

LUISA FERNANDA PATIÑO GRISALES

RESPOSTA DE *Cotesia flavipes* A VOLÁTEIS DE PLANTAS  
DE CANA DE AÇÚCAR ATACADAS OU NÃO POR *Diatraea*  
*saccharalis*

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das exigên-  
cias do Programa de Pós-graduação em  
Entomologia, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P298r  
2013

Patiño Grisales, Luisa Fernanda, 1989-  
Resposta de *Cotesia flavipes* a voláteis de plantas de cana  
de açúcar atacadas ou não por *Diatraea saccharalis* / Luisa  
Fernanda Patiño Grisales. – Viçosa, MG, 2013.  
xiii, 77 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Eraldo Rodrigues de Lima.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Relação inseto-planta. 2. Parasitismo. 3. Cana de açúcar.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento Entomologia.  
Programa de Pós-Graduação em Entomologia. II. Título.

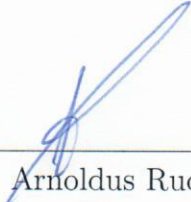
CDD 22 ed. 595.7154

LUISA FERNANDA PATIÑO GRISALES

RESPOSTA DE *Cotesia flavipes* A VOLÁTEIS DE PLANTAS  
DE CANA DE AÇÚCAR ATACADAS OU NÃO POR *Diatraea*  
*saccharalis*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de Julho de 2013.



---

Prof. Arnoldus Rudolf Maria  
Janssen



---

Dr. Lessandro Moreira Gontijo



---

Prof. Eraldo Rodrigues de Lima  
Orientador

Em primeiro lugar  
dedico esta vitória a Deus.  
A meus Pais.  
Dedico também a minha Irmã  
e meu enamorado German Estrada  
que nunca duvidaram do meu potencial.

## Agradecimentos

Novamente agradeço a Deus.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa e ao programa de Entomologia pela oportunidade de cursar meu mestrado.

Agradeço aos meus conselheiros e ao Sr. Jose Manuel pela colaboração nas atividades praticas de meu trabalho.

Ao professor Eraldo Lima por sua tremenda visão científica, pela oportunidade de cursar o mestrado em Entomologia e por ter acreditado no estudo desenvolvido com cana de açúcar.

Ao professor Arne pelo apoio e orientação com meus experimentos.

Ao Hernane, Aline, Claryssa e Debóra pela amizade e apoio na vida acadêmica.

À Sandra pela colaboração com as análises químicas e a toda a galera do laboratório de Semioquímicos e comportamento de insetos pelo apoio e ajuda quando foi preciso.

À minha família (Gloria Diva, Jaime Hernando, Elsa Maria) e enamorado (German Estrada) e a todos aqueles que de certa forma acreditam em mim.

A meus pais e irmã pelo financiamento, ao editor de texto LATEX e ao programa estatístico R.

E finalmente, agradeço à vida por ser tão gentil e me proporcionar tão bons momentos.

## Biografia

Luisa Fernanda Patiño Grisales, filha de Jaime Hernando Patiño Jimenez e Gloria Diva Grisales Gusman, nasceu em Manizales, Caldas, Colômbia, o 05 de janeiro de 1989.

Em julho de 2011, graduou-se em Engenharia Agrônoma, pela Universidade de Caldas, Manizales - Caldas - Colômbia. Durante seu nono período aprofundou em sistemas de produção agrícola.

Em agosto de 2011, iniciou o curso de Mestrado em Entomologia, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG, defendendo a tese em julho de 2013

## Conteúdo

	Página
Lista de Figuras . . . . .	vii
Lista de Tabelas . . . . .	ix
Resumo . . . . .	x
Abstract . . . . .	xii
Introdução Geral . . . . .	1
Referências . . . . .	10
Capítulo 1 - Preferência de <i>Cotesia flavipes</i> por espécies de Cana de açúcar . . . . .	18
1 Introdução . . . . .	21
2 Material e Métodos . . . . .	25
2.1 Produção das plantas de cana de açúcar . . . . .	25
2.2 Criação de <i>Diatraea saccharalis</i> e <i>Cotesia flavipes</i> . . . . .	25
2.3 Experimento de olfatômetro e semi-campo . . . . .	26
3 Resultados . . . . .	29
3.1 Escolha do hospedeiro em olfatômetro . . . . .	29

3.2 Escolha do hospedeiro em condições de semi-campo . . . . .	31
<b>4 Discussão . . . . .</b>	<b>34</b>
<b>5 Referências . . . . .</b>	<b>38</b>
<b>Capítulo 2 - Identificação de voláteis de cana induzidos por herbivoria . . . . .</b>	<b>47</b>
<b>1 Introdução . . . . .</b>	<b>50</b>
<b>2 Material e Métodos . . . . .</b>	<b>53</b>
2.1 Produção das plantas de cana de açúcar . . . . .	53
2.2 Criação de <i>Diatraea saccharalis</i> . . . . .	53
2.3 Extração de compostos voláteis liberados por <i>Saccharum</i> sp. infestado com <i>Diatraea saccharalis</i> e plantas limpas. . . . .	54
2.4 Identificação dos compostos voláteis . . . . .	55
<b>3 Resultados . . . . .</b>	<b>56</b>
<b>4 Discussão . . . . .</b>	<b>61</b>
<b>5 Referências . . . . .</b>	<b>66</b>
<b>Conclusões Gerais . . . . .</b>	<b>77</b>

## Lista de Figuras

	Página
1	Resposta de <i>Cotesia flavipes</i> em olfatômetro de tubo Y a odores de genótipos de plantas de cana de açúcar limpas ou infestadas por <i>Diatraea saccharalis</i> . Os asteriscos indicam diferenças significativas entre cada teste de escolha ***P <0,001. As barras indicam o erro padrão. . . . . 30
2	Resposta de <i>Cotesia flavipes</i> em olfatômetro de tubo Y a odores de genótipos de plantas de cana de açúcar infestadas por <i>Diatraea saccharalis</i> , em olfatômetro de tubo Y. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre cada teste de escolha ** P <0,01, ***P <0,001. As barras indicam o erro padrão. . . . . 31
3	Proporção de parasitismo de <i>Cotesia flavipes</i> em diferentes genótipos de plantas de cana de açúcar infestadas por <i>Diatraea saccharalis</i> , em condições de semi-campo. A proporção de parasitismo não foi significativamente diferente para os genótipos testados. As barras indicam o erro padrão. . . . . 32
4	Proporção de parasitismo de <i>Cotesia flavipes</i> em diferentes genótipos de plantas de cana de açúcar infestadas por <i>Diatraea saccharalis</i> , em campo. A proporção de parasitismo não foi significativamente diferente para os genótipos testados. As barras indicam o erro padrão. . . . . 33
5	Cromatogramas típicos de plantas de cana de açúcar limpas: Archi (1) Alpha pineno, (2) Decanal; White pararia (1) Hexanal, (2) Beta pineno, (3) Nonanal; RB867515 (1) Hexan-3-ol, (2) Hexanol, (3) Octanal, (4) Hexenil acetate <(3Z)->, (5) Nonanal, (6) Decanal. 57

- 6 Cromatogramas típicos de plantas de cana de açúcar infestadas por um período de 48 horas com broca da cana (*Diatraea saccharalis*): Archi (1) Hexan-3-ona, (2) Hexanal, (3) Hexanol <2->, (4) Metil butil acetato <2->, (5) Beta pineno, (6) Decanal, (7) Alpha copaeno; White pararia (1) Alpha pineno, (2) Beta pineno, (3) Octanal, (4) Ocimeno <(E) -beta->, (5) Nonanal; RB867515 (1) Hexanal, (2) Metil butil acetato <2->, (3) Beta pineno, (4) Octanal, (5) Nonanal, (6) Decanal . . . . . 58

## Lista de Tabelas

	Página
1 Compostos químicos voláteis identificados de plantas limpas e infestadas com <i>Diatraea saccharalis</i> por um período de 48h nos diferentes genótipos Archi, White pararia e RB867515. KI=Índice de Kovats. . . . .	59

## Resumo

PATIÑO GRISALES, Luisa F., M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Resposta de *Cotesia flavipes* a voláteis de plantas de cana de açúcar atacadas ou não por *Diatraea saccharalis*** Orientador: Eraldo Rodrigues de Lima. Co-orientador: Arnoldus Rudolf Maria Janssen.

Em todo o mundo plantações de cana de açúcar sofrem o ataque de pragas. Uma das principais pragas é a broca da cana *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae), uma característica marcante de *D. saccharalis* é a penetração no colmo, onde se alimenta do tecido afetando o ponto de desenvolvimento, produzindo o chamado "coração morto" devido à presença do fungo *Colletotrichum falcatum*. As plantas se protegem contra o ataque dos herbívoros através da combinação de defensas constitutivas e/ou induzidas que reduzem o desempenho dos herbívoros, interrompendo a propagação do dano. Conseqüentemente, as plantas respondem à alimentação de herbívoros artrópodes produzindo uma série de compostos secundários, incluindo os compostos voláteis orgânicos (VOCs), os quais são conhecidos por atrair os inimigos naturais. Os inimigos naturais como parasitoides, são capazes de explorar esses voláteis para localizar seus hospedeiros, como por exemplo, usando os sinais químicos da alimentação. Dessa forma, estudos de comportamento para fontes de odores são importantes para o entendimento das interações que ocorrem entre os organismos em uma teia alimentar. Assim como o conhecimento dos compostos químicos que meiam a localização de

plantas infestadas com herbívoros pelos inimigos naturais, para ter uma melhor compreensão da interação inseto-plantas influenciando o terceiro nível trófico. Diante isto, este trabalho investigou as respostas de *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenóptera: Braconidae) aos voláteis de plantas de cana de açúcar rusticas e atual (Archi, White pararia e RB867515), ilesas e infestadas por *D. saccharalis*. No capítulo 1 foram investigadas as preferências de *C. flavipes* ao conjunto de plantas induzidas a herbivoria e plantas ilesas tanto em laboratório quanto em condições de semi-campo. Os resultados mostram que a vespa parasítica apresenta diferentes respostas, sendo que em laboratório mostra escolha por espécies infestadas quanto em semi-campo não mostra preferência, no entanto apresentando parasitismo no hospedeiro. No segundo capítulo identificamos os compostos voláteis emitidos por plantas infestadas com *D. saccharalis* e plantas ilesas de cana de açúcar. Para acessar a esse resultado foi utilizado o GC-MS para a identificação dos compostos, mostrando que quando comparamos plantas ilesas com plantas infestadas foram encontrados e identificados uma quantidade superior de compostos voláteis nas plantas infestadas, principalmente das espécies Archi e White pararia, já que o perfil de voláteis da espécie RB867515 é bastante similar quando ilesa e infestada. Os resultados obtidos através da identificação destes compostos voláteis podem explicar as respostas obtidas no capítulo 1, os quais podem mediar no comportamento de forrageamento de *C. flavipes*. Em linhas gerais, pode-se concluir que esta vespa apresenta parasitismo independente do complexo planta-herbívoro, reduzindo a infestação e o dano por parte de *D. saccharalis* em plantas de cana de açúcar.

## Abstract

PATIÑO GRISALES, Luisa F., M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July of 2013. ***Cotesia flavipes* response to volatile plant sugar cane attacked or not by *Diatraea saccharalis*** Adviser: Eraldo Rodrigues de Lima. Co-Adviser: Arnoldus Rudolf Maria Janssen.

Worldwide sugar cane plantations suffer the pest attack. A major pest is the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae). A striking feature of *D. saccharalis* is the penetration on the stalk, feeding on the tissues; affecting the developmet point, resulting in a condition known as "dead heart" due to the presence of the fungus *Colletotrichum falcatum*. The plants can protect itself from herbivores attack by a combination of constitutive and/or inducible defenses that reduces the performance of herbivores, interrupting the spread of the damage. Accordingly, plants respond to feeding herbivorous arthropods producing a series of secondary metabolites, including volatile organic compounds (VOCs), which are known to attract natural enemies. Natural enemies such as parasitoids, are able to exploit these volatiles to locate their prey, for exemple, using feeding chemical signals. Thus, behavioral studies are important for understanding the interactions that occur between organisms in a food web. As the knowledge of the chemical compounds that mediate the location of plants infested with herbivores by natural enemies, to have a better understanding of insect-plant

interaction influencing the third trophic level. Given this, in this study was investigated the responses of *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) to volatile plant sugar cane rustic and current (Archi, White pararia and RB867515) unscathed and infested by *D. saccharalis*. In the Chapter 1 was investigated the preferences of *C. flavipes* to the set of plants induced to herbivory and plants unharmed in laboratory and semi-field conditions. The results show that the parasitic wasp provides different responses, in the laboratory showed choice for infested specie and semi-infested field conditions show no preference, but present parasitism in the host. In the second chapter we identify the volatile compounds emitted by plants infested with *D. saccharalis* and undamaged plants of sugarcane. To access this result was used for GC-MS for the identification of compounds, showing that when compared uninjured plants with infested plants were found and identified a larger quantity of volatile components in the infested plants, especially on the species Archi and White pararia, the profile of volatile of the specie RB867515 is very similar between infested and unharmed sugar cane plants. The results obtained through the identification of these volatile compounds may explain the outputs obtained in the chapter 1, which may mediate the foraging behavior of *C. flavipes*. In general, it can be concluded that this wasp showed parasitism, independently of the complex plant-herbivore, reducing infestation and damage by *D. saccharalis* in sugarcane plants.

## Introdução Geral

A herbivoria impacta o desenvolvimento vegetativo e/ou reprodutivo das plantas com consequências ecológicas e evolutivas (Dirzo, 1984; Coley et al., 1985; Begon et al., 1996). A magnitude do impacto pode depender do tecido consumido, da disponibilidade dos recursos e da intensidade e frequência do dano (Coley, 1983; Dirzo, 1984). Nas plantas o padrão de crescimento, a inversão de defesa e a longevidade se encontram correlacionadas, porque está na disjuntiva constante de crescer, se multiplicar ou se defender como argumenta a hipótese da disponibilidade de recursos (Coley et al., 1985).

Plantas desenvolveram uma grande variedade de estratégias para defesa contra herbívoros. Tais estratégias estão relacionadas com as características individuais da planta, as quais podem ser modificadas de acordo com a interação entre o herbívoro e seu inimigo natural, com a defesa atuando diretamente no herbívoro, em seu inimigo ou em ambos. Estas características podem ser tanto químicas (tais como toxinas, redutores de digestibilidade e balanço de nutrientes) ou físicos (tais como pubescência e tenacidade do tecido) (Price et al., 1980). A oportunidade de influenciar na interação entre herbívoros e inimigos naturais não seria boa se as características defensivas das plantas tivessem como resultado a morte rápida do herbívoro. Por esta razão, herbívoros provavelmente evoluíram, adaptando se ao meio, mostrando uma efetiva desintoxicação (Feeny, 1976), já que isto tem uma importante consequência para a interação entre o segundo e terceiro nível trófico (Price et al., 1980). Chan et al. (1978) estudou redutores de digestibilidade expressos em plantas em *Heliothis virescens* (Lepidoptera:Noctuidae) mostrando que, dependendo da porcentagem de tanino contido nas folhas, os inimigos naturais se beneficiam (Feeny, 1976). Mas estes redutores de digestibilidade

também podem afetar a interação entre o herbívoro e seu inimigo natural ao provocar a diminuição do tamanho corporal, e, portanto, a fecundidade do herbívoro (Campbell, 1962), influenciando na capacidade dos inimigos em controlar uma população de herbívoros (Van Emden, 1966; White, 1974).

Por outro lado, para que o inimigo natural encontre com êxito seu hospedeiro, é preciso a presença de misturas de compostos voláteis, os quais são os ingredientes odoríferos das plantas (Figueiredo et al., 2008) e também resultado da herbivoria. No entanto, a composição destes compostos varia de acordo com a parte e o estado fenológico da planta, sendo que, ao mesmo tempo, essa composição pode sofrer grandes alterações já que diferentes componentes nos estágios iniciais podem ter uma concentração de 10% a 50-70% em plena etapa de floração (Figueiredo et al., 2008). Segundo Máñez et al. (1991), as mudanças na composição dos voláteis com a maturação da planta são diretamente relacionadas com taxas mais elevadas de ciclização e desidratação dos compostos. Estes compostos também são conhecidos como semioquímicos, sendo importantes mediadores de interações tritróficas como predador-herbívoro-planta ou parasitóide-herbívoro-planta. Estudos comportamentais e químicos provaram que predadores e parasitóides podem ser atraídos por voláteis de plantas que são induzidos por suas presas ou hospedeiros (Agelopoulos & Keller, 1994; Blaakmeer et al., 1994; Turlings et al., 1995; Dicke et al., 1998; Du et al., 1998; Dicke et al., 1999; Shiojiri et al., 2001).

O perfil de compostos voláteis induzidos por herbívoros podem se diferenciar quantitativa e qualitativamente a partir do perfil emitido em resposta aos danos mecânicos, aumentando a liberação de voláteis a partir da alimentação do hospedeiro. Quando larvas de *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) se alimentam de *Nicotiana attenuata* ocorre um aumento na liberação de terpenóides e uma diminuição nos níveis de nicotina (Kahl et al., 2000); *Phytoseiulus persimilis* (Acarina: Phytoseiidae), inimigo natural do ácaro rajado *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae), é atraído pela mistura de compostos voláteis de várias espécies de plantas submetidas ao ataque pelo ácaro

raçado (Dicke et al., 1990b). A variação de odores de plantas induzidas tem sido estudada para determinação da especificidade do sinal, o que pode proporcionar para os parasitóides e predadores informações sobre a identidade, estágio e adequação do herbívoro que ataca a planta (Gouinguéné et al., 2001, 2003; Loughrin et al., 1995; Takabayashi et al., 1991b; Turlings et al., 1998b). Entretanto, a mistura de voláteis induzida pode variar entre os diferentes estágios do herbívoro que se alimentam de uma planta (Takabayashi et al., 1995). Além disso, o potencial para a especificidade é complicado devido à grande variabilidade na emissão de odor entre genótipos de plantas (Takabayashi et al., 1991b; Loughrin et al., 1995; Turlings et al., 1998b).

A produção e liberação de substâncias químicas voláteis que servem como sinais para atrair e aumentar a eficiência dos inimigos naturais dos herbívoros não se limita apenas às partes da planta acima do solo (Rasmann et al., 2005). Por exemplo, o nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis megidis* é atraído por exsudatos emitidos pelas raízes de plantas de milho após danos de *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). O componente mais importante dos exudados foi o sesquiterpeno (E)- $\beta$ -cariofileno, presente nas raízes danificadas. No entanto, através de melhoramento genético, genótipos de milho já possuem o gene responsável por esse volátil silenciado, sendo que na maioria das variedades que se originarem nos programas de melhoramento da América do Norte esse volátil não é emitido em quantidades detectáveis nas folhas de milho (Degen et al., 2004). A adição de (E)- $\beta$ -cariofileno em genótipos que não expressam este composto levou à mesma aceitação por parte de *H. megidis* que os genótipos que liberam este sesquiterpeno após a herbivoria (Rasmann et al., 2005). Não obstante, apesar do objetivo do melhoramento ser aumentar as características produtivas das plantas, algumas características e compostos destas tem se perdido durante suas reproduções nos programas de melhoramento. A perda de defesa direta contra os herbívoros durante a domesticação de plantas tem sido documentado (Sotelo, 1997), mas a perda de um sinal envolvendo defesa indireta tem sido pouco

estudado (Rasmann et al., 2005). No entanto, sabe-se que a emissão de voláteis em plantas tanto de forma constitutiva quanto induzida podem ser modificadas por melhoramento genético, existindo a possibilidade de melhorar a resistência de plantas contra pragas importantes tanto direta quanto indiretamente através do controle biológico melhorado (Åhman et al., 2010). O melhoramento convencional é uma rota para modificar o perfil de voláteis de plantas para que se tornem menos atraente para uma praga ou mais atraente para os inimigos naturais da praga, embora se tem demonstrado que os inimigos naturais podem ser atraídos aparentemente por voláteis liberados constitutivamente pelas plantas. Por exemplo, as preferências olfativas por diferentes variedades de plantas tem sido reportadas para parasitóides de afídeos em cevada (Glinwood et al., 2009) e repolho (Kalule & Wright, 2004) quando as plantas estavam visivelmente sem dano. Com o acúmulo de conhecimento sobre quais características das plantas são importantes para a seleção do hospedeiro, se torna possível uma criação mais seletiva do inimigo natural. Dessa forma, voláteis atraentes e repelentes estão sendo identificados em diversas culturas, incluindo batata doce (Wang & Kays, 2002), videira, (Tasin et al., 2006) e milho (Rasmann et al., 2005). A partir dessas informações os critérios de seleção são sugeridos para melhora direta ou indireta de resistência a pragas (Åhman et al., 2010).

No universo das plantas certamente há uma grande variação nas emissões de voláteis. No entanto, apenas um número limitado de voláteis são mais específicos e passíveis de exploração através do melhoramento convencional devido ao cruzamento de barreiras entre a planta de origem e a cultura. Ocorre variação genética intraespecífica das taxas e composição de emissões voláteis de espécies cultivadas, como algodão (Elzen et al., 1986), arroz (Hernández et al., 1989; Rapusas et al., 1996), batata-doce (Wang & Kays, 2002), pêra (Scutareanu et al., 2003), milho (Degen et al., 2004), trigo (Weaver et al., 2009), cenoura (Nissinen et al., 2005) e tomilho (Mewes et al., 2008). Entretanto, diferenças intraespecíficas nas emissões dos voláteis po-

dem existir nos componentes químicos, concentrações ou quantidades totais. Assim, presumivelmente, a praga teria que responder de forma diferente a uma mistura modificada para que isso seja útil como uma característica de resistência. Visser & Avé (1978) foram os primeiros a mostrar que a proporção dos compostos ubíquos em uma mistura de voláteis de plantas podem ser mais importantes para atração do herbívoro do que compostos isolados. Por exemplo, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) foi atraído pela mistura específica de álcoois e aldeídos C6 (GLVs) em batata, e sua atração foi perdida se qualquer um dos componentes foi aumentado na concentração (Visser & Avé, 1978). Os inimigos naturais também respondem à composição de voláteis emitidos por as plantas na presença de um herbívoro (Dicke et al., 2003).

A variação genética intraespecífica da emissão de voláteis, induzida por herbívoros, demonstrado em diversas plantas de feijoeiro (Dicke et al., 1990a), maçã (Takabayashi et al., 1991b), algodão (Loughrin et al., 1995), repolho (Potting et al., 1999), tabaco selvagem (Halitschke et al., 2000), milho (Degen et al., 2004; Gouinguéné et al., 2001; Hoballah et al., 2002), pêra (Scutareanu et al., 2003), e cenoura (Nissinen et al., 2005) podem ser utilizadas para a melhora da resistência indireta (Åhman et al., 2010). Por exemplo, níveis de expressão do sesquiterpeno (E)- $\beta$ -farneseno (E $\beta$ f) em plantas de *Arabidopsis thaliana* (Capparales: Brassicaceae) modificadas com um gene de *Mentha piperita* (Lamiales: Lamiaceae) para provocar a emissão pura de E $\beta$ f e assim assegurar que a planta libere quantidades suficientes para inundar outro sesquiterpeno endógeno produzido, resultando em efeitos sobre o comportamento de *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) (alarme e respostas repelentes) e seu parasitóide *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Braconidae). Isso demonstra que a emissão resultante da transformação de uma planta para a produção de um volátil, afeta as respostas comportamentais em dois níveis tróficos (Beale et al., 2006). Já em milho, a herbivoria por lepidópteros induz a liberação de uma mistura dos voláteis (E)- $\beta$ -farneseno e (E)- $\alpha$ -bergamoteno, atrativa a parasitóides, sendo suas sínteses mediadas

pela enzima terpeno sintase TPS10. O gene que expressa essa enzima foi introduzido em *A. thaliana* e a sobre-expressão deu como resultado plantas que emitem altas quantidades de produtos TPS10 e mostraram que *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae) aprendem a explorar os sesquiterpenos para localizar seus hospedeiros lepidópteros após exposição prévia a esses produtos voláteis, em associação com hospedeiros, sendo estes voláteis sinais para a defesa indireta após ataque do herbívoro (Schnee et al., 2006). Em brássicas, glucosinolatos tem sido considerados um sistema de defesa eficaz contra herbívoros, principalmente devido aos produtos formado após a hidrólise por cima do tecido danificado, mas pouco se conhece sobre as atividades biológicas de hidrólise alternativa dos nitrilos de proteínas epítioespecíficas (ESPs). Plantas de *A. thaliana* foram utilizadas para a super-expressão de ESPs investigando os efeitos de nitrilos simples na defesa direta e indireta contra *Pieris rapae* (Lepidoptera:Pieridae). Observando que o parasitoide *Cotesia rubecula* (Hymenoptera, Braconidae) foi atraído por nitrilos simples expressados após a herbivoria (Mumm et al., 2008). Nestes casos, a introdução de um gene estimulou a defesa indireta de plantas hospedeiras, atraindo predadores ou parasitóides aos sinais derivados, mostrando que plantas melhoradas podem ser atraentes para os inimigos e o comportamento do herbívoro pode ser mudado, afetando as interações tritróficas. Vendo a importância de como as interações tritróficas podem ser alteradas pelo processo de seleção de plantas, este estudo visa avaliar se a defesa induzida por herbivoria tem alguma diferença entre plantas rústicas e plantas atuais de cana de açúcar, já que *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae), principal praga da cana (Gallo et al., 2002), é encontrada em quase todas as plantações de cana no Brasil e inevitavelmente se torna uma grande ameaça para o cultivo que resulta em perda de produção para as indústrias sucroalcooleiras (Falco, 2003).

A cana de açúcar, *Saccharum officinarum* (L.), é uma das culturas mais antigas do mundo, iniciada cerca de 3000 anos, como um tipo de grama na ilha de Nova Guiné que se estendeu para Borneu, Sumatra e Índia, é uma planta

de clima tropical da família Poaceae, originária do sudeste da Ásia (Cesnik & Miocque, 2004). Cristovão Colômbio a introduziu nas Américas em sua segunda viagem (1493) à ilha Espanhola. Apenas em 1501 foram introduzidas plantas com êxito. A partir do êxito das plantações de cana de açúcar em Santo Domingo, a cultura foi levada ao longo do Caribe e América do Sul. A cultura foi introduzida no Brasil em 1502, sendo considerada de grande importância no âmbito sócio-econômico, devido à sua matéria prima na produção de alimento (Mendonça, 1996). O gênero *Saccharum* foi primeiramente descrito por Linnaeus (1800) em seu livro *Species Plantarum*, encontrando-se várias espécies neste gênero, como *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinense*, *S. edule* e *S. barberi*, as quais são consideradas do velho mundo. Em *S. sinense* temos as espécies White pararia e Archi, consideradas espécies antigas por não terem sofrido modificações ao longo do tempo. Já em *S. officinarum* temos a espécie RB867515, considerado atual por ser o resultado de cruzamentos (Barbosa et al., 2008), sendo conhecida pela produção abundante de suco. Um dos grandes problemas da produção da cana de açúcar está relacionado com a vulnerabilidade, durante todo o seu desenvolvimento, ao ataque da broca da cana *D. saccharalis*, que normalmente ocorre com menor incidência quando a cana é jovem, aumentando consideravelmente o seu ataque com o desenvolvimento da planta, sendo que geralmente a cana-planta é mais infestada, quando comparada à soca (Macedo & Botelho, 1988).

A broca da cana de açúcar, é uma espécie de ampla distribuição nas Américas. Encontra-se desde os Estados Unidos até o Rio da Prata, na Argentina, incluindo as Antillas (Linares, 1987). Considerada uma das principais pragas da cana de açúcar nas Américas, a broca-da-cana, *D. saccharalis* provocam injúrias diretas devido ao hábito de perfurar o colmo, causando a morte da gema apical, enquanto que na cana adulta provoca brotações laterais, enraizamento aéreo, atrofiamento dos entrenós e tombamento, reduzindo assim, a produção agrícola e industrial (Mendonça, 1996). As injúrias indiretas são consideráveis, pois ao penetrar no colmo, as lagartas formam galerias por

onde penetram fungos que causam a podridão vermelha *Colletotrichum falcatum* (Went) e *Fusarium moniliforme* (Sheldon). Estes fungos invertem a sacarose, diminuindo a pureza do caldo e o rendimento em açúcar (Botelho & Macedo, 2002; Gallo et al., 2002).

O manejo integrado de *D. saccharalis* vem sendo realizado, principalmente pelo controle biológico, com parasitóides multiplicados em laboratório e liberados no campo. Os parasitóides larvais da broca são os mais utilizados como método de controle no Brasil e no mundo (Pinto et al., 2006). O parasitóide larval *Cotesia flavipes* (Cam) (Hymenoptera: Braconidae) foi introduzido no Brasil, proveniente de Trinidad em 1974 para os canaviais de Alagoas (Mendonça & Mendonça, 1996). Sua introdução e uso generalizado no Brasil vem sendo considerado um sucesso, desde a sua introdução até os dias atuais. As liberações são feitas de forma inundativa, visando interromper o crescimento populacional da broca da cana (Botelho & Macedo, 2002). Apesar de seu grande uso, são necessários estudos detalhados sobre o comportamento de *C. flavipes* às diferentes misturas de voláteis das espécies de cana de açúcar após a injúria do herbívoro. As informações a serem obtidas poderão despertar o interesse de produtores e pesquisadores com relação ao controle biológico de *Diatraea saccharalis* nos diferentes espécies cultivadas.

Considerado a possível diferença na emissão dos voláteis em plantas de cana de açúcar induzidas por herbivoria e sendo que a localização pelo parasitóide para seu hospedeiro possivelmente depende dos odores, este trabalho objetiva elucidar a relação das fêmeas de *C. flavipes* frente aos diferentes perfis de voláteis de plantas rústicas e atual. Esperava-se que o parasitoide teria preferência por plantas rústicas, originárias do velho mundo (Cheavegatti-Gianotto et al., 2011), já que *C. flavipes* é endêmica do Sudeste Asiático e apresenta associação com brocas da família Crambidae e Noctuidae (Gifford & Mann, 1967).

Os resultados deste estudo pode levar-nos a observar se as misturas de voláteis das diferentes espécies influenciam a busca de *C. flavipes* para controlar seu hospedeiro . Desse modo, nossa perspectiva é promover novos

estudos sobre a história evolutiva e consequências ecológicas das interações entre níveis multitróficos, levando à exploração dos sinais que protegem as culturas.

## Referências

- Agelopoulos, N. G., & M. A. Keller. 1994. Plant-natural enemy association in tritrophic system, *Cotesia rubecula*-*Pieris rapae*-*Brassicaceae* (Cruciferae). III: Collection and identification of plant and frass volatiles. *Journal of chemical ecology* **20**:1955–1967.
- Åhman, I., R. Glinwood, & V. Ninkovic. 2010. The potential for modifying plant volatile composition to enhance resistance to arthropod pests. *Plant Sciences Reviews* pages 1–10.
- Barbosa, M. H. P., L. C. I. de Silveira, M. W. de Oliveira, V. d. F. M. de Souza, & S. N. N. Ribeiro. 2008. RB867515 Sugarcane cultivar. *Genética* **31**:962.
- Beale, M. H., M. A. Birkett, T. J. Bruce, K. Chamberlain, L. M. Field, A. K. Huttly, J. L. Martin, R. Parker, A. L. Phillips, J. A. Pickett, et al. 2006. Aphid alarm pheromone produced by transgenic plants affects aphid and parasitoid behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**:10509–10513.
- Begon, M., J. Harper, & C. Townsend. 1996. *Ecology: individuals, populations, and communities*. Wiley-Blackwell.
- Blaakmeer, A., J. Geervliet, J. v. Loon, M. Posthumus, T. v. Beek, & A. Groot. 1994. Comparative headspace analysis of cabbage plants damaged by two species of *Pieris* caterpillars: consequences for in-flight host location by *Cotesia* parasitoids. *Entomologia experimentalis et applicata* **73**:175–182.

- Botelho, P., & N. Macedo. 2002. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. Controle Biológico no Brasil: Parasitóides e Predadores pages 409–525.
- Campbell, I. 1962. Reproductive capacity in the genus *Choristoneura* Led.(Lepidoptera: Tortricidae). I. Quantitative inheritance and genes as controllers of rates. Canadian Journal of Genetics and Cytology **4**:272–288.
- Cesnik, R., & J. Miocque. 2004. Histórico, p. 23-30. Melhoramento da cana-de-açúcar. Brasília, EMBRAPA, 307p .
- Chan, B. G., A. Waiss, & M. Lukefahr. 1978. Condensed tannin, an antibiotic chemical from *Gossypium hirsutum*. Journal of insect physiology **24**:113–118.
- Cheavegatti-Gianotto, A., H. M. C. de Abreu, P. Arruda, J. C. Bespalhok Filho, W. L. Burnquist, S. Creste, L. di Ciero, J. A. Ferro, A. V. de Oliveira Figueira, T. de Sousa Filgueiras, et al. 2011. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. Tropical Plant Biology **4**:62–89.
- Coley, P. 1983. Intraspecific variation in herbivory on two tropical tree species. Ecology pages 426–433.
- Coley, P., J. Bryant, & F. Chapin. 1985. Resource availability and plant antiherbivore defense. Science **230**:895.
- Degen, T., C. Dillmann, F. Marion-Poll, & T. C. Turlings. 2004. High genetic variability of herbivore-induced volatile emission within a broad range of maize inbred lines. Plant Physiology **135**:1928–1938.
- Dicke, M., A. A. Agrawal, & J. Bruin. 2003. Plants talk, but are they deaf? Trends in Plant Science **8**:403–405.
- Dicke, M., R. Gols, D. Ludeking, & M. A. Posthumus. 1999. Jasmonic acid and herbivory differentially induce carnivore-attracting plant volatiles in lima bean plants. Journal of Chemical Ecology **25**:1907–1922.

- Dicke, M., M. W. Sabelis, J. Takabayashi, J. Bruin, & M. A. Posthumus. 1990a. Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals: prospects for application in pest control. *Journal of Chemical Ecology* **16**:3091–3118.
- Dicke, M., J. Takabayashi, M. A. Posthumus, C. Schütte, & O. E. Krips. 1998. Plant-Phytoseiid Interactions Mediated by Herbivore-Induced Plant Volatiles: Variation in Production of Cues and in Responses of Predatory Mites. *Experimental and Applied Acarology* **22**:311–333.
- Dicke, M., T. Van Beek, M. Posthumus, N. Ben Dom, H. Van Bokhoven, & A. De Groot. 1990b. Isolation and identification of volatile kairomone that affects acarine predator-prey interactions Involvement of host plant in its production. *Journal of Chemical Ecology* **16**:381–396.
- Dirzo, R. 1984. Insect-plant interactions: some ecophysiological consequences of herbivory. *Physiological Ecology of Plants of the Wet Tropics* pages 209–224.
- Du, Y., G. M. Poppy, W. Powell, J. A. Pickett, L. J. Wadhams, & C. M. Woodcock. 1998. Identification of semiochemicals released during aphid feeding that attract parasitoid *Aphidius ervi*. *Journal of Chemical Ecology* **24**:1355–1368.
- Elzen, G., H. Williams, & S. Vinson. 1986. Wind tunnel flight responses by hymenopterous parasitoid *Campoletis sonorensis* to cotton cultivars and lines. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **42**:285–289.
- Falco, M. C., Maria Cristina & Silva-Filho. 2003. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**:761–766.
- Feeny, P., 1976. Plant apparency and chemical defense. Pages 1–40 *in* Biochemical interaction between plants and insects. Springer.

- Figueiredo, A. C., J. G. Barroso, L. G. Pedro, & J. J. Scheffer. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* **23**:213–226.
- Gallo, D., O. Nakano, S. Silveira Neto, R. Carvalho, C.o, G. Baptista, E. Berti Fiho, & J. Parra. 2002. *Entomologia agrícola*. Piracicaba: FEALQ, 2002. page 920p.
- Gifford, J., & G. Mann. 1967. Biology, Rearing, and A Trial Release of *textitApanteles flavipes* in the Florida Everglades to Control the Sugarcane Borer. *Journal of Economic Entomology* **60**:44–47.
- Glinwood, R., E. Ahmed, E. Qvarfordt, V. Ninkovic, & J. Pettersson. 2009. Airborne interactions between undamaged plants of different cultivars affect insect herbivores and natural enemies. *Arthropod-Plant Interactions* **3**:215–224.
- Gouinguéné, S., H. Alborn, & T. C. Turlings. 2003. Induction of volatile emissions in maize by different larval instars of *Spodoptera littoralis*. *Journal of chemical ecology* **29**:145–162.
- Gouinguéné, S., T. Degen, & T. C. Turlings. 2001. Variability in herbivore-induced odour emissions among maize cultivars and their wild ancestors (teosinte). *Chemoecology* **11**:9–16.
- Halitschke, R., A. Keßler, J. Kahl, A. Lorenz, & I. T. Baldwin. 2000. Ecophysiological comparison of direct and indirect defenses in *Nicotiana attenuata*. *Oecologia* **124**:408–417.
- Hernández, H. P., T. C.-Y. Hsieh, C. M. Smith, & N. H. Fischer. 1989. Foliage volatiles of two rice cultivars. *Phytochemistry* **28**:2959–2962.
- Hoballah, M. E. F., C. Tamo, & T. C. Turlings. 2002. Differential attractiveness of induced odors emitted by eight maize varieties for the parasitoid *Cotesia marginiventris*: Is quality or quantity important? *Journal of Chemical Ecology* **28**:951–968.

- Kahl, J., D. H. Siemens, R. J. Aerts, R. Gaèbler, F. Kuèhnemann, C. A. Preston, & I. T. Baldwin. 2000. Herbivore-induced ethylene suppresses a direct defense but not a putative indirect defense against an adapted herbivore. *Planta* **210**:336–342.
- Kalule, T., & D. Wright. 2004. The influence of cultivar and cultivar-aphid odours on the olfactory response of the parasitoid *Aphidius colemani*. *Journal of Applied Entomology* **128**:120–125.
- Linares, B. 1987. Influencia de la temperatura en el desarrollo de *Diatraea saccharalis* Fabricius. *Cana de Azucar (Venezuela)*. **5**:43–66.
- Linnaeus, C. 1800. *Species plantarum*. Impensis GC Nauk.
- Loughrin, J. H., A. Manukian, R. R. Heath, & J. H. Tumlinson. 1995. Volatiles emitted by different cotton varieties damaged by feeding beet armyworm larvae. *Journal of Chemical Ecology* **21**:1217–1227.
- Macedo, N., & P. Botelho. 1988. Controle integrado da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794)(Lepidoptera: Pyralidae). *Brasil Açucareiro* **160**:2–14.
- Máñez, S., A. Jiménez, & A. Villar. 1991. Volatiles of *Sideritis mugronensis* flower and leaf. *Journal of Essential Oil Research* **3**:395–397.
- Mendonça, A. 1996. Pragas da cana-de-açúcar. *Maceió: Insetos & Cia* **1**:239.
- Mendonça, A., & A. Mendonça. 1996. Guia das principais pragas da cana-de-açúcar na América Latina e Caribe. *Maceió, Insetos & Cia*, 239p.
- Mewes, S., H. Krüger, & F. Pank. 2008. Physiological, morphological, chemical and genomic diversities of different origins of thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution* **55**:1303–1311.
- Mumm, R., M. Burow, G. Bukovinszki Kiss, E. Kazantzidou, U. Wittstock, M. Dicke, & J. Gershenzon. 2008. Formation of simple nitriles upon glucosinolate hydrolysis affects direct and indirect defense against the specialist herbivore, *Pieris rapae*. *Journal of Chemical Ecology* **34**:1311–1321.

- Nissinen, A., M. Ibrahim, P. Kainulainen, K. Tiilikkala, & J. K. Holopainen. 2005. Influence of carrot psyllid (*Trioza apicalis*) feeding or exogenous limonene or methyl jasmonate treatment on composition of carrot (*Daucus carota*) leaf essential oil and headspace volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**:8631–8638.
- Pinto, A. d. S., J. F. Garcia, & H. N. d. Oliveira, 2006. Atualização em produção de cana-de-açúcar, Chapter manejo das principais pragas da cana-de-açúcar . Piracicaba.
- Potting, R., G. Poppy, & T. Schuler. 1999. The role of volatiles from cruciferous plants and pre-flight experience in the foraging behaviour of the specialist parasitoid *Cotesia plutellae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **93**:87–95.
- Price, P. W., C. E. Bouton, P. Gross, B. A. McPheron, J. N. Thompson, & A. E. Weis. 1980. Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Annual Review of Ecology and Systematics* pages 41–65.
- Rapusas, H. R., D. G. Bottrell, M. Coll, et al. 1996. Intraspecific variation in chemical attraction of rice to insect predators. *Biological Control* **6**:394–400.
- Rasmann, S., T. G. Köllner, J. Degenhardt, I. Hiltbold, S. Toepfer, U. Kuhlmann, J. Gershenzon, & T. C. Turlings. 2005. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature* **434**:732–737.
- Schnee, C., T. G. Köllner, M. Held, T. C. Turlings, J. Gershenzon, & J. Degenhardt. 2006. 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 of the United States of America* **103**:1129–1134.
- Scutareanu, P., J. Bruin, M. A. Posthumus, & B. Drukker. 2003. Constitutive and herbivore-induced volatiles in pear, alder and hawthorn trees. *Chemoecology* **13**:63–74.

- Shiojiri, K., J. Takabayashi, S. Yano, & A. Takafuji. 2001. Infochemically mediated tritrophic interaction webs on cabbage plants. *Population Ecology* **43**:23–29.
- Sotelo, A., 1997. Constituents of Wild Food Plants. Pages 89–111 *in* T. Johns & J. Romeo, editors. *Functionality of Food Phytochemicals*, volume 31 of *Recent Advances in Phytochemistry*. Springer US.
- Takabayashi, J., M. Dicke, & M. A. Posthumus. 1991. Variation in composition of predator-attracting allelochemicals emitted by herbivore-infested plants: relative influence of plant and herbivore. *Chemoecology* **2**:1–6.
- Takabayashi, J., S. Takahashi, M. Dicke, & M. Posthumus. 1995. Developmental stage of herbivore *Pseudaletia separata* affects production of herbivore-induced synomone by corn plants. *Journal of Chemical Ecology* **21**:273–287.
- Tasin, M., A.-C. Bäckman, M. Bengtsson, C. Ioriatti, & P. Witzgall. 2006. Essential host plant cues in the grapevine moth. *Naturwissenschaften* **93**:141–144.
- Turlings, T., J. Loughrin, P. McCall, U. Röse, W. Lewis, & J. Tumlinson. 1995. How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**:4169–4174.
- Turlings, T. C., U. B. Lengwiler, M. L. Bernasconi, & D. Wechsler. 1998. Timing of induced volatile emissions in maize seedlings. *Planta* **207**:146–152.
- Van Emden, H. 1966. Plant insect relationships and pest control. *World Rev. Pest Control* **5**:115–123.
- Visser, J., & D. Avé. 1978. General green leaf volatiles in the olfactory orientation of the Colorado beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **24**:738–749.
- Wang, Y., & S. J. Kays. 2002. Sweetpotato volatile chemistry in relation to sweetpotato weevil (*Cylas formicarius*) behavior. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **127**:656–662.

Weaver, D. K., M. Buteler, M. L. Hofland, J. B. Runyon, C. Nansen, L. E. Talbert, P. Lamb, & G. R. Carlson. 2009. Cultivar preferences of ovipositing wheat stem sawflies as influenced by the amount of volatile attractant. *Journal of Economic Entomology* **102**:1009–1017.

White, T. 1974. A hypothesis to explain outbreaks of looper caterpillars, with special reference to populations of *Selidosema suavis* in a plantation of *Pinus radiata* in New Zealand. *Oecologia* **16**:279–301.

## Preferência de *Cotesia flavipes* por espécies de Cana de açúcar

Luisa F. Patiño Grisales<sup>1</sup>, Aline Francêz<sup>1</sup>, Claryssa de Oliveira Mota<sup>1</sup>,  
Débora Mello Furtado de Mendonça<sup>1</sup> Hernane Dias Araújo<sup>1</sup>, Arne  
Janssen<sup>1,2</sup>, Eraldo Lima<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup>Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil.

<sup>2</sup>Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics, Section Population Biology, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands.

## Resumo

Voláteis de plantas induzidos por herbívoros podem servir como defesas indiretas, sendo sinais que atraem os inimigos naturais. Vários parasitóides são conhecidos por utilizar tais sinais para localizar seus hospedeiros, como *Cotesia flavipes*, que é atraído pelos voláteis induzidos por injúrias de larvas de *Diatraea saccharalis*. A cana de açúcar no Brasil vem sendo melhorada há mais de 500 anos. Este projeto tem o objetivo de testar a atratividade de compostos voláteis induzidos pela herbivoria em duas espécies rústicas das plantas induzidas por herbivoria de duas espécies rústicas (White pararia e Archi) e de uma espécie cultivada atualmente (RB867515) de cana de açúcar. Em um olfatômetro do tipo "Y", plantas da mesma espécie, induzidas e limpas, ou de plantas induzidas de espécies diferentes foram oferecidas ao parasitóide em bioensaios de escolhas. Simultaneamente, em condições de semi-campo as três espécies de cana foram oferecidas em gaiolas e dispostas em três conjuntos de plantas induzidas das espécies rústicas e atuais para experimentos de escolha. Este trabalho evidencia as respostas dos parasitóides aos diferentes conjuntos de plantas tanto em condições de laboratório quanto em condições de semi-campo. Estes experimentos demonstraram a presença de interações indiretas, o que indica a presença de infoquímicos mediados por interações tritóficas nas plantas. Então, sugere-se que fêmeas de *C. flavipes* em busca de hospedeiros utilizam uma mistura de voláteis presente no ar, os quais são emitido por plantas que estão sendo alimentadas por hospedeiros. Os resultados são discutidos no contexto das interações tritóficas e como a busca pelo hospedeiro pode ser influenciada por diferentes componentes do sistema.

### Abstract

Induced plant volatiles by herbivores may serve as indirect defense, being signals that attract natural enemies. Several parasitoids are known to use these signals to locate their hosts, as *Cotesia flavipes*, which is attracted by volatiles induced by injuries of *Diatraea saccharalis* larvae. Sugarcane in Brazil has been improved for over 500 years. The objective of this study is to evaluate the attractiveness of compounds induced by herbivory on two rustic species (White pararia and Archi) and a species currently cultivated (RB867515) of sugarcane. In an olfactometer type "Y", plants of the same species, induced and clean, or induced plants of different species were offered to the parasitoid in bioassays choices. Simultaneously, in semi-field conditions the three sugarcane species were offered in cages, arranged in three sets of induced rustic species and current sugarcane for experiments of choice. This work shows that the responses of parasitoid to different sets of plants both in laboratory and in semi-field conditions. These experiments demonstrated the presence of indirect interactions, indicating the presence of infochemicals mediated by tritrophic interactions in sugarcane plants. Therefore, it is suggested that *C. flavipes* females seeking of hosts using a mixture of volatiles present in the air, which are emitted by plants that are fed by hosts. The results are discussed in the context of tritrophic interactions and how the search for the host can be influenced by different components of the system.

# 1 Introdução

As plantas são constantemente atacadas por herbívoros e patógenos, que as utilizam como local propício para seu desenvolvimento. Dessa forma, as plantas devem destinar uma fração de seus recursos metabólicos para se defender (Feeny, 1976). Ao investir em defesa, a planta ganha proteção contra a herbivoria ,mas, ao fazê-lo, também pode beneficiar plantas vizinhas (Sabelis et al., 2002). Dessa forma, pode ser que as estratégias de defesa das plantas incluam, as condições do estado das plantas de seu entorno (Farmer & Ryan, 1990; Bruin et al., 1992, 1995; Shonle & Bergelson, 1995; Avdiushko et al., 1997). Então, as plantas se protegem contra o ataque de herbívoros através da combinação de defesas constitutivas e induzidas que reduzem o desempenho dos herbívoros e, conseqüentemente, interrompem a propagação do dano. Essas duas formas de defesa são cruciais para as plantas se defenderem contra pragas não patogênicas, como os insetos (Karban & Baldwin, 1997; Kant et al., 2004).

Desde Price et al. (1980), as pesquisas sobre a expressão de características das plantas que facilitam o controle dos herbívoros avançaram, contrastando com outras características defensivas das plantas como compostos tóxicos, tenacidade de folha ou tricomas, que reduzem diretamente a aptidão do herbívoro e, assim, aumentam o desempenho da planta (Duffey & Stout, 1996). A emissão de voláteis de plantas induzidos pela herbivoria (HIPVs)(Dicke & Baldwin, 2010) é observada como um fenômeno generalizado. Tais emissões tem sido interpretadas como meio de defesa das plantas, já que predadores e parasitoides podem utilizar estes sinais para localizar sua presa/hospedeiro (Turlings & Wäckers, 2004; Dicke & Baldwin, 2010), além de servir como comunicação dentro da planta e entre plantas (por exemplo, Fowler & Lawton

(1985); Shonle & Bergelson (1995); Baldwin et al. (2002)) (Frost et al., 2007). É fato que tanto os predadores quanto os parasitoides utilizam eficazmente os sinais químicos proporcionados pelas plantas (Dicke & Sabelis, 1989*a*; Dicke et al., 1990*a*) o qual tem sido a base para a hipótese de que plantas podem ativamente recrutar os inimigos dos herbívoros (Dicke & Sabelis, 1989*a*; Turlings et al., 1990*b*; Sabelis & De Jong, 1988; Whitman & Eller, 1990). Em outras palavras, as formas de comunicação entre plantas e o terceiro nível trófico tem evoluído (Janssen et al., 2002).

Portanto, as plantas são conhecidas por sua capacidade de produzir uma diversidade de metabolitos secundários (Schoonhoven et al., 2005), alguns dos quais são liberados no ar após o ataque ou deposição de ovos por herbívoros (Dicke et al., 2009; Mumm & Hilker, 2006), chamados HIPVs (Dicke & Baldwin, 2010). Alterações das plantas, produzidas pela herbivoria não só afeta o indutor mas também outras espécies de herbívoros que atacam as plantas induzidas (Sabelis et al., 2007), num processo conhecido como defesa indireta, que só pode surgir se existe a planta como um organismo intermediário (Wootton, 1994). Mudanças na química da planta, ativadas pela saliva ou regurgitado do inseto herbívoro (McConn et al., 1997), não só alteram a composição e a densidade de espécies de herbívoros, mas também o tipo e abundância de inimigos naturais (Sabelis et al., 2007). Quando a planta expressa a defesa indireta, ela não atua diretamente sobre o segundo nível trófico, mas, indiretamente, através do terceiro nível trófico (Price et al., 1980). Assim, as plantas podem ativamente influenciar a estrutura trófica das comunidades de artrópodes que vivem nelas e manipular a teia alimentar de tal forma que ela age como um "sistema imune externo" (Sabelis et al., 2007). Então, a herbivoria pode induzir a liberação de substâncias químicas voláteis específicas por parte da planta (Dicke & Sabelis, 1989*a*; Dicke et al., 1990*b,a*; Turlings et al., 1990*b*, 1995) que revelam a presença de herbívoros a seus inimigos ou induzir a planta à produção de alimentos tais como nec-

tar extrafloral, que promovem a sobrevivência do predador ou mesmo sua reprodução (por exemplo, Sabelis et al. (1999, 2005)).

No entanto, sabe-se que a emissão de voláteis em plantas tanto de forma constitutiva quanto induzida podem ser modificadas por melhoramento genético, existindo a possibilidade de melhorar a resistência de plantas contra pragas importantes tanto direta quanto indiretamente através do controle biológico melhorado (Åhman et al., 2010).

Beale et al. (2006) e Schnee et al. (2006) demonstraram que a emissão resultante da transformação de uma planta para a produção de um volátil afeta as respostas comportamentais em dois níveis tróficos, ou seja, em ambos os casos a introdução de um único gene estimulou a defesa indireta de plantas hospedeiras, atraindo parasitóides aos sinais derivados. Isso mostra que plantas melhoradas podem ser atraentes para os inimigos naturais e que o comportamento do herbívoro pode ser mudado, afetando assim as interações tritróficas.

Fêmeas de parasitoides são guiadas por HIPVs para a busca de seus hospedeiros (Dicke, 1999; Shiojiri et al., 2001; Hilker & Meiners, 2002; Turlings et al., 2002; Steidle & Van Loon, 2003), tendo a capacidade de distinguir os hospedeiros parasitados e aceitá-lo ou não para sua oviposição, sendo este um comportamento generalizado para parasitóides himenópteros (Vinson, 1985; Van Alphen & Visser, 1990). *Cotesia flavipes* (Cam) (Hymenoptera: Braconidae) é um dos mais importantes agentes de controle biológico da broca *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae). No entanto, estudos de laboratório e campo indicam que o desempenho dos parasitóides pode diferir entre espécies de plantas, variedades ou cultivares (Verkerk & Wright, 1996). Portanto, o presente estudo baseia-se na existência de uma variação interespecífica para esclarecer se a liberação de voláteis induzidos por herbivoria acima do solo nas plantas de cana de açúcar (*Saccharum* sp.), em condições de semi-campo e laboratório, leva a uma atração diferencial de *C. flavipes* na procura de seu hospedeiro. Foram selecionadas três espécies de cana de açúcar, compreendendo a espécie mais plantado no Brasil

(RB867515) (CTC, 2011), desenvolvido através de cruzamentos (Barbosa et al., 2008), denominada "atual" e duas espécies (Archi e White pararia) do banco de germoplasma da Universidade Federal de Viçosa, denominadas "rústicas" por serem espécies originárias do velho mundo (Europa, Ásia e África), onde começou o desenvolvimento desta cultivar (Cheavegatti-Gianotto et al., 2011). *C. flavipes*, endêmica do Sudeste Asiático, apresenta associação com brocas da família Crambidae e Noctuidae, tendo a capacidade de encontrar seu hospedeiro e desenvolver todo seu ciclo (Gifford & Mann, 1967). Assim, pelo fato do parasitoide ter evoluído com os cultivares de cana de açúcar para o controle de *D. saccharalis*, testou-se a hipótese de que *C. flavipes* teria uma maior preferência por voláteis induzidos por herbivoria da planta atual em olfatômetro do tipo Y e em gaiolas em condições de semi-campo. Dessa forma, este trabalho fornece evidências necessárias para mostrar como o papel dos voláteis tanto de plantas como de herbívoros, influencia na localização do hospedeiro, apresentando um método de controle de pragas baseado em insetos benéficos.

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Produção das plantas de cana de açúcar

Estacas maduras do terço médio da planta de cana de açúcar (*Saccharum* spp.) das espécies rústicas (White pararia e Archi) e atuais (RB 867515) foram quinzenalmente semeadas em uma casa de vegetação. Estas foram semeadas em bandejas de plástico utilizando um substrato comercial para mudas (substrato para plantas, Tropstrato HT hortaliças), mantidas em casa de vegetação com controle de temperatura, umidade, luz natural e regadas diariamente até atingirem a idade para o transplante. Ao atingir os 20 dias de semeadura, as mudas foram transplantadas para vasos plásticos pretos de 1,5 L contendo uma mistura de terra com substrato em uma proporção 1:1. Feito isso, elas foram colocadas em bancadas com irrigação automatizada e uma semana depois foi realizada uma adubação de NPK (20-5-20) 2 gramas por planta, aplicando água imediatamente e repetindo 30 dias depois. As plantas foram utilizadas para os experimentos, utilizando canas da mesma idade fenológica (60 dias) e com sete folhas perfeitamente desenvolvidas.

### 2.2 Criação de *Diatraea saccharalis* e *Cotesia flavipes*

Os indivíduos de *D. saccharalis* utilizados nesse trabalho foram criados em dieta artificial (Hensley & Hammond, 1968) e as pupas foram mantidas em recipientes com papel filtro umedecidos, até a emergência dos adultos. Todos os insetos foram criados em condições controladas sob temperatura de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $60 \pm 2\%$  e fotoperíodo de 12 horas.

Para a obtenção dos ovos, foram utilizadas gaiolas de PVC de 30x20 com 50 casais de *D. saccharalis* onde foi fornecido um algodão com água. As

gaiolas foram vistoriadas diariamente para monitorar a ocorrência de cópulas e oviposições.

Os indivíduos de *C. flavipes* utilizados foram criados em lagartas de *D. saccharalis* de terceiro instar. Foi colocado papel toalha em uma bancada e depois jogado em cima deste um pouco de lagartas. Cada larva individualmente foi segurada com uma mão utilizando luva de procedimento cirúrgico, a qual foi manejada com cuidado para não feri-la ou matá-la e foi colocada perto de uma vespa fêmea que subiu na lagarta parasitando e inoculando os ovos sobre a mesma. As vespas se encontraram dentro de copos de plástico tampados, as quais se deixaram sair pouco a pouco, para não ter presença de superparasitismo.

Depois de serem parasitadas, foram colocadas dez lagartas em placas de Petri com dieta. Para maximizar a produção de vespas, as placas foram dispostas em uma sala com temperatura de 23 – 25°C. Permanecendo nessa sala por 15 dias, formando as massas de casulos.

As pupas de *C. flavipes* que formaram, foram removidas com ajuda de uma pinça, quebrando-se a dieta e retirando-as. Cada massa de pupas foi colocada em uma placa, onde foram separadas as massas mais novas (cor branco) e as massas perto à emergência (cor preto) em diferentes potes, colocando entre 5 e 7 massas por cada copo de plástico que continuarem no laboratório e foram utilizadas nos experimentos, respectivamente.

### 2.3 Experimento de olfatômetro e semi-campo

Observou-se as respostas de *Cotesia flavipes* aos voláteis de plantas limpas e plantas infestadas com *Diatraea saccharalis* das diferentes espécies. As respostas das fêmeas do parasitóide foram medidas em um olfatômetro de tubo em Y (Pallini et al., 1997; Janssen, 1999). O olfatômetro consiste de um tubo de vidro em forma de Y. Em cada braço (lado) do olfatômetro vai conectado, por meio de mangueiras de plástico escuras, um recipiente de vidro (38x50x81cm) onde serão colocadas as fontes de odores: um conjunto de 2

plantas foram infestadas 48 horas antes dos testes com *D. saccharalis* com 8 indivíduos por planta ou não serão infestadas (controle). Os recipientes onde forem postas as plantas tem uma entrada de ar na parte inferior de um lado para que funcione o sistema. As cubas, forem fechadas na parte superior com tampas de vidro com o objetivo de fechar o sistema, evitando com isso a passagem de ar por frestas. Uma bomba de vácuo foi conectada à base do olfatômetro para formar uma corrente de ar para que pudesse conduzir os voláteis das fontes de odores para dentro do olfatômetro. A velocidade da corrente de ar em cada braço foi medida por meio de um anemômetro (VelociCalc<sup>®</sup>, Modelo: 9545-A) e essa velocidade foi a mesma nos dois braços do olfatômetro (0,46 m/s). As velocidades foram medidas previamente, visando obter a melhor resposta do parasitoide na toma de decisão.

Foi utilizado fêmeas emergidas do mesmo dia (zero dias de idade) e testadas individualmente. Cada indivíduo foi liberado na extremidade basal do olfatômetro de forma a caminhar contra a corrente de ar formada em direção às fontes de voláteis. Ao atingirem a junção do tubo, os parasitóides respondiam por uma das fontes. O teste era terminado quando cada parasitóide atingia o extremo final do braço escolhido. Foram testadas as seguintes combinações de odores: (i) Archi limpa x Archi infestada; (ii) White pararia limpa x White pararia infestada; (iii) RB867515 limpa x RB867515 infestada; (iv) Archi infestada x RB867515 infestada e (v) White pararia infestada x RB867515 infestada com *D. saccharalis*, para testar como os voláteis emitidos de plantas rústicas e atuais influenciam no comportamento e preferências do parasitoide.

Em cada experimento foram feitas quatro repetições e com cada repetição foi utilizado diferentes grupos de plantas e artrópodes. Foram testados 20 parasitóides por repetição, totalizando 80 insetos por tratamento. A cada cinco animais testados, as fontes de odores foram trocados de posição nos braços do olfatômetro, em função de possíveis interferências do meio ambiente. Foi tolerado um prazo de até dez minutos para a escolha de cada

parasitóide pelas fontes de odores. Não havendo escolha após este tempo, o resultado em questão foi eliminado, tomando-se só para o análise os insetos que responderam.

Simultaneamente, em semi-campo, foram colocadas seis plantas, 3 plantas White pararia e 3 plantas RB867515 em uma gaiola (160\*160\*120 cm) distribuídas de forma alterna, com as folhas de cada planta asseguradas com um barbante e uma distancia de 50 cm entre plantas, de maneira que nenhuma das folhas se toquem entre sim, infestadas com 8 larvas cada uma por um período de 48 horas. Juntamente em outra gaiola foram colocadas 3 plantas Archi e 3 plantas RB867515 com a mesma quantidade de larvas e o mesmo período de infestação, em seguida, foram liberadas em cada gaiola 30 vespas em um pote de plástico de 100 ml que foi pendurado com um barbante no centro da gaiola, para assim confirmar a resposta do olfatômetro, registrando-se por cada tratamento o numero de lagartas parasitadas em cada planta após 24 horas depois da liberação e se tanto a espécie quanto posição influencia no parasitismo de *Cotesia flavipes*. Este experimento teve 4 repetições por conjunto de plantas (tratamento), e as posições dos genótipos foram alternandas conforme as extremidades de um hexagono, consistindo de 3 plantas de cada variedade colocadas alternadamente na gaiola.

Os dados foram analisados usando o Modelo Linear Generalizado (GLM) com distribuição de tipo Poisson (Crawley, 2012).

## 3 Resultados

### 3.1 Escolha do hospedeiro em olfatômetro

Fêmeas de *Cotesia flavipes* recém emergidas foram expostas pela primeira vez a plantas infestadas e não infestadas de cana de açúcar, mostrando preferência para plantas infestadas quando contrastadas com plantas limpas de Archi, White pararia e RB867515 ( $\chi^2 = 50.62; g.l = 1; p = 1.121 \times 10^{-12}$ ); ( $\chi^2 = 20.93; g.l = 1; p = 4.764 \times 10^{-6}$ ), ( $\chi^2 = 11.5297; g.l = 1; p = 0.00068$ ), respectivamente, (Figura 1). Quando se testou plantas infestadas de diferentes genótipos a resposta das fêmeas variou conforme o genótipo. O genótipo RB867151 quando contrastado com Archi foi menos preferido ( $\chi^2 = 16.797; g.l = 1; p < 0.0001$ ), mas quando contrastato com White pararia foi mais preferido ( $\chi^2 = 10.011; g.l = 1; p = 0.0015$ ), (Figura 2).

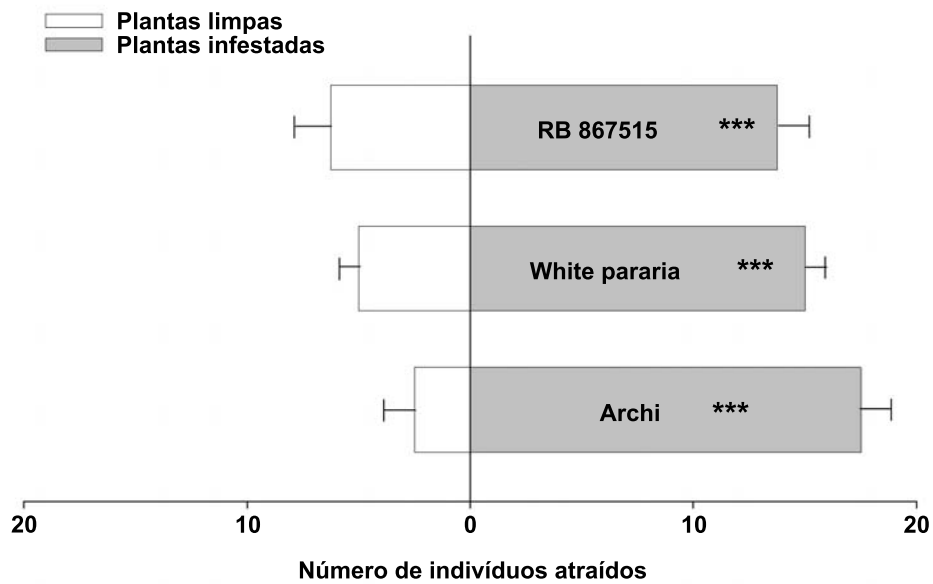


Figure 1: Resposta de *Cotesia flavipes* em olfatômetro de tubo Y a odores de genótipos de plantas de cana de açúcar limpas ou infestadas por *Diatraea saccharalis*. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre cada teste de escolha \*\*\* $P < 0,001$ . As barras indicam o erro padrão.

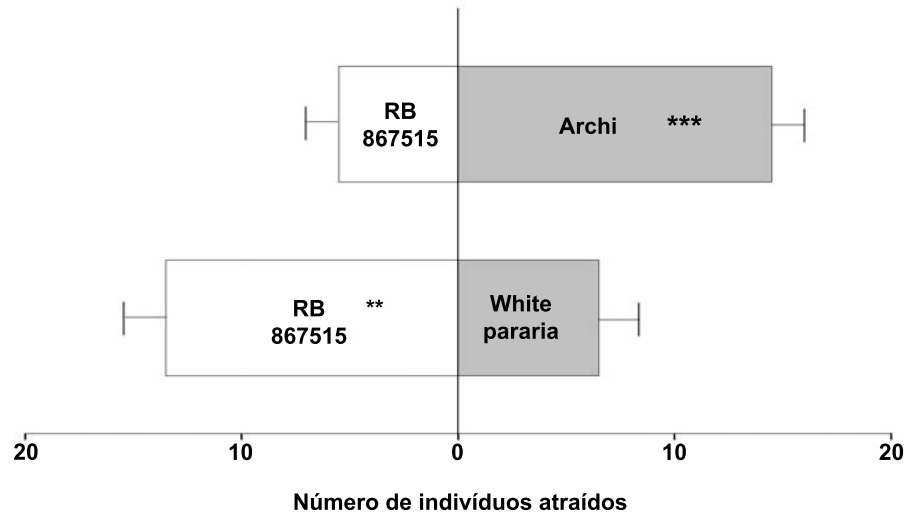


Figure 2: Resposta de *Cotesia flavipes* em olfatômetro de tubo Y a odores de genótipos de plantas de cana de açúcar infestadas por *Diatraea saccharalis*, em olfatômetro de tubo Y. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre cada teste de escolha \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ . As barras indicam o erro padrão.

### 3.2 Escolha do hospedeiro em condições de semi-campo

Fêmeas expostas ao conjunto de plantas infestadas nas condições de semi-campo, não mostraram nenhuma escolha aos genótipos testados (Figura 3 e Figura 4), e tampouco para a posição das plantas.

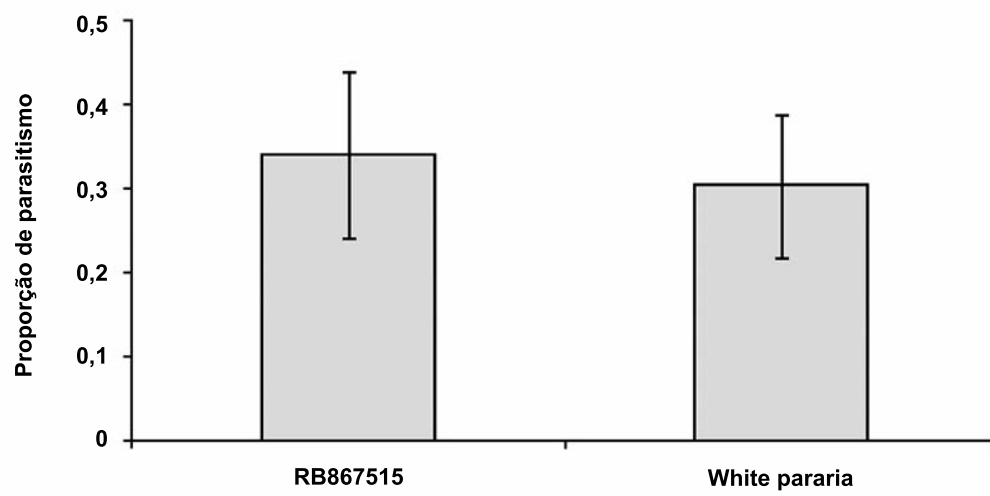


Figure 3: Proporção de parasitismo de *Cotesia flavipes* em diferentes genótipos de plantas de cana de açúcar infestadas por *Diatraea saccharalis*, em condições de semi-campo. A proporção de parasitismo não foi significativamente diferente para os genótipos testados. As barras indicam o erro padrão.

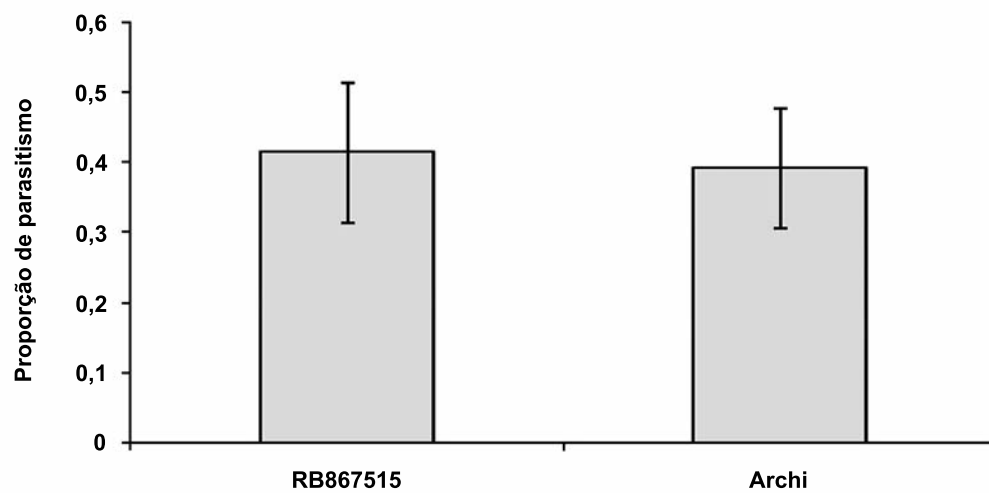


Figure 4: Proporção de parasitismo de *Cotesia flavipes* em diferentes genótipos de plantas de cana de açúcar infestadas por *Diatraea saccharalis*, em campo. A proporção de parasitismo não foi significativamente diferente para os genótipos testados. As barras indicam o erro padrão.

## 4 Discussão

O sucesso reprodutivo dos parasitoides está fortemente correlacionado com a qualidade e quantidade de parasitismo. Há, portanto, uma ligação entre o êxito do local de acolhimento (meio ambiente, planta, hospedeiro) e o fitness do parasitóide. Dessa forma, é de se esperar que os parasitóides evoluíram a capacidade de usar ou aprender a usar estímulos que aumentem a probabilidade de encontrar hospedeiros adequados.

A atratividade e parasitismo de uma espécie da família Braconidae a plantas induzidas por herbivoria de *Diatraea saccharalis* de duas espécies rústicas (White pararia e Archi) e de uma espécie cultivada atualmente (RB867515), foi demonstrada tanto em condições de laboratório quanto de semi-campo, ilustrando a importância da interação planta-herbívoros para o acolhimento dos parasitoides (Kester & Barbosa, 1991; Elzen et al., 1983; Turlings et al., 1990b, 1991b). A fim de encontrar seu hospedeiro, os inimigos naturais dos herbívoros muitas vezes fazem uso efetivo de compostos voláteis de plantas que são emitidos quando sofrem herbivoria (Turlings et al., 1998a), como observado em *Cotesia flavipes* por Potting et al. (1995). Esses voláteis estão envolvidos no comportamento de forrageamento tanto de predadores e parasitoides, como no caso de ácaros predadores que utilizam esses voláteis de forma eficiente na busca do ácaro fitófago *Tetranychus urticae* (Dicke & Sabelis, 1989a; Dicke et al., 1990b,a) e no caso de vespas parasíticas que buscam herbívoros como hospedeiros para sua prole aplicando a mesma estratégia (por exemplo, Turlings et al. (1990b, 1995); Steinberg et al. (1993); Agelopoulos & Keller (1994); Mattiacci et al. (1994)).

Neste contexto, *C. flavipes* mostrou preferência por plantas infestadas por *D. saccharalis* no experimento conduzido no olfatômetro em tubo Y (Fig-

ure 1), ratificando que os inimigos naturais dos artrópodes podem fazer uso dos HIPVs emitidos sistematicamente e em grandes quantidades. Sendo que a disponibilidade de outros sinais é limitada, parece que tanto parasitoides quanto predadores tem se adaptado ao uso de voláteis detectáveis de plantas (Tumlinson et al., 1992; Vet & Dicke, 1992).

Price et al. (1980) e Vinson et al. (1977) foram alguns dos primeiros a sugerir que as plantas podem recrutar ativamente os inimigos naturais depois de submetidos à herbivoria. Assim, fêmeas de *C. flavipes* respondem a uma complexidade de odores advindos da interação planta-hospedeiro, demonstrando preferência em alguns casos, como visto nas respostas em olfatômetro (Figure 2) quando dois conjuntos de plantas de diferentes espécies infestadas com *D. saccharalis* foram oferecidas. Dessa forma, a emissão de semioquímicos de alguma forma muda e evoca a resposta da fêmea. Portanto, os resultados sugerem que cada associação entre *D. saccharalis* e cana de açúcar emite sua própria mistura de voláteis que é detectada por *C. flavipes*. Por outro lado, os fluxos de odores no tubo Y não se misturam. Antes da junção do tubo cada odor só preenche uma de suas metades, já que a velocidade da corrente de ar é dobrado nessa parte (Sabelis & Baan, 1983), demonstrando efetivamente que os HIPVs se diferenciam no olfatômetro, por tanto, as respostas de *C. flavipes* para os sinais químicos de cada conjunto de plantas são confiáveis.

As respostas dos inimigos naturais podem estar influenciadas diretamente pelas variações nas propriedades da interação planta-herbívoro, tanto positiva quanto negativamente (Price et al., 1980). Além disso, as plantas podem proporcionar odores ou outras condições atraentes para os inimigos naturais (Price et al., 1980) e os processos comportamentais destes serão afetados por fatores como a idade, estado fisiológico da planta, pela experiência do inimigo natural, fatores ambientais (Geervliet et al., 1998) e porque os himenópteros evitam plantas que estão com presença de parasitoides e larvas já parasitadas que conduz a uma distribuição não agregada de parasitoides, mostrando que sinais voláteis podem causar interações intraespecíficas no

terceiro nível trófico (Vinson, 1985; Van Alphen & Visser, 1990; Janssen et al., 1995b). Portanto, devido a essas possíveis influências, é mais fácil compreender o porquê das respostas obtidas em outras condições. Sendo que fêmeas expostas a diferentes espécies de *Saccharum* injuriadas dentro de uma gaiola em condições de semi-campo não apresentaram preferência sobre alguma espécie específica, contrariando os resultados do olfatômetro (Figure 3 e Figure 4). O parasitoide estão, é influenciado por uma série de estímulos que determinam a escolha e a habilidade de encontrar hospedeiros aceitáveis. Estes estímulos, como por exemplo o desenho das folhas, cores e atrativo da plantas, agem em sequência, influenciando a busca e a seleção de hospedeiros em campo (Monteith, 1955). Dado que não houve grau de preferência de *C. flavipes* por espécie de cana de açúcar, a busca por hospedeiros pode estar aparentemente influenciada tanto por estímulos químicos ou quimiotácteis emitidos pelo hospedeiro (Monteith, 1955; Vet, 1999; Janssen et al., 1995a), quanto por sinais visuais (Tanaka et al., 1999) e acústicos (Feener Jr & Brown, 1997).

No entanto, para os parasitoides, os sinais olfativos são mais importantes, porque além das substâncias liberadas na interação inseto-planta, também há a liberação de substâncias químicas por parte do hospedeiro (odores de fezes, muda, alimentação, feromônios sexuais e de agregação, secreções das glândulas salivares e secreções cuticulares) que podem ser utilizadas pelos inimigos naturais. Mas, enquanto os sinais vindos do hospedeiro são utilizados pelo inimigo natural a curtas distâncias, os odores provenientes da interação inseto-planta são geralmente percebidos a longas distâncias (Jervis, 2005). O desempenho do parasitóide também pode ser afetado pela quantidade e qualidade (composição) da mistura de voláteis advindas dessas interações (Hoballah et al., 2002). Dessa forma, é possível, que os resultados encontrados de parasitismo nas gaiolas foram principalmente mediados pelos sinais emitidos pelos herbívoros e por as interações intraespecíficas no terceiro nível

trófico (van Baalen & Sabelis, 1993), uma vez que, não houve discriminação entre as espécies como observado em resultados anteriores (Figure 2).

Em resumo, nosso estudo mostra claramente que *C. flavipes* pode apresentar preferência por uma espécie ou não nos experimentos conduzidos em laboratório e semi-campo, mas sem afetar o desempenho do parasitoide, portanto, rejeitamos a hipótese testada, já que a vespa não mostrou só preferência por plantas RB867515 nos experimentos conduzidos. Não é possível dizer especificamente o que atraiu o parasitoide nas áreas de liberação, mas tanto os sinais químicos provenientes da interação cana de açúcar - *D. saccharalis* quanto os sinais do hospedeiro foram importantes para essa atração. Com base nos resultados, podemos especular que fêmeas de *C. flavipes* respondem aos diferentes fatores que conformam o sistema, tendo a capacidade de diferenciar os sinais que se associam aos hospedeiros adequados. No entanto, mais estudos terão que estabelecer os compostos essenciais no comportamento de forrageamento dos insetos benéficos para uma melhor implementação de programas de controle biológico.

## 5 Referências

Agelopoulos, N. G., & M. A. Keller. 1994. Plant-natural enemy association in tritrophic system, *Cotesia rubecula*-*Pieris rapae*-*Brassicaceae* (Cruciferae). III: Collection and identification of plant and frass volatiles. *Journal of chemical ecology* **20**:1955–1967.

Åhman, I., R. Glinwood, & V. Ninkovic. 2010. The potential for modifying plant volatile composition to enhance resistance to arthropod pests. *Plant Sciences Reviews* pages 1–10.

Avdiushko, S., G. Brown, D. Dahlman, & D. Hildebrand. 1997. Methyl jasmonate exposure induces insect resistance in cabbage and tobacco. *Environmental Entomology* **26**:642–654.

Baldwin, I. T., A. Kessler, & R. Halitschke. 2002. Volatile signaling in plant–plant–herbivore interactions: what is real? *Current Opinion in Plant Biology* **5**:351–354.

Barbosa, M. H. P., L. C. I. de Silveira, M. W. de Oliveira, V. d. F. M. de Souza, & S. N. N. Ribeiro. 2008. RB867515 Sugarcane cultivar. *Genética* **31**:962.

Beale, M. H., M. A. Birkett, T. J. Bruce, K. Chamberlain, L. M. Field, A. K. Huttly, J. L. Martin, R. Parker, A. L. Phillips, J. A. Pickett, et al. 2006. Aphid alarm pheromone produced by transgenic plants affects aphid and parasitoid behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**:10509–10513.

- Bruin, J., M. Dicke, & M. Sabelis. 1992. Plants are better protected against spider-mites after exposure to volatiles from infested conspecifics. *Experientia* **48**:525–529.
- Bruin, J., M. W. Sabelis, & M. Dicke. 1995. Do plants tap SOS signals from their infested neighbours? *Trends in Ecology & Evolution* **10**:167–170.
- Cheavegatti-Gianotto, A., H. M. C. de Abreu, P. Arruda, J. C. Bessalho Filho, W. L. Burnquist, S. Creste, L. di Ciero, J. A. Ferro, A. V. de Oliveira Figueira, T. de Sousa Filgueiras, et al. 2011. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. *Tropical Plant Biology* **4**:62–89.
- Crawley, M. J. 2012. *The R book*. Wiley.
- CTC, 2011. *Censo Varietal e de Produtividade em 2011*. Centro de Tecnologia Canavieira, Piracicaba.
- Dicke, M. 1999. Are herbivore-induced plant volatiles reliable indicators of herbivore identity to foraging carnivorous arthropods? *Entomologia Experimentalis et Applicata* **91**:131–142.
- Dicke, M., & I. T. Baldwin. 2010. The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the "cry for help". *Trends in plant science* **15**:167–175.
- Dicke, M., & M. Sabelis. 1989. How plants obtain predatory mites as bodyguards. *Netherlands Journal of Zoology* **38**:148–165.
- Dicke, M., M. W. Sabelis, J. Takabayashi, J. Bruin, & M. A. Posthumus. 1990a. Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals: prospects for application in pest control. *Journal of Chemical Ecology* **16**:3091–3118.

- Dicke, M., T. Van Beek, M. Posthumus, N. Ben Dom, H. Van Bokhoven, & A. De Groot. 1990*b*. Isolation and identification of volatile kairomone that affects acarine predator-prey interactions Involvement of host plant in its production. *Journal of Chemical Ecology* **16**:381–396.
- Dicke, M., J. J. van Loon, & R. Soler. 2009. Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. *Nature Chemical Biology* **5**:317–324.
- Duffey, S. S., & M. J. Stout. 1996. Antinutritive and toxic components of plant defense against insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **32**:3–37.
- Elzen, G., H. Williams, & S. Vinson. 1983. Response by the parasitoid *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae) to chemicals (synomones) in plants: Implications for host habitat location. *Environmental Entomology* **12**:1873–1877.
- Farmer, E. E., & C. A. Ryan. 1990. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**:7713–7716.
- Feener Jr, D. H., & B. V. Brown. 1997. Diptera as parasitoids. *Annual Review of Entomology* **42**:73–97.
- Feeny, P., 1976. Plant apparency and chemical defense. Pages 1–40 *in* *Biochemical interaction between plants and insects*. Springer.
- Fowler, S. V., & J. H. Lawton. 1985. Rapidly induced defenses and talking trees: the devil's advocate position. *American Naturalist* pages 181–195.
- Frost, C. J., H. M. Appel, J. E. Carlson, C. M. De Moraes, M. C. Mescher, & J. C. Schultz. 2007. Within-plant signalling via volatiles overcomes vascular constraints on systemic signalling and primes responses against herbivores. *Ecology Letters* **10**:490–498.

- Geervliet, J. B., A. I. Vreugdenhil, M. Dicke, & L. E. Vet. 1998. Learning to discriminate between infochemicals from different plant-host complexes by the parasitoids *Cotesia glomerata* and *C. rubecula*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **86**:241–252.
- Gifford, J., & G. Mann. 1967. Biology, Rearing, and A Trial Release of *Apanteles flavipes* in the Florida Everglades to Control the Sugarcane Borer. *Journal of Economic Entomology* **60**:44–47.
- Hensley, S., & A. M. Hammond. 1968. Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. *Journal of Economic Entomology* **61**:1742–1743.
- Hilker, M., & T. Meiners. 2002. Induction of plant responses to oviposition and feeding by herbivorous arthropods: a comparison. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **104**:181–192.
- Hoballah, M. E. F., C. Tamo, & T. C. Turlings. 2002. Differential attractiveness of induced odors emitted by eight maize varieties for the parasitoid *Cotesia marginiventris*: Is quality or quantity important? *Journal of Chemical Ecology* **28**:951–968.
- Janssen, A. 1999. Plants with spider-mite prey attract more predatory mites than clean plants under greenhouse conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **90**:191–198.
- Janssen, A., M. W. Sabelis, & J. Bruin. 2002. Evolution of herbivore-induced plant volatiles. *Oikos* **97**:134–138.
- Janssen, A., J. J. van Alphen, M. W. Sabelis, & K. Bakker. 1995*a*. Odour-mediated avoidance of competition in *Drosophila* parasitoids: the ghost of competition. *Oikos* pages 356–366.

- Janssen, A., J. J. van Alphen, M. W. Sabelis, & K. Bakker. 1995*b*. Specificity of odour-mediated avoidance of competition in *Drosophila* parasitoids. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **36**:229–235.
- Jervis, M. 2005. *Insects as natural enemies: a practical perspective*. Kluwer Academic Pub.
- Kant, M. R., K. Ament, M. W. Sabelis, M. A. Haring, & R. C. Schuurink. 2004. Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants. *Plant Physiology* **135**:483–495.
- Karban, R., & I. T. Baldwin. 1997. *Induced responses to herbivory*. University of Chicago Press.
- Kester, K., & P. Barbosa. 1991. Postemergence learning in the insect parasitoid, *Cotesia congregata* (Say)(Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Insect Behavior* **4**:727–742.
- Mattiacci, L., M. Dicke, & M. A. Posthumus. 1994. Induction of parasitoid attracting synomone in Brussels sprouts plants by feeding of *Pieris brassicae* larvae: Role of mechanical damage and herbivore elicitor. *Journal of Chemical Ecology* **20**:2229–2247.
- McConn, M., R. A. Creelman, E. Bell, J. E. Mullet, et al. 1997. Jasmonate is essential for insect defense in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**:5473–5477.
- Monteith, L. 1955. Host preferences of *Drino bohemica* Mesn.(Diptera: Tachinidae), with particular reference to olfactory responses. *The Canadian Entomologist* **87**:509–530.
- Mumm, R., & M. Hilker. 2006. Direct and indirect chemical defence of pine against folivorous insects. *Trends in plant science* **11**:351–358.

- Pallini, A., A. Janssen, & M. W. Sabelis. 1997. Odour-mediated responses of phytophagous mites to conspecific and heterospecific competitors. *Oecologia* **110**:179–185.
- Potting, R. P., L. E. Vet, & M. Dicke. 1995. Host microhabitat location by stem-borer parasitoid *Cotesia flavipes*: the role of herbivore volatiles and locally and systemically induced plant volatiles. *Journal of Chemical Ecology* **21**:525–539.
- Price, P. W., C. E. Bouton, P. Gross, B. A. McPheron, J. N. Thompson, & A. E. Weis. 1980. Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Annual Review of Ecology and Systematics* pages 41–65.
- Sabelis, M., & H. v. d. Baan. 1983. Location of distant spider mite colonies by phytoseiid predators: demonstration of specific kairomones emitted by *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **33**:303–314.
- Sabelis, M., A. Janssen, A. Pallini, M. Venzon, J. Bruin, B. Drukker, & P. Scutareanu. 1999. Behavioural responses of predatory and herbivorous arthropods to induced plant volatiles: from evolutionary ecology to agricultural applications. *Induced plant defenses against pathogens and herbivores* pages 269–296.
- Sabelis, M., R. Schuurink, J. Takabayashi, A. Janssen, M. Kant, M. van Wijk, B. Sznajder, N. Aratchige, I. Lesna, & B. Belliure. 2007. *Ecology meets plant physiology: Herbivore-induced plant responses and their indirect effects on arthropod communities*. Cambridge University Press pages 188–217.
- Sabelis, M. W., & M. C. De Jong. 1988. Should all plants recruit bodyguards? Conditions for a polymorphic ESS of synomone production in plants. *Oikos* pages 247–252.

- Sabelis, M. W., M. van Baalen, B. Pels, M. Egas, & A. Janssen. 2002. Evolution of exploitation and defense in tritrophic interactions. Cambridge University Press pages 297–321.
- Sabelis, M. W., P. C. van Rijn, & A. Janssen. 2005. Fitness consequences of food-for-protection strategies in plants. Plant-provided food and herbivore–carnivore interactions. Cambridge University Press, Cambridge, UK pages 109–134.
- Schnee, C., T. G. Köllner, M. Held, T. C. Turlings, J. Gershenzon, & J. Degenhardt. 2006. 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 of the United States of America* **103**:1129–1134.
- Schoonhoven, L. M., J. v. Loon, M. Dicke, et al. 2005. *Insect-plant biology*. Ed. 2, Oxford University Press.
- Shiojiri, K., J. Takabayashi, S. Yano, & A. Takafuji. 2001. Infochemically mediated tritrophic interaction webs on cabbage plants. *Population Ecology* **43**:23–29.
- Shonle, I., & J. Bergelson. 1995. Interplant communication revisited. *Ecology* **76**:2660–2663.
- Steidle, J. L., & J. J. Van Loon. 2003. Dietary specialization and infochemical use in carnivorous arthropods: testing a concept. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **108**:133–148.
- Steinberg, S., M. Dicke, & L. E. Vet. 1993. Relative importance of infochemicals from first and second trophic level in long-range host location by the larval parasitoid *Cotesia glomerata*. *Journal of Chemical Ecology* **19**:47–59.

- Tanaka, C., Y. Kainoh, & H. Honda. 1999. Physical Factors in Host Selection of Parasitoid Fly, *Exorista japonica* Townsend (Diptera: Tachinidae). *Applied Entomology and Zoology* **34**:91–98.
- Tumlinson, J., T. Turlings, & W. Lewis. 1992. The semiochemical complexes that mediate insect parasitoid foraging. *Agric. Zool. Rev* **5**:221–252.
- Turlings, T., S. Gouinguéné, T. Degen, & M. E. Fritzsche-Hoballah. 2002. The chemical ecology of plant–caterpillar–parasitoid interactions. *Multi-trophic Level Interactions* pages 148–173.
- Turlings, T., J. Loughrin, P. McCall, U. Röse, W. Lewis, & J. Tumlinson. 1995. How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**:4169–4174.
- Turlings, T. C., M. Bernasconi, R. Bertossa, F. Bigler, G. Caloz, & S. Dorn. 1998. The induction of volatile emissions in maize by three herbivore species with different feeding habits: possible consequences for their natural enemies. *Biological Control* **11**:122–129.
- Turlings, T. C., J. H. Tumlinson, R. R. Heath, A. T. Proveaux, & R. E. Doolittle. 1991. Isolation and identification of allelochemicals that attract the larval parasitoid, *Cotesia marginiventris* (Cresson), to the microhabitat of one of its hosts. *Journal of Chemical Ecology* **17**:2235–2251.
- Turlings, T. C., J. H. Tumlinson, & W. Lewis. 1990. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science* **250**:1251–1253.
- Turlings, T. C., & F. Wäckers. 2004. Recruitment of predators and parasitoids by herbivore-injured plants. *Advances in Insect Chemical Ecology* **2**:21–75.

- Van Alphen, J. J., & M. E. Visser. 1990. Superparasitism as an adaptive strategy for insect parasitoids. *Annual Review of Entomology* **35**:59–79.
- van Baalen, M., & M. W. Sabelis. 1993. Coevolution of patch selection strategies of predator and prey and the consequences for ecological stability. *American Naturalist* pages 646–670.
- Verkerk, R. H., & D. J. Wright. 1996. Multitrophic interactions and management of the diamondback moth: a review. *Bulletin of Entomological Research* **86**:205–216.
- Vet, L., & M. Dicke. 1992. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annual Review of Entomology* **37**:141–172.
- Vet, L. E. 1999. From chemical to population ecology: infochemical use in an evolutionary context. *Journal of Chemical Ecology* **25**:31–49.
- Vinson, S. 1985. The behavior of parasitoids. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* **9**:417–469.
- Vinson, S. B., C. S. Barrfield, & R. D. Henson. 1977. Oviposition behaviour of *Bracon mellitor*, a parasitoid of the boll weevil (*Anthonomus grandis*). *Physiological Entomology* **2**:157–164.
- Whitman, D. W., & F. J. Eller. 1990. Parasitic wasps orient to green leaf volatiles. *Chemoecology* **1**:69–76.
- Wootton, J. T. 1994. The nature and consequences of indirect effects in ecological communities. *Annual Review of Ecology and Systematics* pages 443–466.

# Identificação de voláteis de cana induzidos por herbivoria

Luisa F. Patiño Grisales<sup>1</sup>, Aline Francêz<sup>1</sup>, Claryssa de Oliveira Mota<sup>1</sup>,  
Débora Mello Furtado de Mendonça<sup>1</sup>, Hernane Dias Araújo<sup>1</sup>, Arne  
Janssen<sup>1,2</sup>, Eraldo Lima<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup>Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil.

<sup>2</sup>Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics, Section Population Biology, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands.

## Resumo

As plantas de cana de açúcar sob ataque de larvas de *Diatraea saccharalis* emitem uma mistura de voláteis que é altamente atrativo para vespas parasitoides como *Cotesia flavipes*. A liberação desses sinais é provocada por indutores da regurgitação das larvas. Estudos sugerem que as plantas emitem diferentes respostas a diferentes espécies de herbívoros e até diferentes etapas do herbívoro, proporcionando assim, sinais para parasitoides e predadores. O conhecimento destes compostos voláteis é extremamente importante para uma melhor compreensão da interação inseto-plantas influenciando o terceiro nível trófico. Os compostos foram identificados usando-se o processo de extração das plantas para a extração dos compostos voláteis e análise por GCMS. Os análises dos voláteis coletados revelaram 14 compostos, apresentando-se um composto comum nas três diferentes espécies de plantas (White pararia, Archi, RB867515) quando infestadas com o herbívoro. Os resultados mostram que ao comparar plantas infestadas com *D. saccharalis* e plantas ilesas, foram encontradas uma quantidade maior de compostos voláteis nas plantas infestadas em relação nas plantas ilesas. Então, propõe-se que tais compostos químicos servem indireta e diretamente para proteger as plantas contra artrópodes herbívoros e patógenos.

### Abstract

Sugarcane plants under attack of borer *Diatraea saccharalis* emit a specific blend of volatiles that is highly attractive to parasitoid wasps as *Cotesia flavipes*. The release of these signals is caused by regurgitation inducers of the larvae. Studies suggest that plants emit different responses to different types of herbivores and to different steps of herbivore, thus providing signals to parasitoids and predators. The knowledge of these volatile compounds is extremely important to a better comprehension of insect-plant interactions influencing the third trophic level. The compounds were identified using the sandblasting process plants for extraction of volatile and analysis by GCMS. The analysis of volatiles collected reveal 14 compounds, presenting a compound common in three different species of sugar cane plants (White pararia, Archi, RB867515) when infested with the herbivore. The results showed that when compared infested plants with *D. saccharalis* and clean plants, was found a higher amount of volatiles in plants infested than in clean plants. So, it is proposed that such compounds serve indirect and directly to protect the plants against arthropod herbivores and pathogens.

## 1 Introdução

Plantas sob o ataque de herbívoros liberam uma variedade de compostos orgânicos voláteis, os quais estão envolvidos na atração dos inimigos naturais desses herbívoros (Agrawal et al., 2002; Agrawal, 2007; Van Wijk et al., 2010; van Wijk et al., 2011). Esses voláteis consistem de uma mistura complexa de compostos induzidos por herbivoria além de compostos não induzidos (Van Wijk et al., 2010). Parasitoides de larvas de lepidoptera podem encontrar microhabitats de seus hospedeiros usando voláteis emitidos pelo complexo planta-herbívoro (Vet & Dicke, 1992; Takabayashi & Dicke, 1996). O uso de estímulos químicos derivados dos herbívoros é frequentemente limitado pela sua baixa detectabilidade, especialmente em distâncias mais longas (Dicke et al., 1990*a*; Turlings et al., 1991*b*). Dessa forma, estímulos de plantas são normalmente mais facilmente disponíveis por causa da biomassa relativamente maior, mas são menos confiáveis acerca da presença de herbívoros (Vet & Dicke, 1992). Os insetos possuem sensilas que detectam concentrações mínimas de compostos químicos, e espera-se que a alta sensibilidade tenha evoluído principalmente através de interações interespecíficas em que pressões de seleção coincidem e a variação qualitativa do sinal é muito baixa (Masson et al., 1990).

O valor da informação da planta depende fortemente do grau de infestação de herbívoros, sendo que os danos por estes aumenta sobremaneira a emissão de compostos voláteis (Dicke & Sabelis, 1989*b*; Dicke et al., 1990*b*; Turlings et al., 1990*b*). Algumas das substâncias emitidas a partir das plantas infestadas são apenas o resultado da ruptura mecânica de células da planta e, portanto, não são específicos de herbívoros. No entanto, outros voláteis que são liberados após danos são indicadores específicos de herbívoros na

planta (Dicke et al., 1990*a,b*; Turlings et al., 1990*b*) chamados sinomônios. Por exemplo, o ácaro predador *Phytoseiulus persimilis* é atraído pela indução de sinomônios produzidos após dano causado pelo ácaro aranha *Tetranychus urticae* em plantas de feijão ou pepino (Dicke et al., 1990*a,b*), do mesmo modo, plantas de milho sob ataque de larvas de noctuidios liberam diversos terpenóides que são atraentes para o parasitoide generalista *Cotesia marginiventris* (Turlings et al., 1990*b*; Turlings & Tumlinson, 1991).

Voláteis de plantas são conhecidos por sua diversidade na composição química, complexidade das misturas, variabilidade no tempo e dependência às condições da cultura (Masson et al., 1990; Visser, 1986). Os inimigos naturais tem a capacidade de lidar com essa complexidade, reduzindo seu foco para um conjunto limitado de produtos químicos que, por meio da experiência, foram caracterizados como uma combinação planta-herbívoro em particular (Ding et al., 1989; Lewis & Tumlinson, 1988; Turlings et al., 1990*a,b*; Vet & Groenewold, 1990). Embora muitos estudos demonstrem a atração de parasitóides aos voláteis, apenas alguns destes produtos químicos foram isolados e identificados (Turlings et al., 1991*b*; Eller et al., 1988; Nordlund et al., 1981).

É possível que parasitoides submetidos a condições específicas de voláteis tem uma subsequente resposta intensificada significativamente a estes produtos (Lewis & Tumlinson, 1988). Isso pode ter consequências positivas para os programas de liberação em massa de agentes de controle biológico, buscando alta eficiência com baixas frequências de liberações (Lewis & Nordlund, 1985). Assim, se torna importante a identificação de semioquímicos tanto de plantas (*Saccharum* sp.) ilesas quanto atacadas por herbívoros para saber quais voláteis estão envolvidos na interação inseto-planta e se é possível aumentar a taxas de parasitismo ao utilizar esses compostos em campo.

A cana de açúcar é cultivada em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo, em ambos os lados do equador, até aproximadamente 35° N e 35° S (van Dillewijn et al., 1952). Variedades modernas de cana são produtos de cruzamentos entre espécies do gênero *Saccharum* que foram feitas por cria-

dores no final do século XIX (Matsuoka et al., 1999). *Saccharum officinarum* L. é geralmente conhecida como a cana nobre, porque é forte e produz suco doce e abundante, encontrando-se nesta espécie a variedade RB867515. Já *Saccharum sinense* Roxb. é conhecido como bastão chinês e indiano, já que era inicialmente cultivado na China e na Índia antes da disseminação das variedades modernas (Naidu & Sreenivasan, 1987), encontrando-se aqui as variedades White pararia e Archi. Esta cultura, defronta-se com uma série de problemas agrônômicos, incluindo a incidência de pragas e, em particular, a presença da broca *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae), que constroi galerias nos colmos, levando a uma menor produção de biomassa e açúcar, além do aumento de infecções fúngicas e contaminação do suco. A broca-da-cana é controlada principalmente pela liberação massiva de *Cotesia flavipes* (Cam) (Hymenoptera: Braconidae), normalmente criada em laboratórios (Cheavegatti-Gianotto et al., 2011). Esse parasitoide tem sido reportado com diferentes graus de êxito em muitas áreas do mundo, sendo introduzida em Barbados (Alam et al., 1971), Brasil, Colômbia (Mendonça, 1996; Mohyuddin et al., 1981), Florida (Gifford & Mann, 1967), Nicarágua (Huis, 1981) e Texas (Fuchs et al., 1979).

Voláteis emitidos pelas plantas podem influenciar o comportamento de busca dos parasitoides (Barbosa et al., 1988; Lewis & Martin Jr, 1990; Vet & Dicke, 1992; Dicke, 1994; Godfray, 1995). Diferentes espécies de plantas apresentam diferenças em seu perfil de voláteis (Loughrin et al., 1994; Boevé et al., 1996; Ngi-Song et al., 1996), o que também pode ocorrer em plantas da mesma espécie, existindo diferenças claras entre os genótipos (Takabayashi et al., 1991b; Loughrin et al., 1995; Turlings et al., 1998b; Gouinguéné et al., 2001). Então, pelo fato de *C. flavipes* apresentar diferenças na escolha das espécies testadas (Capítulo 1), o perfil de voláteis entre plantas atuais e rústicas espera-se ser diferente. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi identificar os voláteis emitidos por plantas de cana de açúcar ilesas e quando atacadas por *D. saccharalis*.

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Produção das plantas de cana de açúcar

Estacas maduras do terço médio da planta de cana de açúcar (*Saccharum* spp.) das espécies rústicas (White pararia e Archi) e atuais (RB 867515) foram quinzenalmente semeadas em uma casa de vegetação. Estas foram semeadas em bandejas de plástico utilizando um substrato comercial para mudas (substrato para plantas, Tropstrato HT hortaliças), mantidas em casa de vegetação com controle de temperatura, umidade, luz natural e regadas diariamente até atingirem a idade para o transplante. Ao atingir os 20 dias de semeadura, as mudas foram transplantadas para vasos plásticos pretos de 1,5 L contendo uma mistura de terra com substrato em uma proporção 1:1. Feito isso, elas foram colocadas em bancadas com irrigação automatizada e uma semana depois foi realizada uma adubação de NPK (20-5-20) 2 gramas por planta, aplicando água imediatamente e repetindo 30 dias depois. As plantas foram utilizadas para os experimentos, utilizando canas da mesma idade fenológica (60 dias) e com sete folhas perfeitamente desenvolvidas.

### 2.2 Criação de *Diatraea saccharalis*

Os indivíduos de *D. saccharalis* utilizados nesse trabalho foram criados em dieta artificial (Hensley & Hammond, 1968) e as pupas foram mantidas em recipientes sem dieta, até a emergência dos adultos. Todos os insetos foram criados em condições controladas no laboratório sob temperatura de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $60 \pm 2\%$  e fotoperíodo de 12 horas.

Na criação de *D. saccharalis*, foram utilizadas gaiolas de PVC de 30x20 com 50 casais onde foi fornecido um algodão com água. As gaiolas foram vistoriadas diariamente para monitorar a ocorrência de cópulas e oviposições.

### **2.3 Extração de compostos voláteis liberados por *Saccharum* sp. infestado com *Diatraea saccharalis* e plantas limpas.**

Para a extração dos compostos voláteis de cana de açúcar infestadas com *D. saccharalis* e plantas limpas foram feitas as aerações das plantas. Para isso, plantas de cana da mesma idade fenológica foram infestadas com seis larvas por planta, que permaneciam incubados por um período de 48 horas, ou não foram infestadas (plantas limpas). Essas plantas foram mantidas dentro de gaiolas feitas de voal de 1 metro de comprimento em uma sala com condições controladas para evitar a infestação com outros artrópodes. Após as 48 horas de infestação, foi testada a atratividade das plantas em um olfatômetro de tubo em Y, utilizando parasitoides, *C. flavipes*.

Após os testes no olfatômetro, as plantas foram levadas para uma sala e acondicionadas em campânulas de vidro, para a aeração. Foram conectados a estas campânulas de vidro, os filtros de carvão ativado para a limpeza do ar que entra nos tubos e os filtros de resina HiSep Q (80/100 mesh; Alltech, Deerfield, IL, USA), onde os compostos orgânicos voláteis ficaram adsorvidos. A aeração foi feita com o auxílio de um compressor que empurra o ar fazendo com que este passe pelo filtro de carvão ativado, e de uma bomba de vácuo que faz a sucção deste ar passando pelas plantas dentro das campânulas. Este processo permite que ocorra o carregamento dos compostos voláteis que ficaram adsorvidos à resina HiSep Q no filtro de saída. A aeração das plantas foi realizada com 24 horas, utilizando-se um fluxo de ar de 150 mL/min. Todo o material de vidro utilizado foi aquecido a 280°C durante 8 horas antes da utilização. Após a aeração, o compressor e a bomba a vácuo foram desligados

e os compostos orgânicos voláteis foram extraídos dos filtros de resina HiSep Q com a lavagem dos mesmos com 300  $\mu\text{L}$  de n-hexano (Sigma Aldrich, USA), coletados com um tubo de vidro e armazenados em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

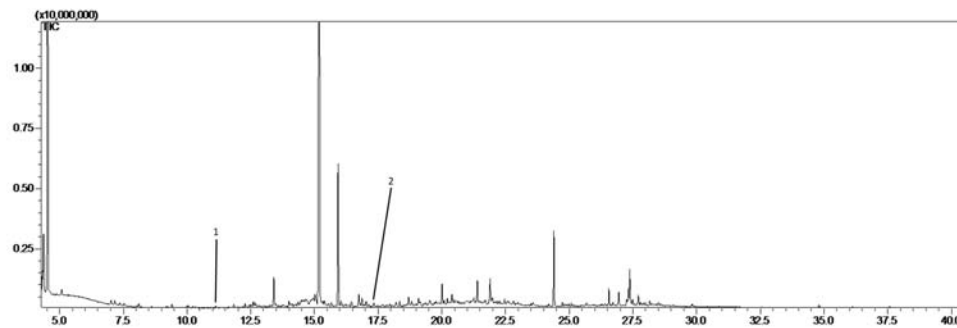
## 2.4 Identificação dos compostos voláteis

Para a identificação dos compostos, inicialmente o volume das amostras foi reduzido a 90  $\mu\text{l}$ , à temperatura ambiente em vidros de francke-vials e foi adicionado a essas amostras 10  $\mu\text{l}$  de padrão interno (n-heptil acetato), após isto, foi reduzido de novo a 30  $\mu\text{l}$  à temperatura ambiente nos vidros de francke-vials. Este padrão interno é conhecido por ser separável dos demais compostos e não estar presente na amostra, servindo como um parâmetro de comparação. As amostras diluídas em hexano foram analisadas em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa (GC-MS, Shimadzu, Modelo QP2010), por meio da injeção manual de 1  $\mu\text{l}$  do extraído de hexano. O GC-MS utilizado está equipado com uma coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) revestida com Rtx-5MS (df = 0,25  $\mu\text{m}$ ; J W Scientific Folsom, CA, USA), utilizando o hélio como gás carreador (1 mL/min.). A temperatura da coluna se iniciara a  $35^{\circ}\text{C}$ , permanecendo por 5 minutos, se elevava a uma taxa de  $8^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ , até atingir  $280^{\circ}\text{C}$ , permanecendo por mais 5 minutos, totalizando um tempo de análise aproximadamente de 40 min. As análises foram realizadas em modo splitless. Os dados foram analisados pelo programa GCMS solutions (Shimadzu Corporation) e a identificação baseou na comparação dos espectros de massa de cada composto com o banco de dados das bibliotecas NIST08 MS e Wiley. Com os tempos de retenção dos compostos e dos padrões de hidrocarbonetos (C7 - C30), foram calculados os índices de Kovats (KI). A partir dessas informações, foram identificados os compostos das amostras tendo como base os índices de Kovats tabelados por Adams et al. (2007). A identificação de alguns compostos foi confirmada por comparação com os espectros de massa e tempos de retenção de padrões injetados.

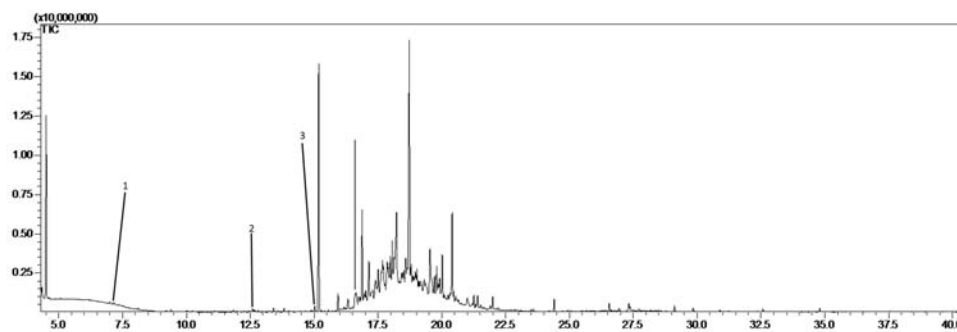
### 3 Resultados

Os compostos identificados encontram-se discriminados na Tabela 1. Apenas um composto em comum ( $\beta$ -pineno) foi encontrado nas três diferentes espécies quando infestados com larvas de *Diatraea saccharalis* por um período de 48 horas. Três compostos em comum (Hexanal, Decanal, Methyl butyl acetate <2->) foram encontrados nas espécies Archi e RB867515 e dois (Octanal, Nonanal) nas espécies White pararia e RB867515. Nas plantas ilesas, um composto em comum (Nonanal) foi encontrado nas espécies White pararia e RB867515 e um composto em comum (Decanal) nas espécies Archi e RB867515. As (Figuras 5 e 6) mostra os cromatogramas típicos para coleções de voláteis feitos a partir de plantas infestadas e ilesas por um período de 24 horas. Para identificar a maioria destes compostos foi possível mediante a comparação dos espectros de massa e tempos de retenção. Estes certos compostos foram comparados com os espectros de massa da biblioteca e identificados provisionalmente.

Archi limpa



White pararia limpa



RB867515 limpa

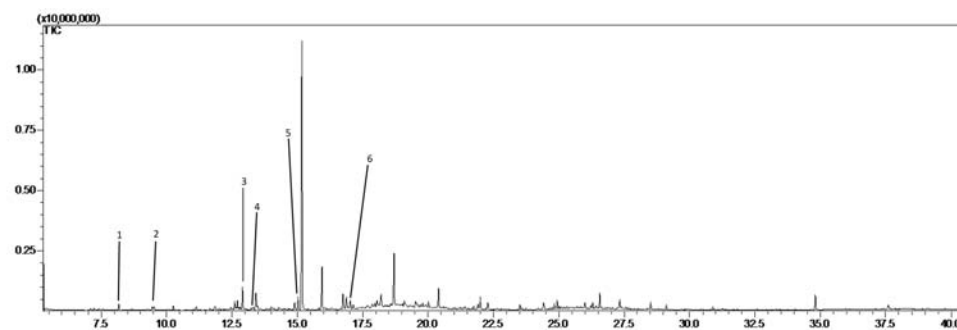
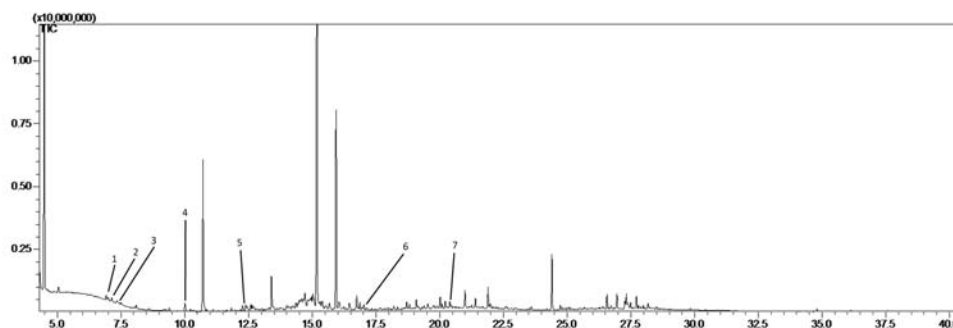
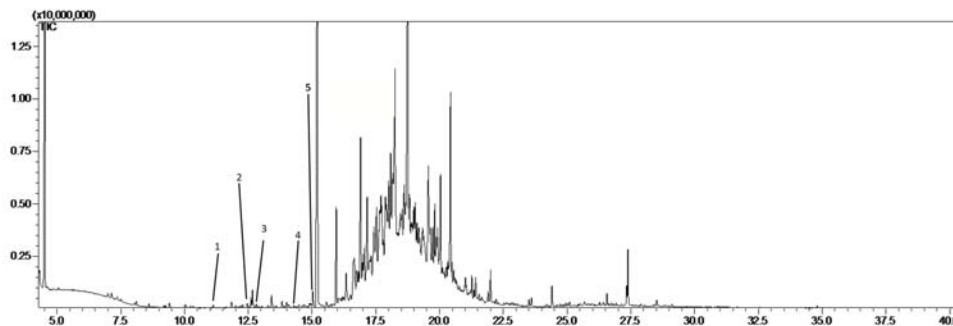


Figura 5: Cromatogramas típicos de plantas de cana de açúcar limpas: Archi (1) Alpha pineno, (2) Decanal; White pararia (1) Hexanal, (2) Beta pineno, (3) Nonanal; RB867515 (1) Hexan-3-ol, (2) Hexanol, (3) Octanal, (4) Hexenil acetate <(3Z)->, (5) Nonanal, (6) Decanal.

Archi infestada



White pararia infestada



RB867515 infestada

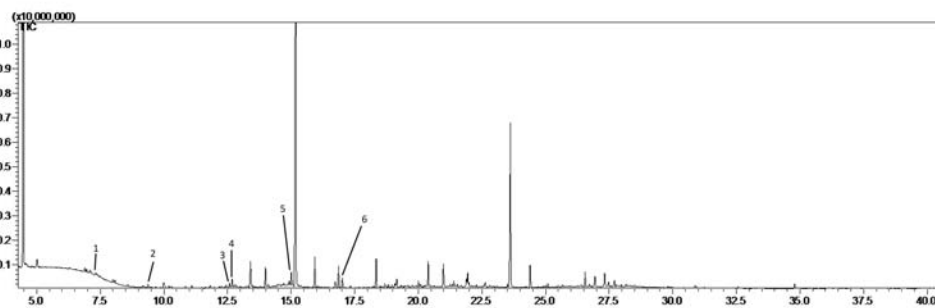


Figura 6: Cromatogramas típicos de plantas de cana de açúcar infestadas por um período de 48 horas com broca da cana (*Diatraea saccharalis*): Archi (1) Hexan-3-ona, (2) Hexanal, (3) Hexanol <2->, (4) Metil butil acetato <2->, (5) Beta pineno, (6) Decanal, (7) Alpha copaeno; White pararia (1) Alpha pineno, (2) Beta pineno, (3) Octanal, (4) Ocimeno <(E)-beta->, (5) Nonanal; RB867515 (1) Hexanal, (2) Metil butil acetato <2->, (3) Beta pineno, (4) Octanal, (5) Nonanal, (6) Decanal

Tabela 1: Compostos químicos voláteis identificados de plantas limpas e infestadas com *Diatraea saccharalis* por um período de 48h nos diferentes genótipos Archi, White pararia e RB867515. KI=Índice de Kovats.

