs. In: C. W. Schaefer, Antônio R. Panizzi. (Org.). Heteroptera of Economic Importance. 1 ed. Boca Raton - Florida: CRC Press, p 421-473.
- PAREJA, M., MORAES, M.C.B., CLARK, S.J., BIRKETT, M.A. E POWELL, W. 2007. Response of the aphid parasitoid *Aphidius funebris* to volatiles from undamaged and aphid-infested *Centaurea nigra*. *J. Chem. Ecol.* 33: 695–710.

- PIRES, C.S.S., SUJII, E.R., BORGES, M., SCHMIDT, F.G.V., ZARBIN, P.H.G., AZEVEDO, V.C.R., LACERDA, A.L., PANTALEÃO, D. 2001. Ação cairomonal de componentes do feromônio de alarme do percevejo verde pequeno da soja, *Piezodorus guildinii*, sobre o parasitóide de ovos *Telenomus podisi*. Brasília: Embrapa Cenargen, Boletim de Pesquisa, n. 19. 22 p.
- POPPY, G.M., SUTHERLAND, J.P. 2004. Can biological control benefit from genetically-modified crops? Tritrophic interactions on insect-resistant transgenic plants. *Physiol. Entomol.* 29: 257-268.
- POTTING, R.P.J., POPPY, G.M. SCHULER, T.H. 1999. The role of volatiles from cruciferous plants and pre-flight experience in the foraging behaviour of the specialist parasitoid *Cotesia plutellae*. *Entomol. Exp. Appl.* 93: 87-95.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2009. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing. 409p.
- RITCHIE, S., HANWAY, J.J., THOMPSON, H.E. 1982. How a soybean plant develops. Ames, Iowa State University of Science and Technology, Coop. Ext. Serv., Special Report 53., 20 p.
- RODRIGUEZ-SAONA, C. CHALMERS, J.A. RAJ, S. THALER, J.S. 2005. Induced plant responses to multiple damages: differential effects on an herbivore and its parasitoid. *Oecologia* 143: 566–577.
- SHIOJIRI, K., TAKABAYASHI, J., YANO, S., TAKAFUJI, A. 2000. Flight response of parasitoids toward plant-herbivore complexes: a comparative study of two parasitoid-herbivore systems on cabbage plants. *Appl. Entomol. Zool.* 35: 87-92.

- SHIOJIRI, K., TAKABAYASHI, J., YANO, S., TAKAFUJI, A. 2001. Infochemically mediated tritrophic interaction webs on cabbage plants. *Pop. Ecol.* 43: 23-29.
- SHIOJIRI, K., TAKABAYASHI, J., YANO, S., TAKAFUJI, A. 2002. Oviposition preferences of herbivores are affected by tritrophic interaction webs. *Ecol. Lett.* 5: 186–192.
- STEIDLE, J.L.M., VAN LOON, J.J.A. 2002. Chemoecology of parasitoid and predator oviposition behaviour. In: Chemoecology of insect eggs and egg deposition. Blackweel Publishing, Berlin, Germany. p 291- 317.
- STEINBERG, S., DICKE, M., VET, L.E.M. 1993. Relative importance of infochemicals from first and second trophic level in long-range host location by the larval parasitoid *Cotesia glomerata*. *J. Chem. Ecol.* 19: 47–59.
- SUJII, E. R., COSTA, M.L.M., PIRES, C. S., COLAZZA, S., BORGES, M. 2002. Inter and intra-guild interactions in egg parasitoid species of the soybean stink bug complex. *PAB* 37: 1541–1549.
- TUMLINSON, J.H., TURLINGS, T.C.J., LEWIS, W.J. 1993. Semiochemically mediated foraging behavior in beneficial parasitic insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 22: 385–391.
- VET, L.E.M., DICKE, M. 1992. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tri-trophic context. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 141-172.
- VET, L.E.M., LEWIS, W.J., CARDE, R.T. 1995. Parasitoid foraging and learning. In Carde, R. T., and Bell, W. J. (eds.), *Chemical Ecology of Insects 2*, Chapman e Hall, New York, p. 65-104.

- VILELA, E.F., DELLA LUCIA, T.M.C. 2001. Feromônios de Insetos - Biologia, Química e Aplicação. Holos Editora, 206 p.
- VINSON, S.B. 1998. The general host selection behavior of parasitoid Hymenoptera and a comparison of initial strategies utilized by larvaphagous and oophagous species. *Biol. Control* 11: 79-96.
- VOS, M., BERROCAL, S.M., KARAMAOUNA, F., HEMERIK, L., VET, L.E.M. 2001. Plant-mediated indirect effects and the persistence of parasitoid-herbivore communities. *Ecol. Lett.* 4: 38–45.

ANEXOS

ANEXO 1: Compostos voláteis identificados de plantas de soja cv Conquista e seus Índice de Kovats (KI).

COMPOSTOS	KI
(Z)-3-Hexen-1-ol	856
6-Metil-5-Hepten-2-Ona	989
(Z)-3-Acetato de hexenila	1005
α -Felandreno	1016
Limoneno	1041
(E)- β -ocimeno	1052
Salicilato de metila	1217
Benzotiazol	1257
Geranil acetona	1445
β -Cariofileno	1464
α -Farneseno	1518
TMTT	1589
<hr/>	
TMTT ((E,E)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno)	

ANEXO 2: Compostos voláteis coletados de plantas de soja cv conquista (média \pm EP (ng/24h)) sem percevejos (Cont) ou submetidas à herbivoria de herbivoria por Eh (*E. heros*), Nv (*N. viridula*) e EhNv (*E. heros*+*N. viridula*), nos intervalos de: 24, 48, 72 e 96 horas.

