

LUCIANE MODENEZ SALDIVAR XAVIER

ECOLOGIA QUÍMICA DE *Elasmopalpus lignosellus* (ZELLER): COMUNICAÇÃO QUÍMICA DURANTE O COMPORTAMENTO REPRODUTIVO E A INTERAÇÃO TRITRÓFICA ENVOLVENDO MILHO E O PARASITÓIDE *Trichogramma pretiosum* RILEY

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010**

LUCIANE MODENEZ SALDIVAR XAVIER

ECOLOGIA QUÍMICA DE *Elasmopalpus lignosellus* (ZELLER): COMUNICAÇÃO QUÍMICA DURANTE O COMPORTAMENTO REPRODUTIVO E A INTERAÇÃO TRITRÓFICA ENVOLVENDO MILHO E O PARASITÓIDE *Trichogramma pretiosum* RILEY

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

APROVADA: 29 de setembro de 2010.

Dr. José Magid Waquil

Prof^a Ivone Rezende Diniz

Dr. Miguel Michereff Filho

Dra. Carmen Silva Soares Pires

Prof. Evaldo Ferreira Vilela
(orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me mostrou a essência, suas promessas e a palavra.

Ao meu orientador Prof. Evaldo Ferreira Vilela e co-orientadores Dr. Crébio José Ávila e Dr. Paulo Afonso Viana, pela confiança, orientação na pesquisa e auxílio durante o doutorado.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Animal, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, cuja orientação durante as disciplinas me possibilitou conhecimento na execução da pesquisa.

Ao Prof. Eraldo Rodrigues de Lima, pelo acompanhamento e auxílio durante a pesquisa.

Ao grupo de pesquisadores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Dr. Miguel Borges, Dr. Raúl Alberto Laumann e Dra. Maria Carolina Blassioli Moraes, pelo auxílio no desenvolvimento da pesquisa.

Ao Dr. José Alexandre Freitas Barrigossi e aos funcionários do Laboratório de Entomologia da Embrapa Arroz e Feijão, por todo suporte na pesquisa.

Ao estudante Diego Martins Magalhães, pelo acompanhamento e auxílio na pesquisa.

A todos do Laboratório de Ecologia e Semioquímicos de Insetos da Embrapa Cenargen, pelo apoio na realização do trabalho.

À Sra. Maria Paula A. da Costa e Sra. Miriam Magalhães, dedicação e carinho é pouco para expressar o que representam.

Aos colegas do laboratório da Universidade Federal de Viçosa, Juliana C. Fortes, Farah C. Gama, Ângela Alves de Almeida, Wendel T. Pontes, Silvana Aparecida da Silva Souza e Daniel Albeny, pelo apoio e amizade.

A minha família, por estarmos juntos.

Aos meus pais e irmãos, por tudo que representam para mim.

À Mirian Fernandes F. Micherreff, Ana Paula Silva Lopes e Michely F. Santos de Aquino, pelo companheirismo, amizade, auxílio e valiosas discussões sobre a pesquisa.

À Luciana Barboza Silva, pelo apoio e amizade.

À Angela Canesin, Silvana Aparecida da Silva Souza, Odinez Alves Marques Garcia e Maria Aparecida da Rocha Reis pela grande amizade e carinho.

À Caroline Muller e à Eulene Francisco da Silva, pelo carinho por mim e por minha filha, e à Paulina de Araújo Ribeiro, por todo apoio em meus estudos e amizade.

Ao André Wilson Campos Rosado e Christiane Martins, pelo auxílio e amizade no início da realização da pesquisa.

À Cristiane F. Dantas, que me acolheu em Brasília com tanto carinho e confiança.

Ao casal de amigos, Caroline Bezerra e Leonardo L. Pepino, pela grande amizade.

ÍNDICE

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO GERAL.....	01
REFERÊNCIAS.....	12
CAPÍTULO 1: “ Indirect defense induced by lesser cornstalk borer, <i>Elasmopalpus lignosellus</i> on maize and its effect on <i>Trichogramma pretiosum</i>.”	32
Abstract.....	32
Resumo.....	33
Introduction.....	34
Methods and Material.....	36
Results and Discussion.....	42
Conclusions.....	48
Acknowledgments	48
References.....	50
Table and Figures.....	60
CAPÍTULO 2: “ Sexual behavior of the lesser cornstalk borer, <i>Elasmopalpus lignosellus</i>: age influence in mating and males responses in a wind tunnel. ”.....	67
Abstract.....	67

Resumo.....	68
Introduction.....	69
Methods and Material.....	71
Results and Discussion.....	74
Conclusions.....	77
Acknowledgments.....	78
References.....	79
Tables and Figures.....	85
CAPÍTULO 3: “Avaliação de extratos feromonais de <i>Elasmopalpus lignosellus</i> obtidos por diferentes técnicas de extração.”	89
Resumo.....	89
Abstract.....	90
Introdução.....	91
Material e Métodos.....	93
Resultados e Discussão.....	96
Conclusões.....	100
Agradecimentos.....	100
Referências.....	101
Figuras.....	107
CONCLUSÕES GERAIS.....	113
ANEXO.....	115

RESUMO

XAVIER, Luciane Modenez Saldivar, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro, 2010, **Ecologia química de *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller): comunicação química durante o comportamento reprodutivo e a interação tritrófica envolvendo milho e o parasitóide *Trichogramma pretiosum* Riley.** Orientador: Evaldo Ferreira Vilela. Co-Orientadores: Crébio José Ávila e Paulo Afonso Viana.

O sistema tritrófico: milho, *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera: Pyralidae) e *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) foi avaliado com o objetivo de observar se o comportamento alimentar de *E. lignosellus* induz a defesa indireta de plantas de milho e se os voláteis induzidos, após danos de herbivoria, são usados como pistas por *T. pretiosum* para encontrar seu hospedeiro. A quantidade de compostos voláteis emitidos de plantas de milho, submetidas a diferentes tratamentos (sem dano, danificadas por herbivoria e mecanicamente), diferiu significativamente quando comparadas. Os resultados de bioensaios com as plantas de milho, submetidas aos diferentes tratamentos com o parasitóide de ovos, sugerem que *T. pretiosum* usa os voláteis do milho como pista para encontrar o hospedeiro. Após 24 horas de dano, pela análise de curvas principais não se detectou diferenças no perfil químico de voláteis de plantas danificadas por herbivoria e sem dano. Entretanto, individualmente, os compostos (Z)-3-acetato de hexenila, benzotiazol e os terpenos, β -pineno, β -mirceno e (E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno foram liberados em alta quantidade por plantas danificadas por herbivoria. O estudo do comportamento reprodutivo de *E. lignosellus* mostrou que o maior índice de acasalamento ocorreu quando os casais estavam entre 24 e 48 horas de idade. e

entre 6 a 8 horas de escuro. No comportamento de acasalamento, os machos, usualmente, vibram as asas ao se aproximar da fêmea e o período médio de acasalamento foi de $93,97 \pm 4,13$ minutos. Fêmeas de *E. lignosellus*, em comportamento de chamamento, foram avaliadas em túnel de vento e atraíram significativamente mais machos que nos bioensaios em fluxo de ar limpo (controle). Fêmeas jovens apresentaram comportamento de chamamento significativamente menor, mas não afetou na resposta do macho. A idade das fêmeas não interferiu na resposta dos machos e os machos entre 48 e 72 horas de idade foram os que apresentaram menor resposta e diferiram significativamente dos outros machos avaliados. O tempo de resposta em cada bioensaio (10 minutos/bioensaio) foi significativamente maior nos machos entre 48 e 72 horas de idade, quando machos de 0-24, 24-48, 48-72 e 72-96 horas foram comparados. Diferentes técnicas analíticas foram testadas para extração do feromônio sexual de *E. lignosellus*: aeração, extração de glândulas e microextração em fase sólida *SPME*. As técnicas de aeração e por fibra de *SPME* apresentaram pouca consistência e resultados com alta variabilidade. O processo de extração de glândulas mostrou ser a técnica mais eficiente, na qual foi possível identificar três compostos com padrão de fragmentação esperado para acetatos de lepidóptero. A análise química dos extratos mostrou que os compostos são acetato de hexadecila, acetato de (Z)-11-hexadecenila e acetato de (Z)-9-hexadecenila ou (Z)-8-hexadecenila.

ABSTRACT

XAVIER, Luciane Modenez Saldivar, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2010, **Chemical ecology of *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller): chemical communication during reproductive behavior and tritrophic interaction involving maize and the parasitoid *Trichogramma pretiosum* Riley.** Adviser: Evaldo Ferreira Vilela. Co- Advisers: Crébio José Ávila and Paulo Afonso Viana.

The tritrophic system in maize, *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera: Pyralidae) and *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) was evaluated aiming to identify if the feeding behavior of *E. lignosellus* larvae induces the indirect defense of maize plants and also if induced volatiles, after damage by herbivory, are used by the *T. pretiosum* as cues to find their host. The amount of volatile compounds emitted by maize plants, subjected to different treatments (undamaged, damaged by herbivory and mechanically damaged), differed significantly when compared. The results of bioassays with the maize plants subjected to the different treatments with egg parasitoids, suggest that *T. pretiosum* use maize volatiles as clues to find the host. After 24h of damage, the analysis of the main curves did not detect differences between undamaged plants and plants damaged by herbivory. However, individually, the compounds (*Z*)-3-hexenyl acetate, benzothiazole and terpenes, β -pinene, β -myrcene and (*E*)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene were released in higher quantities by plants damaged by herbivory when compared to the quantity released by undamaged plants. The study of reproductive behavior showed that the highest index of mating occurred when the couples were between 24 and 48 hours old and between 6 and 8 hours of darkness. In the mating

behavior, the males usually vibrated their wings when approaching the female and the average period of mating was 93.97 ± 4.13 minutes. Calling females of *E. lignosellus*, were evaluated in a wind tunnel and attracted significantly more males than in bioassays with clean air (control). Younger females call significantly less, but no significant effect occurred in male response. Males with 48 to 72 hours old responded less and differed significantly from other males assessed, but the age of the female did not influence the response. The time of response in each bioassay (10 minutes/bioassay) was significantly higher for males aged between 48 and 72 hours old, when males of 0-24, 24-48, 48-72 and 72-96 hours old were compared. Different analytical techniques were tested in the extraction of the sex pheromone of *E. lignosellus*: aeration, extraction of glands and Solid Phase Micro-Extraction (SPME). The aeration technique and SPME fiber technique showed little consistency and results with high variability. The gland extraction process was the most efficient technique, in which it was possible to identify only three compounds with the fragmentation pattern expected for lepidopteran acetates. The chemical analysis of extracts showed that the compounds are hexadecyl acetate, (Z)-11-hexadecenyl acetate and (Z)-9 or (Z)-8-hexadecenyl acetate.

INTRODUÇÃO GERAL

Elasmopalpus lignosellus

A broca-do-colo ou lagarta-elasma, *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Pyralidae), é uma praga subterrânea que ocorre em regiões temperadas e tropicais do hemisfério ocidental, distribuindo-se desde o sul dos Estados Unidos até a América do Sul (Viana, 2004). As lagartas de *E. lignosellus* são polípagas (Busoli et al., 1977) e atacam hospedeiros com até 30 cm de altura, sendo os ataques mais expressivos em culturas com até 30 dias pós-emergência (Pinto et al., 2004). Os primeiros instares se alimentam de folhas novas e, ao atingir o terceiro instar, penetram no colmo de plantas novas, onde constroem galerias em direção ao centro da planta (Dupree, 1965; Kishino, 1981) e quando atingem a gema apical, em geral, causam a morte do hospedeiro (Pinto et al., 2004). Quando o ataque ocorre antes do perfilhamento, cada lagarta é capaz de destruir até quatro plantas adjacentes e, em ataque intenso, pode inviabilizar a lavoura (Sauer, 1939).

Devido à sua polifagia, existem mais de 60 espécies de plantas registradas como hospedeiras de *E. lignosellus* (Stone, 1968) e, devido aos danos diretos nas plantas, durante o início da fase vegetativa, esta praga produz anualmente significativo prejuízo econômico a várias culturas, como registrado por Tippins (1982) e Martin & Suber (1982), na Geórgia, EUA. No Brasil, *E. lignosellus* foi registrada desde a década de 30 do século passado em lavouras de milho, arroz, sorgo e algodão (Sauer, 1939). Atualmente, esta praga é um problema sério, especialmente nas culturas de milho, soja e algodão, atacando também as culturas de

arroz, sorgo, trigo, amendoim e cana-de-açúcar (Sauer, 1939; Kishino, 1981; Ferreira & Barrigossi, 2003; Viana, 2004, Richetti et al., 2009; Suleiman, 2010).

No Brasil, *E. lignosellus* é classificada como praga chave da fase inicial da cultura do milho, já que o ataque às plantas ocorre nos primeiros 30 dias após a germinação (Bianco, 1991; Cruz et al., 1995; Gallo et al., 2002).

A cultura do Milho

O milho *Zea mays* Linnaeus (Poaceae) é uma gramínea anual e um dos mais importantes cereais cultivados mundialmente (Cançado & Freitas, 2002; Magalhães et al., 2002; Haberer et al., 2005). Este cereal é originário do México e América Central (Buckler & Stevens, 2005) a partir da domesticação do teosinto (*Zea* spp) (Piperno & Flannery, 2001; Buckler & Stevens, 2005). Esta gramínea é cultivada em grande parte do Brasil, alcançando cerca de 14 milhões de hectares de área plantada, com produção de grãos de 54 milhões de toneladas e exportação de 8.500 toneladas, em 2009/2010 (CONAB 2010; Magalhães et al., 2002). Devido à quantidade de cultivares no mercado, rapidez de substituição e variabilidade de suas características agrônômicas, são necessários intensivos estudos para a escolha de genótipos de milho adequados às condições locais (Farinelli et al., 2003).

Manejo de *E. lignosellus*

Diante da importância da cultura do milho e de expressivos impactos ocasionados por *E. lignosellus*, o avanço do conhecimento científico visando o manejo desta praga é relevante. Diversas práticas de manejo, dinâmica populacional e tabelas de vida deste inseto em diferentes hospedeiros foram investigadas, assim como a seleção de resistência genética em cultivares e variedades de milho (Busoli et

al., 1977; Johnson, 1978; Ferreira Jr. et al., 1998; Vilella et al., 2002). Práticas culturais que contribuem para a manutenção do teor de umidade no solo e o sistema de plantio direto podem influenciar a incidência de *E. lignosellus* (Viana & Costa, 1992; Silva et al., 1994; Gallo et al., 2002). Além disso, vários parasitóides, pertencentes às ordens Hymenoptera e Diptera, e o entomopatógeno *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911 (Bacillaceae) são citados como inimigos naturais de *E. lignosellus* na fase larval (Johnson & Smith Jr., 1980; Tippins, 1982; Moar et al., 1995), juntamente com o parasitóide de ovos *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Trichogrammatidae) que mostrou eficiência como agente de controle em condições de laboratório (Paron & Quintela, 2002). No entanto, em razão da ecologia e comportamento do inseto, o impacto dos inimigos naturais de *E. lignosellus* na fase larval é limitado (Viana, 2004).

Apesar dos estudos já realizados, pouco se avançou no controle de *E. lignosellus*, não havendo uma recomendação segura para conter seus danos (Silva et al., 1994) e apenas o controle químico tem sido intensificado (Viana, 2004).

Estudos de ecologia química podem conduzir a alternativas eficientes e sustentáveis para o manejo de *E. lignosellus*. Neste contexto, a identificação de atrativos sexuais utilizados durante o comportamento reprodutivo e os semioquímicos envolvidos na interação tritrófica *E. lignosellus*-milho-inimigo natural (*T. pretiosum*) podem resultar em tecnologias, procedimentos e/ou produtos com potencial para uso no controle populacional desta praga.

A ecologia química é considerada uma ciência que estuda as substâncias químicas mediadoras na interação entre organismos e seu ambiente (Takken & Dicke, 2006). Estas substâncias, denominadas semioquímicos, são sinais químicos utilizados para comunicações intra (feromônios) e interespecíficas (aleloquímicos)

(Dicke & Sabelis, 1988; Vilela & Della Lucia, 2001; Pickett et al., 2006; Lei & Vickers, 2008). Em ambientes terrestres, os semioquímicos geralmente são voláteis que produzem mudanças comportamentais ou respostas fisiológicas nos organismos receptores (Dicke & Sabelis, 1988) e são detectados por quimiorreceptores olfativos (Blomquist & Vogt, 2003).

Feromônios são definidos como compostos produzidos por um organismo que causam, no receptor da mesma espécie, respostas comportamentais e fisiológicas específicas (Raina, 1993; Roelofs, 1995; Rafaeli & Jurenka, 2003). Aleloquímicos são sinais químicos mediadores de interações interespecíficas e são classificados em alomônios (conferem vantagem seletiva ao emissor), cairomônios (favorecem o receptor) e sinomônios (em que emissor e receptor se beneficiam), estes últimos podem ser representados em interações complexas como indução de voláteis no milho pela herbivoria de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Noctuidae) que atraem o parasitóide *Cotesia marginiventris* (Cresson, 1865) (Ichneumonidae) (Hoballah et al., 2002).

Em insetos muitos organismos usam feromônio sexual para localização do coespecífico (Cardé & Willis, 2008). Estudos da comunicação sexual têm resultado na caracterização de respostas químicas e comportamentais em vários insetos, utilizando feromônios como sinais olfativos (Hildebrand, 1995; Galizia & Szyszka, 2008). Uma vez que estes compostos são quimicamente e biologicamente definidos, seu uso no manejo integrado de pragas pode ser estabelecido. Um método efetivo para estimar populações de espécies-praga, especialmente lepidópteros, é o monitoramento com emprego de armadilhas contendo o feromônio sexual sintético como atrativo para a espécie como, por exemplo, nas espécies *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Pyralidae) e *Pseudaletia sequax* Franclemont, 1951 (Noctuidae),

insetos-praga que causam expressivos danos econômicos (Santangelo et al., 2002; Almeida, 2007).

A atração química é a forma mais difundida de recrutamento sexual em lepidópteros, principalmente nos de hábito noturno, em que machos são atraídos por uma mistura de compostos emitidos pelas fêmeas (Cardé & Backer, 1984; Raina, 1996; Greiner et al., 2002; Jarriault et al., 2009). As fêmeas receptivas liberam este feromônio durante uma fase de chamamento (Wedell, 2005), a partir de uma glândula específica localizada no final do abdome (Cardé & Baker, 1984). O padrão de chamamento pode definir a liberação do feromônio sexual (McNeil, 1991) e é específico para cada espécie, incluindo eventos como exposição da glândula de feromônio e movimento das asas (Manson & Johnson, 1989; Pires et al., 1994; Ambrogi et al., 2009).

Durante a percepção, os machos apresentam uma série de comportamentos a longa e média distâncias que permitem a sua orientação para a fonte emissora de feromônio como: movimentos das asas e antenas, voo em zigue-zague, seguindo a pluma de odor, pouso na fonte emissora ou próximo a esta, caminhada e movimentação das asas até localizar a fêmea (McNeil, 1991; Lima & Della Lucia, 2001; Rafaeli & Jurenka, 2003). Em geral, os feromônios sexuais de lepidópteros são formados por uma mistura de compostos voláteis (Norin, 2001). Entre os compostos comumente encontrados em feromônios de lepidópteros se destacam dois grupos. O Tipo I representa 70% dos feromônios conhecidos, que correspondem a acetatos, aldeídos e alcoóis, com átomos de carbono (C_{10} - C_{18}) em uma cadeia linear com até 3 insaturações; um outro de Tipo II, com 15% dos feromônios estudados, correspondem a hidrocarbonetos insaturados e seus derivados epóxidos, com longas cadeias lineares (C_{17} - C_{23}) (Ando et al., 2004).

Estudos com fêmeas têm demonstrado que a idade, presença de feromônio sexual de coespecíficos, acasalamento, *status* do macho, alimento e fatores abióticos como temperatura, umidade relativa, luminosidade e velocidade do vento são determinantes para produção e emissão do feromônio sexual (Webster & Carde, 1982; McNeil, 1991; Foster & Greenwood, 1997; Rafaeli & Jurenka, 2003). Em machos de lepidópteros, há vários fatores responsáveis pela mudança na atratividade comportamental ao feromônio sexual, como idade, governada por fatores hormonais e neurológicos, temperatura, velocidade do vento, nível de competição, qualidade e quantidade de estímulo (McNeil, 1991; Hildebrand, 1995; Roelofs, 1995; Anton & Gadene, 1999; Greiner et al., 2002; Evenden & Gries, 2008; Jarriault et al., 2009;).

Feromônio sexual de *E. lignosellus*

Payne & Smith (1975) descreveram pela primeira vez o feromônio sexual de *E. lignosellus*. Posteriormente, a partir do estudo de uma população de Tifton, GA, EUA, foi constatada uma mistura de dez compostos feromonais na seguinte proporção: 16.5% de acetato de (Z)-7-tetradecenila, 8.8% de acetato de (Z)-9-tetradecenila, 3.8% de acetato de tetradecila, 28.2% de acetato de (Z)-9-hexadecenila, 17.4% de acetato de (Z)-11-hexadecenila, 9.6% de acetato de hexadecila, 2.1% de (Z)-7-tetradecenol, 2.1% de (Z)-9-tetradecenol, 7.0% de (Z)-9-hexadecenol e 4.4% de (Z)-11-hexadecenol (Lynch et al., 1984). Quatro destes compostos foram sintetizados e preparados em uma solução na proporção de 37% de (Z)-7-tetradecenila, 20% acetato de (Z)-9-tetradecenila, 4% (Z)-9-tetradecenol, e 39% acetato de (Z)-11-hexadecenila. Essa mistura mostrou-se eficiente na atração de machos em armadilhas no campo, na Flórida e no México (Funderburk et al., 1985). No entanto, testes com esta mistura

feromonal, no Brasil, foram realizados por Pires et al. (1992), sem eficácia na captura de machos em armadilhas no campo.

Como a mistura feromonal proposta para a população americana de *E. lignosellus* não funcionou nas populações brasileiras, estudos foram conduzidos com duas populações, uma de Minas Gerais e outra de Goiás (Silva, 2001; Jham et al., 2005, 2007). Nestes estudos, os seguintes compostos foram propostos para a população de Goiás: acetato de (*E*)-8-hexadecenila ou acetato de (*E*)-9-hexadecenila, acetato de (*Z*)-9-hexadecenila e acetato (*Z*)-11-hexadecenila e, para a população de Sete Lagoas (MG), os acetatos (*Z*)-9-hexadecenila e (*Z*)-11-hexadecenila. Estudos de eletroantenografia mostraram que machos de cada população respondem aos compostos identificados nas fêmeas da sua mesma região de origem (Jham et al., 2005, 2007). A variabilidade na composição do feromônio sexual de populações de diferentes localidades geográficas, em lepidópteros e outras Ordens de insetos, vem sendo comumente relatada (Cardé & Baker, 1984, Groot et al, 2009). No entanto, os estudos com as populações brasileiras ainda não são conclusivos, uma vez que não foram conduzidos bioensaios em laboratório ou campo para verificar se estes compostos têm ação feromonal.

Voláteis de plantas para o manejo de inimigos naturais

A defesa da planta contra herbívoros não é restrita a barreiras físicas. Compostos químicos não voláteis agem muitas vezes sobre a praga e, adicionalmente, as plantas possuem estratégias de defesa indireta agindo sobre inimigos naturais (predadores ou parasitóides) (Turlings & Ton, 2006). Algumas plantas produzem naturalmente metabólitos secundários voláteis que são usados, por exemplo, por polinizadores e pragas, como pista para encontrar o hospedeiro.

Adicionalmente, plantas também produzem voláteis que agem na sua defesa indireta atraindo inimigos naturais das pragas. Quando as plantas são danificadas por herbivoria ou oviposição o perfil de voláteis das plantas é alterado e usado como informação por inimigos naturais da provável presença do hospedeiro (Price et al., 1980; Dicke et al., 1990; Turlings et al., 1990; Vet & Dicke, 1992, Price, 1997; Moraes et al., 2005, 2008; Köllner et al., 2008). Price et al. (1980) foram os primeiros pesquisadores a discutir o significado ecológico da atração do terceiro nível trófico por plantas que estão sob ataque de herbívoros. Esta atração é uma das funções dos voláteis de planta induzidos pela herbivoria (*HIPVs*) (Hoballah & Turlings, 2005; Turlings & Ton, 2006). Posteriormente, os *HIPVs* foram descritos para sistemas tritróficos de várias plantas cultivadas, como milho, algodão, feijão, tabaco e soja (Dicke et al., 1990; Turlings et al., 1990, Loughrin et al., 1994, De Moraes et al., 1998, Colazza et al., 2004, Moraes et al., 2005, 2008; Heil, 2008).

HIPVs podem variar quantitativamente e qualitativamente (Rostás et al., 2006), dependendo principalmente das características da espécie/genótipo da planta, das diferentes espécies de herbívoros que causam os danos, do tipo de dano ocasionado e/ou da presença de substâncias na saliva do herbívoro que induzem a resposta da planta (Turlings et al., 2000; Engelberth et al., 2007; Lin et al., 2008; Rasmann & Turlings, 2008). Esta defesa pode ser sistêmica e estendendo-se por toda a planta (Karban & Baldwin, 1997). A variação na liberação dos *HIPVs* é responsável por uma atração diferencial dos parasitóides (Hoballah & Turlings, 2001), que ocorre através de um processo co-evolutivo (Bernays & Chapman, 1994) e os inimigos naturais demonstram capacidade de responder a estes odores mesmo em baixas concentrações (De Moraes et al., 1998; Eiras & Gerk, 2001; Vilela & Pallini, 2002).

Os *HIPVs* são originados de diferentes rotas metabólicas, duas delas são induzidas principalmente por insetos mastigadores como a rota das lipoxigenases e a rota dos compostos derivados do isopreno, os terpenóides (Arimura et al., 2009). Uma terceira rota muito importante é induzida principalmente por patógenos e insetos sugadores, como mosca-branca e afídeos, a rota do ácido salicílico (Walling, 2000; Kaloshian & Walling, 2005).

Os terpenóides são sintetizados pela planta através da junção de pequenos blocos de C_5 , chamados de isoprenóides, e podem originar-se da rota do ácido mevalônico ou do piruvato (Gershenson & Kreis, 1999, Arimura et al., 2009). Os monoterpenos (C_{10}) e diterpenos (C_{20}) são sintetizados nos plastídeos e os sesquiterpenos no citosol. Outra importante classe de terpenos, os homoterpenos, como, por exemplo, o composto 8,12-trimetiltrideca-1,3,7,11-tetraene (TMTT), podem ser produzidos de sesquiterpenos e diterpenos, assim, podendo ser sintetizados nas plantas, tanto nos plastídeos, como no citosol.

Os compostos derivados dos ácidos graxos vêm da rota do octadecanóide, originado da quebra de ácidos graxos de cadeia longa (como os ácidos linolêico e linolênico). Destes compostos são produzidos os voláteis verdes de plantas, que incluem compostos de seis carbonos aldeídos, alcoóis e seus ésteres, e também o ácido jasmônico e seus derivados, como metil jasmonato e cis-jasmone (Hatanaka, 1993, Dudareva et al., 2006, Pickett et al., 2007).

Os compostos derivados da rota ácido salicílico são compostos aromáticos, como salicilato de metila, indole, benzaldeído, e são muito importantes na comunicação química inseto-planta (Boer & Dicke, 2005).

Vários estudos em milho têm detalhado a base fisiológica da síntese de voláteis como resposta de defesa indireta. O milho tem sido uma planta modelo

desde o início dos estudos de *HIPVs* (Turlings et al., 1990). Após dano de herbivoria de lepidópteros, o milho libera uma mistura de voláteis altamente atrativos para vários parasitóides (D'Alessandro et al., 2006; Schnee et al., 2006). (E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (DMNT), um composto presente nesta mistura, atrai inimigos naturais dos lepidópteros *Spodoptera* spp. (Noctuidae), *Helicoverpa* spp. (Noctuidae), *Trichoplusia ni* (Hübner, 1802) (Noctuidae), *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Noctuidae) e *Pseudaletia separate* Walker, 1865 (Noctuidae) (Turlings et al., 1993, 2005; Yan & Wang, 2006; Rostás & Turlings, 2008).

Nestas pesquisas com milho foram estudadas como as rotas biossintéticas são induzidas (Köllner et al., 2008), a comparação da composição quantitativa e qualitativa das misturas de voláteis liberados entre cultivares (Gouinguené et al., 2001; Hoballah et al., 2002; Degen et al., 2004) e a interação dos *HIPVs* com fatores bióticos (hormônios de planta, elicitores derivados de herbívoros e associação com microrganismos) e abióticos como umidade do solo e ar, temperatura, luminosidade e fertilização (Gouinguené & Turlings, 2002).

Nos estudos de *HIPVs*, além da descrição detalhada da biossíntese e liberação de compostos orgânicos voláteis (*VOCs*), é fundamental conhecer o mecanismo de percepção e exploração deste sinal químico pelos inimigos naturais (D'Alessandro & Turlings, 2006). A manipulação do comportamento de inimigos naturais através destes voláteis pode representar uma ferramenta em potencial no manejo integrado de pragas. Em soja, por exemplo, fitohormônios como *cis*-jasmone induzem a liberação de voláteis, semelhantes aos induzidos após dano de herbivoria por percevejos, que são atrativos para o parasitóide de ovos *Telenomus podisi* Ashmead, 1893 (Scelionidae) (Moraes et al., 2009). A aplicação deste fitohormônio, em soja, é capaz de aumentar significativamente a incidência de

parasitóides de ovos, mostrando potencial para seu uso no manejo comportamental destes inimigos naturais, auxiliando no controle biológico (Vieira, 2010).

Objetivos

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo geral desenvolver estudos de ecologia química de *E. lignosellus*, envolvendo milho como planta hospedeira e o parasitóide de ovos *T. pretiosum*, tendo como objetivos específicos:

- 1- Avaliar a interação tritrófica *E. lignosellus*-milho-parasitóide de ovos (*T. pretiosum*), visando estabelecer se há indução de defesa indireta, em milho, pela herbivoria e seu efeito no comportamento do parasitóide;
- 2- Aprofundar o conhecimento sobre o comportamento sexual de *E. lignosellus* e a influência de feromônios sexuais no mesmo; e
- 3- Estabelecer a composição do feromônio sexual de *E. lignosellus*, de uma população brasileira, utilizando diferentes técnicas de extração feromonal.

Os três capítulos desta pesquisa foram escritos no formato de artigo científico, de acordo com as normas da revista Pesquisa Agropecuária Brasileira, para a qual foram submetidos os Capítulos I e II. Entre os capítulos, há repetições de algumas informações e citações, por serem relevantes na elaboração de cada capítulo.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.A de. **Comportamento reprodutivo e identificação do feromônio sexual de *Pseudaletia sequax* (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2007. 56p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

AMBROGI, B.G.; FONSECA, M.G.; CORACINI, M.D.A.; ZARBINET, P.H.G. Calling behaviour and male response towards sex pheromone of poplar moth *Condylorrhiza vestigialis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Pest Science**, v.82, p.55-60, 2009.

ANDO, T.; INOMATA, S.; YAMAMOTO, M. Lepidoptera sex pheromones. In: Schulz, S. (Ed.). **Chemistry of pheromones and other semiochemicals**. Topics in current chemistry. New York: Springer and Verlag, 2004. p.51-96.

ANTON, S.; GADENNE, C. Effect of juvenile hormone on the central nervous processing of sex pheromone in an insect. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.96, p.5764-5767, 1999.

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

BERNAYS, E.A.; CHAPMAN, R.F. **Host-plant selection by phytophagous insects**. New York: Chapman & Hall, 1994. 312p.

BIANCO, R. Pragas do milho e seu controle. In: **A cultura do milho no Paraná**. Londrina: IAPAR, 1991. p.187-221. Circular 68.

BLOMQUIST, G.J.; VOGT, R.G. **Insect pheromone biochemistry and molecular biology: The biosynthesis and detection of pheromones and plant volatiles**. California: Elsevier: Academic Press, 2003. 745p.

BOER, J.G.; DICKE, M. Information use by the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae), a specialised natural enemy of herbivorous spider mites. **Applied Entomology and Zoology**, v.40, p.1-12, 2005.

BUCKLER, E.S.; STEVENS, N.M. Maize Origins, Domestication, and Selection. In: MOTLEY, T.J.; ZEREGA, N.; CROSS, H. (Ed.). **Darwin's harvest: new approaches to the origins, evolution, and conservation of crops**. New York: Columbia University Press. p. 67-90. 2005.

BUSOLI, A.C.; LARA F.M.; JUNIOR, D.N.; GUIDI, M. Preferência de *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera: Pyralidae) por diferentes culturas. **Anais da Sociedade Brasileira de Entomologia**, v.6, p.73-79, 1977.

CANÇADO, R.A.; FREITAS, R.J.S. de. Milho: Teor de umidade x Atividade de água, Uma relação no milho (*Zea mays* Linné) entre o teor de umidade e o teor de atividade de água.

Biociência, v.29, p.84-90, 2002.

CARDÉ, R.T.; BAKER, T.C. Sexual communication with pheromones. In: BELL W.J.; CARDÉ R.T. (Ed.). **Chemical ecology of insects**. New York: Chapman and Hall, 1984. p.356-383.

CARDÉ, R.T.; WILLIS, M.A. Navigational strategies used by insects to find distant, wind-borne sources of odor. **Journal of Chemical Ecology**, v.34, p.854-866, 2008.

COLAZZA, S.; MCELFFRESH, J.S.; MILLAR, J.G. Identification of volatile synomones; induced by *Nezara viridula* feeding and oviposition on bean spp., that attract the egg parasitoid *Trissolcus basalus*. **Journal of Chemical Ecology**, v.30, p.945-964, 2004.

CONAB - **Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira - Grãos - Agosto/2010. 42p.** Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conab/Main.php?MagID=3&MagNo=74>. Acesso em: 15/11/2010.

CRUZ, I.; WAQUIL, J.M.; VIANA, P.A.; VALICENTE, F.H. Pragas: diagnóstico e controle. **Arquivo do Agrônomo**, v.2, p.01-25, 1995.

D'ALESSANDRO, M.; HELD, M.; TRIPONEZ, Y.; TURLINGS, T.C.J. The role of indole and other shikimic acid derived maize volatiles in the attraction of two parasitic wasps. **Journal of Chemical Ecology**, v.32, p.2733-2748, 2006.

D'ALESSANDRO, M.; TURLINGS, T.C.J. Advances and challenges in the identification of volatiles that mediate interactions among plants and arthropods. **The Analyst**, v.131, p.24-32, 2006.

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

DEGEN, T.; DILLMANN, C.; MARION-POLL, F.; TURLINGS, T.C.J. High genetic variability of herbivore-induced volatile emission within a broad range of maize inbred lines. **Plant Physiology**, v.135, p.1928-1938, 2004.

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

DICKE, M.; SABELIS, M.W.; TAKABAYASHI, J.; BRUIN, J.; POSTHUMUS, M.A. Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals: prospects for application in pest control. **Journal of Chemical Ecology**, v.16, p.3091-3119, 1990.

DUDAREVA N.; NEGRE F.; NAGEGOWDA, D.A, ORLOVA, I. Plant volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v25, p.417-440, 2006.

DUPREE, M. Observations on the life history of the Lesser cornstalk borer. **Journal of Economic Entomology**, v.58. p.1156-1157, 1965.

EIRAS, A. E.; GERK, A. de O. Cairomônios e aprendizagem em parasitóides. In: Vilela E.F.; DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed.). **Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p.113-120.

ENGELBERTH, J.; SELDL-ADAMS, I.; SCHULTZ, J.C.; TUMLINSON, J.H. Insect elicitors and exposure to green leafy volatiles differentially up-regulate major octadecanoids and transcripts of 12-oxo phytodienoic acid reductases in *Zea mays*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.20, p.707-716, 2007.

EVENDEN, M.L.; GRIES, R. Plasticity of male response to sex pheromone depends on physiological state in a long-lived moth. **Animal Behaviour**, v.75, p.663-672, 2008.

FARINELLI, R.; PENARIOL, F.G.; BORDIN, L.; COICEV, L.; FILHO, D.F. Desempenho agrônomo de cultivares de milho nos períodos de safra e safrinha. **Bragantia**, v.62, p.235-241, 2003.

FERREIRA, E.; BARRIGOSI, J.A.F. Field technique for infesting Rice with *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) and evaluating insecticide treatments. **Neotropical Entomology**, v.32, p.367-371, 2003.

FERREIRA JR, E.; CASTRO, E.M. de; FERREIRA, E.; MORAIS, O.P. de. Potencial genético da população de arroz de sequeiro “CNA 8” para um programa de seleção visando à resistência à broca-do-colo, *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera, Pyralidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v.22, p.318-322, 1998.

FOSTER, S.; GEENWOOD, D.R. Change in reductase activity is responsible for senescent decline in sex pheromone titre in the lightbrown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker). **Journal of Insect Physiology**, v.43, p.1093-1100, 1997.

FUNDERBURK, J.E.; HERZOG, D.C.; MACK, T.P.; LYNCH, R.E. Sampling lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Pyralidae) adults in several crops with reference to adult dispersion patterns. **Environmental Entomology**, v.14, p.453-458, 1985.

GALIZIA, C.G.; SZYSZKA, P. Olfactory coding in the insect brain: molecular receptive ranges, spatial and temporal coding. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.128, p.81-92, 2008.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

GERSHENSON, J.; KREIS, W. Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, sterols, cardiac glycosides and steroid saponins. In: Wink, M. (Ed.). **Biochemistry Plant Secondary Metabolism**. Sheffield Academic Press, 1999. p.222-229.

GOUINGUENÉ, S.; DEGEN, T.; TURLINGS, T.C.J. Variability in herbivore-induced odour emissions among maize cultivars and their wild ancestors (teosinte). **Chemoecology**, v.11, p.9-16, 2001.

GOUINGUENÉ, S.P.; TURLINGS, T.C.J. The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. **Plant Physiology**, v.129, p.1296–1307, 2002.

GREINER, B.; GADENNE, C. ; ANTON, S. Central processing of plant volatiles in *Agrostis ipsilon* males is age-independent in contrast to sex pheromone processing. **Chemical Senses**, v. 25, p. 45-48, 2002.

GROOT, A.T.; INGLIS, O.; BOWDRIDGE, S.; SANTANGELO, R.G.; BIANCO, C.; LÓPEZ, J.D.; VARGAS, A.T.; GOULD, F.; SCHAL, C. Geographical and temporal variation in moth chemical communication. **Evolution**, v.63, p.1987-2003, 2009.

HABERER, G.; YOUNG, S.; BHARTI, A.K.; GUNDLACH, H.; RAYMOND, C.; FUKS, G.; BUTLER, E., WING, R.A.; ROUNSLEY, S.; BIRREN, B.; NUSBAUM, C.; MAYER, K.F.X.; MESSING, J. Structure and Architecture of the Maize Genome. **Plant Physiology**, v.139, p.1612-1624, 2005.

HATANAKA, A. The biogenesis of green odour by green leaves. **Phytochemistry**, v.34, p.1201-1218, 1993.

HEIL, M. Indirect defence via tritrophic interactions. **New Phytologist**, v.178, p.41-61, 2008.

HILDEBRAND, J.G. Analysis of chemical signals by nervous systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.92, p.67-74, 1995.

HOBALLAH, M.E.F.; TAMÓ, C.; TURLINGS, T.C.J. Differential attractiveness of induced odors emitted by eight maize varieties for the parasitoid *Cotesia marginiventris*: is quality or quantity important. **Journal of Chemical Ecology**, v.28, p.951–968, 2002.

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

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

JARRIAULT, D.; BARROZO, R.B.; PINTO, C.J. de C.; GREINER, B.; DUFOUR, M.C.; ROCA, I.M.; GRAMSBERGEN, J.B.; ANTON S.; GADENNE, C. Age-dependent plasticity of sex pheromone response in the moth, *Agrotis ipsilon*: combined effects of octopamine and juvenile hormone. **Hormones and Behavior**, v.56, p.185–191, 2009.

JHAM, G.N.; SILVA, A.A. da; LIMA, E.R.; VIANA, P. Identification (GC and GC-MS) of unsaturated acetates in *Elasmopalpus lignosellus* and their biological activity (GC-EAD and EAG). **Journal of Separation Science**, v.28, p. 281-285, 2005.

JHAM, G.N.; SILVA, A.A. da.; LIMA, E.R.; VIANA, P.A. Identification of acetates in *Elasmopalpus lignosellus* pheromone glands using a newly created mass spectral database and Kovats retention indices. **Química Nova**, v.30, p.916-919, 2007.

JOHNSON, S.J. The population dynamics and natural mortality of the lesser cornstalk borer, *Elasmopalpus lignosellus*, in the peanut agroecosystem and the biology of selected primary parasites. 1978. 123p. Tese (Doutorado) - A & M University, Texas.

JOHNSON, S.J.; SMITH, J.W. Jr. Biology of *Orgilus elasmopalpi* (Hym.: Braconidae) with *Elasmopalpus lignosellus* (Lep.: Pyralidae) as host. **Entomological Society of America**, v.73, p.572-575, 1980.

KALOSHIAN, I.; WALLING, L.L. Hemipterans as plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.43, p.491-521, 2005.

KARBAN, R.; BALDWIN, I.T, **Induced responses to herbivory**. University of Chicago, 1997. 319p.

KISHINO, K. Estudo da biologia e controle de *Elasmopalpus lignosellus* Zeller (Lepidoptera, Phycitidae) em região de cerrado. In: Relatório parcial do projeto da

cooperação em pesquisa agrícola nos cerrados do Brasil. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 1978-1980. Planaltina, **Embrapa/CPAC Cerrados – Japan International Cooperation Agency – JICA**, 1981. p. 45-81.

KÖLLNER, T.G.; HELD, M.; LENK, C.; HILTPOLD, I.; TURLINGS T.C.J.; GERSHENZON, J.; DEGENHARDT, J.A. Maize (*E*)- β -caryophyllene synthase implicated in indirect defense responses against herbivores is not expressed in most American maize varieties. **The Plant Cell**, v.20, p.482-494, 2008.

LEI, H.; VICKERS, N. Central processing of natural odor mixtures in insects. **Journal of Chemical Ecology**, v.34, p.915-917, 2008.

LIMA, E.R.; DELLA LUCIA, T.M.C. Biodinâmica dos feromônios. In: VILELA, E.F.; DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed.). **Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 13-25.

LIN, C.; SHEN, B.; XU, Z.; KÖLLNER, T.G.; DEGENHARDT, J.; DOONER, H. Characterization of monoterpene synthase gene tps 26; the ortholog of a gene induced by insect herbivory in maize. **Plant Physiology**, v.146, p.940-951, 2008.

LOUGHRIN, J.H.; MANUKIAN, A.; HEATH, R.R.; TURLINGS, T.C.J.; TUMLINSON, J.H. Diurnal cycle of emission of induced volatile terpenoids herbivore-injured cotton plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.91, p.11836–11840, 1994.

LYNCH, R.E.; KLUN J.A.; LEONHARDT, B.A.; SCHWARZ, M.; GARNER, J.W. Female sex pheromone of the lesser cornstalk borer, *Elasmopalpus lignosellus* (Lepidoptera: Pyralidae). **Environmental Entomology**, v.13, p.121-126, 1984.

MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.O.M.; CARNEIRO, N.P.; PAIVA, E. **Fisiologia do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2002. 23p. (EMBRAPA-CNPMS. Circular Técnica, 22).

MANSON, L.J.; JOHNSON, S.J. Age dependent calling of the female soybean loopers (Lepidoptera : Noctuidae). **Florida Entomologist**, v.72, p.327-336, 1989.

MARTIN, P.B.; SUBER, E.F. Population dynamics and management of the lesser cornstalk borer in small grain systems. In: Tippins, H.H. (Ed.). **A Review of information on the Lesser cornstalk borer *Elasmopalpus lignosellus***. Athens: University of Georgia. (Special Publication, 17). 1982. p.21-32.

McNEIL, J.N. Behavioral ecology of pheromone-mediated communication in moths and its importance in the use of pheromone traps. **Annual Review of Entomology**, v.36, p.407-30, 1991.

MOAR, W.J.; PUSZTAI-CAREY, M.; MACK, T.P. Toxicity of purified proteins and the HD-1 strain from *Bacillus thuringiensis* against Lesser Cornstalk Borer (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**, v.88, p.606-609, 1995.

MORAES, M.C.B.; LAUMANN, R.A.; PAREJA, M.; SERENO, F.T.P.S.; MICHEREFF, F.F.; BIRKETT, M.A.; PICKETT, J.A.; BORGES, M. Attraction of the stink bug egg parasitoid *Telenomus podisi* to defence signals from soybean activated by treatment with *cis*-jasmone. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.131, p.178-188, 2009.

MORAES, M.C.B.; LAUMANN, R.A.; PIRES, C.S.S.; SUJII, E.R.; BORGES, M. 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**, v.115, p.227-237, 2005.

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

NORIN, T. Pheromones and kairomones for control of pest insects. Some current results from a Swedish research program. **Pure and Applied Chemistry**, v.73, p.607–612, 2001.

PARON, M.R.; QUINTELA, E.D. Parasitismo de *Trichogramma pretiosum* sobre ovos de *Elasmopalpus lignosellus* em arroz. In: CONGRESSO DA CADEIA PRODUTIVA DE ARROZ, REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE ARROZ, 2002. **Anais**. p.493-495. (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 134).

PAYNE, T.L.; SMITH Jr, J.W. A sex pheromone in the lesser cornstalk borer.

Environmental

Entomology, v.4, p.355-356, 1975.

PICKETT, J.A.; BRUCE, T.J.A.; CHAMBERLAIN, K.; HASSANALI, A.; KHAN, Z.R.; MATTHES, M.C.; NAPIER, J.A.; SMART, L.E.; WADHAMS, L.J.; WOODCOCK, C.M. Plant volatiles yielding new ways to exploit plant defence. In: DICKE, M.; TAKKEN, W. (Ed.). **Chemical Ecology: from gene to ecosystem**. Wageningen: Springer, 2006. p.161-173.

PICKETT, J.A.; BIRKETT, M.A.; BLASSIOLI MORAES, M.C.; BRUCE, T.J.A.; CHAMBERLAIN, K.; GORDON WEEKS, R.; MATTHES, M.C.; NAPIER, J.A.; SMART, L.E.; WADHAMS, L.J. & WOODCOCK, C.M. *cis*-jasmone as allelopathic agent in inducing plant defence. **Allelopathy Journal**, v.19, p.109-118, 2007.

PINTO, A.S.; PARRA, J.R.P.; OLIVEIRA, H.N. **Guia ilustrado de pragas e insetos benéficos do milho e sorgo**. Ribeirão Preto. Livraria PLD, 2004. 108p.

PIPERNO, D.R.; FLANNERY, K.V. The earliest archaeological maize (*Zea mays* L.) from highland Mexico: New accelerator mass spectrometry dates and their implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, p.2101-2103, 2001.

PIRES, C.S.S.; VILELA, E.F.; VIANA, P.A. Comportamento de fêmeas de *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) associado à liberação de feromônio sexual. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.23, p.1-12, 1994.

PIRES, C.S.S.; VILELA, E.F.; VIANA, P.A.; FERREIRA, J.T.B. Avaliação no campo do feromônio sexual sintético de *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.21, p.59-68, 1992.

PRICE, P.W. **Insect ecology**. New York: John Wiley & Sons, 1997. 874p.

PRICE, P.W.; 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**, v.11, p.41-65, 1980.

RAFAELI, A.; JURENKA, R.A.P.B. An regulation of pheromone biosynthesis in female moths. In: Blomquist GL, Vogt RG (Ed.). **Insect pheromone biochemistry and molecular biology**. Oxford: Elsevier Academic Press, 2003. p.107-136.

RAINA, A.K. Neuroendocrine control of sex pheromone biosynthesis in Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, v.38, p.329-349, 1993.

RAINA, A.K. Control of pheromone production in moths. In: **Insect pheromone research: new direction**. CARDÉ, R.T.; MINKS, A.K. (Ed.). United States of America: Chapman & Hall. 1996. p.21-30.

RASMANN, S.; TURLINGS, T.C.J. First insights into specificity of belowground tritrophic interactions. **Oikos**, v.117, p.362-369, 2008.

RICHETTI, A.; MORAES G.C.; ÁVILA C.J. Perfil do produtor e manejo de pragas na Microrregião Dourados. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2009. 23 p. (Embrapa Agropecuária Oeste. **Documentos 102**).

ROELOFS, W.L. Chemistry of sex attraction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.92, p.44-49, 1995.

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

ROSTÁS, M.; TURLINGS, T.C.J. Induction of systemic acquired resistance in *Zea mays* also enhances the plant's attractiveness to parasitoids. **Biological Control**, v.46, p.178-186, 2008.

SANTANGELO, E.M.; CORACINI, M.; WITZGALL, P.; CORREA, A.G.; UNELIUS, C.R. Identification, Syntheses, and Characterization of the Geometric

Isomers of 9,11-Hexadecadienal from Female Pheromone Glands of the Sugar Cane Borer *Diatraea saccharalis*. **Journal of Natural Products**, v.65, p. 909-915, 2002.

SAUER, H.F.G. Notas sobre *Elasmopalpus lignosellus* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae.), séria praga dos cereais no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.10, p.199-206, 1939.

SCHNEE, C.; KÖLLNER, T.G.; HELD, M.; TURLINGS, T.C.J.; GERSHENZON, J.; DEGENHARDT, J. The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, p.1129-1134, 2006.

SILVA, A.A. da. **Identificação de acetatos monoinsaturados candidatos a feromônio sexual de *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae)**. 2001. 97p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SILVA, M.T.B. da; GRUTZMACHER, A.D.; RUEDELL, J.; LINK, D.; COSTA, E.C. Influência de sistemas de manejo de solos e de culturas sobre insetos subterrâneos. **Ciência Rural**, v.24, p.247-251, 1994.

SULEIMAN, K. Pragas iniciais da soja: Os cuidados devem começar antes da semeadura. novembro/2010. Artigo em Hypertexto. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2010_3/PragasSoja/index.htm. Acesso em: 17/11/2010.

STONE, K.J. Reproductive biology of the Lesser Cornstalk Borer. I Rearing Technique. **Journal of Economic Entomology**, v.61, p.1712-1714, 1968.

TAKKEN, W.; DICKE, M. Chemical ecology: a multidisciplinary approach. In: **Chemical Ecology: From Gene to Ecosystem**. DICKE, M.; TAKKEN, W. (Ed.). The Netherlands: Springer. 2006. p. 20–21.

TIPPINS, H. H. (ed.). **A review of information on the Lesser Cornstalk Borer, *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller)**. Athens: University of Georgia. (Special Publication, 17). 1982. 64p.

TURLINGS, T.C.J.; ALBORN, H.T.; LOUGHRIN, J.H.; TUMLINSON, J.H. Volicitin, an elicitor of maize volatiles in oral secretion of *Spodoptera exigua*: isolation and bioactivity. **Journal of Chemical Ecology**, v.26, p.189-202, 2000.

TURLINGS, T.C.J.; JEANBOURQUIN, P.M.; HELD, M.; DEGEN, T. Evaluating the induced-odour emission of a Bt maize and its attractiveness to parasitic wasps. **Transgenic Research**, v.14, p.807-816, 2005.

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

TURLINGS, T.C.J.; TON, J. Exploiting scents of distress: the prospect of manipulating herbivore-induced plant odours to enhance the control of agricultural pests. **Current Opinion in Plant Biology**, v.9, p.421-427, 2006.

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

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

VIANA, P.A.; COSTA E.F. da. Manejo da lagarta elasma, *Elasmopalpus lignosellus*, na cultura do milho, através da umidade do solo. In: **RELATÓRIO TÉCNICO ANUAL DO CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE MILHO E SORGO 1988-1991**. Embrapa Milho e Sorgo, 1992. v.5, 59p.

VIANA, P.A.; Lagarta-elasma. In: SALVADORI, J.R.; ÁVILA, C.J.; SILVA, M.T.B. da. (Ed.). **Pragas de solo no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo; Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz Alta: Fundacep Fecotrigo, 2004. p.379-408.

VIEIRA, C.R. **Ecologia química de insetos parasitóides de ovos (Hymenoptera: Scelionidae) e sua aplicação no controle de pragas**. 2010. 71p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília.

VILELA, E.F.; DELLA LUCIA, T.M.C. Introdução aos semioquímicos e terminologia. In: VILELA, E.F.; DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed.). **Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p.9-12.

VILELA, E.F.; PALLINI, A. Uso dos semioquímicos no controle biológico de pragas. In: PARRA, J.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil**. São Paulo: Malone, 2002. p.529-542.

VILELLA, F.M.F.; WAQUIL, J.M.; VILELA, E.F.; VIANA, P.A.; LYNCH, R.E.; FOSTER, J.E. Resistance of Bt transgenic maize to lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Pyralidae). **Florida Entomologist**, v.85, p.652-653, 2002.

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

WEBSTER, R.P.; CARDE, R.T. Influence of relative humidity on calling behaviour of the female European corn borer (*Ostrinia nubilalis*). **Entomologia Experimentalis et Applicata**. v.32, p.181-185, 1982.

WEDELL, N. Female receptivity in butterflies and moths. **The Journal of Experimental Biology**, v.208, p.3433-3440, 2005.

YAN, ZENG-GUANG.; WANG, CHEN-ZHU. Similar attractiveness of maize volatiles induced by *Helicoverpa armigera* and *Pseudaletia separata* to the generalist parasitoid *Campoletis chloridae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.118, p.87-96, 2006.

CAPÍTULO 1

Indirect defense induced by lesser cornstalk borer, *Elasmopalpus lignosellus* on maize and its effect on *Trichogramma pretiosum*.

Abstract - *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera: Pyralidae) is an important pest of maize in North, Central, and South America. Plants damaged by herbivory can release a different blend of volatiles which can act on the foraging behavior of natural enemies. In this work the tritrophic system: maize, *E. lignosellus* and *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) was evaluated with the aim of identifying whether the feeding behavior of *E. lignosellus* larvae induces the indirect defense of maize plants and also if the herbivory induced plant volatiles are used as cues by the *T. pretiosum* to find their host. The herbivory induced plants' volatiles attract *T. pretiosum*, in olfactometer studies. The chemical profile obtained after 24h of volatile collection from undamaged, herbivory and mechanically damaged plants was different. The multivariate statistical analysis (Principal Response Curve analysis (PRC)) did not detect differences between the total blend of volatiles profile released in the treatment undamaged and herbivory damaged maize plants over the time. However, when assessed individually, the compounds (*Z*)-3-hexenyl acetate, benzothiazole and terpenes, β -pinene, β -myrcene and (*E*)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene were released in higher quantities by herbivory damaged plants when compared to undamaged plants. The results obtained show that the maize plants are induced by the feeding behaviour of *E. lignosellus* larvae and that herbivory induced plant volatiles are used as cues by the *T. pretiosum* to find their host.

Index terms: Egg parasitoid, tritrophic interactions and volatile organic compounds.

Defesa indireta induzida pela broca-do-colmo *Elasmopalpus lignosellus* em milho e seus efeitos em *Trichogramma pretiosum*.

Resumo - *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera: Pyralidae) é uma importante espécie-praga do milho na América do Sul, Central e do Norte. Plantas danificadas por herbivoria podem liberar uma mistura diferente de voláteis que podem atuar no comportamento de forrageamento de inimigos naturais. Neste trabalho o sistema tritrófico: milho, *E. lignosellus* e *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) foram avaliados com objetivo de identificar se o comportamento alimentar da lagarta *E. lignosellus* induz a defesa indireta de plantas de milho e também se os voláteis induzidos pela herbivoria são usados como pistas pelo *T. pretiosum* para encontrar seu hospedeiro. Plantas danificadas por herbivoria atraíram *T. pretiosum*. O perfil químico obtido após 24h de coleta de voláteis em planta sem dano, danificada por herbivoria e dano mecânico foi significativamente diferente. A análise multivariada (análise de resposta da curva principal (PRC)) não detectou diferenças entre a mistura total do perfil de voláteis liberados nos tratamentos plantas com dano de herbivoria e sem dano, sob o tempo. No entanto, quando analisados individualmente, os compostos (Z)-3-acetato de hexenila, benzotiazol e os terpenos, β -pineno, β -mirceno e (E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno foram liberados em altas quantidades em plantas danificadas por herbivoria quando comparadas a plantas sem dano. Os resultados obtidos indicam que plantas de milho são induzidas, pelo comportamento alimentar da lagarta *E. lignosellus*, a produzir compostos voláteis. Estes, são usados como pista pelo *T. pretiosum* para encontrar seu hospedeiro.

Termo para indexação: Parasitóide de ovos, interação tritrófica e compostos orgânicos voláteis.

Introduction

To reduce pesticide inputs in agroecosystems, methodologies using semiochemicals have been proposed for incorporation into integrated pest management strategies (Howse et al., 1998). South American countries, and in particular Brazil, are among the largest producers of grain in the world. However, the use of semiochemicals in pest management is still underdeveloped, and there is little knowledge about semiochemically-mediated interactions in local agroecosystems (D'Alessandro & Turlings, 2006).

The lesser cornstalk borer (LCB), *Elasmopalpus lignosellus* Zeller, 1848) (Lepidoptera: Pyralidae) is an important insect-pest of maize in North, Central, and South America, and it has been reported to attack at least 60 species of plants (Stone, 1968; Viana, 2004). The larvae of *E. lignosellus* attack plants from germination to approximately thirty days after planting, boring into the main stem and producing a tunnel upward (Dupree, 1965; Kishino, 1981; Viana, 2004), which results in the death of the host when the attack occurs before tilling (Sauer, 1939).

Different studies have been conducted to try to find alternatives to insecticides, and the use of the sex pheromone produced by *E. lignosellus* females showed good results in its monitoring in United States. Lynch et al. (1984) identified the female sex pheromone of LCB from North American population (USA). However, field tests of this mixture failed to attract LCB males in Brazil (Pires et al., 1992). Studies to identify a sex pheromone blend from Brazilian populations were carried out for two different populations, and both presented differences in their pheromone blends, but field studies did not show behavioral response with any of

these new blends (Jham et al., 2005, 2007). Another alternative could be the semiochemicals from plants to attract natural enemies.

Plant volatiles in association with natural enemies can be an excellent tool to be used in the integrated management of pest (Vet & Dicke, 1992; Moraes et al., 2005, 2008, 2009). Parasitoids and predators are capable of distinguishing complex mixtures of odors that indicate the presence or not of their potential host/prey (Vet & Dicke, 1992). Herbivory induced plant volatiles (HIPVs) have been reported from a wide range of tritrophic systems, on different crops such as maize, cotton, lima beans, broad beans, cultivated tobacco and soybean (Moraes et al., 2005, 2008; Heil & Ton, 2008). HIPVs can vary quantitatively and qualitatively, depending mainly on plant traits that vary among species or genotypes and between different herbivore species causing damage (Rasmann & Turlings, 2008).

Despite of the potential of HIPVs for management of natural enemies in crops, the mode of action of these compounds on parasitoids is not clear (D'Alessandro et al., 2009). To use HIPVs in crop protection requires not only a need for more detail of their biosynthesis and timing release, but also the perception and exploitation of these chemical signals by the natural enemy (D'Alessandro & Turlings, 2006).

This goal of this work was to study the chemical ecology interaction between maize plants, *E. lignosellus* and the egg parasitoid *T. pretiosum*. The main objectives were: to evaluate if *E. lignosellus* herbivory induces the indirect defense of maize plants and also if the herbivory induced plant volatiles could be used as cue by the egg parasitoid *T. pretiosum* when foraging for hosts.

To reach the goal, the following questions were addressed: 1) Do the maize plant volatiles induced after *E. lignosellus* herbivory lead to a different

attractiveness to the egg parasitoid *T. pretiosum*? 2) Does *E. lignosellus* herbivory activate indirect chemical defense in maize plants? and 3) If so, which blends of compounds are induced by *E. lignosellus* herbivory.

Methods and Material

Plant and insects

Maize (*Zea mays*, var. BR-106) seeds were obtained from the Embrapa Maize and Sorghum in Sete Lagoas, Minas Gerais State, Brazil. The seeds were germinated in pots with sterilized soil and kept in a growth chamber, at $26 \pm 1^\circ\text{C}$ and 80% r.h. The plants were used in experiments after they developed two completely expanded leaves (17 to 22 cm height).

Elasmopalpus lignosellus were reared in a laboratory colony at Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, Brazil ($15^\circ47'$ S, $47^\circ55'$ W), originated from individuals collected in sugar-cane fields in Viçosa, MG, Brazil ($20^\circ45'$ S, $42^\circ52'$ W). The larvae were fed on an artificial diet (Chalfant, 1975), modified by Viana (1993) (see composition of the diet in Annex I), and maintained in rearing chambers at $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and $20 \pm 10\%$ r.h. with a photoperiod of L12:D12.

A *Trichogramma pretiosum* colony was started from individuals obtained from a mass rearing colony from Embrapa Rice and Beans, in Santo Antonio de Goiás (GO), Brazil. The parasitoids were maintained at Embrapa Genetic Resources and Biotechnology Laboratory (Brasilia, DF, Brazil) in plastic cages (7.5 x 1.3 cm) under a L14:D10 photoperiod at $26.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$ and $65 \pm 10\%$ r.h. Droplets of pure bee honey were supplied as food source for the adults. To obtain parasitoids for bioassays, eggs of *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae)

were exposed to parasitoid females for 24h. The parasitized eggs were removed and placed in plastic cages (7.5 x 1.3 cm), until the full development of the parasitoids, under the same conditions as previously described. Only naïve females (24-48 h in adult stage) were used in bioassays.

Preparation of plants for experiments

To evaluate if *E. lignosellus* feeding damage induces the indirect defense of maize plants the following treatments were used: (i) herbivory: one *E. lignosellus* larvae (third instar) was placed on each maize plant, (ii) mechanical damage: maize plants were damaged manually to mimic the damage caused by the *E. lignosellus* larvae. For artificial damage, each leaf was scraped with a needle of a syringe creating a 1 cm long slit. A hole (1cm) was also made at the base of the stem with a needle, and (iii) undamaged plants: plants without any damage.

Olfactometer bioassays

Bioassays were performed to evaluate if changes in the volatile profile of maize submitted to different treatments might modify the foraging behavior of the egg parasitoid *T. pretiosum*. Plants with one larva of *E. lignosellus* (third instar) were placed inside of a transparent micropore plastic bag (bread bags) and allowed to be fed on for 24, 48, 72 or 96 h before being used for the bioassays. Undamaged and mechanically damaged plants were kept in the same conditions, but in different rooms to avoid chemical signalling.

An acrylic block with a Y-shaped cavity (19 x 19 cm) with 1 cm thickness sandwiched between two glasses plates was used as bioassay arena (Moraes et al., 2005). The trunk of the Y-shaped of the apparatus measured 8 cm and each arm measured 7 cm. Herbivory damaged and undamaged plants were placed in glass chambers that were connected to the arms of the olfactometer via silicon tubing.

Filtered (activated charcoal) humidified air was passed through the system at 0.6 l/min to pull the air and 0.8 l/min to push, in a push-pull system. The olfactometer was illuminated from above by two fluorescent lamps (40 W, Sylvania). A single *T. pretiosum* female was introduced at the base of the Y-tube and observed for 10 minutes. It was considered a first choice when the insect entered in an arm of the olfactometer and remain at least 20 seconds. Each parasitoid was used only once and the plant was used in five bioassays, and then replaced. The position of the olfactometer was changed for each bioassay in order to avoid any bias in the parasitoid response. Bioassays were carried out to test the response of *T. pretiosum* to herbivore damaged against undamaged maize. For the herbivory bioassays plants were tested 24, 48, 72 and 96 h after the start of the damage.

Volatile collections

Maize plants of the different treatments were placed individually in cylindrical glass chambers (internal volume 10 L). In order, to minimize the contamination with volatiles from the soil the pots were wrapped in aluminium foil.

A glass tube containing the adsorbent Super Q (100 mg, 80-100mesh, Alltech PA, USA) was connected via a PTFE tube to a vacuum bomb at a flow of 0.6 l/min and the air entrance was connected to a flow of air filtered with activated charcoal (1 l/min) creating a positive push-pull system. The volatiles were collected every 24 h, during four consecutive days for undamaged and herbivore damaged plants. For the mechanically damaged plants, described above, the volatiles were collected only during the first 24 hours. It has been shown that maize induction by mechanical damage occurs at the moment and/or few seconds after the wound (Heil, 2008). The trapped volatiles were eluted from the adsorbent using 500 µl *n*-hexane

and pre-concentrated to 100 μl under a N_2 filtered flow. Extracts were stored at 20°C until used for GC and GC-MS.

Chemical Analyses

The extracts obtained by air-entrainment were analysed by gas chromatography for quantification of the components (Shimadzu 17A, DB-5 column, 30 m X 0.25 mm ID, 0.25 μm film, J&W Scientific, Folsom, CA, USA), using a temperature program of $50^\circ\text{C}/1$ min, $15^\circ\text{C}/\text{min}$ to $250^\circ\text{C}/20$ min. One microliter of each sample was injected using splitless mode with helium as carrier gas. The column effluent was analyzed with a flame ionization detector (FID) at 270°C . For the GC analysis an aliquot of each extract was separated (50 μl) and 1 μl of 16-hexadecanolide was added as the internal standard (IS), for a final concentration of 19.6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Amounts released by the plant in each 24 h period were calculated in relation to the area of the internal standard. Data were collected with Class-GC software (Shimadzu, Japan) and were handled using Excel (Microsoft Corporation, 2003).

Because linalool co-eluted with the hydrocarbon undecane its quantification was carried out by single ion monitoring in GC-MS Shimadzu QP2010 instrument equipped with a quadrupole analyser, a non polar DB-5 column (30m X 0.25 μm film; J&W Scientific) and a splitless injector (250°C) with helium as the carrier gas. Ionization was made by electron impact (70eV, source temperature 200°C). Five selected samples of each treatment were injected in triplicate monitoring of the ions m/z 93, 136 and 154, and a calibration curve was constructed using five concentration levels (6.25, 12.5, 25.0, 50.0 and 125.0 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$), replicated three times for the quantification.

For qualitative analysis, selected extracts were analysed using a Shimadzu QP2010 instrument equipped with a quadrupole analyser, a non polar DB-5 column (30m X 0.25 μ m film; J&W Scientific) and a splitless injector (250°C) with helium as the carrier gas. Ionization was by electron impact (70eV, source temperature 200°C). Data were collected using the GC-MS Solutions 2.4 Software (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Identifications were carried out by comparison of spectra with library databases (NIST, 2005) and confirmed using authentic standards. The compounds cyclosativene and (*E*)- α -bergamotene were identified only by the comparison with the database and Kováts index, because the authentic standards were not available.

Chemicals

Super Q (80/100 mesh) was purchased from Alltech (StateCollege, PA, USA). Hexane (95% pesticide residue) was purchased from Fisher Scientific (Loughborough, Leicestershire, UK) and redistilled before use. 6-Methyl-5- hepten-2-one, α -pinene (98%) and β -pinene (99%) were purchased from Sigma Aldrich (Gillingham, Dorset, UK), (*Z*)-3-hexenyl acetate from Alfa Aesar (Heysham, UK). Benzothiazole, β -myrcene and geranyl acetone from Sigma Aldrich Steinheim, Germany. Limonene, linalool, β -caryophyllene were purchased from TCI America, Portland, EUA. (*E*)-4,8-dimethylnona-1,3,7-triene (DMNT) and (*E,E*)-4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene (TMTT) were donated by Dr. Michael Birkett.

Feeding behavior of *E. lignosellus* larvae on maize plants

To evaluate the feeding behaviour of *E. lignosellus* larvae, forty maize plants were observed. The seeds were germinated in conical plastic pots (2.5cm x 12.5cm) with sterilized soil and kept in growth chamber, at $26 \pm 1^\circ$ C and 80 % r.h. The plants were used in experiments at 17 to 22 cm height and with two complete

expanded leaves (17 days after germination), individualized in acrylic Petri dishes (15cm x 1cm). The larvae used in this experiment were kept for 24 h without food; therefore all larvae were in the same starving condition at the beginning of the experiment and in a similar way that was done for the experiments conducted to evaluate the herbivory damage on maize plants. One of the leaves of each plant was placed inside the Petri dish and offered to one larva of *E. lignosellus* (third instar). The evaluation of food consumption was carried out during four consecutive days. In the Petri dish when the first leaf was completely consumed, the second leaf was offered to the larvae to keep monitoring their feeding behavior along the four days.

Statistical analysis

The choices made by the parasitoid in the bioassays were analyzed by logistic regression (logit of the proportion of response to each treatment) and estimation of the probability of choosing the test odor (analyses in software R (R statistical Development Core Team, 2010)). The model which fit contained a factor for the side (left or right) on which the test odor was presented to control for this variability. The χ^2 test was used to test of hypothesis of no preference (50% first choice to each odor).

All the following analyses were carried out using software R (R statistical Development Core Team, 2010). The total amount of volatiles emitted by the undamaged and herbivory damaged plants was analyzed using a GLM (generalized linear models) with gamma distribution, followed by comparison of means for contrast methods. To build this statistical model, the response variable was the total amount of emitted volatiles collected for 24 h during four consecutive days as described above. The volatiles released by maize plants mechanically damaged was evaluated only on the first 24 hours and compared with the volatiles emitted by the

undamaged and herbivory damaged maize plants after 24 hours of aeration. For this, a multivariate analysis of variance (MANOVA) was applied and each compound was incorporated as a variable and treatment as a factor. To determine the contribution of each compound to the different treatments a canonical variate discriminant analysis (CVA) was carried out.

The Principal Response Curve analysis (PRC) was used to evaluate the importance of the total blend of volatiles profile in the treatment undamaged and herbivory damaged maize plants over time (for 24 h during four days consecutives). The model of PRC is described as $y_{d(j)tk} = y_{0k} + b_k c_{dt} + \varepsilon_{d(j)tk}$, where $[y_{d(j)tk}]$ is the concentration of the compound k at time t in sample j of treatment d , $[y_{0k}]$ is the mean concentration of the compound k in control (undamaged plant) at time t , $[c_{dt}]$ is principal response of treatment d at time t , $[b_k]$ is the weight of each compound with respect to principal response of each treatment and $[\varepsilon_{d(j)tk}]$ is an error term with mean of zero and variance σ_k^2 . The value b_k gave information about the importance of each compound to the pattern of the curve obtained, higher values of -0.5 and +0.5 means that the compound has a higher influence, compounds with b_k close to zero means that these compounds did not influence the change of the curve (Van den Brink & Ter Braak, 1999; Moser et al., 2007).

The quantitative analysis of compounds released in the treatments undamaged and herbivory damaged maize plants were performed using a GLM as described above.

Results and Discussion

In Y-tube olfactometer bioassays, *T. pretiosum* did not show a preference towards odors of mechanical damaged plants when compared to undamaged and did

not show a difference towards undamaged plants vs air (Figure 1A). In the other treatment combinations, *T. pretiosum* showed a preference for odors of herbivore damaged plants when compared to undamaged plants at 24h ($\chi^2=4.27$, $P=0.04$) and 72 h ($\chi^2=4.27$, $P=0.04$) after herbivore damage (Figure 1B).

When compared, the undamaged plants the quantities of volatiles released were significantly different at 72 h ($P\leq 0.05$) and when the herbivore damaged plants were compared the volatiles released also were different at 24 and 72h ($P= 0.04$) (Figure 2A). However, there was no difference in the total amount of volatiles released between undamaged and herbivore damaged plants when compared every 24 hours (Figure 2B).

Twenty seven volatile organic compounds (VOCs) were identified from the extracts obtained from maize volatile collections (Figure 3 - Table 1). This chemical profile showed several compounds common to other varieties of maize [var. Iona and LG 11 (Turlings et al., 2000); var. Delprim (Schmelz et al., 2003); maize hybrids Novartis N4640Bt, yield-gard, Cry1Ab, event Bt11 and its non Bt isogenic equivalent N4640 (Turlings et al., 2005); var Delprim (D'Alessandro et al., 2006); var. Roya dent (Ozawa et al., 2008)], such as green leaf volatile (*Z*)-3-hexenyl acetate, the terpenes α and β -pinenes, camphene, β -myrcene, linalool, (*E*)-4-8-dimethyl-1,3,7-nonatriene (DMNT), (*E*)- α -bergamotene, (*E*)- β -farnesene, geranyl acetone, β -caryophyllene and (*E,E*)-4,8,12-trimethyl-1,3,7,11-tridecatetraene (TMTT).

Comparisons of GC-MS analysis of the extracts obtained from undamaged, mechanically and herbivore damaged plants did not show qualitative differences. However, significant differences were observed on the quantitative analysis. In the first 24 hours comparing undamaged plants with mechanically and herbivore

damaged plants, the MANOVA separated the three treatments and the statistical analysis was significant ($F_{2,17}=5.55$, $P = 0.05$, Pillai's trace=1.96) (Figure 4). The PRC analysis of the plant volatiles did not show difference when comparing undamaged and herbivore damaged plants (Figure 5).

The quantitative analysis of these compounds, using a GLM, showed that β -pinene was released in higher quantities from 24h herbivore damaged plants ($P= 0.02$), β -myrcene and benzothiazole was produced in higher quantities from 72h herbivore damaged plants ($P= 0.05$), (Z)-3-hexenyl acetate was released in higher quantity by herbivore damaged plants at 24h ($P= 0.03$) and 96h ($P= 0.03$) and DMNT was produced in higher quantities at 24h ($P= 0.01$), 48h ($P= 0.03$) and 96h ($P= 0.02$), after herbivore damage of *E. lignosellus* (Figure 6).

In the experiments to evaluate the feeding behavior of *E. lignosellus* larvae it was observed that all larvae ($n= 40$) fed during the four days. However, only four larvae (10%) fed consecutively during the four days. The other larvae did not show a pattern in their feeding behavior, feeding in intervals of 24 to 72h. Fifty seven percent of these larvae fed in the first day, 39% in the second day, 83% in third day and 53% in the fourth day. These results show clearly that *E. lignosellus* did not feed continuously in maize plants.

The feeding damage provoked by *E. lignosellus* did not change qualitatively the chemical profile of volatiles from maize when compared to undamaged and mechanically damaged plants at 24 h and to undamaged during the other times evaluated, but the canonical analysis showed that the relative quantities of the compounds in the blends varied between these treatments. However, *T. pretiosum* did not discriminate the volatiles of mechanically damaged from undamaged plants.

On the other hand the parasitoid was able to discriminate herbivore damaged plants from undamaged plants

The PRC analysis failed to show a significant difference between herbivore damaged and undamaged plant. However, when the total amount of volatiles released by herbivore damaged plants were compared each 24h, the chemical profile showed differences at 24 and 72h and in the feeding behavior experiment, a higher number of insects feeding was observed these period. In addition, the canonical analysis showed that the chemical profile released by herbivore, mechanically damaged and undamaged maize plants after 24 hours was different. These results suggest that the treatments have a higher influence on the chemical profile of the plants better than the duration of the treatments. And this was corroborated by the individual analysis of the compounds, using GLM, which showed important differences. The green leaf volatiles (*Z*)-3-hexenyl acetate, benzothiazole and the terpenes β -pinene, β -myrcene and DMNT differed significantly when herbivore damage and undamaged plants were compared.

The results obtained in the feeding behavior experiment suggest that the herbivory provoked by third instar larvae does not induce the plants continuously, and probably the plants only respond when the saliva of the larvae is in contact with the plant, suggesting that if there is an inductor present in saliva, its effect does not last for a long time, i.e., that is no longer than 24h.

The chemical profile obtained in this study was very similar to other cultivars of maize. The VOCs identified in maize are common to many plant species (Moraes et al., 2009; van den Boom et al., 2004; Bruce et al., 2008), which included the green leaf volatiles, terpenoids and aromatic compound derivatives from shikimate pathway. The variability of VOCs in maize has been demonstrated to be

highly dependent on the stage and the cultivar used (Kollner, 2004; Turlings et al., 1998, 2000) and can be related to the genetic variability in these plants (Gouinguéné et al., 2001; Fritzsche-Hoballah et al., 2002; Degen et al., 2004) or to specific elicitors from oral secretion of herbivore insects (Turlings et al., 2000). Turlings et al. (1998), for example, reported indole as one of the main compounds in *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae)-induced maize volatiles, but this compound was not identified in cultivar studied here.

Studies carried out with Lepidoptera have registered that the herbivory induced plant volatiles is mainly composed of monoterpenes, sesquiterpenes, green leaf volatiles and aromatic products from shikimate pathway, (Rose & Tumlinson, 2004; De Moraes et al., 1998; Kessler & Baldwin, 2001; Kaloshian & Walling, 2005). Homoterpenes, such as DMNT has been induced by herbivory damage in several systems that include different species of plants and lepidopteran, such as, maize and *Spodoptera* spp (Turlings et al., 2000, 2005; Schmelz et al., 2003; Rostás & Turlings, 2008), maize and *Helicoverpa* spp. (Noctuidae), *Trichoplusia ni* (Hübner, 1803) (Noctuidae), *A. gemmatalis* (Turlings et al., 1993), *Pseudaletia separate* Walker, 1865 (Noctuidae) (Yan & Wang, 2006) and the HIPVs have been assessed in several of their larval endoparasitoids (Turlings et al., 2000; Gouinguéné et al., 2003).

E. lignosellus larvae in maize appear to induce mainly the isoprenoid pathway responsible for the biosynthesis of terpenes volatiles. The response of *T. pretiosum* to a blend of volatiles from the isoprenoid pathway might suggest that the parasitoids use these compounds as long range cues for searching for their hosts, since these compounds are more stable than green leaf volatiles, and plants start to emit them only after 24 h of the damaged being started (Paré & Tumlinson, 1997,

Arimura et al. 2004). The response of *T. pretiosum*, a poliphagous egg parasitoid, to a blend of volatiles from the isoprenoid pathway can suggest that the long range searching behavior of the parasitoid can be influenced by volatiles of a common metabolic pathway related to herbivory and this is in concordance with the hypotheses of host search in parasitic insects that predicts that generalist parasitoids use non-specific cues, while specialist parasitoids use specific ones (Vet & Dicke, 1992; Meiners et al., 2000, Steidle & van Loon, 2003). In addition, the use of cues not being directly related to the host stage parasitized by *T. pretiosum* females is in concordance with the general behavior observed in egg parasitoids. Because their host may be hardly apparent (eggs), egg parasitoids must rely on semiochemical or others cues that are more detectable than those from the eggs, such as those from stages of the host that are not suitable for parasitism (adults or immature stages) or the host plants (Vet & Dicke, 1992; Vet et al., 1991; 1995; Vinson, 1998; Moraes et al., 2005; Fatouros et al., 2008, Moraes et al., 2008, Laumann et al. 2008, 2009; Pashalidou et al., 2010).

To use HIPVs as novel tools in crop protection it is not only necessary to have a detailed understanding of the biosynthesis and timing of VOCs release, but also to obtain an understanding of the mechanisms of perception and exploitation of these chemical signals by natural enemies (D'Alessandro et al., 2006). Determining the relative importance of individual compounds or group of compounds to a specific parasitoid is possibly one of the major and most difficult questions yet to be answered (D'Alessandro & Turlings, 2006; D'Alessandro et al., 2009). To reach this, it is necessary to continue to explore different statistical methods of analysis, deal with a more sensitive analytical methods, and also to develop new behavioral

bioassays, that may allow evaluation of the response to blends and ratios of the compounds with the chemical analysis in real time.

Our results suggest that *E. lignosellus* induce the indirect defences of maize probable compounds from isoprenoid pathway. These changes affect the behaviour of the parasitoid *T. pretiosum*, which may contribute to further laboratory studies to identify the importance of these compounds for the attraction of *T. pretiosum* and to understand this complex interaction in the context of VOCs.

Conclusions

1. The results indicate that *E. lignosellus* induces the indirect defences of maize;
2. Benzothiazole, green leaf volatile (*Z*)-3-hexenyl acetate and compounds of isoprenoid pathway was induced by *E. lignosellus* larvae after plants were herbivore damaged; and
3. The changes in volatiles released by herbivore damaged plants by *E. lignosellus* larvae affect the host searching behaviour of the parasitoid *T. pretiosum*.

Acknowledgments

We thank Dr. Paulo Viana (Embrapa Maize and Sorghum) and Dr. Alexandre Barrigossi (Embrapa Rice and Beans) for helping with field collection and laboratory rearing of the insects. We are grateful to Dr. Martin Pareja for comments that greatly improved the manuscript. This work received financial support from the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Distrito Federal Research Foundation (FAPDF), and Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

(EMBRAPA). This research was also supported by the International Foundation for Science, Stockholm, Sweden, through a grant to Dra. Maria C. B. Moraes.

References

ARIMURA, GEN-ICHIRO; HUBER, D.P.W.; BOHLMANN, J. Forest tent caterpillars (*Malacosoma disstria*) induce local and systemic diurnal emissions of terpenoid volatiles in hybrid poplar (*Populus trichocarpa x deltoides*): cDNA cloning, functional characterization, and patterns of gene expression of (2)-germacrene D synthase, *PtdTPS1*. **The Plant Journal**, v.37, p.603-616, 2004.

BRUCE, T.J.A.; MATTHES, M.C.; CHAMBERLAIN, K.; WOODCOCK, C.M.; MOHIB, A.; WEBSTER, B.; SMART, L.E.; BIRKETT, M.A.; PICKETT, J.A.; NAPIER, J.A. Cis-Jasmone induces Arabidopsis genes that affect the chemical ecology of multitrophic interactions with aphids and their parasitoids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.105, p.4553-4558, 2008.

CHALFANT, R.B. A simplified technique for rearing the lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Phycitidae). **Journal of the Georgia Entomological Society**, v.10, p.33-37, 1975.

D'ALESSANDRO, M.; BRUNER, V.; VON MÉREY, G.; TURLINGS, T.C.J. Strong attraction of the parasitoid *Cotesia marginiventris* towards minor volatile compounds of maize. **Journal of Chemical Ecology**, v.35, p.999-1008, 2009.

D'ALESSANDRO, M.; HELD, M.; TRIPONEZ, Y.; TURLINGS, T.C.J. The role of indole and other shikimic acid derived maize volatiles in the attraction of two parasitic wasps. **Journal of Chemical Ecology**, v.32, p.2733-2748, 2006.

D'ALESSANDRO, M.; TURLINGS, T.C.J. Advances and challenges in the identification of volatiles that mediate interactions among plants and arthropods. **The Analyst**, v.131, p.24-32, 2006.

DEGEN, T.; DILLMANN, C.; MARIOM-POLL, F.; TURLINGS, T.C.J. High genetic variability of herbivore-induced volatile emission within a broad range of maize inbred lines. **Plant Physiology**, v.135, p.1928-1938, 2004.

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

DUPREE, M. Observations on the life history of the lesser cornstalk borer. **Journal of Economic Entomology**, v.58, p.1156-1157, 1965.

FATOUROS, N.E.; DICKE, M.; MUMM, R.; MEINERS, T.; HILKER, M. Foraging behavior of egg parasitoids exploiting chemical information. **Behavioral Ecology**, v.19, p.677-689, 2008.

FRITZSCHE-HOBALLAH, M.E.; TAMÒ, C.; TURLINGS, T.C.J. Differential attractiveness of induced odors emitted by eight maize varieties for the parasitoid *Cotesia marginiventris*: Is quality or quantity important? **Journal of Chemical Ecology**, v.28, p.951-968, 2002.

GOUINGUENÉ, S.; ALBORN, H.; TURLINGS, T.C.J. Induction of volatile emissions in maize by different larval instars of *Spodoptera littoralis*. **Journal of Chemical Ecology**, v.29, p.145-162, 2003.

GOUINGUENÉ, S.; DEGEN, T.; TURLINGS, T.C.J. Variability in herbivore-induced odour emissions among maize cultivars and their wild ancestors (teosinte). **Chemoecology**, v.11, p.9-16, 2001.

HEIL, M. Indirect defence via tritrophic interactions. **New Phytologist**, v.178, p.41-61, 2008.

HEIL, M.; TON, J. Long distance signaling in plant defence. **Trends in Plant Science**, v.13, p.264-272, 2008.

HOWSE, P.; STEVENS, I.; JONES, O. **Insect pheromones and their use en pest management**. London: Chapman & Hall, 1998. 369p.

JHAM, G.N.; SILVA, A.A. da; LIMA, E.R.; VIANA, P. Identification (GC and GC-MS) of unsaturated acetates in *Elasmopalpus lignosellus* and their biological activity (GC-EAD and EAG). **Journal of Separation Science**, v.28, p. 281-285, 2005.

JHAM, G.N.; SILVA, A.A. da; LIMA, E.R.; VIANA, P.A. Identification of acetates in *Elasmopalpus lignosellus* pheromone glands using a newly created mass spectral database and Kovats retention indices. **Química Nova**, v.30, p.916-919, 2007.

KALOSHIAN, I.; WALLING, L.L. Hemipteran as plant pathogens. **Annual Review Phytopathology**, v.43, p.491-521, 2005.

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

KISHINO, K. Estudo da biologia e controle de *Elasmopalpus lignosellus* Zeller (Lepidoptera, Phycitidae) em região de cerrado. In: Relatório parcial do projeto da cooperação em pesquisa agrícola nos cerrados do Brasil. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 1978-1980. Planaltina, **Embrapa/CPAC Cerrados – Japan International Cooperation Agency – JICA**, 1981. p. 45-81.

KOLLNER, T.G.; SCHNEE, C.; GERSHENZON, J.; DEGENHARDT, J. The sesquiterpenes hydrocarbons of maize (*Zea mays*) form five groups with distinct developmental and organ-specific distributions. **Phytochemistry**, v.65, p.1895-1902, 2004.

LAUMANN, R.A.; MORAES, M.C.B.; PAREJA, M.; ALARCÃO, G.C.; BOTELHO, A.C.; MAIA, A.H.N.; LEONARDECZ, E.; BORGES, M. Comparative biology and functional response of *Trissolcus* spp. (Hymenoptera: Scelionidae) and implications for stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) biological control. **Biological Control**, v.44:32-41 (2008).

LAUMANN, R.A.; AQUINO, M. F. S.; MORAES, M. C. B.; PAREJA, M.; BORGES, M. Response of the egg parasitoids *Trissolcus basalis* and *Telenomus*

podisi to compounds from defensive secretions of stink bugs. **Journal of Chemical Ecology**, v.35, p.8-19, 2009.

LYNCH, R.E.; KLUN, J.A.; LEONHARDT, B.A.; SCHWARZ, M.; GARNER, J.W. Female sex pheromone of the lesser cornstalk borer; *Elasmopalpus lignosellus* (Lepidoptera: Pyralidae). **Environmental Entomology**, v.13, p.121-126, 1984.

MEINERS, T.; WESTERHAUS, C.; HILKER, M. Specificity of chemical cues used by a specialist egg parasitoid during host location. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.95, p.151-159, 2000.

MICROSOFT CORPORATION Excel (11.8328.8329) SP3. Parte do produto Microsoft Office Professional, 2003.

MORAES, M.C.B.; LAUMANN, R.A.; PIRES, C.S.S.; SUJII, E.R.; BORGES, M. 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**, v.115, p.227-237, 2005.

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

MORAES, M.C.B.; LAUMANN, R.A.; PAREJA, M.; SERENO, F.T.P.S.; MICHEREFF, F.F.; BIRKETT, M.A.; PICKETT, J.A.; BORGES, M. Attraction of the stink bug egg parasitoid *Telenomus podisi* to defence signals from soybean activated by treatment with *cis*-jasmone. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.131, p.178-188, 2009.

MOSER, T.; ROMBKE, J.; SCHALLNASS, H.J.; VAN GESTEL, C.A.M. The use of the multivariate principal curves (PRC) for community level analysis: a case study on the effects of carbendazim on enchytraeids in terrestrial model ecosystems (TME). **Ecotoxicology**, v.16, p.573-583, 2007.

NIST Mass Spectral Search for the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library Version 2.0. Gaithersburg. Maryland: Office of the Standard Reference Data base, National Institute of Standards and Technology, 2005.

OZAWA, R.; SHIOJIRI, K.; SABELIS, M.W.; TAKABAYASHI, J. Maize plants sprayed with either jasmonic acid or its precursor, methyl linolenate, attract armyworm parasitoids, but the composition of attractants differs. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.129, p.189-199, 2008.

PARÉ, P.W.; TUMLINSON, J.H. De Novo Biosynthesis of volatiles Induced by Insect herbivory in cotton. **Plant Physiology**, v.114, p.1161-1167, 1997.

PASHALIDOU, F.G.; HUIGRNS, M.E.; DICKE, M.; FATOUROS, N.E. The use of oviposition-induced plant cues by *Trichogramma* egg parasitoids. **Ecological Entomology**, v.35, p.748-753, 2010.

PIRES, C.S.S.; VILELA, E.F.; VIANA, P.A.; FERREIRA, J.T.B. Avaliação no campo do feromônio sexual sintético de *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.21, p.59-68, 1992.

RASMANN, S.; TURLINGS, T.C.J. First insights into specificity of belowground tritrophic interactions. **Oikos**, v.117, p.362-369, 2008.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, 2010.

ROSE, U.S.R.; TUMLINSON, J.H. Volatiles released from cotton plants in response to *Helicoverpa zea* feeding damage on cotton flower buds. **Planta**, v.218, p.824-832, 2004.

ROSTÁS, M.; TURLINGS, T.C.J. Induction of systemic acquired resistance in *Zea mays* also enhances the plant's attractiveness to parasitoids. **Biological Control**, v.46, p.178-186, 2008.

SAUER, H.F.G. Notas sobre *Elasmopalpus lignosellus* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae.), séria praga dos cereais no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.10, p.199-206, 1939.

SCHMELZ, E.A.; ALBORN, H.T.; BANCHIO, E. Quantitative relationships between induced jasmonic acid levels and volatile emission in *Zea mays* during *Spodoptera exigua* herbivory. **Planta**, v.216, p.665-673, 2003.

STEIDLE J.L.M.; VAN LOON J.J.A. Dietary specialization and infochemical use in carnivorous arthropods: testing a concept. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.108, p.133-148, 2003.

STONE, K.J. Reproductive biology of the Lesser Cornstalk Borer. I Rearing Technique. **Journal of Economic Entomology**, v.61, p.1712-1714, 1968.

TURLINGS, T.C.J.; ALBORN, H.T.; LOUGHRIN, J.H.; TUMLINSON, J.H. Volicitin an elicitor of maize volatiles in oral secretion of *Spodoptera exigua*: isolation and bioactivity. **Journal of Chemical Ecology**, v.26, p.189-202, 2000.

TURLINGS, T.C.J.; JEANBOURQUIN, P.M.; HELD, M.; DEGEN, T. Evaluating the induced-odour emission of a Bt maize and its attractiveness to parasitic wasps. **Transgenic Research**, v.14, p.807-816, 2005.

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

TURLINGS, T.C.J.; MC CALL, P.J.; ALBORN, H.T.; TUMLINSON, J.H. An elicitor in caterpillar oral secretions that induces corn seedlings to emit chemical

signals attractive to parasitic wasps. **Journal of Chemical Ecology**, v.19, p.411-425, 1993.

VAN DEN BOOM, C.E.M.; VAN BEEK, T.A.; POSTHUMUS, M.A.; GROOT, A. de; DICKE, M. Qualitative and quantitative variation among volatile profiles induced by *Tetranychus urticae* feeding on plants from various families. **Journal of Chemical Ecology**, v.30, p.69-89, 2004.

VAN DEN BRINK, P.J.; TER BRAAK, C.J.F. Principal response curves: analysis of time-dependent multivariate responses of biological community to stress. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.18, p.138-148, 1999.

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

VET, L.E.M.; LEWIS, W.J.; CARDÉ, R.T. Parasitoid foraging and learning. In: Cardé, R.T.; Bell, W.J. (Ed.). **Chemical Ecology of Insects**. New York: Chapman & Hall, 1995. p.65-101.

VET, L.E.M.; WACKERS, F.L.; DICKE, M. How to hunt for hiding hosts: the reliability-detectability problem in foraging parasitoids. **Netherland Journal of Zoology**, v.41, p.202-213, 1991.

VIANA, P.A. Importância econômica e bioecologia da broca *Elasmopalpus lignosellus*. **Simpósio Latino Americano de cana-de-açúcar**, 2. 1993. Maceió.

1993. p.1-21.

VIANA, P.A.; Lagarta-elasmó. In: SALVADORI, J.R.; ÁVILA, C.J.; SILVA, M.T.B. da (Ed.). **Pragas de solo no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo; Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz Alta: Fundacep Fecotrigó, 2004. p.379-408.

VINSON, S.B. The general host selection behaviour of parasitoid Hymenoptera and a comparison of initial strategies utilized by larvaphagous and oophagous species. **Biological Control**, v.11, p.79-96, 1998.

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

Table 1. Mean amounts (ng/24 h) \pm standard error of volatiles collected from maize undamaged [(24h (N= 9), 48 h and 72 h (N= 7), 96 h (N= 9)], and herbivory damaged [(24h (N= 6) 48h (N= 9) 72h (N= 5) and 96h (N= 9)] during four consecutive days and mechanically damaged maize [(24h (N=5)]. The compounds were qualitatively analysed by gas chromatography (GC) and coupled gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and quantitative analysis was carried out by gas chromatography.

Nr. Compounds	KI	Undamaged plants				Mechanically damaged plants	Herbivory damaged plants				
		24 h	48 h	72 h	96 h		24 h	48 h	72 h	96 h	
1. α -Pinene	938	1.56 \pm 0.40	1.48 \pm 1.20	1.90 \pm 1.43	3.77 \pm 1.88	1.45 \pm 0.21	7.46 \pm 4.77	2.37 \pm 1.12	1.46 \pm 0.61	6.27 \pm 2.35	
2. Camphene	958	3.55 \pm 1.27	1.49 \pm 1.24	0.83 \pm 0.38	1.65 \pm 1.02	1.21 \pm 0.13	1.51 \pm 0.48	1.06 \pm 0.30	3.16 \pm 2.73	4.50 \pm 2.24	
3. β -Pinene	983	0.64 \pm 0.18	0.64 \pm 0.37	0.33 \pm 0.21	0.79 \pm 0.32	4.31 \pm 1.18	3.18 \pm 1.53	2.50 \pm 1.62	1.56 \pm 1.19	3.95 \pm 2.08	
4. 6-Methyl-5-heptene-2-one	989	8.22 \pm 3.10	1.34 \pm 0.46	1.59 \pm 0.73	3.83 \pm 1.37	21.70 \pm 6.56	8.27 \pm 2.69	4.83 \pm 2.24	0.80 \pm 0.38	6.44 \pm 3.72	
5. β -Myrcene	993	1.27 \pm 0.28	1.18 \pm 0.43	0.27 \pm 0.08	2.64 \pm 1.61	7.89 \pm 3.77	1.44 \pm 0.52	2.81 \pm 1.85	1.87 \pm 1.25	9.76 \pm 5.43	
6. (Z) 3-Hexenyl acetate	1008	3.64 \pm 1.05	0.75 \pm 0.37	0.28 \pm 0.15	1.48 \pm 0.47	1.80 \pm 0.82	11.71 \pm 3.57	7.92 \pm 5.23	2.36 \pm 1.29	4.88 \pm 1.29	
7. Limonene	1036	24.90 \pm 6.35	10.25 \pm 2.86	3.22 \pm 0.93	15.90 \pm 5.69	1.12 \pm 0.44	25.43 \pm 8.65	11.33 \pm 3.07	6.09 \pm 1.95	13.38 \pm 4.21	
8. Linalool	1102	0.61 \pm 0.47	4.05 \pm 1.68	2.75 \pm 2.33	0.21 \pm 0.25	-	4.72 \pm 1.26	3.86 \pm 1.82	2.07 \pm 0.26	4.88 \pm 1.80	
10. DMNT	1119	2.43 \pm 0.85	0.15 \pm 0.04	0.17 \pm 0.05	1.96 \pm 0.74	4.30 \pm 1.56	17.21 \pm 5.20	0.64 \pm 0.20	0.62 \pm 0.36	13.82 \pm 4.07	
14. Benzothiazole	1200	5.70 \pm 0.92	2.33 \pm 0.87	0.68 \pm 0.15	2.73 \pm 0.60	4.70 \pm 2.71	8.35 \pm 4.12	7.63 \pm 3.25	2.60 \pm 1.47	4.83 \pm 1.52	
17. Cyclosativene	1227	1.15 \pm 0.41	1.60 \pm 0.53	3.20 \pm 2.05	1.97 \pm 0.82	3.37 \pm 1.13	3.52 \pm 1.17	1.75 \pm 0.20	0.46 \pm 0.07	3.07 \pm 1.45	
18. Unknowns sesquiterpenoid	1373	7.32 \pm 1.70	0.93 \pm 0.63	0.88 \pm 0.32	3.98 \pm 1.12	15.52 \pm 5.47	8.32 \pm 3.24	1.21 \pm 0.23	0.51 \pm 0.07	3.20 \pm 0.98	
19. Unknown sesquiterpenoid	1377	6.72 \pm 1.42	1.51 \pm 0.73	1.99 \pm 0.53	3.29 \pm 0.78	15.52 \pm 2.67	5.73 \pm 1.26	7.54 \pm 4.01	4.40 \pm 3.75	5.97 \pm 2.19	
21. (E)- β Caryophyllene	1425	3.20 \pm 0.98	1.41 \pm 0.97	0.88 \pm 0.26	1.73 \pm 0.65	3.41 \pm 1.04	5.21 \pm 2.15	0.55 \pm 0.23	1.76 \pm 1.31	1.77 \pm 0.54	
22. (E)- α -Bergamotene	1456	5.84 \pm 2.19	4.78 \pm 2.08	1.23 \pm 0.51	5.51 \pm 2.36	32.48 \pm 11.46	13.09 \pm 4.21	2.33 \pm 0.72	2.10 \pm 1.05	3.62 \pm 1.64	
23. Geranyl acetone	1459	1.01 \pm 0.62	2.43 \pm 1.42	1.61 \pm 1.19	1.18 \pm 0.56	1.74 \pm 0.78	1.81 \pm 1.27	1.60 \pm 0.95	0.41 \pm 0.25	1.87 \pm 1.28	
24. (E)- β -Farnesene	1460	12.57 \pm 2.32	7.37 \pm 3.14	3.70 \pm 0.91	6.96 \pm 1.33	34.54 \pm 6.13	18.54 \pm 5.80	9.29 \pm 2.00	3.33 \pm 0.92	5.52 \pm 1.25	
26. TMTT	1584	1.56 \pm 0.40	13.12 \pm 8.91	1.70 \pm 0.73	4.97 \pm 2.46	3.47 \pm 1.30	12.20 \pm 7.38	4.32 \pm 1.31	1.98 \pm 0.68	4.63 \pm 1.55	

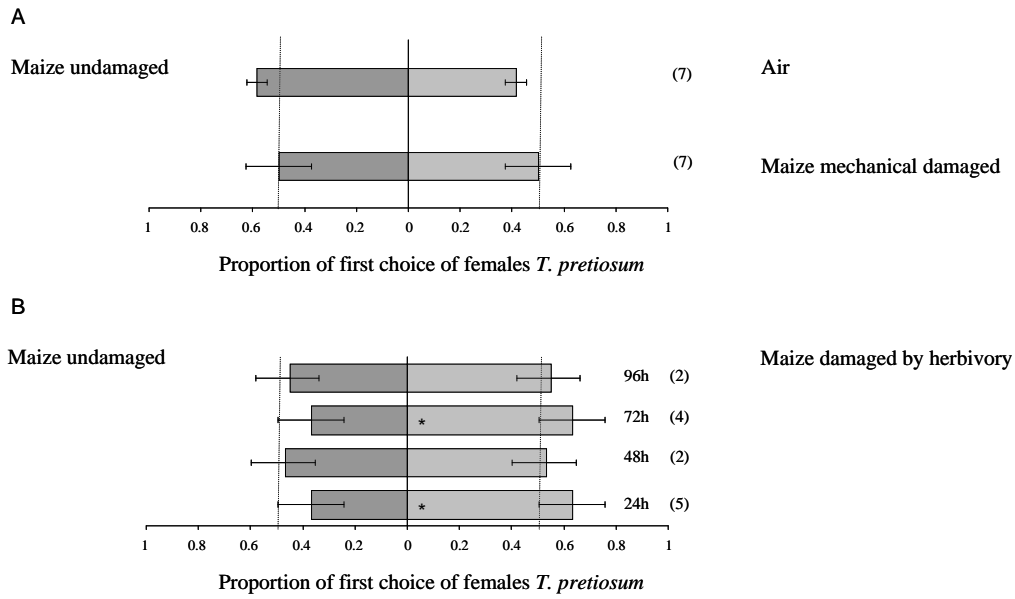


Figure 1. First choice of the parasitoid *Trichogramma pretiosum* in Y-tube olfactometer subjected to following treatments combinations: A. maize undamaged vs air and maize undamaged vs maize mechanically damaged. B. maize undamaged vs. maize damaged by herbivory. Sixty female of *T. pretiosum* were tested in each combination. The analyses of first choice were carried out by logistic regression and a χ^2 statistic to assess significance. Asterisks indicate significant difference between treatment at $P < 0.05$ and lines are the 95% confidence.

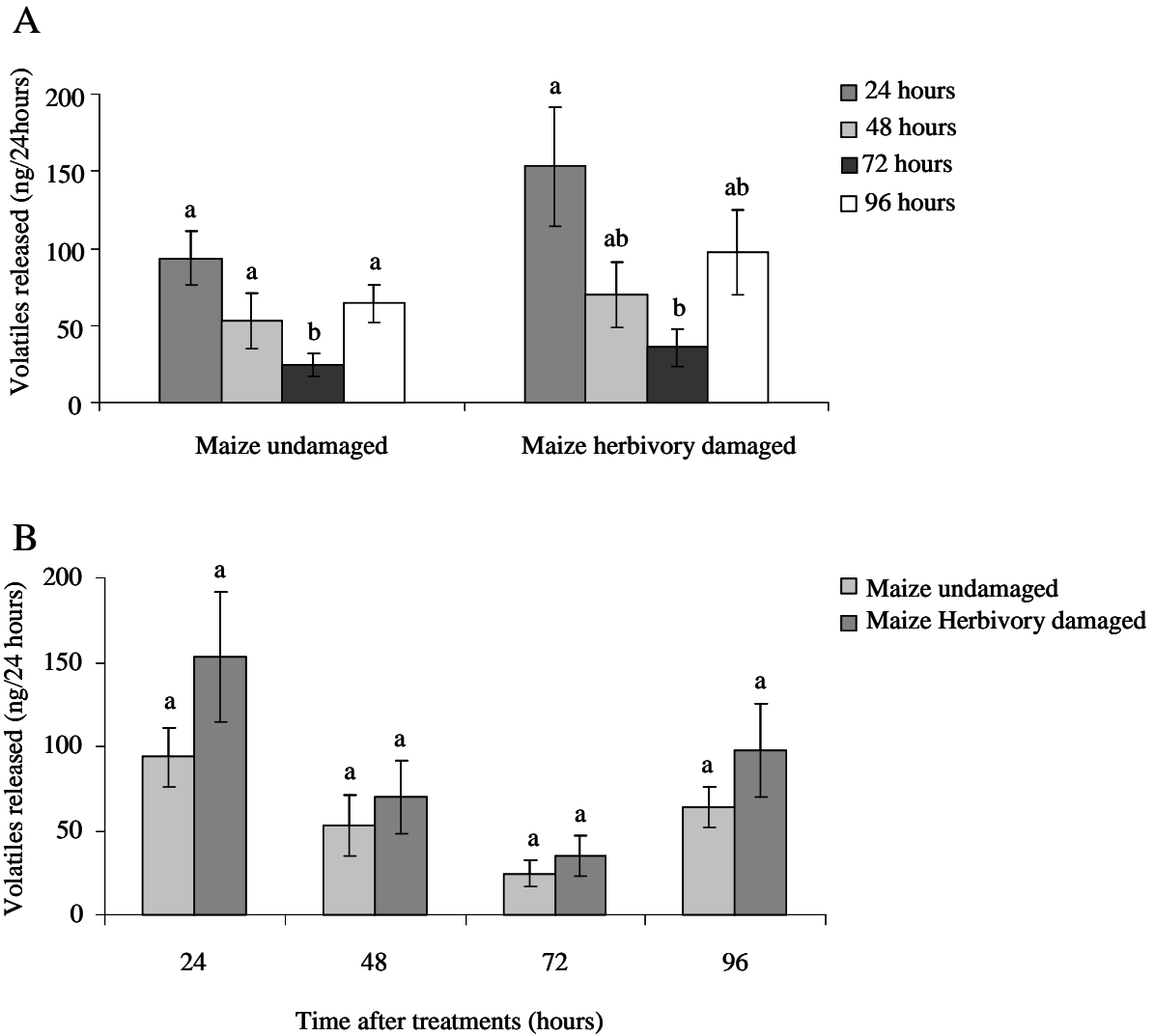


Figure 2. Total amount of volatiles (mean \pm SE) obtained from maize plants submitted to two treatments during four days: herbivory damage (damaged by *Elasmopalpus lignosellus* third instar larvae) and undamaged maize. A. Comparison of maize undamaged and maize herbivory damage during four days. The quantitative analysis (GLM - generalized linear models, with gamma distribution). B. Comparison of total amount of volatiles released (mean \pm SE) between undamaged and herbivory damaged maize. The qualitative analysis was carried out by gas chromatography (GC) and coupled gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and quantitative analysis by gas chromatography.

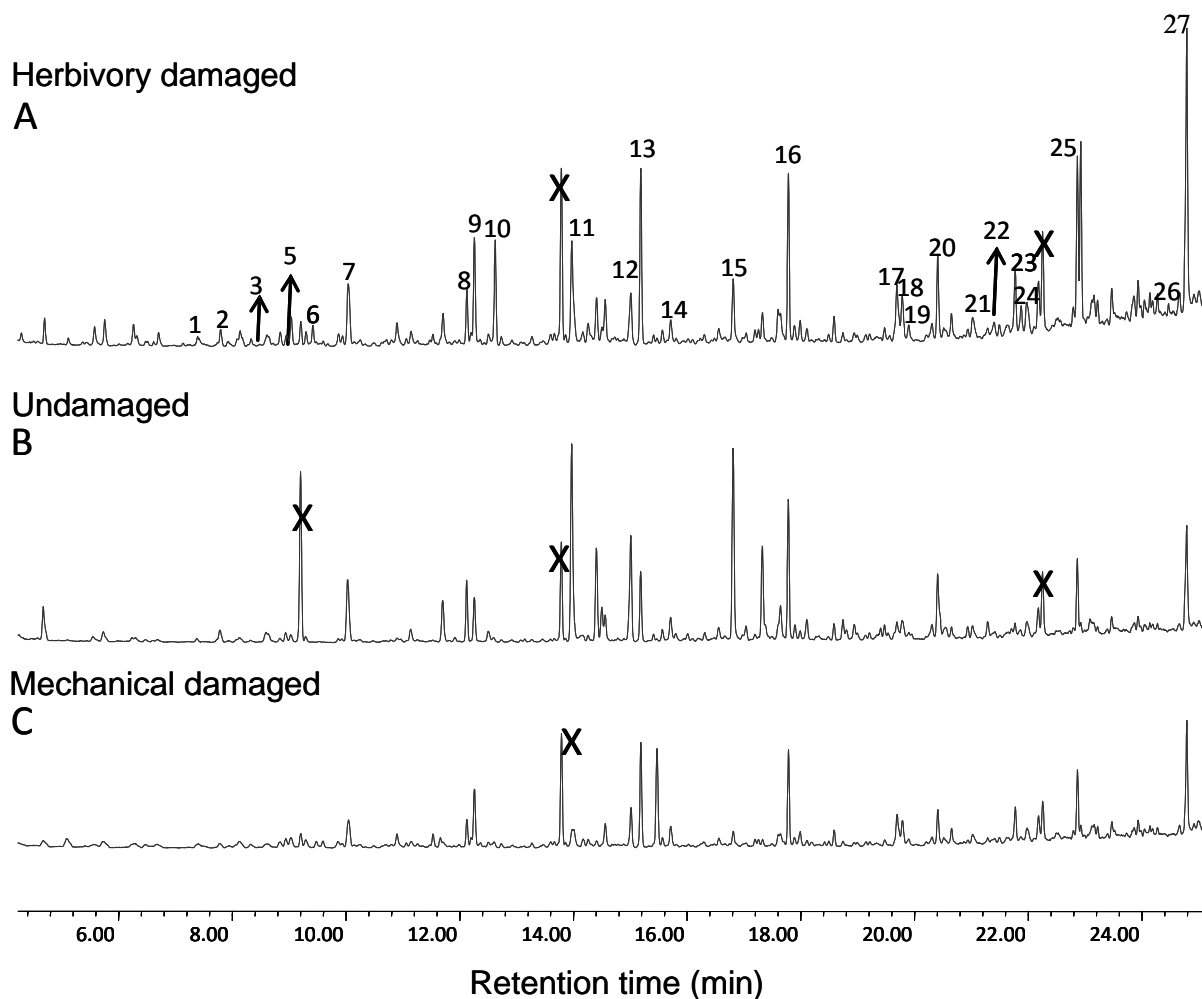


Figure 3. Qualitative comparison of the volatiles blend released by maize during the four days, using gas chromatography (GC) and coupled gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) to qualitative analysis: A. Herbivory damaged maize by *Elasmopalpus lignosellus* larvae. B. undamaged maize plants. C. Mechanical damaged maize. The compounds are numbered as follows: 1) 1 α -pinene, 2) camphene, 3) β -pinene, 4) 6-methyl-5-hepten-2-one, 5) β -myrcene, 6) (*Z*)-3-hexenyl acetate, 7) limonene, 8) linalol and undecane (co-eluting), 9) nonanal, 10) (*E*)-4,8-dimethylnona-1,3,7-triene (DMNT), 11) 3-ethyl benzaldehyde, 12) dodecano, 13) decanal, 14) benzothiazole, 15) p-ethyl-acetophenone, 16) tridecane, 17) cyclosativene, 18) unknown sesquiterpenoid, 19) unknown sesquiterpenoid, 20) tetradecane, 21) (*E*)- β -caryophyllene, 22) β -bergamotene, 23) geranyl acetone 24) (*E*)- β -farnesene, 25) pentadecane, 26) (*E,E*)-4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene (TMTT), 27) hexadecane and X-contaminant (isophthalate and derivatives).

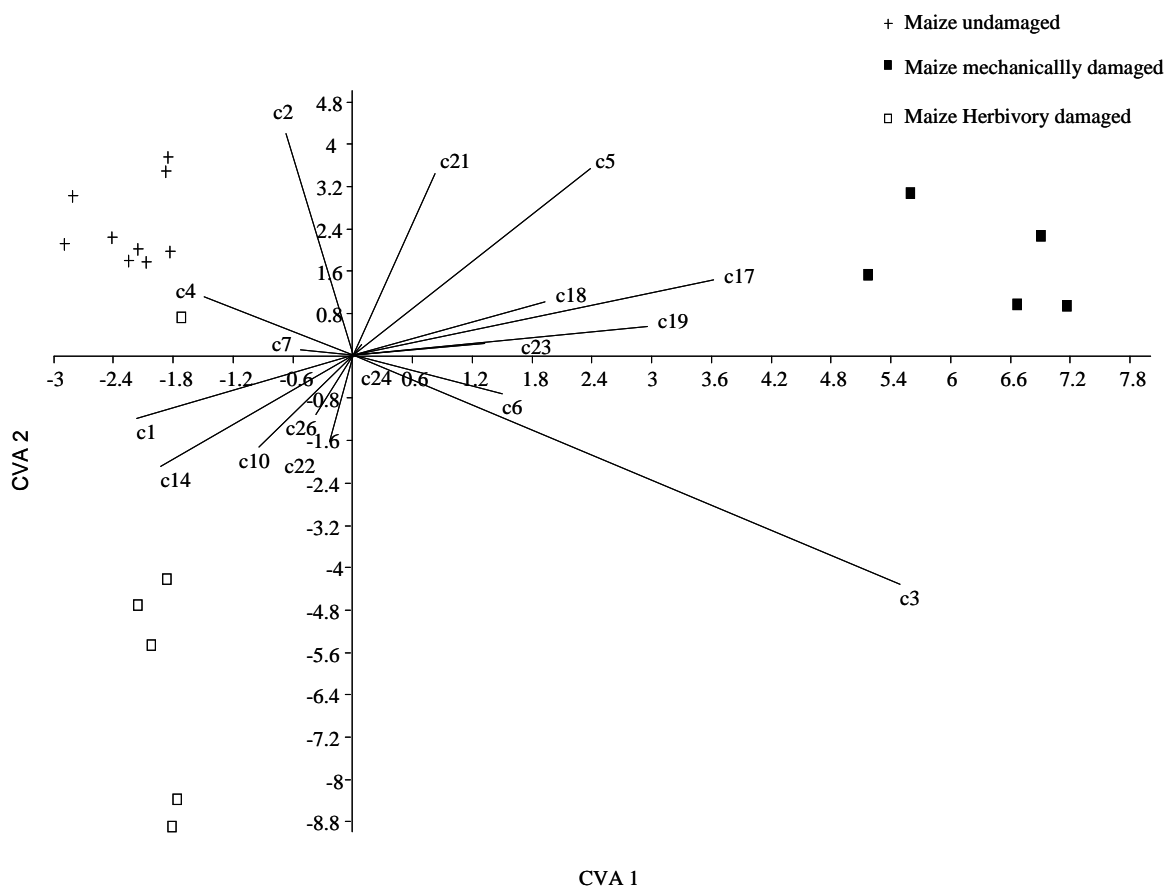


Figure 4. Discriminate analysis (CVA) bi-plots comparing the total amount of volatiles produced in first 24 hours of aeration in each treatment: Maize undamaged, Maize mechanical damaged and Maize herbivory damaged. The statistical analysis was significant ($P= 0.05$) and each compound was represented as follows: c1) α -pinene, c2) camphene, c3) β -pinene, c4) 6-methyl-5-hepten-2-one, c5) β -myrcene, c6) (*Z*)-3-hexenyl acetate, c7) limonene, c10) (*E*)-4,8-dimethylnona-1,3,7-triene (DMNT), c14) benzothiazole, c17) cyclosativene, c18) unknown sesquiterpenoid, c19) unknown sesquiterpenoid, c21) (*E*)- β -caryophyllene, c22) β -bergamotene, c23) geranyl acetone c24) (*E*)- β -farnesene and c26) (*E,E*)-4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene (TMTT). The extracts were analysed by gas chromatography (GC) and coupled gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) for quantification and quantitative analysis by gas chromatography.

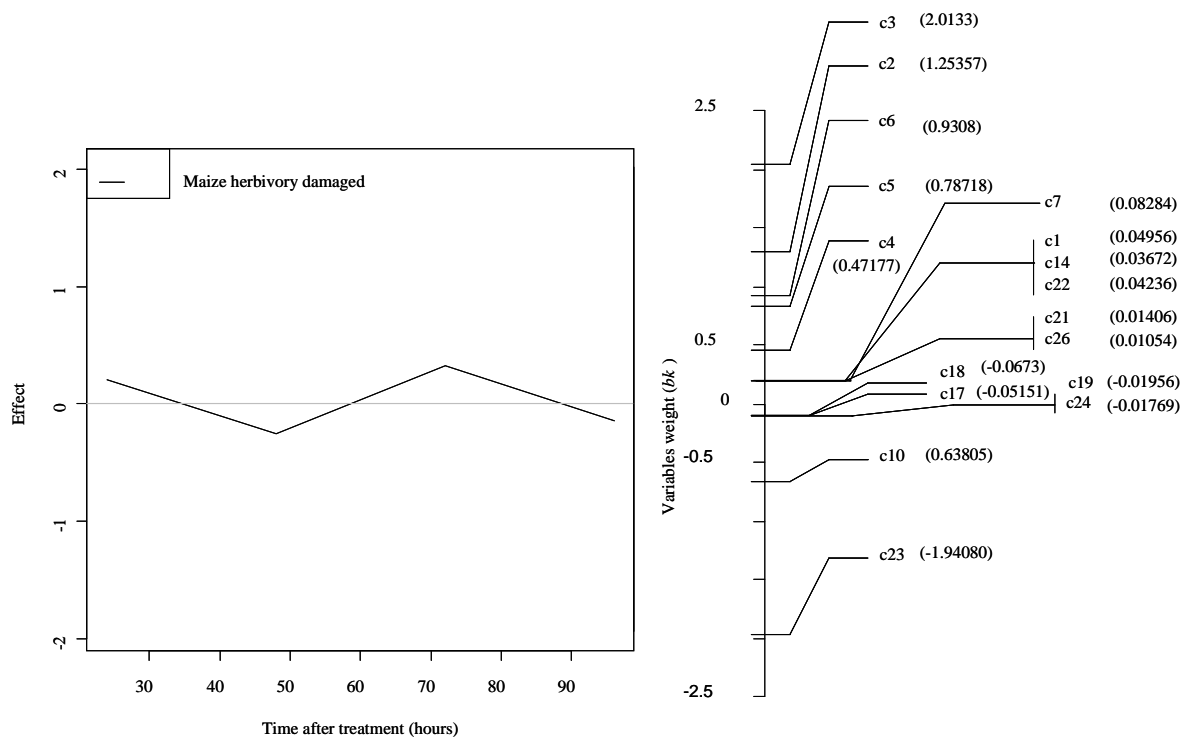


Figure 5. Multivariate Principal Response Curve analysis (PRC) (variables weights (bk)) based on volatile blends released by maize plants. The curve represents the response pattern of maize plants damaged by *Elasmopalpus lignosellus* third instar larvae and maize undamaged. The compounds was numbered as follows: c1) 1 α -pinene, c2) camphene, c3) β -pinene, c4) 6-methyl-5-hepten-2-one, c5) β -myrcene, c6) (*Z*)-3-hexenyl acetate, c7) limonene, c10) (*E*)-4,8-dimethylnona-1,3,7-triene (DMNT), c14) benzothiazole, c17) cyclosativene, c18) unknown sesquiterpenoid, c19) unknown sesquiterpenoid, c21) (*E*)- β -caryophyllene, c22) β -bergamotene, c23) geranyl acetone c24) (*E*)- β -farnesene and c26) (*E,E*)-4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene (TMTT). The qualitative analysis was carried out using gas chromatography (GC) and coupled gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and quantitative analysis by gas chromatography.

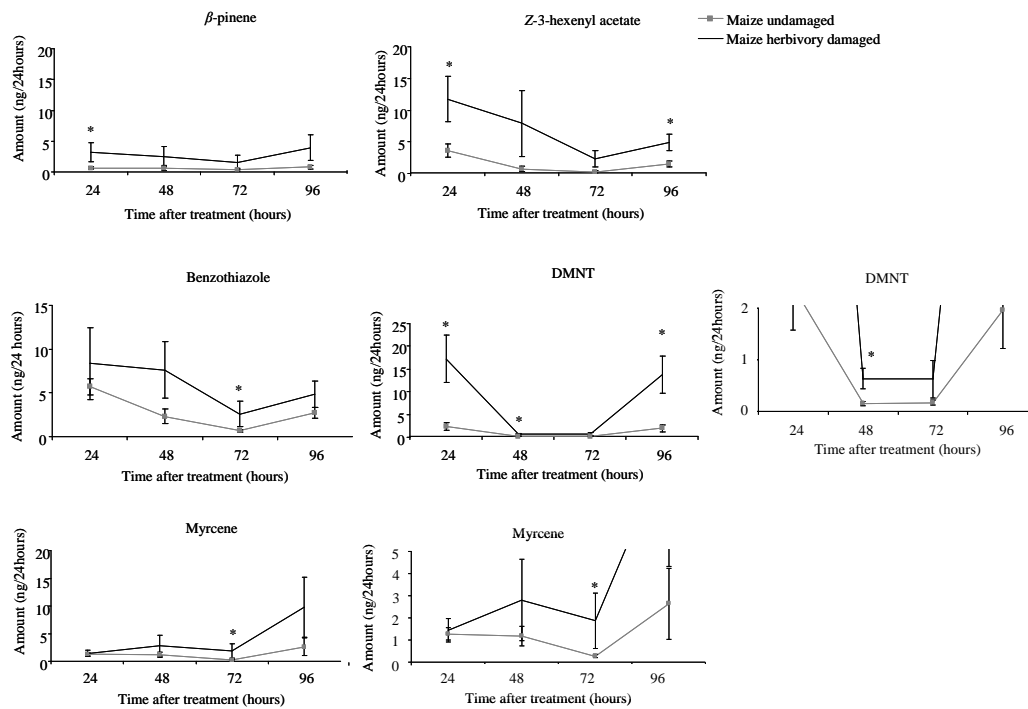


Figure 6. Comparison of volatiles released during four days of aeration between the treatments of herbivore damaged and undamaged maize (mean \pm SE) and quantitative analysis (GLM - generalized linear models, with gamma distribution). The qualitative analysis of extracts was by chromatography (GC) and coupled gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and quantitative analysis by gas chromatography. Asterisks denotes significant differences between the treatments ($P \leq 0.05$)

CAPÍTULO 2

Sexual behavior of the lesser cornstalk borer, *Elasmopalpus lignosellus*: age influence in mating and males responses in a wind tunnel.

Abstract. The study of the reproductive behavior and response of *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera: Pyralidae) males to females in calling behavior, at up to four days in adult stage, were studied under laboratory conditions. The maximum number of mating occurred when the couple was between 24 and 48 hours old; the scotophase period significantly influenced mating behavior, which peaked between 6 and 8 hours of darkness. In mating behavior, the males usually vibrated their wings when a female approached and mating took 93.97 ± 4.13 minutes. Females in calling behavior were evaluated in a wind tunnel and attracted significantly more males than in bioassays with clean air (control). Younger females called significantly less, but no significant effect on male response was observed. Males with 48 to 72 hours/old showed lower frequency or proportion of response when compared to other males assessed, with 0-24, 24-48 and 72-96 hours old. The age of the female did not influence the male response. The time of response of the male in each bioassay (10 minutes of observation/bioassay) was significantly higher for males with 48-72 hours. These results indicate that the age of the *E. lignosellus* male influences the response to females of their species in calling behavior.

Index terms: Mating, reproductive maturity, chemical communication, moth, attraction, sexual receptivity

Comportamento sexual da broca-do-colmo, *Elasmopalpus lignosellus*: influencia da idade no acasalamento e respostas dos machos em tunnel de vento.

Resumo. O estudo do comportamento reprodutivo e a resposta de machos de *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera: Pyralidae) a fêmeas em comportamento de chamamento, com até quatro dias de idade, foi conduzido sobre condições de laboratório. O número máximo de acasalamento ocorreu quando os casais estavam entre 24 e 48 horas de idade. O período de escotofase influenciou significativamente no comportamento de acasalamento, que foi máximo entre 6 a 8 horas de escuro. No comportamento de acasalamento, os machos, usualmente vibraram suas asas ao se aproximar da fêmea e o período de acasalamento foi de 93.97 ± 4.13 minutos. Fêmeas de *E. lignosellus*, em comportamento de chamamento, foram avaliadas em túnel de vento e atraíram significativamente mais machos que nos bioensaios em fluxo de ar limpo (controle). Fêmeas jovens apresentaram comportamento de chamamento significativamente menor, mas não afetou na resposta do macho. A idade das fêmeas não interferiu na resposta dos machos. Machos entre 48 e 72 horas de idade foram os que apresentaram menor comportamento de resposta e diferiram significativamente dos outros machos avaliados, com 0-24, 24-48 e 72-96 horas de idade. No entanto, o tempo de resposta dos machos em cada bioensaio (10 minutos de observação/bioensaio) foi significativamente maior nos machos entre 48 e 72 horas de idade, quando as quatro idades dos machos foram comparadas. Estes resultados indicam a idade do macho de *E. lignosellus* influencia na resposta para fêmeas coespecíficas, em comportamento de chamamento.

Termo para indexação: acasalamento, maturidade reprodutiva, comunicação química, mariposa, atração, receptividade sexual.

Introduction

Several studies on sex pheromones in insects have resulted in chemical and behavioral elucidation (Tillman et al., 1999), demonstrating the importance of blend composition and the structure of odor plume in the successful mating location (Cardé & Baker, 1984; Raina, 1996; Cardé & Willis, 2008). The sex pheromone of the lepidopteran are mainly formed by two groups: Type I (75% of the known pheromone), formed by a complex mixture of straight chain acetates, aldehydes and alcohols, with 10-18 carbon atoms and a other of Type II (15% of the known pheromone), represented by polyunsaturated hydrocarbons and epoxy derivatives with long straight chains, with 17-23 carbon atoms (Ando et al., 2004). In insects, the sex pheromone composition of several species can vary according to different geographical locations (Cardé & Baker, 1984).

The lesser cornstalk borer (LCB), *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera: Pyralidae), is an important insect pest widely distributed in tropical and temperate regions of the western hemisphere from the south of the U.S.A to Argentina and Chile. More than 60 species of host plants have been described for the LCB (Stone, 1968; Viana, 2004). This insect is a serious pest in Brazil, especially in maize, soybean, cotton, rice, sorghum, wheat, peanut (Kishino, 1981) and sugarcane (Viana, 2004) crops. The larvae of *E. lignosellus* feed on plants up to 30 cm in height (Pinto et al., 2004). The larvae bore into plant stem producing a tunnel, causing a symptom called dead heart (Kishino, 1981), and this is observed when the larvae reach the apical meristem with consequent death of the host (Pinto et al., 2004).

The sex pheromone of LCB from a North American population (USA) was identified as a mixture of (Z)-7-tetradecenyl acetate, (Z)-9-tetradecenyl acetate, (Z)-9-tetradecenol, and (Z)-11-hexadecenyl acetate (proportion 37:20:4:39), and activity of this mixture was confirmed in a field test (Lynch et al., 1984). However, field tests conducted in Brazil with this mixture failed to attract LCB males (Pires et al., 1992). The chemical analysis of the sex pheromone of Brazilian populations from Goiânia (Goias State, GO) and Sete Lagoas (Minas Gerais State, MG), identified a specific blend for each population, which was also different from that of North American population (Lynch et al., 1984; Jham et al., 2005, 2007). These studies identified the presence of (E)-8-hexadecenyl acetate, (Z)-9-hexadecenyl acetate and (Z)-11-hexadecenyl acetate in the Goiânia population (GO), and only two acetates, (Z)-9-hexadecenyl acetate and (Z)-11-hexadecenyl acetate in the Sete Lagoas population (MG) (Jham et al., 2005, 2007).

Effective population monitoring of *E. lignosellus* with the use of sex pheromone could help to develop IPM strategies for this pest in Brazil. However, in Brazil, there is not an efficient pheromonal blend to attract LCB males. A complete understanding of the mating behavior of *E. lignosellus* can help in the identification of the pheromonal blend of this specie in Brazilian populations. Pires et al. (1994) observed that female calling behavior begins in the first night after emergence and that 70% of females called at least once during the second night. These authors also found that calling behavior is influenced by scotophase, limited to the second half of the dark phase, and was influenced by age; older females started their calling earlier. However, there is no information about the male behavioral response to the female sex pheromone, which is important because traps with the sex pheromone will be used to monitor the population through males. In this study, LCB reproductive behavior and the male response to calling females in wind tunnel were evaluated. The work aimed to answer

two questions: 1- What is the periodicity, duration and age at which mating occurs? 2- Is the frequency of responses of the males to the females in calling behavior related to their age?

Methods and Material

Insects

A laboratory colony of *E. lignosellus* was established at Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, Brazil, from individuals collected in sugar-cane fields in Viçosa, Minas Gerais State, Brazil (20°45' S, 42°52' W) and mass rearing at Embrapa Maize and Sorghum in Sete Lagoas (Minas Gerais). The larvae were reared on an artificial diet (Chalfant, 1975), modified by Viana (1993) (see composition of the diet in Annex I), maintained at 28 ± 0.5 °C and $70 \pm 10\%$ r.h. and under reversed photoperiod of L12:D12. All the experiments in this work were carried out during ten laboratory generations of *E. lignosellus*.

Periodicity and duration of mating

To assess the periodicity and duration of mating, couples of *E. lignosellus* were observed during seven days (0 to 168 hours old after emergence). Soon after emergence, sixty couples were individualized in plastic pots and fed with beer without alcohol. These couples were observed continuously, during reversed photoperiod (12D: 12L), every 24 h period. After observation of mating period and duration, the couples were discarded. During mating, the specific behavior of females and males was registered: time of initialization and duration of mating.

Wind tunnel bioassays

Behavioral tests were carried out in wind tunnel to evaluate orientation of virgin males to virgin females, during calling behavior.

The wind tunnel was constructed with a glass cylinder with a flight section of 120 cm x 10 cm diameter, and air was blown onto an array (5 x 15 cm diameter) of activated charcoal cylinder. Air flow was produced by two computer fans (15 cm diameter), one at the up-wind e extremity of the wind tunnel, to create the air flow, and other on the opposite side as exhauster. To create a laminar flow, a cardboard “honey comb” circle (3 cm x 15 cm diameter) was adapted to the up-wind fan. The wind speed was calibrated at 0.5 m/sec to conduct the behavioral tests, under scotophase of the reversed photoperiod (12D: 12L). This wind tunnel bioassays were carried out with males that were 24, 48, 72 and 96 hours old (hours after the final molt) to evaluate the orientation to virgin females with 24, 48, 72 and 96 hours old (hours after the final molt) during calling behavior. The females were introduced in the extremity of the air entrance of the wind tunnel in a wire cage (N=15 females per bioassay). Bioassays were conducted with all possible combinations of male/female ages (total of 16 combinations). Additionally, for each male age (N= 40) control bioassays were performed without females in the wind tunnel. For each combination of male/female the followings number of bioassays were carried out (male 24/female 24h (N= 41), male 24/female 48h (N= 40), male 24/female 72h (N= 40), male 24/female 96h (N= 42); male 48/female 24h (N= 40), male 48/female 48h (N= 56), male 48/female 72h (N= 40), male 48/female 96h (N= 40); male 72/female 24h (N= 42), male 72/female 48h (N= 64), male 72/female 72h (N= 65), male 72/female 96h (N= 63); male 96/female 24h (N= 40), male 96/female 48h (N= 51), male 96/female 72h (N= 68), male 96/female 96h (N= 53)). Males were individually released at the opposite extremity of the wind tunnel (1 m away from caged females) when at least one female was in calling behavior. To liberate the males

they were maintained for ten minutes in the same conditions (temperature and luminosity) of the bioassays, in a plastic cylinder (6 cm x 3 cm diameter) with their extremes closed with cotton wads. After this period the cylinder was introduced in the tunnel and the cotton wads were removed gently. The male behavior was observed for ten minutes and the behavior was recorded during response, such as vibration of wings and antennae, direct flight to the odor source, or walk.

A positive response was considered when the males left the liberation point and flew up-wind reaching at least half way from the caged females. Those males that showed a positive response, had their response time and the period of scotophase of the bioassays registered. The scotophase was classified into two-hour periods: 4-6, 6-8, 8-10, 10-12 h after the beginning of the dark conditions.

Statistical analysis

To analyze the differences in the number of couples mating in different periods of the scotophase and by age class, the χ^2 test was performed. The response of males in the wind tunnel was analyzed using Deviance Analyses (ANODEV), with binominal distribution of errors and logit as link function. This analysis was applied in order to test the effect of female age on male responses, to test the responses of males of different ages to females in each age class, and to test the total response of males in each age class (responses of males in each age class to females of all ages evaluated). When the analyses showed significant effects of the treatments, means were compared using contrast analyses. To compare the number of females in calling behavior ANODEV were used, using Poisson errors and log as link function, followed by comparison using contrast method. The same analysis was used to compare the time of the male response in each age class, followed by comparison of means using Tukey's

test. All the analyses were carried out in software R (R statistical Development Core Team, 2010) at 5% significance level.

Results and Discussion

From sixty couples observed, forty-one mated, and the distribution of mating in relation to the age of the couples showed a higher frequency (31.9% of the mating couples) when the insects were 24-48 hours old ($\chi^2_6=59.29$, $P < 0.05$) (Table 1). The mating occurred preferentially from 6 to 8 hours after the start of scotophase ($\chi^2_5=69.07$, $P < 0.05$). In this period, 68.29% of the total mating was observed (Table 2). The mean mating duration was of 93.97 ± 4.13 minutes (Annex II).

The age of males influenced their responses to calling females (ANODEV, $P = 0.03$, d.f.= 3,781). When the response to calling females was compared by contrast analysis it was observed that the 48-72 hours old males differed significantly from other males evaluated and showed a lower response level ($P < 0.03$) (Figure 1). The female age did not show a significant effect on male responses (ANODEV, $P = 0.59$, d.f.= 3, 778). This result, under controlled conditions, is in agreement with what was observed in the field, in that virgin females *E. lignosellus* of 0-96 hours old (0-24, 24-48, 48-72 and 72-96 hours old) showed no significant differences on attraction of males (Payne & Smith, 1975). In addition, there were no significant interactions between male responses and females age (ANODEV, $P = 0.11$, d.f.= 9, 769).

The mean response time (time from the introduction of the males in the wind tunnel until they left the liberation area, flying or walking) showed significant variation according to the age of males ($F_{3,177}=7.78$, $P < 0.05$). Males that were 48-72 hours old showed a higher response time than the other ages evaluated (Tukey's test, $P < 0.05$) (Figure 1).

The mean number of females in calling behavior, in the four ages analyzed, differed significantly (ANODEV, $P < 0.05$, d.f.= 3, 781). The females that were 0-24 hours old showed a significantly lower frequency in calling behavior ($P < 0.05$), compared to the other females evaluated, with different ages. On the other hand, females that were 72-96 hours old showed a higher number of females in calling behavior ($P < 0.05$) (Figure 2).

The response of males in the wind tunnel was recorded in 110 males; and 100% of them vibrated the antennae after their introduction in the wind tunnel, 7.27% vibrated the wings, 56.36% flew directly to the odor source, 26.36% walked linearly in direction of females, 3.64% walked in circles and 38.18% walked in zig zag direction to the odor source.

Lesser cornstalk borer showed mating peaks when the adults were between 24 and 48 hours old; the highest frequency of mating was observed 6 to 8 hours after the beginning of the scotophase. This is directly related to the calling behavior of females, which shows maximum frequency in this time (Pires et al., 1994). Previous reports showed that LCB females show calling behavior on the first day after emergence (Pires et al., 1994) suggesting that at this time they are sexually mature (Mason & Johnson, 1989; Kingan et al., 1993; Raina, 1993; Parra-Pedrazzoli & Leal, 2006). In this work the maximum number of matings occurred when the insects in the couples were on the second day after emergence (48 hours old), which could suggest that male sexual maturity is responsible for the delay in mating. This behavior is common to other moth species (Witethom, 1992) in which the mating did not occur soon after emergence, such as in *Amyelois transitella* (Walker, 1863) (Pyralidae), where maximum mating frequency occurred in the first 48 hours and *Neoleucinodes elegantalis* (Guenée, 1854) (Cambridae), which shows the highest proportion of mating between 48 and 72 hours old (Eiras, 2000; Parra-Pedrazzoli & Leal, 2006). In this research, the males that were 0-24, 24-48 and 72-96 hours old did not differ in the response. However, in a test to assess the periodicity of mating, our results showed that the males with 24-48 hours old

obtained the highest occurrence of mating. So males with 24 to 48 hours old could be at the optimum physiological state for reproduction and response to the sex pheromone.

Several studies have shown that, in Lepidoptera males, endocrinological requirements, such as secretions from accessory glands (MAG) (Gillott, 2003), and hormones, such as the juvenile hormone (JH) delay the sexual maturity of the males and the age at which they become reproductively active (Happ, 1984, 1992; Jin & Gong, 2001; Wedell, 2005). The development of the seminal fluids is a determining factor for mating to occur (Wedell, 2005). Similarly, males of *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Noctuidae) become sexually mature 48 hours post emergence after a significant accumulation of proteins in MAG (Jin & Gong, 2001).

The physiological state of the male, represented by JH level (Anton & Gadenne, 1999) and status of accessory glands, is important in the optimal timing in response to the sex pheromone (Gadenne et al., 2001). Additionally, the JH may have the effect of modifying the olfactory functions in some moths (Carlsson & Hansson, 2003). These authors observed that with increasing levels of JH the performance of antennal lobe (AL) neurons also increases. Posteriorly, in moth *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1766) (Noctuidae), it was observed that both JH and octopamine (neuromodulator) are involved in the plasticity age-dependent of sex pheromone response (Jarriault et al., 2009). Recently, the effects of male age of noctuids *Heliothis virescens* (Fabricius, 1977) and *Heliothis subflexa* (Guenée, 1852) on expression level of genes involved in male response to pheromones (Soques et al., 2010) were studied. In that study, it was found that the age had no effect on expression levels. However, these authors emphasized that more studies about similar gene expression in other moth species are necessary before any assessments regarding this relationship can be made.

In lepidopteran, after that the males became sexually mature, they were highly attracted by the sex pheromone released by the females (Baker, 1989; Roelofs, 1995; Jarriault

et al., 2009). In some moth species, the male response to female pheromones increases as it ages (Anton & Gadenne, 1999; Gadenne & Anton, 2000; Evenden & Gries, 2008). This was observed in *Grapholitha molesta* (Busk, 1916), (Tortricidae), in those males with 24 hours old or less, there was comparatively lower response levels, 48 hours old intermediate response and 72 to 96 hours old the highest responses to pheromone (Baker & Cardé, 1979), In our results, *E. lignosellus* males with 48-72 hours old showed a lower response level to calling females. However, the males with 72-96 hours old responded in a similar way to young males, making it difficult to interpret the results, and suggesting that a more complex physiological or behavioral mechanism is responsible for alterations in the response to volatiles from calling females. This phenomenon needs to be established in the future using physiological, neural and electro-physiological techniques.

Thus, we observed plasticity in response of *E. lignosellus* males to females in calling behavior, which probably depends on male physiological and neurological state during response. Our results indicate that the males between 24-48 hours old are sexually mature. These observations, associated with those previously reported by Pires et al. (1994), represent important information about the sexual behavior of this species. This information could be applied in future works to identify the sex pheromone blend of Brazilian populations, as to determine biological activity of synthetic sex pheromone in laboratory.

Conclusions

1. The age of the couple and scotophase period influenced in the mating behavior of *E. lignosellus*;

2. The age of the *E. lignosellus* male influences in the response to females of their species in calling behavior, which probably depends on male physiological and neurological state during response; and
3. Males aged 24-48 hours old are sexually mature.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Paulo Viana (Embrapa Maize and Sorghum) and Dr. Alexandre Barrigossi (Embrapa Rice and Beans) for helping with field collection and laboratory rearing of the insects. This work received financial support from the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Distrito Federal Research Foundation (FAPDF), and Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). This research was also supported by the International Foundation for Science, Stockholm, Sweden, through a grant to Dra. Maria C. B. Moraes.

References

ANDO, T.; INOMATA, S.; YAMAMOTO, M. Lepidoptera sex pheromones. In: Schulz, S. (Ed.). **Chemistry of pheromones and other semiochemicals**. Topics in current chemistry. New York: Springer and Verlag, 2004. p.51-96.

ANTON, S.; GADENNE, C. Effect of juvenile hormone on the central nervous processing of sex pheromone in an insect. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.96, p.5764-5767, 1999.

BAKER, T.C. Sex pheromone communication in the Lepidoptera: New research progress. **Experientia**, v.45, p.248-262, 1989.

BAKER, T.C.; CARDÉ, R.T. Endogenous and exogenous factors affecting periodicities of female calling and male sex pheromone response in *Grapholitha milesta* (Busck). **Journal of Insect Physiology**, v.25, p.943-950, 1979.

CARDÉ, R.T.; BAKER, T.C. Sexual communication with pheromones. In: BELL, W.J.; CARDÉ, R.T. (Ed.). **Chemical ecology of insects**. New York: Chapman and Hall, 1984. p.356-383.

CARDÉ, R.T.; WILLIS, M.A. Navigational strategies used by insects to find distant, wind-borne sources of odor. **Journal of Chemical Ecology**, v.34, p.854-866, 2008.

CARLSSON, M.A.; HANSSON, B.S. Plasticity and coding mechanisms in the insect antennal lobe. In: BLONQUIST, G.J.; VOGT, R.G. (Ed.). **Insect pheromone biochemistry**

and molecular biology: the biosynthesis and detection of pheromones and plant volatiles.

Amsterdam: Elsevier Academic Press. 2003. 745p.

CHALFANT, R.B. A simplified technique for rearing the lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Phycitidae). **Journal of the Georgia the Entomological Society**, v.10, p.33-37, 1975.

EIRAS, A. Calling behaviour and evaluation of sex pheromone glands extract of *Neoleucinodes elegantalis* Guenée (Lepidoptera: Crambidae) in wind tunnel. **Sociedade Entomologica do Brasil**, v.29, p.453–460, 2000.

EVENDEN, M.L.; GRIES, R. Plasticity of male response to sex pheromone depends on physiological state in a long-lived moth. **Animal Behaviour**, v.75, p.663-672, 2008.

GADENNE, C.; ANTON, S. Central processing of sex pheromone stimuli is differentially regulated by juvenile hormone in a male moth. **Journal of Insect Physiology**, v.46, p.1195-1206, 2000.

GADENNE, C.; DUFOUR, M.C.; ANTON, S. Transient post-mating inhibition of behavioural and central nervous responses to sex pheromone in an insect. **The Royal Society of London**, v.268, p.1631-1635, 2001.

GILLOTT, C. Male Accessory Gland Secretions: Modulators of Female Reproductive Physiology and Behavior. **Annual Review of Entomology**, v.48, p.163–184, 2003.

HAPP, G.M. Structure and development of male accessory glands in insects. In: KING, R.C.; AKAI, H. (Ed.). **Insect Ultrastructure**, Germany: Plenum Press, 1984. p.365-392.

HAPP, G.M. Maturation of the male reproductive system and its endocrine regulation. **Annual Review of Entomology**, v.37, p.303-20, 1992.

JARRIAULT, D.; BARROZO, R.B.; PINTO, C.J. de C.; GREINER, B.; DUFOUR, M.C.; ROCA, I.M.; GRAMSBERGEN, J.B.; ANTON S.; GADENNE, C. Age-dependent plasticity of sex pheromone response in the moth, *Agrotis ipsilon*: combined effects of octopamine and juvenile hormone. **Hormones and Behavior**, v.56, p.185-191, 2009.

JHAM, G.N.; SILVA, A.A. da.; LIMA, E.R.; VIANA, P. Identification (GC and GC-MS) of unsaturated acetates in *Elasmopalpus lignosellus* and their biological activity (GC-EAD and EAG). **Journal of Separation Science**, v.28, p. 281-285, 2005.

JHAM, G.N.; SILVA, A.A. da.; LIMA, E.R.; VIANA, P.A. Identification of acetates in *Elasmopalpus lignosellus* pheromone glands using a newly created mass spectral database and Kovats retention indices. **Química Nova**, v.30, p.916-919, 2007.

JIN, Z.Y.; GONG, H. Male accessory gland derived factors can stimulate oogenesis and enhance oviposition in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.46, p.175-185, 2001.

KINGAN, T.G.; THOMAS-LAEMONT, P.A.; RAINA, A.K. Male accessory gland factors elicit change from 'virgin' to 'mated' behaviour in the female corn earworm moth *Helicoverpa zea*. **The Journal of Experimental Biology**, v.183, p.61–76, 1993.

KISHINO, K. Estudo da biologia e controle de *Elasmopalpus lignosellus* Zeller (Lepidoptera, Phycitidae) em região de cerrado. In: Relatório parcial do projeto da cooperação em pesquisa agrícola nos cerrados do Brasil. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 1978-1980. Planaltina, **Embrapa/CPAC Cerrados – Japan International Cooperation Agency – JICA**, 1981. p. 45-81.

LYNCH, R.E.; KLUN, J.A.; LEONHARDT, B.A.; SCHWARZ, M.; GARNER, J.W. Female sex pheromone of the lesser cornstalk borer, *Elasmopalpus lignosellus* (Lepidoptera: Pyralidae). **Environmental Entomology**, v.13, p.121-126, 1984.

MASON, L.J.; JOHNSON, S.J. Age dependent calling of the female soybean loopers (Lepidoptera : Noctuidae). **Florida Entomologist**, v.72, p.327-336, 1989.

PARRA-PEDRAZZOLLI, A.L.; LEAL, W.S. Sexual behavior of the navel orangeworm, *Amyelois transitella* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). **Neotropical Entomology**, v.35, p.769-774, 2006.

PAYNE, T.L.; SMITH, JR. J.W. A sex pheromone in the lesser cornstalk borer. **Environmental Entomology**, v.4, p.355-356, 1975.

PINTO, A.S.; PARRA, J.R.P.; OLIVEIRA, H.N. **Guia ilustrado de pragas e insetos**

benéficos do milho e sorgo. Ribeirão Preto. Livraria PLD, 2004. 108p.

PIRES, C.S.S.; VILELA, E.F.; VIANA, P.A. Comportamento de fêmeas de *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) associado à liberação de feromônio sexual. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.23, p.1-12, 1994.

PIRES, C.S.S.; VILELA, E.F.; VIANA, P.A.; FERREIRA, J.T.B. Avaliação no campo do feromônio sexual sintético de *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.21, p.59-68, 1992.

RAINA, A.K. Neuroendocrine control of sex pheromone biosynthesis in Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, v.38, p.329-349, 1993.

RAINA, A.K. Control of pheromone production in moths. In: **Insect pheromone research: new direction.** CARDÉ, R.T.; MINKS, A.K. (Ed.). United States of America: Chapman & Hall. 1996. p.21-30.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, 2010.

ROELOFS, W.L. Chemistry of sex attraction. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** v.92, p.44-49, 1995.

SOQUES, S.; VÁSQUEZ, G. M.; GROZINGER, C. M.; GOULD, F. Age and Mating Status Do Not Affect Transcript Levels of Odorant Receptor Genes in Male Antennae of *Heliothis virescens* and *Heliothis subflexa*. **Journal of Chemical Ecology**, v.36, p.1226-1233, 2010.

STONE, K.J. Reproductive biology of the Lesser Cornstalk Borer. I Rearing Technique. **Journal of Economic Entomology**, v.61, p.1712-1714, 1968.

TILLMAN, J.A.; SEYBOLD, S.J.; JURENKA, R.A.; BLOMQUIST, G.J. Insect pheromones - an overview of biosynthesis and endocrine regulation. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.29, p.481-514, 1999.

VIANA, P.A. Importância econômica e bioecologia da broca *Elasmopalpus lignosellus*. **Simpósio Latino Americano de cana-de-açúcar**, 2. 1993. Maceió. 1993. p.1-21.

VIANA, P.A.; Lagarta-elasmó. In: SALVADORI, J.R.; ÁVILA, C.J.; SILVA, M.T.B. da. (Ed.). **Pragas de solo no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo; Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz Alta: Fundacep Fecotrigo, 2004. p.379-408.

WEDELL, N. Female receptivity in butterflies and moths. **The Journal of Experimental Biology**, v.208, p.3433-3440, 2005.

WITETHOM, B. Effects of age on calling and mating behavior of the sapodilla fruit borer, *Nephoterix* sp. (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of the Science Society of Thailand**, v.18, p.93-103, 1992.

Table 1. Percentage of sixty couples *Elasmopalpus lignosellus* that mate at different time intervals (0-168 hours old after emergence) during scotophase of a photoperiod of 12L: 12D.

Age of couples in hours	Mating (%)
0-24	7,35
24-48	31,88
48-72	17,02
72-96	7,69
96-120	6,25
120-144	4,17
144-168	0,00
Total of mating	68,33

Reference: There was a significant effect of age in the percentage of mating ($\chi^2=59.29$, d.f.=6, $P < 0.05$).

Table 2. Percentage of forty one couples of *Elasmopalus lignosellus* that mate at different periods in the scotophase (photoperiod 12L:12D).

Scotophase/hours	Mating (%)
0-2	0.00
2-4	2.44
4-6	21.95
6-8	68.29
8-10	7.32
10-12	0.00

References: There were statistical differences in the percentage of couples at different periods of the scotophase ($\chi^2=69.07$, d.f.= 5, $P < 0.05$).

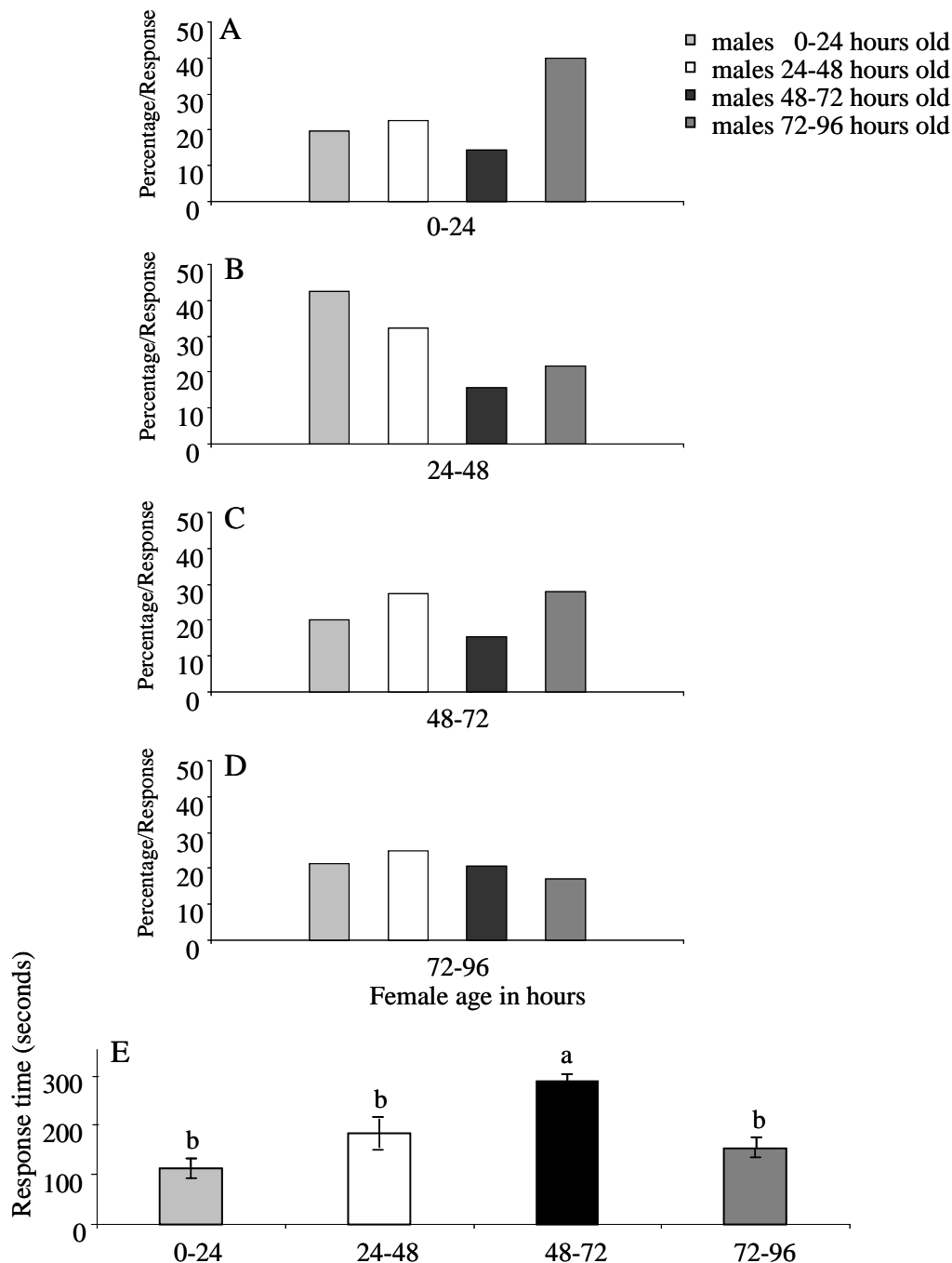


Figure 1. Male response to females in calling behavior aged 0 to 96 hours: (A) Females with 0-24 hours old; (B) Females with 24-48 hours old; (C) Females with 48-72 hours old; (D) Females with 72-96 hours old. A significant effect was observed between the males ($P=0.03$), males with 48-72 hours old were different from the other males with different ages ; (E) Response time (sec.) (mean \pm SE). of males *E. lignosellus* to females at each age, in calling behavior in wind tunnel bioassays (male 0-24h (N=42), male 24-48h (N=47), male 48-72h (N= 39), male 72-96h (N= 53)). The mean response time of males showed significant variation with age ($P < 0.05$). Males of 48-72 hours old showed a higher response time than those with different ages which were evaluated ($P < 0.05$). Data followed by the same letter are not significantly different by the Tukey's test.

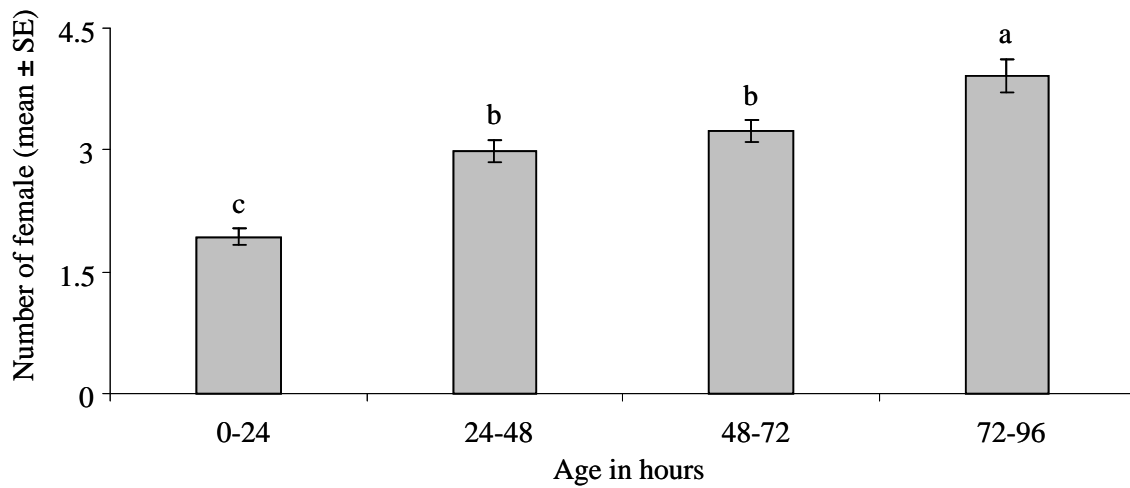


Figure 2. Analysis of females *E. lignosellus* in calling behavior (mean \pm SE). Comparison between the mean number of females *E. lignosellus* in calling behavior in groups of 15 insects used in bioassays with virgin males in the wind tunnel. Columns with same letters are not significantly different using GLM analysis and ANODEV, using contrast method ($P < 0.05$).

CAPÍTULO 3

Avaliação de extratos feromonais de *Elasmopalpus lignosellus* obtidos por diferentes técnicas de extração.

Resumo - No Brasil, *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera: Pyralidae) é considerada uma das principais pragas do milho. Diferentes técnicas de extração do feromônio deste lepidóptero foram testadas com objetivo de contribuir para o desenvolvimento de uma metodologia adequada para o isolamento e estudo do feromônio sexual. As técnicas avaliadas foram: aeração, microextração em fase sólida (*SPME*) e extração de glândulas. As três técnicas utilizadas não produziram resultados concordantes. A técnica de aeração e a técnica usando a fibra de *SPME* mostraram pouca consistência e geraram resultados com alta variabilidade. A extração de glândula mostrou ser a técnica mais eficiente, sendo possível identificar somente três compostos com o padrão de fragmentação esperado para acetatos de lepidópteros. As análises químicas dos extratos obtidos das extrações de glândulas, com o padrão de fragmentação e o índice de Kováts (KI), sugerem que os compostos identificados possam ser o acetato de hexadecila, acetato de (*Z*)-11-hexadecenila e acetato de (*Z*)-9-hexadecenila ou (*Z*)-8-hexadecenila. O composto acetato de (*Z*)-11-hexadecenila também foi observado em todas as pesquisas realizadas na busca de identificar a composição feromonal deste lepidóptero, sendo provavelmente o principal componente do feromônio sexual da espécie. Estes resultados contribuem no desenvolvimento de futuras pesquisas para verificar a atividade biológica destes compostos que podem ser relevantes no manejo de *E. lignosellus* de populações que ocorrem no Brasil.

Termo para indexação: Extração de glândula, aeração, microextração, adsorção e produção feromonal.

Evaluation of pheromonal extracts of *Elasmopalpus lignosellus* obtained by different extraction techniques.

Abstract - In Brazil, *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera: Pyralidae) is considered one of the main pests of maize. Many techniques to extract pheromone from this lepidopteran were tested, aiming to contribute to the development of an adequate methodology to isolate and study the sexual pheromone. The techniques used were: aeration, solid phase microextraction (SPME) and gland extraction. These three techniques produced divergent results. The technique of aeration and the technique using fiber of SPME showed little consistency and generated results with high variability. The gland extraction technique seemed to be the most efficient, and it was possible to identify only three compounds which followed the fragmentation pattern expected from lepidoptera acetate. The chemical analysis obtained from the gland extraction, with the fragmentation pattern and the Kováts index (KI), suggest that the identified compounds can be hexadecyl acetate, (Z)-11-hexadecenyl acetate, and (Z)-9-hexadecenyl acetate or (Z)-8-hexadecenyl. The compound (Z)-11-hexadecenyl acetate was also observed in all researches that aimed to identify the pheromonal composition of this lepidopteran, which is possibly the main component of the sexual pheromone of this species. These results contribute in the development of future researches to verify the biological activities of these compounds that can be relevant to the management of *E. lignosellus* populations that occur in Brazil.

Index terms: Extraction gland, aeration, microextraction, adsorption and pheromonal production.

Introdução

Elasmopalpus lignosellus (Zeller, 1848) (Lepidoptera: Pyralidae), conhecida como broca-do-colo ou lagarta elasma, é uma praga subterrânea, pertencente à família Pyralidae. Este inseto distribuiu-se do sul dos Estados Unidos até América do Sul e causa danos a mais de 60 espécies de plantas hospedeiras (Stone, 1968). No Brasil, é considerada uma das principais pragas do milho (Viana, 2004). Os estudos para o controle desta espécie são justificados pelos expressivos danos em lavouras brasileiras, desde a década de 30. Apesar da constatação de inimigos naturais desta praga na fase larval, o uso destes insetos no controle biológico não é eficiente devido à bioecologia do inseto, pois, as lagartas se abrigam, desde os instares iniciais, no interior da planta hospedeira e do seu casulo de proteção. Práticas de controle cultural e físico têm sido pesquisadas, além de viabilidade de uso de feromônio sexual, parasitóide na fase larval e fungos entomopatogênicos (Johnson & Smith Jr., 1980; Pires et al., 1992; Viana & Costa, 1992; Moar et al., 1995; Paron & Quintela, 2002). No entanto, atualmente a principal forma de controle, quando ocorre, é através de inseticidas químicos (Viana, 2004).

O desenvolvimento de táticas de manejo de insetos-praga, nos agroecossistemas, deve buscar estudos fundamentais de biologia e de comportamento (Lingren et al., 1980). Estes estudos devem ser conduzidos, tanto em laboratório, como em campo. Através deles é possível responder questões-chaves para o desenvolvimento de métodos de controle como, por exemplo, o período de incidência do inseto na cultura, o período de acasalamento, se a existência de uso de plantas alternativas no caso da ausência das plantas hospedeiras definitivas. Entre várias outras informações necessárias, tanto para a aplicação efetiva de inseticidas químicos, como para identificação de métodos alternativos de controle. Uma tática

efetiva para estimar a densidade populacional e distribuição espacial de insetos-praga, especialmente lepidópteros, é o monitoramento com emprego de armadilhas, contendo o feromônio sexual sintético como atrativo para a espécie alvo (Baker, 1989, 2008; Baker & Health, 2004). Esta técnica permite adquirir informações relevantes para o manejo e contribuir na tomada de decisão sobre o momento e a forma de controle da praga-alvo.

Lynch et al. (1984) isolaram e identificaram dez componentes do extrato de glândulas de fêmeas de *E. lignosellus* e mostraram sua atividade biológica como atraentes de machos, ao incorporá-los em armadilhas, em lavouras na Flórida e no México (Funderburk et al., 1985). No entanto, testes em condições de campo, no Brasil, com o feromônio sintético produzido nos Estados Unidos, e também no Brasil, foram realizados por Pires et al. (1992), e não atraíram machos. Outros estudos conduzidos no Brasil, visando a identificação do feromônio sexual deste inseto, mostraram que em duas populações de diferentes regiões geográficas, uma de Minas Gerais e outra de Goiás, a composição obtida de extratos de glândulas foram diferentes. Para a população de Goiás foram identificados: acetato de (*E*)-8-hexadecenila ou acetato de (*E*)-9-hexadecenila, acetato de (*Z*)-9-hexadecenila e acetato (*Z*)-11-hexadecenila e para a população de Sete Lagoas (MG) foi relatada a presença dos acetatos: (*Z*)-9-hexadecenila e (*Z*)-11-hexadecenila. Em testes de eletroantenografia foi observado que machos coespecíficos dessas populações respondem aos compostos identificados (Jham et al., 2005, 2007).

O monitoramento efetivo de *E. lignosellus*, em outros países, tem incentivado a condução de estudos orientados para a elucidação da composição do feromônio das diferentes populações deste lepidóptero no Brasil. Nas pesquisas desenvolvidas no país, Pires (1992) e Jham (2005, 2007), sugerem a existência de diferenças nas proporções, ou mesmo na composição da mistura feromonal, entre as populações que ocorrem no Brasil e a existente nos Estados Unidos. Segundo Cardé & Baker (1984), podem ocorrer variações entre

populações da mesma espécie de regiões geográficas diferentes com relação à composição e a resposta aos feromônios sexuais. Há possibilidade, ainda, dos estudos realizados localmente sobre a ecologia química de *E. lignosellus* não terem fornecido as informações corretas a respeito, em razão dos insetos utilizados terem advindo de gerações criadas em laboratório por vários anos seguidos e em dieta artificial.

O isolamento de feromônio sexual, no geral, é realizado através de duas técnicas, a extração dos compostos presentes nas glândulas feromonais, usando solventes orgânicos, e através de técnicas usando materiais para adsorver os compostos. Neste último caso, as mais utilizadas são a coleta de voláteis em câmaras de aeração forçada, na qual diferentes materiais podem ser usados, como carvão ativado, polidimetilsiloxano, Tenax, Super Q, entre outros. A microextração em fase sólida, da sigla em inglês SPME, também é bastante usada, em que fibras com diâmetros variando de 100 a 7 micras são usadas para a adsorção dos compostos. As fibras de *SPME* têm como grande vantagem a dispensa no uso de solventes para a eluição, o que aumenta a sensibilidade da técnica. No entanto, esta técnica é extremamente dependente do equilíbrio dos compostos na fase aérea, para a adsorção na fibra e da afinidade dos compostos pelo material que a fibra é composta (Valente & Augusto, 2000; Zarbin, 2001).

Assim, este trabalho teve como objetivo aprofundar o conhecimento sobre a composição do feromônio sexual de *E. lignosellus* de populações que ocorrem em Minas Gerais, utilizando diferentes técnicas de extração feromonal.

