



**WILLIAN JOSÉ RODRIGUES DA SILVA**

**INTERAÇÕES MEDIADAS POR COMPOSTOS  
ORGÂNICOS VOLÁTEIS ENTRE A SOJA, O  
PERCEVEJO *Euschistus heros* (HEMIPTERA:  
PENTATOMIDAE) E O PARASITOIDE  
*Telenomus podisi* (HYMENOPTERA:  
PLATYGASTRIDAE)**

**LAVRAS – MG  
2015**

**WILLIAN JOSÉ RODRIGUES DA SILVA**

**INTERAÇÕES MEDIADAS POR COMPOSTOS ORGÂNICOS  
VOLÁTEIS ENTRE A SOJA, O PERCEVEJO *Euschistus heros*  
(HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) E O PARASITOIDE *Telenomus podisi*  
(HYMENOPTERA: PLATYGASTRIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Entomologia, área de concentração em Manejo Integrado de Pragas, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Luís Cláudio Paterno Silveira

Coorientador

Dr. Miguel Borges

**LAVRAS – MG**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Silva, Willian José Rodrigues da.

Interações mediadas por compostos orgânicos voláteis entre a soja, o percevejo *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) e o parasitoide *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Platygasteridae) / Willian José Rodrigues da Silva. – Lavras: UFLA, 2015.

116 p.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador (a): Luís Cláudio Paterno Silveira.

Bibliografia.

1. Interação Tritrófica. 2. Percevejo. 3. Parasitoide. 4. Voláteis de plantas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**WILLIAN JOSÉ RODRIGUES DA SILVA**

**INTERAÇÕES MEDIADAS POR COMPOSTOS ORGÂNICOS  
VOLÁTEIS ENTRE A SOJA, O PERCEVEJO *Euschistus heros*  
(HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) E O PARASITOIDE *Telenomus podisi*  
(HYMENOPTERA: PLATYGASTRIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Entomologia, área de concentração em Manejo Integrado de Pragas, para a obtenção do título de Doutor.

Aprovada em 29 de Junho de 2015

Dra. Lenira Costa Viana Santa-Cecília	EPAMIG
Dra. Silvia Ribeiro de Souza	IBSP
Dr. Geraldo Andrade Carvalho	UFLA
Dr. Alexander Machado Auad	EMBRAPA

Dr. Luís Cláudio Paterno Silveira

Orientador

**LAVRAS – MG**

**2015**

*Aos meus pais,*  
*Pedro José da Silva*  
&  
*Petronila Rodrigues da Silva*  
OFEREÇO

*A minha esposa,*  
*Maria Fernanda de Oliveira Souza*  
DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, primeiramente a Deus.

À UFLA, por meio do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, pela oportunidade de cursar o doutorado.

Aos meus pais pela dedicação e paciência durante a realização das atividades do doutorado.

As minhas colegas Michele, Miriam, Ana Carolina, Amanda que compartilharam momentos bons e difíceis nas amostragens em campo de soja.

Aos meus amigos Tiago, Warley, Lucas pela atenção durante a minha estadia em Brasília.

Ao técnico Márcio pela atenção prestada durante a execução do trabalho em laboratório.

Ao meu orientador Professor Dr. Martin Francisco Pareja pela atenção e oportunidade concedida para realização dos trabalhos.

Em especial ao meu coorientador, Dr. Miguel Borges a que tenho tanto apreço, pela ajuda em todos os momentos da estadia em Brasília.

Ao Dr. Raul Laumann, pela atenção e esclarecimento durante a realização das atividades.

À Dra. Maria Carolina Blassioli, pela atenção concedida para a realização dos trabalhos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

## RESUMO

As plantas liberam compostos orgânicos voláteis que podem ativar a defesa em plantas, além de interferir no comportamento dos herbívoros e inimigos naturais. No presente estudo o objetivo foi avaliar como a exposição de plantas de soja *Glycine max* L. (Fabales: Fabaceae) a Compostos Orgânicos Voláteis - COVs sintéticos afeta as plantas, percevejo marrom da soja, *Euschistus heros* (Fabricius, 1794) e o parasitoide de ovo *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Platygasteridae). Foram testadas três diferentes cultivares de soja, definidas por estudos preliminares, uma resistente a pulgão, Dowling e duas suscetíveis, BR-16 e Jataí. As plantas foram pulverizadas com os COVs acetato de (*cis*)-3-hexenila, salicilato de metila, (*cis*)-jasmona e o (*trans*)-2-octen-1-ol. Os experimentos realizados com as plantas expostas aos COVs tiveram o objetivo de responder as seguintes hipóteses: (i) as plantas de soja tratadas pelos COVs têm a sua defesa induzida; (ii) alterações induzidas pelos COVs na emissão dos voláteis afetam a atração do *T. Podisi*; (iii) as plantas induzidas pelos COVs afetam no desenvolvimento do percevejo marrom (*E. heros*); (iv) a exposição aos COVs alteram no peso da parte aérea e da raiz das plantas induzidas; (v) ação dos voláteis de plantas induzidas pelos COVs afetam no comportamento de parasitoides e percevejos em área de campo com soja. Os resultados demonstraram que os compostos: acetato de (*cis*)-3-hexenila e salicilato de metila afetaram a produção e liberação das misturas de COVs, formados por acetato de (*cis*)-3-hexenila, (*trans*)- $\beta$ -ocimeno, (*trans,trans*)- $\alpha$ -farneseno e (*trans,trans*)-4,8,12-trimetil-1,3(*trans*),7(*trans*),11-tridecatetrae (TMTT), sendo que estes voláteis podem ser responsáveis pela atração do parasitoide de ovo *T. podisi*, e também afetam no comportamento de busca por alimento e sítios de oviposição além do desenvolvimento do percevejo marrom *E. heros*. A exposição das plantas aos COVs não interferem no desenvolvimento inicial da planta. No ensaio de campo foi verificada a presença de parasitoides pertencentes a várias famílias, principalmente da família Platygasteridae. Embora não tenham sido observadas diferenças na abundância de percevejos. A pulverização com o acetato de (*cis*)-3-hexenila e salicilato de metila influenciam na interação tritrófica entre plantas induzidas, o parasitoide *T. podisi* e o percevejo *E. heros*.

Palavras-chave: *Glycine max*. Voláteis. Interação tritrófica. *Telenomus podisi*. *Euschistus heros*.

## ABSTRACT

The plants release volatile organic compounds that can activate the defense in plants, besides interfere in the herbivores behavior and natural enemies. In this study had as objective to evaluate how exposure of soybean plants *Glycine max* L. (Fabales: Fabaceae) to Volatile Organic Compounds - VOCs synthetic affect the plants, brown stink bug, *Euschistus heros* (Fabricius, 1794) and the egg parasitoid *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Platygasteridae). Three different soybean cultivars were tested, defined by preliminary studies, one resistant to aphid, Dowling and two susceptible, BR-16 and *Jataí*. The plants were sprayed with VOCs (*cis*)-3-hexenyl acetate, methyl salicylate, (*cis*)-jasmone and (*trans*)-2-octen-1-ol. The experiments conducted with plants exposed to VOCs were intended to answer the following assumptions: (i) the soybean plants treated by VOCs have their induced defense; (ii) changes induced by VOCs in the volatile emission affect the attraction of *T. Podisi*; (iii) plants induced by VOCs affect the development of brown stink bug (*E. heros*); (iv) exposure to VOCs change in weight of shoot and root of the induced plants; (v) action of plant volatiles induced by the VOCs affect in the parasitoid behavior and bugs in soybean field area. The results showed that the compounds: (*cis*)-3-hexenyl acetate and methyl salicylate affect the production and release of VOCs mixtures formed by (*cis*)-3-hexenyl acetate, (*trans*)- $\beta$ -ocimene, (*trans,trans*)- $\alpha$ -farnesene and (*trans,trans*)-4,8,12-trimethyl-1,3(*trans*),7(*trans*),11-tridecatetraene (TMTT), and these volatiles may be responsible for attraction of egg parasitoid *T. podisi*, and also affect the food by seeking behavior and oviposition sites in addition of the development of brown stink bug *E. heros*. Plants' exposure to VOCs do not interfere in the initial development of the plant. In the field test was verified the parasitoids presence belonging to several families, mainly from Platygasteridae family. Although no differences were observed in the bugs abundance. Spraying with (*cis*)-3-hexenyl acetate and methyl salicylate influence in the tritrophic interaction among induced plants, parasitoid *T. podisi* and the stik bug *E. heros*.

**Keywords:** *Glycine max*. Volatile. Tritrophic interaction. *Telenomus podisi*. *Euschistus heros*.

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO 1

- Figura 1 Proporção de respostas de fêmeas de *Euschistus heros* no olfatômetro em Y para a cv Dowling no estádio (R2) submetidas a diferentes tratamentos de exposição a COVs. Controle: água destilada. Tratamentos: salicilato de metila, acetato de (*cis*)-3-hexenila, em concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  M. \*  $0,05 > P > 0,01$ ; \*\*  $0,01 > P > 0,001$  pelo teste de ( $\chi^2$ ) de Wald. Números entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum dos tratamentos apresentados. Com total de bioensaios: 42 (salicilato de metila); 41 (acetato de (*cis*)-3-hexenila; 24 (controle (água destilada))..... 36
- Figura 2 Proporção de respostas de fêmeas de *Euschistus heros* no olfatômetro em Y para a cv Jataí no estádio (R2) submetidas ao tratamento de exposição ao COV. Controle: água destilada. Tratamentos: salicilato de metila em concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  M. \*  $0,05 > P > 0,01$ ; \*\*  $0,01 > P > 0,001$  pelo teste de ( $\chi^2$ ) de Wald. Número entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum dos tratamentos apresentados. Com total de bioensaios: 42 (salicilato de metila); 21 (controle (água destilada))..... 36
- Figura 3 Número de posturas e número de ovos (média  $\pm$  EP) de *Euschistus heros* na cultivar de soja Dowling no teste com chance de escolha, nas arenas. (A) Número de postura; (B) Número de ovos. As plantas foram pulverizadas com salicilato de metila (SM), acetato de (*cis*)-3-hexenila (Ac. Hex) na concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  M, e controles água destilada + Tween 20 (0,1%) e água destilada. Os dados foram transformados em  $\log(x+1)$  para as análises. Barras da variável seguidas pela mesma letra não diferiram significativamente entre si, pelo teste Tukey ( $P > 0,05$ )..... 38
- Figura 4 Número de posturas e número de ovos (média  $\pm$  EP) de *Euschistus heros* na cultivar de soja Dowling no teste sem chance de escolha, nas arenas. (A) Número de postura; (B) Número de ovos. As plantas foram pulverizadas com salicilato de metila (SM), acetato de (*cis*)-3-hexenila (Ac. Hex) na concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  M, e controles água destilada + Tween 20 (0,1%) e água destilada. Os dados foram transformados em  $\log(x+1)$  para as análises. Barras da variável seguidas pela mesma letra não diferiram significativamente entre si, pelo teste Tukey ( $P > 0,05$ )..... 39

- Figura 5 Curvas de sobrevivência de *Euschistus heros* (ninfas e adultos) ao longo de 31 dias de alimentação com plantas da cv Dowling pulverizadas com salicilato de metila, acetato de (*cis*)-3-hexenila na concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  M, e controles água destilada + Tween 20 (0,1%) e água destilada..... 44

## ARTIGO 2

- Figura 1 Proporção de respostas ( $\pm$ EP) de fêmeas de *Telenomus podisi* no olfatômetro em (Y) para as cultivares Dowling, BR-16 e Jataí no estágio de desenvolvimento (V3), após 72 horas a exposição aos COVs. Controle: planta pulverizada com água destilada. Tratamentos: salicilato de metila, acetato de (*cis*)-3-hexenila, (*cis*)-jasmona, (*trans*)-2-octen-1-ol em concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$ M, e água destilada + Tween 20 (0,1%). Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos vs controle pelo teste de Wald ( $\chi^2$ ), a 5% (\*) ou 1% (\*\*) de probabilidade. Os números entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum tratamento de um total de 40 insetos avaliados..... 68
- Figura 2 Proporção de respostas ( $\pm$ EP) de fêmeas de *Telenomus podisi* no olfatômetro em (Y) para as cultivares Dowling e Jataí no estágio de desenvolvimento (R2), após 72 horas a exposição aos COVs. Controle: planta pulverizada com água destilada. Tratamentos: salicilato de metila, acetato de (*cis*)-3-hexenila em concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$ M. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos vs controle pelo teste de Wald ( $\chi^2$ ), a 5% de probabilidade. Números entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum tratamento de um total de 40 insetos avaliados..... 69
- Figura 3 Proporção de respostas ( $\pm$ EP) de fêmeas de *Telenomus podisi* no olfatômetro em (Y) para as cultivares Dowling, BR-16 e Jataí no estágio de desenvolvimento (V3), após 72 horas a exposição aos COVs. Controle: planta pulverizada com água destilada. Tratamentos: salicilato de metila, acetato de (*cis*)-3-hexenila, (*cis*)-jasmona, (*trans*)-2-octen-1-ol em concentração de  $1,0 \times 10^{-5}$ M, e água destilada + Tween 20 (0,1%). Números entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum tratamento de um total de 40 insetos avaliados..... 70

- Figura 4 Quantidade média dos voláteis totais (média  $\pm$  EP) para as cultivares Dowling e Jataí submetidas a diferentes tratamentos. (A) cv Dowling no estádio V3, (B) cv Dowling no estádio R2, (C) cv Jataí no estádio V3 e (D) cv Jataí no estádio R2. Controle: plantas pulverizadas com água destilada e Tween 20 (0,1%). Tratamentos: plantas pulverizadas com acetato de (*cis*)-3-hexenila, salicilato de metila na concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  M. Médias seguidas pela mesma letra não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey a  $P > 0.05$ ..... 72
- Figura 5 Gráfico de dispersão das variáveis canônicas (CVA) da cultivar Dowling no estádio de desenvolvimento vegetativo e reprodutivo, submetidos a diferentes tratamentos de tratamentos. Baseados nos voláteis liberados no período de 72-96 horas depois da pulverização. Controle: água destilada. Tratamentos: acetato de (*cis*)-3-hexenila, salicilato de metila na concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  M e água destilada + Tween 20 a 0,1%. Os pontos representam o padrão de resposta das plantas de soja aos diferentes tratamentos. As linhas representam os voláteis quantificados nos tratamentos..... 78

### ARTIGO 3

- Figura 1 Esquema de campo das parcelas com plantas de soja da cultivar Dowling utilizadas no experimento de campo, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. As plantas das parcelas marcadas em (X) não foram avaliadas..... 95
- Figura 2 Total de parasitoides (Média + EP) em armadilhas adesivas amarelas instaladas nas parcelas de soja pulverizadas com acetato de (*cis*)-3-hexenila e salicilato de metila e como controle (água destilada + Tween 20). As setas indicam o estádio de desenvolvimento que as plantas das parcelas foram pulverizadas com os COVs e o controle..... 99
- Figura 3 Curva de resposta principal (PRC) da abundância de parasitoides adultos como função dos tratamentos: 1 Controle (água destilada + Tween 20); 2 salicilato de metila; 3 acetato de (*cis*)-3-hexenila durante oito semanas. O eixo da esquerda representa o efeito do nível populacional dos parasitoides incidente sobre o componente principal. O eixo da direita mostra as famílias e como foram influenciadas pelo tratamento e o estádio da soja. O estádio da soja representa o período de coleta das armadilhas..... 100

- Figura 4 Captura de parasitoides da família Platygasteridae (Média + EP) em armadilhas adesivas amarelas instaladas nas parcelas de soja pulverizadas com acetato de (cis)-3-hexenila e salicilato de metila e como controle (água destilada + Tween 20). As setas indicam o estágio de desenvolvimento que as plantas das parcelas foram pulverizadas com os COVs e o controle. \*Valor significativo a ( $P \leq 0,05$ )..... 101
- Figura 5 Captura de parasitoides (Média  $\pm$  EP) em armadilhas adesivas amarelas instaladas nas parcelas de soja pulverizadas com acetato de (cis)-3-hexenila e salicilato de metila e como controle (água destilada + Tween 20). A) Gênero *Telenomus*; B) Gênero *Trissolcus*. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos, dentro de data, pelo teste Tukey ( $P < 0.05$ )..... 102
- Figura 6 Parasitismo em cartelas de ovos sentinela de *Euschistus heros* (Média  $\pm$  EP) colocadas nas parcelas de soja pulverizadas com acetato de (cis)-3-hexenila e salicilato de metila e como controle (água destilada + Tween 20). (A) Ovos parasitados (%); (B) Total de parasitoides emergidos. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos, dentro de data, pelo teste Tukey ( $P < 0.05$ )..... 104
- Figura 7 Densidade populacional de Pentatomidae (Média  $\pm$  EP) capturado em pano de batida nas parcelas de soja pulverizadas com acetato de (cis)-3-hexenila e salicilato de metila e como controle (água destilada + Tween 20). Asterisco indica diferença significativa entre as cultivares, dentro de data, pelo teste Tukey ( $P < 0.05$ )..... 105

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

- Tabela 1 Valores médios ( $\pm$  EP) da duração do período ninfal, do terceiro ao quinto instar e do desenvolvimento do terceiro instar a adulto, de *Euschistus heros* em plantas de soja da cv Dowling pulverizadas com salicilato de metila, acetato de (*cis*)-3-hexenila nas concentrações de  $1,0 \times 10^{-3}$  M e controles água destilada + Tween 20 (0,1%) e água destilada ( $27 \pm 1$  °C, UR  $65 \pm 10$  % e fotofase de 14 hr)..... 41
- Tabela 2 Valores médios ( $\pm$  EP) da longevidade (dias) e peso (mg) de fêmeas e machos de *Euschistus heros*, provenientes das ninfas alimentadas em plantas de soja da cv Dowling pulverizadas com salicilato de metila, acetato de (*cis*)-3-hexenila nas concentrações de  $1,0 \times 10^{-3}$  M e controles água destilada + Tween 20 (0,1%) e água destilada ( $27 \pm 1$  °C, UR  $65 \pm 10$  % e fotofase de 14 hr)..... 43

### ARTIGO 2

- Tabela 1 Quantidade de compostos orgânicos voláteis coletados durante 24 h (média  $\pm$  erro padrão em nanogramas) de plantas da cv Dowling no estágio V3 e R2 72 horas após a pulverização com acetato de (*cis*)-3-hexenila, salicilato de metila na concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  M, água destilada + Tween 20 (0,1%) e água destilada (controles) 75
- Tabela 2 Quantidade de compostos orgânicos voláteis coletados durante 24 h (média  $\pm$  erro padrão em nanogramas) de plantas da cultivar Jataí no estágio V3 e R2 72 após a pulverização com salicilato de metila na concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  M, água destilada + Tween 20 (0,1%) e água destilada (controles)..... 77

## SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE.....	16
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	16
REFERÊNCIAS.....	20
SEGUNDA PARTE.....	24
ARTIGO 1 - Alteração na atração, oviposição e desenvolvimento de <i>Euschistus heros</i> (Heteroptera: Pentatomidae), em plantas de soja, induzidos por acetato de ( <i>cis</i> )-3-hexenila e salicilato de metila.....	24
RESUMO.....	24
ABSTRACT.....	25
1 INTRODUÇÃO.....	26
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
2.1 Preparação das plantas.....	29
2.2 Preparação das soluções com voláteis sintéticos de plantas.....	29
2.3 Obetância e manutenção do Percevejo-marrom, <i>E. heros</i> .....	30
2.4 Resposta olfativa do percevejo marrom, <i>E. heros</i> .....	30
2.5 Oviposição do percevejo-marrom, <i>E. heros</i> .....	32
Desenvolvimento de ninfas e adultos do percevejo-marrom, <i>E. heros</i> .....	33
2.7 Ensaio de alocação de biomassa em plantas de soja.....	34
3 RESULTADOS.....	35
3.1 Resposta olfativa do percevejo marrom <i>E. heros</i> .....	35
3.2 Efeitos dos COVs na oviposição do percevejo <i>E. heros</i> .....	37
Desenvolvimento ninfal do percevejo marrom <i>E. heros</i> em plantas de soja.....	40
3.4 Ensaio de alocação de biomassa em plantas de soja.....	45
4 DISCUSSÃO.....	46
REFERÊNCIAS.....	50
ARTIGO 2 - Alteração do perfil de voláteis de plantas de soja induzidos pela aplicação de COVs e no comportamento de busca do parasitoide de ovos <i>Telenomus podisi</i> (Hymenoptera: Platygastridae).....	54
RESUMO.....	54
ABSTRACT.....	55
1 INTRODUÇÃO.....	56
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	59
2.1 Preparação das plantas.....	59
2.2 Preparação das soluções com voláteis sintéticos de plantas.....	59
2.3 Parasitoide de ovos, <i>Telenomus podisi</i> .....	60
2.4 Resposta olfativa do parasitoide de ovos, <i>T. podisi</i> .....	60

2.5	Coleta e análise de voláteis das plantas de soja.....	62
2.6	Análise estatística.....	65
3	RESULTADOS.....	67
3.1	Atração do parasitoide de ovo <i>T. podisi</i> em olfatômetro (Y).....	67
3.2	Análise de voláteis de soja.....	71
4	DISCUSSÃO.....	79
	REFERÊNCIAS.....	83
	ARTIGO 3 - Aplicação de acetato de ( <i>cis</i> )-3-hexenila e salicilato de metila sintéticos em plantas de soja na atração de parasitoides em campo.....	90
	RESUMO.....	90
	ABSTRACT.....	91
1	INTRODUÇÃO.....	92
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	94
2.1	Compostos orgânicos voláteis de plantas sintéticos.....	94
2.2	Fonte dos químicos.....	94
2.3	Desenho experimental.....	94
2.4	Amostragem de parasitóides.....	96
2.4.1	Incidência e intensidade de parasitismo.....	97
2.5	Avaliação da população de percevejos no campo.....	97
2.6	Análise estatística.....	98
3	RESULTADOS.....	99
3.1	Abundância de parasitoides nas armadilhas adesivas.....	99
3.2	Parasitismo de ovos sentinela.....	103
3.3	Abundância de percevejos.....	104
4	DISCUSSÃO.....	106
	REFERÊNCIAS.....	109
	TERCEIRA PARTE.....	113
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	113
	ANEXO 1.....	116

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

As plantas desenvolveram capacidade de resposta a fatores bióticos e abióticos (BALDWIN, 2010; DICKE; VAN LOON; SOLER, 2009). Essa habilidade inclui defesas constitutivas e induzidas. A defesa constitutiva está relacionada à presença das barreiras físicas e/ou químicas com surgimento da presença ou ausência de fatores adversos na planta. Enquanto, a defesa induzida é expressa apenas quando a planta está sob a influência de estresse, com produção de compostos químicos, oriundos do metabolismo secundário. Entre estes se destacam os compostos orgânicos voláteis (COVs), que regulam as interações das plantas com o ambiente (BALDWIN, 2010; DICKE; VAN LOON; SOLER 2009; FARAG; PARÉ, 2002). Esse mecanismo de defesa tem sido estudado em plantas de importância econômica, principalmente aquelas atacadas por pragas e doenças (BELORTE et al., 2003).

Um exemplo de cultura com importância econômica é a soja *G. max*, que embora tenha uma alta produção a incidência de pragas e doenças chega a causar até 30% na redução da produção (DEGRANDE; VIVAN, 2010; RIBEIRO; COSTA, 2000). Entre os insetos herbívoros causadores de prejuízos estão as lagartas desfolhadoras e o complexo de percevejos fitófagos, no qual se destaca o percevejo-marrom, *Euschistus heros* (Fabricius, 1794), o percevejo-verde, *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758), o percevejo verde pequeno, *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) e os percevejos barriga verde, *Dichelops* spp. (Fabricius, 1794) (Hemiptera: Pentatomidae) (BELORTE et al., 2003).

O percevejo-marrom *E. heros* é responsável por uma grande redução no tamanho e na qualidade das sementes, além dos distúrbios fisiológicos como a retenção foliar, sendo que a extensão dos danos depende do estágio de

desenvolvimento da planta. A colonização deste percevejo se inicia no final do ciclo vegetativo da cultura, ou logo após a floração nos estádios reprodutivos (R1 e R2). A partir da formação das vagens no estágio (R3) ocorre o pico da reprodução dos insetos, que resulta em um aumento populacional da espécie, prejudicando as plantas em um dos períodos mais suscetíveis da soja, que é durante o enchimento dos grãos a partir do estágio (R5) (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999). Na maioria das áreas de cultivo o controle desta praga acontece com a aplicação de inseticidas organofosforados, em períodos pré-determinados (SOSA-GÓMEZ et al., 2009). Essas aplicações causam sérios problemas ecológicos, como alteração na abundância de inimigos naturais entre outros agentes benéficos para a comunidade vegetal (BATISTA FILHO et al., 2003).

A presença de agentes de controle biológico, tais como parasitoides e predadores em áreas de cultivo agrícola são essenciais para a regulação populacional de insetos-pragas, principalmente aqueles que podem causar prejuízos às culturas. Para a cultura da soja os parasitoides de ovos do gênero *Telenomus* e *Trissolcus* são os mais efetivos no parasitismo natural (MEDEIROS et al., 1997, 1998). A microvespa com maior eficiência na regulação da população de *E. heros* é o parasitoide de ovos *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Platygasteridae) (PACHECO; CORRÊA-FERREIRA, 2000). Contudo, para que os agentes de controle biológico possam ter sucesso na busca pelo hospedeiro ou pela presa, é necessária a presença de pistas químicas que possibilitem uma busca mais eficiente (HARE; MORGAN; NGUYUN, 1997; SCHMIDT, 1991; STEIDLE; RUTHER, 2000).

Uma das pistas utilizadas por estes inimigos naturais são os COVs liberados pelas plantas. Esses COVs são produzidos em uma complexa rede de sinalização do metabolismo secundário (DICKE; BALDWIN, 2010; DUDAREVA et al., 2006; FINESCHI et al., 2013; QUALLEY; DUDAREVA,

2008). Os COVs apresentam várias funções no ambiente, sendo mediadores de várias interações, entre as quais, podemos citar a atração de polinizadores, de dispersores de sementes e de inimigos naturais (KESSLER et al., 2013; NINKOVIC, 2003; RODRIGUEZ; ALQUÉZAR; PEÑA, 2013). Adicionalmente, são capazes de ativar o sistema de defesa em plantas saudáveis, representando assim, uma ferramenta eficiente para as defesas nas plantas (BALDWIN, 2010). As plantas podem ser induzidas tanto pela exposição aos COVs sintéticos (MORAES et al., 2009) quanto por misturas liberadas por plantas previamente injuriadas por herbívoros (HEIL; KOST, 2006). Após a exposição é desencadeada uma alteração no metabolismo secundário com maior produção e liberação de voláteis de folhas verdes, terpenoides e aromáticos (ARIMURA; KOST; BOLAND, 2005; ENGELBERTH et al., 2004; HEIL; KOST, 2006). Esses constituintes são produzidos pelas vias metabólicas dos octadecanoides, ácido chiquímico e ácido salicílico, respectivamente. A liberação de voláteis acontece durante todo o desenvolvimento da planta, embora quando o tecido é danificado por herbívoros, existe uma maior liberação desses COVs. As misturas de voláteis específicas de plantas com herbivoria podem ser usadas pelos inimigos naturais para localizarem seus hospedeiros (BEYAERT et al., 2010; BRUCE; PICKETT, 2011; SIDERHURST; JANG, 2010; WEI; KANG, 2006).

As plantas expostas aos COVs sintéticos sofrem alterações no metabolismo, que resulta na atração de parasitoides e insetos herbívoros (ARIMURA; KOST; BOLAND, 2005; BALDWIN, 2010; DICKE; BALDWIN, 2010; ENGELBERTH et al., 2004; MORAES et al., 2009). A partir disso o objetivo geral nesta tese foi avaliar como a exposição de plantas de soja a COVs sintéticos afetam as plantas, percevejos e inimigos naturais. A apresentação deste trabalho foi organizada em três artigos: no primeiro artigo, intitulado “Alteração na atração, oviposição e desenvolvimento de *Euschistus heros*

(Heteroptera: Pentatomidae) em plantas de soja induzidos por acetato de (*cis*)-3-hexenila e salicilato de metila”, o objetivo foi avaliar o comportamento de atração, oviposição e desenvolvimento de *E. heros* nos cultivares de soja Dowling e Jataí induzidos por COVs. No segundo, intitulado “Alteração do perfil de voláteis de plantas de soja induzidos pela aplicação de COVs e no comportamento de busca do parasitoide de ovos *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Platygasteridae)”, o objetivo foi avaliar a atração de *T. podisi* para os voláteis liberados por plantas das cultivares Dowling, Jataí e BR-16 induzidos após a exposição ao acetato de (*cis*)-3-hexenila, salicilato de metila, (*cis*)-jasmona e (*trans*)-2-octen-1-ol e o perfil de voláteis liberados pelas plantas da cv Dowling e Jataí após a exposição aos COVs em laboratório. No terceiro artigo, intitulado “Aplicação de acetato de (*cis*)-3-hexenila e salicilato de metila sintéticos em plantas de soja na atração de parasitoides em campo” teve a finalidade de avaliar a abundância de parasitoides e percevejos em parcelas de soja expostas aos COVs sintéticos acetato de (*cis*)-3-hexenila e salicilato de metila.

## REFERÊNCIAS

ARIMURA, G.; KOST, C.; BOLAND, W. Herbivore- induced, indirect plant defences. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1734, n. 2, p. 91–111, Mar. 2005.

BALDWIN, I. T. Plant volatiles. **Current Biology**, Cambridge, v. 20, n. 9, p. 392-397, May 2010.

BATISTA FILHO, A. et al. Manejo integrado de pragas em soja: Impacto de inseticidas sobre inimigos naturais. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 61-67, jan./mar. 2003.

BELORTE, L. C. et al. Danos causados por percevejos (Hemiptera: Pentatomidae) em cinco cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill, 1917) no município de Araçatuba, SP. **Arquivo do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 70, n. 2, p. 169-175, abr./jun. 2003.

BEYAERT, I. et al. Relevance of resource-indicating key volatiles and habitat odour for insect orientation. **Animal Behaviour**, Bristol, v. 79, n. 5, p. 1077–1086, May 2010.

BRUCE, T. J. A.; PICKETT, J. A. Perception of plant volatile blends by herbivorous insects – finding the right mix. **Phytochemistry**, Washington, v. 72, n. 13, p. 1605–1611, Sept. 2011.

CORRÊA-FERREIRA, B. S.; PANIZZI, A. R. **Percevejos da soja e seu manejo**. Londrina: Embrapa - CNPSo, 1999. 45 p. (Circular Técnica, 24).

DEGRANDE, P. E.; VIVAN, L. M. Pragas da soja. In: \_\_\_\_\_. **Tecnologia e produção: soja e milho 2010/2011**. Maracaju: Fundação MS, 2010. 257 p.

DICKE, M.; BALDWIN, I. T. The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the “cry for help”. **Trends in Plant Science**, Cambridge, v. 15, n. 3, p. 167–175, Mar. 2010.

DICKE, M.; VAN LOON, J. J. A.; SOLER, R. Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. **Nature Chemical Biology**, Cambridge, v. 5, n. 5, p. 317-324, Apr. 2009.

DUDAREVA, N. et al. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Science**, Philadelphia, v. 25, n. 5, p. 417–440, Jan. 2006.

ENGELBERTH, J. et al. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 6, p. 1781–1785, Dec. 2004.

FARAG, M. A.; PARÉ, P. W. C6-green leaf volatiles trigger local and systemic VOC emissions in tomato. **Phytochemistry**, Washington, v. 61, n. 5, p. 545-554, Nov. 2002.

FINESCHI, S. et al. Diversification of volatile isoprenoid emissions from trees: evolutionary and ecological perspectives. In: NIINEMETS, U.; MONSON, R. K. (Ed.). **Biology, controls and models of tree volatile organic compound emissions**. Berlin: Springer, 2013. p. 1-20.

HARE, J. D.; MORGAN, D. J. W.; NGUYUN, T. Increased parasitization of California red scale in the field after exposing its parasitoid, *Aphytis melinus* to a synthetic kairomone. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 82, n. 1, p. 73–81, Jan. 1997.

HEIL, M.; KOST, C. Priming of indirect defences. **Ecology Letters**, Davis, v. 9, n. 7, p. 813–817, 2006.

KESSLER, D. et al. Petunia flowers solve the defence/apparency dilemma of pollinator attraction by deploying complex floral blends. **Ecology Letters**, Davis, v. 16, n. 3, p. 299-306, Nov. 2013.

MEDEIROS M. A. et al. Incidência natural de parasitoides em ovos de percevejos encontrados na soja (Hemiptera: Pentatomidae) no Distrito Federal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 8, p. 1431-1435, ago. 1998.

MEDEIROS, M. A. et al. Parasitismo e predação em ovos de *Euschistus heros* (Fab) (Heteroptera: Pentatomidae) no Distrito Federal, Brasil. **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 397-401, ago. 1997.

MORAES, M. C. B. et al. Attraction of the stink bug egg parasitoid *Telenomus podisi* to defence signals from soybean activated by treatment with *cis*-jasmone. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 131, n. 2, p. 178-188, May 2009.

NINKOVIC, V. Volatile communication between barley plants affects biomass allocation. **Journal of Experimental Botany**, Colchester, v. 54, n. 389, p. 1931-1939, June 2003.

PACHECO, D. J. P.; CORRÊA-FERREIRA, B. S. Parasitismo de *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Scelionidae) em populações de percevejos pragas da soja. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 295–302, Jun. 2000.

QUALLEY, A. V.; DUDAREVA, N. Aromatic volatiles and their involvement in plant defense. In: SCHALLER, A. (Ed.). **Induced plant resistance to herbivory**. Berlin: Spinger, 2008. p. 409–432.

RIBEIRO, A. L. P.; COSTA, E. C. Desfolhamento em estádios de desenvolvimento da soja, cultivar BR 16, no rendimento de grãos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 5, p. 767–771, Out. 2000.

RODRIGUEZ, A.; ALQUÉZAR, B.; PEÑA, L. Fruit aromas in mature fleshy fruits as signals of readiness for predation and seed dispersal. **The new Phytologist**, Bristol, v. 197, n. 1, p. 36-48, Jan. 2013.

SCHMIDT, J. M. The role of physical factors in tritrophic interactions. **Redia**, Firenze, v. 74, p. 43-93, 1991.

SIDERHURST, M. S.; JANG, E. B. Cucumber volatile blend attractive to female melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett). **Journal of Chemical Ecology**, Tampa, v. 36, n. 7, p. 699–708, July 2010.

SOSA-GÓMEZ, D. R. et al. Insecticide susceptibility of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae) in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, Riverside, v. 102, n. 3, p. 1209–1216, June 2009.

STEIDLE, J. L. M.; RUTHER, J. Chemicals used for host recognition by the granary weevil parasitoid *Lariophagus distinguendus*. **Journal of Chemical Ecology**, Tampa, v. 26, n. 12, p. 2665-2675, July 2000.

WEI, J.; KANG, L. Electrophysiological and behavioral responses of a parasitic wasp to plant volatiles induced by two leaf miner species. **Chemical Senses**, Tokyo, v. 31, n. 5, p. 467–477, June 2006.

## SEGUNDA PARTE

### **ARTIGO 1 - Alteração na atração, oviposição e desenvolvimento de *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae), em plantas de soja, induzidos por acetato de (*cis*)-3-hexenila e salicilato de metila**

#### **RESUMO**

Os fatores bióticos e abióticos desencadeiam nas plantas a ativação do mecanismo de defesa, com produção de metabólitos secundários. Esses produtos interagem diretamente sobre o herbívoro, ou indiretamente com plantas, inimigos naturais e herbívoros. Neste estudo o objetivo foi avaliar os efeitos de cultivares de soja *Glycine Max* L. (Fabales: Fabaceae) induzidas por COVs durante o estágio reprodutivo (R2) no comportamento e durante o estágio (R5) no desenvolvimento do percevejo-marrom (*E. heros*) e os efeitos na alocação de biomassa nas plantas de soja induzidas pelos COVs. Foi verificado que as fêmeas acasaladas do percevejo foram atraídas para os voláteis emitidos pelas plantas da cv Dowling pulverizadas com acetato de (*cis*)-3-hexenila e salicilato de metila, em comparação com os voláteis emitidos pela planta controle. Os percevejos não responderam para os voláteis emitidos pelas plantas da cv Jataí pulverizadas com salicilato de metila. Foi observado que as plantas da cv Dowling induzidas por acetato de (*cis*)-3-hexenila e salicilato de metila afetaram o número de postura nos testes de oviposição com chance de escolha com as fêmeas de *E. heros*. Foi verificada redução no número de ovos nas plantas da cv Dowling induzidas pelo salicilato de metila no teste sem chance de escolha. Não foram observadas diferenças significativas nos números de ovos e posturas para as plantas da cv Jataí induzidas pelo salicilato de metila. As plantas da cv Dowling induzidas pelo acetato de (*cis*)-3-hexenila e salicilato de metila alteraram o desenvolvimento ninfal, longevidade e mortalidade do percevejo marrom *E. heros*. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas no peso da biomassa vegetal das plantas da cv Dowling e Jataí, induzidas pelos COVs. Os resultados demonstraram que as plantas induzidas por acetato de (*cis*)-3-hexenila e salicilato de metila, influenciam na atração, oviposição e no desenvolvimento ninfal, do percevejo marrom *E. heros*. Contudo o processo de indução pelos COVs não afetam o desenvolvimento inicial da planta.

Palavras-chave: *Euschistus heros*. Indução de resistência. *Glycine max*.

**ARTICLE 1 - Change in attraction, oviposition and development of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae), in soybean plants, induced by (cis)-3-hexenyl acetate and methyl salicylate**

**ABSTRACT**

Biotic and abiotic factors trigger in the plants the defense mechanism activation with secondary metabolites production. These products interact directly on the herbivore or indirectly with plants, herbivores and natural enemies. In this study the objective was to evaluate the soybean effects *Glycine Max* L. (Fabales: Fabaceae) induced by VOCs during the reproductive stage (R2) in behavior and during the stage (R5) in the development of brown stink bug (*E. heros*) and the effect on biomass allocation in soybean plants induced by the VOCs. It has been found that the stink bug mated females were attracted for the volatile emitted by plants cv Dowling sprayed with (cis)-3-hexenyl acetate and methyl salicylate compared with the volatiles emitted by the plant control. The stink bugs did not respond to volatiles emitted by the plants cv *Jataí* sprayed with methyl salicylate. It was observed that the plants cv Dowling induced by (cis)-3-hexenyl acetate and methyl salicylate affected the number of posture in oviposition tests with possibility of choice *E. heros* females. It has been verified the reduction in the number of eggs in the plants cv Dowling induced by methyl salicylate in the test without choice. No significant differences were observed in the numbers of eggs and postures for plants cv *Jataí* induced by methyl salicylate. Plants cv Dowling induced by (cis)-3-hexenyl acetate and methyl salicylate altered the nymphal development, longevity and mortality of the brown stink bug *E. heros*. However, no significant differences were observed in the weight of the vegetal biomass of plants cv Dowling and *Jataí*, induced by VOCs. The results showed that plants induced by (cis)-3-hexenyl acetate and methyl salicylate, influence the attraction, oviposition and nymphal development of the brown stink bug *E. heros*. However, the induction process by the VOCs do not affect the early development of the plant.

Keywords: *Euschistus heros*. Induced resistance. *Glycine max*.

## 1 INTRODUÇÃO

Ao longo do tempo as plantas desenvolveram a capacidade de resistência a diversos fatores bióticos e abióticos (BALDWIN, 2010; DICKE, 2009; MITHOFER; BOLAND, 2012). Essa capacidade de respostas fisiológicas, inclui a produção de compostos químicos que podem ser translocados no xilema e floema ou liberados por várias partes da planta (BOWLES, 1990), respostas morfológicas como a pubescência, além da maior pigmentação da epiderme e a presença de tricomas. No entanto, normalmente a base da resistência é química, com produção de metabólitos secundários de maneira contínua (defesa constitutiva) ou apenas temporariamente (defesa induzida).

Inicialmente após a injúria ou exposição aos COVs sintéticos nos tecidos vegetais é desencadeada a produção de vários metabólitos secundários, como os voláteis de folhas verdes, alguns terpenoides e aromáticos (BALDWIN, 2010; DICKE, 2009; FARAG; PARÉ, 2002). Posteriormente, ocorre a produção de metabólitos secundários que são acumulados nos tecidos vegetais que, em geral, são os flavonoides, alcaloides, a maioria dos terpenoides e esteroides (MITHOFER; BOLAND, 2012). Essas substâncias podem alterar o comportamento e a fisiologia dos herbívoros, como os percevejos da soja com efeitos negativos sobre a longevidade de percevejos adultos e no potencial reprodutivo destes insetos-pragas (PIUBELLI et al., 2003a).

Entre os insetos causadores de grandes prejuízos nas culturas agrícolas no Brasil, se destaca o percevejo-marrom *E. heros*, este fitófago reduz o tamanho, a qualidade dos grãos e dificulta o processo de colheita mecanizada na cultura da soja. As aplicações de inseticidas em períodos pré-determinados têm favorecido a resistência dos insetos, elevado o custo de

produção, além de causar sérios problemas ecológicos, com redução de inimigos naturais e outros agentes benéficos para a comunidade vegetal (BATISTA FILHO et al., 2003; SOSA-GÓMEZ et al., 2009).

Durante o processo de alimentação deste percevejo é ativado o sistema de defesa nas plantas de soja com maior ou menor estímulo a depender das características genotípicas e fenotípicas das plantas (MICHEREFF et al., 2011). Após a ativação ocorre a produção e liberação de compostos orgânicos voláteis (COVs) que podem influenciar na escolha da planta para a alimentação e sítios de oviposição, e no ciclo de desenvolvimento do inseto, com redução ou prolongamento durante o período ninfal que afeta também a longevidade e o potencial reprodutivo da espécie. Essas variações podem ser resultado da alimentação em tecidos com altos níveis de compostos tóxicos e inibidores de processos fisiológicos, e assim afeta diretamente a praga.

Alguns metabólitos produzidos pelas plantas podem inibir a germinação de sementes, inibir ou estimular o crescimento de raízes e folhas em plantas vizinhas. Em geral, a exposição a esses compostos influencia na alocação de biomassa nas plantas (MCCONNAUGHAY; COLEMAN, 1999). Porém, metabólitos voláteis liberados pela parte aérea das plantas também interferem no desenvolvimento de plantas vizinhas e na ativação de mecanismos de defesa (NINKOVIC, 2003).

Desse modo no presente estudo o objetivo foi avaliar os efeitos de cultivares de soja induzidas por COVs durante o estágio reprodutivo (R2) na atração, oviposição e desenvolvimento ninfal do percevejo marrom (*E. heros*) e os efeitos no desenvolvimento das plantas de soja induzidos pelos COVs. Foram testadas as seguintes hipóteses: (i) alterações induzidas pelos COVs na emissão dos voláteis afetam a atração do *E. heros* (ii) os COVs quando pulverizados nas plantas de soja afetam a oviposição das fêmeas de

*E. heros* (iii) o desenvolvimento ninfal, longevidade e mortalidade de ninfas e adultos de *E. heros* são afetados quando alimentados com plantas de soja pulverizadas com os COVs (iv) as plantas pulverizadas com os COVs têm alteração na alocação de biomassa em consequência do custo energético para a ativação do metabolismo secundário. Os resultados indicam que o acetato de (*cis*)-3-hexenila e salicilato de metila afetam atração, oviposição e desenvolvimento ninfal, longevidade e mortalidade do percevejo marrom *E. heros*. Contudo, não afetam no crescimento inicial das plantas de soja após a pulverização com os COVs.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Preparação das plantas

As sementes de soja, *Glycine max* das cultivares “Dowling” e “Jataí”, foram cultivadas em mistura de solo esterilizado e substrato orgânico (proporção de 1:1), mantidas em condições controladas em casa de vegetação (Temperatura de  $27 \pm 6$  °C e umidade relativa de  $65 \pm 10\%$ ). As plantas no estágio fisiológico R2 foram utilizadas nos ensaios de defesa indireta e no estágio R5 para os ensaios de ciclo de desenvolvimento de ninfas e adultos do percevejo-marrom e no estágio V3 para testes de alocação de biomassa nas plantas de soja (FEHR et al., 1971).

### 2.2 Preparação das soluções com voláteis sintéticos de plantas

Os COVs sintéticos, acetato de (*cis*)-3-hexenila e salicilato de metila foram solubilizados em solução de água destilada + óleo vegetal adjuvante 0,1% (Tween<sup>®</sup> 20; Sigma-aldrich, EUA) na concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$ M. Os tratamentos controle foram água destilada e água destilada + Tween 20 (0,1%). Os COVs sintéticos utilizados foram selecionados com base nos resultados apresentados no Artigo 1, em razão da alteração do perfil de voláteis nas plantas após a exposição. Os COVs foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). As plantas das cultivares preparadas como descrito no item 3.1, foram submetidas aos tratamentos por pulverização até o ponto de escorrimento da solução nas folhas com volume aproximado de 8 mL para as plantas no estágio V3 e de 16 mL para as plantas no estágio R2 e R5. As plantas pulverizadas foram utilizadas para bioensaios, ensaios de oviposição, avaliação de desenvolvimento de ninfas e adultos após 72 horas da exposição aos COVs, para o ensaio de alocação de biomassa após 18 dias da exposição aos COVs.

### 2.3 Obetança e manutenção do Percevejo-marrom, *E. heros*

O percevejo-marrom, *E. heros*, utilizado nos ensaios comportamentais foi obtido da criação de laboratório da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, Brasil), mantidos em potes de plástico de 8 L (22 cm diâmetro x 26 cm de altura), com dieta natural, vagens de feijão verde *Phaseolus vulgaris* (Fabales: Fabaceae), sementes de soja (*G. max*), girassol *Helianthus annuus* (Asterales: Asteraceae), amendoim *Arachis hypogaea* (Fabales: Fabaceae), água fornecida em um pote de plástico (7cm de diâmetro x 5 cm de altura) contendo um pedaço de algodão incluso em uma perfuração no centro da tampa de plástico (4 cm de diâmetro) e uma tela de nylon para oviposição. Os potes foram mantidos em sala de ambiente controlado (14:10 h L:D; 25°C± 2 °C e umidade relativa de 65± 10%). As massas de ovos foram coletadas diariamente, sendo ofertadas para manutenção da colônia dos percevejos e dos parasitoides de ovos.

Para os ensaios em olfatomетria em Y e ensaios de oviposição as fêmeas com 12 dias após a última ecdise foram mantidas com machos durante 24 horas antes da realização dos ensaios, sendo um casal para cada pote.

### 2.4 Resposta olfativa do percevejo marrom, *E. heros*

Para determinar a resposta comportamental de busca do percevejo-marrom, utilizou-se um olfatômetro na forma de Y, constituído de uma placa de acrílico (33 cm x 40 cm) em forma de Y (corpo 20 cm; braços 17 cm cada; ângulo de 130°; diâmetro 1.5 cm), inserida entre duas placas de vidro: a superior translúcida e a inferior ofuscada, fixadas com cliques de papel conforme Moraes et al. (2005). As câmaras de vidro contendo plantas-controle (pulverizadas com água destilada ou ar puro) ou pulverizadas com os COVs foram conectadas ao

olfatômetro com mangueira de silicone, que interliga o sistema com o umidificador de ar, filtro de carvão ativado e as bombas de compressão e vácuo. O sistema gerou um fluxo de ar de entrada com 0,6 L/min regulado por um fluxômetro, e de saída o ar foi succionado por uma bomba de vácuo ligada no extremo oposto à entrada de ar, e regulada com fluxo de 0,2 L/min.

Para cada bioensaio foi utilizada uma fêmea acasalada e sem alimentação durante 24 horas, utilizada apenas uma vez, sendo liberada uma dentro do olfatômetro e monitorada para registro da primeira escolha (permanência mínima de 1 min no braço escolhido). Cada planta foi utilizada durante cinco bioensaios, invertendo-se a posição dos braços do olfatômetro no terceiro ensaio para evitar o efeito residual das fontes de odor na escolha do percevejo. Também se registrou o número de insetos que não apresentaram resposta olfativa.

As respostas de escolha das fêmeas de *E. heros* foram para as seguintes combinações de tratamentos:

Plantas da Cv Dowling:

- (1) ar puro vs controle (água destilada);
- (2) acetato de (*cis*)-3-hexenila vs água destilada;
- (3) salicilato de metila vs água destilada.

Plantas da Cv Jataí:

- (1) ar puro vs controle (água destilada);
- (2) salicilato de metila vs água destilada.

Para cada combinação foram realizadas 40 repetições, exceto para a combinação ar vs controle (água destilada) com 20 repetições. As plantas-control e pulverizadas foram mantidas em salas diferentes (fotoperíodo de 12:12 h L:D, temperatura de  $27 \pm 2$  °C e umidade relativa de  $60 \pm 10\%$ ) até

o momento de serem usadas nos experimentos, para evitar a sinalização química entre as plantas. Os bioensaios foram conduzidos 72 horas após o tratamento das plantas com os COVs.

Para avaliação estatística dos dados de ensaio em resposta do percevejo ao ensaio de olfatosmetria em Y, entre plantas pulverizadas com os COVs e plantas-controle, foi utilizado um modelo linear generalizado (MLG) com correção de Wald e aplicação do teste *qui-quadrado*. As análises foram realizadas no programa estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2009).

## **2.5 Oviposição do percevejo-marrom, *E. heros***

Para determinar a oviposição das fêmeas do percevejo marrom, utilizou-se uma arena dividida em duas partes, na parte inferior foi utilizada uma base em madeira com (40 cm de diâmetro) seis orifícios circulares (7 cm de diâmetro), e na parte superior um cesto plástico (38 cm de diâmetro x 90 cm de altura) forrado internamente com plástico transparente semipermeável para ventilação das plantas. Este modelo de arena foi utilizado para os ensaios com e sem chance de escolha. Para o ensaio com chance de escolha as plantas de soja no estádio (V3) pulverizadas com os COVs e controles tiveram seus vasos envoltos em papel alumínio, e inseridas no orifício na base de madeira, sendo recoberto pela estrutura de plástico. Enquanto para o ensaio sem chance de escolha, as plantas descritas anteriormente foram inseridas na arena todas de um mesmo tratamento e/ou controle.

Para cada arena foram utilizadas quatro fêmeas acasaladas de *E. heros*. Foram utilizadas quatro plantas para cada conjunto de ensaios com ou sem chance de escolha para as plantas da cv Dowling, para a cv Jataí foram

utilizadas três plantas para cada conjunto de ensaios com e sem chance de escolha, a sequência de distribuição das plantas foi inteiramente casualizada, com um total de 15 repetições (conjuntos) para cada tratamento.

Para análise dos ensaios de oviposição das fêmeas do percevejo com e sem chance de escolha foi utilizada uma análise de variância (Anova) aplicando o teste de Tukey a 5%. As análises foram realizadas no programa estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2009).

## **2.6 Desenvolvimento de ninfas e adultos do percevejo-marrom, *E. heros***

Para avaliar o desenvolvimento de ninfas e adultos de *E. heros*, foi selecionada a cultivar de planta de soja que após a pulverização com os COVs alteraram a resposta de comportamento e oviposição do percevejo-marrom. Assim, foi utilizada a cv Dowling no estágio R5 72 h após as pulverizações com os COVs e com controle (plantas tratadas com água destilada). As plantas foram recobertas individualmente com plástico poliestireno perfurado, sendo transferido para cada planta 20 ninfas de 2º instar do percevejo marrom (*E. heros*) obtidos conforme descrito (item 3.3). Para cada tratamento foram utilizadas oito repetições. As plantas foram observadas diariamente para registro do período ninfal dos percevejos. As mudanças de instar foram consideradas quando mais de 50% dos indivíduos realizaram a ecdise. Os adultos foram obtidos separados por sexo com base na morfologia externa da genitália (BORGES et al., 2006). Sendo posteriormente pesados com uso de uma balança analítica, após 24 h da ecdise e do endurecimento cuticular. Um macho e uma fêmea após serem pesados retornaram para a planta tratada. Foram feitas avaliações diárias para a determinação da sobrevivência de ninfas e adultos, e da longevidade dos adultos.

Para análise de mortalidade de ninfas e adultos entre as plantas pulverizadas com os COVs e plantas-controle, foi utilizada uma análise de variância (Anova) aplicando o teste de Tukey a 5%. Para a avaliação da sobrevivência foi utilizado o método de Kaplan-Meier que estima o tempo mediano de sobrevivência (TMS) e compara as curvas de sobrevivência pelo teste de Log-Rank.

## **2.7 Ensaio de alocação de biomassa em plantas de soja**

Para avaliar os efeitos das induções dos COVs na biomassa das plantas de soja, foram utilizadas plantas da cv Dowling e Jataí no estágio V3 após 72 horas da pulverização com os COVs e os controles, mantidos em sala climatizada (LD 12:12 h;  $25,0 \pm 2$  °C e  $65 \pm 10\%$  de umidade relativa). Após 15 dias a parte aérea e o sistema radicular foram pesados, em seguida colocadas em estufa à temperatura de 60 °C e mantidos durante 48 h, e quando retirados da estufa foram pesadas novamente a fim de se obter a matéria seca. Foram utilizadas oito plantas para cada tratamento.

Para avaliação do peso de matérias frescas e secas das plantas pulverizadas com os COVs e nas plantas-controle, foi utilizada uma análise de variância (Anova) aplicando o teste de Tukey a 5%. As análises foram realizadas no programa estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2009).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Resposta olfativa do percevejo marrom *E. heros*

No ensaio em olfatometria em Y, foi observado que as fêmeas do *E. heros* foram atraídas pelos voláteis liberados por plantas da cv Dowling pulverizadas com acetato de (*cis*)-3-hexenila na concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  M (Wald test  $\chi^2 = 4.19$ ,  $P=0,04$ ) (Figura 1), também foi observada atração para os voláteis liberados das plantas pulverizadas com salicilato de metila na concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  M (Wald test  $\chi^2 = 4.49$ ,  $P=0,03$ ) (Figura 1). Nos bioensaios realizados com as plantas-controle comparados com ar puro foi observado que as fêmeas preferiram os voláteis liberados pelas plantas (Wald test  $\chi^2 = 7.67$ ,  $P < 0,01$ ) (Figura 1).

Para a cv Jataí as fêmeas do percevejo responderam para os voláteis emitidos pelas plantas-controle em relação ao ar puro (Wald test  $\chi^2 = 7.67$ ,  $P < 0,01$ ) (Figura 2). Enquanto os voláteis emitidos pelas plantas da cv Jataí pulverizadas com salicilato de metila na concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  M não atraíram as fêmeas do percevejo *E. heros* em relação as plantas-controle (Figura 2).

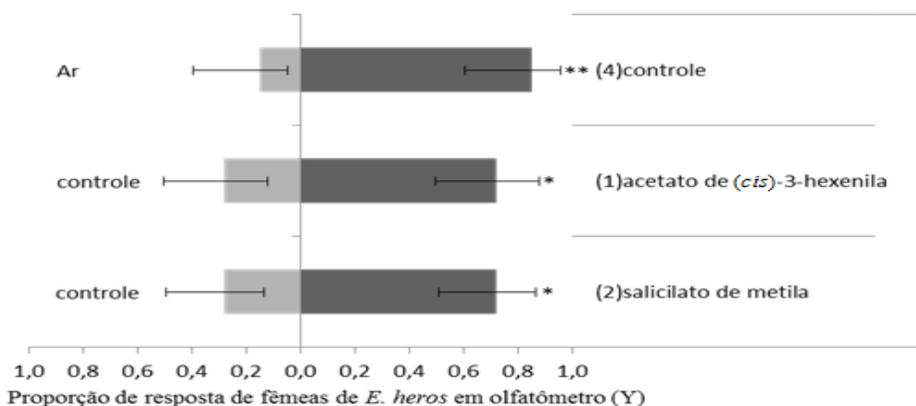


Figura 1 Proporção de respostas de fêmeas de *Euschistus heros* no olfatômetro em Y para a cv Dowling no estádio (R2) submetidas a diferentes tratamentos de exposição a COVs. Controle: água destilada. Tratamentos: salicilato de metila, acetato de (*cis*)-3-hexenila, em concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$ M. \*  $0,05 > P > 0,01$ ; \*\*  $0,01 > P > 0,001$  pelo teste de ( $\chi^2$ ) de Wald. Números entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum dos tratamentos apresentados. Com total de bioensaios: 42 (salicilato de metila); 41 (acetato de (*cis*)-3-hexenila; 24 (controle (água destilada))

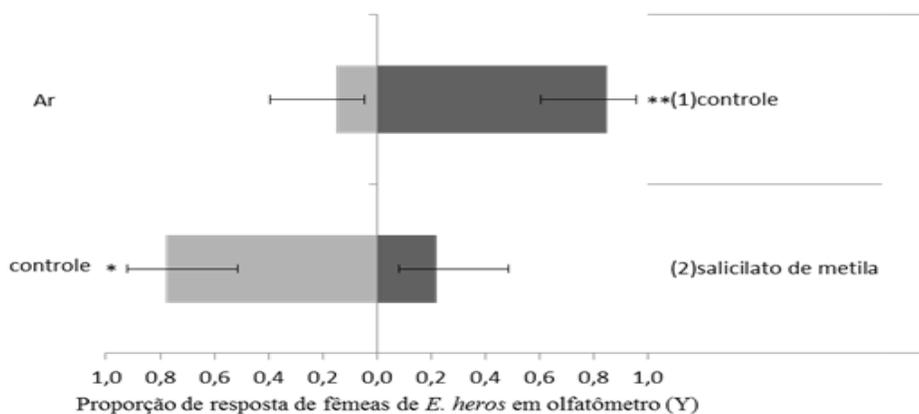


Figura 2 Proporção de respostas de fêmeas de *Euschistus heros* no olfatômetro em Y para a cv Jataí no estádio (R2) submetidas ao tratamento de exposição ao COV. Controle: água destilada. Tratamentos: salicilato de metila em concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$ M. \*  $0,05 > P > 0,01$ ; \*\*  $0,01 > P > 0,001$  pelo teste de ( $\chi^2$ ) de Wald. Número entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum dos tratamentos apresentados. Com total de bioensaios: 42 (salicilato de metila); 21 (controle (água destilada))

### 3.2 Efeitos dos COVs na oviposição do percevejo *E. heros*

Para a cv Dowling nos teste de oviposição com chance de escolha as fêmeas de *E. heros* colocaram número de ovos semelhantes ( $F_{3,56}=2,16$ ,  $P=0,10$ ) entre as plantas pulverizadas com os COVs e controles. Foi observada variação no número de posturas ( $F_{3,56}=3,16$ ,  $P=0,01$ ) entre as plantas pulverizadas com os COVs e plantas-controle (Figura 3). No teste sem chance de escolha, houve diferença significativa no número de ovos encontrados em relação ao tratamento de COVs aplicado ( $F_{3,56}=3,87$ ,  $P=0,01$ ). Entretanto, não houve diferença no número de postura por planta entre os COVs pulverizados ( $F_{3,56}=2,42$ ,  $P=0,07$ ) (Figura 4).

Para a cv Jataí no teste de oviposição com chance de escolha não foi observada diferença entre o número de ovos ( $F_{2,42}=0,76$ ,  $P=0,47$ ) nem de posturas ( $F_{2,42}=1,03$ ,  $P=0,36$ ). Para o teste sem escolha também não houve diferença entre o número de ovos ( $F_{2,42}=1,52$ ,  $P=0,23$ ) e postura ( $F_{2,42}=1,04$ ,  $P=0,36$ ) realizadas pelas fêmeas de *E. heros*.

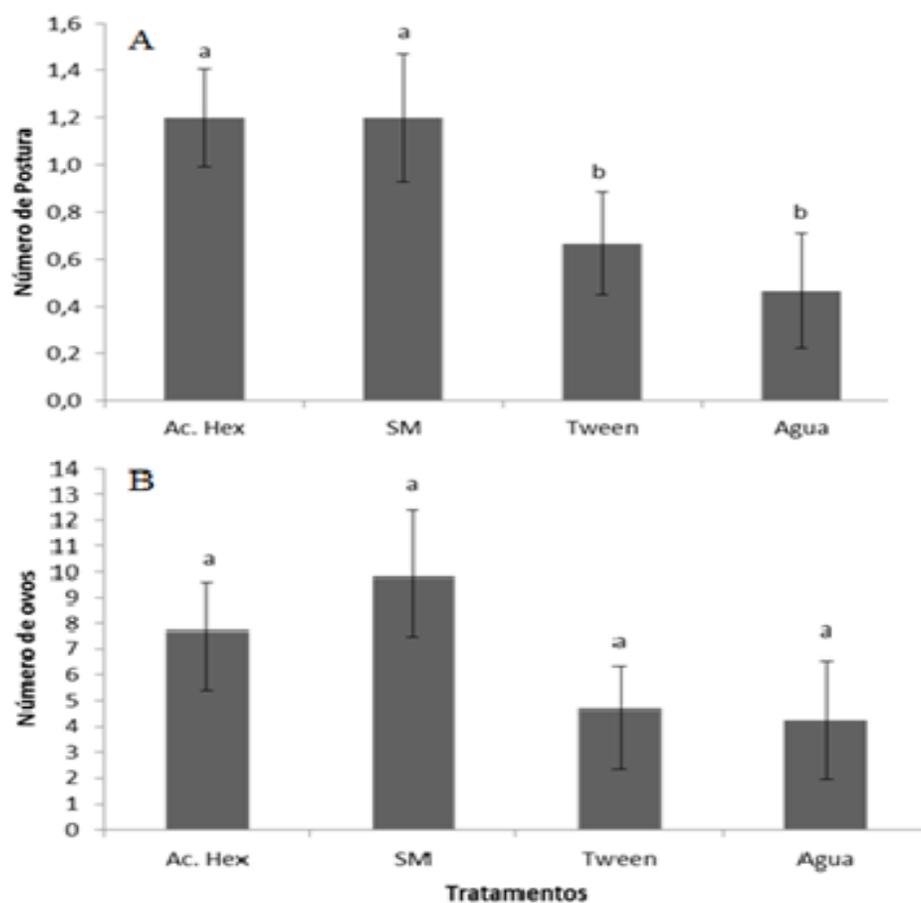


Figura 3 Número de posturas e número de ovos (média ± EP) de *Euschistus heros* na cultivar de soja Dowling no teste com chance de escolha, nas arenas. (A) Número de postura; (B) Número de ovos. As plantas foram pulverizadas com salicilato de metila (SM), acetato de (*cis*)-3-hexenila (Ac. Hex) na concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  M, e controles água destilada + Tween 20 (0,1%) e água destilada. Os dados foram transformados em  $\log(x+1)$  para as análises. Barras da variável seguidas pela mesma letra não diferiram significativamente entre si, pelo teste Tukey ( $P > 0.05$ )

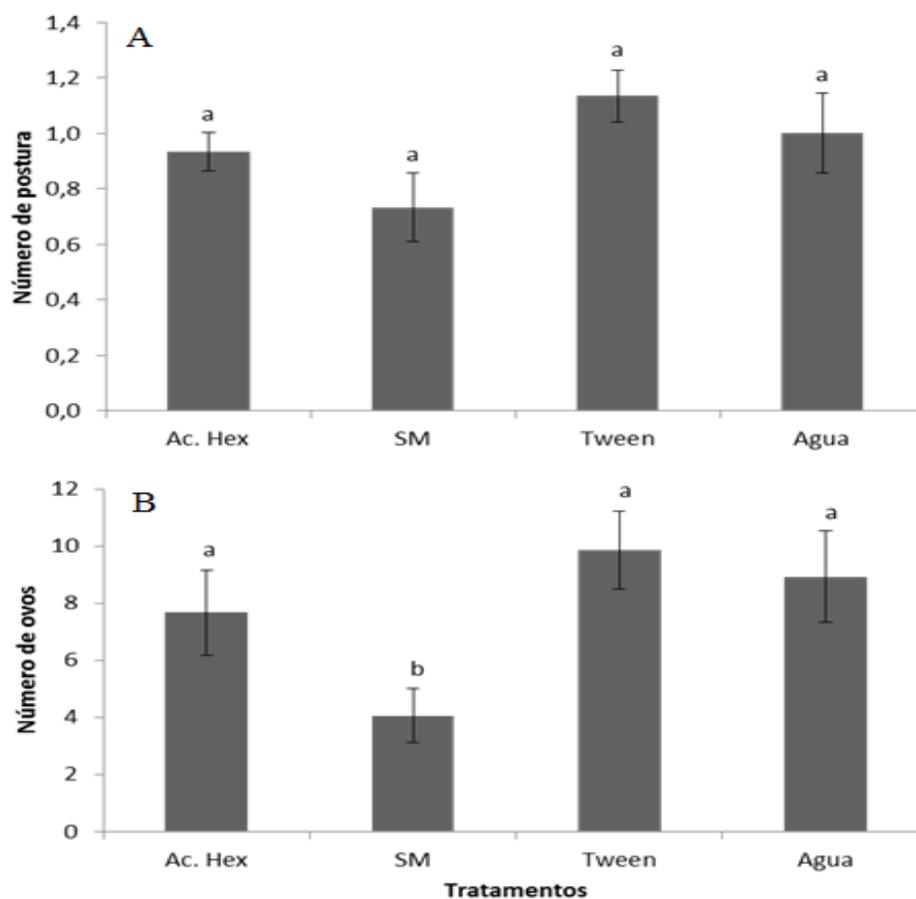


Figura 4 Número de posturas e número de ovos (média ± EP) de *Euschistus heros* na cultivar de soja Dowling no teste sem chance de escolha, nas arenas. (A) Número de postura; (B) Número de ovos. As plantas foram pulverizadas com salicilato de metila (SM), acetato de (*cis*)-3-hexenila (Ac. Hex) na concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  M, e controles água destilada + Tween 20 (0,1%) e água destilada. Os dados foram transformados em  $\log(x+1)$  para as análises. Barras da variável seguidas pela mesma letra não diferiram significativamente entre si, pelo teste Tukey ( $P>0.05$ )

### 3.3 Desenvolvimento ninfal do percevejo marrom *E. heros* em plantas de soja

As plantas pulverizadas com o salicilato de metila e acetato de (*cis*)-3-hexenila afetaram o desenvolvimento de *E. heros* (Tabela 1). Essa diferença foi observada apenas no quinto instar ninfal do (5° instar:  $F_{3,25}=4,54$ ,  $P=0,01$ ) e para a fase ninfal completa ( $F_{3,25}=6,13$ ,  $P=0,002$ ) não sendo observada para as demais fases ciclo de desenvolvimento (3° instar:  $F_{3,25}=2,19$ ,  $P=0,11$ ; 4° instar:  $F_{3,25}=1,29$ ,  $P=0,29$ ), e para o período total de 3° instar a adulto ( $F_{3,25}=0,51$ ,  $P=0,676$ ), quando o desenvolvimento das ninfas nos diferentes tratamentos cultivares foi comparado.

Tabela 1 Valores médios ( $\pm$  EP) da duração do período ninfal, do terceiro ao quinto instar e do desenvolvimento do terceiro instar a adulto, de *Euschistus heros* em plantas de soja da cv Dowling pulverizadas com salicilato de metila, acetato de (*cis*)-3-hexenila nas concentrações de  $1,0 \times 10^{-3}$  M e controles água destilada + Tween 20 (0,1%) e água destilada ( $27 \pm 1$  °C, UR  $65 \pm 10$  % e fotofase de 14 hr)

Duração (dias)	Dowling			
	Salicilato de metila	Acetato de ( <i>cis</i> )-3-hexenila	Água destilada + Tween 20	Água destilada
3° instar	3,75 $\pm$ 0,17 a	3,75 $\pm$ 0,17 a	3,37 $\pm$ 0,19 a	3,2 $\pm$ 0,22 a
4° instar	3,75 $\pm$ 0,17 a	4,00 $\pm$ 0,00 a	4,0 $\pm$ 0,20 a	4,2 $\pm$ 0,22 a
5° instar	5,75 $\pm$ 0,26 a	5,62 $\pm$ 0,19 a	5,0 $\pm$ 0,20 b	4,8 $\pm$ 0,22 b
Fase ninfal	12,37 $\pm$ 0,33 b	13,25 $\pm$ 0,19 a	13,37 $\pm$ 0,19 a	12,2 $\pm$ 0,22 b
3° instar-adulto	16,5 $\pm$ 1,41 a	18,62 $\pm$ 1,24 a	17,87 $\pm$ 1,39 a	18,2 $\pm$ 1,78 a

\* Linhas seguidas pela mesma letra não diferiram significativamente entre si, pelo teste Tukey ( $P > 0,05$ ).

Não houve diferença significativa entre os pesos de fêmeas ( $F_{2,18}=1,13$ ,  $P=0,34$ ) e de machos ( $F_{2,18}=2,75$ ,  $P=0,09$ ) mantidos nas plantas pulverizadas com os COVs (Tabela 2). As fêmeas cujas ninfas se alimentaram nas plantas pulverizadas com acetato de (*cis*)-3-hexenila viveram por menos tempo, diferindo estatisticamente da longevidade dos adultos mantidos nas plantas-controlé água destilada + Tween 20 e água destilada (fêmeas:  $F_{2,18}=5,15$ ,  $P=0,01$ ; machos:  $F_{2,18}=2,99$ ,  $P=0,07$ ) (Tabela 2).

Tabela 2 Valores médios ( $\pm$  EP) da longevidade (dias) e peso (mg) de fêmeas e machos de *Euschistus heros*, provenientes das ninfas alimentadas em plantas de soja da cv Dowling pulverizadas com salicilato de metila, acetato de (*cis*)-3-hexenila nas concentrações de  $1,0 \times 10^{-3}$  M e controles água destilada + Tween 20 (0,1%) e água destilada ( $27 \pm 1$ oC, UR  $65 \pm 10$  % e fotofase de 14 hr)

	Dowling			
	Salicilato de metila	Acetato de ( <i>cis</i> )-3-hexenila	Água destilada + Tween 20	Água destilada
Longevidade da fêmea (dias)	-	3,37 $\pm$ 1,00 b	5,37 $\pm$ 0,56 a	6,6 $\pm$ 0,83 a
Peso da fêmea (mg)	-	49,56 $\pm$ 1,8 a	55,79 $\pm$ 4,52 a	56,69 $\pm$ 3,85 a
Longevidade do macho (dias)	-	3,37 $\pm$ 0,44 a	4,12 $\pm$ 0,65 a	5,4 $\pm$ 0,67 a
Peso do macho (mg)	-	48,40 $\pm$ 2,99 a	55,40 $\pm$ 2,29 a	53,21 $\pm$ 1,76 a

\* Linhas seguidas pela mesma letra não diferiram significativamente entre si, pelo teste Tukey ( $P > 0.05$ )

- Ausência de percevejos adultos causado pela morte durante a última ecdise.

Na comparação das curvas, constatou-se que o percevejo sobreviveu significativamente mais tempo nas plantas pulverizadas com Tween em relação às plantas pulverizadas com acetato de (*cis*)-3-hexenila, salicilato de metila e água destilada (teste de Log-rank,  $P=0,011$ ).

Diferenças marcantes entre as curvas de sobrevivência somente foram verificadas após 12 dias do início do experimento, com rápido declínio na sobrevivência dos insetos alimentados nas plantas de soja pulverizadas com salicilato de metila que culminou com a morte de todos os indivíduos no 22º dia (Figura 5).

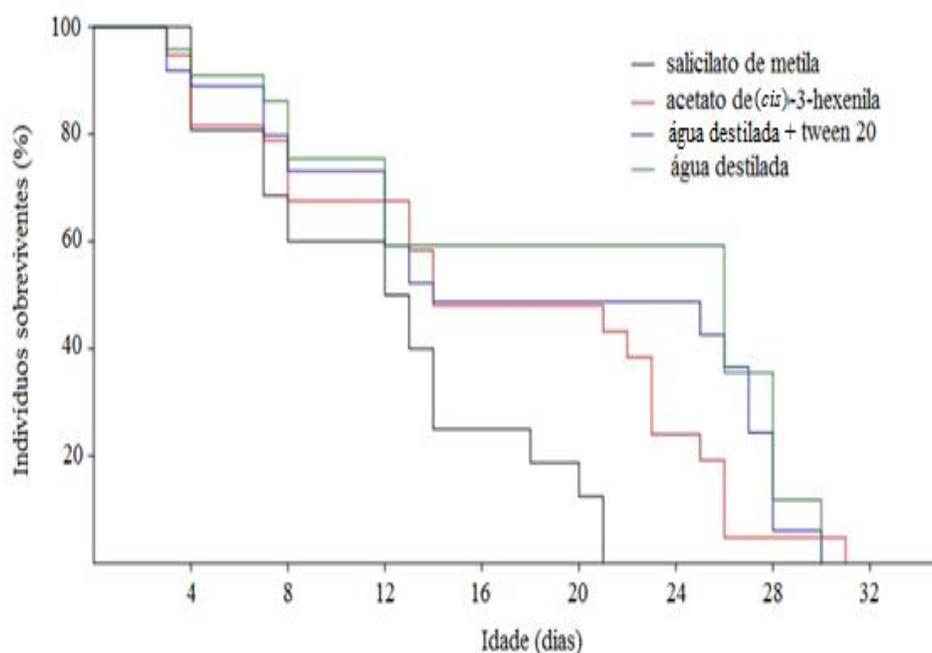


Figura 5 Curvas de sobrevivência de *Euschistus heros* (ninfas e adultos) ao longo de 31 dias de alimentação com plantas da cv Dowling pulverizadas com salicilato de metila, acetato de (*cis*)-3-hexenila na concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  M, e controles água destilada + Tween 20 (0,1%) e água destilada

### 3.4 Ensaio de alocação de biomassa em plantas de soja

As pulverizações com os COVs não afetaram o desenvolvimento das plantas de soja da cv Dowling quanto à biomassa da parte aérea: peso da folha fresca ( $F_{3,28}=2,68$ ,  $P=0,06$ ) e peso da folha seca ( $F_{3,28}=2,40$ ,  $P=0,08$ ) e na biomassa do sistema radicular: peso da raiz fresca ( $F_{3,28}=1,46$ ,  $P=0,24$ ) e peso da raiz seca ( $F_{3,28}=1,61$ ,  $P=0,14$ ) (Tabela 4).

Também não foi observada diferença após as pulverizações na cv Jataí para a parte aérea: folha fresca ( $F_{2,21}=0,98$ ,  $P=0,39$ ) e folha seca ( $F_{2,21}=1,19$ ,  $P=0,32$ ) e no sistema radicular: raiz fresca ( $F_{2,21}=0,78$ ,  $P=0,46$ ) e raiz seca ( $F_{2,21}=1,53$ ,  $P=0,23$ ) (Tabela 5).

#### 4 DISCUSSÃO

Os resultados indicam que a resposta das plantas aos COVs sintéticos acetato de (*cis*)-3-hexenila e salicilato de metila induz alterações na produção e liberação de voláteis para a cv Dowling que podem atrair as fêmeas do percevejo marrom *E. heros*. Verificamos que os COVs também alteram a oviposição de fêmeas do percevejo, e o ciclo de desenvolvimento das ninfas e adultos. A indução das plantas em baixa concentração não reduz a capacidade de crescimento inicial da planta.

As alterações na produção de voláteis ocasionadas pelos COVs, também podem afetar os herbívoros (THEIS; LERDAU; RAGUSO, 2007). Para tanto, a exposição aos COVs sintéticos sinalizam para as plantas a necessidade de preparação das defesas, com alterações no metabolismo secundário na maioria das vezes (GLINWOOD; NINKOVIC; PETTERSSON, 2011).

A partir disto, verificamos a hipótese de que os COVs sintéticos alteram o perfil de voláteis das plantas tratadas (artigo 1) e esses odores afetam no comportamento do percevejo marrom *E. heros*. Observamos que os dois COVs induziram modificações na liberação de voláteis, e com isso a atração das fêmeas do percevejo marrom para as plantas da cv Dowling. Entretanto, para a cv Jataí não foi observada atração. Esse fato pode estar relacionado à resistência genética de cada cultivar, as quais apresentam maior potencial na ativação do metabolismo secundário, enquanto as cultivares suscetíveis têm essa capacidade restrita a determinadas vias do metabolismo (CARRÃO-PANIZZI; KITAMURA, 1995; PIUBELLI et al., 2003b).

Durante a ativação da defesa das plantas ocorre uma cascata de reações que resultam no acúmulo de compostos com baixa volatilidade nos diferentes tecidos das plantas. No caso da soja os compostos, por exemplo, os flavonoides estão envolvidos neste processo de indução e armazenamento, e resistência a

insetos herbívoros (PIUBELLI et al., 2003a). Nas plantas de soja é comum a produção de isoflavonoides com concentrações variáveis de acordo com fatores genéticos e de desenvolvimento da planta (CARRÃO-PANIZZI; KITAMURA, 1995). Em geral, alguns desses compostos podem afetar negativamente a alimentação e subsequente o desenvolvimento dos insetos (FISCHER; KOGAN; PAXTON, 1990; KOGAN; FISCHER, 1991). Talvez, isso indique que as fêmeas não selecionam de maneira adequada o sítio de oviposição, ou que provavelmente os compostos flavonoides produzidos e acumulados nos tecidos das plantas podem confundir as fêmeas após o primeiro dano de herbivoria também conhecida como picada de prova, quanto aos sítios de oviposição mais adequados, assim como os locais de alimentação (SIMMONDS, 2001).

A baixa qualidade nutricional ou presença de antibióticos e outras toxinas podem ter desfavorecido o desenvolvimento do período ninfal de *E. heros* mantidos nas plantas da cv Dowling pulverizadas com o salicilato de metila e plantas-controle. A redução no período ninfal observada pode estar associada aos diferentes mecanismos que são ativados após a exposição aos indutores de resistência, principalmente para os derivados do ácido salicílico que ativam a rota do ácido chiquímico responsável pela produção de vários isoflavonoides (AN; MOU, 2011). Esses compostos químicos são produzidos em grande quantidade em plantas de soja, entre eles rutina e genistina, compostos deterrentes que afetam o desenvolvimento de insetos (CARRÃO-PANIZZI; KITAMURA, 1995; PIUBELLI et al., 2003b). A redução no período ninfal dos percevejos, nas plantas pulverizadas com água destilada, comparada com as plantas pulverizadas com os COVs, está associada à resistência natural da cultivar para afídeo (LI; HILL; HARTMAN, 2004).

Em geral, durante o quinto instar as ninfas de *E. heros* são mais suscetíveis à qualidade nutricional dos alimentos (PANIZZI; ROSSINI, 1987). Este fato explica que as pulverizações das plantas com os COVs pode ter

provocado alteração nos mecanismos de defesa nas plantas, como a produção de um alimento de menor qualidade nutricional ou acúmulo de toxinas. No último estágio ninfal há mudanças fisiológicas e morfológicas com intensa atividade bioquímica que envolve enzimas essenciais e hormônios que permitem a transformação das ninfas em insetos adultos (PANIZZI; PARRA, 1991), sendo assim neste estágio há maior necessidade de qualidade nutricional das plantas.

Muitas vezes o acúmulo de toxinas nos insetos acontece lentamente, porém após períodos críticos de mudanças intensas, por exemplo, a transformação durante o processo de ninfa e adulto, os bloqueios de atividade enzimática, podem afetar a longevidade dos adultos (HOFFMANN-CAMPO; MAZZARIN; LUSTOSA, 1994; PIUBELLI et al., 2003b). Foi observado que as ninfas mantidas em plantas pulverizadas com o salicilato de metila chegaram a realizar a última ecdise para fase adulta, porém os indivíduos não sobreviveram. Foi verificada uma menor longevidade das fêmeas de *E. heros* alimentadas em plantas pulverizadas com o acetato de (*cis*)-3-hexenila comparado com as plantas-controle. Isso demonstra que os COVs apresentam capacidade de indução de defesa em plantas, a partir de mecanismos diferentes de ativação, que resulta em alimento inadequado, e quando associado à restrição do percevejo na planta causam distúrbios fisiológicos no herbívoro, também pode prolongar o ciclo que expõe os insetos a seus inimigos naturais por mais tempo, sob condições de estresse e com suscetibilidade mais elevada (HOFFMANN-CAMPO; GAZZONI; TOLEDO, 1996).

As ativações do metabolismo secundário, o qual resulta na produção de diversos compostos químicos voláteis e sistêmicos podem acarretar um alto custo energético para a planta (HEIDEL; BALDWIN, 2004; VAN HULTEN et al., 2006). Observamos que as plantas da cv Dowling e da cv Jataí com os COVs possuem quantidade de biomassa vegetal: parte aérea e sistema radicular, semelhantes às plantas-controle. Isso demonstra que a indução em baixa

concentração não afeta o desenvolvimento da planta no estágio V3, apesar do consumo energético para ativação do metabolismo secundário.

Deste modo os resultados demonstram que as plantas de soja pulverizadas com o acetato de (*cis*)-3-hexenila e salicilato de metila sintéticos interferem na atração, na preferência de locais para oviposição e no desenvolvimento dos imaturos do percevejo marrom *E. heros*. Embora o metabolismo secundário tenha alterações na produção de metabólitos, o crescimento inicial da planta não é prejudicado após a pulverização com os COVs sintéticos.

**REFERÊNCIAS**

AN, C.; MOU, Z. Salicylic acid and its function in Plant Immunity. **Journal of Integrative Plant Biology**, Cas, v. 53, n. 6, p. 412–428, June 2011.

BALDWIN, I. T. Plant volatiles. **Current Biology**, Cambridge, v. 20, n. 9, p. 392-397, May 2010.

BATISTA FILHO, A. et al. Manejo integrado de pragas em soja: Impacto de inseticidas sobre inimigos naturais. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 61-67, Jan./Mar. 2003.

BORGES, M. et al. **Metodologias de criação e manejo de colônias de percevejos da soja (Hemiptera-Pentatomidae) para estudos de comportamento e ecologia química**. Brasília: Embrapa – Cenargen, 2006. 18 p.

BOWLES, D. J. Defense-related proteins in higher plants. **Annual Review Biochemistry**, Stanford, v. 59, p. 873–907, 1990.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; KITAMURA, K. Isoflavone content in Brazilian soybean cultivars. **Breeding Science**, Tsukuba, v. 45, p. 295–300, 1995.

DICKE, M. Behavioural and community ecology of plants that cry for help. **Plant, Cell & Environment**, Logan, v. 32, n. 6, p. 654–665, June 2009.

FARAG, M. A.; PARÉ, P. W. C6-green leaf volatiles trigger local and systemic VOC emissions in tomato. **Phytochemistry**, Washington, v. 61, n. 5, p. 545-554, Nov. 2002.

FEHR, W. R. et al. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Science**, Davis, v. 11, n. 6, p. 929-931, Nov. 1971.

FISCHER, D. C.; KOGAN, M.; PAXTON, J. D. Effect of glyceollin, a soybean phytoalexin, on feeding by three phytophagous beetles (Coleoptera: Coccinellidae): Dose e response. **Environmental Entomology**, State College, v. 19, n. 5, p. 78–82, Oct. 1990.

GLINWOOD, R.; NINKOVIC, V.; PETTERSSON, J. Chemical interaction between undamaged plants – effects on herbivores and natural enemies. **Phytochemistry**, Washington, v. 72, n. 13, p. 1683–1689, Sept. 2011.

HEIDEL, A. J.; BALDWIN, I. T. Microarray analysis of salicylic acid- and jasmonic acid-signalling in responses of *Nicotiana attenuata* to attack by insects from multiple feeding guilds. **Plant, Cell & Environment**, Logan, v. 27, n. 11, p. 1362–1373, Nov. 2004.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; GAZZONI, D. L.; TOLEDOP, J. F. F. Comparação de métodos para avaliação de linhagens de soja (*Glycine max* Merrill) resistentes a percevejos (Hemiptera: Pentatomidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 5, p. 305-316, Maio 1996.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MAZZARIN, R. M.; LUSTOSA, P. R. Mecanismos de resistência de genótipos de soja: Teste de não preferência para *Anticarsia Gemmatalis* Hubner, 1818 (Lep.: Noctuidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 513-519, Abr. 1994.

KOGAN, M.; FISHER, D. C. Inducible defenses in soybean against herbivorous insects. In: TALLAMY, D. W.; RAUPP, M. J. (Ed.). **Phytochemical induction by herbivorous insects**. New York: J. Wiley & Sons, 1991. p. 347–380.

LI, Y.; HILL, C. B.; HARTMAN, G. L. Effect of three resistant soybean genotypes on the fecundity, mortality, and maturation of Soybean Aphid (Homoptera: Aphididae). **Journal of Economic Entomology**, Riverside, v. 97, n. 3, p. 1106-1111, June 2004.

MCCONNAUGHAY, K. D. M.; COLEMAN, J. S. Biomass allocation in plants: ontogeny or optimality? A test along three resource gradients. **Ecology**, Davis, v. 80, n. 8, p. 2581-2593, Dec. 1999.

MICHEREFF, M. F. F. et al. Volatiles mediating a plant-herbivore-natural enemy interaction in resistant and susceptible soybean cultivars. **Journal of Chemical Ecology**, Tampa, v. 37, n. 3, p. 273–285, Mar. 2011.

MITHOFER, A.; BOLAND, W. Plant defense against herbivores: chemical aspects. **Annual Review of Plant Biology**, Stanford, v. 63, p. 431–450, Feb. 2012.

MORAES, M. C. B. et al. Induced volatiles in soybean and pigeon pea plants artificially infested with the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, and their effect on the egg parasitoid, *Telenomus podisi*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 115, n. 1, p. 227-237, Apr. 2005.

NINKOVIC, V. Volatile communication between barley plants affects biomass allocation. **Journal of Experimental Botany**, Colchester, v. 54, n. 389, p. 1931-1939, June 2003.

PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. **Ecologia nutricional dos insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole, 1991. 359 p.

PANIZZI, A. R.; ROSSINI, M. C. Impacto de várias leguminosas na biologia de ninfas de *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 47, p. 507–512, 1987.

PIUBELLI, G. C. et al. Flavonoid increase in soybean as a response to *Nezara viridula* injury and its effect on insect-feeding preference. **Journal of Chemical Ecology**, Tampa, v. 29, n. 5, p. 1223-1233, May 2003a.

PIUBELLI, G. C. et al. Nymphal Development, Lipid Content, Growth and Weight Gain of *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) Fed on soybean Genotypes. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 127-132, Jan./Mar. 2003b.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2009. 409 p.

SIMMONDS, M. S. J. Importance of flavonoids in insect–plant interactions: Feeding and oviposition. **Phytochemistry**, Washington, v. 56, n. 3, p. 245–252, Feb. 2001.

SOSA-GÓMEZ, D. R. et al. Insecticide susceptibility of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae) in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, Riverside, v. 102, n. 3, p. 1209–1216, June 2009.

THEIS, N.; LERDAU, M.; RAGUSO, R. A. The challenge of attracting pollinators while evading floral herbivores: patterns of fragrance emission in *Cirsium arvense* and *Cirsium repandum* (asteraceae). **International Journal of Plant Sciences**, Glencoe, v. 168, n. 5, p. 587–601, 2007.

VAN HULTEN, M. et al. Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 14, p. 5602–5607, Apr. 2006.

**ARTIGO 2 - Alteração do perfil de voláteis de plantas de soja induzidos pela aplicação de COVs e no comportamento de busca do parasitoide de ovos *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Platygasteridae)**

**RESUMO**

As plantas liberam compostos orgânicos voláteis que podem ativar a defesa em plantas, além de interferir no comportamento dos inimigos naturais. No presente estudo o objetivo foi avaliar a emissão de voláteis de plantas de soja *Glycine max* L. (Fabales: Fabaceae) nos estádios vegetativo (V3) e reprodutivo (R2), pulverizadas com COVs sintéticos e a sua interação com o parasitoide de ovos *Telenomus podisi*. Foram utilizadas três diferentes cultivares de soja, uma resistente a pulgão Dowling e duas suscetíveis BR-16 e Jataí. As plantas foram pulverizadas com os compostos: acetato de (*cis*)-3-hexenila, salicilato de metila, (*cis*)-jasmona, e (*trans*)-2-octen-1-ol. Os experimentos realizados visavam responder as seguintes hipóteses: (i) as plantas de soja tratadas pelos COVs têm a sua defesa induzida (ii) alterações induzidas pelos COVs na emissão dos voláteis afetam a atração do *T. podisi*. Os resultados indicaram que os compostos: acetato de (*cis*)-3-hexenila e salicilato de metila afetam a produção e liberação das misturas de COVs, sendo os principais compostos induzidos na soja: acetato de (*cis*)-3-hexenila, (*trans*)- $\beta$ -ocimeno, (*trans,trans*)- $\alpha$ -farneseno e (*trans,trans*)-4,8,12-trimetil-1,3(*trans*),7(*trans*),11-tridecatetrae (TMTT), e a mudança no perfil químico de voláteis da soja agem na atração do parasitoide de ovo *T. podisi*. Assim, as plantas induzidas pela exposição aos COVs alteram as principais vias do metabolismo secundário para produção de voláteis, e essa resposta da planta interfere no comportamento do parasitoide.

Palavras-chave: Semioquímicos. Interações tritróficas. Parasitoide de ovos. *G.max*.

**ARTICLE 2 - Change of soybean plant volatiles profile induced by the VOCs application and in the seeking behavior of parasitoid eggs *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Platygasteridae)**

**ABSTRACT**

Plants release volatile organic compounds that can activate the defense in plants, and interfere in the behavior of the natural enemies. In this study the objective was to evaluate the emission of volatile soybean plants *Glycine max* L. (Fabales: Fabaceae) in the vegetative (V3) and reproductive (R2), sprayed with synthetic VOCs and their interaction with the parasitoid egg *Telenomus podisi*. Three different soybean cultivars were used one resistant to aphid Dowling and two susceptible BR-16 and *Jataí*. The plants were sprayed with the compounds: (*cis*)-3-hexenyl acetate, methyl salicylate, (*cis*)-jasmona and (*trans*)-2-octen-1-ol. The experiments conducted aimed at answering the following assumptions: (i) soybean plants treated by VOCs have their induced defense (ii) changes induced by VOCs in the volatile emission affect the attraction of *T. podisi*. The results indicated that the compounds: (*cis*)-3-hexenyl acetate and methyl salicylate affect the production and release of mixtures of VOCs, being the main compounds induced in soybean: (*cis*)-3-hexenyl acetate (*trans*)- $\beta$ -ocimene, (*trans*, *trans*)- $\alpha$ -farnesene and (*trans*, *trans*)-4,8,12-trimethyl-1,3(*trans*),7(*trans*),11-tridecatetraene (TMTT), and the change in the chemical profile of soy volatile act on the attraction of the egg parasitoid *T. podisi*. Thus, plants induced by exposure to VOCs alter the main pathways of secondary metabolism for the volatile production and this plant response interferes in the parasitoid behavior.

Keywords: Semiochemicals. Tritrophic interactions. Egg parasitoid. *G. max*.

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas produzem e liberam uma variedade de compostos orgânicos voláteis (COVs) de acordo com as necessidades fisiológicas. Esses compostos podem mediar várias interações ecológicas, desde alterar o comportamento de predadores e parasitoides até ativar genes de defesa em plantas saudáveis (ERB; FORESTI; TURLINGS, 2010; KOST; HEIL, 2006). A emissão de COVs acontece durante todo o ciclo da planta, porém quando o tecido é danificado por herbívoros e patógenos, existe uma maior liberação de voláteis que facilita a atração de inimigos naturais. Desse modo, os COVs realizam importante função como mediadores entre as plantas e o ambiente (KESSLER et al., 2013; NINKOVIC, 2003; RODRIGUEZ; ALQUÉZAR; PEÑA, 2013).

Sabe-se que muitos desses voláteis são capazes de atrair inimigos naturais (GLINWOOD et al., 2009; MICHEREFF et al., 2011; MORAES et al., 2009), mas é limitado o número de trabalhos relativos a determinações de quais COVs e suas concentrações que são capazes de ativar o sistema de defesa nas plantas (FARAG et al., 2005; FARAG; PARÉ, 2002; MORAES et al., 2009; PRESTON; LAUE; BALDWIN, 2001). As plantas apresentam mecanismos de resistência variados, sendo considerada suscetível a injúrias provocadas por insetos herbívoros ou com moderada resistência em razão do processo de ativação da defesa. Piubelli et al. (2003) verificaram a suscetibilidade de plantas de soja (*Glycine max*) cv BR-16 ao percevejo verde *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae), contudo Moraes et al. (2009) verificaram que os parasitoides de ovos *T. podisi* respondem para os voláteis das plantas da cv BR-16 após a exposição ao hormônio vegetal (*cis*)-jasmona. É possível verificar nos exemplos anteriores que, o mecanismo de ativação da defesa em determinada planta decorre do nível

de estresse no tecido, que altera o metabolismo com efeito direto sobre o herbívoro ou influenciam na resposta de inimigos naturais, principalmente, quando as plantas são induzidas por COVs sintéticos.

Os COVs indutores ativam uma complexa rede de sinalização de diversas vias do metabolismo secundário da planta (DICKE; BALDWIN, 2010; DUDAREVA et al., 2006; FINESCHI et al., 2013; QUALLEY; DUDAREVA, 2008). Em geral, existem dois principais hormônios vegetais reguladores dessas vias de defesa. O ácido jasmônico que regula a via dos octadecanoides, sendo esta responsável pela produção dos voláteis de folhas verdes, a via dos terpenos, com produção dos terpenoides, a segunda via é regulada pelo ácido salicílico que regula a produção dos compostos aromáticos (AMENT et al., 2004; AN; MOU, 2011). Quando ocorre ativação do sistema de defesa, em geral, é induzida a produção de uma mistura de voláteis, com compostos pertencentes aos seguintes grupos: voláteis de folhas verdes (VFVs), terpenoides e aromáticos (ALBORN et al., 1997; ARIMURA; KOST; BOLAND, 2005; BERNASCONI et al., 1998; ENGELBERTH et al., 2004; HEIL; KOST, 2006; MATTIACCI; DICKE; POSTHUMUS, 1995; TURLINGS; TUMLINSON; LEWIS, 1990). A ativação das duas vias de hormônios vegetais resulta em diferenças quantitativas e qualitativas nos voláteis produzidos e liberados pelas plantas (AMENT et al., 2004; ENGELBERTH et al., 2001; HORIUCHI et al., 2003; OZAWA et al., 2000; SCHMELZ et al., 2003).

Os voláteis liberados pelas plantas interferem no comportamento dos inimigos naturais com atração ou repelência, principalmente dos parasitoides que utilizam esses odores como pistas químicas para localização do hospedeiro. Alguns autores verificaram a atração do parasitoide de ovos *T. podisi* para voláteis de plantas com elevadas concentrações de monoterpenos e sesquiterpenos em plantas de soja

(MORAES et al., 2009), sendo que o (*trans,trans*)- $\alpha$ -farneseno é um dos principais compostos responsáveis pela atração de *T. podisi* (MICHEREFF et al., 2011).

No presente estudo o objetivo foi avaliar a emissão de voláteis de plantas de soja *G. max* induzidas por COVs nos estágios vegetativo (V3) e reprodutivo (R2) e a sua interação com o parasitoide *T. podisi*. O sistema estudado se baseia nas seguintes hipóteses: (i) o tratamento de plantas de soja com os COVs acetato de (*cis*)-3-hexenila ou salicilato de metila induzem a produção de misturas específicas de voláteis (ii) as misturas de voláteis específicos, induzidos pelos COVs acetato de (*cis*)-3-hexenila, salicilato de metila, (*cis*)-jasmona e (*trans*)-2-octen-1-ol atraem o parasitoide de ovos *T. podisi*. Os resultados indicam que os COVs afetam a produção dos voláteis em plantas de soja e agem na atração do parasitoide de ovos *T. podisi*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Preparação das plantas

As sementes de soja, *Glycine max* da cultivar “Dowling” (resistente), “Jataí” e “BR-16” (suscetíveis), foram cultivadas em mistura de solo esterilizado e substrato orgânico (Plantmax<sup>®</sup>) (proporção de 1:1), mantidas em condições controladas em casa de vegetação (Temperatura de  $27 \pm 6$  °C e umidade relativa de  $65 \pm 10\%$ ). As plantas no estágio fisiológico V3 e R2 foram utilizadas nos ensaios de defesa indireta (FEHR et al., 1971).

### 2.2 Preparação das soluções com voláteis sintéticos de plantas

As plantas pulverizadas foram utilizadas para coleta de voláteis e bioensaios após 72 h da pulverização com os COVs. Os COVs sintéticos, acetato de (*cis*)-3-hexenila, salicilato de metila, (*trans*)-2-octen-1-ol, (*cis*)-jasmona, foram solubilizados em solução de água destilada + óleo vegetal adjuvante 0,1% (Tween<sup>®</sup> 20; Sigma-aldrich, EUA) nas concentrações de  $1,0 \times 10^{-3}$ M e  $1,0 \times 10^{-5}$ M. Os tratamentos controles foram água destilada e água destilada + Tween 20 (0,1%). Os COVs foram adquiridos como padrões sintéticos puros da Sigma-aldrich (Steinheim, Alemanha). Os compostos utilizados foram selecionados porque são os principais compostos induzidos por *E. heros* em soja das cultivares Dowling e IAC 100 (MICHEREFF et al., 2011), e as concentrações por resultados observados em trabalhos preliminares. As plantas das cultivares preparadas como descrito, foram submetidas aos tratamentos por pulverização uniforme, até o ponto de escorrimento da solução nas folhas tratadas para o

estádio V3 com volume aproximado de 8 mL e para o estágio R2 com volume aproximado de 16 mL.

### **2.3 Parasitoide de ovos, *Telenomus podisi***

O parasitoide de ovos, *T. podisi*, foi obtido da criação em laboratório da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, Brasil), mantido em potes de acrílico (frasco de cultura de tecidos 25 cm<sup>2</sup>, ICN Biomedicals) e alimentados com gotas de mel fornecidas uma vez por semana, sendo separados diariamente macho e fêmea recém-emergidos. Os bioensaios de resposta comportamental foram realizados com fêmeas adultas (1 dia de idade) acasaladas.

### **2.4 Resposta olfativa do parasitoide de ovos, *T. podisi***

Para determinar a resposta olfativa do parasitoide, utilizou-se um olfatômetro na forma de Y, constituído de uma placa de acrílico (19 cm x 19 cm) com uma cavidade em forma de Y (corpo 8 cm; braços 7 cm cada; ângulo de 130° entre os braços; largura interna 1.5 cm), inserida entre duas placas de vidro: a superior translúcida e a inferior ofuscada, fixadas com cliques de papel conforme Moraes et al. (2005). As câmaras de vidro contendo plantas-controle (pulverizadas com água destilada) ou pulverizadas com as soluções de COVs foram conectadas ao olfatômetro com mangueira de silicone, que interligou o sistema com o umidificador de ar, filtro de carvão ativado e bombas de compressão e vácuo. O sistema gerou um fluxo de ar de entrada com 0,6 L/min regulado por um fluxômetro, e de saída o ar é succionado por uma bomba de vácuo ligada no extremo oposto à entrada de ar, e regulada com fluxo de 0,2 L/min.

Os movimentos do parasitoide foram monitorados por uma câmera de vídeo (CCD câmera Sony SPT M324CE; Sony, Minato-Ku, Tokyo, Japan com 12.5–75.0 mm/F1.8 zoom lens), para reduzir os efeitos de reflexão durante a captura das imagens, o olfatômetro foi iluminado na parte inferior por lâmpadas de infravermelho ( $\lambda = 950$  nm, 108 LEDs). As imagens capturadas foram digitalizadas utilizando uma placa de captura de vídeo (PC-Studio PCTV Pinnacle System) e os dados registrados e processados pelo software SACAM (JORGE et al., 2005).

Para cada bioensaio foi utilizada uma fêmea, apenas uma vez, sendo liberada dentro do olfatômetro e monitorada para registro da primeira escolha (permanência mínima de 20 segundos no braço escolhido) e o tempo de residência (tempo total de bioensaio de 600 seg). Cada planta foi utilizada para cinco fêmeas, invertendo-se a posição dos braços do olfatômetro para evitar o efeito residual das fontes de odor na escolha dos parasitoides.

A resposta das fêmeas de *T. podisi* para odores de plantas induzidas pelo tratamento com diferentes COVs de soja foi avaliada para cada cultivar no estádio (V3). As plantas foram tratadas com os COVs sintéticos na concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$ M e  $1,0 \times 10^{-5}$ M e posteriormente utilizadas nos bioensaios nas seguintes combinações:

Concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$ M:

- (1) (*cis*)-jasmona vs água destilada (controle);
- (2) acetato de (*cis*)-3-hexenila vs água destilada;
- (3) salicilato de metila vs água destilada;
- (4) (*trans*)-octen-1-ol vs água destilada;

Concentração de  $1,0 \times 10^{-5}$ M:

- (5) (*cis*)-jasmona vs água destilada;
- (6) acetato de (*cis*)-3-hexenila vs água destilada;

(7) salicilato de metila vs água destilada;

(8) (*trans*)-octen-1-ol vs água destilada;

Controle:

(9) água destilada + Tween 20 vs água destilada.

As combinações testadas com plantas de soja no estágio (R2) foram apenas os tratamentos que resultaram em atração das fêmeas dos parasitoides decorrentes dos ensaios no estágio (V3). Para cada combinação foram realizadas 40 repetições, exceto para combinação Tween 20 vs controle com 20 repetições. As plantas-controle e pulverizadas foram mantidas em salas diferentes (fotoperíodo de 12:12 h L:D; temperatura de  $27 \pm 2$  °C e umidade relativa de  $60 \pm 10\%$ ) até o momento de serem usadas nos experimentos, para evitar a sinalização química entre as plantas.

## 2.5 Coleta e análise de voláteis das plantas de soja

Os voláteis foram coletados somente dos tratamentos que mudaram o comportamento de busca do parasitoide *T. podisi* em relação ao controle. Assim sendo, foram coletados os voláteis das plantas cv. Dowling pulverizadas com água destilada, água destilada + Tween 20 (controles), acetato de (*cis*)-3-hexenila e salicilato de metila nas concentrações de  $1,0 \times 10^{-3}$ M, após 72 horas da exposição ao tratamento, enquanto para a cv. Jataí foram coletados os voláteis das plantas pulverizadas com água destilada, água destilada + Tween 20 (0.1%) (controles) e salicilato de metila na concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$ M. Para cada tratamento foram utilizados seis indivíduos. Para realizar a coleta dos voláteis as plantas foram inseridas em câmara de vidro (volume de 10 L), com papel alumínio recobrimo o vaso para minimizar a passagem de voláteis liberados pelo solo. A câmara de vidro foi conectada ao sistema de compressão de ar com

fluxo de entrada de 1,0 L/ min, previamente filtrado por carvão ativado, e na extremidade oposta foi conectado um tubo de vidro com adsorvente (Porapak Q) conectado por mangueiras de silicone a um sistema de saída de ar através de uma bomba de vácuo com fluxo regulado para 0,6 L/ min como descrito anteriormente por Moraes et al. (2008).

Após 24 horas do acionamento do sistema de coleta, os tubos de adsorvente foram eluídos com 1 mL do solvente orgânico *n*-hexano e a amostra foi pré-concentrada para um volume de 50 µL com uso de um fluxo de N<sub>2</sub>. Após a eluição, os tubos com adsorventes foram condicionados através do aquecimento a 180 °C sob fluxo de N<sub>2</sub> por uma hora antes de serem novamente utilizados. Os extratos foram armazenados a -20 °C até sua utilização nas análises químicas em cromatógrafo gasoso acoplado a detector de ionização de chamas (CG-DIC) e CG acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM).

A análise quantitativa dos voláteis presentes nos extratos foi realizada com uso do cromatógrafo gasoso (CG) (Agilent 7890A, coluna apolar DB-5, 0,25 mm de diâmetro x 30 m de comprimento, filme 0,25 µm, J&W Scientific, Folsom, CA, EUA), com detector de ionização de chama (DIC) a 270 °C e um método de programação de gradiente de temperatura com temperatura inicial de 50 °C (2 min) seguindo por um gradiente de temperatura 5 °C/min até 180 °C (0,1 min) e um segundo gradiente de 10 °C/min até 250 °C (20 min), com tempo total de 55,10 min.

Como o linalool co-elui com o composto undecano na coluna DB-5, para quantificar este composto os extratos foram analisados usando um GC-FID com coluna polar (PerkinElmer, coluna polar Elite-Wax (0,25 mm de diâmetro x 30 m de comprimento, com filme 0,5 µm, PerkinElmer, Shelton, CT, EUA), com detector de ionização de chama (DIC) a 270 °C e um método de gradiente de temperatura com temperatura inicial de 50 °C (2 min) seguindo por um

gradiente de temperatura 5 °C/min até 180 °C (0,1 min) e um segundo gradiente de 10 °C/min até 250 °C (20 min), com tempo total de 55,10 min.

Para as análises químicas dos extratos das plantas foi adicionado 1 µL do composto 16-hexadecanolactona como padrão interno (PI), com exceção das amostras coletadas das plantas da cv. Dowling no estágio reprodutivo que foram adicionadas 1 µL do composto butirato de heptila como padrão interno (PI). Ambos os PI ficaram na concentração final de 4,9 µg/mL. Foi injetado 1 µL de cada extrato de aeração das plantas no modo de injeção splitless e o gás hélio foi o utilizado como gás carreador. A quantificação foi realizada comparando as áreas dos picos de cada composto em relação à área do PI. As respectivas áreas dos compostos coletados pelo software ClassGC foram organizadas em planilhas no programa Excel (MICROSOFT OFFICE EDIÇÃO 2007®, MICROSOFT CORPORATION, EUA).

Extratos das aerações de plantas foram selecionados para conduzir a análise qualitativa através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), Agilent MSD 5975C equipado com um analisador quadruplar, com uma coluna apolar DB-5 MS (0,25 mm de diâmetro x 30 m de comprimento, com filme 0,25 µm, J&W Scientific, Folsom, CA, USA) e com fonte de ionização de impacto de elétrons (70-eV). As análises foram realizadas no modo de injeção splitless e um método de gradiente de temperatura com temperatura inicial de 50 °C (2 min) seguindo por um gradiente de temperatura 5 °C/min até 180 °C (0,1 min) e um segundo gradiente de 10 °C/min até 250 °C (20 min), com tempo total de 55,10 min. Foi injetado 1 µL de cada extrato selecionado. O gás hélio foi o utilizado como gás carreador. A identificação dos compostos foi realizada pelo índice de retenção (IR) e por comparação com padrões de fragmentação de espectros de massa de biblioteca espectral (NIST; WILEY, 2008) e para a confirmação final da identificação os padrões de fragmentação dos compostos foram comparados com os dados obtidos dos

padrões autênticos que foram injetados no espectrômetro de massas nas mesmas condições das amostras.

Como os compostos (*trans,trans*)- $\alpha$ -farneseno e (*trans,trans*)-4,8,12-trimetil-1,3(*trans*),7(*trans*),11-tridecatetraeno (TMTT) co-eluíram com impurezas, e não foi possível separar estas impurezas, a identificação desses compostos foi conduzida utilizando-se o método de monitoramento de íons selecionados por espectrometria de massas. Para a quantificação foi utilizado o método padrão externo. O programa de temperatura utilizado foi o mesmo citado anteriormente para as análises por CG-FID. Para a identificação do (*trans,trans*)- $\alpha$ -farneseno e TMTT foram monitorados os íons 61 e 93. As curvas de calibração foram construídas nas concentrações (0,0005; 0,00125; 0,0025; 0,005; 0,01; 0,05 mg/mL) dos padrões (*trans,trans*)- $\alpha$ -farneseno e TMTT, injetados cinco vezes, sendo o valor médio aplicado para construção das curvas (Anexo 1). Os extratos coletados das plantas cv. Dowling no estágio reprodutivo e vegetativo dos tratamentos acetato de (*cis*)-3-hexenila, salicilato de metila, água destilada + tween 20 e água destilada, foram injetados cinco vezes para cada amostra das plantas cv. Dowling no estágio reprodutivo e vegetativo, sendo que os valores de quantificação das amostras foram realizados usando as curvas de calibração construída para cada composto.

## 2.6 Análise estatística

Para avaliar a preferência dos parasitoides para os voláteis das plantas pulverizadas e plantas-controle nos bioensaios de olfatométrica os resultados foram analisados por meio de um modelo linear generalizado (MLG) com correção de Wald e aplicação do teste qui-quadrado.

Para análise química do perfil dos COVs liberados pelas plantas foram realizados testes de normalidade em sequência utilizada uma análise

multivariada (Manova) e uma análise de variância canônica, a fim de verificar a dinâmica dos voláteis identificados nas amostras de plantas sobre o agrupamento das plantas pulverizadas com os COVs e plantas-controle. Enquanto para o total de COVs liberados e os COVs individuais, foi utilizada uma análise de variância (Anova) aplicando-se o teste de Tukey a 5%, para avaliar as diferenças na quantidade de voláteis emitidos pelas plantas pulverizadas com os COVs e plantas-controle. As análises foram realizadas no programa estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2009).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Atração do parasitoide de ovo *T. podisi* em olfatômetro (Y)

Nos bioensaios em olfatomia, fêmeas de *T. podisi* responderam preferencialmente aos voláteis liberados por plantas da cv Dowling 72 horas após pulverização com acetato de (*cis*)-3-hexenila na concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  M no estádio V3 (Wald test  $\chi^2 = 9.05$ ,  $P=0,002$ ) e no estádio R2 (Wald test  $\chi^2 = 6.61$ ,  $P=0,010$ ) quando contrastado com os voláteis emitidos pelas plantas pulverizadas com água destilada + Tween 20, e responderam às plantas tratadas com salicilato de metila na concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  M no estádio V3 (Wald test  $\chi^2 = 4.68$ ,  $P=0,030$ ) e R2 (Wald test  $\chi^2 = 4.68$ ,  $P=0,030$ ) quando comparado com as plantas pulverizadas com água destilada + Tween 20 (Figuras 1 e 2).

Para a cv Jataí os parasitoides responderam para os voláteis das plantas 72 horas após a pulverização com salicilato de metila na concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  M no estádio V3 (Wald test  $\chi^2 = 10.67$ ,  $P=0,001$ ) e no estádio R2 (Wald test  $\chi^2 = 4.52$ ,  $P=0,033$ ) (Figuras 1 e 2) quando contrastado aos voláteis emitidos pelas plantas pulverizadas com água + Tween 20. Os parasitoides não diferenciaram os voláteis das plantas, no estágio V3, das duas cultivares tratadas com os compostos na concentração de  $1,0 \times 10^{-5}$  M dos voláteis liberados pelas plantas tratadas com água destilada + Tween 20 (Figura 3). Também não houve atração das fêmeas do parasitoide para os voláteis liberados pelas plantas da cv BR-16 nas concentrações de  $1,0 \times 10^{-3}$  M e  $1,0 \times 10^{-5}$  M quando tratada com todos os compostos avaliados nos dois períodos avaliados (Figura 1 e 3).

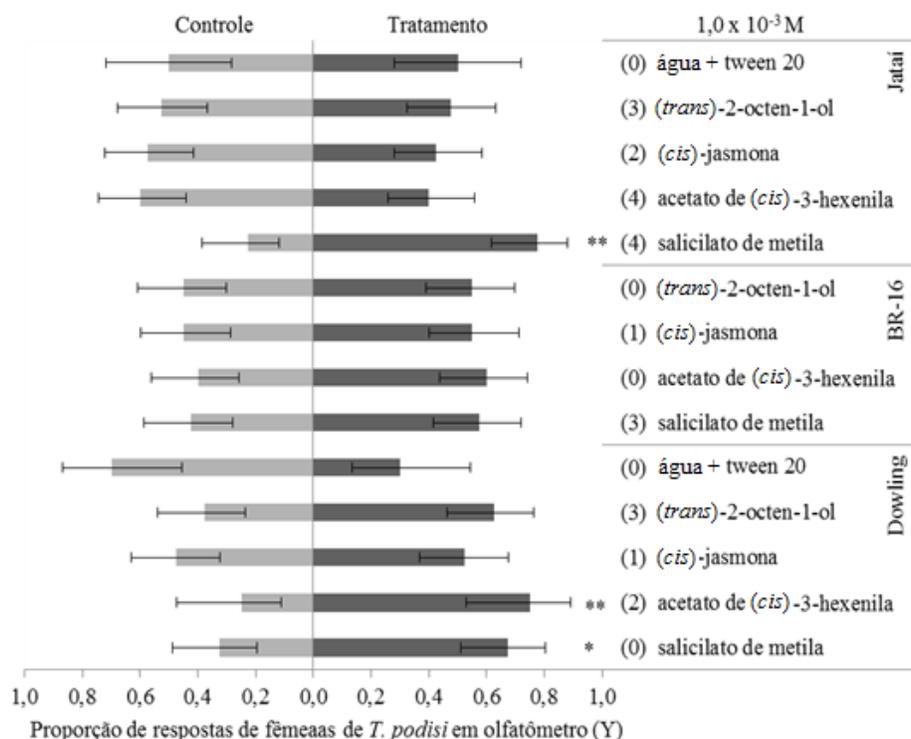


Figura 1 Proporção de respostas ( $\pm$ EP) de fêmeas de *Telenomus podisi* no olfatômetro em (Y) para as cultivares Dowling, BR-16 e Jataí no estágio de desenvolvimento (V3), após 72 horas a exposição aos COVs. Controle: planta pulverizada com água destilada. Tratamentos: salicilato de metila, acetato de (*cis*)-3-hexenila, (*cis*)-jasmona, (*trans*)-2-octen-1-ol em concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$ M, e água destilada + Tween 20 (0,1%). Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos vs controle pelo teste de Wald ( $\chi^2$ ), a 5% (\*) ou 1% (\*\*) de probabilidade. Os números entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum tratamento de um total de 40 insetos avaliados

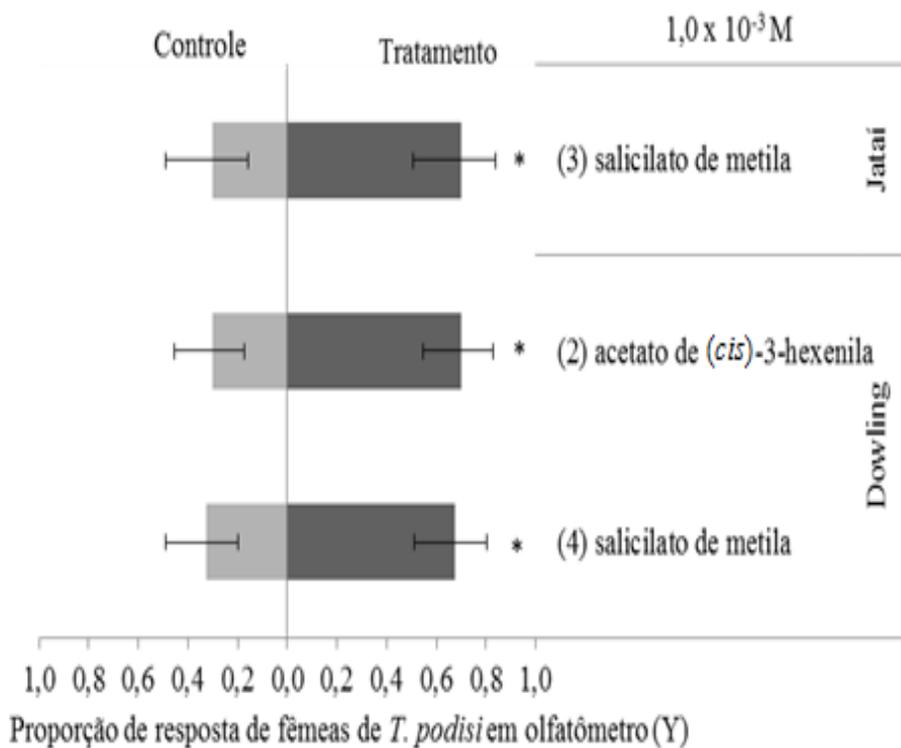


Figura 2 Proporção de respostas ( $\pm EP$ ) de fêmeas de *Telenomus podisi* no olfatômetro em (Y) para as cultivares Dowling e Jataí no estágio de desenvolvimento (R2), após 72 horas a exposição aos COVs. Controle: planta pulverizada com água destilada. Tratamentos: salicilato de metila, acetato de (cis)-3-hexenila em concentração de  $1,0 \times 10^{-3}M$ . Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos vs controle pelo teste de Wald ( $\chi^2$ ), a 5% de probabilidade. Números entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum tratamento de um total de 40 insetos avaliados

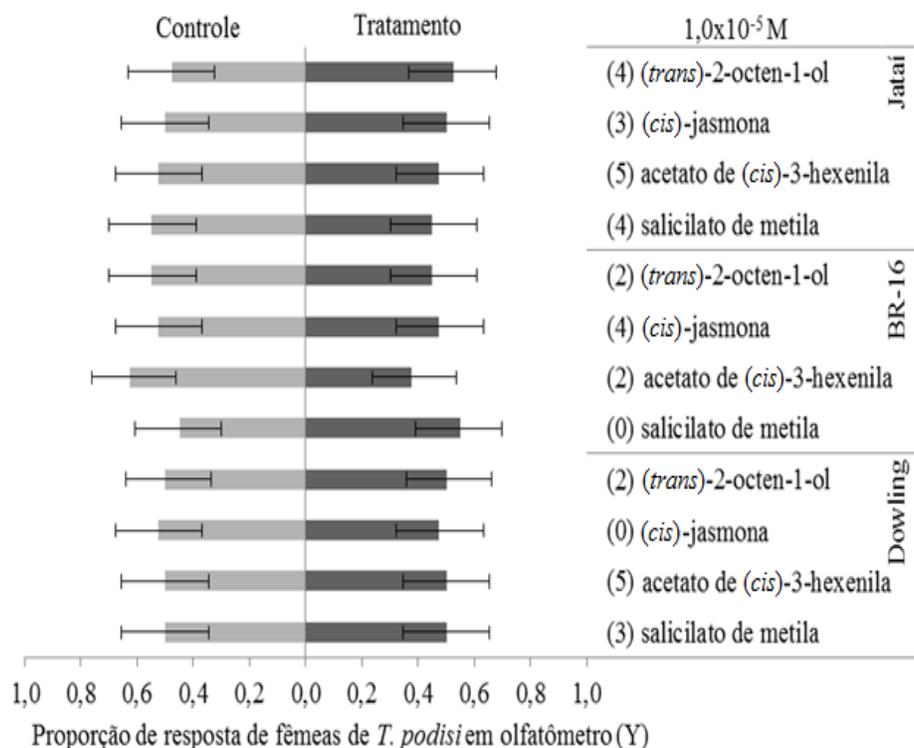


Figura 3 Proporção de respostas ( $\pm$ EP) de fêmeas de *Telenomus podisi* no olfatômetro em (Y) para as cultivares Dowling, BR-16 e Jatáí no estágio de desenvolvimento (V3), após 72 horas a exposição aos COVs. Controle: planta pulverizada com água destilada. Tratamentos: salicilato de metila, acetato de (*cis*)-3-hexenila, (*cis*)-jasmona, (*trans*)-2-octen-1-ol em concentração de  $1,0 \times 10^{-5}$ M, e água destilada + Tween 20 (0,1%). Números entre parênteses representam os insetos que não responderam a nenhum tratamento de um total de 40 insetos avaliados

### 3.2 Análise de voláteis de soja

Plantas de *G. max* da cv Dowling no estágio V3 submetidas a diferentes tratamentos de pulverização liberaram quantidades significativamente diferentes de voláteis. Quando tratadas com a concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  M, as plantas pulverizadas com acetato de (*cis*)-3-hexenila, salicilato de metila e água destilada liberaram menor quantidade de voláteis que aquelas tratadas com água + Tween 20 (0,1%) ( $F_{3,20}=4,80$ ,  $P=0,012$ ) (Figura 4A). Enquanto que as plantas no estágio R2 pulverizadas com acetato de (*cis*)-3-hexenila a  $1,0 \times 10^{-3}$  M, liberaram maior quantidade de voláteis comparado com as plantas pulverizadas com salicilato de metila, e as plantas-controles água destilada + Tween 20 (0,1%) e água destilada ( $F_{3,20}=12,37$ ,  $P<0,001$ ) (Figura 4B).

Para cv Jataí não houve diferença significativa quando se comparou os voláteis totais liberados pelas plantas pulverizadas com salicilato de metila a  $1,0 \times 10^{-3}$  M, as plantas-controle pulverizadas com água destilada + Tween 20 (0,1%), e plantas pulverizadas com água destilada no estágio V3 ( $F_{2,15}=1,44$ ,  $P=0,267$ ) e o mesmo resultado foi obtido quando se comparou os voláteis totais liberados pelas plantas submetidas aos diferentes tratamentos no estágio R2 ( $F_{2,15}=0,76$ ,  $P=0,482$ ). Para a cv. Dowling no estágio V3 foram identificados 13 compostos, e para o estágio R2 16 compostos (Tabela 1). Para a cv Jataí no estágio V3 foram identificados oito compostos, enquanto para o estágio R2 três compostos (Tabela 2).

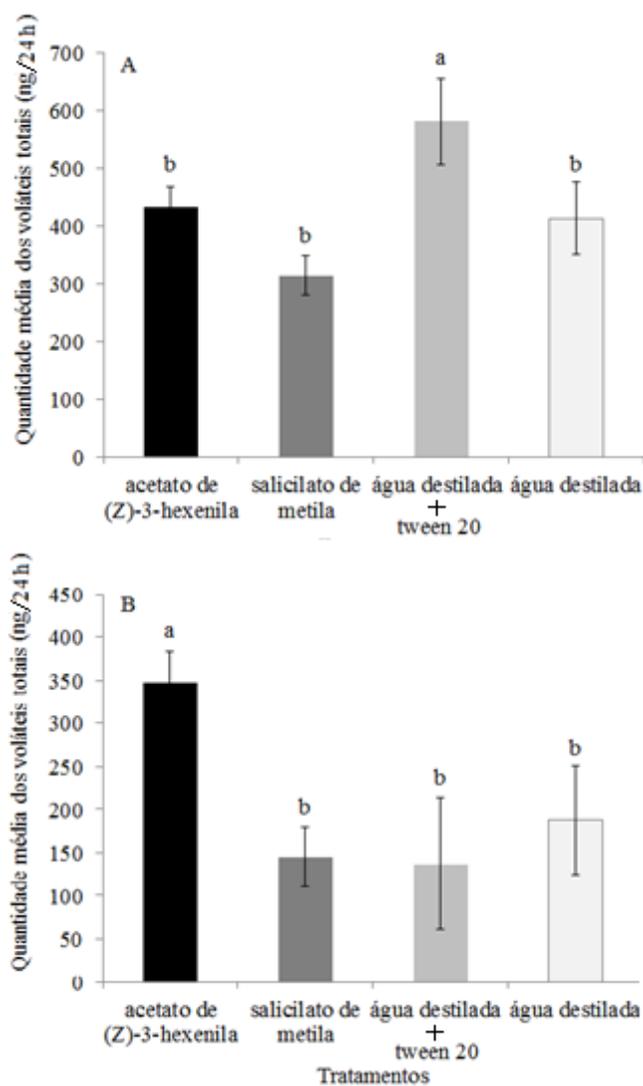


Figura 4 Quantidade média dos voláteis totais (média  $\pm$  EP) para as cultivares Dowling e Jataí submetidas a diferentes tratamentos. (A) cv Dowling no estágio V3, (B) cv Dowling no estágio R2, (C) cv Jataí no estágio V3 e (D) cv Jataí no estágio R2. Controle: plantas pulverizadas com água destilada e Tween 20 (0,1%). Tratamentos: plantas pulverizadas com acetato de (*cis*)-3-hexenila, salicilato de metila na concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  M. Médias seguidas pela mesma letra não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey a  $P > 0.05$

As plantas da cv Dowling no estágio V3 pulverizadas com acetato de (*Z*)-3-hexenila a  $1,0 \times 10^{-3}$  M liberaram em maior quantidade benzaldeído ( $F_{3,20}=3,58$ ,  $P=0,031$ ) e geranilacetona ( $F_{3,20}=6,83$ ,  $P=0,002$ ) quando comparadas com as plantas pulverizadas com salicilato de metila a  $1,0 \times 10^{-3}$  M, água destilada + tween 20 (0,1%) e água destilada. As plantas pulverizadas com água destilada e tween 20 (0,1%) liberaram níveis elevados de salicilato de metila ( $F_{3,20}=3,55$ ,  $P=0,032$ ) e o TMTT ( $F_{3,20}=7,65$ ,  $P=0,001$ ) comparadas com as plantas pulverizadas com acetato de (*cis*)-3-hexenila e salicilato de metila (Tabela1).

Já as plantas no estágio R2 pulverizadas com acetato de (*cis*)-3-hexenila, a  $1,0 \times 10^{-3}$  M, emitiram altas quantidades de benzaldeído ( $F_{3,20}=23,0$ ,  $P<0,001$ ), 3-octanol ( $F_{3,20}=20,0$ ,  $P<0,001$ ), acetato de (*cis*)-3-hexenila ( $F_{3,20}=23,2$ ,  $P<0,001$ ), salicilato de metila ( $F_{3,20}=10,7$ ,  $P<0,001$ ), geranil acetona ( $F_{3,20}=4,51$ ,  $P=0,014$ ), (*trans,trans*)-alpha-farneseno ( $F_{3,20}=6,65$ ,  $P=0,002$ ) e TMTT ( $F_{3,20}=8,54$ ,  $P<0,001$ ) que as plantas pulverizadas com salicilato de metila, água destilada + tween 20 (0,1%) e água destilada (Tabela 1). As plantas pulverizadas com salicilato de metila, a  $1,0 \times 10^{-3}$  M, liberaram apenas o (*trans*)- $\beta$ -ocimeno ( $F_{3,20}=6,95$ ,  $P=0,002$ ) em quantidade elevada, comparado com as plantas pulverizadas com acetato de (*cis*)-3-hexenila, a  $1,0 \times 10^{-3}$  M, água destilada + tween 20 (0,1%) e água destilada. Plantas-controle pulverizadas com água destilada + tween 20 (0,1%) e acetato de (*cis*)-3-hexenila, a  $1,0 \times 10^{-3}$  M, liberaram decanal ( $F_{3,20}=3,99$ ,  $P=0,022$ ), copaeno ( $F_{3,20}=5,97$ ,  $P=0,004$ ) e dodecanal ( $F_{3,20}=5,40$ ,  $P=0,006$ ) em maior quantidade que as plantas pulverizadas com salicilato de metila e água destilada. O tratamento com acetato de (*cis*)-3-hexenila, a  $1,0 \times 10^{-3}$  M e as plantas-controle pulverizadas com água destilada, liberaram em maior quantidade o linalool ( $F_{3,20}=3,37$ ,  $P=0,038$ ) comparado com as plantas pulverizadas com salicilato de metila e água destilada + Tween 20 (0,1%) (Tabela 1).

As plantas da cv Jataí no estágio V3 pulverizadas com salicilato de metila na concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  M liberaram maior quantidade de geranyl acetona ( $F_{2,15}=4,91$ ,  $P=0,022$ ), que as plantas pulverizadas com água destilada+tween 20 (0,1%) e água destilada somente, não sendo observada diferença para os demais voláteis liberados pelas plantas (Tabela 2). Foi observado que as pulverizações nas plantas da cv Jataí no estágio R2 não tiveram efeitos significativos na produção de voláteis (Tabela 2).

Para analisar as mudanças do perfil de voláteis emitidos das plantas cv Dowling foi realizada uma análise discriminante, que resultou em dois modelos com dois componentes principais significativos para as plantas pulverizadas no estágio V3 ( $F_{3,20}= 2,27$ ,  $P=0,01$ , Pillai  $\lambda=2,24$ ) sendo o composto TMTT o responsável pela separação entre os tratamentos e os controles, enquanto que no estágio R2 ( $F_{3,20}=22,54$ ,  $P<0,001$ , Pillai  $\lambda=2,94$ ) os compostos que contribuíram para a separação entre os tratamentos e os controles foram o salicilato de metila e o acetato de (*cis*)-3-hexenila (Figura 5).

Tabela 1 Quantidade de compostos orgânicos voláteis coletados durante 24 h (média ± erro padrão em nanogramas) de plantas da cv Dowling no estádio V3 e R2 72 horas após a pulverização com acetato de (*cis*)-3-hexenila, salicilato de metila na concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  M, água destilada + Tween 20 (0,1%) e água destilada (controles)

Voláteis liberados	Tratamentos			
	Água destilada	Salicilato de metila	Acetato de ( <i>cis</i> )-3-hexenila	Água destilada + Tween 20 (0,1%)
Dowling – Vegetativo V3				
Benzaldeído *	136,4 (±45,7) b	205,4 (±57,7) b	413,2 (±145,0) a	93,5 (±22,6) b
1-octen-3-one	nd.	nd.	nd.	nd.
3-octanone	nd.	nd.	nd.	nd.
3-octanol	nd.	nd.	nd.	nd.
Acetato de ( <i>cis</i> )-3-hexenila	112,9 (±24,2)	85,5 (±15,4)	130,1 (±27,5)	84,0 (±34,4)
( <i>trans</i> )- $\beta$ -Ocimeno	64,9 (±22,4)	44,3 (±10,4)	101,4 (±26,3)	121,2 (±83,2)
Linalool	8,9 (±2,5)	8,5 (±2,0)	13,4 (±2,4)	7,6 (±1,6)
Nonanal	241,9 (±52,9)	197,0 (±37,2)	279,9 (±53,5)	243,7 (±96,6)
Salicilato de metila *	59,5 (±15,1) a	15,6 (±3,4) b	18,7 (±3,2) b	42,1 (±18,0) ab
Decanal	282,7 (±45,5)	208,6 (±44,3)	377,2 (±83,5)	228,4 (±56,8)
Benzotiazol	103,7 (±19,5)	59,9 (±9,1)	98,5 (±25,1)	71,0 (±17,3)
Copaeno	45,1 (±18,8)	15,4 (±1,9)	34,4 (±11,3)	27,9 (±8,9)
Dodecanal	58,8 (±13,6)	36,9 (±6,5)	76,7 (±16,9)	52,4 (±13,3)
Geranil acetona **	148,0 (±26,7) b	130,6 (±21,0) b	257,9 (±49,5) a	145,4 (±12,6) b
( <i>trans,trans</i> )- $\alpha$ -farneseno	1506,4 (±154,8)	1930,2 (±259,7)	2541,2 (±464,0)	2124,0 (±426,0)
TMTT **	2592,6 (±550,4) b	1143,2 (±171,1) b	1276,6 (±149,7) b	4296,5 (±1003,0) a

Continuação...

Dowling – Reprodutivo R2	Tratamentos			
	Água destilada	Salicilato de metila	Acetato de ( <i>cis</i> )-3-hexenila	Água destilada + Tween 20 (0,1%)
Benzaldeído ***	368,8 (±105,4) b	258,5 (±30,3) b	945,5 (±145,4) a	1,30 (±0,9) c
1-octen-3-one	181,5 (±29,3)	89,5 (±10,9)	137,2 (±73,1)	131,9 (±42,4)
3-octanone	157,8 (±41,0)	161,9 (±17,9)	226,1 (±53,2)	143,2 (±60,7)
3-octanol***	153,7 (±60,9) b	400,7 (±38,8) b	812,8 (±141,0) a	79,2 (±29,5) bc
Acetato de ( <i>cis</i> )-3-hexenila***	240,6 (±145,6) b	70,8 (±8,8) b	1264,2 (±197,8) a	169,8 (±53,9) b
( <i>trans</i> )- $\beta$ -Ocimeno**	109,1 (±18,9) a	143,5 (±28,7) a	41,5 (±9,7) b	43,8 (±19,5) b
Linalool *	231,3 (±99,4) a	71,5 (±44,9) b	191,3 (±37,5) ab	26,2 (±5,4) b
Nonanal	596,7 (±318,3)	156,1 (±35,5)	174,3 (±32,5)	84,1 (±10,6)
Salicilato de metila***	43,7 (±11,6) b	33,4 (±13,8) b	566,4 (±126,3) a	490,0 (±129,0) a
Decanal *	38,3 (±10,8) ab	58,3 (±16,9) ab	101,7 (±17,2) a	104,0 (±21,7) a
Benzotiazol	37,3 (±8,4)	29,9 (±10,2)	39,3 (±6,6)	38,8 (±7,3)
Copaeno**	8,9 (±0,7) b	7,5 (±2,9) b	22,5 (±5,5) a	26,3 (±5,2) a
Dodecanal **	13,9 (±5,6) b	16,0 (±5,4) b	49,2 (±10,7) a	31,4 (±7,1) ab
Geranil acetona*	44,9 (±12,8) b	44,3 (±12,3) b	139,8 (±44,6) a	42,1 (±10,8) b
( <i>trans,trans</i> )- $\alpha$ -farneseno **	392,1 (±0,2) b	391,7 (±0,5) b	420,7 (±11,6) a	359,6 (±1,2) bc
TMTT ***	391,0 (±0,1) b	393,8 (±1,3) b	419,3 (±10,1) a	391,6 (±0,3) b

\*Valor significativo a ( $p \leq 0,05$ ); \*\* Valor significativo a ( $p \leq 0,01$ ); \*\*\* Valor significativo a ( $p \leq 0,001$ ); nd. compostos não identificados nas amostras. (TMTT) (*trans,trans*)-4,8,12-trimetil-1,3(*trans*),7(*trans*),11-tridecatetraeno. Médias nas colunas seguidas pela mesma letra não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey a  $P > 0,05$ .

Tabela 2 Quantidade de compostos orgânicos voláteis coletados durante 24 h (média ± erro padrão em nanogramas) de plantas da cultivar Jataí no estádio V3 e R2 72 após a pulverização com salicilato de metila na concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  M, água destilada + Tween 20 (0,1%) e água destilada (controles)

Voláteis liberados	Tratamentos		
		Água destilada + Tween	
Jataí – Vegetativo V3	Salicilato de metila	20 (0,1%)	Água destilada
<i>(trans)</i> - $\beta$ -ocimeno	43,4 ( $\pm$ 12,0)	69,2 ( $\pm$ 18,2)	43,3 ( $\pm$ 19,6)
Nonanal	582,6 ( $\pm$ 112,2)	447,5 ( $\pm$ 103,4)	283,9 ( $\pm$ 85,7)
Salicilato de metila	23,2 ( $\pm$ 8,23)	26,4 ( $\pm$ 9,5)	14,0 ( $\pm$ 6,97)
Decanal	665,3 ( $\pm$ 116,4)	569,3 ( $\pm$ 116,0)	394,3 ( $\pm$ 106,5)
Benzotiazol	111,0 ( $\pm$ 20,5)	112,2 ( $\pm$ 20,0)	59,5 ( $\pm$ 13,6)
Dodecanal	nd.	nd.	nd.
Geranil acetona *	328,4 ( $\pm$ 41,05) a	249,5 ( $\pm$ 42,6) b	165,5 ( $\pm$ 36,9) b
<i>(trans,trans)</i> - $\alpha$ -farneseno	418,5 ( $\pm$ 231,3)	285,3 ( $\pm$ 62,8)	371,4 ( $\pm$ 96,7)
TMTT	733,0 ( $\pm$ 62,9)	861,8 ( $\pm$ 136,8)	712,1 ( $\pm$ 168,7)
Voláteis liberados	Tratamentos		
		Água destilada + Tween	
Jataí – Reprodutivo R2	Salicilato de metila	20 (0,1%)	Água destilada
Nonanal	106,3 ( $\pm$ 38,1)	245,5 ( $\pm$ 48,2)	194,8 ( $\pm$ 36,9)
Salicilato de metila	nd.	nd.	nd.
Decanal	208,8 ( $\pm$ 62,7)	225,6 ( $\pm$ 32,7)	192,9 ( $\pm$ 36,9)
Benzotiazol	nd.	nd.	nd.
Dodecanal	58,1 ( $\pm$ 14,1)	48,0 ( $\pm$ 9,62)	52,6 ( $\pm$ 12,1)
Geranil acetona	nd.	nd.	nd.
<i>(trans,trans)</i> - $\alpha$ -farneseno	nd.	nd.	nd.
TMTT	nd.	nd.	nd.

\*Valor significativo ao teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

nd. Compostos não identificados nas amostras.

(TMTT) *(trans,trans)*-4,8,12-trimetil-1,3(*trans*),7(*trans*),11-tridecatetrae

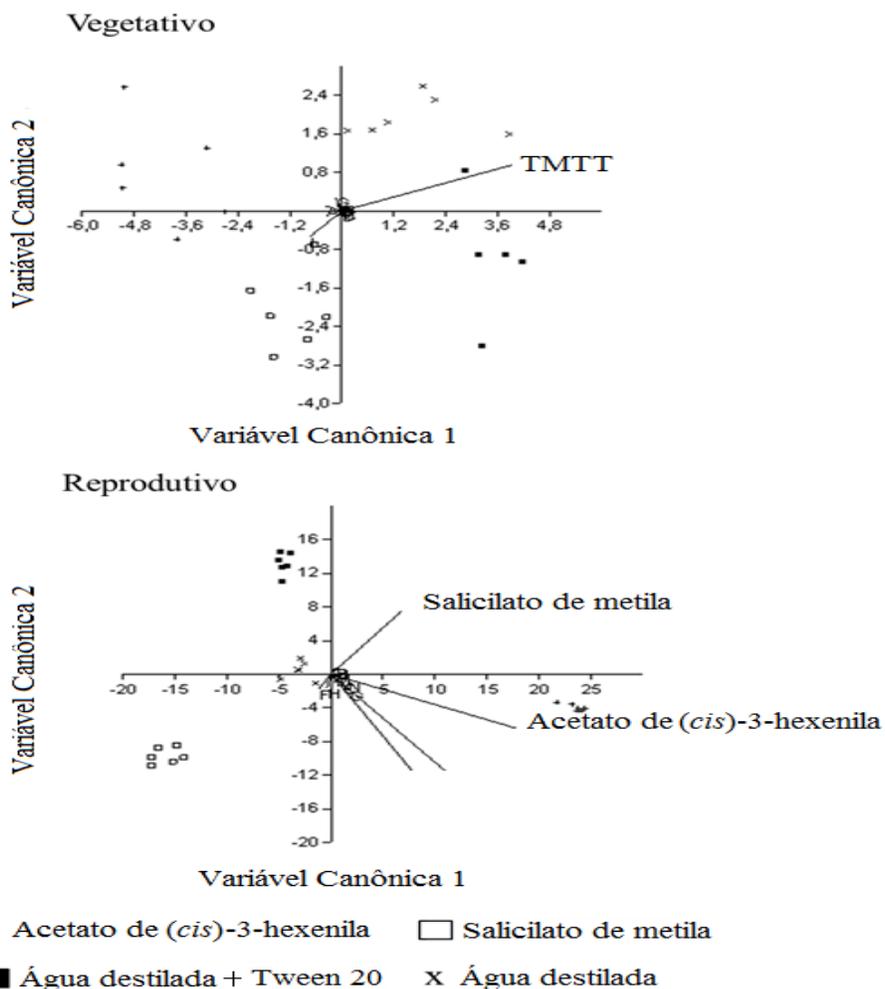


Figura 5 Gráfico de dispersão das variáveis canônicas (CVA) da cultivar Dowling no estágio de desenvolvimento vegetativo e reprodutivo, submetidos a diferentes tratamentos de tratamentos. Baseados nos voláteis liberados no período de 72-96 horas depois da pulverização. Controle: água destilada. Tratamentos: acetato de (*cis*)-3-hexenila, salicilato de metila na concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  M e água destilada + Tween 20 a 0,1%. Os pontos representam o padrão de resposta das plantas de soja aos diferentes tratamentos. As linhas representam os voláteis quantificados nos tratamentos

#### 4 DISCUSSÃO

Em nosso estudo observamos que a pulverização de acetato de (*cis*)-3-hexenila, salicilato de metila na concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  M induziu a defesa indireta de plantas de soja. Os COVs possuem múltiplas funções no ambiente, desde a sinalização entre plantas com ativação de defesa até a atração de inimigos naturais. As injúrias de herbivoria desencadeiam uma cascata de reações químicas no metabolismo secundário, de acordo com o tipo e nível de injúria sofrida no tecido, que resulta em um complexo de odores com a presença de determinados voláteis de folhas verdes e aromáticos, entre outros, que podem atrair inimigos naturais. A aplicação exógena de COVs derivados do ácido jasmônico e ácido salicílico induz alterações na produção de voláteis, de maneira similar às ocasionadas quando ocorre o dano de herbivoria (DICKE; VAN LOON, 2000). A partir disto, as pulverizações com COVs sintéticos atuam como indutores, e ativam o sistema de defesa nas plantas sadias. Assim, testamos a hipótese de que as plantas de soja tratadas pelos COVs têm a sua defesa induzida e afetam o comportamento de busca de *T.podisi*.

A aplicação dos COVs nas plantas da cv Dowling e Jataí induziu a defesa indireta das mesmas após 72 horas da aplicação, uma vez que esses voláteis atraíram os parasitoides nos bioensaios em olfatometria. O volátil de folha verde, acetato de (*cis*)-3-hexenila induziu a produção e liberação de voláteis nas plantas de soja da cv Dowling. Este volátil é liberado imediatamente após a injúria ao tecido, sendo produzido na rota dos octadecanoides (BALDWIN, 2010) e é capaz de induzir a emissão de terpenoides e outros voláteis de folhas verdes (ENGELBERTH et al., 2004). Estudos mostraram que os parasitoides e predadores associam a emissão destes COVs, especialmente dos terpenoides, com a presença do hospedeiro ou da presa (HILKER et al., 2002; MUMM et al., 2003). Por exemplo, o (*trans,trans*)- $\alpha$ -farneseno e o TMTT

liberados de soja após a herbivoria de *E. heros* atraíram fêmeas do parasitoide de ovos *T. podisi* (MICHEREFF et al., 2011). De modo semelhante De Boer, Posthumus e Dicke (2004) verificaram a atração de ácaros predadores para o volátil homoterpeno TMTT. Os efeitos dos terpenoides alteram também outros organismos, tais como os insetos herbívoros. Por exemplo, o monoterpeno linalool que possui efeito de repelência a diversos herbívoros, assim como o sesquiterpeno (*trans*)- $\beta$ -farneseno com repelência a pulgões (MAFFEI, 2010).

O metil salicilato induziu as alterações na produção de voláteis nas plantas da cv Dowling e Jataí. Este COV ativa principalmente as vias do metabolismo secundário que produzem constituintes com baixa volatilidade; esses metabólitos na maioria das vezes podem ser acumulados nos tecidos e afetam diretamente o herbívoro (REYMOND; FARMER, 1998), com alteração do comportamento durante processos de alimentação, oviposição, assim como o desenvolvimento do inseto (ULLAND et al., 2008). O custo energético para ativação das vias do metabolismo promove o efeito sinérgico entre algumas vias, por exemplo, quando a via do ácido chiquímico está ativa, outras rotas metabólicas se mantêm com atividade reduzida, por exemplo, a via dos octadecanoides (MUR et al., 2006; SCHENK et al., 2000; VAN WEES et al., 2000). A menor quantidade de voláteis liberados observadas nas plantas de soja expostas ao metil salicilato, indica que o elicitor alterou a produção dos COVs naturais liberados pelas plantas, embora as quantificações desses COVs em baixíssimas quantidades podem sofrer interferência pelos equipamentos usados para as análises químicas que possuem baixa sensibilidade para esses níveis de detecção. Contudo esses voláteis podem interferir no comportamento de inimigos naturais, visto que esses organismos respondem a concentrações muito baixas de voláteis (MICHEREFF et al., 2011).

As plantas cv Dowling no estágio V3, pulverizadas com os COVs emitiram menor quantidade de voláteis comparadas às plantas que foram

tratadas com água destilada + Tween 20, após 72 horas de tratamento. Estudos prévios mostram que os surfactantes provocam alteração no perfil de COVs produzidos pelas plantas, mas isso não significa que a defesa da planta tenha sido completamente induzida (MORAES et al., 2008, 2009). Embora tenhamos observado uma maior quantidade do TMTT nas plantas de soja no estágio vegetativo tratadas com água destilada + Tween 20 é difícil explicar qual seria o mecanismo que este composto induz ou altera na produção dos terpenoides, talvez este surfactante interfira na abertura dos estômatos, que resulta em liberação dos voláteis armazenados no interior das células dos tecidos vegetais. Porém, a acumulação desses metabólitos nos tecidos vegetais é importante, principalmente, por que os terpenoides podem interferir em outras plantas (MAFFEI, 2010), além dos insetos herbívoros (DICKE; VAN LOON; SOLER, 2009; LANGENHEIM, 1994; MICHEREFF et al., 2011; MORAES et al., 2009). Alguns monoterpêneos atuam na inibição da respiração, do crescimento e da germinação de sementes de plantas vizinhas e o bloqueio do ciclo de oxigênio (MAFFEI, 2010).

Já as plantas da cultivar Dowling no estágio R2 pulverizadas com acetato de (*cis*)-3-hexenila produziram maior quantidade total de COVs do que as plantas de Dowling tratadas com salicilato de metila, água destilada + Tween 20 e água destilada. Este resultado pode estar influenciado pelo fato de este composto ser produzido na rota dos octadecanoides, principal produtora de voláteis de plantas (HATANAKA; KAJIWARA; MATSUI, 1995), assim este COV pode apresentar a capacidade de ativação do mecanismo de defesa (DUDAREVA et al., 2006), de modo semelhante a outros voláteis de folhas verdes, por exemplo, (*cis*)-3-hexen-1-ol (FARAG et al., 2005; RUTHER; KLEIER, 2005), (*trans*)-2-hexenal (FARAG; PARÉ, 2002). Embora as aplicações de COVs sintéticos tenham alterado o perfil de voláteis das plantas da cv Dowling, não foi observado efeito no total de voláteis liberados pelas plantas

da cv Jataí durante os estádios V3 e R2; apenas a redução natural da produção de voláteis para uso dos recursos energéticos em outras vias do metabolismo secundário, sendo observado principalmente no final do ciclo de plantas anuais como a soja (ROSTAS; EGGERT, 2008). Pode ser que a menor quantidade de salicilato de metila presente nas plantas tratadas com esse COV pode ser explicada pelo modelo de regulação para a produção deste volátil, pois a aplicação exógena desencadeia uma regulação positiva que induz alguns genes a reduzirem a acumulação de ácido salicílico e seus derivados nos tecidos vegetais expostos (FEYS et al., 2001).

Essas variações causadas pela ativação de genes de resistência na produção de constituintes de defesa das plantas facilita a compreensão das variações na produção de voláteis entre cultivares da mesma espécie. A pouca atividade desses genes na ativação de rotas metabólicas atuantes na defesa, promovem o entendimento que determinadas plantas tenham maior potencial na produção de metabólicos. Com os avanços tecnológicos na manipulação genética de plantas algumas progênies tiveram interferência no aumento ou redução de características de defesa importantes, influenciando em genótipos com baixa produção de voláteis, resulta em menor preferência dos inimigos naturais (GLINWOOD et al., 2009). Essas evidências foram confirmadas neste estudo, baseando-se em uma menor preferência dos parasitoides para as plantas de soja suscetíveis, enquanto que os parasitoides preferiram mais os voláteis liberados das plantas resistentes (cv Dowling).

Os resultados sugerem que a resposta das plantas de soja às pulverizações com os COVs sintéticos acetato de (*cis*)-3-hexenila e salicilato de metila resultam em alterações na produção e liberação das misturas de COVs, principalmente dos compostos por acetato de (*cis*)-3-hexenila, (*trans*)- $\beta$ -ocimeno, (*trans,trans*)- $\alpha$ -farneseno e TMTT, sendo que estes voláteis poderiam estar envolvidos na atração do parasitoide de ovo *T. podisi*.

## REFERÊNCIAS

ALBORN, H. T. et al. An elicitor of plant volatiles from beet army worm oral secretion. **Science**, Washington, v. 276, n. 5314, p. 945–949, May 1997.

AMENT, K. et al. Jasmonic acid is a key regulator of spider mite-induced volatile terpenoid and methyl salicylate emission in tomato. **Plant Physiology**, Glasgow, v. 135, n. 4, p. 2025–2037, Aug. 2004.

AN, C.; MOU, Z. Salicylic acid and its function in Plant Immunity. **Journal of Integrative Plant Biology**, Cas, v. 53, n. 6, p. 412–428, June 2011.

ARIMURA, G.; KOST, C.; BOLAND, W. Herbivore- induced, indirect plant defences. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1734, n. 2, p. 91–111, May 2005.

BALDWIN, I. T. Plant volatiles. **Current Biology**, Cambridge, v. 20, n. 9, p. 392-397, May 2010.

BERNASCONI, M. L. et al. Herbivore-induced emissions of maize volatiles repel the corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 87, n. 2, p. 133– 142, May 1998.

DE BOER, J. G.; POSTHUMUS, M. A.; DICKE, M. Identification of volatiles that are used in discrimination between plants infested with prey or nonprey herbivores by a predatory mite. **Journal of Chemical Ecology**, Tampa, v. 30, n. 11, p. 2215–2230, Nov. 2004.

DICKE, M.; BALDWIN, I. T. The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: Beyond the “cry for help”. **Trends in Plant Science**, Cambridge, v. 15, n. 3, p. 167–175, Mar. 2010.

DICKE, M.; VAN LOON, J. J. A. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 97, n. 3, p. 237–249, Dec. 2000.

DICKE, M.; VAN LOON, J. J. A.; SOLER, R. Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. **Nature Chemical Biology**, Cambridge, v. 5, p. 317–324, Apr. 2009.

DUDAREVA, N. et al. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Science**, Philadelphia, v. 25, n. 5, p. 417–440, Jan. 2006.

ENGELBERTH, J. et al. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 6, p. 1781–1785, Dec. 2004.

ENGELBERTH, J. et al. Ion channel-forming alamethicin is a potent elicitor of volatile biosynthesis and tendrils coiling. Cross talk between jasmonate and salicylate signaling in lima bean. **Plant Physiology**, Glasgow, v. 125, n. 1, p. 369–377, Jan. 2001.

ERB, M.; FORESTI, N.; TURLINGS, T. C. J. A tritrophic signal that attracts parasitoids to host-damaged plants withstands disruption by non-host herbivores. **Plant Biology**, Freiburg, v. 10, p. 247–258, Nov. 2010.

FARAG, M. A. et al. (Z)-3-hexenol induces defense genes and downstream metabolites in maize. **Planta**, Bonn, v. 220, n. 6, p. 900–909, Apr. 2005.

FARAG, M. A.; PARÉ, P. W. C6-green leaf volatiles trigger local and systemic VOC emissions in tomato. **Phytochemistry**, Washington, v. 61, n. 5, p. 545–554, Nov. 2002.

FEHR, W. R. et al. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Science**, Davis, v. 11, n. 6, p. 929–931, Nov. 1971.

FEYS, B. J. et al. Direct interaction between the *Arabidopsis* disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. **EMBO Journal**, Toronto, v. 20, n. 19, p. 5400–5411, Oct. 2001.

FINESCHI, S. et al “Diversification of volatile isoprenoid emissions from trees: evolutionary and ecological perspectives”. In: NIINEMETS, U.; MONSON, R. K. (Ed.). **Biology, controls and models of tree volatile organic compound emissions**. Berlin: Springer, 2013. p. 1-20.

GLINWOOD, R. et al. Airborne interactions between undamaged plants of different cultivars affect insect herbivores and natural enemies. **Arthropod-Plant Interactions**, Helsinki, v. 3, n. 4, p. 215–224, Dec. 2009.

HATANAKA, A.; KAJIWARA, T.; MATSUI, K. The biogenesis of green odour by green leaves and its physiological functions past, present and future. **Zeitschrift für Naturforschung C**, Zürich, v. 50, n. 7-8, p. 467-472, Aug. 1995.

HEIL, M.; KOST, C. Priming of indirect defences. **Ecology Letters**, Davis, v. 9, n. 7, p. 813–817, 2006.

HILKER, M. et al. Insect egg deposition induces *Pinus sylvestris* to attract egg parasitoids. **Journal of Experimental Biology**, Bern, v. 205, n. 4, p. 455–461, Feb. 2002.

HORIUCHI, J. et al. Comparison of the response of *tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae) to volatiles emitted from lima bean leaves with different levels of damage made by *T. urticae* or *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). **Applied Entomology and Zoology**, Ami, v. 38, n. 1, p. 109–116, 2003.

JORGE, L. A. C. et al. **Software para avaliação do comportamento de insetos**. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2005. 7 p. (Circular Técnica, 30).

KESSLER, D. et al. Petunia flowers solve the defence/apparency dilemma of pollinator attraction by deploying complex floral blends. **Ecology Letters**, Davis, v. 16, n. 3, p. 299-306, Mar. 2013.

KOST, C.; HEIL, M. Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants. **Journal of Ecology**, Illinois, v. 94, n. 3, p. 619–628, May 2006.

LANGENHEIM, J. H. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. **Journal of Chemical Ecology**, Tampa, v. 20, n. 6, p. 1223–1280, June 1994.

MAFFEI, M. E. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. **South African Journal of Botany**, Pietermaritzburg, v. 76, n. 4, p. 612–631, Oct. 2010.

MATTIACCI, L.; DICKE, M.; POSTHUMUS, M. A.  $\beta$ -Glucosidase: an elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 92, n. 6, p. 2036–2040, Mar. 1995.

MICHEREFF, M. F. F. et al. Volatiles mediating a plant-herbivore-natural enemy interaction in resistant and susceptible soybean cultivars. **Journal of Chemical Ecology**, Tampa, v. 37, n. 3, p. 273–285, Mar. 2011.

MORAES, M. C. B. et al. Attraction of the stink bug egg parasitoid *Telenomus podisi* to defence signals from soybean activated by treatment with *cis*-jasmone. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 131, n. 2, p. 178–188, May 2009.

MORAES, M. C. B. et al. Induced volatiles in soybean and pigeon pea plants artificially infested with the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, and their effect on the egg parasitoid, *Telenomus podisi*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 115, n. 1, p. 227-237, Apr. 2005.

MORAES, M. C. B. et al. The chemical volatiles (Semiochemicals) produced by Neotropical stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 37, n. 5, p. 489-505, Sept./Oct. 2008.

MUMM, R. et al. Chemical analysis of volatiles emitted by *Pinus sylvestris* after induction by insect oviposition. **Journal of Chemical Ecology**, Tampa, v. 29, n. 5, p. 1235-1252, May 2003.

MUR, L. A. J. et al. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. **Plant Physiology**, Glasgow, v. 140, n. 1, p. 249-262, Jan. 2006.

NINKOVIC, V. Volatile communication between barley plants affects biomass allocation. **Journal of Experimental Botany**, Colchester, v. 54, n. 389, p. 1931-1939, June 2003.

OZAWA, R. et al. *Lotus japonicus* Infested with herbivorous mites emits volatile compounds that attract predatory mites. **Journal of Plant Research**, Saitama, v. 113, n. 4, p. 427-433, Dec. 2000.

PIUBELLI, G. C. et al. Nymphal development, lipid content, growth and weight gain of *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) fed on soybean genotypes. **Crop Protection**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 127-132, Jan./Mar. 2003.

PRESTON, C. A.; LAUE, G.; BALDWIN, I. T. Methyl jasmonate is blowing in the wind, but can it act as a plant airborne signal?. **Biochemical Systematics and Ecology**, Surrey, v. 29, n. 10, p. 1007-1023, Nov. 2001.

QUALLEY, A. V.; DUDAREVA, N. Aromatic volatiles and their involvement in plant defense. In: SCHALLER, A. (Ed.). **Induced plant resistance to herbivory**. Berlin: Springer, 2008. p. 409–432.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna; R Foundation for Statistical Computing, 2009. 409 p.

REYMOND, P.; FARMER, E. E. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. **Current Opinion in Plant Biology**, Missouri, v. 1, n. 5, p. 404–411, Oct. 1998.

RODRIGUEZ, A.; ALQUÉZAR, B.; PEÑA, L. Fruit aromas in mature fleshy fruits as signals of readiness for predation and seed dispersal. **The new Phytologist**, Bristol, v. 197, n. 1, p. 36-48, Jan. 2013.

ROSTAS, M.; EGGERT, K. Ontogenetic and spatio-temporal patterns of induced volatiles in *Glycine max* in the light of the optimal defence hypothesis. **Chemoecology**, Darmstadt, v. 18, n. 1, p. 29-38, Mar. 2008.

RUTHER, J.; KLEIER, S. Plant-plant signaling: Ethylene synergizes volatile emission in *Zea mays* induced by exposure to (*Z*)-3-hexen-1-ol. **Journal of Chemical Ecology**, Tampa, v. 31, n. 9, p. 2217-2222, Sept. 2005.

SCHENK, P. M. et al. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 21, p. 11655–11660, May 2000.

SCHMELZ, E. A. et al. Nitrogen deficiency increases volicitin-induced volatile emission, jasmonic acid accumulation, and ethylene sensitivity in maize. **Plant Physiology**, Glasgow, v. 133, n. 1, p. 295–306, Sept. 2003.

TURLINGS, T. C. J.; TUMLINSON, J. H.; LEWIS, W. J. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. **Science**, Washington, v. 250, n. 4985, p. 1251–1253, Nov. 1990.

ULLAND, S. et al. Methyl salicylate, identified as primary odorant of a specific receptor neuron type, inhibits oviposition by the moth *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera, Noctuidae). **Chemical Senses**, Tokyo, v. 33, n. 1, p. 35-46, Jan. 2008.

VAN WEES, S. C. M. et al. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate and jasmonate dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 15, p. 8711–8716, Apr. 2000.

### **ARTIGO 3 - Aplicação de acetato de (*cis*)-3-hexenila e salicilato de metila sintéticos em plantas de soja na atração de parasitoides em campo**

#### **RESUMO**

Os compostos orgânicos voláteis (COVs) são produzidos e liberados pelas plantas, principalmente após danos causados por pragas. Esses semioquímicos liberados agem na atração de inimigos naturais, e quando em contato com plantas vizinhas acionam um processo de indução de defesa, que afeta a emissão do “*bouquet*” de voláteis, pode agir na atração de inimigos naturais e em plantas vizinhas. Neste estudo foi investigada em condições de campo a ação dos voláteis de plantas de soja *Glycine max* L. L. (Fabales: Fabaceae) da cv Dowling pulverizadas com os COVs acetato de (*cis*)-3-hexenila e salicilato de metila sobre parasitoides e percevejos. Para avaliar a população de inimigos naturais e o parasitismo foram usados ovos sentinelas e armadilhas adesivas, e para avaliar a população de percevejos a técnica do pano de batida. Os estudos foram conduzidos durante todo o período reprodutivo da soja do R2 ao R7. As análises das armadilhas adesivas mostraram que as famílias Pteromalidae e Platygastriidae foram capturadas em maior número, embora não tenha sido observado um efeito das parcelas pulverizadas com os COVs, comparado com o controle (água destilada + Tween 20 (0,1%)). Também observamos que a incidência de parasitismo em armadilhas com ovos sentinela foi maior nas parcelas pulverizadas com os COVs que no controle (água destilada + Tween 20 (0,1%)). Na amostragem por pano de batida não foram observadas diferenças na população de percevejos fitófagos. Os resultados demonstraram que a pulverização com o acetato de (*cis*)-3-hexenila e salicilato de metila influenciaram na atração e parasitismo nas áreas com plantas de soja induzidas. Embora mais estudos sejam necessários para validar a aplicação desta forma de manejo, a indução com COVs pode ser usada como uma ferramenta complementar para a atração de inimigos naturais, visando ao manejo integrado de pragas.

Palavras-chave: Voláteis de plantas. Interações tritróficas. Parasitoides. Percevejos. *G. max*.

**ARTICLE 3 - Application of (*cis*)-3-hexenyl acetate and methyl salicylate synthetic soybean plants to attract parasitoids in the field**

**ABSTRACT**

Volatile organic compounds (VOCs) are produced and released by plants, especially after damage caused by pests. These semiochemicals released act in attracting natural enemies, and when in contact with neighboring plants trigger a defense induction process, which affects the emission of "*bouquet*" volatile, can act in attracting natural enemies and in neighboring plants. In this study it was investigated under field conditions the action of volatile soybean plants *Glycine max* L. (Fabales: Fabaceae) cv Dowling sprayed with VOCs (*cis*)-3-hexenyl acetate and methyl salicylate on parasitoids and. To assess the natural enemies population and parasitism were used sentinels eggs and sticky traps, and to assess the stink bugs population the hitting cloth technique. The studies were conducted during the reproductive period of soybean R2 to R7. Analyses of sticky traps showed that Pteromalidae and Platygasteridae families were captured in greater numbers, although it was not observed an effect of the sprayed plots with VOCs, compared with the control (distilled water + Tween 20 (0.1%)). It also was observed that the parasitism incidence in traps with sentinel eggs was higher in the sprayed plots with VOCs that in the control (distilled water + Tween 20 (0.1%)). The sample hitting cloth the differences were not observed in the phytophagous stink bugs population. The results showed that spraying with (*cis*)-3-hexenyl acetate and methyl salicylate influence in attracting and parasitism in areas with induced soybean plants. Although more studies are needed to validate the application of this form of management, induction with VOCs can be used as a complementary tool to attract natural enemies, aiming at integrated pest management.

Keywords: Plant Volatile. Tritrophic interactions. Parasitoids. Stink bugs. *G. max*.

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas possuem habilidades de responder a estresses bióticos e abióticos por meio da produção e liberação de uma variedade de compostos orgânicos voláteis (COVs) (DUDAREVA et al., 2006; QUALLEY; DUDAREVA, 2008). Esses COVs regulam importantes interações no ambiente, principalmente as relacionadas à defesa indireta como atração de parasitoides e predadores (BEYAERT; HILKER, 2014; BRUCE; PICKETT, 2011; DICKE; BALDWIN, 2010; DICKE; LORETO, 2010; LUCAS-BARBOSA; VAN LOON; DICKE, 2011; SCHOONHOVEN; VAN LOON; DICKE, 2005). Em geral, esses voláteis são agrupados de acordo com as suas estruturas químicas, por exemplo, os grupos de voláteis de folhas verdes (álcoois, aldeídos e cetonas), terpenoides (monoterpenos, homoterpenos e sesquiterpenos) e aromáticos (ácido salicílico e seus derivados). As plantas atuam como competidoras por recursos no ambiente, contudo são evidentes as várias interações multitróficas, por exemplo, entre plantas vizinhas mediadas pelos COVs (GLINWOOD; NINKOVIC; PETTERSSON, 2011; HEIL; KARBAN, 2010), que afetam as características de defesa com mudanças fenotípicas na planta vizinha (HEIL; TON, 2008).

As plantas apresentam defesas que afetam a fisiologia ou comportamento durante todo o ciclo de desenvolvimento do organismo. Essas defesas podem ser expressas nas plantas a depender do nível de exposição submetida. Por exemplo, a exposição das plantas aos COVs altera o perfil de compostos voláteis produzidos e liberados, sendo que esses voláteis podem agir no comportamento de parasitoides, predadores e insetos herbívoros (DICKE, 2009). Os compostos voláteis induzidos também podem agir nas plantas vizinhas, como um efeito alelopático, e as plantas vizinhas podem entrar em “alerta” ou mesmo terem suas defesas induzidas (BALDWIN et al., 2006). Essa

eficácia na ativação do sistema de defesa é variável de acordo com as características genéticas da planta, que permite associar a um maior ou menor fator de resistência na planta (BARBOSA et al., 2009).

O processo de indução realizado pelos COVs nas plantas sadias depende da quantidade e qualidade dos voláteis emitidos pelas plantas danificadas. A exposição de plantas sadias aos COVs, tanto individuais ou em misturas, pode induzir a defesa das plantas em níveis diferentes. Estudos em campo e laboratório têm demonstrado alterações no comportamento de insetos parasitoides e predadores quando expostos aos voláteis de plantas acetato de (*cis*)-3-hexenila e o salicilato de metila (SIMPSON et al., 2011a, 2011b ; VON MÉREY et al., 2011). Nos últimos anos vêm sendo explorada a possibilidade de usar a aplicação de semioquímicos, COVs, para a indução da defesa das plantas no campo (JAMES, 2003a, 2003b, 2005; SIMPSON et al., 2011a, 2011b; VIEIRA et al., 2013, 2014).

Várias estratégias têm sido usadas para aplicar semioquímicos no campo, mas duas têm se destacado. Uma utiliza a aplicação de semioquímicos através de liberadores que permitem uma distribuição lenta e controlada, para serem usados na atração dos inimigos naturais, repelência de herbívoros e/ou induzir em plantas vizinhas a defesa ou ativar o sistema de *priming*, isto é, o sistema defesa da planta fica em alerta, e quando sofrer a injúria ou indução pode responder de forma mais rápida e/ou intensa. Outra técnica bastante utilizada é aplicação dos semioquímicos usando pulverizadores e fazendo o *spray* diretamente nas plantas, nesta técnica a ideia é induzir a defesa das plantas com os compostos e a defesa induzida da planta age sobre os inimigos naturais e herbívoros (MORAES; BORGES; LAUMANN, 2013).

Neste estudo, objetivou-se avaliar o efeito dos COVs: acetato de (*cis*)-3-hexenila e salicilato de metila aplicados individualmente na forma de *spray* nas plantas para a indução da defesa das mesmas e os efeitos dos voláteis liberados pelas plantas sobre a população de inimigos naturais e herbívoros.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Compostos orgânicos voláteis de plantas sintéticos**

Os semioquímicos salicilato de metila (SAME) e acetato de (*cis*)-3-hexenila (AH), foram selecionados, com base nos resultados apresentados nos artigo 1 e artigo 2 desta tese, nos quais se observou a atração do parasitoide de ovos *T. podisi* para os voláteis de plantas de soja tratadas por estes dois compostos após 72 horas do tratamento. Foram preparadas soluções desses COVs a partir de padrões sintéticos. Para permitir a sua solubilização em meio aquoso foi preparada uma solução com Tween<sup>®</sup>20 (0,1%) e nesta solução foram adicionados os compostos na quantidade necessária para preparar soluções com  $1,0 \times 10^{-3}$ M de cada um. As formulações foram aplicadas com um pulverizador manual sobre a folhagem da soja até o ponto de escorrimento, quando as plantas estavam no início do estágio fenológico R2 e reaplicados no estágio R5.

### **2.2 Fonte dos químicos**

O salicilato de metila (SAME) (>98% pureza, TCI America, Portland, EUA) e acetato de (*cis*)-3-hexenila (AH)(>98% pureza) e Tween 20 foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Milwaukee, EUA).

### **2.3 Desenho experimental**

A área de estudo foi no campo Experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF (15°72'90"S, 47°90'07" W). O experimento foi conduzido de fevereiro a maio de 2014. Durante o plantio foi realizada uma adubação de fundação com super fosfato triplo e cloreto de

potássio (10:10). Foram realizadas duas pulverizações nas plantas de soja nos estádios de desenvolvimento (R2 e R5) (FEHR et al., 1971), com os compostos SAME e o AH na concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  M. As parcelas-controle foram tratadas da mesma forma, mas usando uma solução de água destilada + Tween 20 (0,1%).

Para avaliar a eficácia dos semioquímicos SAME e HA na indução da defesa das plantas e na atração de inimigos naturais na cultura, um experimento de campo foi realizado com soja *G. max* L. cv Dowling. O experimento foi em delineamento inteiramente casualizado. Os tratamentos SAME, AH e controle água destilada + Tween 20 (0,1%) foram repetidos cinco vezes em parcelas de 2 m x 2 m que foram espaçadas por 15 m (Figura 1).



Figura 1 Esquema de campo das parcelas com plantas de soja da cultivar Dowling utilizadas no experimento de campo, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. As plantas das parcelas marcadas em (X) não foram avaliadas

## 2.4 Amostragem de parasitoides

A abundância de parasitoides foi medida com armadilhas adesivas amarelas (Biotrap<sup>®</sup>, Brasil) com (15 x 12,5 centímetros, uma armadilha por parcela) conectadas por dois orifícios na cartela por onde dois fios de barbantes fixavam a cartela a uma estaca de madeira cerca de 1 m de altura a partir do solo. A superfície adesiva das armadilhas foi exposta no campo, durante três dias, após este período foram removidas e envoltas em filme plástico e armazenadas em freezer a - 20 °C. Com o uso de lupa binocular foram identificados os parasitoides da família Scelionidae até o menor nível taxonômico possível, seguindo a chave dicotômica desenvolvida pela Dra. Marta Loiácono (Museu de Ciências Naturais, La Plata, Argentina) e quantificados; os demais parasitoides capturados foram identificados seguindo Gauld e Bolton (1988) e Goulet e Huber (1993).

### 2.4.1 Incidência e intensidade de parasitismo

Para avaliar se a aplicação dos semioquímicos nas plantas afeta a incidência e intensidade de parasitismo foram utilizadas cartelas com 50 ovos sentinelas de *Euschistus heros*. Os ovos foram fixados em cartolina verde 4,0 x 4,0 cm com goma arábica, os ovos foram envoltos por uma tela de filó com malha de 2 x 2 mm, assim protegendo contra predação de insetos, mas permitindo o acesso dos parasitoides de ovos como os da família Platygasteridae. Em cada parcela foram colocadas cartelas com ovos sentinelas em três pontos ao longo de uma das diagonais, um ponto no centro e uma em cada extremidade da diagonal, amarrado com fita a uma estaca de madeira cerca de 0,5 m acima do solo. As cartelas com os ovos foram substituídas por novas a cada três dias. As cartelas retiradas do campo foram acondicionadas em tubos de vidro com

vedação por algodão, transportados para o laboratório e mantidos em uma sala com condições ambientais controladas (LD 14:10 h,  $25,0 \pm 2$  °C, e  $65 \pm 10\%$  de umidade relativa). Foram registradas a incidência (presença ou ausência de parasitoides nas posturas) e intensidade de parasitismo (número de ovos parasitados) nos ovos sentinela.

## **2.5 Avaliação da população de percevejos no campo**

A cada semana foram realizadas amostragens dos herbívoros nas parcelas através da técnica de pano de batida. A técnica consiste no uso de um plástico branco retangular 50 x 100 cm, conectado ao lado com cabos de madeira que foi posicionado entre as fileiras de plantas sobre o qual as plantas eram inclinadas e sacudidas. Cada parcela foi amostrada uma vez por semana, os percevejos capturados foram acondicionados em recipientes de plástico e transportados para o laboratório onde as espécies capturadas foram identificadas.

## **2.6 Análise estatística**

Para a avaliação da abundância de parasitoides por famílias capturadas em cartela adesiva foi utilizada uma análise de redundância parcial (RDA) e foi observada a variância de tratamentos a partir de um teste F gerado pelo resultado de um teste de permutação (teste de permutação de Monte Carlo; com 999 permutações), sendo realizada uma curva de resposta principal (PRC), ajustada para avaliar a proporção da variância explicada pelo tratamento ao longo do tempo em comparação com um tratamento de referência (controle).

Para avaliação da incidência do parasitoide em ovos sentinela foi utilizado o modelo linear generalizado (MLG), com especificações dos erros com distribuição binomial. Também foi utilizada uma análise de variância de

medidas repetidas, para avaliar as diferenças entre as parcelas tratadas e o controle.

Foi utilizada análise de variância de medidas repetidas, para avaliar as diferenças entre as parcelas de tratamento e controle na abundância dos percevejos amostrados por pano de batida. Todos os dados foram submetidos a teste de normalidade, sendo transformados em raiz  $(x+1)$  aqueles utilizados nas análises de medidas repetidas. As análises foram realizadas no programa estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2009).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Abundância de parasitoides nas armadilhas adesivas

No número total de parasitoides não foi observado efeito significativo entre os parasitoides capturados nas armadilhas adesivas nas parcelas tratadas com AH e SAME comparados com água destilada + Tween 20 (controle) ( $F_{2,117}=3,440$ ,  $P=0,065$ ; Figura 2).

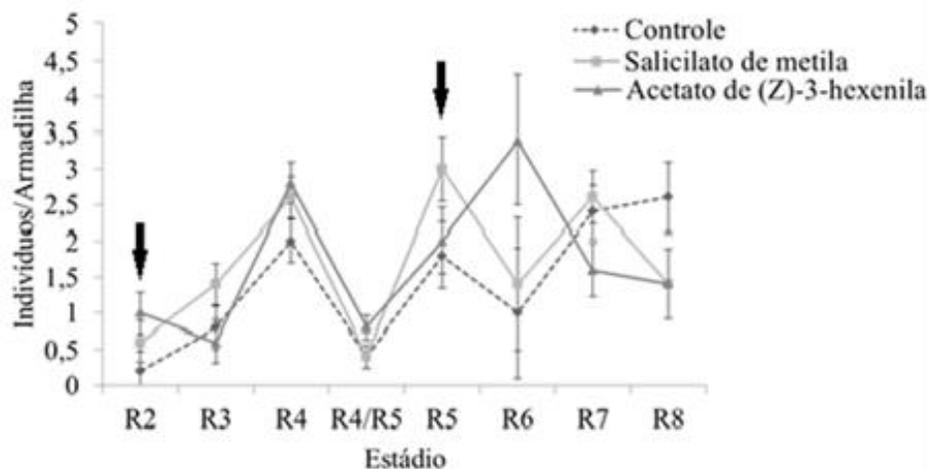


Figura 2 Total de parasitoides (Média + EP) em armadilhas adesivas amarelas instaladas nas parcelas de soja pulverizadas com acetato de (*cis*)-3-hexenila e salicilato de metila e como controle (água destilada + Tween 20). As setas indicam o estágio de desenvolvimento que as plantas das parcelas foram pulverizadas com os COVs e o controle

Nas armadilhas adesivas foram capturados parasitoides de 14 famílias com o total de indivíduos para cada família: (1) Ceraphronidae, (3) Driinidae, (51) Pteromalidae, (14) Mimaridae, (21) Encyrtidae, (56) Platygastriidae, (1) Chrysididae, (15) Ichneumonidae, (6) Braconidae, (3) Trichogrammatidae, (3) Aphididae, (4) Eulophidae, (6) Eucolidae, (7) Diapriidae. A análise por PRC mostrou que ao longo

de todo período avaliado do R2 ao R8 a família de parasitoides Platygasteridae foi significativamente diferente em relação à quantidade desses parasitoides nas parcelas-controle, já que apresentou o maior valor absoluto de 1,5 para a interação entre os tratamentos, tempo e famílias de parasitoides. Famílias com valores absolutos maiores ou menores que 0,5 indicam que a família destaca-se do que foi encontrado no controle e teve mais influência na obtenção das curvas do PRC.

A análise de redundância mostrou que 12,5% da variância total na composição de famílias de parasitoides foram explicados pelo tempo de amostragem e 11,9% pelos tratamentos. A variância do primeiro eixo da PRC explicou 75,6% da variação na composição de famílias e a interação entre estes tratamentos e o tempo, sendo observado efeito significativo (Teste de permutação de Monte Carlo,  $F=2,20$ ,  $P= 0,006$ , Figura 3).

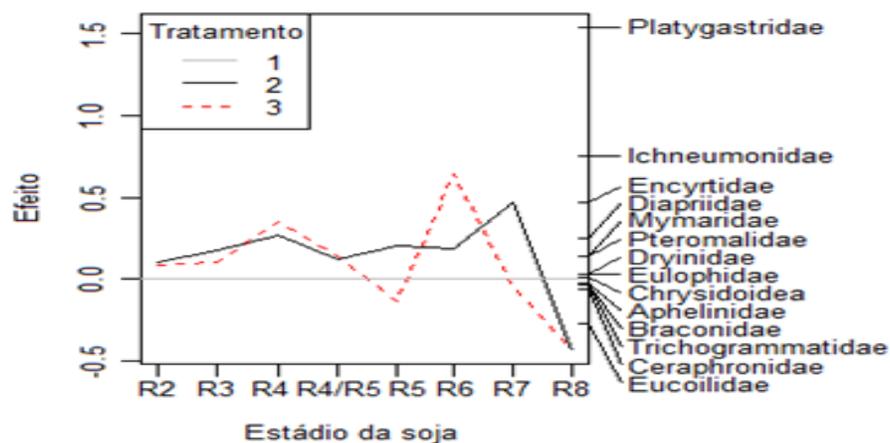


Figura 3 Curva de resposta principal (PRC) da abundância de parasitoides adultos como função dos tratamentos: 1 Controle (água destilada + Tween 20); 2 salicilato de metila; 3 acetato de (cis)-3-hexenila durante oito semanas. O eixo da esquerda representa o efeito do nível populacional dos parasitoides incidente sobre o componente principal. O eixo da direita mostra as famílias e como foram influenciadas pelo tratamento e o estágio da soja. O estágio da soja representa o período de coleta das armadilhas

Quando foi avaliada a abundância dos parasitoides da família Platygasteridae entre as parcelas tratadas com as parcelas-controle também não foi observado um efeito dos tratamentos ( $F_{2,117}=3,492$ ,  $P=0,064$ ), apesar de ser observada uma diferença significativa ao longo do tempo ( $F_{2,117}=7,177$ ,  $P=0,008$ ; Figura 4).

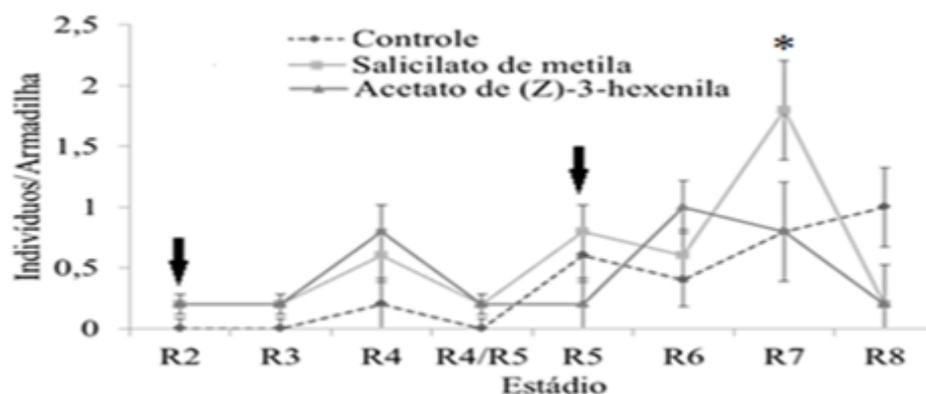


Figura 4 Captura de parasitoides da família Platygasteridae (Média + EP) em armadilhas adesivas amarelas instaladas nas parcelas de soja pulverizadas com acetato de (cis)-3-hexenila e salicilato de metila e como controle (água destilada + Tween 20). As setas indicam o estágio de desenvolvimento que as plantas das parcelas foram pulverizadas com os COVs e o controle. \*Valor significativo a ( $P \leq 0,05$ )

Dentro da família Platygasteridae, a mais abundante nas cartelas adesivas, a abundância do gênero *Telenomus* mostrou um efeito significativo ao longo do tempo ( $F_{2,117}=4,773$ ,  $P=0,031$ ), não sendo observada diferença significativa nos tratamentos ( $F_{2,117}=0,001$ ,  $P=0,982$ ) e na interação do tratamento com o tempo ( $F_{2,117}=0,046$ ,  $P=0,831$ ). Para o gênero *Trissolcus* não foi observada diferença significativa nos tratamentos ( $F_{2,117}=2,083$ ,  $P=0,152$ ), ao longo do tempo ( $F_{2,117}=1,229$ ,  $P=0,270$ ) e na interação entre o tratamento e tempo ( $F_{2,117}=0,324$ ,  $P=0,570$ ).

Na análise entre os tratamentos individualmente em cada estágio de desenvolvimento da soja, foi verificado que no estágio R7, a abundância de parasitoides do gênero *Telenomus* spp. foi maior nas parcelas pulverizadas com

SAME ( $F_{2,12}=4,235$ ,  $P=0,040$ ; Figura 5A), não sendo observada diferença significativa para os demais estádios analisados. Enquanto para análise em cada estádio de desenvolvimento dos parasitoides do gênero *Trissolcus* não foram observadas diferenças significativas (Figura 5B).

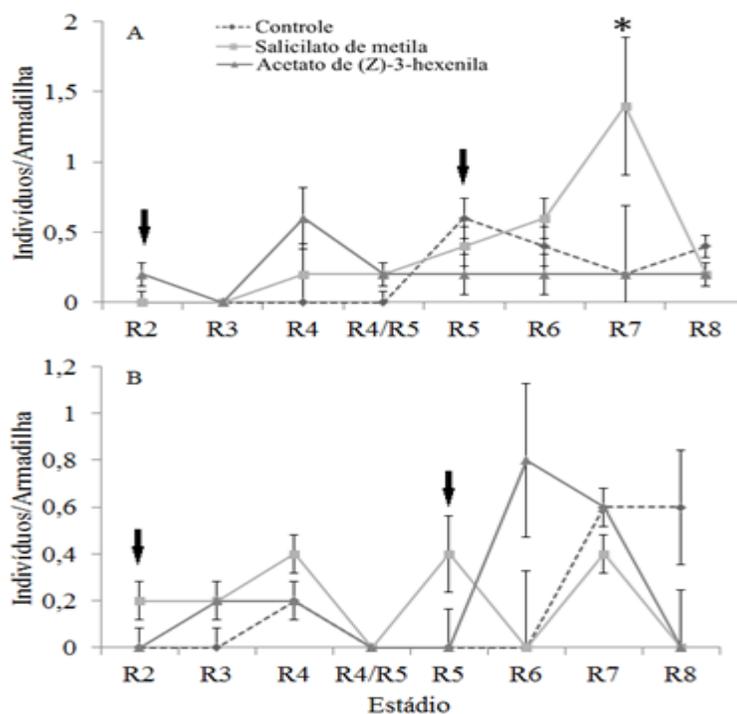


Figura 5 Captura de parasitoides (Média  $\pm$  EP) em armadilhas adesivas amarelas instaladas nas parcelas de soja pulverizadas com acetato de (cis)-3-hexenila e salicilato de metila e como controle (água destilada + Tween 20). A) Gênero *Telenomus*; B) Gênero *Trissolcus*. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos, dentro de data, pelo teste Tukey ( $P < 0.05$ )

### 3.2 Parasitismo de ovos sentinela

Foi verificado na análise de MLG que a presença de parasitismo nos ovos sentinela não foi significativa entre os tratamentos ( $P=0,324$ ), no tempo ( $P= 0,318$ ), na interação entre tratamento e tempo ( $P=0,178$ ). Os ovos sentinela foram parasitados por indivíduos da família Platygastridae, sendo observado apenas efeito significativo para a interação entre o tratamento e o tempo ( $F_{2,117}=5,197$ ,  $P=0,025$ ), embora não tenha sido significativo para os fatores tratamento e tempo, individualmente. Para o total de parasitoides emergidos das parcelas tratadas não foi observada diferença significativa entre o tratamento, tempo e na interação entre estes dois fatores (Figura 6B).

Para análise individual do nível de parasitismo foi observado que no estágio R7, foi significativamente maior nas parcelas pulverizadas com SAME ( $F_{2,12}=12,23$ ,  $P=0,001$ ; Figura 6A), não sendo observada diferença significativa para o nível de parasitismo ocasionado nos demais estádios de desenvolvimento da soja.

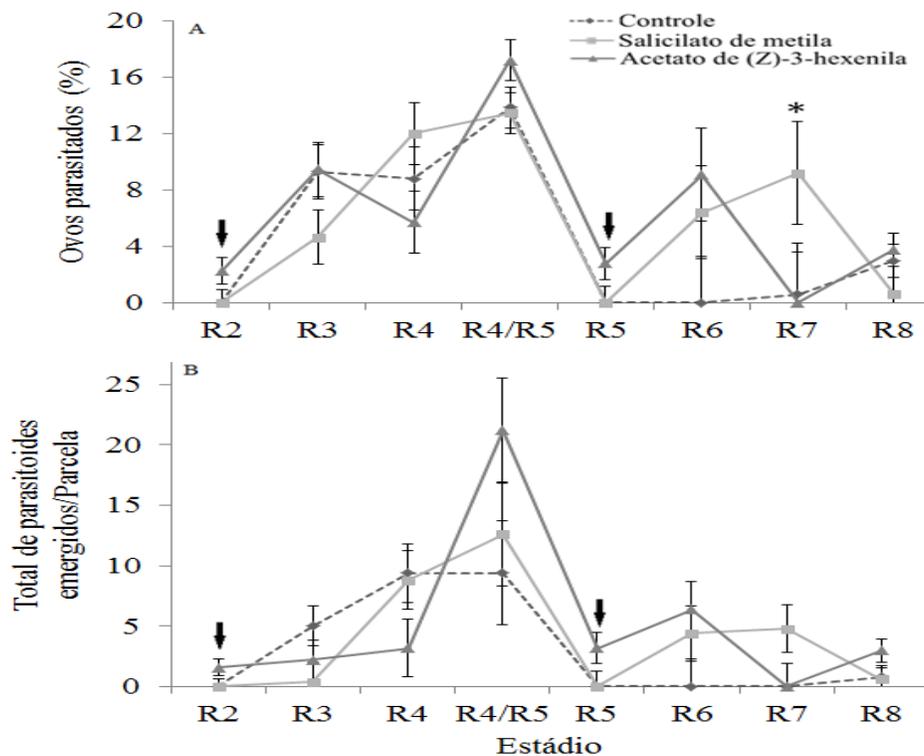


Figura 6 Parasitismo em cartelas de ovos sentinelas de *Euschistus heros* (Média  $\pm$  EP) colocadas nas parcelas de soja pulverizadas com acetato de (*cis*)-3-hexenila e salicilato de metila e como controle (água destilada + Tween 20). (A) Ovos parasitados (%); (B) Total de parasitoides emergidos. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos, dentro de data, pelo teste Tukey ( $P < 0.05$ )

### 3.3 Abundância de percevejos

A captura de percevejos por pano de batida nas parcelas tratadas foi significativa quando analisada a abundância ao longo do tempo ( $F_{2,117}=6,132$ ,  $P=0,014$ ). Porém, não foram observadas diferenças entre os tratamentos e na interação entre tratamento e tempo (Figura 7).

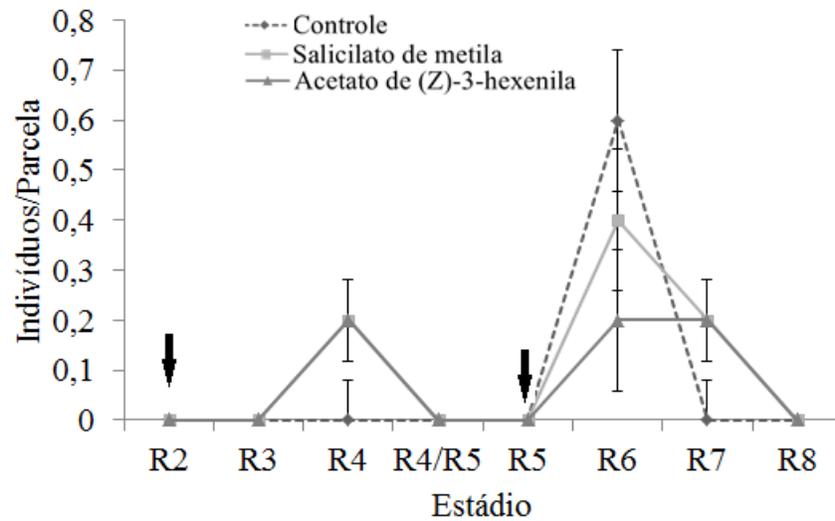


Figura 7 Densidade populacional de Pentatomidae (Média  $\pm$  EP) capturado em pano de batida nas parcelas de soja pulverizadas com acetato de (*cis*)-3-hexenila e salicilato de metila e como controle (água destilada + Tween 20). Asterisco indica diferença significativa entre as cultivares, dentro de data, pelo teste Tukey ( $P < 0.05$ )

#### 4 DISCUSSÃO

Neste estudo foi observado que a pulverização dos COVs AH e SAME em plantas de *G. max* afeta a abundância de parasitoides em campo com aumento do número de parasitoides e o nível de parasitismo, principalmente nos últimos estádio de desenvolvimento das plantas de soja. A emissão de voláteis em plantas acontece durante todo o ciclo de desenvolvimento, contudo em condições de campo as plantas ficam expostas a efeitos bióticos e abióticos que desencadeiam alterações nas emissões de voláteis (DICKE, 2009). A exposição das plantas a COVs naturais e sintéticos podem induzir a produção de voláteis, de maneira similar às ocasionadas pelos herbívoros (DICKE; VAN LOON, 2000), que resulta na atração de parasitoides (MICHEREFF et al., 2011; MORAES et al., 2009). Esses compostos voláteis liberados pelas plantas constituem uma importante informação para os inimigos naturais localizarem os hospedeiros e as presas (BALDWIN et al., 2006; DICKE; BALDWIN, 2010). Neste estudo foi verificado que as pulverizações com COVs sintéticos alteram a quantidade de parasitoides em campo; este resultado é um indicativo que as mudanças na produção de voláteis liberados pelas plantas, que contribui para mudança no comportamento de busca do parasitoide *T. podisi* (resultados discutidos no artigo 1), e do percevejo marrom *E. heros* (resultados discutidos no artigo 2) possui potencial para a utilização em campo. Assim, testamos a hipótese de que as plantas de soja tratadas pelos AH e SAME afetam parasitoides e percevejos em campo, e que o uso de COVs no campo poderia ser uma ferramenta para auxiliar no MIP.

De acordo com o observado, os resultados indicam que tanto as parcelas que foram pulverizadas com os COVs sintéticos e as parcelas-controle pulverizadas com água destilada + Tween (0,1%), contribuíram para a captura de diversas famílias de parasitoides, principalmente da família Platygastriidae,

sendo verificado que dentro desta família os dois gêneros capturados foram *Telenomus* e *Trissolcus*, responsáveis pela regulação da população de percevejo marrom *E. heros* em áreas de cultivo de soja. Resultado semelhante também foi observado por Vieira et al. (2013), em que demonstraram que a abundância de parasitoides em campo de soja é influenciada após a pulverização com o COV (*cis*)-jasmona, com atração dos parasitoides do gênero *Platygastridae*, principalmente da espécie *Telenomus* sp.

A diferença entre os elicitores testados está relacionada às vias metabólicas que podem ser ativadas. Essa inferência é condizente com os resultados observados, visto que as parcelas pulverizadas com o SAME apresentaram uma maior captura de parasitoides de ovos do gênero *Telenomus* no período final do ciclo da soja no estágio de desenvolvimento (R7). Como as pulverizações foram realizadas em dois períodos nos estágios R2 e R5, esse efeito do COV pode ser devido à indução da defesa da planta pelo SAME, tendo em vista que alguns COVs induzem as plantas por um maior período que facilita a atração de parasitoides e predadores por mais tempo (AN; MOU, 2011). Outra justificativa está relacionada a uma resposta numérica, isto é, um aumento da população de parasitoides devido aos parasitoides que foram atraídos durante a primeira pulverização realizada no estágio (R2), e permaneceram nas parcelas tratadas. Isso demonstra a potencialidade desses parasitoides do gênero *Telenomus* na regulação da população do percevejo, visto que já tinha sido confirmada a preferência do *T. podisi* aos voláteis de plantas induzidas pelo SAME em ensaios de laboratório (resultados descritos no artigo 1).

Para o sucesso do parasitoide no controle biológico clássico é necessária presença de parasitoide nas áreas de cultivo, assim como a capacidade de parasitismo. O aumento de parasitoides observados nas parcelas pulverizadas com o SAME no estágio de desenvolvimento (R7), também afetou o parasitismo nos ovos sentinela, embora não tenham sido verificadas diferenças entre os

demais estádios analisados, mesmo com a presença dos parasitoides. Talvez este fato possa estar relacionado à baixa abundância do hospedeiro nas áreas tratadas.

Embora tenha sido verificada a preferência de fêmeas do percevejo *E. heros* para os voláteis induzidos pelas plantas de soja (resultado descrito no artigo 2), não foram observadas diferenças significativas entre as parcelas tratadas com o AH e SAME e parcelas-controle. Apenas foi observado um maior número de percevejos adultos do gênero Pentatomidae entre os estádios R6 a R7 em todos os tratamentos, o que corrobora as observações de trabalhos prévios, que relatam o pico populacional de percevejos a partir do estágio R5 (BORGES et al., 2011; CORRÊA-FERREIRA; MOSCARDI, 1995; MICHEREFF et al., 2015).

Nossos resultados demonstraram que a pulverização com o AH e SAME em plantas de soja alteram a população de parasitoides nas áreas quando comparada com as áreas controle. Novas análises para avaliação da abundância de parasitoides e herbívoros são necessárias nos campos de cultivo com soja a fim de complementar a eficácia dos indutores testados, assim como é necessária a identificação dos voláteis liberados pelas plantas em campo, e testes com liberação de percevejos a fim de analisar a interação desses insetos com as plantas e os inimigos naturais. Além de testar a capacidade de manipulação da população de parasitoides e predadores para uma pequena área do cultivo, que possibilitaria o uso, quando necessário, de inseticidas, sem ocorrer uma redução drástica na população de inimigos naturais.

**REFERÊNCIAS**

AN, C.; MOU, Z. Salicylic acid and its function in Plant Immunity. **Journal of Integrative Plant Biology**, Cas, v. 53, n. 6, p. 412–428, June 2011.

BALDWIN, I. T. et al. Volatile signaling in plant–plant interactions: ‘talking trees’ in the genomics era. **Science**, Washington, v. 311, n. 5762, p. 812–815, Feb. 2006.

BARBOSA, P. et al. Associational resistance and associational susceptibility: having rightor wrong neighbors. **Annual Review of Ecology Evolution and Systematics**, Stanford, v. 40, p. 1–20, Dec. 2009.

BEYAERT, I.; HILKER, M. Plant odour plume as mediators of plant-insect interactions. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 89, n. 1, p. 68-81, Feb. 2014.

BORGES, M. et al. Monitoring the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) with pheromone-baited traps in soybean fields. **Journal of Applied Entomology**, Goettingen, v. 135, n. 1/2, p. 68-80, Feb. 2011.

BRUCE, T. J. A.; PICKETT, J. A. Perception of plant volatile blends by herbivorous insects – finding the right mix. **Phytochemistry**, Washington, v. 72, n. 13, p. 1605–1611, Sept. 2011.

CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. Seasonal occurrence and host spectrum of egg parasitoids associated with soybean stink bugs. **Biological Control**, Kentucky, v. 5, n. 2, p. 196–202, June 1995.

DICKE, M.; BALDWIN, I. T. The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: Beyond the “cry for help”. **Trends in Plant Science**, Cambridge, v. 15, n. 3, p. 167–175, Mar. 2010.

DICKE, M. Behavioural and community ecology of plants that cry for help. **Plant, Cell & Environment**, Logan, v. 32, n. 6, p. 654–665, June 2009.

DICKE, M.; LORETO, F. Induced plant volatiles: from genes to climate change. **Trends in Plant Science**, Cambridge, v. 15, n. 3, p. 115–117, 2010.

DICKE, M.; VAN LOON, J. J. A. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 97, n. 3, p. 237–249, Dec. 2000.

DUDAREVA, N. et al. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Science**, Philadelphia, v. 25, n. 5, p. 417–440, Jan. 2006.

FEHR, W. R. et al. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Science**, Davis, v. 11, n. 6, p. 929–931, Nov. 1971.

GAULD, I. D.; BOLTON, B. **The hymenoptera**. Oxford: Oxford University, 1988. 331 p.

GLINWOOD, R.; NINKOVIC, V.; PETTERSSON, J. Chemical interaction between undamaged plants: effects on herbivores and natural enemies. **Phytochemistry**, Washington, v. 72, n. 13, p. 1683–1689, Sept. 2011.

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

HEIL, M.; KARBAN, R. Explaining evolution of plant communication by airborne signals. **Trends in Ecology & Evolution**, Riverport Lane, v. 25, n. 3, p. 137–144, Mar. 2010.

HEIL, M.; TON, J. Long-distance signalling in plant defence. **Trends in Plant Science**, Cambridge, v. 13, n. 6, p. 264–272, June 2008.

JAMES, D. G. Field evaluation of herbivore-induced plant volatiles as attractants for beneficial insects: methyl salicylate and the green lacewing, *Chrysopa nigricornis*. **Journal of Chemical Ecology**, Tampa, v. 29, n. 7, p. 1601–1609, July 2003a.

JAMES, D. G. Further field evaluation of synthetic herbivore-induced plant volatiles as attractants for beneficial insects. **Journal of Chemical Ecology**, Tampa, v. 31, n. 3, p. 481–495, Mar. 2005.

JAMES, D. G. Synthetic herbivore-induced plant volatiles as field attractants for beneficial insects. **Environmental Entomology**, State College, v. 32, n. 5, p. 977–982, Oct. 2003b.

LUCAS-BARBOSA, D.; VAN LOON, J. J. A.; DICKE, M. The effects of herbivore induced plant volatiles on interactions between plants and flower-visiting insects. **Phytochemistry**, Washington, v. 72, n. 13, p. 1647–1654, Sept. 2011.

MICHEREFF, M. F. F. et al. Effect of resistant and susceptible soybean cultivars attraction of eggs parasitoids under field conditions. **Journal of Applied Entomology**, Goettingen, v. 139, n. 3, p. 207–216, Apr. 2015.

MICHEREFF, M. F. F. et al. Volatiles mediating a plant-herbivore-natural enemy interaction in resistant and susceptible soybean cultivars. **Journal of Chemical Ecology**, Tampa, v. 37, n. 3, p. 273–285, Mar. 2011.

MORAES, M. C. B.; BORGES, M.; LAUMANN, R. A. The application of chemical cues in arthropod pest management for arable crops. In: WAJNBERG, E.; COLAZZA, S. (Ed.). **Chemical ecology of insect parasitoids**. London: Wiley-Blackwell, 2013. p. 225–244.

MORAES, M. C. B. et al. Attraction of the stink bug egg parasitoid *Telenomus podisi* to defence signals from soybean activated by treatment with *cis*-jasmone. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 131, n. 2, p. 178–188, May 2009.

QUALLEY, A. V.; DUDAREVA, N. Aromatic volatiles and their involvement in plant defense. In: SCHALLER, A. (Ed.). **Induced plant resistance to herbivory**. Berlin: Springer, 2008. p. 409–432.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2009. 409 p.  
SCHOONHOVEN, L. M.; VAN LOON, J. J. A.; DICKE, M. **Insect-Plant biology**. Oxford: Oxford University, 2005. 400 p.

SIMPSON, M et al. Attract and reward: combining chemical ecology and habitat manipulation to enhance biological control in field crops. **Journal of Applied Ecology**, Toronto, v. 48, n. 3, p. 580–590, June 2011a.

SIMPSON, M. et al. Insect attraction to synthetic herbivore-induced plant volatile treated field crops. **Agricultural and Forest Entomology**, Penicuik, v. 13, n. 1, p. 45–57, Feb. 2011b.

VIEIRA, C. R. et al. *Cis*-Jasmone indirect action on egg parasitoids (Hymenoptera: Scelionidae) and its application in biological control of soybean stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae). **Biological Control**, Kentucky, v. 64, n. 1, p. 75–82, Jan. 2013.

VIEIRA, C. R. et al. Field evaluation of (*E*)-2-hexenal efficacy for behavioral manipulation of egg parasitoids in soybean. **Biocontrol**, Sophia Antipolis Cedex, v. 59, n. 5, p. 525–537, Oct. 2014.

VON MÉREY, G. Dispensing synthetic green leaf volatiles in maize fields increases the release of sesquiterpenes by the plants, but has little effect on the attraction of pest and beneficial insects. **Phytochemistry**, Washington, v. 72, n. 14–15, p. 1838–1847, Oct. 2011.

## TERCEIRA PARTE

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em nosso estudo, foi verificado que o acetato de (*cis*)-3-hexenila e salicilato de metila alteram a produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) em cultivares de soja. Sendo esses voláteis utilizados como pistas químicas por inimigos naturais, comprovadas pela atração do parasitoide de ovos *T. podisi* aos voláteis liberados pelas plantas induzidas pela aplicação dos COVs sintéticos. Também ficou claro que os voláteis liberados pelas plantas da cv BR-16 (suscetível) não atraíram os parasitoides, apesar de os parasitoides serem atraídos para os voláteis liberados pela outra cultivar suscetível testada. Essa diferença pode estar associada a variações na ativação do metabolismo secundário, principalmente, na rota dos octadecanoides, responsável pela produção dos voláteis de folhas verdes e derivados do ácido jasmônico. Esses voláteis são liberados rapidamente, e permitem a ativação de defesa em tecidos saudáveis e a atração de inimigos naturais. Os principais COVs em quantidades elevadas liberados pelas plantas induzidas foram os terpenos, álcoois e aldeídos, grupos considerados importantes na transmissão de informações sobre localização de presas e predadores para os inimigos naturais.

Também ficou demonstrado que os voláteis liberados pelas plantas induzidas pelos COVs auxiliam na atração de herbívoros, sendo visto que as fêmeas do percevejo *E. heros*, preferem plantas induzidas pelo acetato de (*cis*)-3-hexenila e salicilato de metila comparado com os voláteis liberados por plantas-controle pulverizadas com água destilada. Contudo observamos que possivelmente as induções podem alterar outros metabólitos, translocados pelo floema e xilema, em geral, esses compostos acumulam nos

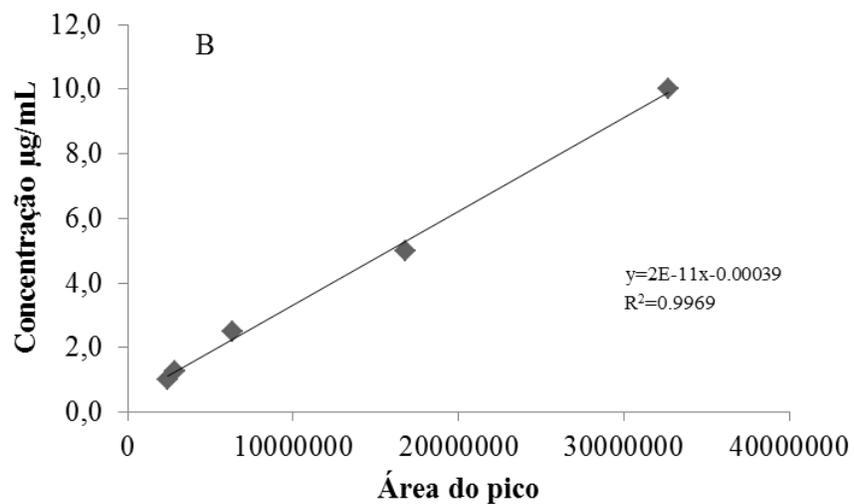
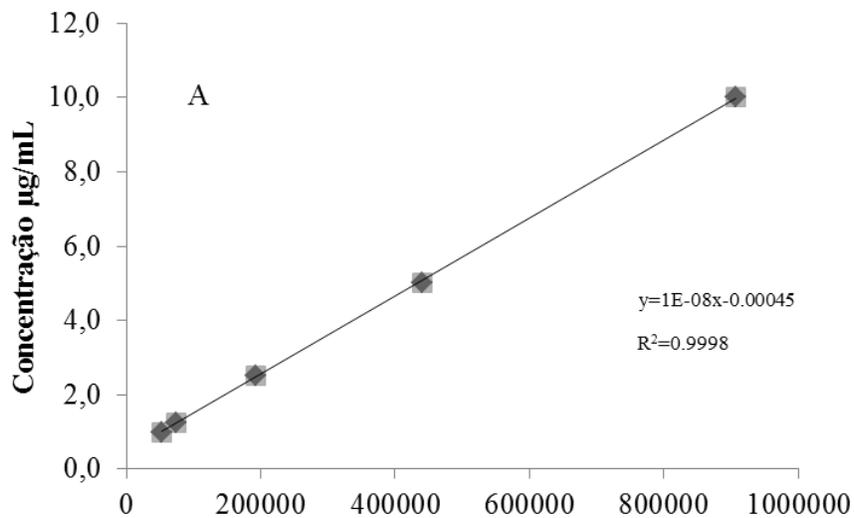
tecidos vegetais e causam deterrencia entre outros efeitos nos herbívoros. Sendo constatada a mudança de comportamento nas fêmeas de *E. heros*, antes da oviposição, visto que essas realizam uma picada de prova, a fim de saber quais as qualidades nutricionais que a planta pode oferecer para a futura prole, assim foi observado que os COVs pulverizados nas plantas afetaram o número de ovos e postura realizada pelas fêmeas do percevejo, talvez essa não preferência pela oviposição de uma grande quantidade de ovos está relacionada a baixa qualidade nutricional ou mesmo pela acumulação de toxinas que podem retardar o desenvolvimento das ninfas e/ou até mesmo causar a morte. Esses efeitos foram observados nos ensaios de desenvolvimento do percevejo, as ninfas alimentadas em plantas de soja pulverizadas com os COVs, retardaram o desenvolvimento ninfal além de afetar a longevidade e mortalidade de adultos. Apesar das alterações no metabolismo secundário com produção de diversos compostos químicos, a capacidade de desenvolvimento da planta de soja não é comprometida após a pulverização com os COVs, segundo os nossos resultados. Esse fato indica que, a exposição das plantas aos COVs sintéticos pode preparar o sistema de defesa, sem prejudicar o desenvolvimento inicial da planta.

Essas interações entre diferentes níveis tróficos, ocasionadas pelas mudanças nas plantas de soja após a pulverização com os COVs, também foi observada em campo. As plantas induzidas atraíram parasitoides de várias famílias, principalmente da Platygasteridae e Pteromalidae. Também foi observada que a capacidade de parasitismo destes parasitoides foi regular, apesar da dificuldade para mensurar os níveis, em virtude da baixa população de percevejos na área testada, que pode ter limitado o crescimento populacional dos parasitoides de ovos do gênero *Telenomus* e *Trissolcus*.

Novos estudos são necessários a fim de validar a eficácia dos elicitores testados, assim como é necessária a identificação das rotas

metabólicas que são ativadas, identificação dos voláteis liberados pelas plantas em campo, mensuração dos níveis de produtividade em plantas expostas aos COVs sintéticos, e testes com liberadores de COVs para analisar a interação entre as plantas, percevejos e parasitoides em campo, a resposta para essas questões poderia facilitar o melhor aprimoramento para o uso da técnica no controle biológico em áreas extensas de cultivo.

## ANEXO 1



Curvas de calibração para a quantificação dos voláteis em soja. A) (*trans,trans*)- $\alpha$ -farneseno, B) (*trans,trans*)-4,8,12-trimetiltrideca-1,3,7,11-tetraeno (TMTT)