

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**RESPOSTA DE *Cotesia kariyai* (WATANABE) E *Cotesia flavipes* (CAMERON) (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) A
VOLÁTEIS INDUZIDOS POR HERBIVORIA**

Alexandre Carlos Menezes-Netto

Engenheiro Agrônomo

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**RESPOSTA DE *Cotesia kariyai* (WATANABE) E *Cotesia flavipes* (CAMERON) (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) A
VOLÁTEIS INDUZIDOS POR HERBIVORIA**

Alexandre Carlos Menezes-Netto

Orientador: Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes

Co-orientador: Yooichi Kainoh

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Entomologia Agrícola).

M543r Menezes-Netto, Alexandre Carlos
Resposta de *Cotesia kariyai* (Watanabe) e *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) a voláteis induzidos por herbivoria / Alexandre Carlos Menezes-Netto. – – Jaboticabal, 2014
xi, 41 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientador: Odair Aparecido Fernandes
Co-orientador: Yooichi Kainoh
Banca examinadora: Jorge Braz Torres, Maria Carolina Blassioli Moraes, Sergio Antonio De Bortoli, Antonio Carlos Busoli
Bibliografia

1. *Cotesia kariyai*. 2. *Cotesia flavipes*. 3. Herbivoria múltipla. 4. Voláteis induzidos de plantas. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 595.7:632.937

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: RESPOSTA DE *Cotesia kariyai* (WATANABE) E *Cotesia flavipes* (CAMERON) (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) A VOLÁTEIS INDUZIDOS POR HERBIVORIA

AUTOR: ALEXANDRE CARLOS MENEZES NETTO

ORIENTADOR: Prof. Dr. ODAIR APARECIDO FERNANDES

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. YOOICHI KAINOH

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA (ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ODAIR APARECIDO FERNANDES
Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. SERGIO ANTONIO DE BORTOLI
Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. ANTONIO CARLOS BUSOLI
Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. JORGE BRAZ TORRES
Universidade Federal Rural de Pernambuco / Recife/PE

Profa. Dra. MARIA CAROLINA BLASSIOLI MORAES
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / Brasília/DF

Data da realização: 29 de janeiro de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ALEXANDRE CARLOS MENEZES-NETTO – Nasceu em 02 de novembro de 1985 na cidade de Currais Novos, estado do Rio Grande do Norte. Formou-se engenheiro agrônomo pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Campus de Mossoró, RN, em dezembro de 2007. Durante três anos e meio do seu curso de graduação (julho de 2004 a dezembro de 2007) foi estagiário do Laboratório de Entomologia Aplicada e bolsista do PIBIC/CNPq (agosto de 2005 a setembro de 2007), sob a orientação do Prof. Dr. Elton Lucio de Araujo, onde defendeu o trabalho “Aspectos biológicos de *Liriomyza trifolii* (Burgess) (Diptera: Agromyzidae) na cultura do meloeiro *Cucumis melo* L.”. Em março de 2008 iniciou o curso de mestrado em Agronomia (Entomologia Agrícola), na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, SP, como bolsista do CNPq, sob a orientação do Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes, e defendeu o trabalho "Fatores naturais e *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Scelionidae) na mortalidade de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho", em fevereiro de 2010. Em março do mesmo ano ingressou no curso de doutorado em Agronomia, área de concentração em Entomologia Agrícola, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, SP, como bolsista da Capes, e também sob a orientação do Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes. De março a julho de 2012 realizou estágio sanduíche (bolsa Capes, Processo BEX 9481/11-7) na universidade de Tsukuba (Ibaraki, Japão), sob a orientação do Prof. Dr. Yooichi Kainoh.

Liberdade é poder falar o que se pensa. Respeito é saber que outros podem pensar diferente. Inteligência é ponderar essas duas coisas. (Gilson L. Volpato)

Ou o século XXI é dedicado aos valores humanos, morais e éticos... ou de nada valeram os avanços tecnológicos conquistados até aqui. (Gilson L. Volpato)

Aos meus pais,
Neuton da Costa Menezes e
Maria de Souza Menezes

e irmãos,
Sheyla Sergina Menezes Carrilho e
Euclides Sátiro Menezes

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao **Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola** da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade de fazer o curso de doutorado, pelo apoio e condições de trabalho oferecidas.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES) pela bolsa de estudos e pela bolsa de estágio sanduíche (Processo BEX 9481/11-7) realizado na Universidade de Tsukuba (Japão).

Ao Prof. Dr. **Odair Aparecido Fernandes**, pela confiança no meu trabalho, orientação, incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. **Yooichi Kainoh** (Universidade de Tsukuba), pela confiança, orientação, incentivo e amizade.

A todos os **professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola**, pelo conhecimento e experiência compartilhados.

Aos professores e amigos **Elton Lucio de Araujo**, **Rui Sales Júnior**, **Marcos Antonio Filgueira** (Universidade Federal Rural do Semi-Árido, UFERSA) e **Luciano Pacelli Medeiros Macedo** (Instituto Federal do Rio Grande do Norte, IFRN), pelos ensinamentos transmitidos, exemplo de profissionalismo e amizade que tanto contribuíram para a minha formação.

A todos os **amigos de pós-graduação** que obtive durante estes seis anos de convivência no Departamento de Entomologia. Especialmente aos grandes amigos **Daniell Rodrigo Rodrigues Fernandes**, **Francisco José Sosa Duque**, **Haroldo Xavier Linhares Volpe** e **Claudio Antonio Salas Figueroa** pelas discussões, entomológicas ou não, e especialmente pela grande amizade.

Aos amigos de pós-graduação e professores **Douglas Henrique Bottura Maccagnan** (Universidade Estadual de Goiás, UEG, Campus de Iporá) e **Ivan Carlos Fernandes Martins** (Universidade Federal Rural da Amazônia, UFRA, Campus de Capanema), pela amizade, pelo companheirismo e pelos momentos de descontração.

Aos grandes amigo(a)s **Juliana Duarte de Souza Alonso**, **Tiago Rodrigo Lohmann**, **José Antônio de Souza Rossato Júnior**, **Andréa Corrêa Varella**,

Tatiana Rodrigues Carneiro, por tudo o que vivemos juntos, pela grande amizade e experiências compartilhadas. Muito obrigado por tudo!

Aos membros da equipe do Laboratório de Ecologia Aplicada: **Dayane Andrade dos Reis, Thais Tanan de Oliveira, Luan Alberto Odorizzi dos Santos, Éllen Rimkevicius Carbognin, Marieli Fernandes, Laíssa Cavallini dos Santos, Hurian Gallinari Holzhausen, André Maurício Múscari, Marcio Pistore Santos, Fabiana Cristina de Freitas, Audrey Hermes Konda, Daniela da Costa**. Em especial ao meu grande amigo **Daniel Ferreira Caixeta** e à querida **Márcia Regina Macri Ferreira**. Muito obrigado pela amizade, companhia, experiências compartilhadas, e por fazerem parte da minha formação.

Aos ex-membros do Laboratório de Ecologia Aplicada: **Elis Cristine Vilarinho, Lidiane Roberta Pavani, Matheus Rovere de Moraes, Ana Elisa Mafra, Helton Pereira Câmara, Marcelo Roberto Lontro Junior, Lais Fávero, Bárbara Natali de Toledo**.

Aos amigos **André Martins Pires** e **Leonardo da Silva Turco**, pela ajuda na realização do trabalho, pela amizade e pelos momentos de descontração.

À **Lidiane Gonçalves Caixeta** pela amizade, incentivo e companheirismo.

Ao **Sílvio Rogério Viel**, pela amizade e ajuda na solução de problemas técnicos.

Ao **Luis Eduardo Batista** (Syngenta Plene, Itápolis, SP), pelo fornecimento das mudas de cana-de-açúcar.

À **Josy Aparecida dos Santos** e **Marielly de Castro**, coordenadoras do Laboratório de Entomologia da Usina São Martinho, pela paciência e disponibilidade no fornecimento de *Diatraea saccharalis* e *Cotesia flavipes*.

Ao **Paulo Eduardo Garcia Junior** (Fazenda São José, Jaboticabal, SP), pelo apoio, incentivo, conversas sobre as pragas da cana e disponibilidade das suas áreas de produção.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Interações ecológicas mediadas por comunicação química	3
2.1.1. Defesa de plantas	4
2.1.2. Voláteis de plantas induzidos	5
2.1.3. Voláteis de plantas induzidos por herbivoria múltipla	6
2.2. Sistemas tritróficos adotados como modelo	7
2.2.1. <i>Zea mays</i> – <i>Mythimna separata</i> / <i>Ostrinia furnacalis</i> – <i>Cotesia kariyai</i>	7
2.2.2. <i>Saccharum</i> spp. – <i>Diatraea saccharalis</i> / <i>Mahanarva fimbriolata</i> – <i>Cotesia flavipes</i>	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Plantas	10
3.2. Herbívoros	10
3.3. Parasitoides	11
3.4. Olfatômetro e procedimentos experimentais	12
3.5. Fontes de estímulos olfativos	15
3.6. Tratamentos	16
3.7. Análise dos dados	18
4. RESULTADOS	19
4.1. Preferências olfativas de <i>Cotesia kariyai</i>	19
4.2. Preferências olfativas de <i>Cotesia flavipes</i>	23
4.3. Avaliação dos parâmetros de tempo e área nos bioensaios com <i>C. kariyai</i> em olfatômetro de quatro vias.....	26
5. DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÕES	34
7. REFERÊNCIAS	35

**RESPOSTA DE *Cotesia kariyai* (WATANABE) E *Cotesia flavipes* (CAMERON)
(HYMENOPTERA: BRACONIDAE) A VOLÁTEIS INDUZIDOS POR HERBIVORIA**

RESUMO – *Cotesia kariyai* (Watanabe) e *Cotesia flavipes* (Cameron) são predominantes agentes de controle biológico de *Mythimna separata* (Walker) e *Diatraea saccharalis* (Fabricius), dois insetos-praga de importância econômica em campos de milho da Ásia, e de milho e cana-de-açúcar no Brasil, respectivamente. Compreender os mecanismos utilizados por estes parasitoides na estratégia de localização do hospedeiro é essencial para melhor desenvolver os programas de controle biológico. Na complexidade dos *habitats* (ambientes naturais e/ou cultivados), muitos aspectos influenciam a localização do habitat do hospedeiro, a localização do hospedeiro propriamente dito e a aceitação do hospedeiro por esses parasitoides (por exemplo, a presença de hospedeiros inadequados). Em distintas combinações de dupla-escolha de tratamentos avaliados em olfatômetro de quatro vias, investigamos a influência de plantas de milho e de cana-de-açúcar infestadas simultaneamente por ambos os hospedeiros e não hospedeiro (hospedeiros inadequados) na resposta olfativa de *C. kariyai* e *C. flavipes*. *C. kariyai* discriminou entre plantas de milho infestadas pelo hospedeiro e pelo não hospedeiro, dependendo do nível de infestação do não hospedeiro. Plantas de milho infestadas por ambos os hospedeiros e não hospedeiro foram preferidas por *C. kariyai* em relação às plantas infestadas somente pelo hospedeiro. *C. flavipes* preferiu voláteis de plantas de cana-de-açúcar infestadas pelo hospedeiro àqueles de plantas infestadas pelo não hospedeiro. Plantas de cana infestadas simultaneamente pelo hospedeiro e pelo não hospedeiro foram igualmente preferidas por *C. flavipes*.

Palavras-chave: Herbivoria múltipla, interações inseto-planta, não hospedeiro, parasitoide, voláteis de plantas induzidos por herbivoria

***Cotesia kariyai* (WATANABE) AND *Cotesia flavipes* (CAMERON)
(HYMENOPTERA: BRACONIDAE) RESPONSE TO HERBIVORE-INDUCED
VOLATILES**

ABSTRACT – *Cotesia kariyai* (Watanabe) and *Cotesia flavipes* (Cameron) are predominant biological control agents of *Mythimna separata* (Walker) and *Diatraea saccharalis* (Fabricius), two economically important insect pests in maize fields of Asia, and maize and sugarcane fields in Brazil, respectively. Understanding the mechanisms used by these species on their host search strategy is essential for enhancing biological control programs. In a complex habitat (natural and/or cultivated environments), several aspects influence host habitat location, host finding and host acceptance by these parasitoid species (e.g., the presence of unsuitable hosts). We run many distinct dual-choice treatment combinations in a four-arm olfactometer to investigate the influence of simultaneously infested maize and sugarcane plants by both host and nonhost (unsuitable) herbivores, in the olfactory response of *C. kariyai* and *C. flavipes*. *C. kariyai* could discriminate between host- and nonhost-infested maize plants depending on the nonhost infestation level. Maize plants infested by both host and nonhost herbivores were preferred by *C. kariyai* over than infested by host alone. *C. flavipes* preferred host-infested sugarcane plant volatiles over volatiles from nonhost-infested plants. Sugarcane plants infested by both host and nonhost herbivores were equally preferred by *C. flavipes*.

Keywords: Multiple herbivory, plant-insect interactions, non-host, parasitoid, herbivore-induced plant volatiles

1. INTRODUÇÃO

As plantas, quando utilizadas como alimento por herbívoros, ativam a produção e emissão de substâncias do metabolismo secundário que são qualitativa e quantitativamente distintas dos compostos emitidos quando as plantas não estão sob herbivoria (McCORMICK; UNSICKER; GERSHENZON, 2012). Essas substâncias, denominadas voláteis de plantas induzidos por herbivoria (VPIH), desempenham papel na defesa indireta de plantas (HOBALLAH; TURLINGS, 2001; KESSLER; BALDWIN, 2001) por serem responsáveis pela atração de inimigos naturais, predadores e parasitoides, muito embora ainda se discuta qual a sua real contribuição na manutenção do desempenho reprodutivo das plantas (SCHUMAN; BARTHEL; BALDWIN, 2012).

As interações entre plantas e inimigos naturais são alvo de estudos há muito tempo e o avanço no seu entendimento é significativo. Todavia, até a publicação de Price et al. (1980), entendia-se que os próprios hospedeiros, em vez das plantas, eram responsáveis pela atração dos inimigos naturais. No entanto, desde então se sabe da importância dos VPIH no processo de localização da presa ou do hospedeiro pelos predadores e parasitoides.

Inimigos naturais, especialmente parasitoides, utilizam-se quase exclusivamente de sinais químicos para localizar o habitat do seu hospedeiro e, em seguida, encontrar o seu hospedeiro propriamente dito. A sofisticada utilização dessas substâncias químicas faz parte da estratégia adotada por esses organismos para obter de modo eficiente acesso ao alimento, ambiente para acasalamento e lugar seguro para a sua prole (SCHOONHOVEN; van LOON; DICKE, 2005).

Um amplo espectro de fatores influenciam os parasitoides na utilização desses infoquímicos (provenientes das plantas, herbívoros e produtos da interação planta-herbívoro) na tomada de decisão em busca dos seus hospedeiros. Presentes em um ambiente bastante complexo, hospedeiros inadequados ao desenvolvimento dos parasitoides podem afetar o comportamento de forrageamento desses agentes biológicos, tanto na localização do habitat onde se encontra o hospedeiro, quanto na eficiência reprodutiva (tempo de forrageamento/taxas de parasitismo) (RIJK; DICKE; POELMAN, 2013). Não obstante, Rostás et al. (2006) verificaram que plantas de

milho afetadas pelo fungo *Setosphaeria turcica* (Leonard & Suggs) emitiram qualitativamente os mesmos voláteis de plantas injuriadas por *Spodoptera litoralis* (Boid.) (Lepidoptera: Noctuidae). Todavia, os autores notaram que plantas simultaneamente infectadas pelo fungo e injuriadas pelo herbívoro apresentavam menos da metade da quantidade emitida. Apesar disto, não houve redução da eficácia de atração dos parasitoides *Cotesia marginiventris* (Cresson) e *Microplitis rufiventris* (Kok.) (Hymenoptera: Braconidae) quando as plantas estavam simultaneamente infectadas pelo fungo e injuriadas pelo herbívoro.

Assim, de modo a avançar na compreensão da interação trófica, o objetivo geral desse estudo foi investigar qual a influência da presença simultânea de herbívoros (hospedeiro e não hospedeiro) na mesma planta hospedeira sobre o comportamento de atração de parasitoides. Para tanto, considerou-se dois sistemas como modelo:

1. *Zea mays* L. (Poaceae) - *Mythimna separata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae) e *Ostrinia furnacalis* (Guenée) (Lepidoptera: Crambidae) - *Cotesia kariyai* (Watanabe) (Hymenoptera: Braconidae), parasitoide de *M. separata*;
2. *Saccharum* spp. (Poaceae) – *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) e *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) - *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), parasitoide de *D. saccharalis*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Interações ecológicas mediadas por comunicação química

As interações entre espécies que compõem os ecossistemas, naturais ou modificados, ocorrem em alto grau de complexidade. A comunicação química entre espécies dos diferentes níveis tróficos é uma das principais vias pelas quais os organismos se inter-relacionam. Tomadas de decisão baseadas em componentes químicos voláteis, assim como a utilização desses odores na comunicação intra e interespecífica são extensivamente observadas tanto em ecossistemas naturais quanto em agroecossistemas (SCHOONHOVEN; van LOON; DICKE, 2005).

Os sinais químicos são normalmente denominados de semioquímicos, mas também chamados de infoquímicos, conforme proposição de Dick e Sabelis (1988). Os semioquímicos ou infoquímicos são substâncias que transmitem informações numa interação entre indivíduos da mesma espécie e/ou de espécies distintas, produzindo uma resposta comportamental ou fisiológica que pode ser vantajosa ou desvantajosa. Os semioquímicos são ainda divididos em feromônios e aleloquímicos, uma vez que podem mediar interações intra e interespecíficas, respectivamente (BENTO; NARDI, 2009).

Os feromônios são substâncias que medeiam interações entre organismos da mesma espécie, possibilitando vantagens adaptativas para o organismo emissor, para o organismo receptor, ou para ambos (NORDLUND; LEWIS, 1976). Os feromônios sexuais, particularmente, são mais amplamente estudados para fins de monitoramento e manejo de pragas agrícolas, havendo significativo avanço e consolidação de pesquisas no Brasil, incluindo a síntese e comercialização de vários compostos (BENTO; VILELA; DELLA LUCIA, 2001; VILELA; MAFRA-NETO, 2001).

Os aleloquímicos são semioquímicos que medeiam interações entre organismos pertencentes a espécies distintas. De acordo com as vantagens obtidas pelo emissor ou receptor, esse grupo de substâncias é subdividido em alomônios, cairomônios e sinomônios (NORDLUND; LEWIS, 1976). Alomônios são substâncias liberadas por um emissor (espécie A) que causam mudança no comportamento do receptor (espécie B) e que são favoráveis apenas para a primeira espécie. Em geral,

podem-se citar como alomônios as substâncias de defesas dos artrópodes (VILELA; DELLA LUCIA, 2001). Por sua vez, os cairomônios são definidos como substâncias liberadas por um emissor (espécie A) que causam mudança no comportamento do receptor (espécie B) e que são favoráveis apenas para a segunda espécie. Quando larvas de *D. saccharalis* (broca-da-cana) se alimentam do colmo de uma planta de cana-de-açúcar, elas excretam fezes que se acumulam nos orifícios (galerias) resultantes da alimentação. Substâncias voláteis provenientes das larvas, das fezes e também do regurgito das larvas de *D. saccharalis* podem ser utilizadas como sinais confiáveis para fêmeas de *C. flavipes* (parasitoide larval) na localização do seu hospedeiro (van LEERDAM; SMITH JR.; FUCHS, 1985) e, portanto, agem como cairomônio. Por último, os sinomônios são substâncias liberadas por um emissor (espécie A) que causam mudança no comportamento do receptor (espécie B) e que são favoráveis para ambas as espécies. Por exemplo, substâncias emitidas por plantas de milho induzidas por herbivoria de larvas de *Chilo partellus* (Swinhoe) (Lepidoptera: Pyralidae) (broca-do-milho em cultivos na África) atraem o parasitoide *C. flavipes* (POTTING; VET; DICKE, 1995).

Estudos que procuram entender o papel dos aleloquímicos nas relações entre plantas, herbívoros e carnívoros têm sido desenvolvidos com bastante intensidade e viabilizados pelo envolvimento multidisciplinar e ampliação significativa do número de técnicas e ferramentas disponíveis, dentre elas técnicas moleculares (TURLINGS; WACKERS, 2004; DICKE; van LOON; SOLER, 2009).

2.1.1 Defesa de plantas

Por serem fonte de recursos nutricionais de uma ampla quantidade de consumidores, as plantas desenvolveram ao longo do tempo várias estratégias de defesa contra ataques de insetos herbívoros, as quais são classificadas em dois distintos grupos de estratégia, isto é, defesa constitutiva e induzida. Por defesa constitutiva consideram-se barreiras físicas tais como tricomas, camadas de ceras ou espinhos; além de metabólitos secundários como redutores de digestibilidade, toxinas e repelentes. A segunda estratégia utilizada pelas plantas - defesa induzida - é ativada a partir do momento em que ocorrem injúrias causadas pela alimentação

de fitófagos. Trata-se da produção de substâncias voláteis que, dentre outras funções, são capazes de atrair inimigos naturais dos herbívoros das plantas e, portanto, contribuir para a sua supressão (PRICE et al., 1980, KARBAN; BALDWIN, 1997, SCHOONHOVEN; van LOON; DICKE, 2005).

2.1.2 Voláteis de plantas induzidos

Sob a ação de herbívoros, as plantas passam por alterações bioquímicas que envolvem a liberação de compostos orgânicos voláteis, denominados voláteis de plantas induzidos por herbivoria (VPIH). Essas substâncias podem se distinguir quantitativa e/ou qualitativamente daquelas produzidas e liberadas pela planta que não sofreu injúria por herbivoria e/ou oviposição (KARBAN; BALDWIN, 1997; McCORMICK; UNSICKER; GERSHENZON, 2012). Estas substâncias podem ser emitidas de forma restrita ao local onde ocorreu a injúria, assim como de maneira sistêmica (em toda a planta), como é o caso de plantas de milho sob a ação biótica de *C. partellus*, em que há liberação sistêmica de voláteis que atraem *C. flavipes* (POTTING; VET; DICKE, 1995; KARBAN; BALDWIN, 1997; DICKE; van LOON, 2000). Em um contexto evolutivo, esses voláteis podem desempenhar uma função de atratividade a inimigos naturais (parasitoides e predadores) dos herbívoros que provocam a indução (TURLINGS; WACKERS, 2004).

A indução de voláteis também pode ser provocada pela oviposição dos herbívoros. Nesse caso, as plantas antecipam a sua defesa contra os herbívoros antes mesmo que eles causem injúrias, que geralmente são realizadas por larvas/lagartas. A primeira demonstração de emissão de voláteis induzidos por oviposição foi feita por Meiners e Hilker (1997). Esse estudo mostrou que plantas de *Ulmus minor* (Miller) produzem e emitem substâncias voláteis quando o besouro *Xanthogaleruca luteola* Muller (Coleoptera: Chrysomelidae) deposita seus ovos. Os autores demonstraram ainda que o parasitoide de ovos *Oomyzus gallerucae* (Fonscolombe) (Hymenoptera: Eulophidae) é capaz de identificar essas substâncias e são atraídos para plantas de *U. minor* ovipositadas por *X. luteola*.

O conhecimento a respeito dos voláteis induzidos na defesa das plantas tem avançado significativamente. Por exemplo, a orientação de parasitoides e

predadores para planta sob herbivoria está geralmente relacionada também com a fonte de sinais químicos e não apenas com o herbívoro somente foi compreendida após Price et al. (1980) revisarem como as interações entre herbívoros e seus inimigos naturais variam entre diferentes espécies de plantas. Vet e Dicke (1992) propuseram que essa comunicação entre o primeiro (plantas) e o terceiro (carnívoros) níveis tróficos é resultado do problema da confiabilidade-detectabilidade enfrentado pelos inimigos naturais à procura de presas e hospedeiros. Isto é, os sinais emitidos pelos herbívoros são fortes indicadores da presença do hospedeiro, ou seja, de alta confiabilidade, porém são de difícil detectabilidade pelos inimigos naturais a longas distâncias devido a sua pequena biomassa quando comparada à biomassa das plantas nas quais os herbívoros estão presentes. Por outro lado, os voláteis emitidos pelas plantas são de baixa confiabilidade em relação à presença do hospedeiro; no entanto possuem biomassa relativa muito maior do que a dos herbívoros e, portanto, são facilmente detectáveis.

Apesar do avanço no conhecimento, a discussão a respeito da real contribuição dos voláteis de plantas no aumento do sucesso reprodutivo das plantas pelo processo de atração dos inimigos naturais ainda é bastante intensa (DICKE; van LOON, 2000; HARE, 2011; McCORMICK; UNSICKER; GERSHENZON, 2012; SCHUMAN; BARTHEL; BALDWIN, 2012). A maioria das pesquisas tem se empenhado em entender o significado ecológico e evolutivo que esses voláteis exercem nas plantas (McCORMICK; UNSICKER; GERSHENZON, 2012). Sabe-se, por exemplo, que os VPIH emitem informações específicas aos inimigos naturais a respeito da espécie de herbívoro presente na planta, assim como a sua idade e estágio de desenvolvimento (TAKABAYASHI et al., 1995).

2.1.3 Voláteis de plantas induzidos por herbivoria múltipla

Na natureza as plantas geralmente são hospedeiras de mais de uma espécie de inseto herbívoro, que frequentemente possuem distintos hábitos alimentares. Assim, os perfis químicos dos voláteis emitidos por plantas sob essa condição de herbivoria múltipla podem alterar as respostas que, por exemplo, os parasitoides

apresentariam em uma condição de infestação/herbivoria realizada por uma única espécie (RIJK; DICKE; POELMAN, 2013).

Na década de 2000, os interesses nos estudos das defesas induzidas de plantas têm sido direcionados para a herbivoria múltipla. Nesses estudos, técnicas ecológicas, químico-biológicas e biológico-moleculares têm sido utilizadas de forma integrada. Até então, os cientistas estavam concentrados no entendimento dos mecanismos de indução dos VPIH em sistemas envolvendo uma planta e um herbívoro. O fato da complexidade envolvida em situações reais ser bem maior do que a interação entre uma planta e um herbívoro, somado ao avanço das técnicas/ferramentas disponíveis, fez com que se procurasse entender os meios pelos quais múltiplas infestações de plantas por diferentes herbívoros podem aumentar, atenuar ou, de qualquer modo, alterar as respostas dos VPIH (DICKE; van LOON; SOLER, 2009).

Desse modo, os esforços também têm sido direcionados no intuito de entender de modo mais realista como os parasitoides reagem à imensa amplitude de sinais químicos com os quais eles se deparam em campo. Por exemplo, na maioria das vezes, as plantas estão sob a ação de mais de um tipo de herbívoro que geralmente possuem hábitos alimentares diversos. Portanto, as pesquisas têm avançado na compreensão dos efeitos causados pela herbivoria múltipla, bem como do papel que herbívoros não hospedeiros exercem sobre parasitoides (ex., AGBOGBA; POWELL, 2007; de BOER et al., 2008; DICKE; van LOON; SOLER, 2009; ERB; FORESTI; TURLINGS, 2010; BUKOVINSZKY et al., 2012).

2.2 Sistemas tritróficos adotados como modelo

2.2.1 *Zea mays* – *Mythimna separata*/*Ostrina furnacalis* – *Cotesia kariyai*

Mythimna separata é um importante inseto-praga na Austrália, Nova Zelândia e em países da Ásia, inclusive no Japão. As larvas se alimentam das plantas e causam perdas econômicas predominantemente em lavouras de gramíneas (milho, sorgo e arroz) (KANDA, 1991).

Ostrinia furnacalis (Asian corn borer) é um inseto-praga que se distribui desde a China até a Austrália (NAFUS; SCHREINER, 1991). As lagartas podem ocasionar sérias perdas na produção de milho, tanto pelas injúrias causadas ao cartucho, quanto pelo ato de se alimentar de espigas, folhas e colmo. A sobrevivência e o desenvolvimento das lagartas ocorrem predominantemente nas partes reprodutivas das plantas de milho. Outras espécies cultivadas como pimentão, gengibre, sorgo e algodão também são hospedeiros de *O. furnacalis* (NAFUS; SCHREINER, 1991).

Cotesia kariyai é um endoparasitoide gregário especialista de larvas de *M. separata*. Várias pesquisas já foram desenvolvidas no intuito de entender como esse parasitoide localiza o seu hospedeiro, assim como identificar quais fatores relacionados às plantas hospedeiras e ao próprio hospedeiro afetam a estratégia de busca desse agente de controle biológico (TAKABAYASHI; TAKAHASHI, 1989; TAKABAYASHI et al., 1995; FUJIWARA; TAKABAYASHI; YANO, 2000a, b; FUKUSHIMA et al., 2001; FUKUSHIMA et al. 2002; HOU; TAKABAYASHI; KAINOH, 2005; MANDOUR et al., 2011). Apesar das informações já conhecidas sobre a ecologia químico-comportamental de *C. kariyai* em relação a *M. separata* em milho, questões como a influência da presença de mais de um herbívoro na planta hospedeira sobre o comportamento de localização do hospedeiro por esse agente biológico ainda não foram respondidas.

2.2.2 *Saccharum* spp. – *Diatraea saccharalis*/Mahanarva fimbriolata – *Cotesia flavipes*

D. saccharalis é um dos mais importantes lepidópteros-praga do Brasil. Ocorre em todas as regiões produtoras de cana-de-açúcar durante todo o ano e em algumas importantes regiões produtoras de milho, causando sérios danos. Até recentemente era considerada a principal praga da cana-de-açúcar. No entanto, com a recente mudança do método de colheita manual (com utilização do fogo) para a colheita mecânica da cana-de-açúcar, a cigarrinha-das-raízes *M. fimbriolata* atualmente divide essa posição de destaque, pois vem ocorrendo em altas populações. Dentre os métodos de controle dessas pragas, os programas de controle biológico da broca-da-cana com o braconídeo *C. flavipes* e da cigarrinha-

das-raízes com o fungo *Metarhizium anisopliae* possuem destaque (ALMEIDA; BATISTA FILHO, 2006; PINTO, 2006).

Cotesia flavipes é um himenóptero parasitoide de espécies do gênero *Chilo* (Lepidoptera: Crambidae) e de outros crambídeos, tanto quanto de brocas de colmos de gramíneas do sudeste da Ásia e da Austrália (BOTELHO; MACEDO, 2002). Essa espécie é mundialmente estudada e utilizada para o controle biológico desses insetos-praga (OVERHOLT et al., 1994) e, particularmente no Brasil, é o agente principal de um dos maiores programas de controle biológico aplicado do mundo, no controle da broca-da-cana em extensas áreas de cana-de-açúcar. Esse agente biológico foi inicialmente trazido para o Brasil no ano de 1971, e no estado de São Paulo as pesquisas começaram em 1975 com material proveniente do Nordeste do Brasil (GALLO, 1980). As primeiras liberações massais ocorreram em 1977 e desde então cresceram significativamente, atingindo valores médios de 35% de parasitismo nos anos 90, com redução da intensidade de infestação de 7 para cerca de 2% no final dessa década (BOTELHO, 1992; BOTELHO; MACEDO, 2002). Nos últimos anos, as liberações de *C. flavipes* têm sido efetuadas em uma área em torno de 2 milhões de hectares de cana-de-açúcar, a uma taxa de 12 bilhões de parasitoides/ano.

Apesar do sucesso desse programa de controle biológico aplicado, justificado pelo grande período de tempo no qual ele vem sendo utilizado e pelas grandes dimensões de área nas quais ele é realizado, ainda não se conhece o mecanismo pelo qual *C. flavipes* consegue localizar *D. saccharalis* em plantas de cana-de-açúcar, tampouco o comportamento de forrageamento desse parasitoide. Somente foi verificado por van Leerdam, Smith Jr. e Fuchs (1985) que uma substância solúvel em água presente nas fezes larvais frescas de *D. saccharalis* medeia o comportamento de localização deste hospedeiro por *C. flavipes*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Plantas

Sementes de milho (*Zea mays* L., Honey-Bantam Peter 619, Sakata Seed Co., Kanagawa, Japão) foram semeadas isoladamente em recipientes plásticos (5,5 cm diâmetro x 7 cm altura) e mantidas em câmara incubadora sob luzes fluorescentes. Aproximadamente 20 dias após, as plântulas foram transplantadas para vasos plásticos (11 cm diâmetro x 9 cm altura) e mantidas em casa-de-vegetação climatizada em constante termoperíodo ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$ luz: $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ escuro) e fotoperíodo (16h luz: 8h escuro). Plantas com cerca de 30 cm (aprox. 15 dias) foram utilizadas nos experimentos.

Mudas de cana-de-açúcar (variedade IAC SP 95-5000, tecnologia Plene®, Syngenta Co., Itápolis/SP, Brasil) foram transplantadas para vasos plásticos (13 cm diâmetro x 10 cm altura), adubadas (4–14–8, NPK) e mantidas em casa-de-vegetação sob regime natural de luz, temperatura e umidade relativa. Plantas com cerca de 70 cm (aprox. 30 dias) foram utilizadas nos experimentos.

3.2 Herbívoros

Larvas de *M. separata* foram alimentadas com dieta artificial (Silk Mate 2M®, Nosan Co., Yokohama, Japão), seguindo metodologia proposta por Kanda (1991). A colônia foi mantida em sala climatizada ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$, 40-70% de umidade relativa, fotoperíodo de 16h luz: 8h escuro), na Universidade de Tsukuba, Japão.

A criação de *O. furnacalis* foi iniciada a partir de indivíduos procedentes da colônia do Laboratório de Entomologia da Universidade de Kyoto, Japão. Pupas foram colocadas em gaiolas cilíndricas transparentes (15 cm diâmetro x 30 cm altura) e revestidas internamente com papel seda branco-transparente como substrato para oviposição. Os adultos foram alimentados com solução de açúcar (5%) embebida em pedaço de algodão. A remoção e substituição das folhas de papel seda contendo massas de ovos de *O. furnacalis* foi realizada semanalmente.

As massas de ovos foram distribuídas em placas de Petri (9 cm diâmetro x 2 cm altura) com dieta artificial (Silk Mate 2M®, Nosan Co., Yokohama, Japão). Larvas de segundo e terceiro ínstaes foram transferidas para caixas plásticas (24 cm largura x 30 cm comprimento x 10 cm altura), com pedaços de papelão ondulado colados nas laterais da caixa como substrato para a pupação. A criação foi mantida em sala climatizada ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$, 40-70% de umidade relativa, fotoperíodo de 16h luz: 8h escuro), na Universidade de Tsukuba, Japão.

As larvas de *D. saccharalis* utilizadas para os experimentos foram obtidas da criação massal do Laboratório de Entomologia da Usina São Martinho S/A (Pradópolis, SP, Brasil). A metodologia de manutenção da colônia foi realizada segundo os procedimentos descritos por Viel (2009).

Para a realização dos experimentos com *M. fimbriolata*, ninfas de quarto ínstar foram coletadas manualmente em cultivo comercial orgânico de cana-de-açúcar (Fazenda São José, Jaboticabal, SP) e levadas para o laboratório em caixas térmicas juntamente com parte da rizosfera de plantas de cana-de-açúcar.

3.3 Parasitoides

Para a manutenção da colônia de *C. kariyai*, larvas de quarto ínstar de *M. separata* foram individualmente oferecidas a fêmeas do parasitoide com dois a três dias de idade em placas de Petri (5 cm diâmetro) para oviposição. Após o parasitismo, as larvas hospedeiras foram transferidas para recipientes plásticos (10 cm diâmetro x 6 cm altura) com dieta artificial (Silk Mate 2M®, Nosan Co., Yokohama, Japão). Aproximadamente 10 dias após o parasitismo, as pupas de *C. kariyai* foram coletadas e colocadas em caixas plásticas transparentes (16 cm largura x 28 cm comprimento x 17 cm altura) contendo chumaços de algodão umedecidos e gotas de mel pinceladas nas laterais da caixa para a alimentação dos parasitoides. A emergência dos adultos ocorreu cerca de cinco dias após a formação das pupas e a cópula ocorreu imediatamente após a emergência. Fêmeas de dois a três dias de idade, alimentadas, copuladas e sem experiência de oviposição foram utilizadas em todos os experimentos. A colônia de *C. kariyai* foi mantida em sala

climatizada ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$, 40-70% de umidade relativa, fotoperíodo de 16h luz: 8h escuro).

Pupas de *C. flavipes* foram obtidas da criação massal do Laboratório de Entomologia da Usina São Martinho S/A (Pradópolis/SP, Brasil), a qual é mantida segundo metodologia descrita por Viel (2009). As pupas foram mantidas em caixas cúbicas de acrílico transparentes (30 cm de lado), com disponibilidade de mel (pincelados nas paredes da caixa) e água (disponibilizada em pequenos chumaços de algodão) para a emergência dos adultos. Fêmeas de dois a três dias de idade, alimentadas, copuladas e sem experiência de oviposição foram utilizadas em todos os experimentos. As condições ambientais das salas onde foram mantidas as pupas e os adultos de *C. flavipes* foram $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, 50-70% de umidade relativa, fotoperíodo de 12h luz: 12h escuro.

3.4 Olfatômetro e procedimentos experimentais

Um olfatômetro de quatro vias (Fig. 1), segundo modelo proposto por Vet et al. (1983), foi utilizado para os bioensaios com *C. kariyai* e *C. flavipes*. A arena (Fig. 2) consiste em uma base de alumínio (24 cm x 24 cm) com uma cavidade em forma de “X”, que fica coberta com tampa de vidro transparente de mesmas dimensões. A liberação do parasitoide para as observações foi realizada na região central da arena ao retirar a tampa e recoloca-la imediatamente após a colocação do parasitoide na arena.

Campos de odor de mesma área foram estabelecidos a partir de ar succionado por bomba de vácuo e filtrado em carvão ativado. Após passar pelas câmaras contendo as fontes de odor, o ar foi introduzido na arena de observação (Fig. 1) através das quatro vias (250 mL/min/via). Em seguida, o ar foi removido pela abertura central abaixo da arena e retirado da sala através de tubos de silicone. Todo o conjunto (arena + outros componentes do olfatômetro) estava sob lâmpadas fluorescentes de modo a garantir distribuição homogênea da luz.

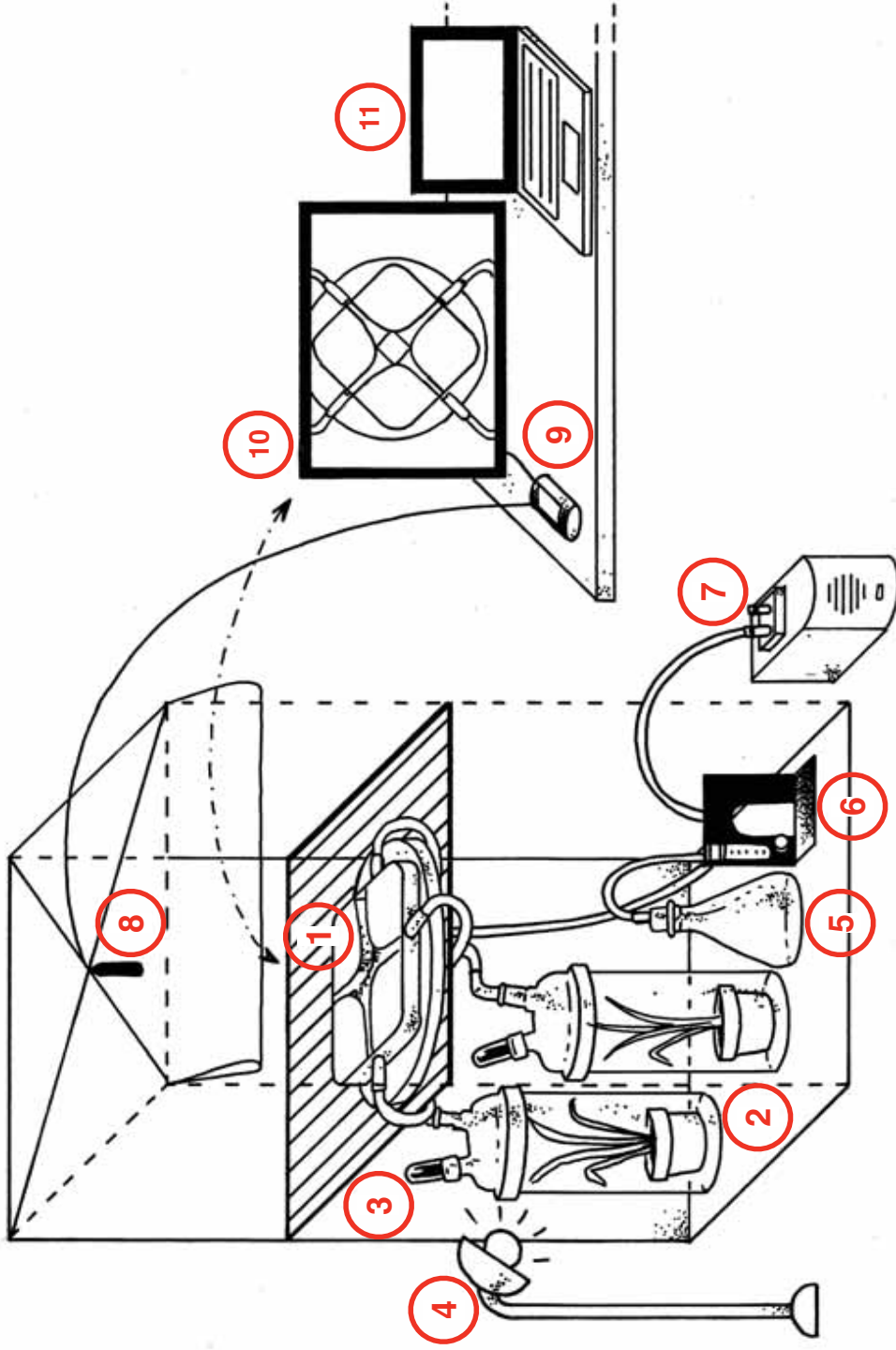


Figura 1. Vista geral do olfatômetro de quatro vias utilizado nos experimentos conduzidos na Universidade de Tsukuba. (1) Arena, (2) Câmaras de odor, (3) Filtro de carvão ativado, (4) Fonte de luz para plantas, (5) Recipiente com ar, (6) Fluxômetro, (7) Bomba de vácuo, (8) Câmara de vídeo + Lâmpada para iluminação da arena, (9) Gravador de vídeo, (10) Monitor, (11) Computador.

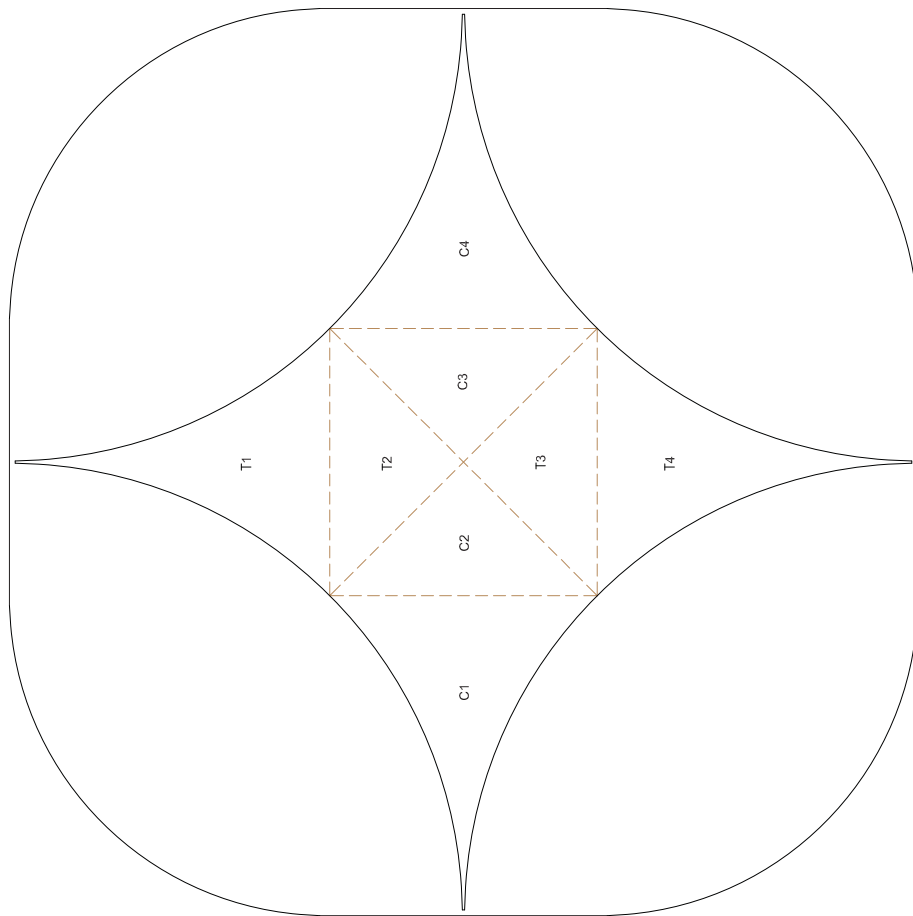


Figura 2. Vista de cima da arena de observação de quatro vias conectada ao sistema de olfatometria usado para avaliar a resposta olfativa de *Cotesia kariyai* e *Cotesia flavipes*. O quadrado formado no centro da arena em formato de estrela foi definido como área central (C2, C3, T2, T3) e as demais áreas foram definidas como áreas marginais (T1, T4, C1, C4). (Escala: 1:2, Unidade: mm)

O tempo de residência de cada fêmea foi registrado para distintas áreas da arena, denominadas de área marginal (T1+T4 e C1+C4) e central (T2+T3 e C2+C3) (ver Fig. 2). Também foi registrada a primeira fonte escolhida pelo parasitoide. Cada fêmea foi utilizada somente uma vez para observação. Fêmeas que ficaram imóveis por 300s foram descartadas. Em cada experimento foram realizadas dez observações. Para cada observação foi utilizada uma fêmea. A arena foi rotacionada 90° no sentido horário sempre após cinco observações. O sistema foi limpo com álcool 70% sempre antes e depois de cada experimento, assim como no momento de rotacionar a arena.

Os experimentos foram sempre conduzidos entre 12:00 e 17:30h, em dias distintos. A temperatura do ar durante os experimentos foi de aproximadamente 25°C, com mínima de 22,6°C e máxima de 28,1°C. As demais condições ambientais foram idênticas às já descritas para as salas de criação dos insetos.

As observações foram feitas por um período de 10 minutos e o registro dos eventos foi realizado com o software The Observer® (Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands). A utilização desse software também permitiu a posterior extração dos dados de tempo de residência aos cinco minutos de observação, para fins de comparação com os dados de 10 minutos.

3.5 Fontes de estímulos olfativos

A resposta de *C. kariyai* foi observada em diferentes combinações das seguintes fontes de odor (tratamentos) com plantas de milho: voláteis de plantas saudas (sem injúria) [SADIA]; ar puro [AR]; voláteis de plantas induzidas pelo hospedeiro, o desfolhador *M. separata* [HOSP]; voláteis de plantas induzidas pelo não hospedeiro, o broqueador *O. furnacalis* [NHOSP]; voláteis de plantas induzidas pela herbivoria simultânea do hospedeiro + não hospedeiro [HOSP + NHOSP]; e voláteis do complexo planta hospedeiro (plantas induzidas pelo hospedeiro, mais lagartas, fezes e regurgito das lagartas) [CPH].

De modo idêntico, a resposta olfativa de *C. flavipes* também foi avaliada a partir de distintas combinações dos seguintes tratamentos estabelecidos em plantas de cana-de-açúcar: voláteis de plantas saudas (sem injúria) [SADIA]; ar puro [AR];

voláteis de plantas induzidas pelo hospedeiro, o broqueador *D. saccharalis* [HOSP]; voláteis de plantas induzidas pelo não hospedeiro, o sugador *M. fimbriolata* [NHOSP]; voláteis de plantas induzidas pela herbivoria simultânea do hospedeiro + não hospedeiro [HOSP + NHOSP]. O tratamento HOSP consiste da combinação planta, lagartas e produtos associados (lagartas, fezes e regurgito), pela impossibilidade de remover as lagartas de *D. saccharalis* do interior do colmo das plantas sem danificá-las, antes dos experimentos.

3.6 Tratamentos

A infestação das plantas foi realizada sempre no dia anterior à condução dos bioensaios (aprox. às 18:00h). Minutos antes do início das observações (aprox. 12:00h), fez-se a remoção dos herbívoros e seus produtos associados, quando possível. Assim, a exposição das plantas aos seus hospedeiros durou 18 horas (MANDOUR et al., 2011). Durante o período de exposição, sempre se tomou o cuidado de manter as plantas com tratamentos distintos em ambientes separados para evitar possível interferência dos voláteis entre os tratamentos.

Os vasos contendo as plantas de milho foram recobertos com dupla camada de papel alumínio para evitar a mistura do substrato de desenvolvimento das plantas com as fezes das lagartas, e para impedir a mistura de voláteis do solo com voláteis da planta no momento de realização dos bioensaios.

Após receber as lagartas, os vasos com as plantas de milho foram acondicionadas em recipientes plásticos transparentes e cilíndricos (15 cm diâmetro x 30 cm altura) para evitar a fuga das lagartas. O conjunto (plantas e recipientes cilíndricos) foi mantido em casa de vegetação a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e iluminação natural.

Os seguintes tratamentos foram utilizados para avaliar a resposta de *C. kariyai*:

1. Plantas de milho com *M. separata* (HOSP): Cinco lagartas de quarto ínstar (MANDOUR et al., 2011) foram cuidadosamente transferidas com pincel de cerdas finas para as folhas das plantas. Antes da realização dos bioensaios, as lagartas e os seus produtos associados (fezes e regurgito) foram cuidadosamente removidos

das plantas, utilizando pinça de pontas arredondadas para retirar as lagartas e evitar qualquer injúria à plantas, bem como pincel de cerdas finas para remover as fezes. Quando se testou a influência do complexo planta-hospedeiro (CPH), as lagartas e os seus produtos associados não foram retirados.

2. Plantas de milho com *O. furnacalis* (NHOSP): Dois níveis de infestação (cinco e dez lagartas) foram utilizados para plantas que receberam o tratamento NHOSP. Nos primeiros experimentos, cinco lagartas de quarto ínstar foram colocadas no colmo das plantas com pincel de cerdas finas. Uma vez que a área foliar consumida foi visivelmente inferior à área consumida por lagartas do tratamento HOSP, aumentamos para a quantidade de dez lagartas, também de quarto ínstar, nos experimentos seguintes. O fato de *O. furnacalis* ser essencialmente um broqueador, apesar de inicialmente se alimentar das folhas, dificulta muito a quantificação da área vegetal consumida e, conseqüentemente, a comparação com a área consumida das plantas que receberam o tratamento HOSP. Não foi possível a remoção das lagartas da planta quando estavam no interior do colmo.

3. Plantas de milho com infestação dupla (HOSP + NHOSP): Cinco lagartas de *M. separata* mais dez lagartas de *O. furnacalis*, todas no quarto ínstar, foram colocadas simultaneamente nas folhas e no colmo de plantas de milho. Do mesmo modo como em HOSP, as lagartas foram removidas; e em NHOSP, quando as lagartas estavam dentro do colmo, não houve possibilidade de remoção.

4. Plantas de milho sem injúria (SADIA): Plantas sem herbívoros foram mantidas nas mesmas condições daquelas que receberam outros tratamentos.

Para o estudo da resposta olfativa de *C. flavipes*, os seguintes tratamentos foram adotados:

1. Plantas de cana-de-açúcar com *D. saccharalis* (HOSP): Dez lagartas de quarto ínstar foram cuidadosamente transferidas com pinça de pontas arredondadas para a região entre a bainha das folhas e o colmo das plantas, para facilitar a entrada das

lagartas no colmo. As lagartas e os seus produtos associados (fezes e regurgito) não foram removidos das plantas para a realização dos experimentos, dada a impossibilidade de removê-los de dentro de colmo sem destruir a planta.

2. Plantas de cana-de-açúcar com *M. fimbriolata* (NHOSP): Dez ninfas de quarto instar foram colocadas cuidadosamente na base do colmo da planta, com pincel de cerdas finas, para facilitar o contato com as raízes e, portanto, a sucção de seiva. Antes da realização dos experimentos, as ninfas foram removidas das plantas.

3. Plantas de cana-de-açúcar com infestação dupla (HOSP + NHOSP): Dez lagartas de *D. saccharalis* em quarto instar, mais dez ninfas de *M. fimbriolata* em quarto instar foram simultaneamente expostas a plantas de cana-de-açúcar para alimentação. A transferência para as plantas foi feita cuidadosamente para a região entre a bainha das folhas e o colmo das plantas, no caso de lagartas de *D. saccharalis*, e para a base do colmo, no caso das ninfas de *M. fimbriolata*. Do mesmo modo como em HOSP, as lagartas não foram removidas das plantas; e em NHOSP, as ninfas foram removidas antes dos experimentos.

4. Plantas de cana-de-açúcar sem injúria (SADIA): Plantas sem herbívoros foram mantidas nas mesmas condições daquelas que receberam outros tratamentos.

3.7 Análise dos dados

Todos os bioensaios foram conduzidos como testes de dupla escolha. O teste t de Student para amostras pareadas foi utilizado na análise do tempo de residência. Os dados da primeira escolha do parasitoide foram analisados pelo teste qui-quadrado (χ^2), com correção de Yates para continuidade (ZAR, 2010). Após serem extraídos do Observer, os dados foram tabulados no software Excel (Microsoft) e os testes de hipótese foram realizados no software R (R Development Core Team, 2012).

4. RESULTADOS

4.1 Preferências olfativas de *Cotesia kariyai*

Fêmeas de *C. kariyai* de dois a três dias de idade mostraram-se significativamente atraídas por voláteis de plantas de milho infestadas pelo hospedeiro *M. separata* comparados com ar puro e voláteis de plantas sadias ($P < 0,001$) (Fig. 3). Os parasitoides mostraram igual preferência entre voláteis de plantas sadias e ar puro ($P = 0,18$) (Fig. 3), muito embora tenha havido diferença significativa na preferência por plantas sadias quando considerada a área central do olfatômetro ($P = 0,02$) (Fig. 4).

Quando foram comparadas plantas infestadas pelo não hospedeiro *O. furnacalis* com plantas sem injúria, a resposta às plantas infestadas foi significativamente maior ($P < 0,001$) (Fig. 3).

A comparação entre plantas infestadas por *M. separata* e plantas infestadas por *O. furnacalis* evidenciou que a preferência olfativa de *C. kariyai* varia em função da densidade dos herbívoros que se alimentam das plantas. Ao considerar conjuntamente os resultados de todos os experimentos com essa combinação de tratamentos, verifica-se maior preferência por voláteis provenientes de plantas infestadas pelo hospedeiro ($P < 0,01$) (Fig. 3). Todavia, ao avaliar isoladamente as respostas olfativas de *C. kariyai* nos distintos bioensaios, percebe-se modificação na preferência de escolha do parasitoide quando o número de lagartas de *O. furnacalis* que se alimentaram da planta foi alterado. A exposição aos odores de plantas infestadas com cinco lagartas de *M. separata* e cinco de *O. furnacalis* fez com que os parasitoides preferissem significativamente mais os odores provenientes do seu hospedeiro ($P < 0,001$) (Fig. 5). Por outro lado, quando apresentados aos voláteis de plantas infestadas com cinco lagartas de *M. separata* e dez de *O. furnacalis*, não houve discriminação entre as duas fontes de odor ($P = 0,39$) (Fig. 5).

Os voláteis provenientes de plantas infestadas pelo hospedeiro na presença do não hospedeiro foram preferidos por *C. kariyai* àqueles provenientes de plantas infestadas unicamente pelo hospedeiro ($P < 0,001$) (Fig. 3).

Por fim, a comparação entre voláteis do complexo planta-hospedeiro (planta + lagartas + fezes + regurgito) com voláteis de plantas saudias, a fim de se verificar a influência de substâncias relacionadas ao hospedeiro na atratividade de *C. kariyai*, mostrou uma forte preferência por plantas infestadas e com presença do hospedeiro ($P < 0,001$) (Fig. 3).

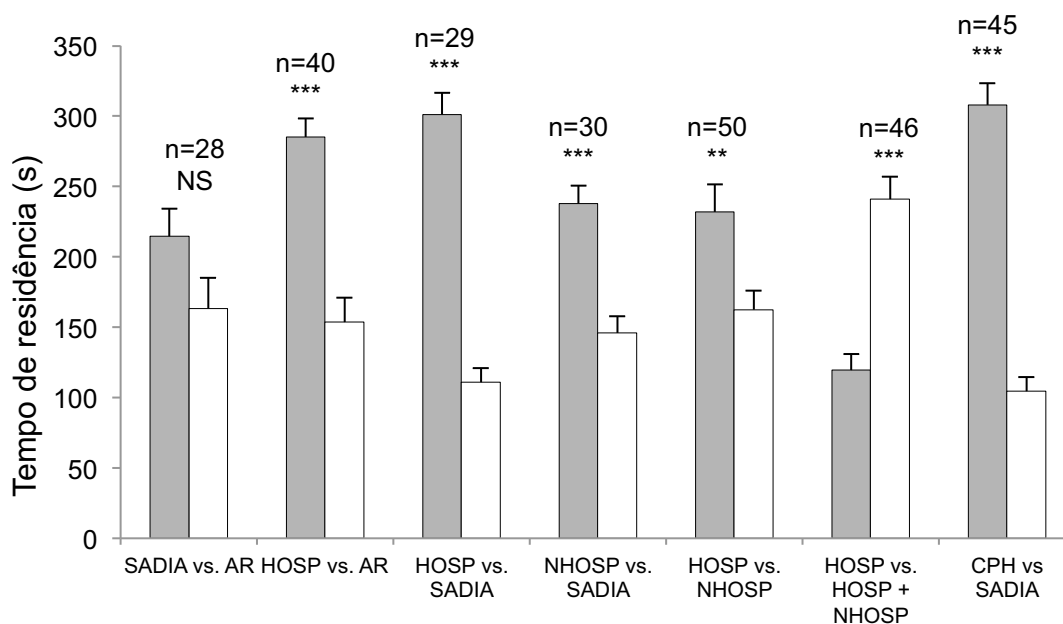


Figura 3. Tempo de residência (s) (média $\pm$ EP) de fêmeas de *Cotesia kariyai* em olfatômetro de quatro vias expostas a diferentes estímulos olfativos. SADIA, planta sadia (sem injúria); AR, ar puro contido em câmara de vidro vazia; HOSP, planta de milho infestada com hospedeiro *M. separata*; NHOSP, planta de milho infestada com não hospedeiro *O. furnacalis*; HOSP + NHOSP, planta de milho infestada simultaneamente por *M. separata* e *O. furnacalis*; CPH, planta de milho infestada por *M. separata*, mais lagartas, fezes e regurgito. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; e NS não significativo, de acordo com o teste t de Student para tratamentos pareados.

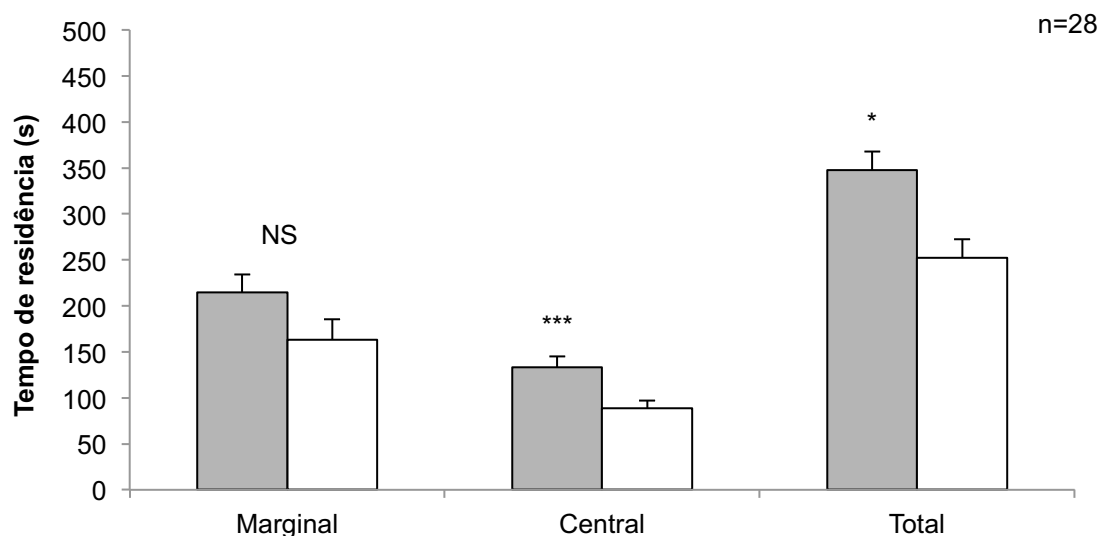


Figura 4. Tempo de residência (s) (média $\pm$ EP) de fêmeas de *Cotesia kariyai* em distintas áreas de um olfatômetro de quatro vias quando expostas aos voláteis de plantas saudáveis (SADIA) e ar puro (AR). *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; e NS não significativo, de acordo com o teste t de Student para tratamentos pareados.

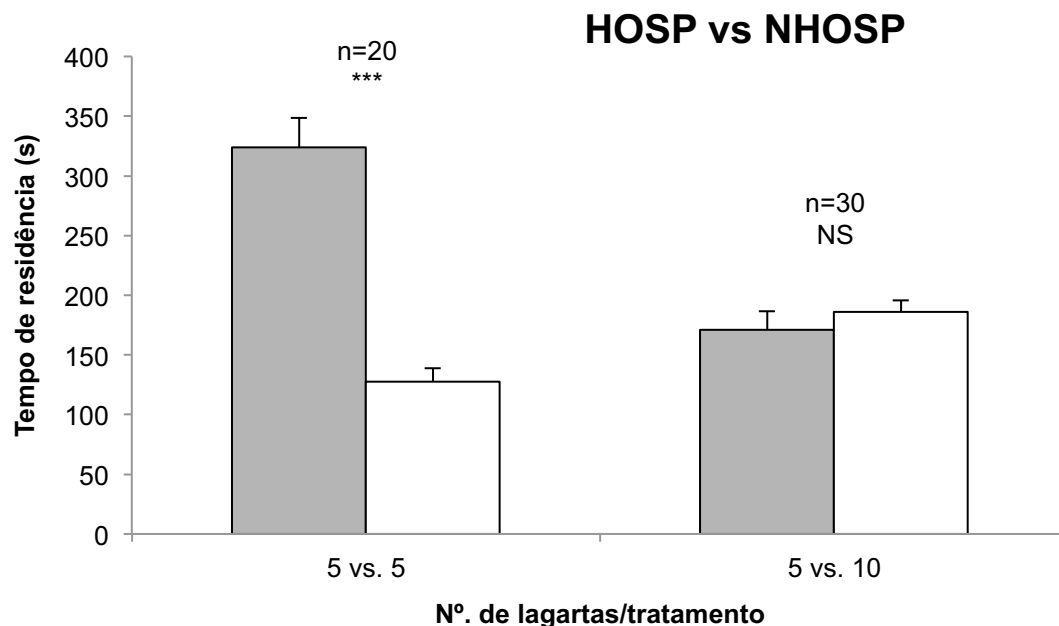


Figura 5. Tempo de residência (s) (média $\pm$ EP) de fêmeas de *Cotesia kariyai* quando comparados os tratamentos HOSP (barras cheias) e NHOSP (barras vazias) em dois níveis de infestação de *Ostrinia furnacalis* (cinco e dez lagartas). *** $P < 0,001$; e NS não significativo, de acordo com o teste t de Student para tratamentos pareados.

A atratividade de *C. kariyai*, avaliada pela primeira escolha das fêmeas às diferentes fontes de odor (Fig. 6), foi coerente com a resposta apresentada quanto ao tempo de residência. Conforme esperado, as fêmeas não discriminaram voláteis de plantas sadias do ar puro. No entanto, também de modo semelhante ao observado no tempo de residência, se mostraram atraídas por plantas infestadas pelo hospedeiro, tanto quando comparadas ao ar puro, quanto quando expostas a plantas sadias. Ao se observar a primeira escolha de *C. kariyai* quando exposta aos voláteis de plantas infestadas pelo não hospedeiro, não se observa preferência em relação a plantas sem injúria. A comparação entre plantas infestadas com o hospedeiro e plantas infestadas com o não hospedeiro também não mostrou preferência do parasitoide. De maneira idêntica ao observado com o tempo de residência, fêmeas de *C. kariyai* discriminaram entre voláteis de plantas infestadas pelo hospedeiro na presença e na ausência do não hospedeiro, preferindo plantas infestadas com os dois herbívoros. Por último, também não houve discriminação entre complexo-planta-hospedeiro e plantas sem injúria quanto à primeira escolha do parasitoide, apesar de ter havido significativa diferença quando ao tempo de residência.

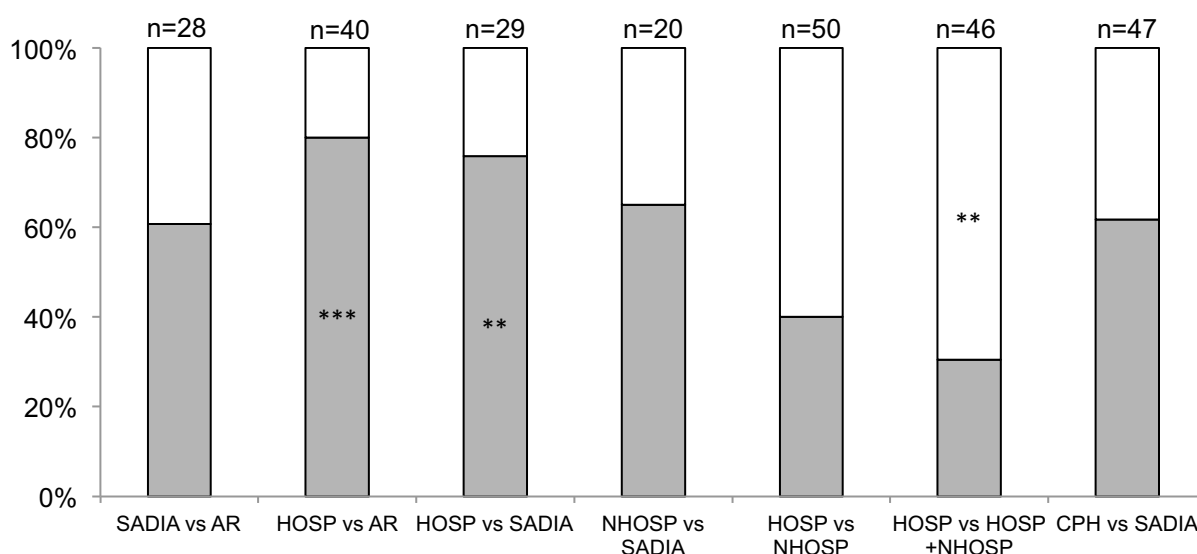


Figura 6. Respostas de fêmeas de *Cotesia kariyai* em olfatômetro de quatro vias expostas a diferentes estímulos olfativos. SADIA, planta sadia (sem injúria); AR, ar puro contido em câmara de vidro vazia; HOSP, planta de milho infestada com hospedeiro *M. separata*; NHOSP, planta de milho infestada com não hospedeiro *O. furnacalis*; HOSP + NHOSP, planta de milho infestada simultaneamente por *M. separata* e *O. furnacalis*; CPH, planta de milho infestada por *M. separata*, mais lagartas, fezes e regurgito. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; e demais não houve diferença significativa, de acordo com o teste de qui-quadrado (χ^2).

4.2 Preferências olfativas de *Cotesia flavipes*

Fêmeas de *C. flavipes*, também de dois a três dias de idade, mostraram-se fortemente atraídas por voláteis de plantas de cana-de-açúcar infestadas pelo hospedeiro *D. saccharalis* comparados com ar puro e voláteis de plantas sadias ($P < 0,001$) (Fig. 7). Assim como *C. kariyai*, as fêmeas de *C. flavipes* não discriminaram entre voláteis de plantas sadias e ar puro ($P = 0,84$) (Fig. 7).

Quando foram comparadas plantas infestadas pelo não hospedeiro *M. fimbriolata* com plantas sem injúria, *C. flavipes* também não discriminou os tratamentos ($P = 0,90$) (Fig. 7). A comparação entre plantas infestadas por *D. saccharalis* e plantas infestadas por *M. fimbriolata* mostrou que *C. flavipes* discriminou os voláteis dos dois tratamentos ($P < 0,001$) (Fig. 7).

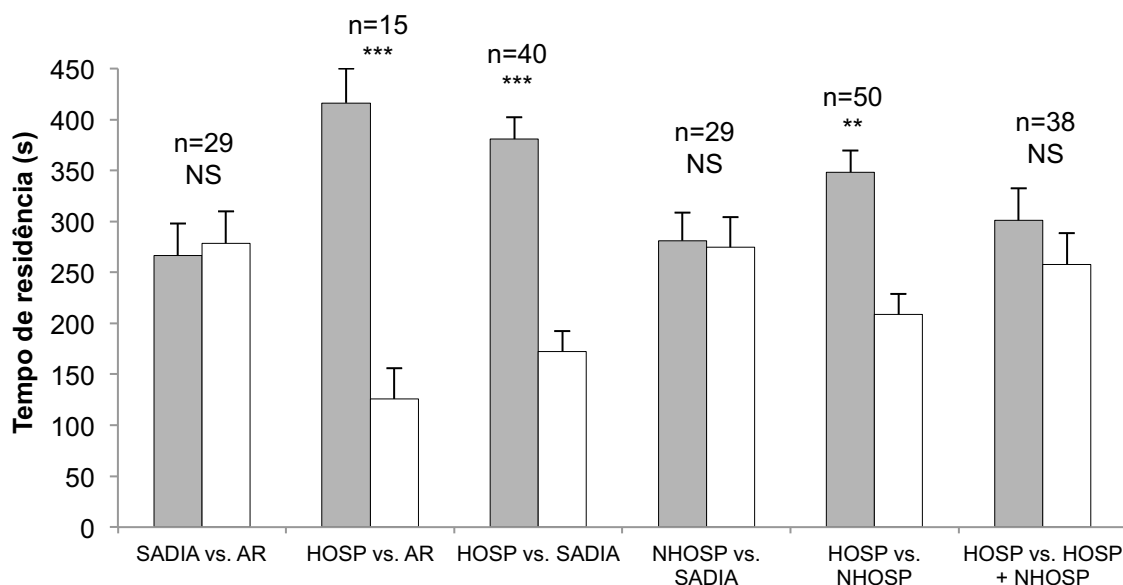


Figura 7. Tempo de residência (s) (média $\pm$ EP) de fêmeas de *Cotesia flavipes* em olfatômetro de quatro vias expostas a diferentes estímulos olfativos. SADIA, planta sadia (sem injúria); AR, ar puro contido em câmara de acrílico vazia; HOSP, planta de cana-de-açúcar infestada com hospedeiro *D. saccharalis*; NHOSP, planta de cana-de-açúcar infestada com não hospedeiro *M. fimbriolata*; HOSP + NHOSP, planta de cana-de-açúcar infestada simultaneamente por *D. saccharalis* e *M. fimbriolata*. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; e NS não significativo, de acordo com o teste t de Student para tratamentos pareados.

Por último, quando comparados os voláteis provenientes de plantas infestadas pelo hospedeiro na ausência e na presença do não hospedeiro, *C. flavipes* também não discriminou entre os dois tratamentos ($P=0,49$) (Fig. 7).

As respostas de *C. flavipes* aos diferentes estímulos químicos testados pela primeira escolha (Fig. 8) foram idênticas às obtidas na avaliação do tempo de residência em todas as condições experimentais, exceto para a combinação em que as fêmeas foram expostas aos voláteis de plantas infestadas pelo hospedeiro e ar puro.

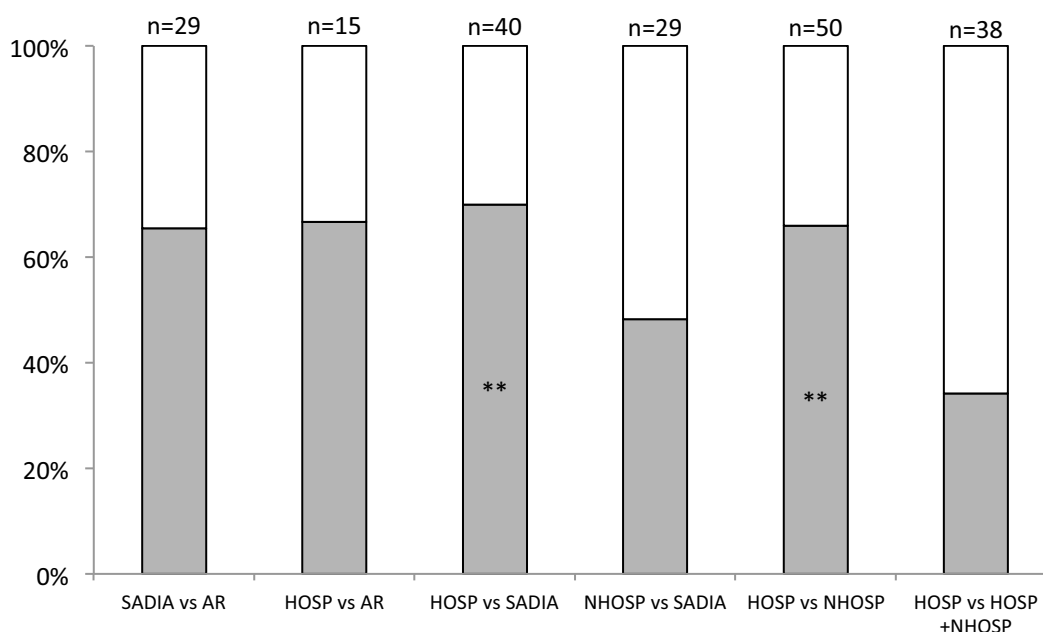


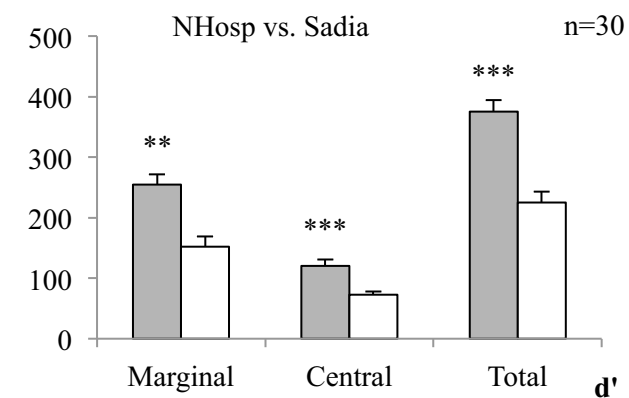
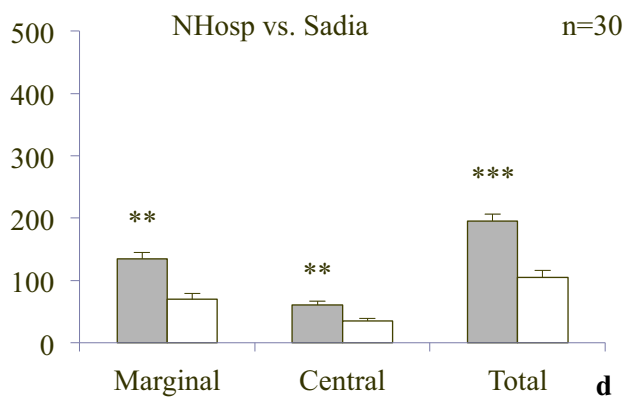
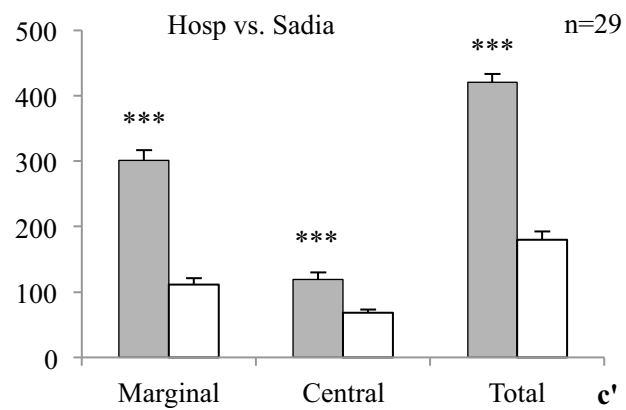
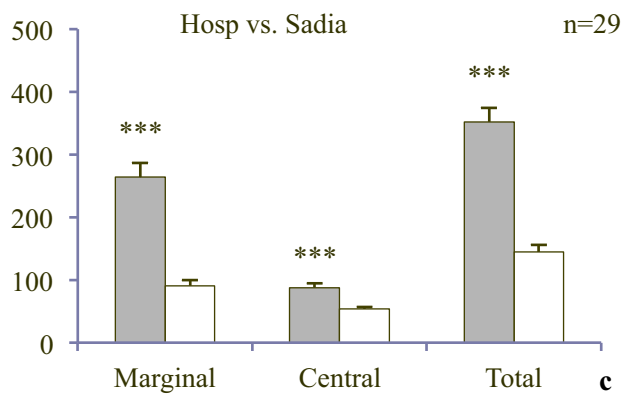
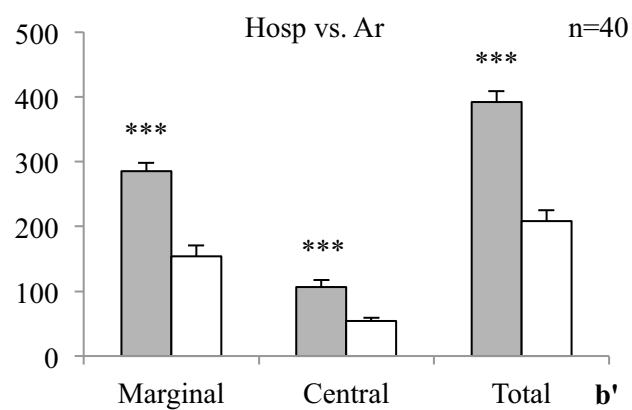
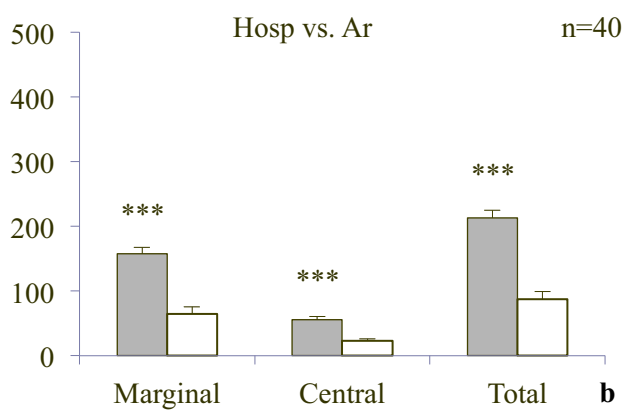
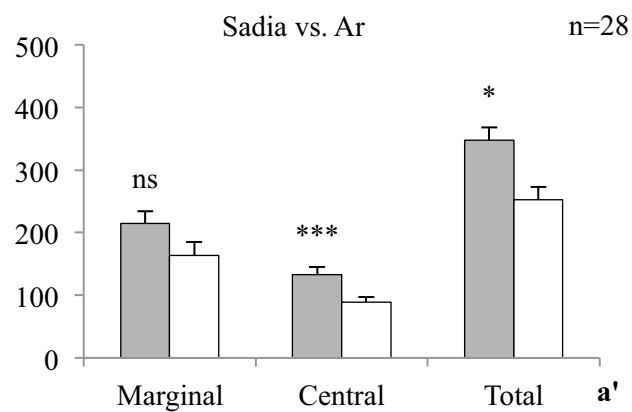
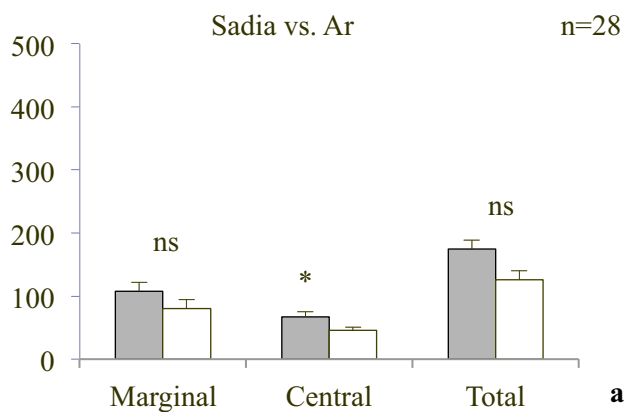
Figura 8. Respostas de fêmeas de *Cotesia flavipes* em olfatômetro de quatro vias expostas a diferentes estímulos olfativos. SADIA, planta sadia (sem injúria); AR, ar puro contido em câmara de acrílico vazia; HOSP, planta de cana-de-açúcar infestada com hospedeiro *D. saccharalis*; NHOSP, planta de cana-de-açúcar infestada com não hospedeiro *M. fimbriolata*; HOSP + NHOSP, planta de cana-de-açúcar infestada simultaneamente por *D. saccharalis* e *M. fimbriolata*. ** $P < 0,01$; e demais não houve diferença significativa, de acordo com o teste de qui-quadrado (χ^2).

4.3 Avaliação dos parâmetros de tempo e área nos bioensaios com *C. kariyai* em olfatômetro de quatro vias

Os resultados indicaram que a resposta olfativa de *C. kariyai* aos cinco e dez minutos de observação é idêntica em todas as combinações testadas com diferentes estímulos químicos (Fig. 9). No entanto, ao verificar a resposta do parasitoide quando expostos a plantas sem injúria e ar puro (Fig. 9a-a'), notou-se diferença entre os dois tempos de observação (cinco e dez minutos), na área central da arena, o que implicou também em diferença significativa na área total da arena. Em outra combinação de tratamentos (HOSP vs. NHOSP), o aumento do tempo de observação (10 minutos) implicou em resposta não significativa na área central da arena, diferentemente do ocorrido aos cinco minutos, quando houve diferença ($P < 0,05$).

Essas observações permitem inferir que cinco minutos de observação são suficientes para registrar de forma confiável a resposta de fêmeas *C. kariyai* a estímulos químicos usando um modelo de olfatômetro de quatro vias semelhante ao adotado neste estudo. Além disso, a área marginal da arena parece ser mais adequada para o registro das observações nas condições testadas, uma vez que considerar o tempo de permanência dos parasitoides na região central do olfatômetro poderia implicar em erro no caso da combinação dos tratamentos com plantas sadias e ar puro.

A adoção de cinco minutos, ao invés de dez, para avaliar a resposta olfativa do parasitoide implica na redução do esforço de observação.



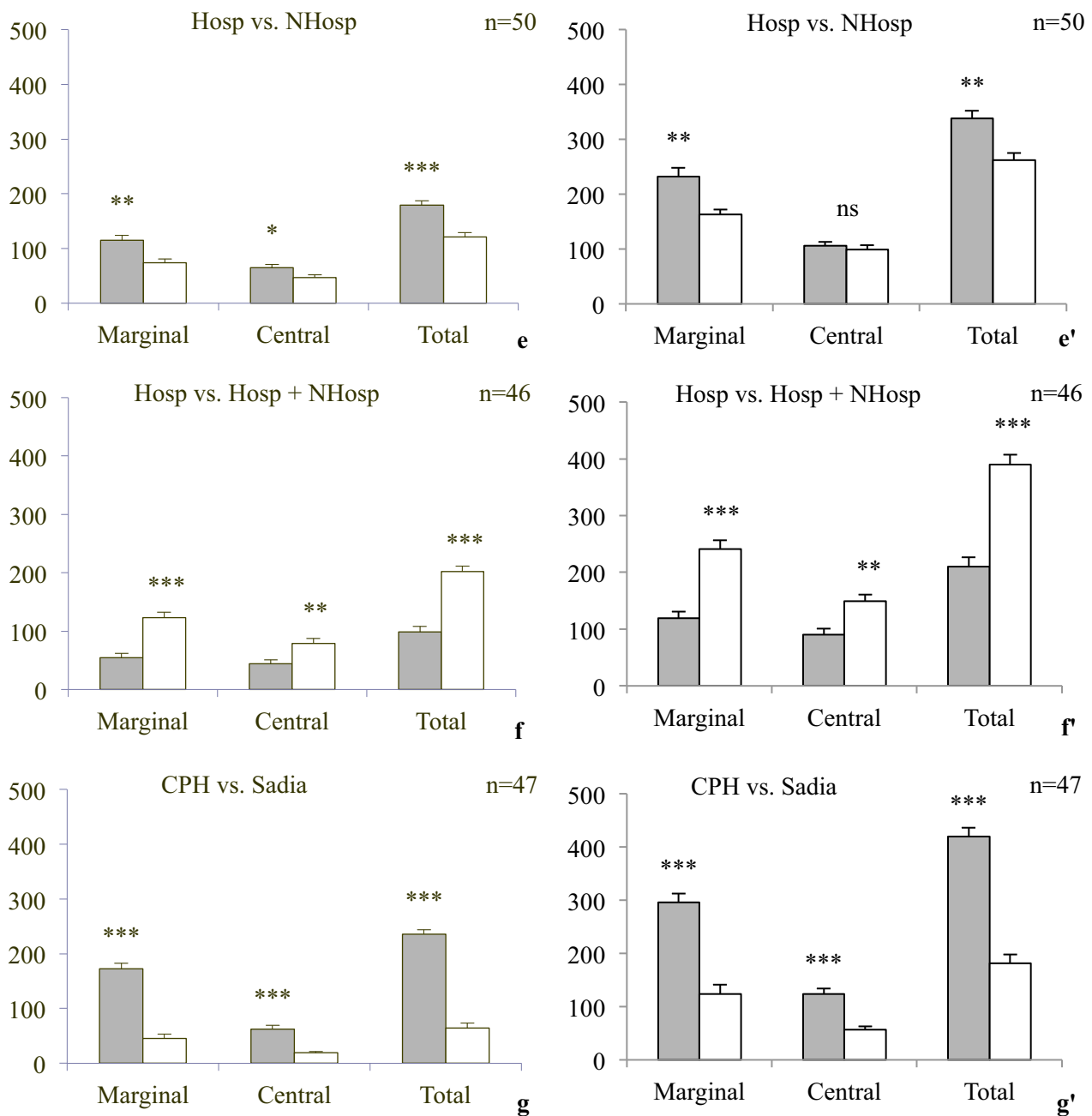


Figura 9. Tempo de residência (s) (média $\pm$ EP) de fêmeas de *Cotesia kariyai* nas áreas marginal, central e total do olfatômetro de quatro vias nos tempos de observação de 5 (a – g) e 10 minutos (a' – g') expostas a distintas combinações de estímulos olfativos. As barras cheias e vazias referem-se, respectivamente, aos tratamentos descritos em cada gráfico. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$; e NS não significativo, de acordo com o teste t de Student para tratamentos pareados.

5. DISCUSSÃO

Fêmeas de *C. kariyai* sem nenhuma experiência prévia de oviposição e/ou contato com plantas se mostraram fortemente atraídas por voláteis de plantas infestadas pelo hospedeiro *M. separata* quando comparados com ar puro e com plantas sem injúria. No entanto, não conseguiram discriminar entre plantas sem injúria e ar puro. Essas respostas mostram que esse parasitoide não responde a plantas de milho sem injúria, mas tem grande preferência por plantas infestadas pelo hospedeiro *M. separata*. Outras situações em que parasitoides não conseguiram até mesmo discriminar entre voláteis de plantas infestadas pelo hospedeiro e de plantas sem injúria foram entendidas após avaliar a influência do aprendizado ou experiência de oviposição (GIRLING et al., 2006; BLANDE; PICKETT; POPPY, 2007). Especificamente para *C. kariyai*, compostos voláteis induzidos pelo hospedeiro e compostos voláteis não específicos (provenientes de injúria mecânica e de plantas saudáveis) parecem ter importante papel na localização do hospedeiro, conforme demonstrado por Fukushima et al. (2002). Esses autores mostraram que compostos químicos não específicos que são reconhecidamente liberados por plantas de milho infestadas pelo hospedeiro, mas também por plantas de milho com injúria mecânica e sem injúria (ex. (Z)-3-Hexen-1-yl acetato, TAKABAYASHI et al., 1995), aumentaram significativamente a resposta de *C. kariyai* após o condicionamento. Assim, não se esperava discriminação entre esses dois tratamentos por *C. kariyai*.

Plantas infestadas pelo não hospedeiro *O. furnacalis* foram preferidas pelo parasitoide quando comparadas com plantas sem injúria. Quando comparadas com plantas infestadas pelo hospedeiro, a densidade de lagartas do não hospedeiro influenciou a resposta de *C. kariyai*. Comparações entre a área vegetal consumida pelos dois herbívoros são difíceis de serem estabelecidas, em função de *O. furnacalis* possuir hábito broqueador além do hábito desfolhador. No entanto, observações visuais da área vegetal consumida pelos dois herbívoros permitem estimar e associar a densidade de lagartas com o consumo vegetal, bem como com a atratividade do parasitoide. Nos experimentos em que as plantas foram infestadas com um maior número de lagartas (dez) de *O. furnacalis*, o consumo foliar nesse

tratamento (NHOSP) foi visualmente maior do que quando na densidade de cinco lagartas e, conseqüentemente, mais próximo ao consumo do tratamento HOSP. A combinação entre consumo foliar mais consumo do interior do colmo parece ter aumentado a atração ao parasitoide e implicado em não discriminação dos tratamentos por *C. kariyai* ($P=0,39$) (Fig. 5). Nessa perspectiva, Girling et al. (2011) demonstraram, por exemplo, que *Cotesia vestalis* (Haliday) (Hymenoptera: Braconidae) foi capaz de identificar diferenças quali e quantitativas em voláteis emitidos por plantas de repolho infestadas com *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). À semelhança do que foi observado com *C. kariyai*, Girling et al. (2011) mostraram que *C. vestalis* preferiu plantas com mais herbívoros e mais injúria.

Cotesia kariyai mostrou grande preferência por plantas infestadas com o hospedeiro na presença do não hospedeiro, quando comparadas com plantas infestadas com o hospedeiro sozinho. No entanto, em teste para observação do comportamento de oviposição de *C. kariyai* quando expostas a lagartas de *O. furnacalis* (não hospedeiro), foi possível verificar a completa rejeição do parasitoide por esse herbívoro. Nenhuma fêmea inseriu ovipositor nas lagartas oferecidas, exceto quando houve insistência em manter a lagarta em contato com a fêmea de *C. kariyai* até que houvesse aceitação e oviposição. No entanto, em nenhum desses casos em que se forçou a oviposição houve emergência de parasitoides. Esse comportamento se distingue, por exemplo, ao de *Cotesia plutellae* Kurdjumov (Hymenoptera: Braconidae) que não reconhece *Pieris rapae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae) como não hospedeiro e oviposita as lagartas quando as encontra nas folhas das plantas, conforme descrito por Shiojiri et al. (2000).

Cotesia glomerata (L.) (Hymenoptera: Braconidae) também não reconhece *P. xylostella* como não hospedeiro e tenta ovipositar as lagartas, porém com frequente insucesso devido ao agressivo comportamento das lagartas de *P. xylostella* em resposta ao contato antenal do parasitoide (SHIOJIRI et al., 2000). Takabayashi e Takahashi (1990) identificaram em fezes de *Acantholeucania loreyi* (Watanabe) (Hymenoptera: Braconidae) uma substância aleloquímica idêntica ao cairomônio emitido por *M. separata* e que foi capaz de atrair fêmeas de *C. kariyai*. No entanto, o parasitismo de *A. loreyi* (não hospedeiro) por *C. kariyai* não originou nenhuma prole. Essa situação foi idêntica ao ocorrido nas nossas observações, com a diferença que

C. kariyai não se sentiu atraída por fezes de *O. furnacalis*. Diante disso, pode-se considerar que a presença simultânea de *M. separata* e *O. furnacalis* em uma mesma planta não deve ter efeito negativo sobre desempenho do parasitoide, por ser improvável o sucesso de parasitismo em hospedeiro inadequado.

Os produtos relacionados ao hospedeiro (lagartas, fezes e regurgito) não mostraram ter importância na preferência do parasitoide, uma vez que a resposta olfativa de *C. kariyai* na presença (HOSP vs. SADIA) e na ausência (CPH vs. SADIA) desses produtos foi idêntica. Todavia, em geral, esses produtos liberam voláteis que podem servir de pistas químicas aos parasitoides em curtas distâncias, enquanto que em longas distâncias os voláteis de plantas exercem importante papel (PRICE et al., 1980; TAKABAYASHI; TAKAHASHI, 1990; VET; DICKE, 1992).

A importância de voláteis de plantas sem injúria na localização do hospedeiro à longa distância por parasitoides é reconhecidamente importante (AGELOPOULOS; KELLER, 1994; MATTIACCI; DICKE; POSTHUMUS, 1994). Diferentemente do esperado, fêmeas de *C. flavipes* não fizeram distinção entre plantas sadias de cana-de-açúcar e ar puro. Ngi-Song et al. (1996) mostraram, por exemplo, que fêmeas de *C. flavipes* sem experiência prévia de oviposição (*naive*) respondem a voláteis de plantas sadias de gramíneas como milho, sorgo e capim napier quando comparadas com ar puro. Por outro lado, no estudo conduzido por Jembere, Ngi-Song e Overholt (2003), fêmeas de *C. flavipes* também sem experiência prévia de oviposição não distinguiram entre voláteis de plantas sem injúria de capim napier e ar puro. No entanto, ao utilizar uma planta gramínea (cana-de-açúcar) como modelo para o estudo, se esperava uma preferência por fêmeas de *C. flavipes* sem prévia experiência de oviposição. Uma possível explicação para esse resultado pode estar associada à idade das plantas utilizadas para os experimentos e, desse modo, ao perfil de voláteis liberado por essas plantas. Ngi-Song et al. (1996) utilizaram plantas de milho, sorgo e capim napier de dois a três meses de idade (~ 120 cm), enquanto que as plantas de cana-de-açúcar utilizadas nesses estudo tinham idade máxima de um mês (~ 70 cm). Ainda, considerando a relação de especificidade entre parasitoides, seus hospedeiros e as plantas hospedeiras (McCORMICK; UNSICKER; GERSHENZON, 2012), plantas de cana-de-açúcar podem não ser

atrativas a fêmeas de *C. flavipes* sem experiência de oviposição, mesmo se tratando de uma planta gramínea.

Cotesia flavipes não discriminou entre plantas infestadas com o hospedeiro *D. saccharalis* e o não hospedeiro *M. fimbriolata*. Também mostrou igual preferência por plantas de cana-de-açúcar infestadas com o hospedeiro na ausência e presença do não hospedeiro. Esses dados são consistentes com os resultados obtidos por Obonyo et al. (2008). Esses autores mostraram que fêmeas de *C. flavipes* sem experiência prévia de oviposição foram igualmente atraídas por plantas de sorgo infestadas por espécies de lepidópteros hospedeiras e não hospedeiras quando comparadas com plantas sem injúria, mesmo que tenham sido detectadas diferenças qualitativas e quantitativas na mistura de voláteis emitidos por essas distintas espécies. Os autores discutem que *C. flavipes* pode não ser capaz de distinguir entre hospedeiros apropriados e inapropriados mesmo após picadas de prova e concluem que hospedeiros inapropriados (não hospedeiros) podem ser um entrave reprodutivo para *C. flavipes*.

Apesar de não se ter avaliado o comportamento de *C. flavipes* em contato direto/próximo com *M. fimbriolata*, é muito improvável que fêmeas desse parasitoide tenham alguma atração por esse herbívoro. No entanto, observações do comportamento de *C. flavipes* diretamente em plantas infestadas com ambos os herbívoros pode elucidar se a presença de *M. fimbriolata* pode afetar negativamente a eficiência de localização do hospedeiro desse parasitoide.

Rijk, Dicke e Poelman (2013) revisaram o efeito de múltipla herbivoria no comportamento de forrageamento de parasitoides. Identificaram, por exemplo, que em metade dos casos publicados (13 de 26 casos) que compararam a preferência de parasitoides entre plantas infestadas pelo hospedeiro e não hospedeiro, os parasitoides não discriminaram entre esses dois tratamentos. Da outra metade, nove estudos demonstraram que os parasitoides preferiram plantas infestadas pelo não hospedeiro. Esses dados revelam que herbívoros não hospedeiros têm grande potencial de afetar negativamente a eficiência de forrageamento de parasitoides (RIJK; DICKE; POELMAN, 2013).

Outras pesquisas envolvendo os sistemas tróficos aqui estudados devem ser realizadas para verificar a resposta de voo de *Cotesia* spp. (em túnel de vento, por

exemplo) aos VPIH emitidos em distintas combinações envolvendo as plantas e os hospedeiros. O comportamento de forrageamento dessas espécies de parasitoide diretamente na planta é outro aspecto que merece ser estudado.

Estes resultados permitem inferir que é possível a ocorrência de *C. kariyai* e *C. flavipes* em ambientes em que os herbívoros não hospedeiros estudados também estejam presentes. Ao conseguir discriminar substâncias voláteis provenientes de plantas infestadas pelos seus hospedeiros quando também expostos aos voláteis de plantas infestadas pelos não hospedeiros, esses agentes biológicos podem ter desempenho satisfatório no controle dos seus hospedeiros, que por sua vez são importantes insetos-praga em lavouras de milho e cana-de-açúcar. No entanto, outros estudos que verifiquem o comportamento e o desempenho (taxa de parasitismo, por exemplo) com outras abordagens (túnel de vento, identificação de voláteis) ajudariam a melhor elucidar as interações ecológicas entre as espécies desses sistemas.

6. CONCLUSÕES

Cotesia kariyai consegue discriminar entre voláteis emitidos por plantas de milho infestadas pelo hospedeiro (*M. separata*) e pelo não hospedeiro (*O. furnacalis*), dependendo da intensidade de infestação do não hospedeiro.

Plantas infestadas pelo hospedeiro na presença do não hospedeiro são mais atrativas a *C. kariyai* do que na ausência.

Cotesia flavipes discrimina voláteis emitidos por plantas de cana-de-açúcar infestadas pelo hospedeiro (*D. saccharalis*) e pelo não hospedeiro (*M. fimbriolata*).

Plantas infestadas pelo hospedeiro na presença e na ausência do não hospedeiro são igualmente atrativas a *C. flavipes*.

7. REFERÊNCIAS

AGBOGBA, B. C.; POWELL, W. Effect of the presence of a non-host herbivore on the response of the aphid parasitoid *Diaeretiella rapae* to host-infested cabbage plants. **Journal of Chemical Ecology**, Nova Iorque, v. 33, n. 12, p. 2229-2235, 2007.

AGELOPOULOS, N. G.; KELLER, M. A. Plant-natural enemy association in tritrophic system, *Cotesia rubecula* - *Pieris rapae* - Brassicaceae (Cruciferae). III. Collection and identification of plant and frass volatiles. **Journal of Chemical Ecology**, Nova Iorque, v. 20, p. 1955-1967, 1994.

ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A. A indústria do fungo *Metarhizium anisopliae*. In: PINTO, A. S. (Ed.). **Controle de pragas da cana-de-açúcar**. Sertãozinho: Biocontrol, 2006. p. 35-38.

BENTO, J. M. S.; NARDI, C. Bioecologia e nutrição vs ecologia química: as interações multitróficas mediadas por sinais químicos. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Eds.). **Bioecologia e nutrição de insetos: Base para o manejo integrado de pragas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 277-296, 2009.

BENTO, J. M. S.; VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. Considerações sobre a história do estudo e emprego de feromônios no Brasil. In: VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. (Eds.). **Feromônios de insetos: Biologia, química e aplicação**. Ribeirão Preto: Holos, p. 147-150, 2001.

BLANDE, J. D.; PICKETT, J. A.; POPPY, G. M. A comparison of semiochemically mediated interactions involving specialist and generalist *Brassica*-feeding aphids and the braconid parasitoid *Diaeretiella rapae*. **Journal of Chemical Ecology**, Nova Iorque, v. 33, p. 767-779, 2007.

BOTELHO, P.S.M. Quinze anos de controle biológico da *Diatraea saccharalis* utilizando parasitoides. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, p. 255-262, 1992.

BOTELHO, P. S. M.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. (Eds.). **Controle biológico no Brasil: Parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole, p. 409-426, 2002.

BUKOVINSZKY, T.; POELMAN, E. H.; KAMP, A.; HEMERIK, L.; PREKATSAKIS, G.; DICKE, M. Plants under multiple herbivory: consequences for parasitoid search behavior and foraging efficiency. **Animal Behaviour**, Londres, v. 83, n. 2, p. 501-509, 2012.

de BOER, J. G.; HORDIJK, C. A.; POSTHUMUS, M. A.; DICKE, M. Prey and non-prey arthropods sharing a host plant: effects on induced volatile emission and predator attraction. **Journal of Chemical Ecology**, Nova Iorque, v. 34, n. 3, p. 281-290, 2008.

DE, MORAES, C. M., LEWIS, W. J., PARÉ, P. W., ALBORN, H. T.; TUMLINSON, J. H. Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. **Nature**, Londres, v. 393, n. 6685, p. 570-573, 1998.

DICKE, M.; SABELIS, M. W. Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds? **Functional Ecology**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 131-139, 1988.

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

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

ERB, M.; FORESTI, N.; TURLINGS, T. C. J. A tritrophic signal that attracts parasitoids to host-damaged plants withstands disruption by non-host herbivores. **BMC Plant Biology**, Londres, v.10, n. 1, p. 1-11, 2010.

FUJIWARA, C.; TAKABAYASHI, J.; YANO, S. Effects of host-plant species on parasitization rates of *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae) by a parasitoid, *Cotesia kariyai* (Hymenoptera: Braconidae). **Applied Entomology and Zoology**, Tóquio, v. 35, n. 1, p. 131-136, 2000a.

FUJIWARA, C.; TAKABAYASHI, J.; YANO, S. Oviposition experience on a host-infested plant affects flight and antennal searching behavior of *Cotesia kariyai* toward

the host-plant complex. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 97, n. 3, p. 251-256, 2000b.

FUKUSHIMA, J.; KAINOH, Y.; HONDA, H.; TAKABAYASHI, J. Learning of host-infested plant volatiles in the larval parasitoid *Cotesia kariyai*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 99, n. 3, p. 341-346, 2001.

FUKUSHIMA, J.; KAINOH, Y.; HONDA, H.; TAKABAYASHI, J. Learning of herbivore-induced and nonspecific plant volatiles by a parasitoid, *Cotesia kariyai*. **Journal of Chemical Ecology**, Nova Iorque, v. 28, n. 3, p. 579-586, 2002.

GALLO, D. Situação do controle biológico da broca da cana-de-açúcar no Brasil. **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, Jaboticabal, v. 9, n. 2, p. 303-308, 1980.

GIRLING, R. D.; HASSALL, M.; TURNER, J. G.; POPPY, G. M. Behavioural responses of the aphid parasitoid *Diaeretiella rapae* to volatiles from *Arabidopsis thaliana* induced by *Myzus persicae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 120, p. 1-9, 2006.

GIRLING, R. D.; STEWART-JONES, A.; DHERBECOURT, J.; STALEY, J. T.; WRIGHT, D. J.; POPPY, G. M. Parasitoids select plants more heavily infested with their caterpillar hosts: a new approach to aid interpretation of plant headspace volatiles. **Proceedings of the Royal Society B**, Londres, v. 278, p. 2646-2653, 2011.

HARE, J. D. Ecological role of volatiles produced by plants in response to damage by herbivorous insects. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 56, s/n, p. 161-180, 2011.

HOBALLAH, M. E.; TURLINGS, T. C. J. Experimental evidence that plants under caterpillar attack may benefit from attracting parasitoids. **Evolutionary Ecology Research**, Tucson, v. 3, n. 5, p. 553-565, 2001.

HOU, M.; TAKABAYASHI, J.; KAINOH, Y. Effect of leaf age on flight response of a parasitic wasp *Cotesia kariyai* (Hymenoptera: Braconidae) to a plant-herbivore complex. **Applied Entomology and Zoology**, Tóquio, v. 40, n. 1, p. 113-117, 2005.

JEMBERE, B.; NGI-SONG, A. J.; OVERHOLT, W. Olfactory responses of *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) to target and non-target Lepidoptera and their host plants. **Biological Control**, Orlando, v. 28, p. 360-367, 2003.

KANDA, K. Rearing method of the common armyworm, *Mythimna separata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae). In: YUSHIMA, K.; KAMANO, S.; TAMAKI, Y. (Eds.). **Rearing method of insects**. Tokyo: Japan Plant Protection Association, p. 206-209, 1991.

KARBAN, R.; BALDWIN, I. T. **Induced responses to herbivory**. Chicago & London: The University of Chicago Press, 1997. 319p.

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

MANDOUR, N. S.; KAINOH, Y.; OZAWA, R.; UEFUNE, M.; TAKABAYASHI, J. Effects of time after last herbivory on the attraction of corn plants infested with common armyworms to a parasitic wasp *Cotesia kariyai*. **Journal of Chemical Ecology**, Nova lorque, v. 37, n. 3, p. 267-272, 2011.

MATTIACCI, L.; DICKE, M.; POSTHUMUS, M. A. Induction of parasitoid attracting synomone in brussels sprouts plants by feeding *Pieris brassicae* larvae: role of mechanical damage and herbivore elicitor. **Journal of Chemical Ecology**, Nova lorque, v. 20, p. 2229–2247, 1994.

McCORMICK, A. C.; UNSICKER, S. B.; GERSHENZON, J. The specificity of herbivore-induced plant volatiles in attracting herbivore enemies. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 17, n. 5, p. 303-310, 2012.

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

NAFUS, D. M.; SCHREINER, I. H. Review of the biology and control of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lep: Pyralidae). **Tropical Pest Management**, Basingstoke, v. 37, n. 1, p. 41-56, 1991.

NGI-SONG, A. J.; OVERHOLT, W. A.; NJAGI, P. G. N.; DICKE, M.; AYERTEY, J. N.; LWANDE, W. Volatile infochemicals used in host and host habitat location by *Cotesia flavipes* Cameron and *Cotesia sesamiae* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), larval parasitoids of stemborers on Graminae. **Journal of Chemical Ecology**, Nova lorque, v. 22, p. 307–323, 1996.

NORDLUND, D. A.; LEWIS, W. J. Terminology of chemical releasing stimuli in intraespecific and interspecific interactions. **Journal of Chemical Ecology**, Nova lorque, v. 2, p. 211-220, 1976.

OBONYO, M.; SCHULTHESS, F.; GERALD, J.; WANYAMA, O.; LE RU, B.; CALATAYUD, P. A. Location, acceptance and suitability of lepidopteran stemborers feeding on a cultivated and wild host-plant to the endoparasitoid *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae). **Biological Control**, Orlando, v. 45, p. 36–47, 2008.

OVERHOLT, W. A.; NGI-SONG, A. J.; KIMANI, S. K.; MBAPILA, J. C.; LAMMERS, P. M.; KIOKO, E. N. Environmental considerations and the introduction of *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) for biological control of *Chilo partellus* (Swinhoe) (Lepidoptera: Pyralidae), an introduced gramineous stemborer in Africa. **Biocontrol News and Information**, Wallingford, v.15, p.19-24, 1994.

PINTO, A. S. O controle biológico de pragas da cana-de-açúcar. In: PINTO, A. S. (Ed.). **Controle de pragas da cana-de-açúcar**. Sertãozinho: Biocontrol, p. 09-14, 2006.

POTTING, R. P. J.; VET, L. E. M.; DICKE, M. Host microhabitat location by stem-borer parasitoid *Cotesia flavipes*: the role of herbivore volatiles and locally and systemically induced plant volatiles. **Journal of Chemical Ecology**, Nova lorque, v. 21, n. 5, p. 525-539, 1995.

PRICE, P. W.; BOUTON, C. E.; GROSS, P.; McPHERON, B. A.; THOMPSON, J. N.; WEIS, A. E. Interactions among three trophic levels: Influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 11, s/n, p. 41-65, 1980.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>, 2012.

RIJK, M.; DICKE, M.; POELMAN, E. P. Foraging behavior by parasitoids in multiherbivore communities. **Animal Behaviour**, Londres, v. 85, p. 1517-1528, 2013.

ROSTÁS, M.; TON J.; MAUCH-MANI B.; TURLINGS, T. C. J. Fungal infection reduces herbivore-induced plant volatiles of maize but does not affect naïve parasitoids. **Journal of Chemical Ecology**, Nova Iorque, v. 32, p. 1897-1909, 2006.

SCHOONHOVEN, L. M.; van LOON, J. J. A.; DICKE, M. **Insect-Plant Biology**, 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2005. 421p.

SCHUMAN, M. C.; BARTHEL, K.; BALDWIN, I. T. Herbivory-induced volatiles function as defenses increasing fitness of the native plant *Nicotiana attenuata* in nature. **e-Life**, Castle Park, v. 1, s/n, p. 1-29, 2012.

SHIOJIRI, K.; TAKABAYASHI, J.; YANO, S.; TAKAFUJI, A. Flight response of parasitoids toward plant-herbivore complexes: A comparative study of two parasitoid-herbivore systems on cabbage plants. **Applied Entomology and Zoology**, Tóquio, v. 35, n. 1, p. 87-92, 2000.

TAKABAYASHI, J.; TAKAHASHI, S. Effects of host fecal pellet and synthetic kairomone on host-searching and postoviposition behavior of *Apanteles kariyai*, a parasitoid of *Pseudaletia separata*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 52, n. 3, p. 221-227, 1989.

TAKABAYASHI, J.; TAKAHASHI, S. An allelochemical elicits arrestment in *Apanteles kariyai* in feces of nonhost larvae *Acantholeucania loreyi*. **Journal of Chemical Ecology**, Nova Iorque, v. 16, n. 6, 1990.

TAKABAYASHI, J.; TAKAHASHI, S.; DICKE, M.; POSTHUMUS, M. A. Developmental stage of herbivore *Pseudaletia separata* affects production of herbivore induced synomone by corn plants. **Journal of Chemical Ecology**, Nova Iorque, v. 21, n. 3, p. 273-287, 1995.

TURLINGS, T. C. J.; WACKERS, F. L. Recruitment of predators and parasitoids by herbivore-injured plants. In: CARDE, R. T.; MILLAR, G. J. (Eds.). **Advances in insect chemical ecology**. Nova Iorque: Cambridge University Press, p. 21-75, 2004.

van LEERDAM, M. B.; SMITH Jr., J. W.; FUCHS, T. W. Frass-mediated, host-finding behavior of *Cotesia flavipes*, a braconid parasite of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 78, n. 5, p. 647-650, 1985.

VET, L.E.M.; van LENTEREN, J. C.; HEYMANS, M.; MEELIS, E. An airflow olfactometer for measuring olfactory responses of hymenopterous parasitoids and other small insects. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 8, n. 1, p.97-106, 1983.

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

VIEL, S. R. Criação de *Diatraea saccharalis* e *Cotesia flavipes*. In: DE BORTOLI, S. (Ed.). Criação de insetos: **Da base à biofábrica**. Jaboticabal: edição própria, p. 76-140, 2009.

VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. Introdução aos semioquímicos e terminologia. In: VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. (Eds.). **Feromônios de insetos: Biologia, química e aplicação**. Ribeirão Preto: Holos, p. 9-12, 2001.

VILELA, E. F.; MAFRA-NETO, A. Registro de feromônios comerciais e legislação. In: VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. (Eds.). **Feromônios de insetos: Biologia, química e aplicação**. Ribeirão Preto: Holos, p. 151-159, 2001.

VINSON, S. B. Host selection by insect parasitoids. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 21, p. 109-133, 1976.

WALLING, L. L. The myriad plant responses to herbivores. **Journal of Plant Growth Regulation**, Nova Iorque, v. 19, p. 195-216, 2000.

YAN, Z. G.; WANG, C. Z. Similar attractiveness of maize volatiles induced by *Helicoverpa armigera* and *Pseudaletia separata* to the generalist parasitoid *Campoletis chloridaeae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 118, n. 2, p. 87-96, 2006.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**, 5. ed. Londres: Prentice Hall, 2010. 944p.