Material e Métodos

Criação de Insetos em dieta artificial

Adultos de *E. lignosellus* foram coletados em plantio de cana-de-açúcar em Viçosa, Minas Gerais, Brasil (20°45' S, 42°52' W). A colônia foi estabelecida na Embrapa Recursos

Genéticos e Biotecnologia e as lagartas foram alimentadas em dieta artificial, à base de ágar e feijão, conforme metodologia de Chalfant (1975), modificada por Viana (1993) (ver composição da dieta no Anexo I), mantidas em 28 ± 0.5 °C e $70 \pm 10\%$ UR, com fotoperíodo invertido de 12 horas de luz:12 horas de escuro (12L:12E), com a luz sendo apagada às 7 h.

Coleta de voláteis de fêmeas e machos de E. lignosellus

Coleta por aeração

Neste sistema de extração, de 4 a 15 mariposas, separadas por idades, de 0-24h, 24-48, 48-72 e 72-96 horas (após emergência), foram colocadas em câmaras de vidro de borosilicato de 1 litro (Figura 1). Na câmara foi conectado um tubo de vidro contendo o adsorvente (50 mg de Super Q) e esse tubo foi conectado a uma bomba de vácuo. Na outra entrada da câmara foi conectado um tubo de vidro contendo carvão ativado (500 mg) para filtrar o ar que entrou e circulou pela câmara de aeração. Com este procedimento foram realizadas 75 réplicas com diferentes conjuntos de insetos: 15 aerações foram de machos e 60 aerações foram de fêmeas. A aeração foi realizada em ciclo de fotoperíodo invertido, como descrito anteriormente, a entrada e saída do ar foram controladas através de fluxômetros, ajustados a 0.6 L/min de entrada de ar e 0.2 L/min de saída de ar (Figura 1). Após 24 horas de aeração, os voláteis adsorvidos foram eluídos com 500 μ L *n*-hexano e pré-concentrados para 10 μ L solvente/inseto, utilizando fluxo de N₂ filtrado. Estes extratos foram acondicionados em freezer a -20°C até análise em CG (cromatografia a gás) e CG-EM (cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas).

Coleta com fibras adsorventes de SPME

Para utilizar as fibras de SPME, um sistema muito semelhante ao da câmara de aeração foi montado. A principal diferença foi que, ao invés do tubo contendo o adsorvente,

foi colocada a fibra de SPME. E, como não há circulação de ar que movimenta o mesmo através da fibra, como na coleta por aeração, neste caso, foram utilizadas câmaras menores para permitir que a área de distribuição do ar dentro da câmara fosse menor, possibilitando maior adsorção dos compostos pela fibra. Para este estudo, foi utilizada a fibra de polidimetilsiloxano de 100 μm (Sigma Aldrich) (Figura 2) e foram conduzidas quatro réplicas. Para permitir eficiente adsorção dos compostos, as fibras ficaram em contato com o ar contendo as mariposas (4 a 15 fêmeas) por 30 minutos, após isso, a fibra foi imediatamente injetada no cromatógrafo gasoso acoplado a um detector de chamas ou ao cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas. Nos dois casos, a fibra foi inserida no injetor *splitless* e ficou por 50 segundos a 250 °C, dentro do injetor, antes de iniciar a corrida.

Extração de glândulas

Para isolamento de feromônio, em extração por solvente de glândulas feromonais, fêmeas recém-emergidas, oriundas de Minas Gerais e mantidas em dieta artificial, foram individualizadas em potes plásticos (6 cm x 3 cm diâmetro), contendo solução de mel a 10% em algodão umedecido e mantidas em ciclo de fotoperíodo invertido. Quando as fêmeas iniciaram comportamento de chamamento, o abdome foi gentilmente pressionado até a extrusão dos segmentos terminais que contém a glândula de feromônio. Quinze extratos foram obtidos, contendo entre 4 a 45 glândulas/extrato. Estas glândulas foram mantidas em frasco, com 200 μL *n*-hexano, durante 20 minutos. Posteriormente, este extrato de glândulas feromonais foi filtrado, transferido para outro frasco, pré-concentrado para 10 μL solvente/inseto e acondicionado em freezer a -20°C até ser usado nas análises.

Análise química

Os extratos de feromônio obtidos foram analisados quantitativamente em cromatógrafo gasoso acoplado a um detector de ionização de chama (CG-DIC, Perkin Elmer

AutoSystem XL), com injetor no modo *splitless*, e com hélio como gás carreador, usando programa de temperatura de 50°C/1 min, 15°C/min para 250°C/20 min. Para a análise qualitativa, os extratos selecionados foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a um espectômetro de massas quadrupolar (Shimadzu QP2010) (CG-EM), com injetor no modo *splitless* e hélio como gás carreador, usando o mesmo programa de aquecimento da análise por CG-DIC. O padrão de fragmentação dos compostos foi comparado com o padrão de fragmentação obtido na biblioteca NIST e com padrões autênticos: (Z)-7-tetradecenal, (Z)-11-tetradecenol, (Z)-11-hexadecenol e os padrões obtidos do laboratório de Semioquímicos e Comportamento de insetos, Universidade Federal de Viçosa: (Z)-7-tetradecenol, acetato (Z)-9-tetradecenila, acetato (Z)-11-hexadecenila, acetato (Z)-7-tetradecenila, (Z)-9-tetradecenol, (Z)-9-hexadecenol, acetato tetradecenila, acetato (Z)-9-hexadecenila, acetato hexadecenila, (Z)-11-hexadecenol.

Para auxiliar na identificação dos compostos, também foi utilizado o índice de Kováts. Na determinação destes valores, os índices de retenção foram calculados, empregando análise de uma mistura de hidrocarbonetos lineares (n-alcenos entre C₇ - C₂₁) e utilizando as mesmas condições de análise de CG descritas anteriormente. Para o cálculo do índice de Kováts foi empregada a seguinte equação: $I_x = 100n + 100n (t_{Rx} - t_{Rz} / t_{R(z+1)} - t_{Rz})$, em que [n] é o número de carbonos do n-alceno, com o tempo de retenção (t_{Rz}) anterior ao composto considerado, e t_{Rz+1} o tempo de retenção do n-alceno localizado após o composto avaliado. Estes índices foram posteriormente comparados com os descritos na literatura.

Resultados e Discussão

As três técnicas utilizadas para coleta do feromônio sexual de *E. lignoselus* não produziram resultados concordantes. Tanto a técnica de aeração quanto a técnica usando a

fibra de SPME, mostraram pouca consistência e obtenção de resultados com alta variabilidade. Adicionalmente, com estas técnicas, não foram identificados componentes do feromônio sexual em quantidades significativas (Figura 3). A extração de glândula mostrou ser a técnica mais eficiente, sendo possível identificar somente três compostos com o padrão de fragmentação esperado para acetatos de lepidópteros (Figura 3). Desta forma, as análises químicas se referiram extritamente aos extratos obtidos das extrações de glândulas. O padrão de fragmentação e o índice de Kováts (KI) do composto 1 (KI= 2014), composto 2 (KI=2004) e composto 3 (KI= 1995), sugerem que os compostos identificados possam ser o acetato de hexadecila, acetato de (Z)-11-hexadecenila e acetato de (Z)-9-hexadecenila ou (Z)-8-hexadecenila, respectivamente (Figuras 4, 5 e 6). Considerando o total de extratos analisados, somente em uma pequena proporção dos mesmos, foram observados os compostos encontrados no perfil apresentado na figura 3. O que provavelmente é justificado pela pequena quantidade de feromônio sexual produzida pelo inseto. Em geral, a maior dificuldade para identificação de feromônio sexual em inseto é devido à baixa taxa de liberação dos compostos feromonais (Kalinová et al., 2006).

Além das dificuldades mencionadas, e, independente do método de extração usado, as amostras apresentaram-se muito complexas e com alta diversidade de compostos químicos. Muitos dos quais, podem ser oriundos da dieta usada para criar os insetos. Em percevejos (*Euschistus heros* (Fabricius, 1791) (Hemiptera: Pentatomidae)) foi demonstrado que a dieta é um dos fatores determinantes para produção de feromônio sexual (Moraes et al., 2008).

O composto com índice de Kováts 2014 foi identificado como o acetato de hexadecila, sendo confirmado pelo padrão de fragmentação da biblioteca (NIST, 2005) e pela comparação com o padrão autêntico, que teve o mesmo KI e padrão de fragmentação (Figura 4).

O composto com índice de Kováts de 2004 foi identificado como o acetato de (Z)-11 hexadecenila e também foi confirmado pela comparação do padrão de fragmentação da biblioteca NIST e com o espectro de massas de um padrão autêntico (Figura 5).

Não foi possível confirmar a estrutura química do composto com o índice de Kováts 1995, já que não se dispunha do padrão sintético. Acetatos, em geral, apresentam padrão de fragmentação muito semelhante entre si, dificultando a análise e identificação da identidade destes compostos. Na Figura 6, é mostrado o padrão de fragmentação obtido para o composto 3 e de outros dois isômeros de acetato, sendo observado que não é possível afirmar qual deles é o composto produzido por *E. lignosellus*. Da mesma maneira, por apresentarem um padrão de fragmentação muito similar, com uma única diferença na posição da insaturação, e possuírem índices de Kováts também muito próximos (KI 1993 e 1991), não foi possível afirmar qual é a estrutura química destes compostos. Este inconveniente pode ser resolvido injetando as amostras e os padrões autênticos em colunas capilares de cromatografia gasosa com diferentes características químicas. Desta forma, os próximos estudos deverão envolver a síntese desses compostos e subsequentes análises no CG com diferentes colunas.

Estabelecer um método de extração é avaliar procedimentos que aperfeiçoem a coleta de amostras de forma, que essas, apresentem menor conteúdo de impurezas (Leal et al, 1996; Philips, 1997). Nossos resultados mostram diferenças entre os processos de extração de feromônio de *E. lignosellus*. O método de extração da glândula abdominal mostrou-se mais promissor, já que com o mesmo foi possível observar compostos com característica similar ao feromônio deste lepidóptero.

É comum que a qualidade dos extratos feromonais, obtidos por vários processos, sejam diferentes. Fatores como umidade, temperatura e tamanho do frasco podem interferir, qualitativamente e quantitativamente, nos extratos obtidos pela microtécnica SPME (Valente & Augusto, 2000) e quando os voláteis são coletados por aeração, com uso de adsorvente,

todos os voláteis liberados pelo inseto são coletados (Moraes et al., 2003). Estes inconvenientes não ocorrem com o método de extração de glândula, já que uma região específica é extraída, o que diminui impurezas (Zarbin, 2001). A extração de glândulas pode resultar em uma mistura complexa de compostos, em que é extraída somente a quantidade de feromônio presente no corpo do inseto no momento da extração (Philips, 1997). Assim, esta técnica é a prática mais utilizada para isolamento e identificação em estudos com feromônio (Zarbin et al., 1999).

Os resultados observados nesta pesquisa e os possíveis candidatos ao feromônio sexual de *E. lignosellus*, constatados por outras pesquisas no Brasil, sugerem o envolvimento de compostos acetatos presentes na mistura feromonal. Compostos acetatos estão presentes no feromônio sexual de muitas espécies de lepidópteros (Ando et al., 2004). No entanto, diferenças, quantitativas e qualitativas, na composição do feromônio sexual têm sido comumente encontradas em várias populações de lepidópteros de diferentes localidades geográficas (Cardé & Baker, 1984, Groot et al., 2009).

O composto acetato de (Z)-11-hexadecenila, observado em nossos resultados, também foi observado em estudos prévios com esta espécie no Brasil e constatada a resposta eletroantegráfica em machos da espécie (Silva, 2001; Jham et al., 2005, 2007). Este composto também foi constatado em estudo de uma população de Tifton, GA, EUA, inclusive com eficiência a campo para coleta de machos (Lynch et al., 1984; Funderburk et al., 1985). Assim, o composto acetato de (Z)-11-hexadecenila, também presente na mistura feromonal de outros lepidópteros da família Pyralidae (El-Sayed, 2010; Miller et al., 2010), provavelmente representa o principal componente do feromônio sexual de *E. lignosellus*. Entretanto, a mistura específica, assim como a atividade biológica da mesma e de cada componente, precisa ser estabelecida em futuros trabalhos.

Além disso, esta pesquisa foi a primeira a constatar o composto acetato de hexadecila na mistura feromonal de *E. lignosellus*, em populações brasileiras. Diante do exposto, nossos resultados estimulam o desenvolvimento de novos trabalhos para verificar a atividade biológica do composto acetato de (Z)-11-hexadecenila e acetato de hexadecila em *E. lignosellus*, em populações brasileiras, e contribuem para avançar na resolução de um problema tecnológico que pode ser relevante no manejo desta espécie, uma das principais pragas da agricultura brasileira.

Conclusões

1. Compostos acetatos estão presentes na mistura feromonal de *E. lignosellus*: acetato de hexadecila, acetato de (Z)-11-hexadecenila e acetato de (Z)-9-hexadecenila ou (Z)-8-hexadecenila; e
2. A constatação do composto acetato de hexadecila, na mistura feromonal de *E. lignosellus*, foi um avanço nas pesquisas de comunicação química deste lepidóptero, em populações brasileiras.

Agradecimentos

Ao Dr. Paulo Afonso Viana (Embrapa Milho e Sorgo) e Dr. José Alexandre Barrigossi (Embrapa Arroz e Feijão) pelo auxílio na coleta e criação do inseto em laboratório. Agradecemos ao Prof. Eraldo Rodrigues de Lima, pelo envio de padrões autênticos. Esta pesquisa recebeu apoio financeiro do CNPq e da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

Referências

ANDO, T.; INOMATA, S.; YAMAMOTO, M. Lepidoptera sex pheromones. In: Schulz, S. (Ed.). **Chemistry of pheromones and other semiochemicals**. Topics in current chemistry. New York: Springer and Verlag, 2004. p.51-96.

BAKER, T.C. Sex pheromone communication in the Lepidoptera: new research progress. **Experientia**, v.45, p.248-262, 1989.

BAKER, T.C. Use of pheromones in IPM. **In: RADCLIFFE T.; HUTCHINSON, B. (Ed.). Integrated Pest Management**. Cambridge University Press, 2008. p.273-285.

BAKER, T.C.; HEATH, J.J. Pheromones - function and use in insect control. In: GILBERT, L.I.; IATRO, K; GILL, S.S. (Ed.). **Molecular Insect Science**. Tucson: Elsevier, 2004. p. 407-460.

CARDÉ, R.T.; BAKER, T.C. Sexual communication with pheromones. In: BELL W.J.; CARDÉ R.T. (Ed.). **Chemical Ecology of Insects**. New York: Chapman and Hall, 1984. p.356-383.

CHALFANT, R.B. A simplified technique for rearing the lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Phycitidae). **Journal of the Georgia Entomological Society**, v.10, p.33-37, 1975.

EL-SAYED, A.M. The Pherobase: Database of Insect Pheromones and Semiochemicals. <<http://www.pherobase.com>>2010.

FUNDERBURK, J.E.; HERZOG, D.C.; MACK, T.P.; LYNCH, R.E. Sampling lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Pyralidae) adults in several crops with reference to adult dispersion patterns. **Environmental Entomology**, v.14, p.453-458, 1985.

GROOT, A.T.; INGLIS, O.; BOWDRIDGE, S.; SANTANGELO, R.G.; BIANCO, C.; LÓPEZ, J.D.; VARGAS, A.T.; GOULD, F.; SCHAL, C. Geographical and temporal variation in moth chemical communication. **Evolution**, v.63, p.1987-2003, 2009.

JHAM, G.N.; SILVA, A.A. da; LIMA, E.R.; VIANA, P. Identification (GC and GC-MS) of unsaturated acetates in *Elasmopalpus lignosellus* and their biological activity (GC-EAD and EAG). **Journal of Separation Science**, v.28, p. 281-285, 2005.

JHAM, G.N.; SILVA, A.A. da; LIMA, E.R.; VIANA, P.A. Identification of acetates in *Elasmopalpus lignosellus* pheromone glands using a newly created mass spectral database and Kovats retention indices. **Química Nova**, v.30, p.916-919, 2007.

JOHNSON, S.J.; SMITH, J.W. Jr. Biology of *Orgilus elasmopalpi* (Hym.: Braconidae) with *Elasmopalpus lignosellus* (Lep.: Pyralidae) as host. **Entomological Society of America**, v.73, p.572-575, 1980.

KALINOVÁ, B.; JIROS, P.; ZD'ÁREK, J.; WEN, X.; HOSKOVEC, M. GC x GC/TOF MS technique - A new tool in identification of insects pheromones: analysis of the persimmon bark borer sex pheromone gland. **Talanta**, v.69, p.542-547, 2006.

LEAL, W.S.; KUWAHARA, S.; ONO, M.; KUBOTA, S. (*R,Z*)-7,15-hexadecadien-4-olide, sex pheromone of the yellowish elongate chafer, *Heptophylla picea*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.4, p.315-321, 1996.

LINGREN, P.D.; BURTON, J.; SHELTON, W.; RAULSTON, J.R. Night vision goggles: for design, evaluation, and comparative efficiency determination of a pheromone trap for capturing live adult male pink bollworms. **Journal of Economic Entomology**, v.73, p.622-630, 1980.

LYNCH, R.E.; KLUN, J.A.; LEONHARDT, B.A.; SCHWARZ, M.; GARNER, J.W. Female sex pheromone of the lesser cornstalk borer, *Elasmopalpus lignosellus* (Lepidoptera: Pyralidae). **Environmental Entomology**, v.13, p.121-126, 1984.

MILLER, D.R.; MILLAR, J.G.; MANGINI, A.; CROWE, C.M.; GRANT, G.G. (*3Z,6Z,9Z,12Z,15Z*)-Pentacosapentaene and (*Z*)-11-hexadecenyl acetate: sex attractant blend for *Dioryctria amatella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**, v.103, p.1216-1221, 2010.

MOAR, W.J.; PUSZTAI-CAREY, M.; MACK, T.P. Toxicity of purified proteins and the HD-1 strain from *Bacillus thuringiensis* against Lesser Cornstalk Borer (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**, v.88, p.606-609, 1995.

MORAES, M.C.B.; BORGES, M.; PAREJA, M.; VIEIRA, G.H.; DE SOUZA SERENO, F.T.P.; LAUMANN, R.A. Food and humidity affect sex pheromone ratios in the stink bug, *Euschistus heros*. **Physiological Entomology**, v.33, p.43-50, 2008.

MORAES, M.C.B.; SOUSA, L.M.P. de; LAUMANN, R.; BORGES, M. Metodologia para estudos de semioquímicos e a sua aplicação no manejo de pragas. A influência de voláteis de soja no comportamento do parasitóide *Telenomus podisi*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 6p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Circular Técnica**, 24).

NIST Mass Spectral Search for the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library Version 2.0. Gaithersburg. Maryland: Office of the Standard Reference Data base, National Institute of Standards and Technology, 2005.

PARON, M.R.; QUINTELA, E.D.. Parasitismo de *Trichogramma pretiosum* sobre ovos de *Elasmopalpus lignosellus* em arroz. In: CONGRESSO DA CADEIA PRODUTIVA DE ARROZ, REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE ARROZ, 2002. **Anais**. p.493-495. (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 134).

PHILIPS, T.W. Semiochemicals of stored-product insects: research and applications. **Journal of Stored Products Research**, v.33, p.17-30, 1997.

PIRES, C.S.S.; VILELA, E.F.; VIANA, P.A.; FERREIRA, J.T.B. Avaliação no campo do feromônio sexual sintético de *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.21, p.59-68, 1992.

SILVA, A.A. da. **Identificação de acetatos monoinsaturados candidatos a feromônio sexual de *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae)**. 2001. 97p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

STONE, K.J. Reproductive biology of the Lesser Cornstalk Borer. I Rearing Technique. **Journal of Economic Entomology**, v.61, p.1712-1714, 1968.

VALENTE, A.L.P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida, **Química Nova**, v.23, p.523-530, 2000.

VIANA, P.A. Importância econômica e bioecologia da broca *Elasmopalpus lignosellus*. **Simpósio Latino Americano de cana-de-açúcar**, 2. 1993. Maceió. 1993. p.1-21.

VIANA, P.A.; Lagarta-elasma. In: SALVADORI, J.R.; ÁVILA, C.J.; SILVA, M.T.B. da (Ed.). **Pragas de solo no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo; Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz Alta: Fundacep Fecotrigô, 2004. p.379-408.

VIANA, P.A.; COSTA E.F. da. Manejo da lagarta elasma, *Elasmopalpus lignosellus*, na cultura do milho, através da umidade do solo. In: **Relatório técnico anual do Centro Nacional de Pesquisa de milho e sorgo 1988-1991**. Embrapa Milho e Sorgo, 1992. v.5, 59p.

ZARBIN P.H.G. Extração, isolamento e identificação de substâncias voláteis de insetos. In: VILELA, E.F.; DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed.). **Feromônios de insetos. Biologia, química e emprego no manejo de pragas**. Riberão Preto: Holos, 2001. p.45-50.

ZARBIN, P.H.G.; FERREIRA, J.T.B.; LEAL, W.S. Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrutural de feromônios de insetos. **Química Nova**, v.22, p.263-268, 1999.

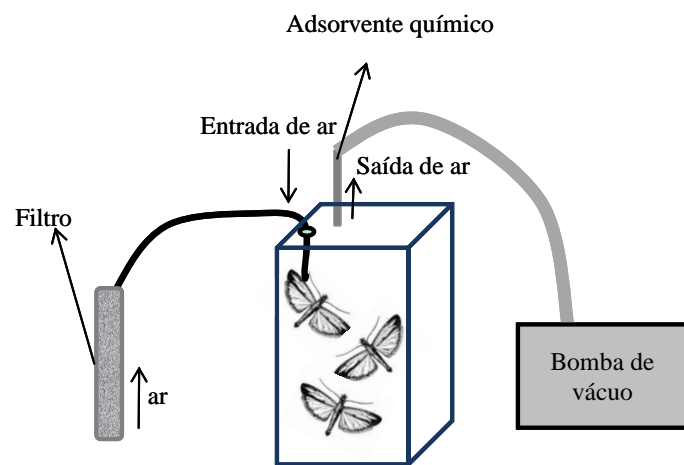


Figura 1. Sistema de aeração para coleta de voláteis emitidos por *Elasmopalpus lignosellus*, em câmara de vidro usando o sistema de aeração forçada.

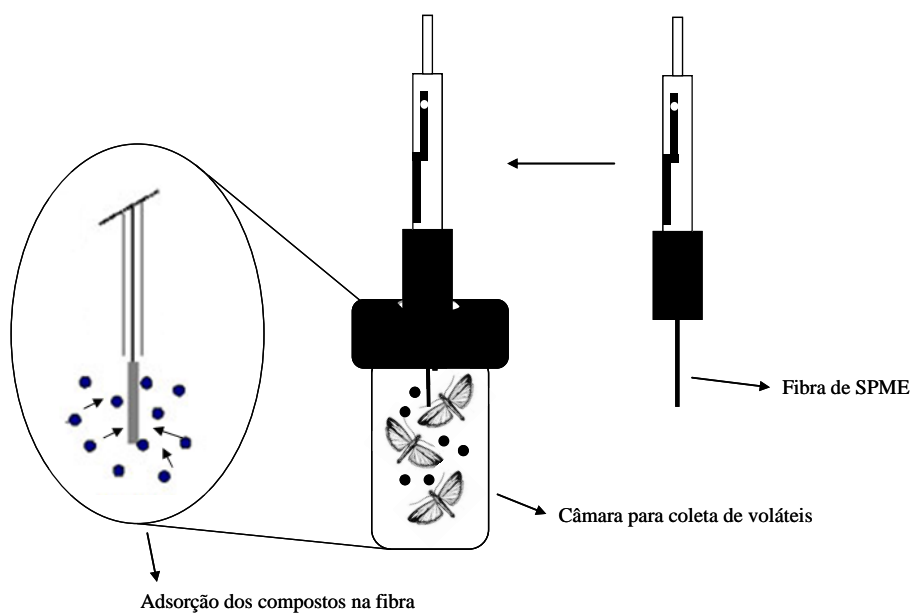


Figura 2. Ilustração do processo de concentração na microextração em fase sólida SPME.

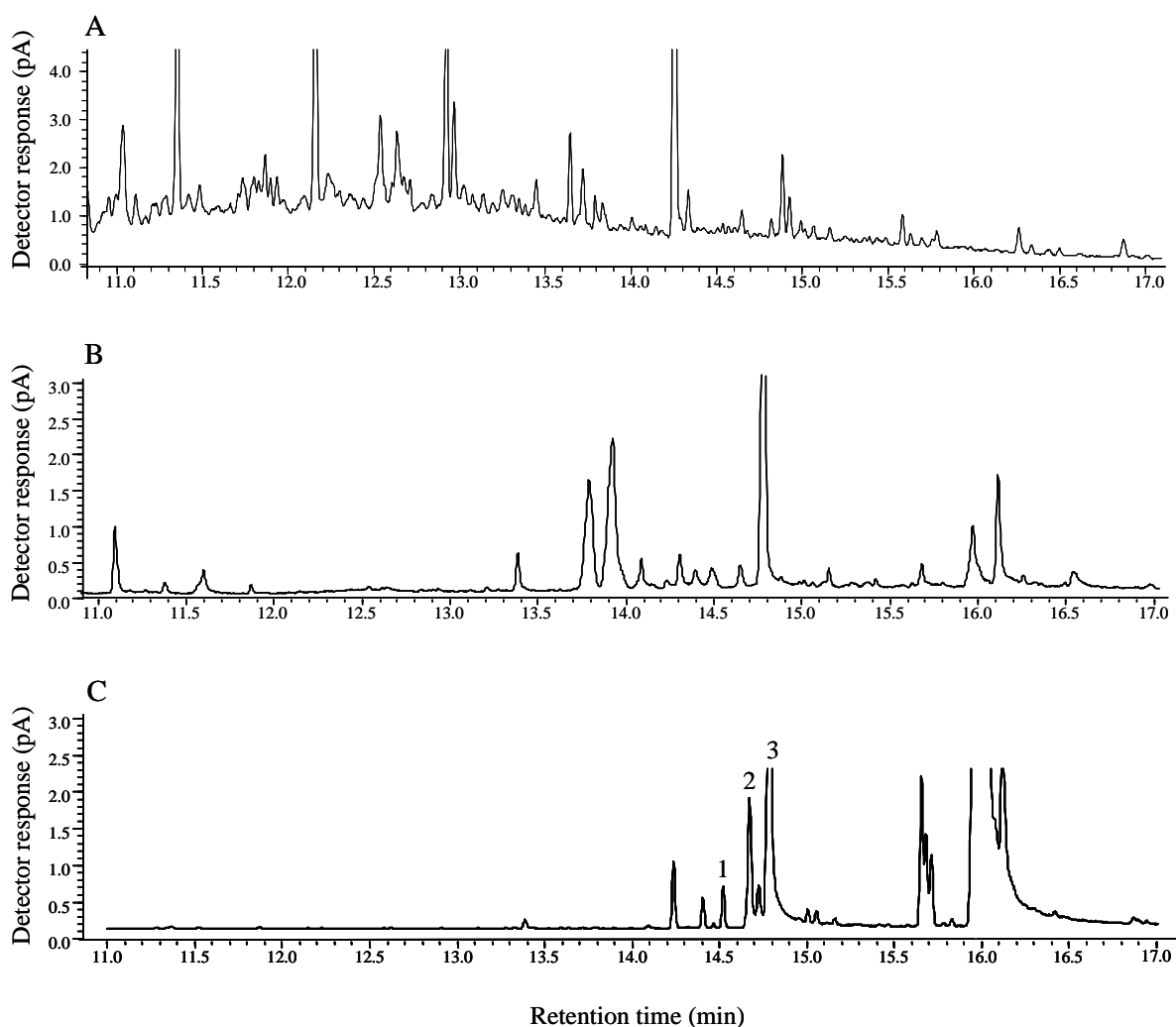


Figura 3. Perfil cromatográfico dos extratos de fêmeas de *Elasmopalpus lignosellus* (pA= picoAmpère). Análise qualitativa usando cromatografia gasosa acoplada ao espectômetro de massas (CG-EM). A. Voláteis isolados em sistema de extração por aeração (adsorvente Super Q). B. Voláteis adsorvidos em aeração por microextração em fase sólida (SPME). C. Isolamento de feromônio em extração por solvente de glândulas feromonais. Composto 1. Acetato de hexadecila KI= 2014, 2. Acetato de (Z)-11-hexadecenila KI= 2004 e 3. Acetato de (Z)-9 ou (Z)-8 de hexadecenila KI= 1995.

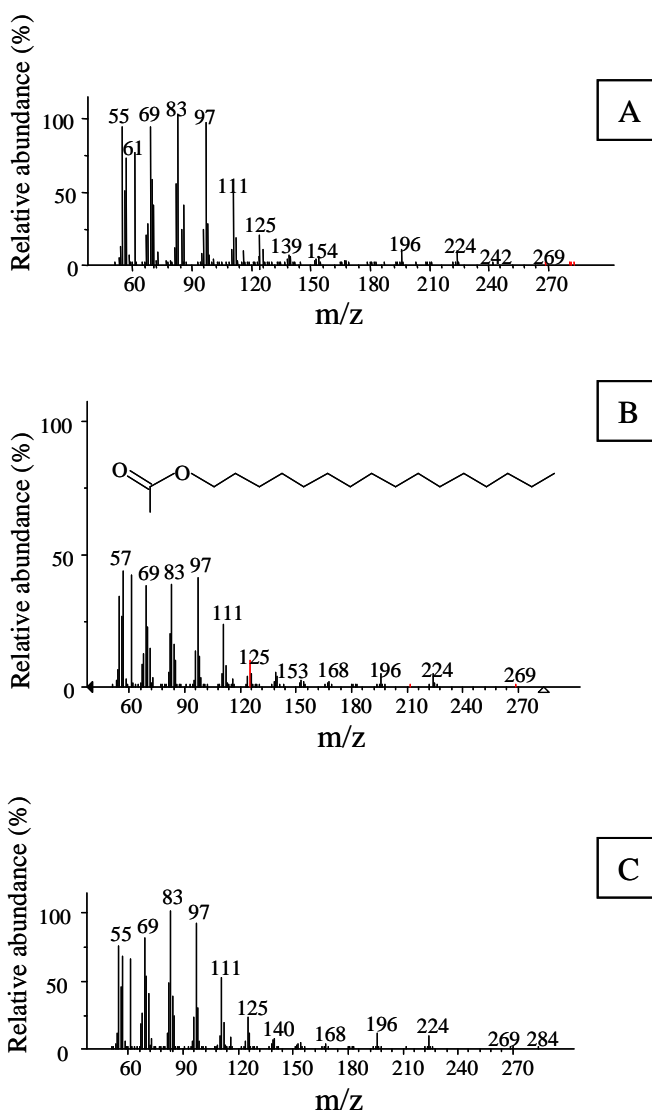


Figura 4. A. Espectro de massas de acetato de hexadecila (composto 1) identificado a partir dos extratos de glândulas feromonais de *Elasmopalpus lignosellus*; B. Espectro de massas deste composto da biblioteca NIST e C. Espectro de massas do padrão autêntico do composto acetato de hexadecila. Análise qualitativa realizada por cromatografia gasosa acoplada a um espectômetro de massas (CG-EM).

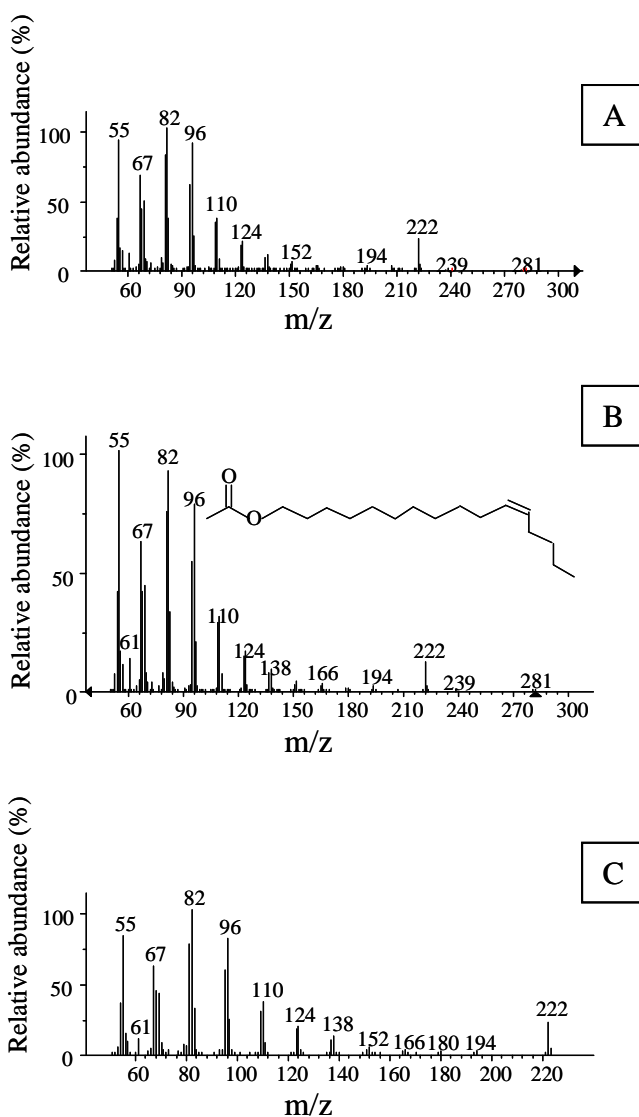


Figura 5. A. espectro de massas de acetato de (Z)-11-hexadecenila (composto 2) identificado no extrato de glândula de *Elasmopalpus lignosellus*; B espectro de massas deste composto sugerido pela biblioteca Nist e C. Espectro de massas do padrão autêntico de acetato de (Z)-11-hexadecenila. Análise qualitativa realizada por cromatografia gasosa acoplada a um espectômetro de massas (CG-EM).

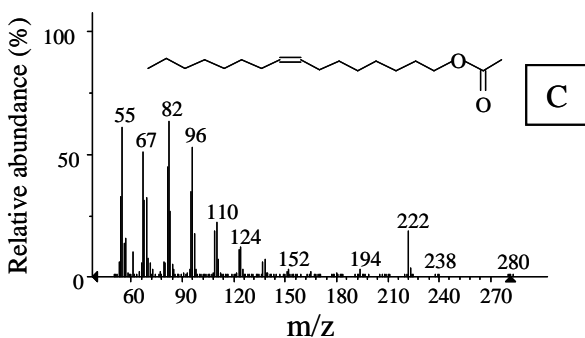
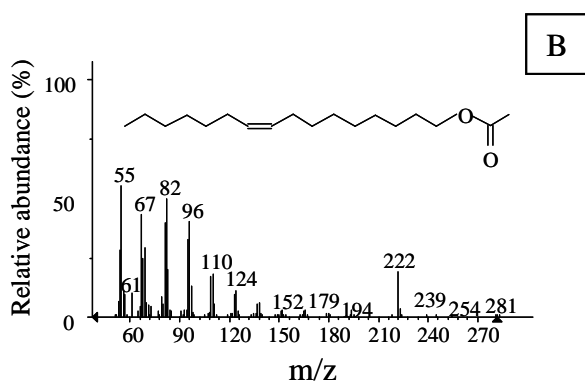
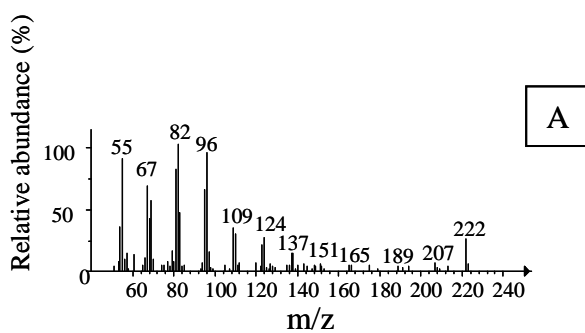


Figura 6. A Espectro de massas de acetato de (*Z*)-9-hexadecenila (composto 3) com KI-1995 identificado no extrato de glândulas de *Elasmopalpus lignselus*, B. Espectro de massas obtido da biblioteca NIST acetato de (*Z*)-9-hexadecenila e C. Espectro de massas obtido da biblioteca NIST acetato de (*Z*)-8-hexadecenila. Análise qualitativa realizada por cromatografia gasosa acoplada a um espectômetro de massas (CG-EM).

CONCLUSÕES GERAIS

1. A herbivoria de *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) induz a defesa indireta em plantas de milho;
2. A mudança no perfil de voláteis liberados por plantas de milho, após dano de herbivoria por lagartas de *E. lignosellus*, afeta o comportamento do parasitóide de ovos *Trichogramma pretiosum* Riley;
3. A idade dos casais (0 a 168 horas após emergência) tem efeito na frequência de acasalamento de *E. lignosellus*;
4. O período de acasalamento ocorreu preferencialmente, entre 6 a 8 horas do período de escuro;
5. A duração do acasalamento de *E. lignosellus* foi, em média, de $93,97 \pm 4,13$ minutos;
6. A idade dos machos (0-24, 24-48, 48-72 e 72-96 horas após emergência) de *E. lignosellus* influencia na frequência de resposta para fêmeas em comportamento de chamamento;
7. A idade das fêmeas (0-24, 24-48, 48-72 e 72-96 horas após emergência) não interfere na resposta dos machos, em túnel de vento, nas quatro idades avaliadas;
8. Os machos, entre 48-72 horas de idade, apresentam menor comportamento de resposta para fêmeas em comportamento de chamamento e maior tempo de resposta nos bioensaios em túnel de vento;
9. Os machos, ao responderem ao chamamento das fêmeas, apresentam comportamento como: vibração de antenas e asas, voo em direção a fonte de odor, caminhar em círculo e caminhar linear e em zigue zague em direção as fêmeas;
10. Os machos entre 24 e 48 horas de idade podem estar em estado reprodutivo e fisiológico ótimo para reprodução e resposta ao feromônio sexual;

11. A extração de glândula é a técnica mais eficiente, dentre as técnicas avaliadas para coleta de feromônio sexual de *E. lignosellus*; e
12. Os compostos: acetato de hexadecila, acetato de (*Z*)-11-hexadecenila e acetato de (*Z*)-9-hexadecenila ou (*Z*)-8-hexadecenila, são possíveis componentes do feromônio sexual de *E. lignosellus*.

ANEXO I

Procedimento de manutenção da colônia de *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera: Pyralidae).

1. OBJETIVO

É objetivo deste procedimento é estabelecer as diretrizes para a manutenção de colônia de *E. lignosellus*, permitindo a obtenção de insetos saudáveis e em número suficiente para execução de pesquisas de ecologia química (bioensaios, experimentos e aerações).

2. REFERÊNCIAS

2.1 Complementares

CHALFANT, R.B. A simplified technique for rearing the lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Phycitidae). **Journal of the Georgia the Entomological Society**, v.10, p.33-37, 1975.

VIANA, P.A. Importância econômica e bioecologia da broca *Elasmopalpus lignosellus*. **Simpósio Latino Americano de cana-de-açúcar**, 2. 1993. Maceió. 1993. p.1-21.

VIANA, P.A.; Lagarta-elasma. In: SALVADORI, J.R.; ÁVILA, C.J.; SILVA, M.T.B. da. (Ed.). **Pragas de solo no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo; Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz Alta: Fundacep Fecotrigo, 2004. p.379-408.

TIPPINS, H.H. A review of information on the Lesser Cornstalk Borer, *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller). In: **A Review of information on the Lesser cornstalk borer *Elasmopalpus lignosellus***. TIPPINS, H.H. (Ed.). Athens: University of Georgia. (Special Publication, 17). 1982. 64p.

TIPPINS, H.H. (Ed.). **A review of information on the Lesser Cornstalk Borer, *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller)**. Athens: University of Georgia. (Special Publication, 17). 1982. 64p.

2.2 Cruzadas

MENEGUIM, A.M.; PARRA, J.R.P.; HADDAD, M.L. Comparação de dietas artificiais, contendo diferentes fontes de ácidos graxos, para a criação de *Elasmopalpus lignosellus*. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.26, p.35-43, 1997.

3. DESCRIÇÃO

3.1 Sinonímia

Criação em laboratório da lagarta elasm.

3.2 Materiais utilizados

- a)** Potes plásticos (140 mL) com tampa;
- b)** Tesoura;
- c)** Dieta artificial (anexo A);
- d)** Papel toalha cortado em círculo (diâmetro da gaiola);
- e)** Tule;
- f)** Ligas de borracha;
- g)** Agulha de seringa;
- h)** Caneta para retroprojeter;
- i)** Álcool 70%;
- j)** Vermiculita fina;
- k)** Proveta de 10 mL;

- l)** Proveta (2L);
- m)** Etiquetas;
- n)** Cartolina branca;
- o)** Sacos plásticos comuns e autoclaváveis; e
- p)** Pipeta Pasteur.

3.3 Equipamentos e utensílios

- a)** Capela de fluxo laminar;
- b)** Balança;
- c)** Lâmpada UV germicida;
- d)** Liquidificador comum e industrial;
- e)** Espátula;
- f)** Prancheta;
- g)** Fita crepe;
- h)** Barbante;
- i)** Gaiolas de cano PVC (20 cm de diâmetro x 20 cm de altura) com 3 aberturas, uma com 3,5cm de diâmetro para a entrada de insetos e duas laterais (8mm) para entrada de tubos de vidro;
- j)** Panela de aço;

- k)** Pincel (n° 2);
- l)** 3 Pissetas (500 mL);
- m)** Becker plástico (100 mL) e de vidro (1L);
- n)** Recipiente de plástico para acondicionamento de vermiculita (2L); e
- o)** Recipiente de plástico para acondicionamento dos ovos (1L).

3.4 Valores de referência e de criticidade

A porcentagem de emergência de *E. lignosellus* em dieta artificial é de 60%.

3.5 Conteúdo

Metodologia.

3.5.1 Montagem das gaiolas de adultos:

- a) Fixar a etiqueta (Anexo B) com fita crepe e anotar a data de montagem (Fig. 1 A e B);
- b) Fechar a gaiola nas duas extremidades com tecidos (tule), presos com ligas de borracha (Fig. 1 C a G);
- c) Alimentação de adultos: Colocar cerveja (Anexo C) em dois tubos de vidro (Anexo D) que devem ser presos à gaiola com liga de borracha, sendo a base destes tubos protegida com fita crepe. Substituir diariamente a cerveja. Ao substituir, lavar os tubos e esterilizar (Anexo E), quando necessário (Fig. 1 H a R);
- d) Colocar papel toalha branco, como substrato de postura, na parte superior e inferior da gaiola (coberto com tule e preso com liga de borracha). Como suporte para gaiola, recortar uma cartolina branca (30cmx15cm), dobrar ao meio, envolvê-la em saco plástico e fechar com fita crepe (Fig. 1 S a Z);
- e) Observar diariamente o substrato de postura e, se necessário, retirar e substituir (Anexo F);
- f) Colocar 30 casais recém emergidos (Anexo G) por gaiola; e

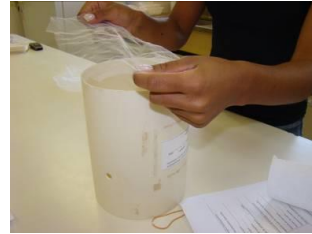
g) A gaiola deve ser desmontada 15 dias após a montagem.



A



B



C



D



E



F



G



H



I



J



L



M



N



O



P



Q



R



S



T



U



V



X



Z

Fig. 1. Sequência para montagem da gaiola dos adultos de *E. lignosellus*.

3.5.2. Colocação de lagartas neonatas em potes com dieta:

- Retirar os potes com dieta da geladeira e manter a temperatura ambiente por 1 hora;
- Abrir os potes na capela de fluxo e deixar por 20 minutos na luz U.V. (germicida);
- Se necessário, secar os potes com papel toalha para retirar toda água condensada;
- Colocar sobre a dieta uma camada fina (aproximadamente 2mm) de vermiculita autoclavada (Anexo H) (Fig. 2 A);
- Separar 80 lagartas neonatas em uma bandeja, misturar com aproximadamente 4g de vermiculita e distribuir em 10 potes com dieta (proporção de 8 lagartas/pote) (Fig. 2 B a F);
- Após, cobrir a dieta com uma camada de 0,5 cm de vermiculita, tampar o pote e perfurar a tampa com agulha (20 perfurações) (Fig. 2 G a I);
- Quantificar os potes (Tabela 1 - Anexo I), anotar na tampa a data de repicagem e acondicioná-los em B.O.D. (Fig. 2 J); Especificar na etiqueta (Anexo J) a data de repicagem, quantidade de potes e a data prevista de emergência (Fig. 2 L e M); e
- O procedimento de repicagem das lagartas neonatas descrito anteriormente deve ser realizado diariamente (início da manhã e final da tarde).

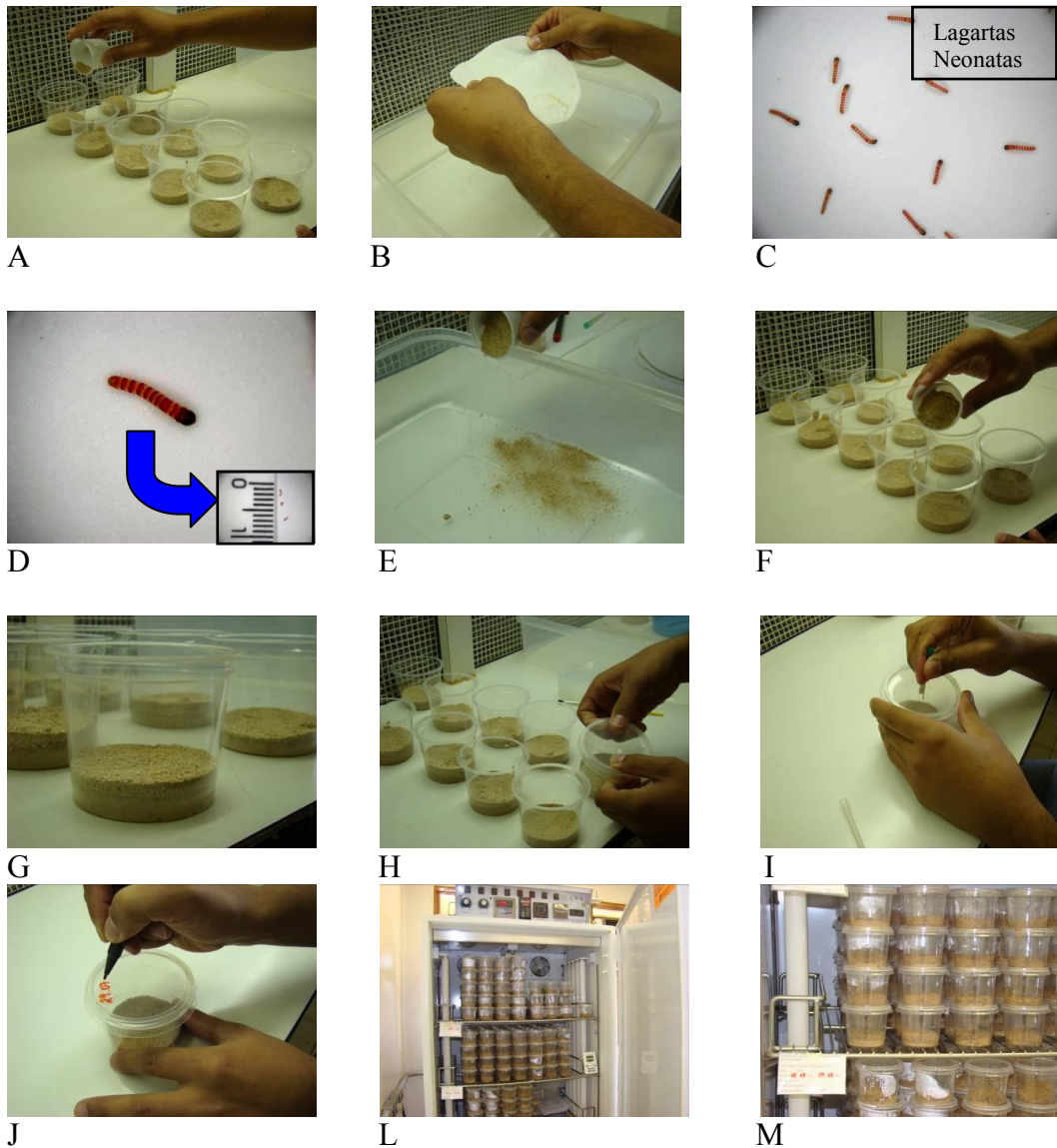


Fig. 2. Sequência para repicagem das lagartas de *E. lignosellus*.

3.5.3. Emergência de adultos:

- Após 25 dias (a partir da data de colocação das lagartas neonatas na dieta), observar diariamente a ocorrência de emergência, retirar os adultos e quantificá-los (Fig.3 e Tabela 2 - Anexo L). Descartar estes potes 45 dias após a preparação. Antes do descarte, manter os potes em freezer (- 20°C por 5 h).



Fig. 3. Adulto de *E. lignosellus* retirado do pote e acondicionado em gaiola.

Anexo

A. Dieta Artificial

Água Destilada (fria)	1.280 mL
Água Destilada (quente)	1.300 mL
Feijão Moído	420 g
Levedo de Cerveja	128 g
Germe de Trigo Moído	200 g
Agar	40 g
Ácido Ascórbico	13 g
Nipagin	8 g
Ácido Sórbico	4 g
Tetraciclina	0,25 g
Mistura de Vanderzant's	5 g
Formaldeído (36 a 40%)	8 mL
Inibidor de Fungos	10 mL
Acido Linolenico 55%	10 mL

Fonte: Chalfant (1975), modificado por Viana (1993).

B. Etiqueta para as gaiolas (5cm x 4cm)

Laboratório de Bioecologia e Semioquímicos Embrapa Cenargen
Adultos de <i>Elasmopalpus lignosellus</i>
Instalação: Período: ___ \ ___ a ___ \ ___ 2008
Número de machos: ____
Número de fêmeas: ____

Fonte: Embrapa Milho e Sorgo
Laboratório de Entomologia / Resistência de Plantas
e Manejo de Pragas (modificada)

C. Alimento de adultos

- Abrir uma lata de cerveja sem álcool, colocar em uma pisseta e deixar aberta por 1 hora, para retirar o gás da bebida;
- Após, fechar e acondicionar em geladeira;
- Colocar cerveja nos tubos de vidro; e
- Após aberta, a cerveja pode ser utilizada por um período máximo de três dias.

D. Tubos de vidro para cerveja

- Utilizar uma pipeta Pasteur (com ponta quebrada) e aquecê-la em bico de Bunsen de maneira que fique em forma de L, posteriormente fechar uma das extremidades.

E. Esterilização dos tubos de vidro

- A cada 15 dias, esterilizar os tubos de vidro (Anexo D) em Hipoclorito de sódio a 5% (colocar a solução nos tubos com auxílio de uma pisseta), deixando de molho por 2 horas. Após, passar em água e deixar secar.

F. Substituição do substrato de postura

A oviposição ocorre a partir do segundo dia após a emergência e será necessário substituir o substrato de postura quando os ovos ficarem com coloração vermelha (Fig. 4). Manter os

substratos de postura por 3 dias (período de eclosão) em um pote fechado (item 3.3), diariamente observar a eclosão das lagartas e realizar repicagem duas vezes ao dia (item 3.5.2).



Fig. 4. Observação dos ovos de *E. lignosellus* no substrato de postura.

G. Diferenciação entre macho e fêmea



Machos: Asas anteriores claras na parte central, com as margens escuras. Os palpos labiais são mais longos e eretos nos machos; e

Fêmeas: Asas anteriores escuras.

Fig. 5. Macho e fêmea de *E. lignosellus*.

H. Autoclavagem da vermiculita

- Distribuir 0,5 quilos de vermiculita (batida em liquidificador) umedecida em 3 sacos plásticos autoclaváveis, fechar com barbante, deixando parcialmente aberto;
- Ligar a autoclave no máximo até atingir a temperatura de 120°C, após ajustar para o médio durante 20 minutos;
- Desligar a autoclave, abrir a válvula para a saída do vapor. Após a saída de todo vapor, abrir a autoclave e fechar os sacos;
- Passar álcool a 70% em recipiente plástico (2L) e em um copinho plástico de café e deixar na capela por 20 minutos na luz germicida;
- Abrir os sacos com vermiculita autoclavada na capela e colocar no recipiente esterilizado; e

- Utilizar a vermiculita autoclavada por 10 dias e autoclavar novamente, caso não seja totalmente utilizada durante este período.

I. Tabela 1

Tab 1. Emergência de adultos *Elasmopalpus lignosellus*

Embrapa Cenargen

Laboratório de Bioecologia e Semioquímicos

Ano:

Geração:				Geração:			
		Mês:				Mês:	
Data	Machos	Fêmeas	Total	Data	Machos	Fêmeas	Total
01				01			
02				02			
03				03			
04				04			
05				05			
06				06			
07				07			
08				08			
09				09			
10				10			
11				11			
12				12			
13				13			
14				14			
15				15			
16				16			
17				17			
18				18			
19				19			
20				20			
21				21			
22				22			
23				23			
24				24			
25				25			
26				26			
27				27			
28				28			
29				29			
30				30			
31				31			
Total				Total			

Fonte: Embrapa Milho e Sorgo

Laboratório de Entomologia / Resistência de Plantas e Manejo de Pragas (modificada)

J. Etiqueta (10 cm x 5 cm) para as prateleiras da B.O.D.

Laboratório de Bioecologia e Semioquímicos Embrapa Cenargen Multiplicação de <i>Elasmopalpus lignosellus</i> Período de repicagem: _____ Numero de copos: _____ Numero de Lagartas: _____ Previsão de emergência: ____ / ____ /2009

Fonte: Embrapa Milho e Sorgo
Laboratório de Entomologia / Resistência de Plantas
e Manejo de Pragas (modificada)

L. Tabela 2

Tab 2. Repicagem de lagartas – Criação de *Elasmopalpus lignosellus*
Embrapa Cenargen
Laboratório de Bioecologia e Semioquímicos

Data da repicagem	Número de potes	Início da emergência

Fonte: Embrapa Milho e Sorgo
Laboratório de Entomologia / Resistência de Plantas e Manejo de Pragas (modificada)

ANNEX II

Time of mating of forty one couples of *Elasmopalus lignosellus* (mean \pm SE) (0-168 hours old after emergence), during scotophase of a photoperid of 12L: 12D.

Couple	Time of mating of each couple/minutes
1	71
2	101
3	48
4	78
5	82
6	106
7	153
8	74
9	67
10	96
11	80
12	76
13	84
14	101
15	127
16	105
17	74
18	113
19	84
20	127
21	102
22	64
23	92
24	105
25	85
26	68
27	64
28	87
29	82
30	123
31	134
32	101
33	75
34	81
35	134
36	153
37	114
38	74
39	135
40	49
41	84
Mean	93.97 \pm 4.13