Compostos	24h				48h			
	Cont	Eh	Nv	EhNv	Cont	Eh	Nv	EhNv
(Z)-3-Hexen-1-ol	0,04 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01	0,17 \pm 0,07	1,34 \pm 0,04	0 \pm 0	0,33 \pm 0,03	0,35 \pm 0,06	3,37 \pm 0,57
6-Metil-5-Hepten-2-Ona	0,56 \pm 0,05	0,61 \pm 0,05	0,66 \pm 0,07	0,78 \pm 0,03	0,28 \pm 0,02	0,19 \pm 0,02	0,36 \pm 0,04	0,27 \pm 0,02
(Z)-3-Acetato de hexenila	0,86 \pm 0,03	2,25 \pm 0,11	2,37 \pm 0,3	1,99 \pm 0,11	0,72 \pm 0,02	1,02 \pm 0,07	1,16 \pm 0,14	0,09 \pm 0,01
α -Felandreno	0 \pm 0	0,1 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01	0,09 \pm 0,03	0,05 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01	0 \pm 0
Limoneno	0,08 \pm 0,0	0,03 \pm 0,0	0,44 \pm 0,07	0,11 \pm 0,01	0,39 \pm 0,02	0,33 \pm 0,03	0,46 \pm 0,05	0,53 \pm 0,06
(E)- β -ocimeno	0,02 \pm 0,0	0,04 \pm 0,02	0,61 \pm 0,05	0,41 \pm 0,01	1,46 \pm 0,11	0,44 \pm 0,04	0,29 \pm 0,07	0,11 \pm 0,01
Salicilato de metila	0,51 \pm 0,02	2,94 \pm 0,23	1,70 \pm 0,3	1,33 \pm 0,15	0,34 \pm 0,02	1,51 \pm 0,12	1,30 \pm 0,2	0,07 \pm 0,01
Benzotiazol	0,4 \pm 0,04	0,32 \pm 0,03	0,33 \pm 0,03	1,01 \pm 0,07	0,35 \pm 0,02	0,08 \pm 0,01	0,24 \pm 0,03	0,05 \pm 0,01
Geranil acetona	0,26 \pm 0,01	0,31 \pm 0,02	0,39 \pm 0,05	0,276 \pm 0,01	0 \pm 0	0,31 \pm 0,03	0,15 \pm 0,03	0 \pm 0
β -Cariofileno	1,83 \pm 0,14	2,00 \pm 0,1	3,00 \pm 0,3	2,62 \pm 0,13	1,17 \pm 0,09	1,34 \pm 0,1	1,49 \pm 0,14	0,04 \pm 0,01
α -Farneseno	0,47 \pm 0,03	3,97 \pm 0,56	1,10 \pm 0,16	1,94 \pm 0,06	0,52 \pm 0,03	2,29 \pm 0,17	2,83 \pm 0,52	0,12 \pm 0,04
TMTT	0,308 \pm 0,01	0,691 \pm 0,07	0,65 \pm 0,08	0,62 \pm 0,04	0,27 \pm 0,02	0,40 \pm 0,04	0,46 \pm 0,05	0,81 \pm 0,23

ANEXO 2: Continuação

Compostos	72h				96h			
	Cont	Eh	Nv	EhNv	Cont	Eh	Nv	EhNv
(Z)-3-Hexen-1-ol	0±0	0,429±0,04	0,273±0,02	0,359±0,04	0±0	0,175±0,03	0,071±0,01	0,340±0,14
6-Metil-5-Hepten-2-Ona	0,223±0,04	0,365±0,04	0,102±0,01	0,319±0,03	0,207±0,02	0,284±0,03	0,077±0,01	0,309±0,03
(Z)-3-Acetato de hexenila	0,729±0,13	1,247±0,12	0,903±0,05	0,821±0,04	0,384±0,07	1,457±0,24	1,094±0,07	0,815±0,05
α -Felandreno	0±0	0,086±0,01	0,072±0,01	0±0	0,042±0,01	0,109±0,03	0,079±0,01	0±0
Limoneno	0±0	0,618±0,13	0,141±0,01	0,104±0,01	0±0	0,486±0,1	0,342±0,04	0,109±0,01
(E)- β -ocimeno	1,057±0,27	0,345±0,07	0,199±0,01	0,337±0,07	0,770±0,28	0,413±0,06	0,368±0,03	0,328±0,03
Salicilato de metila	0,384±0,06	1,878±0,19	0,558±0,03	0,555±0,05	0,211±0,04	1,739±0,14	0,779±0,05	0,498±0,04
Benzotiazol	0,857±0,18	0,314±0,03	0,066±0	0,429±0,04	0,412±0,1	0,311±0,05	0,088±0,01	0,354±0,03
Geranil acetona	0±0	0,168±0,02	0,052±0,01	0,104±0,01	0±0	0,223±0,03	0,082±0	0,108±0,01
β -Cariofileno	0,866±0,14	1,114±0,1	1,06±0,04	1,079±0,08	1,787±0,47	1,355±0,13	1,384±0,09	0,880±0,05
α -Farneseno	0,794±0,15	3,988±0,44	0,838±0,04	0,873±0,08	1,085±0,31	5,234±1,08	0,992±0,05	0,472±0,05
TMTT	0,215±0,05	0,542±0,1	0,26±0,03	0,522±0,04	0±0	0,868±0,06	0,203±0,01	0,374±0,05

TMTT ((E,E)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno)