

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
Mestrado em Comportamento e Biologia Animal

Nayara Braga Saraiva

**VESPA SOCIAL *Polybia fastidiosuscula*: RESPOSTA OLFATIVA  
PARA VOLÁTEIS E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DE  
PLANTAS DE MILHO INDUZIDO**

Juiz de Fora  
2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Braga, Nayara.

Vespa social *Polybia fastidiosuscula*: resposta olfativa para voláteis e identificação dos compostos de plantas de milho induzido / Nayara Braga. -- 2014.

67 f. : il.

Orientador: Fábio Prezoto

Coorientador: Alexander Machado Auad

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Comportamento Animal, 2014.

1. Compostos Orgânicos Voláteis. 2. Defesa Indireta. 3. Regurgito de Lagartas. 4. Vespa Social. 5. Controle Biológico. I. Prezoto, Fábio, orient. II. Auad, Alexander Machado, coorient. III. Título.

Nayara Braga Saraiva

**VESPA SOCIAL *Polybia fastidiosuscula*: RESPOSTA OLFATIVA  
PARA VOLÁTEIS E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DE  
PLANTAS DE MILHO INDUZIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Prezoto

Co-Orientador: Prof. Dr. Alexander Machado Auad

Juiz de Fora

2014

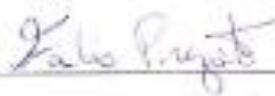
Nayara Braga Saraiva

**VESPA SOCIAL *Polybia fastidiosuscula*: RESPOSTA OLFATIVA  
PARA VOLÁTEIS E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DE  
PLANTAS DE MILHO INDUZIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Aprovada em 20 de Fevereiro de 2014.

**BANCA EXAMINADORA**




Dr. Fábio Prezoto (orientador)

Universidade Federal de Juiz de Fora



Dr. Alexander Machado Auad (Co-orientador)

Embrapa Gado de Leite



Dra. Marcy das Graças Fonseca

Embrapa Gado de Leite

*À minha família que esteve sempre ao meu lado me apoiando e incentivando diante das dificuldades. A vocês o meu eterno agradecimento.*

## AGRADECIMENTO

À Deus por me iluminar e permitir cumprir esta importante etapa de minha vida.

Ao Dr. Fábio Prezoto pela orientação e solicitude em me atender logo no primeiro momento, pelo apoio e paciência ao me ensinar.

Ao meu coorientador Dr. Alexander M. Auad pelas sugestões sempre oferecidas, pelo exemplo de entusiasmo no trabalho, amizade, e por oferecer as dependências do Laboratório de Entomologia da Embrapa Gado de Leite para o desenvolvimento deste trabalho.

À querida Dra. Marcy G. Fonseca por estar ao meu lado em todos os momentos deste trabalho, pelos ensinamentos e amizade.

À Embrapa Gado de Leite, em especial aos amigos Thiago, Cristiane, Renata, Flávio e toda equipe do Laboratório de Entomologia.

À Dra. Simone Martins pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo pelo fornecimento dos ovos de *Spodoptera frugiperda*.

À equipe do Laboratório de Semioquímicos da Embrapa Recurso Genético e Biotecnologia, em especial aos pesquisadores Dra. Maria Carolina Blassioli Moraes e Dr. Miguel Borges pela apoio técnico oferecido, aconselhamentos e identificação dos compostos voláteis.

Aos meus pais Stael e Francisco por fazer parte de toda esta batalha, pela preocupação e amor incondicional. Obrigada família, tios e primos pela torcida...

À minha dindinha Maria Aparecida pelo zelo, incentivo e por ser esse anjo em minha vida.

Ao meu avô Henrique pelo exemplo de vida, força e determinação; e minhas avós Zezé e Jutacy pelo amor e carinho de sempre.

Ao meu namorado Victor por ser sempre presente, pelo amor, amizade, sorrisos e paciência. E a sua família pelo acolhimento e presteza.

À Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) pela bolsa concedida.

## RESUMO

A lagarta *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepdopitera: Noctuidae) é praga na cultura do milho, afetando em até 60% os rendimentos de grãos. Uma das formas de controle dessa praga é por meio do controle biológico, sendo as vespas predadoras uma alternativa viável. Desta forma, objetivou-se avaliar a resposta olfativa da vespa social *Polybia fastidiosuscuai* (Saussure) (Hymenoptera: Vespidae) para voláteis liberados por plantas de milho e/ou da lagarta *S. frugiperda*. Utilizando um olfatômetro em Y, foram realizados bioensaios comportamentais para verificar a resposta comportamental das vespas sociais aos voláteis liberados por lagartas *S. frugiperda*, por plantas de milho, por plantas de milho induzidas com lagartas *Spodoptera frugiperda* e plantas de milho injúrias mecânicas e/ou tratadas com regurgito de lagartas ou água. Observou-se que as vespas sociais não tiveram preferência significativa quando ofertou-se, ar, lagartas, plantas de milho sem indução ou plantas de milho injuriadas mecanicamente tratadas com água. No entanto, as vespas preferiram plantas induzidas por lagartas *S. frugiperda* ou plantas injuriadas mecanicamente tratadas com regurgito de lagartas durante os intervalos de 5-6 horas e 24-25 horas. O mesmo não foi observado quando as plantas foram induzidas por lagartas ou injuriadas mecanicamente tratadas com regurgito de lagarta no intervalo de 1-2 horas. Estes resultados foram confirmados quando ofertou-se os extratos plantas de milho induzidas por lagartas *S. frugiperda* ou plantas de milho injuriadas mecanicamente tratadas com regurgito de lagartas após 5-6 horas de indução versus o hexano como controle. Em uma segunda fase os extratos de plantas de milho sem indução, plantas de milho com a presença de *S. frugiperda* por 1 hora, plantas de milho com a presença contínua de *S. frugiperda* e de plantas de milho injuriadas mecanicamente tratadas com regurgito de lagartas foram quantificados por cromatografia gasosa acoplada a detecção por ionização de chamas (CG-DIC) e analisados por cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM) utilizando o gás hélio como gás de arraste. Os dados foram coletados e avaliados com o software ChemStation. E a identificação dos compostos dos extratos das plantas de milho foi feita por comparação dos tempos de retenção no CG-DIC com os dos padrões usando coluna apolares e cálculo do índice de Kovats.

Palavras-chave: Compostos orgânicos voláteis, interação tritrófica, defesa indireta, lagarta, vespa social, controle biológico.

## ABSTRACT

The caterpillar *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepdopitera: Noctuidae) is a pest in corn, affecting up to 60%, the grain yield. One way to control this pest is through biological control, and predatory wasps a viable alternative. Thus, we aimed to evaluate the olfactory response of the social wasp *Polybia fastidiosuscula* (Saussure) (Hymenoptera: Vespidae) to volatiles released by maize plants and / or caterpillar *S. frugiperda*. Using a olfactometer-Y, behavioral experiments were conducted to verify the behavioral response to volatile social wasps released by *S. frugiperda* larvae by corn plants, induced by corn plants with caterpillars *Spodoptera frugiperda* and corn plants mechanical injuries and / or treated with caterpillars regurgitate or water. It was observed that the wasps did not have significant social preferably when offered up, air, caterpillars, corn plants without induction or mechanically injured maize plants treated with water. However, wasps preferred induced by *S. frugiperda* larvae or mechanically injured plants treated with caterpillars of regurgitation during intervals 5-6 hours and 24-25 hours plants. The same was not observed when plants were induced by caterpillars or injured mechanically treated with caterpillar regurgitate in the range of 1-2 hours. These results were confirmed when offered up corn plant extracts induced by *S. frugiperda* larvae or corn plants injured overflow, mechanically treated larvae after 5-6 hours of induction versus hexane as control. In a second phase extracts of corn plants without induction, corn plants with the presence of *S. frugiperda* for 1 hour, corn plants with the continued presence of *S. frugiperda* and corn plants injured mechanically treated regurgitate Crawler were quantified by gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID) and analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) using helium as the carrier gas. Data were collected and evaluated with the ChemStation software. And the identification of compounds of extracts of maize plants was made by comparison of retention times in GC-FID with patterns using nonpolar column and Kovats index calculation.

Key words: Volatile Organic Compounds, tritrophic interaction, indirect defenses, caterpillar, social wasp, biological control.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Fotografia 1.</b> Injúrias ocasionadas pela lagarta <i>S.frugiperda</i> na planta de milho -----	17
<b>Fotografia 2.</b> Plantas de milho ( <i>Zea mays</i> L.) em desenvolvimento -----	31
<b>Fotografia 3.</b> Criação de <i>Spodoptera frugiperda</i> -----	31
<b>Fotografia 4.</b> A) Colônia de <i>Polybia fastidiosuscula</i> . B) Vespas <i>Polybia fastidiosuscula</i> armazenadas -----	32
<b>Fotografia 5.</b> A) Lagartas <i>Spodoptera frugiperda</i> sobre a planta de milho. B) Coleta do regurgito de <i>Spodoptera frugiperda</i> . C) Regurgito de <i>Spodoptera frugiperda</i> -----	32
<b>Fotografia 6.</b> Planta de milho com lagartas <i>Spodoptera frugiperda</i> -----	33
<b>Fotografia 7.</b> Planta de milho com lagartas <i>Spodoptera frugiperda</i> -----	33
<b>Fotografia 8.</b> Injúria mecânica na planta de milho -----	34
<b>Fotografia 9.</b> Aplicação do regurgito de <i>Spodoptera. frugiperda</i> sobre a planta de milho -----	34
<b>Fotografia 10.</b> Indução da planta de milho com regurgito de <i>Spodoptera frugiperda</i> -	35
<b>Fotografia 11.</b> A) Olfatômetro em Y. B) Filtro com carvão ativado e água. C) Fluxômetro -----	35
<b>Fotografia 12.</b> Câmara de vidro adaptada para aeração -----	37
<b>Fotografia 13.</b> A) Dessorção com hexano. B) Concentração dos extratos com nitrogênio -----	38
<b>Figura 1.</b> Resposta olfativa da vespa <i>P. fastidiosuscula</i> em olfatômetro em y para voláteis de milho submetido a diferentes tratamentos: i) ar ii) planta de milho sem injúria; (iii) lagartas <i>S. frugiperda</i> ; iv) planta de milho induzidas continuamente com lagarta <i>S. frugiperda</i> (Planta + lagarta) e testadas em intervalos de 1-2horas; 5-6horas e 24-25horas; v) planta de milho com lagartas <i>S. frugiperda</i> por 1 hora e testadas em intervalos de tempos de 5-6horas e 24-25horas. *Diferenças significativas, Teste Qui-quadrado, $P < 0,05$ . -----	40
<b>Figura 2.</b> Resposta olfativa da vespa <i>P. fastidiosuscula</i> em olfatômetro em y para voláteis de milho submetido a diferentes tratamentos: i) plantas de milho injúrias mecanicamente em intervalos de tempo de 1-2horas, 5-6horas e 24-25horas; ii) plantas de milho com injúria mecânica tratadas com água ; iii) planta de milho com injúria mecânica tratadas com regurgito de <i>S. frugiperda</i> em intervalos de 5-6horas e 24-25horas; iv) planta de milho sem injúria tratadas com água; v) planta de milho sem	

injúria tratadas regurgito de *S. frugiperda* em intervalos de tempo de 5-6horas.

\*Diferenças significativas, Teste Qui-quadrado,  $P < 0,05$ . ----- 41

**Gráfico 3.** Resposta olfativa da vespa *P. fastidiosuscula* em olfatômetro em y para hexano (controle) ou para extratos de milho submetido a diferentes tratamentos: i) planta de milho induzidas continuamente com lagarta *S. frugiperda*; ii) planta de milho com a presença de lagartas *S. frugiperda* por 1 hora; iii) planta de milho com injúria mecânica tratadas com regurgito de *S. frugiperda* em intervalos de tempos de 5-6horas.

\*Diferenças significativas, Teste Qui-quadrado,  $P < 0,05$ . ----- 42

**Figura 4.** Quantidade dos compostos (1)  $\alpha$ -pineno, (2) mirceno, (3) (Z)-3-acetato de hexenila, (4) limoneno, (5) (Z)  $\beta$ -ocimeno, (6) linalol, (7) DMNT, (8) indol, (9)  $\beta$ -farneseno e (10) TMTT emitidos pelas plantas de milho submetidas a diferentes tratamentos: milho sem injúria, planta de milho com lagarta por 1 hora, planta de milho continuamente com lagartas e planta de milho injuriada mecanicamente tratada com regurgito de lagarta. As letras representam a diferença entre os tratamentos calculados através do índice de Kruskal-Wallis, ao nível de significância 5%, e médias comparadas pelo método de Dunn ( $\alpha=0,05$ ). ----- 58

**Figura 5.** Quantidade dos compostos (1) mentol, (2) benzotiazol, (3)  $\alpha$ -copaeno e (4) geranyl acetona, emitidos pelas plantas de milho submetidas a diferentes tratamentos: milho sem injúria, planta de milho com lagarta por 1 hora, planta de milho continuamente com lagartas e planta de milho injuriada mecanicamente tratada com regurgito de lagarta. As letras representam a diferença entre os tratamentos calculados através do índice de Kruskal-Wallis, ao nível de significância 5%, e médias comparadas pelo método de Dunn ( $\alpha=0,05$ ). ----- 59

**Figura 6.** A análise discriminante mostra separação dos quatro tratamentos experimentais para o milho: planta sem injúria, planta com lagarta por 1 hora, planta com lagarta por 8 hora e planta com injúria mecânica tratadas com regurgito. Os pontos representam cada repetição na combinação linear, e as linhas são as quantidades, que representam a importância de cada composto nos tratamentos ao longo das duas dimensões (CV1 e CV2). Os dois primeiros componentes da ACP explicam os dados na porcentagem de 68.8%.A numeração dos compostos segue: (C1)  $\alpha$ -pineno; (C2) mirceno; (C3) (Z)-3-acetato de hexenila; (C4) limoneno; (C5) (Z)- $\beta$ -ocimeno, (C6) linalol; (C7) DMNT; (C8) mentol; (C9) benzotiazol; (C10) indol; (C11)  $\alpha$ -copaeno; (C12) geranyl acetona; (C13)  $\beta$ -farneseno; (C14) TMTT. ----- 60

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento

VFVs - Voláteis de Folhas Verdes

COVS - Compostos Orgânicos Voláteis

MIP - Manejo Integrado de Pragas

LOX - Lipoxigenase

IR - Índice de Retenção

ACP - Análise de Componentes Principais

13HPOT -13-hidroperoxi-linolênico

13HPL - 13-hidroperoxidoliase

DMNT - (*E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno

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

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO-----	13
2. REVISÃO DE LITERATURA -----	15
2.1. Milho -----	15
2.2. Pragas -----	15
2.3. <i>Spodoptera frugiperda</i> -----	17
2.4. Controle de <i>Spodoptera frugiperda</i> -----	18
2.5. Controle biológico -----	19
2.6. Vespas sociais -----	19
2.7. Comunicação química -----	20
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	22
4. RESPOSTA OLFATIVA DA VESPA SOCIAL <i>Polybia fastidiosuscula</i> (SAUSSURE) (HYMENOPTERA: VESPIDAE) PARA VOLÁTEIS DE PLANTAS DE MILHO ( <i>Zea mays</i> L) -----	28
4.1. INTRODUÇÃO -----	29
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS -----	30
4.2.1. Obtenção de Plantas e Insetos -----	30
4.2.2. Coleta do regurgito -----	32
4.2.3. Indução das plantas de milho -----	33
4.2.4. Bioensaios de olfatometria -----	35
4.2.5. Aeração dos voláteis das plantas de milho -----	37
4.2.6. Bioensaios de olfatometria com os extratos das plantas de milho -----	38
4.3. RESULTADOS -----	39
4.4. DISCUSSÃO -----	42
4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	46
5. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS EMITIDOS PELAS PLANTAS DE MILHO ( <i>Zea mays</i> L) -----	51
5.1. INTRODUÇÃO -----	51
5.2. MATERIAL E MÉTODOS -----	53
5.2.1. Obtenção das plantas e insetos -----	53
5.2.2. Coleta do regurgito -----	54
5.2.3. Indução das plantas de milho -----	54

5.2.4. Aeração dos voláteis -----	54
5.2.5. Análise dos compostos voláteis -----	55
5.2.6. Análise dos estatística -----	56
5.3. RESULTADOS -----	56
5.4. DISCUSSÃO -----	60
5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	64
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS -----	67

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A cultura do milho no Brasil destaca-se por ocupar o segundo lugar em maior volume de grãos produzidos, com cerca de 78 milhões toneladas, ocupando uma área de aproximadamente 16 milhões de hectares na safra de 2012/13 (CONAB, 2013). No entanto, o ataque de lagartas são as principais causas da queda na produtividade e da baixa qualidade dos grãos, afetando em até 60% o rendimento da cultura (LUIZ & MAGRO, 2007).

Dentre as lagartas, a do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), respalda sua importância pela ampla distribuição temporal e geográfica, constituindo-se em uma das espécies mais nocivas para as culturas anuais nas regiões tropicais das Américas, principalmente no Brasil (NAGOSHI *et al.*, 2007). Devido seu hábito polífago, esta praga utiliza vários hospedeiros nos diferentes agroecossistemas (WAQUIL *et al.*, 2002), sendo o milho o seu hospedeiro preferencial, causando danos em todas as fases de crescimento da planta e, grande prejuízo monetário para o produtor (CRUZ, 1995; BUSATO *et al.*, 2002; SÁ *et al.*, 2009).

Nas últimas décadas, os métodos aplicadas no controle de pragas tem recebido crescente atenção devido a graves preocupações públicas e ambientais sobre o uso de inseticidas sintéticos, tornando-se necessário, o desenvolvimento de novas técnicas, a fim de minimizar uso de produtos fitossanitários no controle de *S. frugiperda* por meio da implementação do manejo integrado de pragas, com a inclusão do controle biológico (BOEGE & MARQUIS, 2005).

As plantas aperfeiçoaram uma vasta diversidade de mecanismos de defesas contra condições ambientais adversas, tais como o ataque de herbívoros, que podem defender-se através de mecanismos de defesas diretas ou indiretas (HILKER & MEINERS, 2002). As defesas diretas são de origem constitutiva nas plantas e podem afetar diretamente a biologia e a seleção hospedeira do inseto através de barreiras físicas ou química, tais como a produção de componentes tóxicos e/ou deterrente da alimentação (BALDWIN & PRESTON, 1999; DOSS *et al.*, 2000). Contudo, a defesa indireta, são reações sistêmicas da planta, derivadas de processos bioquímicos complexos emitidos após uma indução, que promove a atração de predadores que exercem controle biológico sobre o herbívoro (DICKE, 1999; MEINERS & HILKER, 2002). Neste contexto, as vespas sociais são considerados um grupo especial, pois

utilizam numerosas pistas químicas e físicas na localização de sua presa, o que as colocam em situação privilegiada para estudos sobre teias alimentares, devido suas características biológicas, abundância, distribuição e riqueza de interações (CARPENTER & MARQUES, 2001).

Com o objetivo de subsidiar o desenvolvimento de novas técnicas para o manejo eficiente no controle da lagarta *S. frugiperda* que requer a criação de inovações e tecnologias menos agressivas ao meio ambiente e à saúde humana, torna-se fundamental o estudo da resposta olfativa da vespa social *Polybia fastidiosuscula* (Saussure) (Hymenoptera: Vespidae) para voláteis de plantas de milho e/ou da lagarta *S. frugiperda*. Neste contexto, a resposta comportamental da vespa social aos COVs amplia o conhecimento de estratégias ecológicas e sustentáveis direcionadas ao manejo integrado de pragas (MIP) com maior possibilidade de sucesso.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Milho**

O milho (*Zea mays* L.) é uma espécie diploide pertencente à família Poacea (Gramineae), que possui a separação das inflorescências masculina e feminina, caracterizando-se como uma espécie monoica. Possui metabolismo do tipo C4 e com ampla adaptação a diferentes ambientes. Botanicamente, o grão dessa espécie é um fruto, denominado cariopse, sendo que o pericarpo está fundido com o tegumento da semente (CASTRO *et al.*, 2005). Originária da região do México à aproximadamente dez mil anos atrás é considerada uma das plantas cultivadas mais antigas, que nos dias de hoje está amplamente disseminada por todo o planeta, tornando-se uma das poucas culturas que o homem depende em grande escala, tanto para sua alimentação direta, como indireta. Segundo Duarte *et al.* (2006), o milho é um insumo para a produção de uma centena de produtos, porém, considerando apenas a cadeia produtiva de suínos e aves consume-se aproximadamente 70% do milho produzido no mundo e entre 70 e 80% do milho produzido no Brasil.

Devido suas características fisiológicas, a cultura de milho tem alto potencial produtivo, não só no ponto de vista social em razão da sua ampla utilização, mais também econômico em função da extensa área cultivada (DÖBEREINER *et al.*, 1995; FORNASIERI FILHO, 2007). De acordo com os dados da CONAB (2013) a área cultivada no Brasil é de aproximadamente 16 milhões de hectares, com uma produção de 78 milhões de toneladas, ocupando o segundo lugar em maior volume de grãos produzidos.

### **2.2. Pragas**

Apesar das evidências que o milho ocupa grandes áreas agrícolas no Brasil e das importantes transformações tecnológicas decorrentes em incrementos expressivos na produção, a produtividade média ainda é relativamente muito baixa, sendo superado pelos Estados Unidos e China (FORNASIERI FILHO, 2007). São diversos os fatores responsáveis pela baixa produtividade, sendo que as pragas têm elevada participação, o comum aparecimento destas causa danos irreversíveis à cultura, afetando desde o



plântio até a colheita. Estes danos são visíveis principalmente nos últimos anos com o cultivo de milho “safrinha”, que oferece condições para a continuidade de desenvolvimento das pragas devido à permanência da planta de milho na área por um longo período durante o ano agrícola (CRUZ *et al.*, 2002; FARIAS *et al.*, 2012).

O inseto é considerado praga quando atinge o nível populacional capaz de causar danos e reduzir o rendimento de grãos ou diminuir a qualidade do produto. No entanto, ao longo do tempo, os insetos-praga vêm co-evoluindo com seus hospedeiros, isto significa que, por essência, as modificações visando a melhorias nos cultivares vegetais levam a uma adaptação na melhoria dos insetos (CRUZ, 2008).

Entre as principais pragas a lagarta do cartucho, *S. frugiperda*, respalda sua importância pela ampla distribuição temporal e geográfica, constituindo-se em uma das espécies mais nocivas para as culturas anuais nas regiões tropicais das Américas, principalmente no Brasil (NAGOSHI *et al.*, 2007). Devido seu hábito polígrafo, esta praga utiliza vários hospedeiros nos diferentes agro-ecossistemas (WAQUIL *et al.*, 2002), sendo o milho o seu hospedeiro preferencial, causando danos em todas as fases de crescimento da planta e, grande prejuízo monetário para o produtor (Cruz, 1995; BUSATO *et al.*, 2002; SÁ *et al.*, 2009)

A *S. frugiperda* é originária das zonas tropicais e subtropicais das Américas, mas pode ser encontrada em zonas temperadas do continente norte americano durante os períodos de primavera e verão (Santos *et al.*, 2001). No Brasil ocorre praticamente em todos os estados (PEREIRA, 2007), onde encontra clima favorável e alimentação diversificada, propícios para sua ocorrência em diversas regiões e épocas do ano (CRUZ, 1995; SANTOS, 2001). É um inseto holometabólico, ou seja, durante seu ciclo passa por quatro fases distintas: ovo, lagarta, pupa e adulto (LUGINBILL, 1928). Sua biologia tem sido muito estudada por diversos autores em diferentes países e condições, porém a referência mais antiga deste inseto na literatura foi descrita por Smith (1797), que relatou a ovoposição no solo e a emergência da mariposa cerca de 12 dias após a lagarta ter se dirigido ao solo, coincidindo com o período em que o milho ainda está no campo.

Fim do período de incubação, começa a eclodir as lagartas que se alimentam de tecidos verdes, ocasionando o sintoma de dano característico denominado “folha raspada”. Já as lagartas mais desenvolvidas, começam a fazer furos nas folhas até danificá-las completamente, enquanto dirigem-se para o interior do cartucho

culminando com a destruição do mesmo (CRUZ, 2008). Devido ao canibalismo na fase larval, é comum encontrar apenas uma lagarta desenvolvida por cartucho. Podendo-se encontrar lagartas de instares diferentes num mesmo cartucho separadas pela lâmina de folhas.

Apesar de o cartucho ser o local onde normalmente se verifica a sua presença, esta praga pode ocasionar danos em várias outras partes da planta, como os pendões, as espigas e raízes adventícias (CRUZ, 2008). O período larval pode variar em função da temperatura, durante o verão quando a temperatura é mais elevada, o ciclo larval pode ser completado em 15 dias (CRUZ, 2005).

### **2.3. *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797). (Lepidoptera: Noctuidae)**

A *S. frugiperda* é um inseto de hábito polífago que possui destaque por se alimentar de mais de 80 espécies de plantas (CAPINERA, 2002; POGUE, 2002), principalmente as gramíneas, como milho, arroz, trigo, entre outras (BUSATO *et al.*, 2002). Além de utilizar de hospedeiros alternativos para se manter no agro ecossistema, possui preferência alimentar por cartuchos de plantas jovens, mais também têm a capacidade de se alimentar em todas as fases de crescimento da planta. Os locais de ataque bem como o tipo de danos provocado pela lagarta-do-cartucho em milho têm variado muito nos últimos anos. Em condições favoráveis, esta praga aumenta sua população rapidamente, destruindo as folhas e o cartucho do milho, atacando o pedúnculo e impedindo a formação de espigas comerciais (FERNANDES *et al.* 2003). Pode também penetrar diretamente nas espigas em sua porção basal ou distal danificando diretamente os grãos ou também se alimenta do colmo (CRUZ, 1995).



Fotografia 1. Injúrias ocasionadas pela lagarta *S. frugiperda* na planta de milho

Fonte:Manual de Pragas do Milho.

#### **2.4. Controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797). (Lepidoptera: Noctuidae)**

Na agricultura moderna o uso de inseticidas no controle da lagarta-do-cartucho ainda é o principal método de controle. Porém, apesar de sua eficiência, este método de controle pode causar danos irreversíveis, tais como: contaminação ambiental, altos níveis residuais em alimentos, desequilíbrio biológico e surgimento de populações de insetos resistentes (HENANDEZ & VENDRAMIM, 1996). Segundo dados da Embrapa Milho e Sorgo, existem 119 produtos químicos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para o controle da lagarta *S. frugiperda*. Dentre estes, os principais inseticidas utilizados na cultura de milho são: Carbaryl 75P; Carbaryl 480 SC; Cypermethrin 200CE; Cyfluthrin; Esfenvalerate 250CE, Fenvalerate 200CE; Fenitrothion 500CE; Parathion 500CE; Malathion metil 600CE; Lambdacyalothrin 50CE; Permethrin 384CE; Tricholorfon 500CE (EMBRAPA MILHO E SORGO, 2009).

FORNASIERI-FILHO (2007), observou que a ocorrência lagarta-do-cartucho em praticamente todas as fases de desenvolvimento na cultura de milho tem dificultado o manejo químico, estipula-se que o nível de controle dessa praga é de 20% de plantas com folhas raspadas, até o 30º dia após o plantio, e de 10% de plantas com folhas raspadas com 40 a 60 dias. Outra dificuldade é o fato da lagarta se alojar no interior do cartucho, a qual muitas vezes, se torna difícil o contato com o inseticida aplicado. Mas uma porcentagem razoável das lagartas é atingida por doses sub-letais, o qual seria o mais recomendado por não causa sua morte, e sim alterações na biologia e na capacidade de reprodução do inseto reduzindo sua população ao longo das gerações (SILVA & CROCOMO, 2000).

Observa-se, portanto, que os prejuízos não estão relacionados à ausência de tratamento fitossanitário, pois o número de aplicações tem aumentado ao longo dos anos e, em algumas regiões, é comum a utilização de mais de cinco aplicações de inseticidas durante a safra (CRUZ *et al.*, 2008). Sendo que no Brasil, o controle da *S. frugiperda* em lavoura de milho tem sido realizado com até 14 aplicações de inseticidas segundo relatos de Valicente & Tuelher (2009). Sabe-se que as causas determinantes para o insucesso no controle da lagarta são: combate tardio, métodos inadequados de aplicação do inseticida e do manejo integrado de pragas.

A maioria dos produtos químicos utilizados no campo não são seletivos aos inimigos naturais, ocasionando uma séria depreciação ecológica. Assim, o uso apropriado e eficiente do inseticida exige um conhecimento completo da biologia da praga no campo e uma avaliação das diferenças entre os insetos, entretanto, a escolha e a aplicação cuidadosa do produto podem contribuir para a redução dos danos ambientais (GULLAN & CRANSTON, 2009).

Desta forma, há um crescente interesse em reduzir o uso de produtos fitossanitários, estimulando a implementação do manejo integrado de pragas com a inclusão do controle biológico (BOEGE & MARQUIS, 2005). Essa tendência demonstra necessidade por melhores métodos de avaliação da atuação de inimigos naturais nos agro-ecossistemas.

## **2.5. Controle biológico**

Na busca de se obter uma agricultura sustentável com alta produtividade, advém a ideia de se fazer o manejo racional, que visa a redução do uso de agrotóxicos priorizando outros métodos ambientalmente mais seguros, como o controle biológico, que possibilita reduzir a contaminação do produtor, do produto, do consumidor e do ambiente. Neste contexto, o controle biológico corresponde ao controle exercido pelos inimigos naturais como predadores, parasitóides, parasitas e patógenos sobre as diferentes fases do ciclo de vida do inseto praga que vão ao encontro de uma variedade de pistas, que variam em natureza e confiabilidade com a distância dos anfitriões (SALLES, 1995; CORY & HOOVER, 2006).

Os inimigos naturais são potencialmente importantes para o estabelecimento de estratégias de manejo ecológico. Segundo PREZOTO et al. (2006), 90 a 95% das presas capturadas por vespas sociais são larvas de lepidópteros, o que as possibilitam a atuar de forma decisiva no equilíbrio trófico das comunidades como predadoras de pragas agrícolas.

## **2.6. Vespas sociais**

Atividade de forrageamento de insetos sociais é considerado um dos comportamentos mais importantes para a sua sobrevivência (LIMA & PREZOTO,

2003). Esta atividade envolve a capacidade dos seus trabalhadores em interagir com o meio ambiente e coletar recursos necessário para completar o desenvolvimento de sua colônia (WILSON, 1971). Normalmente, os materiais coletados por vespas sociais são principalmente água, hidratos de carbono, material para construir seus ninhos e proteína animal (WILSON 1971, HUNT *et al.*, 1987). Entre os materiais coletados, a captura de presa torna-se o comportamento mais complexo, pois envolve o reconhecimento da presas, a predação e a capacidade de retornar ao ninho (WILSON 1971; UGOLINI & CANNICCI, 1998).

Compreendidas entre a ordem Hymenoptera, as vespas sociais revelam-se como insetos generalistas, por utilizarem uma gama de recursos presentes no ambiente além de sua característica oportunista por retornarem a locais com grande oferta de recursos ou alimentos, em busca da otimização do forrageio e diminuição do esforço de procura (RAVERET, 2000). Alguns trabalhos trazem informações sobre a ação predatória de vespas sociais em diferentes grupos de invertebrados, e uso da proteína animal proveniente dessas presas na alimentação de suas crias (PREZOTO *et al.*, 1994; PREZOTO *et al.*, 2006). Em um estudo na Carolina do Norte, EUA, RABB & LAWSON (1957) encontraram uma redução de 68% nos danos causados por *Protoparce sexta* (Cramer) na cultura do tabaco, depois a introdução de colônias de vespas *Polistes exclamans* (L.) e *Polistes fuscatus* (Fabricius) nas proximidades das fazendas infestadas por pragas. Portanto, o estudo das espécies de predadores, como vespas sociais é fundamental para compreender o seu potencial uso no controle de herbívoros, contribuindo assim para o equilíbrio sustentável dos cultivos florestais e agrícolas.

## **2.7. Comunicação química**

Apesar de na natureza existir uma variedade de sinais envolvidos na comunicação entre animais, os sinais químicos, de um modo geral, são os grandes responsáveis pela comunicação entre insetos e seu meio ambiente (LEWIS & NORLUND, 1984). Estes sinais, podem ser recebidos a curta e/ou a longas distâncias, independente do horário do dia e do tipo de habitat, no entanto, a qualidade de recepção destes sinais, dependerá da quantidade e da volatilidade das substâncias liberadas a partir da fonte, da velocidade e turbulência do vento e da interferência da vegetação e outras barreiras físicas (PAREJA *et al.*, 2007).

Segundo Lewis & Nordlund (1984), qualquer substância que liberada por um determinado organismo provoque uma mudança fisiológica e/ou comportamental em um outro organismo é denominada de semioquímico. Estas substância podem ter ação intraespecífica (feromônio) ou interespecífica (aleloquímico). Os Aleloquímicos por sua vez, diferenciam-se de acordo com tipo de organismo que esta sendo beneficiado na comunicação. Nas interações bi-tróficas (planta-herbívoro), as substâncias secundárias liberadas naturalmente pelas plantas são detectadas por herbívoros que as usam como cairomônios, beneficiando o receptor do sinal (DUDAREVA *et al.*, 2004). Nas interações tri-tróficas (planta-herbívoro-inimigo natural) uma mesma substância liberada pela planta pode ter funções múltiplas, ou seja, pode atuar como cairomônio se atrair um determinado herbívoro, como alomônio, beneficiando o emissor do sinal ou como sinomônio, se atrair inimigos naturais do herbívoro que a está atacando, beneficiando o receptor e o emissor (VISSER, 1986; VINSON, 1984).

Além dos fatores abióticos, a resposta comportamental a determinado semioquímico está intimamente relacionada com a percepção do inseto a este estímulo que envolve uma série de eventos neurofisiológicos, os quais irão capacitá-lo a responder a determinado odor (BIRCH & HAYNES, 1982).

Contudo, as interações entre o primeiro e o terceiro nível tráfico são mediadas por compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por plantas, que são compostos relativamente pequenos, contendo, no geral, entre cinco a vinte átomos de carbono. Eles apresentam uma pressão de vapor relativamente alta, o que permite que volatilizem a temperatura ambiente e se difundam pelo ar. A grande maioria dos COVs pertence a uma das três classes de compostos: 1) derivados do ácidos graxos; 2) os isoprenóides (ou terpenóides) ou 3) os fenilpropanóides (DUDAREVA *et al.*, 2004).

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDWIN, I.; PRESTON, C. The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores. **Planta**, v.208, p.137-145, 1999.

BIRCH, M.C.; HAYNES, K.F. **Insect Pheromones. Studies in Biology**, 147. Edward Arnold, London, p.58, 1982.

BOEGE, K.; MARQUIS, R.J. Facing herbivory as you grow up: the ontogeny of resistance in plants. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 20, p.441-448, 2005.

BUSATO, G.R.; GRUTZMACHER, A.D.; GARCIA, M.S.; GIOLO, F.P.; MARTINS, A.F. Consumo e utilização de alimento por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) originária de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, das culturas do milho e do arroz irrigado. **Neotropical Entomology**, v.31, p.525-529, 2002.

CAPINERA, J. L. **Handbook of vegetable pests**. Academic Press, San Diego, p.2700, 2002.

CARPENTER, J.M; MARQUES, O.M. Contribuição ao estudo dos vespídeos do Brasil (Insecta, Hymenoptera, Vespoidae, Vespidae). Cruz das Almas, Universidade Federal da Bahia. **Publicações digitais**, v.2, 2001.

CASTRO, P.R.; KLUGE, R.A.; PERES, L.E.P. **Manual de fisiologia vegetal**. Piracicaba: Ceres, p.650, 2001.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, oitavo levantamento, maio 2013 / Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília: Conab, 2013. Publicação mensal.1. Safra. 2. Grão. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_05\\_09\\_11\\_56\\_07\\_boletim\\_2\\_maio\\_2013.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_05_09_11_56_07_boletim_2_maio_2013.pdf)>. Acesso em: 16 maio 2013.

CORY, J.S.; HOOVER, K. Plant-mediated effects in insect–pathogen interactions. **Trends in Ecology & Evolution**, v.21, p.278–286, 2006.

CRUZ, I. A lagarta do cartucho na cultura do milho. **EMBRAPA**, CNPMS, Sete Lagoas 45 (Circular Técnica, 21). 2005.

CRUZ, I.; GONÇALVES, E.P.; FIGUEIREDO, M.L.C. Effect of a nuclear polyhedrosis virus on *Spodoptera frugiperda* (Smith) larvae, its damage and yield of maize crop. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.1, p.20-27, 2002.

CRUZ, I. Da cana ao milho. **Cultivar**, Pelotas, v.10, n.110, p.12-15, 2008.

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

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa-SPI, p.60.

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

DUARTE, J.O.; CRUZ, J.C.; GARCIA, J.C.; MATTOS, M.J. **Sistema de produção de milho e sorgo**. Sete Lagoas, 2006. Disponível em: <<https://www.cnpms.com.br>>. Acesso em: 16 novembro. 2013.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**, v135, p.1893–1902, 2004.

EMBRAPA MILHO E SORGO. **Sistemas de Produção**, 2  
ISSN 1679-012X Versão Eletrônica - 5ª edição Set. 2009.FARIAS *et al.*, 2012).



FERNANDES, O. D.; PARRA, J. R. P.; NETO, A. F.; PICOLI, R.; BORGATTO, A. F.; DEMETRIO, C. G. B. (2003). **Efeito do milho geneticamente modificado MON810 sobre a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae).**

FORNASIERI FILHO, D. **Manual da cultura do milho.** 1. ed. Jaboticabal: Funep, p. 273, 2007.

GULLAN, P.J.; CRANSTON, P.S. **Os Insetos: Um resumo de Entomologia.** 3a. ed. Roca, São Paulo, p.456, 2009.

RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ, C.; VENDRAMIM, J.D. Toxicidad de extractos acuosos de Meliaceae en *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Manejo Integrado de Plagas**, v.42, p.14-22, 1996.

HILKER, M.; MEINERS, T. Induction of plant responses towards oviposition and feeding of herbivorous arthropods: a comparison. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. v.104, p.181-192, 2002.

HUNT, J. R.; R. L. JEANNE; A. BAKER & D. E. Grogan. Nutrient dynamics of the swarm-founding social wasps species, *Polybia occidentalis* (Hymenoptera, Vespidae). **Ethology**, v. 75, p.291–305, 1987.

LEWIS, W.J.; NORLUND, D.A. **Semiochemicals influencing fall armyworm parasitoid behavior: implications for behavioral manipulation.** Georgia: Fall Armyworm Symposium, p.343-349, 1984.

LIMA, M. A. P.; PREZOTO, F. Foraging activity rhythm in the neotropical swarm-founding wasp *Polybia platycephala sylvestris* Richards, 1978 (Hymenoptera: Vespidae) in different seasons of the year. **Sociobiology**, v42, p. 645–752, 2003.

LUGINBILL, P. The fall armyworm. Tech Bull US, **Departamento da Agricultura**, v.34: p.1-91, 1928.

LUIZ, C.B.F.; MAGRO, S.R. Controle biológico das pragas da espiga, sobre parâmetros qualitativos e quantitativos na cultura do milho de safrinha em Ubitatã/PR. **Campo Digital**, Campo Mourão, v.2, p.13-21, 2007.

HILKER, M.; MEINERS, T. Induction of plant responses towards oviposition and feeding of herbivorous arthropods: a comparison. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v.104, p.181-192, 2002.

NAGOSHI, R.N.; SILVIE, P.; MEAGHER, R.L. Comparison of haplotype frequencies differentiate fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) corn-strain populations from Florida and Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v.100, p.954-961. Noctuidae). *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.1 (3), p.1-11, 2007.

PAREJA, M.; MORAES, M. C. B.; Clark, S. J. M.; BIRKETT, A.; POWELL, W. Response of the aphid parasitoid *Aphidius funebris* to volatiles from undamaged and aphid-infested *Centaurea nigra*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 33, p. 695-710, 2007.

PEREIRA, L. G. B. Táticas de controle da lagarta-do-cartucho do milho, Spodoptera frugiperda. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais: **Dossiê Técnico**, p.28. 2007.  
Pogue, G. M. A world revision of the genus Spodoptera Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). **Mem. Am. Entomol. Soc.** 43: 1-202, 2002.

POGUE, G. M. A world revision of the genus Spodoptera Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). **Memoirs of the American Entomological Society**, v.43, p. 1-202, 2002.

PREZOTO, F.; GIANNOTTI, E. ; MACHADO, V. L. L. Atividade forrageadora e material coletado pela vespa social *Polistes simillimus* Zikán, 1951 (Hymenoptera, Vespidae). **Insecta**, v. 3, p.11–19, 1994.

PREZOTO, F.; SANTOS-PREZOTO, H.H.; MACHADO, V.L.L.; ZANUNCIO, J.C. Prey captured and used in *Polistes versicolor* (Olivier) (Hymenoptera: Vespidae) Nourishment. **Neotropical Entomology**, v.35, p.707–709, 2006.

RABB, R. L.; LAWSON, F. R. Some factors influencing the predation of *Polistes* wasps on the Tobacco Hornworm. **Journal of Economic Entomology**, v.50(6), p.778-784, 1957.

RAVERET-RICHTER, M. Social wasps (Hymenoptera: Vespidae) foraging behaviour. **Annual Review of Entomology**, v.45, p.121–150, 2000.

SÁ, V.G.M.; FONSECA, B.V.C.; BOREGAS, K.G.B.; WAQUIL, J.M Sobrevivência e desenvolvimento larval de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera:Noctuidae) em Hospedeiros Alternativos. **Neotropical Entomology**, v.38(1), p.108-115, 2009.

SALLES, L. A. B. Estratificação vertical da incidência de *Anastrepha fraterculus* (Wied.) em fruteiras no sul do Brasil. Anais da **Sociedade Entomológica do Brasil**, v.24, p.423-28, 1995.

SANTOS WJ. Evolução das Pragas do Algodoeiro no Cerrado. **Correio Agrícola**, v.1, p.20-27, 2001.

SILVA, F. R.; CROCOMO, B. W. Dose letal. Cultivar, ano IX, nº 95, p. 2007.

SIMMONDS, M.S.J. **Molecular-and chemo-systematics: do they have a role in agrochemical discovery?** Crop Protection, Oxford, v.19, p.591-596, 2000. (UGOLINI & CANNICCI, 1998).

VALICENTE, F. H.; TUELHER, E. S. **Controle Biológico da Lagarta do Cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com Baculovírus.** Circular Técnica nº 114, 2009.

VINSON, S.B. **How parasitoids locate their hosts: a case of insect espionage.** En: Lewis T. editor. Insect communication. London, Academic Press, p. 325-348, 1984.

VISSER, B. Loss of lipid synthesis as an evolutionary consequence of a parasitic lifestyle. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U S A.* 107:8677–8682, 2010.

WAQUIL, J.M.; VILELLA, F.M.F.; FOSTER, J.E. Resistência do milho (*Zea mays* L.) transgênico (Bt.) à lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidóptera:Noctuidae). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.1(3), p.1-11, 2002.

WILSON, E. O. *The Insect Societies*. **The Belknap Press**, Cambridge, p.548, 1971.

#### **4. RESPOSTA OLFATIVA DA VESPA SOCIAL *Polybia fastidiosuscula* (SAUSSURE) (HYMENOPTERA:VESPIDAE) PARA VOLÁTEIS DE PLANTAS DE MILHO (*Zea mays* L)**

##### **RESUMO**

Este trabalho é o primeiro registro sobre o comportamento de vespas sociais frente a voláteis de plantas. A lagarta *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é praga na cultura do milho, afetando em até 60% os rendimentos de grãos. Uma das formas de controle dessa praga é por meio do controle biológico, sendo as vespas predadoras uma alternativa viável. Desta forma, objetivou-se avaliar a resposta olfativa da vespa social *Polybia fastidiosuscula* (Saussure) (Hymenoptera: Vespidae) para voláteis liberados por plantas de milho e/ou da lagarta *S. frugiperda*. Utilizando um olfatômetro em Y, foram realizados bioensaios comportamentais para verificar a resposta comportamental das vespas sociais aos voláteis liberados por lagartas *S. frugiperda*, por plantas de milho, por plantas de milho induzidas com lagartas *Spodoptera frugiperda* e plantas de milho injúrias mecânicas e/ou tratadas com regurgito de lagartas ou água. Observou-se que as vespas sociais não tiveram preferência significativa quando ofertou, ar, lagartas, plantas de milho sem indução ou plantas de milho injuriadas mecanicamente tratadas com água. No entanto, as vespas preferiram plantas induzidas por lagartas *S. frugiperda* ou plantas injuriadas mecanicamente tratadas com regurgito de lagartas durante os intervalos de 5-6 horas e 24-25 horas. O mesmo não foi observado quando as plantas foram induzidas por lagartas ou injuriadas mecanicamente tratadas com regurgito de lagarta no intervalo de 1-2 horas. Estes resultados foram confirmados quando foram ofertados extratos de plantas de milho induzidas por lagartas *S. frugiperda* ou plantas de milho injuriadas mecanicamente tratadas com regurgito de lagartas após 5-6 horas de indução versus o hexano como controle.

Palavras-chave: Compostos orgânicos voláteis, interação tritrófica, defesa indireta, regurgito de lagarta, vespa social, controle biológico.

## 4.1. INTRODUÇÃO

As plantas são atacadas por uma grande diversidade de herbívoros, que provocam numerosos efeitos negativos no seu crescimento, sobrevivência e capacidade reprodutiva (COLEY & BARONE, 1996). Segundo AUAD *et al.* 2013, na natureza, existe uma diversidade de espécies herbívoras que se alimentam de diferentes formas, incluindo a sucção de seiva ou a mastigação de tecidos foliares. Dentre os insetos mastigadores, a lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), constitui-se em uma das espécies mais nocivas para as culturas anuais nas regiões tropicais das Américas, principalmente no Brasil (NAGOSHI *et al.*, 2007). Devido seu hábito polífago, esta praga utiliza vários hospedeiros nos diferentes agroecossistemas (WAQUIL *et al.*, 2002), sendo o milho o seu hospedeiro preferencial, onde tem a capacidade de causar danos em todas as fases de crescimento da planta e grande prejuízo monetário para o produtor (SÁ *et al.*, 2009).

Ao contrário do que se pensou durante muitos anos, as plantas não são apenas passivas ao ataque dos insetos herbívoros (AGRAWAL, 2000), visto que ao longo do período evolutivo, estas desenvolveram a habilidade de reconhecer e responder defensivamente a estes ataques, por meio de atributos físicos ou químicos que podem atuar como defesas constitutivas, presentes antes mesmo de sofrerem a injúria; ou por meio de defesa induzida, que se manifestam após a injúria, favorecendo as plantas na defesa contra herbívoros e condições adversas da natureza (PICHERSKY *et al.*, 2006; HOWE & JANDER, 2008).

As defesas constitutivas podem ser diretas, quando atuam sobre os herbívoros através de barreiras físicas, tais como espinhos e tricomas, ou químicas, impedindo sua colonização e alimentação do herbívoro (GULLAN & CRANSTON, 2009; KOST & HEIL, 2005). Entretanto, a defesa induzida pode ocorrer em resposta ao stress abiótico ou biótico, como por exemplo, à herbivoria (KARBAN & BALDWIN, 1997); oferecendo muitas vantagens para a planta, uma vez que reduzem o investimento em mecanismos de defesa, retardam a adaptação e o desenvolvimento de resistência dos herbívoros (AGRAWAL & KARBAN, 1999).

Kessler & Baldwin (2001) propuseram que este mecanismo de defesas indiretas, provoca mudanças no volume e concentração de açúcares e aminoácidos do néctar extrafloral, assim como a produção e emissão de compostos orgânicos voláteis (COVs)

Quando um herbívoro se alimenta de uma planta, ocorre uma série de processos que resultam em mudanças do perfil dos COVs (XIAO *et al.*, 2012). O primeiro processo é a quebra dos ácidos graxos presente nas membranas celulares, que resulta na liberação de voláteis de folhas verdes (VFs), e na síntese de ácido jasmônico, que é responsável pela expressão de genes envolvidos na defesa da planta devido a mudanças provocadas nos níveis de terpenóides, caracterizando a alteração do odor liberado (DICKE & VET, 1999; DUDAREVA *et al.*, 2004). Muitos destes mecanismos bioquímicos ainda são desconhecidos, mas sabemos que estes processos estão envolvidos na atração de predadores generalistas, como vespas sociais, que utilizam pista química na localização de sua presa.

Os insetos de uma maneira geral, utilizam uma variedade de sinais que estão envolvidos no processo de comunicação, porém as substâncias químicas emitidas pelas plantas são as principais responsáveis pelo seu comportamento reprodutivo, localização e seleção do hospedeiro, que no caso de insetos sociais, envolve ainda a organização da colônia a predação e a capacidade de retornar ao ninho como uns dos seus comportamentos mais complexos. Segundo LIMA & PREZOTO (2003) a atividade forrageadora dos insetos sociais é considerado um dos seus comportamentos mais complexos. Em 2006, PREZOTO *et al.* observou que, 90 a 95% das presas capturadas por vespas sociais são lepidópteros, tal pesquisa, qualifica estes predadores a atuar de forma decisiva no equilíbrio trófico das comunidades como predadoras de pragas agrícolas de maneira sustentável.

Desta forma, objetivou-se avaliar a resposta olfativa da vespa social *P. fastidiosuscula* aos voláteis liberados por lagartas *S. frugiperda*, por plantas de milho, por plantas de milho induzidas com lagartas *Spodoptera frugiperda* e para plantas de milho injúrias mecânicas e/ou tratadas com regurgito de lagartas ou água.

## 4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.2.1. Obtenção de Plantas e Insetos

Sementes de milho (*Zea mays* L.) foram individualmente semeadas em copos plásticos de 200 ml contendo solo, e mantidas em casa de vegetação, sob condições naturais, na

Embrapa Gado de Leite. Quando as plantas atingiram em média de 28 cm de altura e 16 dias de idade as plantas foram utilizadas nos bioensaios.



Fotografia 2. Plantas de milho (*Zea mays* L.) em desenvolvimento

A criação de lagartas de *S. frugiperda* foi estabelecida a partir de criação pré-existente no Laboratório de Entomologia – Embrapa Gado de Leite – onde foram mantidas individualizadas em potes plásticos (3 cm de diâmetro x 8 cm de altura) contendo dieta artificial adaptada de Parra (2001). Foi utilizadas lagartas de terceiro a quarto instar na indução das plantas e na coleta de regurgito.



Fotografia 3. Criação de *Spodoptera frugiperda*

As vespas foram coletadas em duas colônias de *Polybia fastidiosuscula* pré-existent no campus da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil e no Parque da Lajinha, Juiz de Fora, MG, Brasil. A captura foi realizada com uma rede entomológica no momento em que as vespas retornavam do forrageio para a colônia. Após a captura, as vespas foram transferidas para o Laboratório de Entomologia – Embrapa Gado de Leite, onde foram individualizadas em potes plásticos (3 cm de



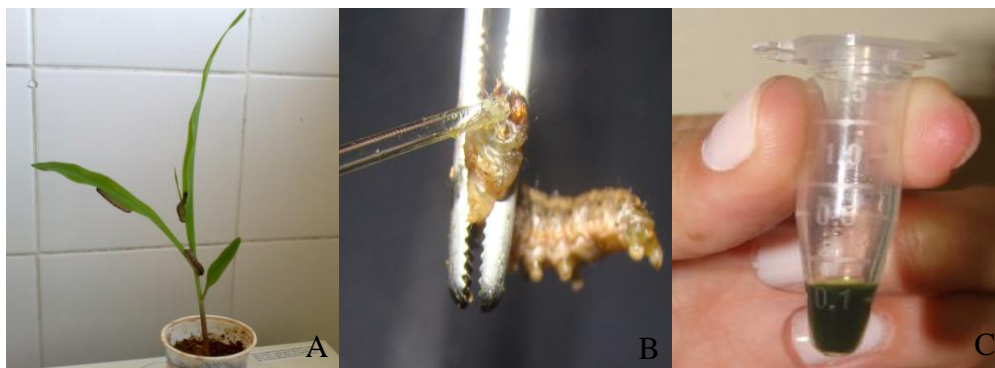
diâmetro x 8 cm de altura) e mantidas por uma hora, para aclimatação, antes do início dos testes de olfatometria.



Fotografia 4. A) Colônia de *Polybia fastidiosuscula*. B) Vespas *Polybia fastidiosuscula* armazenadas.

#### 4.2.2. Coleta do regurgito

Para a coleta do regurgito de *S. frugiperda* foi utilizado lagartas de terceiro a quarto instar mantidas em plantas de milho por 24 horas. Após este período, as lagartas foram colocadas sobre uma placa de petri, onde foi pressionando a região da sua cabeça com um fórceps para a retirada do regurgito. A partir de então, o regurgito foi succionado com uma pipeta Pasteur em vidro (230mm, 2.0 ml) conectada a um septo de silicone ligado a uma bomba de vácuo (TURLINGS *et al.*, 1993). Após a sucção o regurgito foi transferido para um tubo de Eppendorf® de 1.5 ml para posterior utilização nas plantas.



Fotografia 5. A) Lagartas *Spodoptera frugiperda* sobre a planta de milho. B) Coleta do regurgito de *Spodoptera frugiperda*. C) Regurgito de *Spodoptera frugiperda*.

#### 4.2.3. Indução das plantas de milho

A indução das plantas de milho foi realizada de cinco maneiras:

1 – As plantas de milho foram induzidas continuamente com lagartas *S. frugiperda* e os bioensaios foram realizados durante 1-2 h, 5-6h e 24-25h de indução.



Fotografia 6. Planta de milho com lagartas *Spodoptera frugiperda*

2 – As plantas de milho foram induzidas durante 1 hora com lagartas *S. frugiperda* e os bioensaios foram realizados após 5-6h e 24-25h.



Fotografia 7. Planta de milho com lagartas *Spodoptera frugiperda*

3 - Plantas de milho injuriadas mecanicamente com tesoura, cortando 25% de cada folha completamente expandidas da planta (3 folhas) no sentido da parte apical para a base. Após 1-2h, 5-6h e 24-25h da injúria mecânica foram realizados os bioensaios.



Fotografia 8. Injúria mecânica na planta de milho

4 - Plantas de milho foram injuriadas mecanicamente (item 3) e induzidas com o regurgito da lagarta *S. frugiperda* ou água (controle) aplicando-se 10 µl do regurgito ou água sobre as partes injuriadas. Os bioensaios foram realizados após 5-6h e 24-25h da indução.



Fotografia 9. Aplicação do regurgito de *Spodoptera. frugiperda* sobre a planta de milho

5 - Foi aplicado 10  $\mu\text{l}$  do regurgito de *S. frugiperda* ou água (controle) sobre as 3 folhas completamente expandidas das plantas de milho sem injúria. Os bioensaios foram realizados após 5-6h de indução.



Fotografia 10. Indução da planta de milho com regurgito de *Spodoptera frugiperda*

#### 4.2.4. Bioensaios de olfatometria

Os bioensaios de olfatometria foram realizados no Laboratório de Entomologia da Embrapa Gado de Leite, utilizado um olfatômetro em Y, que operou com um fluxo de ar contínuo de 1,0 L/min., previamente umidificado, filtrado com carvão ativado e calibrado através de um fluxômetro. Cada braço do olfatômetro foi conectado por mangueira de silicone á duas câmaras de vidro (30 cm de altura x 8 cm de largura) contendo as fontes de odores, sendo que cada braço continha um tratamento.



Fotografia 11. A) Olfatômetro em Y. B) Filtro com carvão ativado e água. C) Fluxômetro

Foram realizadas duas séries de bioensaios para verificar a resposta comportamental da vespa social *P. fastidiosuscula* aos voláteis de lagartas *S. frugiperda*, plantas de milho induzidas ou não pela lagarta. Na primeira foi testado: (i) ar versus ar; (ii) planta de milho sem injúria versus ar; (iii) três lagarta versus ar; (iv) planta de milho sem injúria versus planta de milho induzida continuamente com lagartas e testadas durante 1-2 horas; 5-6 horas e 24-25 horas da indução; iv) planta de milho sem injúria versus planta induzida com lagartas durante 1h e testados após 5-6 horas e 24-25 horas (Gráfico 1).

Na segunda série foi testado: (i) planta de milho sem indução versus planta de milho com injúria mecânica em intervalos de 1-2horas, 5-6horas, 24-25horas; (ii) planta de milho com injúria mecânica mais regurgito versus planta de milho com injúria mecânica mais água nos intervalos de 5-6 horas e 24-25 horas; (iii) planta de milho sem indução com regurgito de lagarta versus planta de milho sem indução com água em intervalo de 5-6 horas (Figura 2). As plantas induzidas no intervalo de 1-2 horas não foram testadas na segunda série de bioensaio, devido não ter sido significativamente atraídas pelas vespas na primeira série de bioensaio.

Para cada tratamento foram testadas no mínimo 40 vespas *P. fastidiosuscula*, sendo que para todos os bioensaios, cada indivíduo foi testado uma única vez e considerado como uma repetição. A resposta foi registrada quando o inseto caminhava contra o fluxo de ar e chegava ao fim de um dos braços que continha a fonte de odor no tempo máximo de 10min, e como não resposta quando a vespa permanecia parada e não caminhava contra o fluxo de ar até o final de um dos braços que continha a fonte de odor. A posição dos braços do olfatômetro foi invertida a cada vespa testada para evitar qualquer interferência externa. E a cada 5 vespas testadas o olfatômetro foi limpo com álcool etílico 96 GL e mantido em estufa a 50°C por 10 mim. E a cada 10 vespas testadas, as fontes de odores eram trocadas. Todos os testes de olfatometria foram realizados entre 10:00 e 16:00 horas, horário de maior atividade das vespas (PREZOTO *et al.*, 2006).

Os dados da resposta dos insetos foram analisados utilizando-se o teste Qui-quadrado no programa BioEstat (AYRES *et al.* 2003). Os insetos que não escolheram nenhum dos braços foram excluídos da análise estatística.

#### 4.2.5. Aeração dos voláteis das plantas de milho

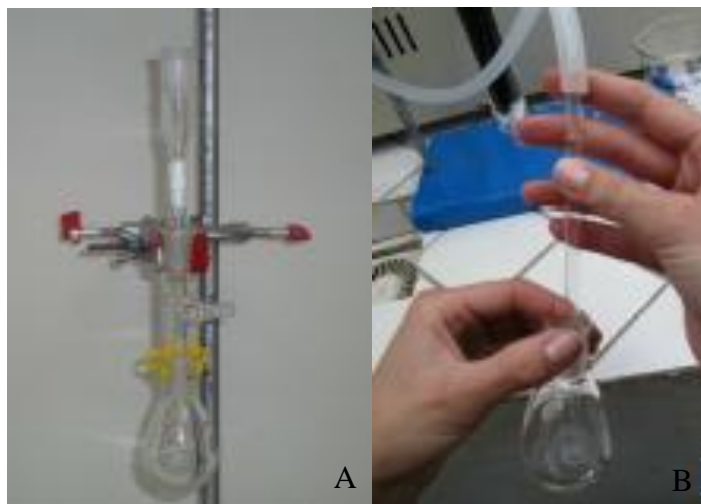
A coleta dos voláteis foi realizada por meio da técnica de aeração no Laboratório de Entomologia da Embrapa Gado de Leite. Foram coletado extratos de: (i) plantas de milho induzidas continuamente com lagartas *S. frugiperda*; (ii) plantas de milho induzidas com lagartas *S. frugiperda* por 1 hora; (iii) planta de milho injuriada mecanicamente tratadas com regurgito de lagartas. Para todos os tratamentos, os voláteis liberados pelas plantas forma coletados após 5-6h da indução.

Para realização da técnica de aeração os copos plásticos (200 ml) contendo as plantas de milho foram envolvidos com papel alumínio e fechados até a altura do caule, evitando assim a contaminação com voláteis provenientes do substrato onde as plantas cresceram (solo adubado) ou de outros organismos (bactérias, fungos, etc.). A partir de então as plantas de milho foram colocadas isoladamente em uma câmara de vidro (42 cm de altura x 16 cm de largura) adaptada para aeração onde um fluxo de ar contínuo de 1,0 L/min., previamente umidificado e filtrado com carvão ativado e calibrado através de um fluxômetro atravessou a câmara carregando todos os voláteis liberados pela planta que ficaram retidos em uma coluna de vidro (11 cm comprimento x 1 cm diâmetro) contendo 0,8 g de polímero adsorvente (Super Q), conforme descrito por ZARBIN *et al.* (2001).



Fotografia 12. Câmara de vidro adaptada para aeração

O período da aeração foi de 3 horas. Período usado para realização dos testes de olfatometria (item 3.1.4.). Após esse período de coleta, foi feita a dessorção dos compostos utilizando 4 ml de hexano (J.T. Baker® - 95% n-hexane) destilado. O extrato foi concentrado em frascos de vidro estéril (vials - 1.5 ml) por meio do N<sub>2</sub> (pureza 99, 99%) para 100 µl e acondicionado em freezer (-25°C) para posteriores uso nos bioensaios.



Fotografia 13. A) Dessorção dos voláteis com hexano. B) Concentração dos extratos com nitrogênio.

#### 4.2.6. Bioensaios de olfatometria com os extratos das plantas de milho

A resposta comportamental das vespas para os extratos das plantas de milho induzida foi realizado utilizando um olfatômetro em Y e como fonte de odor um pedaço de papel filtro (3cm x 2 cm) impregnado com 10 µl de extrato de planta ou hexano (controle) que foi colocado na base de cada braço do olfatômetro, sendo que cada braço continha um odor. Foram conduzidos três bioensaios: (i) extrato de plantas de milho induzidas continuamente com lagartas versus hexano; (ii) extrato de plantas de milho induzidas durante 1 hora com lagartas versus hexano; (iii) extrato de planta de milho injuriada mecanicamente tratadas com regurgito de lagarta versus hexano.

Para cada tratamento foram testadas no mínimo 60 vespas *P. fastidiosuscula*, sendo que para todos os bioensaios, cada indivíduo foi testado uma única vez e considerado como uma repetição.

Os dados da resposta dos insetos foram analisados utilizando-se o teste Qui-quadrado no programa BioEstat (AYRES *et al.*, 2003). Os insetos que não escolheram nenhum dos braços foram excluídos da análise estatística.

### 4.3. RESULTADOS

As vespas sociais não tiveram preferência significativa quando ofertou-se, isoladamente i) ar ( $\chi^2 = 0,906$ ; g.l = 1; p = 0,3942); ii) planta ( $\chi^2 = 0,049$ ; g.l = 1; p = 0,9029) ou iii) lagartas ( $\chi^2 = 2,25$ ; g.l = 1; p = 0,1615) versus ar. No entanto, 68,97% das vespas preferiram plantas induzidas continuamente com lagartas *S. frugiperda* e testadas após 5-6 horas de indução ( $\chi^2 = 13,904$ ; g.l = 1; P = 0,0003), 63,16% preferiram plantas induzidas continuamente com lagartas *S. frugiperda* e testadas após 24-25 horas ( $\chi^2 = 6,927$ ; g.l = 1; p = 0,0113), quando comparadas com plantas sem injúria. O mesmo não foi observado quando as plantas foram induzidas continuamente por lagartas *S. frugiperda* e testadas após 1-2 horas ( $\chi^2 = 0,476$ ; g.l = 1; p = 0,5552). A atratividade das vespas ainda foi observada quando foram ofertadas plantas de milho induzidas com *S. frugiperda* por 1 hora e testadas após 5-6 horas de indução ( $\chi^2 = 11,116$ ; g.l = 1; P = 0,0012) ou após 24-25 horas de indução ( $\chi^2 = 6,927$ ; g.l = 1; P = 0,0113) quando comparadas com a planta de milho sem injúria (Gráfico 1).



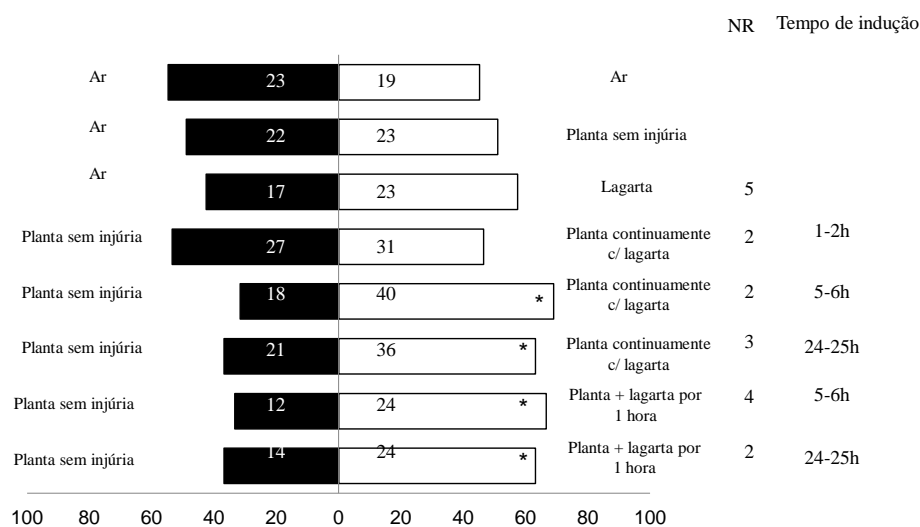


Figura 1. Resposta olfativa da vespa *P. fastidiosuscula* em olfatômetro em y para voláteis de milho submetido a diferentes tratamentos: i) ar ii) planta de milho sem injúria; (iii) lagartas *S. frugiperda*; iv) planta de milho induzidas continuamente com lagarta *S. frugiperda* (Planta + lagarta) e testadas em intervalos de 1-2horas; 5-6horas e 24-25horas; v) planta de milho com lagartas *S. frugiperda* por 1 hora e testadas em intervalos de tempos de 5-6horas e 24-25horas. \*Diferenças significativas, Teste Qui-quadrado,  $P < 0,05$ .

As vespas *P. fastidiosuscula*, não foram atraídas para as plantas injuriadas mecanicamente em intervalos de 1-2 horas ( $\chi^2 = 0,828$ ; g.l = 1;  $P = 0,4179$ ); 5-6 horas ( $\chi^2 = 0,828$ ; g.l = 1;  $P = 0,4179$ ) e 24-25 horas ( $\chi^2 = 0,031$ ; g.l = 1;  $P = 0,9394$ ) versus plantas sem indução. No entanto, as vespas preferiram plantas de milho injuriadas mecanicamente tratadas com regurgito de *S. frugiperda* após 5-6 horas ( $\chi^2 = 32,65$ ; g.l = 1;  $P = 0,0001$ ) ou após 24 – 25 horas ( $\chi^2 = 4,937$ ; g.l = 1;  $P = 0,0338$ ) de indução quando comparado com planta de milho injuriada mecanicamente tratadas com água. No entanto, as vespas não mostraram preferência quando foram ofertadas plantas de milho sem injúrias tratadas com o regurgito das lagartas em intervalos de tempo de 5-6 horas comparado com plantas sem injúria tratada com água ( $\chi^2 = 0,593$ ; g.l = 1;  $p = 0,5029$ ) (Gráfico 2).

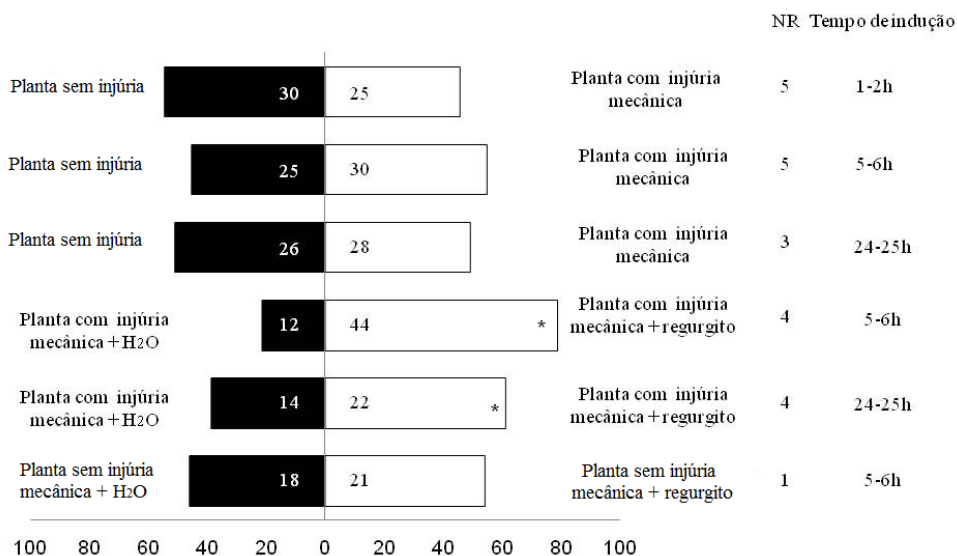


Figura 2. Resposta olfativa da vespa *P. fastidiosuscula* em olfatômetro em y para voláteis de milho submetido a diferentes tratamentos: i) plantas de milho injúrias mecanicamente em intervalos de tempo de 1-2horas, 5-6horas e 24-25horas; ii) plantas de milho com injúria mecânica tratadas com água ; iii) planta de milho com injúria mecânica tratadas com regurgito de *S. frugiperda* em intervalos de 5-6horas e 24-25horas; iv) planta de milho sem injúria tratadas com água; v) planta de milho sem injúria tratadas regurgito de *S. frugiperda* em intervalos de tempo de 5-6horas. \*Diferenças significativas, Teste Qui-quadrado,  $P < 0,05$ .

Quando foram ofertados extratos de plantas de milho em intervalos de 5-6 horas, 75,44% das vespas mostraram preferência significativa para extratos de plantas de milho induzidas continuamente com lagartas ( $\chi^2 = 25,888$ ; g.l = 1;  $p = 0,0001$ ); 75% à extratos de plantas de milho induzidas com lagartas por 1 hora ( $\chi^2 = 25,00$ ); g.l = 1;  $p = 0,0001$ ) e 83,33% das vespas preferiram extratos de plantas de milho injuriada mecanicamente tratadas com regurgito de lagartas ( $\chi^2 = 44,436$ ; g.l = 1;  $p = 0,0001$ ) quando comparados com hexano (Gráfico 3).

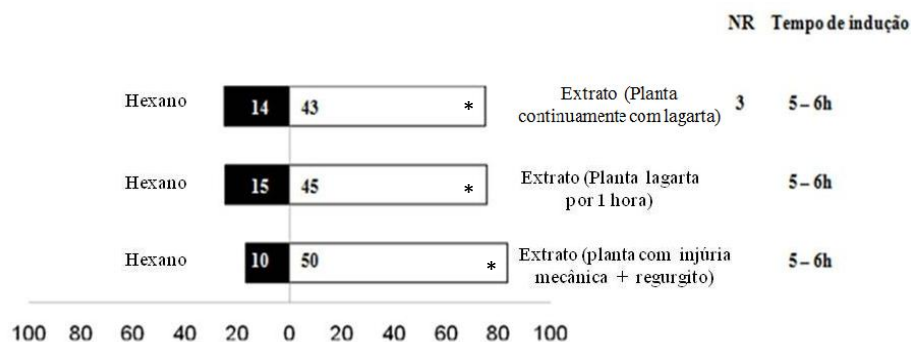


Figura 3. Resposta olfativa da vespa *P. fastidiosuscula* em olfatômetro em y para hexano (controle) ou para extratos de milho submetido a diferentes tratamentos: i) planta de milho induzidas continuamente com lagarta *S. frugiperda*; ii) planta de milho com a presença de lagartas *S. frugiperda* por 1 hora; iii) planta de milho com injúria mecânica tratadas com regurgito de *S. frugiperda* em intervalos de tempos de 5-6horas. \*Diferenças significativas, Teste Qui-quadrado,  $P < 0,05$ .

#### 4.4. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de novas técnicas para o manejo eficiente no controle da lagarta *S. frugiperda* requer a criação de inovações e tecnologias menos agressivas ao meio ambiente e à saúde humana, o que torna fundamental o estudo mais aprofundado sobre as interações presentes na natureza. Ao longo do período evolutivo as plantas desenvolveram um amplo espectro de estratégias para defender-se contra herbívoros (TURLINGS *et al.*, 1998; KNUDSEN *et al.*, 2006); Estudos têm demonstrado que a produção dos voláteis de planta está ligada com o mecanismo de defesa indireta, o qual têm a função de atrair os inimigos naturais antes mesmo dos herbívoros causarem injúrias à planta (DICKE & SABELIS 1988; TURLINGS *et al.*, 1995).

Esta pressão seletiva exercida pelo herbívoro sobre a planta ainda provocam uma série de processos que resultam na mudança dos perfis dos COVs (HARE, 2011). Apesar de muitos destes mecanismos ainda serem desconhecidos, sabemos que estes

processos estão envolvidos na atração de predadores generalistas, como evidenciado neste estudo, onde tanto as plantas injuriadas por herbívoros, quanto as plantas injuriadas mecanicamente tratadas com regurgito de lagarta no local da injúria, provavelmente foram capazes de produzir e liberar compostos químicos específicos que são atrativos para a vespa social *Polybia fastidiosuscula*.

Neste estudo, observamos que a vespa *P. fastidiosuscula* consegue diferenciar misturas de compostos, havendo maior preferência para plantas induzidas por lagartas e por seu regurgito do que planta sem injúria ou lagartas sozinhas. O que justifica dizer que as vespas, parecem ter a capacidade de utilizar odores específicos que possa orientá-las de forma confiável para a planta hospedeira em um ambiente particular; e provavelmente todas as misturas de odores liberados por uma planta hospedeira pode servir como um sinal.

Os VFVs são substâncias químicas emitidas pelas plantas rapidamente após uma injúria inicial, contendo compostos, tais como, (*Z*)-3-hexenal, (*E*)-2-hexenal, (*Z*)-3-hexen-1-ol, (*E*)-2-hexen-1-ol, e (*Z*)-3-acetato de hexenila, (PARÉ & TUMLINSON, 1996;1997). No presente estudos foi observado que a provável causa da não preferência das vespas sociais para plantas de milho induzidas por lagartas no intervalo de 1-2 horas, provavelmente deve-se ao fato de que neste período de injúria inicial as plantas de milho estariam emitindo VFVs e que o tempo de resposta da vespa social pode depender da resposta da planta hospedeira.

Estudos com *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (*Lepidoptera*: Noctuidae) mostraram que o tempo de resposta de emissão máxima de voláteis pelas plantas de milho é variável entre as cultivares, sendo no mínimo 10 h e no máximo 16 horas após o tratamento com o regurgito da lagarta (TURLINGS *et al.* 1998), e que em 5 horas após este indução, as plantas de milho emitem grandes quantidades de voláteis induzidos (TURLINGS *et al.*, 1998). Neste contexto, nossos resultados corroboram com o conceito proposto por TURLINGS *et al.* (1998), visto que, após 5 horas de indução, as plantas de milho provavelmente emitiram grandes quantidades de voláteis induzidos que tornaram-se altamente atrativos para as vespas devido o fato de que algumas horas após este ataque, os voláteis são sintetizados lentamente pela indução e começam a ser liberados durante hora, constituindo-se majoritariamente de monoterpenos, sesquiterpenos e homoterpenos, sendo que os mais comuns em cultivares de milho são (*E*)- $\beta$ -ocimeno, linalol, (*E*)- $\beta$ -farneseno e (*E*)- $\alpha$ -bergamoteno (TURLINGS *et al.*, 1998; HOBALLAH &

TURLINGS, 2005), Observamos que após o período de 5-6 horas de indução os principais compostos continuaram sendo emitindo em quantidades significativas para a atração dos inimigos naturais, visto que as vespas sociais detectaram sua presença mesmo após 24-25 horas de indução contínua com herbívoros ou quando as plantas foram induzidas com lagartas por apenas 1 hora e testadas após 24-25 horas, evidenciando que mesmo sem a presença do herbívoro, a planta de milho emitiu compostos atrativos às vespas sociais. Nossos resultados divergem do proposto por Dicke & Sabelis (1988), onde os autores destacam que a utilização de defesa química pelas plantas tem um custo energético e não havendo mais a presença do herbívoro, não se justifica continuarem liberando voláteis para a atração dos predadores, ou seja, gastando energia com a produção, transporte, estocagem, prevenção de auto-intoxicação e liberação dessas substâncias, que necessitam ser renovadas mais rapidamente do que os compostos não voláteis.

Turlings & Tumlinson (1992), ainda sugerem que geralmente após 24 horas de indução com herbívoros não são mais detectadas quantidades significativas de voláteis, o que não se aplica em nossos resultados, pois as vespas sociais *P. fastidiosuscula* detectaram a presença de compostos químicos mesmo após 24-25 horas de indução com lagartas *S. frugiperda*, entretanto, sabemos que a capacidade de produção e liberação dos compostos voláteis pode depender da variação entre os cultivares, dos níveis de adubação além de fatores abióticos, tais como, temperatura, luz, humidade além da detecção do inseto.

Segundo Vet & Dicke (1992), os compostos químicos atrativos para insetos somente são liberadas após a injúria provocada pelo herbívoro, no entanto nos observamos que o regurgito aplicado a ferida da planta induz as mesmas a produzir misturas de compostos que são atrativos para as vespas sociais. Estes compostos mostrando-se importante no processo de emissão dos voláteis atrativos aos inimigos naturais quando comparadas com plantas injúria mecanicamente tratadas com água. O mesmo não foi quando plantas sem injúria foram tratadas com regurgito ou água. Nossos resultados corroboram com o proposto por Turlings *et al.*, (1990), que o regurgito de herbívoros induziam resposta nas plantas quando atacadas por insetos, e uma simples injúria mecânica, em muitos casos, não pode imitar a resposta da planta atacada por herbívoro.

Os bioensaios conduzidos com extratos de plantas de milho com lagartas por 1 hora, planta de milho induzidas continuamente com lagartas e extratos de plantas de milho injuriadas mecanicamente tratadas com o regurgito mostraram-se atrativos para as vespas *P. fastidiosuscula* provavelmente porque também continhas os principais isoprenóides que foram atrativos.

Neste estudo, verifica-se que a capacidade de busca vespas *P. fastidiosuscula* encontra-se diretamente associada aos sinomônios presentes na planta induzidas com *S. frugiperda* ou seu regurgito associado à injúria mecânica. Portanto, podemos concluir que as vespas *P. fastidiosuscula* utilizam pistas químicas provenientes do complexo (planta-lagarta) para a localização de sua presa, e neste contexto podemos evidenciar a importância dos compostos químicos presentes na comunicação interespecífica, possibilitando que o estudo químico de substâncias voláteis, aliada as observações do comportamento do inseto, um melhor entendimento sobre a comunicação entre inseto-planta.

Este é o primeiro estudo que evidencia a capacidade das vespas sociais em utilizar os voláteis de plantas para orientá-las de forma confiável para uma planta hospedeira, o que justifica o estudo mais aprofundado destes insetos e sua possível utilização como controladores de pragas agrícolas. Portanto, a continuação destes estudos se faz necessário para que se possam elucidar os compostos químicos presentes nos extratos das plantas de milho que foram responsáveis pela atração das vespas *P. fastidiosuscula*, e assim, uma possível utilização desses compostos para sua atração em campo.

#### 4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, A.A. Specificity of induced resistance in wild radish: causes e consequences for two specialist and two generalist caterpillars. **Oikos**, v.89, p.493-500, 2000.

AGRAWAL, A.A. & KARBAN, R. (1999) Why induced defenses may be favored over constitutive strategies in plants. **The Ecology and Evolution of Inducible Defenses** (eds R.Tollrian & C.D.Harvell). pp. 45–61, Princeton University Press, Princeton.

AUAD A.M.; FONSECA, M.G.; MONTEIRO, P.H.; RESENDE T.T.; SANTOS. D.R. Aspects of the biology of the lady beetle *Diomus seminulus* (Coleoptera: Coccinellidae): A potential biocontrol agent against the yellow sugarcane aphid in Brazil. **Annals of the Entomological Society of America**, v.106, p. 243-248, 2013.

AYRES, M.; AYRES, JR.; AYRES, M.D.L.; SANTOS, A.S. BioEstat 3.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém, Sociedade Civil de Mamirauá. 2003.

COLEY, D.; BARONE, J.A. Herbivory and plant defenses in tropical forests. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.27 p.305–35, 1996

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

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

DICKE, M.; VET, L.E.M. Plant-carnivore interactions: evolutionary and ecological consequences for plant, herbivore and carnivore. In: Olf, H., Brown, V.K., Drent, R.H.. **Herbivores: Between Plants and Predators**. Blackwell Science, Oxford, UK. p.483–520, 1999.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**, v135, p.1893–1902, 2004.

GULLAN, P.J.; CRANSTON, P.S. **Os Insetos: Um resumo de Entomologia**. 3a. ed. Roca, São Paulo, p.456, 2009.

HARE, J.D. Ecological role of volatiles produced by plants in response to damage by herbivorous insects. **Annual Review of Entomology**, v.56, p.161–18, 2011.

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

HOWE, G.A.; JANDER, G. Plant immunity to insect herbivores. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p.41-66, 2008.

KARBAN, R.; BALDWIN, I.T. **Induced Responses to Herbivory**. University of Chicago Press, Chicago. 1997.

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

KNUDSEN, J.T.; ERIKSSON, R.; GERSHENZON, J.; STAHL, B. Diversity and distribution of floral scent. **Botanical Review**, v.72, p.1 – 120, 2006.

KOST, C.; HEIL, M. Increased availability of extra floral nectar reduces herbivory in Lima bean plants (*Phaseolus lunatus*, Fabaceae). **Basic and Applied Ecology**, v.6, p.237–248, 2005.



LIMA, M. A. P.; PREZOTO, F. Foraging activity rhythm in the neotropical swarm-founding wasp *Polybia platycephala sylvestris* Richards, 1978 (Hymenoptera: Vespidae) in different seasons of the year. **Sociobiology**, v.42, p. 645–752, 2003.

NAGOSHI, R.N.; SILVIE, P.; MEAGHER, R.L. Comparison of haplotype frequencies differentiate fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) corn-strain populations from Florida and Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v.100, p.954-961. Noctuidae). *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.1 (3), p.1-11, 2007.

PARÉ, P.W.; TUMLINSON, J.H. Volatile signals in response to herbivore feeding. **Florida Entomologist**, v.79, p.93-103, 1996.

PARÉ, P.W.; TUMLINSON, J.H.. Induced synthesis of plant volatiles. **Nature**, v.385, p.30-31, 1997.

PAREJA, M.; MORAES, M. C. B.; Clark, S. J. M.; BIRKETT, A.; POWELL, W. Response of the aphid parasitoid *Aphidius funebris* to volatiles from undamaged and aphid-infested *Centaurea nigra*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 33, p. 695-710, 2007.

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

PICHERSKY E, NOEL JP, DUDAREVA N. **Science**, v.311, p.808–811, 2006.

PREZOTO, F.; SANTOS-PREZOTO, H.H.; MACHADO, V.L.L.; ZANUNCIO, J.C. Prey captured and used in *Polistes versicolor* (Olivier) (Hymenoptera: Vespidae) Nourishment. **Neotropical Entomology**, v.35, p.707–709, 2006.

SÁ, V.G.M.; FONSECA, B.V.C.; BOREGAS, K.G.B.; WAQUIL, J.M Sobrevivência e desenvolvimento larval de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera:Noctuidae) em Hospedeiros Alternativos. **Neotropical Entomology**, v.38(1), p.108-115, 2009.

TURLINGS, T.C.J.; TUMLINSON, J.H. Systemic release of chemical signals by herbivore-injured corn. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.89, p.8399–8402, 1992.

TURLINGS, T. C. J.; TUMLINSON, J. H.; LEWIS, W. J. Exploitation of herbivore - induced plant odors by host seeking parasitic wasps. **Science**, v. 250, p.1251-1253, 1990.

TURLINGS, T.C.J.; ALBORN, H.T.; MCCALL, P.J.; TUMLINSON, J.H. An elicitor in caterpillar oral secretions that induces corn seedlings to emit volatiles attractive to parasitic wasps. **Journal of Chemical Ecology**, v.19, p.411-425, 1993.

TURLINGS, T.C.J.; LOUGHRIN, J.H.; RÖSE, U.S.R.; MCCALL, P.J.; LEWIS, W.J.; TUMLINSON, J.H. How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.9, p.4169-4174, 1995.

TURLINGS, T.J.C.; LENGWILER, U.B.; BERNASCONI, M.L.; WECHSLER, D.. Timing of induced volatile emissions in maize seedlings. **Planta**, v. 207(1), p.146-152, 1998.

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

WAQUIL, J.M.; VILELLA, F.M.F.; FOSTER, J.E. Resistência do milho (*Zea mays* L.) transgênico (Bt.) à lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidóptera:Noctuidae). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.1(3), p.1-11, 2002.

XIAO, Y.; WANG, Q. M.; ERB, T.C.J.; TURLINGS, L.; GE, J.; HU, J.; LI, X.; HAN, T.; ZHANG, J.; LU, G.; ZHANG, L. Y. Specific herbivore-induced volatiles defend plants and determine insect community composition in the field. **Ecology Letters**, v.15, p.1130-1139, 2012.

ZARBIN, P.H.G. **Extração, isolamento e identificação de substâncias voláteis de insetos**, p.45-50. 2001. In: Feromônio de Insetos: Biologia, Química e Emprego no manejo de Pragas 2nd Ed. Ed by Vilela, E.F., Della-Lucia, M.C, Holos, Ribeirão Preto.

## 5. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS EMITIDOS PELAS PLANTAS DE MILHO (*Zea mays* L)

### RESUMO

Os voláteis de plantas estão envolvidos no comportamento de muitos insetos. Este estudo buscou quantificar os extratos de plantas de milho sem indução, plantas induzidas por 1 hora com lagartas *S. frugiperda*, plantas induzidas continuamente com lagartas *S. frugiperda* ou plantas injuriadas mecanicamente tratadas com regurgito de lagarta por cromatografia gasosa acoplada a detecção por ionização de chamas (CG-DIC) e analisados por cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM) utilizando o gás hélio como gás de arraste. Os dados foram coletados e avaliados com o software ChemStation. A identificação dos compostos dos extratos das plantas de milho foi feita por comparação dos tempos de retenção no CG-DIC com os dos padrões usando coluna apolares e cálculo do índice de Kovats. A Análise de Componentes Principais (ACP) mostrou que os dois primeiros componentes da análise da ACP explicam 68% da variabilidade dos dados e que os compostos responsáveis pela diferença entre os tratamentos foram o  $\alpha$ -pineno, (Z)-3-acetato de hexenila, (Z)- $\beta$ -ocimeno, DMNT, indol,  $\beta$ -farneseno e TMTT.

Palavras-chave: Compostos orgânicos voláteis, interação tritrófica, defesa indireta, controle biológico.

## 5.1. INTRODUÇÃO

Os voláteis de plantas são conhecidos por desempenhar papel importante nas interações entre plantas, herbívoros e inimigos naturais (ARIMURA *et al.*, 2005). Estes compostos podem variar quantitativamente (incremento dos mesmos compostos) ou qualitativamente (indução de compostos novos), comparada com aqueles emitidos por plantas saudáveis, injuriada mecanicamente (DICKE, 1999) ou de plantas atacadas por herbívoros ou tratadas com seu regurgito. A emissão de compostos voláteis induzidos pelo herbívoro não é restrita apenas ao local danificado por ele; mas ocorre também nos tecidos não danificados das plantas, caracterizando uma indução sistêmica, que fornece maior proteção para as plantas (DICKE, 1999; TURLINGS *et al.*, 1998; MORAES *et al.*, 2008).

O chamado perfil de voláteis induzidos ocorre quando há síntese de ácido jasmônico, que provoca mudança nos níveis de terpenóides (rota dos isoprenóides), e conseqüentemente a ativação gênica, que é extremamente importante para a atração de predadores, por alterar o odor característico das plantas (DICKE & VET, 1999; DUDAREVA *et al.*, 2004). Os compostos orgânicos voláteis (COVs) começam a ser sintetizados e liberados continuamente durante horas pela planta, constituindo-se majoritariamente de monoterpenos, sesquiterpenos e homoterpenos, sendo que os mais comuns em cultivares de milho são (*E*)- $\beta$ -ocimeno, linalol, (*E*)- $\beta$ -farneseno e (*E*)- $\alpha$ -bergamoteno (TURLINGS *et al.*, 1998), além do (*E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (DMNT) e (*E,E*)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno (TMTT) (TURLINGS & TON, 2006). Este processo de produção e emissão pode demorar entre algumas horas ou até dias, dependendo da espécie da planta e do herbívoro causador da injúria (HOLOPAINEN, 2004). Após a indução pela herbivoria, muitos compostos voláteis emitidos constitutivamente podem aumentar ou diminuir. Neste caso, os voláteis emitidos são aqueles já armazenados anteriormente na planta (RÖSE *et al.*, 1996).

Em 2005, Hoballah & Turlings demonstraram que não basta a presença dos voláteis induzidos para obter uma atração do inimigo natural; é preciso também a presença dos voláteis de folhas verdes (VFs) que são formados após uma injúria inicial, constituídos principalmente por aldeídos, álcoois e seus ésteres através da enzima lipoxigenase (LOX) e terpenóides.

Os VFVs podem constituir mais de 50% da emissão de partes danificadas em algumas espécies de planta (HOLOPAINEN, 2004), enquanto que em tecidos de plantas saudáveis e intactas a quantidade destes compostos é baixa (MATSUI *et al.*, 2006). Na rota de formação dos VFVs, ocorre a liberação de ácidos graxos e o começo da cascata dos jasmonatos, que resulta na síntese de ácidos jasmônicos, um importante hormônio vegetal que ativa a expressão de genes envolvidos na defesa da planta (ARIMURA *et al.*, 2009; D'AURIA *et al.*, 2007). Assim, os voláteis de plantas funcionam de maneira específica, servindo de pistas químicas para predadores e parasitóides na localização de sua presa, uma vez que podem discriminar entre plantas sem injúria ou injuriada por herbívoros (DICKE & VAN LOON, 2000; DICKE, 1999; TURLINGS *et al.*, 1998; MORAES *et al.*, 2008).

A capacidade do predador em utilizar os voláteis de plantas na localização de sua presa e os mecanismos envolvidos nesta interação tem despertado crescente interesse em todo o mundo. Os resultados obtidos no capítulo 1 deste trabalho mostrou que as vespas sociais têm preferência por voláteis de plantas de milho injuriadas por lagartas *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) ou plantas de milho injuriadas mecanicamente e tratadas com regurgito de lagartas do que plantas sem injúrias ou injuriadas mecanicamente e/ou tratadas com água. Neste capítulo buscamos quantificar e qualificar os principais compostos voláteis que estão envolvidos na preferência das vespas por voláteis de plantas de milho induzidas continuamente ou por 1 hora com lagartas *S. frugiperda*, voláteis de plantas de milho injuriadas mecanicamente e tratadas com regurgito de lagartas comparados com os voláteis de plantas sem injúria.

## 5.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1. Obtenção das plantas e insetos

Sementes de milho (*Zea mays* L.) foram individualmente semeadas em copos plásticos de 200 ml contendo solo, e mantidas em casa de vegetação, sob condições naturais, na Embrapa Gado de Leite. Quando as plantas atingiram em média de 28 cm de altura (16 dias) foram utilizadas nos bioensaios para a extração dos voláteis.

A criação de lagartas de *S. frugiperda* foi estabelecida a partir de criação pré-existente no Laboratório de Entomologia – Embrapa Gado de Leite – onde foram mantidas individualizadas em potes plásticos (3 cm de diâmetro x 8 cm de altura) contendo dieta artificial adaptada de Parra (2001). Para a indução das plantas foi utilizado lagartas de terceiro e quarto instar.

#### 5.2.2. Coleta do regurgito

Para a coleta do regurgito de *S. frugiperda* foi utilizado lagartas de terceiro e quarto instar mantidas em plantas de milho por 24 horas. Após este período, as lagartas foram colocadas sobre uma placa de petri, onde foi pressionando a região da sua cabeça com um fórceps para a retirada do regurgito. A partir de então, o regurgito foi succionado com uma pipeta Pasteur em vidro (230 mm, 2.0 ml) conectada a um septo de silicone ligado a uma bomba de vácuo (TURLINGS *et al.*, 1993). Após a sucção o regurgito foi transferido para um tubo de Eppendorf® de 1.5 ml para posterior utilização nas plantas.

#### 5.2.3. Indução das plantas de milho

De acordo com os resultados obtidos no capítulo I deste trabalho foram realizado os seguintes mecanismos de indução: plantas de milho induzidas continuamente ou durante 1 hora com lagartas *S. frugiperda*, sendo que em cada planta foi utilizado três lagartas de terceiro a quarto instar; plantas de milho injuriadas mecanicamente com uma tesoura cortando 25% das três folhas completamente expandidas e tratadas com 10µl do regurgito de *S. frugiperda* sobre a parte ferida.

#### 5.2.4. Aeração dos voláteis

Foram coletados extratos de: (i) plantas de milho sem indução; (ii) plantas de milho induzidas durante 1 hora com lagartas; (iii) plantas de milho induzidas continuamente com lagartas; (IV) planta de milho injuriada mecanicamente tratadas com regurgito de lagarta. Em todos os tratamentos, os voláteis liberados pelas plantas de

milho foram coletados após 5-6 horas da indução por meio da técnica de aeração no Laboratório de Entomologia da Embrapa Gado de Leite.

Para a realização da extração dos compostos químicos das plantas de milho, os copos plásticos (200 ml) contendo as plantas foram envolvidos com papel alumínio e fechados até a altura do caule, evitando assim a contaminação com voláteis provenientes do substrato onde as plantas cresceram (solo adubado) ou de outros organismos (bactérias, fungos, etc.). A partir de então as plantas de milho foram colocadas isoladamente em uma câmara de vidro (42 cm de altura x 16 cm de largura) adaptada para aeração onde um fluxo de ar contínuo de 1,0 L/min., previamente umidificado e filtrado com carvão ativado e calibrado através de um fluxômetro atravessou a câmara carregando todos os voláteis liberados pela planta que ficaram retidos em uma coluna de vidro (11 cm comprimento x 1 cm diâmetro) contendo 0,8 g de polímero adsorvente (Super Q), conforme descrito por Zarbin *et al.* (2001).

O período da aeração das plantas foi de 3 horas. Período usado para realização dos bioensaios de olfatométrica descritos no capítulo I. Após esse período de coleta, foi feita a dessorção dos compostos utilizando 4 ml de hexano (J.T. Baker® - 95% n-hexane) destilado. O extrato foi concentrado em frascos de vidro estéril (vials - 1.5 ml) por meio do N<sub>2</sub> (pureza 99, 999%) para 50 µl e acondicionado em freezer (- 25°C) para posterior análise dos compostos.

#### 5.2.5. Análise dos compostos voláteis

Os extratos foram quantificados por cromatografia gasosa acoplada a detecção por ionização de chamas (CG-DIC) (CG Agilent 7890A) equipado com uma coluna DB-5MS, 30 m x 0,25 mm, filme de 0,25 µm, (J&W Scientific e; USA) utilizando o programa de temperatura: 50 °C por 1 min, 5 °C/min até 180 °C por 0,1 min, 10 °C/min até 250 °C por 10 min. Um microlitro de cada amostra foi injetado no modo splitless, com injetor a 250°C, Hélio como gás de arraste e o detector de ionização por chama (DIC) a 270 °C. A quantificação foi feita através do método de padrão interno, usando a comparação da área de cada pico com a área do padrão interno. O fator de resposta do detector foi considerado igual 1 para todos os compostos. Foi utilizado como padrão interno o composto tetracosano na concentração final de 0.01 mg/mL.



Extratos selecionados foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), usando um equipamento Agilent 5975C inert XL EI/ CI MSD, triple axis detector, o qual estava diretamente acoplado a um cromatógrafo gasoso Agilent 7890A. O cromatógrafo gasoso foi equipado com uma coluna DB-5, 30 m x 0,25 mm d, 0,25  $\mu$ m, Supelco e análise foi conduzida usando o mesmo programa de temperatura das análises por CC-DIC. Gás hélio foi usado como gás de arraste. A ionização foi feita por impacto de elétrons (70 eV, temperatura da fonte de 270 °C). Um microlitro da amostra foi injetada no modo splitless. Os dados foram coletados e avaliados com o software ChemStation. Identificação dos compostos dos extratos das aerações foi feita por comparação do padrão de fragmentação com dados da biblioteca (Nist e Wiley, 2008) e confirmado através da análise de padrões químicos autênticos. O índice de retenção para cada composto foi calculado para auxiliar na identificação dos compostos.

#### 5.2.6. Análise dos estatística

Os dados não obedeceram nenhuma distribuição disponível no programa R de GLM (Modelo Linear Generalizado) sendo necessário o emprego do teste não paramétrico Kruskal-Wallis, ao nível de significância de 5%, sendo as médias comparadas pelo método de Dunn ( $\alpha=0,05$ ). De forma descritiva foi realizado a análise dos componentes principais (ACP) para mostrar os principais compostos que foram responsáveis pela diferença entre os tratamentos.

### 5.3. RESULTADOS

O total de compostos voláteis emitidos pelas plantas de milho submetidas aos diferentes tratamentos foi  $\alpha$ -pineno, mirceno, (Z)-3-acetato de hexenila, limoneno, (Z)- $\beta$ -ocimeno, linalol, DMNT, mentol, benzotiazol, indol,  $\alpha$ -copaeno, geranyl acetona,  $\beta$ -farneseno e TMTT.

No entanto, a quantidade dos compostos  $\alpha$ -pineno ( $t=11,72$ ,  $gl=3$ ,  $p=0,008$ ); mirceno ( $t=12,22$ ,  $gl=3$ ,  $p=0,006$ ); (Z)-3-acetato de hexenila ( $t=16,31$ ,  $gl=3$ ,  $p=0,0009$ ); limoneno ( $t=7,62$ ,  $gl=3$ ,  $p=0,055$ ); (Z)- $\beta$ -ocimeno ( $t=7,67$ ,  $gl=3$ ,  $p=0,058$ ); linalol ( $t=14,40$ ,  $gl=3$ ,  $p=0,002$ ); (E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (DMNT) ( $t=16,12$ ,  $gl=3$ ,

$p=0.001$ );  $\beta$ -farneseno ( $t=9,69$ ,  $gl=3$ ,  $p=0.021$ ); (*E,E*)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno (TMTT) ( $t=7,16$ ,  $gl=3$ ,  $p=0.067$ ) e indol ( $t=12,01$ ,  $gl=3$ ,  $p=0.007$ ) emitidos pelas plantas de milho foram significativamente diferentes entre os tratamentos (Gráfico 4).

Os compostos  $\alpha$ -copaeno ( $t=5,4$ ,  $gl=3$ ,  $p=0.144$ ); geranyl acetona ( $t=3,45$ ,  $gl=3$ ,  $p=0.326$ ); mentol ( $t=1,99$ ,  $gl=3$ ,  $p=0.573$ ) e benzotiazol ( $t=1,06$ ,  $gl=3$ ,  $p=0.786$ ) não foram estatisticamente diferentes para as plantas de milho submetidas aos diferentes tratamentos (Gráfico 5),

Houve diferença na emissão de dois compostos entre os tratamentos de plantas induzidas com lagartas por 1 hora e plantas induzidas continuamente com lagartas, visto que as plantas com a presença da lagartas por 1 hora emitiram maior quantidade do composto mirceno, do que a planta continuamente com lagartas. Enquanto as plantas com lagartas continuamente emitiram maior quantidade de (*Z*)-3-acetato de hexenila do que as plantas com lagarta por 1 hora.

A quantidade dos compostos  $\alpha$ -pineno; mirceno; (*Z*)-3-acetato de hexenila; limoneno; (*Z*)- $\beta$ -ocimeno; linalol; DMNT;  $\beta$ -farneseno; TMTT e indol foram liberados em maior quantidade nas plantas com a presença de lagarta por 1 hora comparado com plantas injuriadas mecanicamente tratadas com regurgito de lagarta.

A Análise de Componentes Principais (ACP) mostrou que os dois primeiros componentes explicam 68% da variabilidade dos dados e que os compostos responsáveis pela diferença entre os tratamentos com planta sem indução, planta com lagarta por 1 hora, planta continuamente com lagartas ou plantas injuriada mecanicamente tratadas com regurgito de lagarta foram  $\alpha$ -pineno, (*Z*)-3-acetato de hexenila, (*Z*)- $\beta$ -ocimeno, DMNT,  $\beta$ -farneseno e TMTT (Gráfico 6).

Os vetores mostraram-se mais concentrados entre os tratamentos das plantas com a presença de lagarta por 1 hora e planta continuamente com lagartas do que para planta sem injúria e plantas injuriadas mecanicamente tratadas com regurgito de lagarta.

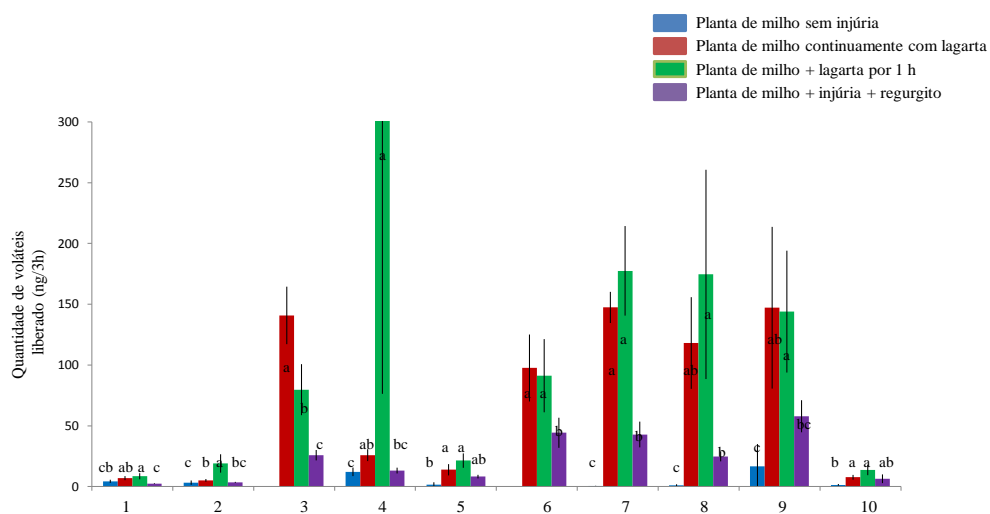


Figura 4. Quantidade dos compostos (1)  $\alpha$ -pineno, (2) mircenol, (3) (Z)-3-acetato de hexenila, (4) limoneno, (5) (Z)  $\beta$ -ocimeno, (6) linalol, (7) DMNT, (8) indol, (9)  $\beta$ -farneseno e (10) TMTT emitidos pelas plantas de milho submetidas a diferentes tratamentos: milho sem injúria, planta de milho com lagarta por 1 hora, planta de milho continuamente com lagartas e planta de milho injuriada mecanicamente tratada com regurgito de lagarta. As letras representam a diferença entre os tratamentos calculado através do índice de Kruskal-Wallis, ao nível de significância 5%, e médias comparadas pelo método de Dunn ( $\alpha=0,05$ ).

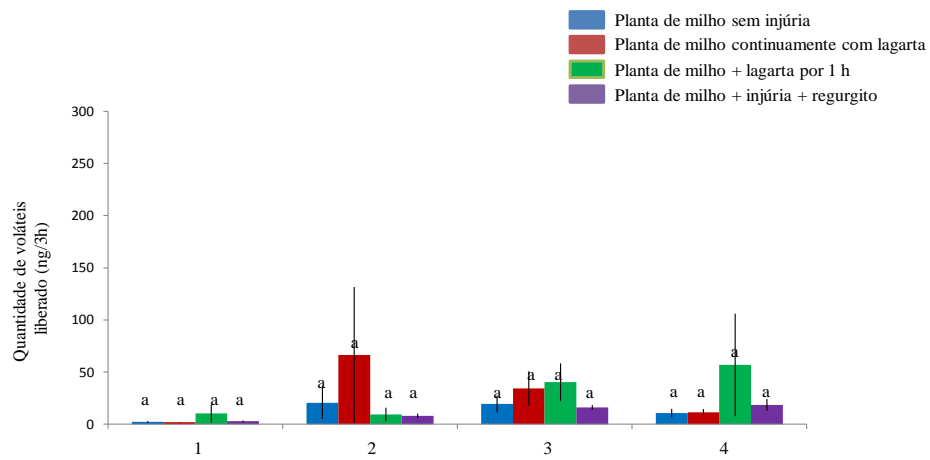


Figura 5. Quantidade dos compostos (1) mentol, (2) benzotiazol, (3)  $\alpha$ -copaeno e (4) geranyl acetona, emitidos pelas plantas de milho submetidas a diferentes tratamentos: milho sem injúria, planta de milho com lagarta por 1 hora, planta de milho continuamente com lagartas e planta de milho injuriada mecanicamente tratada com regurgito de lagarta. As letras representam a diferença entre os tratamentos calculado através do índice de Kruskal-Wallis, ao nível de significância 5%, e médias comparadas pelo método de Dunn ( $\alpha=0,05$ ).

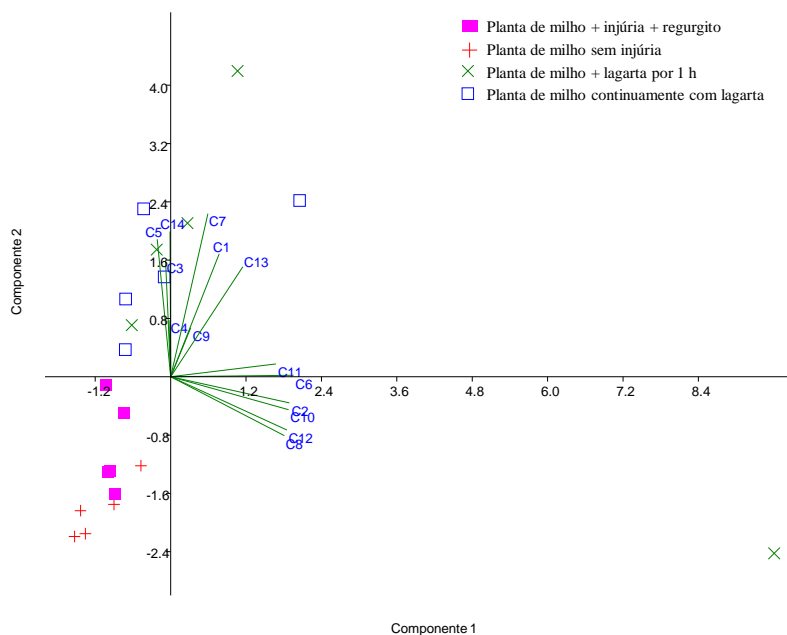


Figura 6. A análise discriminante mostra separação dos quatro tratamentos experimentais para o milho: planta sem injúria, planta com lagarta por 1 hora, planta continuamente com lagartas e planta com injúria mecânica tratadas com regurgito. Os pontos representam cada repetição na combinação linear, e as linhas são as quantidades, que representam a importância de cada composto nos tratamentos ao longo das duas dimensões (CV1 e CV2). Os dois primeiros componentes da ACP explicam os dados na porcentagem de 68.8%. A numeração dos compostos segue: (C1)  $\alpha$ -pineno; (C2) mirceno; (C3) (Z)-3-acetato de hexenila; (C4) limoneno; (C5) (Z)- $\beta$ -ocimeno, (C6) linalol; (C7) DMNT; (C8) mentol; (C9) benzotiazol; (C10) indol; (C11)  $\alpha$ -copaeno; (C12) geranyl acetona; (C13)  $\beta$ -farneseno; (C14) TMTT.

#### 5.4. DISCUSSÃO

A identificação dos compostos induzidos por herbívoros em plantas parece ser uma abordagem eficaz para estudar as interações tritróficas, proporcionando um maior conhecimento sobre os mecanismos envolvidos no comportamento dos predadores no processo de localização de sua presa e quais compostos são particularmente importantes para a atratividade de vespas sociais. Esta abordagem é necessária para compreender em que circunstâncias este comportamento ocorre, a fim de permitir algumas generalizações a serem feitas, e gerar questões interessantes sobre a ecologia e a evolução destes processos.

O fato dos compostos  $\alpha$ -pineno, mirceno, (Z)-3-acetato de hexenila, limoneno, (Z)- $\beta$ -ocimeno, linalol, DMNT,  $\beta$ -farneseno, TMTT e indol, mostrarem diferença significativa entre os tratamentos das plantas de milho, indica que, provavelmente, estes compostos foram responsáveis pela atratividade das vespas. Foi observado que estes compostos foram emitidos em maior quantidade nas plantas com lagarta por 1 hora e plantas continuamente com lagartas quando comparados com as plantas sem indução ou plantas injuriadas mecanicamente tratadas com regurgito de lagarta. Nós sugerimos que a preferência das vespas sociais às plantas injuriadas mecanicamente tratadas com regurgito de lagarta mostrado no capítulo 1 deve-se ao fato de que os compostos implicados são comportamentalmente ativos em doses muito baixas ou esta atratividade pode estar relacionada a outras substâncias que o cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM) não foi capaz de detectar, visto que, os quimiorreceptores dos artrópodes são muito mais sensíveis do que os detectores de instrumentos analíticos (DICKE, 1999; HARE, 2011). No entanto, a explicação para a não preferência das vespas pelas plantas sem indução pode ser devido a baixa quantidade de emissão de compostos importantes, tais como, o (Z)-3-acetato de hexenila, linalol, DMNT, indol,  $\beta$ -farneseno e TMTT, comparado com a emissão destes em plantas submetidas aos outros tratamentos; o que provavelmente influenciou no comportamento das vespas sociais e conseqüentemente na sua preferência.

Em contrapartida, nós sugerimos que os compostos  $\alpha$ -copaeno, geranyl acetona, mentol e benzotiazol, não influenciaram na escolha da vespa, visto que não mostraram diferença estatística para as plantas de milho submetidas aos diferentes tratamentos e, por este motivo, não foram os prováveis responsáveis pela preferência das vespas.

Em 2005, Hoballah & Turlings, observaram que uma planta milho tratada com regurgito de *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) (Lepidoptera: Noctuidae) sobre a parte injuriada emitiu grandes quantidades de linalol; (E)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene; 1-H-indol; (E)- $\alpha$ -bergamoteno; e (E)- $\beta$ -farneseno após 6 horas de indução. Nossos resultados corroboram com os achados de Hoballah & Turlings (2005), visto que as plantas de milho injuriadas mecanicamente tratadas com regurgito de lagarta ou as plantas de milho induzidas com lagarta continuamente com lagartas ou plantas com sua presença por apenas 1 hora liberaram uma maior quantidade destes compostos quando comparadas com planta sem injúria, sugerindo que os compostos

linalol; (E)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene; 1-H-indol; (E)- $\alpha$ -bergamoteno; e (E)- $\beta$ -farneseno têm grande participação no comportamento de escolha das vespas.

Segundo Turlings & Tumlinson (1992), normalmente as plantas não produzem novos compostos, no geral o que acontece na maioria das plantas é a emissão de baixa quantidade de compostos voláteis mesmo quando as plantas não estão sendo atacadas e, após uma injúria ou stress há emissão de compostos que a planta emite sem nenhuma injúria ou tratamento pode aumentar ou diminuir. Embora o tempo de emissão máxima de voláteis de plantas de milho, variável entre cultivares, seja de no mínimo 10, e no máximo 16 horas após o tratamento com lagartas, em 5 horas após esta indução, as plantas de milho emitem grandes quantidades de voláteis induzidos (TURLINGS *et al.*, 1998). E geralmente após 24 horas da indução não são mais detectadas quantidades significativas de voláteis (TURLINGS & TUMLINSON, 1992).

A diferença quanto a emissão dos compostos voláteis foi observada entre os tratamentos de plantas de milho com lagartas por 1 hora e plantas de milho continuamente com lagartas, ambas testadas após 5-6 horas de indução, onde as plantas com lagartas por 1 hora emitiram maior quantidade de mircenol, do que a planta continuamente com lagartas, visto que, o composto mircenol está compreendido dentro o grupo dos terpenos e geralmente são observados horas após uma indução. Já as plantas de milho com a presença contínua de lagartas emitiram maior quantidade de (Z)-3-acetato de hexenila do que as plantas com lagarta por 1 hora, confirmando que as plantas continuavam emitindo voláteis de folhas verdes ao mesmo tempo em que emitiam terpenos, já que este composto (Z)-3-acetato de hexenila está compreendido dentro o grupo dos voláteis de folhas verdes, que são emitidos imediatamente após uma injúria inicial. Este fato pode ser justificado devido as lagartas terem permanecido na planta de milho enquanto os bioensaios foram realizados. Este resultado nos permite dizer que mesmo não havendo mais a presença do herbívoro, a planta continua liberando voláteis atrativos as vespas sociais, porém não da mesma forma que emite voláteis com a presença contínua do herbívoro.

Segundo Baldwin *et al.* (2006), o tempo de resposta da planta a uma injúria pode variar consideravelmente, em algumas plantas a mudança química pode começar dentro de minutos, enquanto que em outras plantas o efeito pode demorar horas e até anos. Sabe-se que as plantas possuem glândulas para o armazenamento de substância voláteis de defesa, portanto quando há um rompimento destas glândulas, os voláteis

(principalmente terpenóides) são emitidos instantaneamente, e se a injúria para, sua emissão também para (RÖSE *et al.*, 1996). No entanto, os resultados do presente trabalho mostraram que os voláteis atrativos às vespas predadoras foram observados durante horas mesmo após a injúria cessar, presumindo-se que esta rápida resposta da planta a uma injúria possibilita a atração de inimigos naturais dos herbívoros antes mesmo destes causarem danos substanciais às plantas.

De acordo com os resultados das análises de componentes principais (ACP) os compostos  $\alpha$ -pineno, (Z)-3-acetato de hexenila, (Z)- $\beta$ -ocimeno, DMNT,  $\beta$ -farneseno e TMTT, representam uma maior variabilidade entre os tratamentos comparado as plantas injuriadas por lagartas e plantas injuriadas mecanicamente tratadas com regurgito de lagarta com plantas sem injúria.

Portanto, o resultado do presente trabalho fornece uma visão sobre os compostos químicos que são responsáveis pela interação tritrófica (planta de milho - *S. frugiperda* – vespa social) e sugere que, os compostos emitidos pela planta de milho induzida por herbivoria ou por sua saliva no local da ferida foram os responsáveis pela preferência das vespas *P. fastidiosuscula*.



## 5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIMURA, C.; KOST, G.; BOLAND, W. Herbivore-induced, indirect plant defences. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.734(2), p.91-111, 2005.

ARIMURA G, MATSUI K, TAKABAYASHI J. Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. **Plant Cell Physiology**. v.50, p.911–923, 2009.

BALDWIN, I. T.; HALITSCHKE, R.; PASCHOLD, A.; VON DAHL, C.C.; PRESTON, C. A. Volatile signaling in plant-plant interactions: "Talking trees" in the genomics era. **Science**, v.311(5762), p.812-815, 2006.

D'AURIA, J. C.; PICHERSKY, E.; SCHAUB, A.; HANSEL, A.; GERSHENZON, J.; **Plant Journal**. v.49, p.194, 2007.

DICKE, M.; VAN LOON, J.J.A. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.97, p.237-249, 2000.

DICKE, M.; VET, L.E.M. Plant-carnivore interactions: evolutionary and ecological consequences for plant, herbivore and carnivore. In: Olf, H., Brown, V.K., Drent, R.H.. **Herbivores: Between Plants and Predators**. Blackwell Science, Oxford, UK. p.483–520, 1999.

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

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**, v135, p.1893–1902, 2004.

HARE, J.D. Ecological role of volatiles produced by plants in response to damage by herbivorous insects. **Annual Review of Entomology**, v.56, p.161–18, 2011.

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

HOLOPAINEN, J. K. **Trends in Plant Science**. v.9, p.529, 2004.

MATSUI, K. **Current Opinion in Plant Biology**. v.9, p.274, 2006.

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

RÖSE, U.S.R.; MANUKIAN, A.; HEATH, R.R.; TUMLINSON, J.H. Volatile semiochemicals released from undamaged cotton leaves. **Plant Physiology**, v.111, p.487-495, 1996.

TURLINGS, T. C. J.; TON, J. **Current Opinion in Plant Biology**, v.9, p.421, 2006.

TURLINGS, T.C.J.; TUMLINSON, J.H. Systemic release of chemical signals by herbivore-injured corn. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.89, p.8399–8402, 1992.

TURLINGS, T.C.J.; ALBORN, H.T.; MCCALL, P.J.; TUMLINSON, J.H. An elicitor in caterpillar oral secretions that induces corn seedlings to emit volatiles attractive to parasitic wasps. **Journal of Chemical Ecology**, v.19, p.411-425, 1993.

TURLINGS, T.J.C.; LENGWILER, U.B.; BERNASCONI, M.L.; WECHSLER, D.. Timing of induced volatile emissions in maize seedlings. **Planta**, v. 207(1), p.146-152, 1998.

ZARBIN, P.H.G. **Extração, isolamento e identificação de substâncias voláteis de insetos**, p.45-50. 2001. In: Feromônio de Insetos: Biologia, Química e Emprego no manejo de Pragas 2nd Ed. Ed by Vilela, E.F., Della-Lucia, M.C, Holos, Ribeirão Preto.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No capítulo 1 observamos a preferência das vespas sociais para voláteis emitidos por plantas de milho com a presença de lagartas por 1 hora, plantas de milho continuamente com lagartas e para plantas de milho injuriadas mecanicamente tratadas com regurgito de lagartas.

Observamos que as vespas sociais não mostraram preferência por plantas sem indução ou injuriadas mecanicamente tratadas e/ou tratadas com água.

O tempo de resposta da planta também é um fator importante para a atratividade das vespas, visto que, vespas preferiram plantas induzidas por lagartas *S. frugiperda* ou plantas injuriadas mecanicamente tratadas com regurgito de lagartas durante os intervalos de 5-6h e 24-25h. O mesmo não foi observado quando as plantas foram induzidas por lagartas ou injuriadas mecanicamente tratadas com regurgito de lagarta no intervalo de 1-2h.

As análises quantitativas e qualitativas realizadas nos extratos de planta de milho sem indução, plantas de milho com a presença de lagartas por 1 hora, plantas de milho continuamente com lagartas e plantas de milho injuriadas mecanicamente tratadas com regurgito de lagartas mostraram que os prováveis compostos responsáveis pela preferência das vespas foram  $\alpha$ -pineno, mirceno, (Z)-3-acetato de hexenila, limoneno, (Z)- $\beta$ -ocimeno, linalol, (DMNT),  $\beta$ -farneseno e indol.

Os resultados do presente trabalho amplia o conhecimento sobre o comportamento das vespas sociais e a provável função ecológica que os COVs (Compostos Orgânicos Voláteis) representam para estas. Portanto pesquisas futuras são necessárias para evidenciar a atratividade das vespas sociais em campo utilizando estes compostos sintéticos como fonte de odor.