Grupo Funcional e Compostos	KI	Plantas Ilesas			Plantas Infestadas		
		Archi	White pararia	RB867515	Archi	White pararia	RB867515
<b>Cetona</b>							
Hexan-3-ona	795				x		
<b>Aldeído</b>							
Hexanal	801		x		x	x	
Octanal	998			x		x	
Nonanal	1100		x	x		x	
Decanal	1201	x		x		x	
<b>Ester</b>							
Metil butil acetato <2->	881				x		
Hexenil acetato <(3Z)->	1005			x			
<b>Álcool</b>							
Hexanol <2->	797					x	
Hexan-3-ol	797			x			

*Continua na página seguinte*

Continuação da Tabela 1

Grupo Funcional e Compostos	KI	Plantas Ilesas			Plantas Infestadas		
		Archi	White pararia	RB867515	Archi	White pararia	RB867515
Hexanol	870			x			
<b>Monoterpeno</b>							
Alpha pineno	939	x			x		
Beta pineno	979		x		x	x	
Ocimeno < (E) -beta->	1050				x		
<b>Sesquiterpeno</b>							
Alpha copaeno	1376				x		

## 4 Discussão

Reações sistêmicas induzidas pelo estresse em plantas são comuns e a produção e transporte de produtos químicos geralmente funcionam como defesa direta contra herbívoros e patógenos (Green & Ryan, 1972; Lin et al., 1990). Mas também, se conhece que plantas liberam compostos voláteis em resposta a uma lesão (Turlings & Tumlinson, 1992). Assim, as plantas, após uma lesão de herbivoria, respondem com a liberação de quantidades relativamente grandes de voláteis, comparadas a plantas ilesas, além de se induzir novos compostos os quais são expressos após um estímulo (Du et al., 1998; De Moraes et al., 1998). Portanto, as diferentes espécies de cana de açúcar testadas mostram diferença no perfil de voláteis tanto de plantas ilesas quanto de plantas que sofreram herbivoria (Tabela 1), como ocorre em outras espécies de plantas que liberam voláteis que atraem parasitoides até seus hospedeiros (Dicke & Sabelis, 1989a; Turlings et al., 1990b; Agelopoulos & Keller, 1994; Takabayashi et al., 1995; Powell et al., 1998; Gouinguéné et al., 2001). Acredita-se que os sinais proporcionados pelas plantas são consequência da ausência de quantidades detectáveis de sinônimos, sinais originários diretamente do hospedeiro (Vet & Dicke, 1992; Tumlinson et al., 1993). No entanto, estudos mostram que odores de plantas contêm informações específicas dos herbívoros pelas quais são atacadas (Sabelis & Baan, 1983; Takabayashi et al., 1991b; De Moraes et al., 1998; Guerrieri et al., 1999). Isso explica os resultados observados no capítulo 1, tanto no olfatômetro quanto nas gaiolas, vendo-se claramente que as canas infestadas apresentam informação sobre o hospedeiro, permitindo a discriminação entre plantas infestadas e ilesas por *C. flavipes*.

Compostos fenólicos (Coley et al., 1985; Matern & Kneusel, 1988; Peters et al., 1990; Bennett & Wallsgrave, 1994; Duffey & Stout, 1996), terpenos (Bennett & Wallsgrave, 1994; Langenheim, 1994; Duffey & Stout, 1996; Paré & Tumlinson, 1999) e alcalóides (Baldwin, 1988; Bennett & Wallsgrave, 1994; Duffey & Stout, 1996) (Tabela 1) são compostos defensivos encontrados tanto em plantas limpas quanto infestadas (Figuras 5 e 6). Além de utilizarem esses compostos como defesa química direta contra a herbivoria, as plantas se beneficiam indiretamente pela formação de sinais químicos em seu entorno (Nadel & Alphen, 1987; Dicke & Sabelis, 1989a; Turlings et al., 1990b; Turlings & Tumlinson, 1991). Plantas atacadas por herbívoros liberam pistas químicas que são usadas pelos inimigos naturais. Por exemplo, vários dos terpenóides liberados pelo milho danificado tanto por lagarta (Turlings et al., 1993b) quanto por ácaros (Dicke et al., 1990a; Takabayashi et al., 1991a), além de servir como repelente de insetos (Dicke et al., 1990a; Turlings & Tumlinson, 1991), serve como atraente dos inimigos naturais dos herbívoros. Já que, tanto predadores quanto parasitoides utilizam eficazmente os sinais oriundos das plantas (Sabelis & De Jong, 1988; Dicke & Sabelis, 1989a; Turlings et al., 1990b; Whitman & Eller, 1990). Dessa forma, tem se sugerido que a comunicação entre plantas e o terceiro nível trófico tem evoluído (Turlings et al., 1995).

As plantas tem se adaptado a melhorar a função de sinalização dos compostos voláteis, o que tem se traduzido da comunicação observada entre plantas e herbívoros (Turlings et al., 1995). Estas emissões de voláteis começam algumas horas após a herbivoria e os odores são produzidos principalmente durante o dia, quando a maioria dos parasitoides forrageiam (Nadel & Alphen, 1987; Takabayashi et al., 1991b; Turlings et al., 1991a; Loughrin et al., 1994; McCall et al., 1994). As secreções dos insetos desempenham um papel importante na indução dos metabólitos secundários, já que as respostas das plantas são específicas aos danos causados pela herbivoria e não podem ser induzidas da mesma maneira por danos mecânicos (Turlings et al., 1995).

Conseqüentemente, muitos estudos tem sido realizados com relação à identificação destes compostos voláteis (Bleeker et al., 2009; Proffit et al., 2011; Copolovici et al., 2012) visando o melhor entendimento do complexo planta-herbívoros na atração dos inimigos naturais (van Wijk et al., 2008; Zhang et al., 2009; Van Wijk et al., 2010; van Wijk et al., 2011). Dessa forma, os resultados obtidos aqui podem explicar a maior atração de *Cotesia flavipes* a odores de plantas atuais e rústicas infestadas por *Diatraea saccharalis* do que a plantas limpas, como dito anteriormente nos resultados de olfatômetro. No entanto, é conhecido que as diferentes misturas de produtos voláteis liberados a partir de plantas danificadas são frequentemente específicos, dependendo do tipo de herbívoro, sua idade, abundância e tipo de alimentação (Yoneya et al., 2009; Clavijo McCormick et al., 2012). Assim, entre os diferentes grupos de plantas é possível observar os mesmos grupos de compostos químicos que compõem a mistura, como por exemplo, os monoterpenos e sesquiterpenos (Turlings et al., 1998a; Arimura et al., 2004), os quais foram encontrados na identificação de compostos das plantas de cana de açúcar. De acordo com Clavijo McCormick et al. (2012), as quantidades relativas destes compostos podem variar entre as plantas, o que pode contribuir para a especificidade tanto de parasitoides quanto de predadores (por exemplo, Dicke & Sabelis (1989a); Turlings et al. (1990b)).

A maior quantidade de compostos liberados nas plantas danificadas comparadas com plantas sadias é surpreendente, principalmente nas espécies Archi e White pararia (Tabela 1), já que a quantidade de compostos liberados por RB867515 tanto limpa quanto infestada foi similar, isto explica porque *C. flavipes*, tem uma maior escolha por plantas infestadas e conseqüentemente pode-se concluir que o parasitoide não se estabeleceu em campos onde não tenha presença de hospedeiros. As substâncias voláteis emitidas na espécie RB867515 é comparável com as encontradas nas duas espécies rústicas. Loughrin et al. (1995) comparou emissões de odores de uma planta selvagem com plantas cultivadas de algodão. A variedade selvagem mostrou consideravelmente mais emissão de voláteis. Este não foi o caso de nosso estudo,

o que indica que o processo de cruzamentos para melhorar características produtivas da cana de açúcar não afetou significativamente a liberação de voláteis. Isto é contrário ao esperado, já que é de esperar que a partir dos cruzes diminuam as substâncias de defesa secundárias nas plantas atuais (Benrey et al., 1998). A presença de compostos como terpenos nas diferentes espécies é essencial, pois atuam como fitoalexinas (antibióticos produzidos pelas plantas em resposta ao ataque de microrganismos) e como repelentes de herbívoros (Duffey & Stout, 1996). Portanto, os monoterpenos e sesquiterpenos presentes nas amostras são importantes na defesa da cana de açúcar, principalmente  $\beta$ -pineno presente nas diferentes espécies quando infestadas (Figuras 5 e 6), conhecido por ser induzido pela herbivoria, ajudando à orientação dos inimigos naturais, encontrado também em algodão (Loughrin et al., 1994; McCall et al., 1994). Por outro lado,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -ocimeno e  $\alpha$ -copaeno não foram liberados em todas as espécies quando infestadas, apresentando-se também estes compostos na mistura de voláteis liberados sob ataque de lagartas em plantas de maçã e milho (Boevé et al., 1996; Turlings et al., 1998b; Gouinguéné et al., 2001; Von Mérey et al., 2012).

Finalmente, neste estudo apresentamos compostos voláteis que são interpretados como respostas defensivas a pragas, provavelmente ativadas por sinais liberados durante a alimentação do herbívoro. Há pouca informação disponível sobre os mecanismos de defesa da cana de açúcar contra danos por insetos (Falco et al., 2001), mas a resposta das plantas à herbivoria tem sido amplamente documentado em outras espécies de plantas (Nadel & Alphen, 1987; Dicke & Sabelis, 1989a; Turlings et al., 1993a; Mattiacci et al., 1995; Boevé et al., 1996; Ryan & Pearce, 2001). No entanto, existem numerosas classes de fitoquímicos que conferem resistência à planta contra herbívoros. Essas classes incluem lecitinas, cêras, compostos fenólicos, açúcares, inibidores da alfa-amilase e inibidores de proteinase (Broadway, 1995). A análise dos genes expressos em cana de açúcar envolvidos no metabolismo secundário sugere que os diferentes compostos e classes, podem atuar como barreiras defensivas contra o ataque dos insetos (Falco et al., 2001). Então, a evidência

química junto com o comportamento observado de *C. flavipes* (Capítulo 1), mostra que os danos produzidos por herbívoros induzem a produção de voláteis de plantas que servem como sinais benéficos para as plantas e prejudiciais para os herbívoros.

## 5 Referências

- Adams, R. P., et al. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Ed. 4, Allured Publishing Corporation.
- Agelopoulos, N. G., & M. A. Keller. 1994. Plant-natural enemy association in tritrophic system, *Cotesia rubecula*-*Pieris rapae*-*Brassicaceae* (Cruciferae). III: Collection and identification of plant and frass volatiles. *Journal of chemical ecology* **20**:1955–1967.
- Agrawal, A. A. 2007. Macroevolution of plant defense strategies. *Trends in Ecology & Evolution* **22**:103–109.
- Agrawal, A. A., A. Janssen, J. Bruin, M. A. Posthumus, & M. W. Sabelis. 2002. An ecological cost of plant defence: attractiveness of bitter cucumber plants to natural enemies of herbivores. *Ecology Letters* **5**:377–385.
- Alam, M., F. Bennett, & K. Carl. 1971. Biological control of *Diatraea saccharalis* (F.) in Barbados by *Apanteles flavipes* Cam. and *Lixophaga Diatraeae* TT. *Entomophaga* **16**:151–158.
- Arimura, G.-i., D. P. Huber, & J. Bohlmann. 2004. Forest tent caterpillars (*Malacosoma disstria*) induce local and systemic diurnal emissions of terpenoid volatiles in hybrid poplar (*Populus trichocarpa* × *deltoides*): cDNA cloning, functional characterization, and patterns of gene expression of (-)-germacrene D synthase, PtdTPS1. *The Plant Journal* **37**:603–616.
- Baldwin, I. T. 1988. Short-term damage-induced increases in tobacco alkaloids protect plants. *Oecologia* **75**:367–370.

- Barbosa, P., D. K. Letourneau, et al. 1988. Novel aspects of insect-plant interactions. John Wiley and Sons Ltd.
- Bennett, R. N., & R. M. Wallsgrave. 1994. Tansley review no. 72. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist* pages 617–633.
- Benrey, B., A. Callejas, L. Rios, K. Oyama, & R. F. Denno. 1998. The Effects of Domestication of *Brassica* and *Phaseolus* on the Interaction between Phytophagous Insects and Parasitoids. *Biological Control* **11**:130–140.
- Bleeker, P. M., P. J. Diergaarde, K. Ament, J. Guerra, M. Weidner, S. Schütz, M. T. de Both, M. A. Haring, & R. C. Schuurink. 2009. The role of specific tomato volatiles in tomato-whitefly interaction. *Plant Physiology* **151**:925–935.
- Boevé, J.-L., U. Lengwiler, L. Tollsten, S. Dorn, & T. C. Turlings. 1996. Volatiles emitted by apple fruitlets infested by larvae of the European apple sawfly. *Phytochemistry* **42**:373–381.
- Broadway, R. M. 1995. Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? *Journal of Insect Physiology* **41**:107–116.
- Cheavegatti-Gianotto, A., H. M. C. de Abreu, P. Arruda, J. C. Bessalho Filho, W. L. Burnquist, S. Creste, L. di Ciero, J. A. Ferro, A. V. de Oliveira Figueira, T. de Sousa Filgueiras, et al. 2011. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. *Tropical Plant Biology* **4**:62–89.
- Clavijo McCormick, A., S. B. Unsicker, & J. Gershenzon. 2012. The specificity of herbivore-induced plant volatiles in attracting herbivore enemies. *Trends in plant science* .
- Coley, P., J. Bryant, & F. Chapin. 1985. Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science* **230**:895.

- Copolovici, L., A. Kännaste, L. Pazouki, & Ü. Niinemets. 2012. Emissions of green leaf volatiles and terpenoids from *Solanum lycopersicum* are quantitatively related to the severity of cold and heat shock treatments. *Journal of Plant Physiology* **169**:664–672.
- De Moraes, C., W. Lewis, P. Pare, H. Alborn, & J. Tumlinson. 1998. Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature* **393**:570–573.
- Dicke, M. 1994. Local and systemic production of volatile herbivore-induced terpenoids: their role in plant-carnivore mutualism. *Journal of Plant Physiology* **143**:465–472.
- Dicke, M., & M. Sabelis. 1989*a*. How plants obtain predatory mites as bodyguards. *Netherlands Journal of Zoology* **38**:148–165.
- Dicke, M., & M. W. Sabelis. 1989*b*. Does it pay plants to advertize for bodyguards. Towards a cost-benefit analysis of induced synomone production pages 341–358.
- Dicke, M., M. W. Sabelis, J. Takabayashi, J. Bruin, & M. A. Posthumus. 1990*a*. Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals: prospects for application in pest control. *Journal of Chemical Ecology* **16**:3091–3118.
- Dicke, M., T. Van Beek, M. Posthumus, N. Ben Dom, H. Van Bokhoven, & A. De Groot. 1990*b*. Isolation and identification of volatile kairomone that affects acarine predator-prey interactions Involvement of host plant in its production. *Journal of Chemical Ecology* **16**:381–396.
- Ding, D., P. D. Swedenborg, & R. L. Jones. 1989. Plant odor preferences and learning in *Macrocentrus grandii* (Hymenoptera: Braconidae), a larval parasitoid of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* pages 164–176.

- Du, Y., G. M. Poppy, W. Powell, J. A. Pickett, L. J. Wadhams, & C. M. Woodcock. 1998. Identification of semiochemicals released during aphid feeding that attract parasitoid *Aphidius ervi*. *Journal of Chemical Ecology* **24**:1355–1368.
- Duffey, S. S., & M. J. Stout. 1996. Antinutritive and toxic components of plant defense against insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **32**:3–37.
- Eller, F., J. Tumlinson, & W. Lewis. 1988. Beneficial arthropod behavior mediated by airborne semiochemicals: Source of volatiles mediating the host-location flight behavior of *Microplitis croceipes* (Cresson)(Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of *Heliothis zea* (Boddie)(Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology* **17**:745–753.
- Falco, M. C., P. A. S. Marbach, P. Pompermayer, F. C. C. Lopes, & M. C. Silva-Filho. 2001. Mechanisms of sugarcane response to herbivory. *Genetics and molecular biology* **24**:113–122.
- Fuchs, T., F. Huffman, & J. Smith Jr. 1979. Introduction and establishment of *Apanteles flavipes* (Hym.: Braconidae) on *Diatraea saccharalis* (Lep.: Pyralidae) in Texas. *Entomophaga* **24**:109–114.
- Gifford, J., & G. Mann. 1967. Biology, Rearing, and A Trial Release of *Apanteles flavipes* in the Florida Everglades to Control the Sugarcane Borer. *Journal of Economic Entomology* **60**:44–47.
- Godfray, H. 1995. Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology. *Environmental Entomology* **24**:483–484.
- Gouinguéné, S., T. Degen, & T. C. Turlings. 2001. Variability in herbivore-induced odour emissions among maize cultivars and their wild ancestors (teosinte). *Chemoecology* **11**:9–16.

- Green, T., & C. Ryan. 1972. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science* **175**:776–777.
- Guerrieri, E., G. Poppy, W. Powell, E. Tremblay, & F. Pennacchio. 1999. Induction and systemic release of herbivore-induced plant volatiles mediating in-flight orientation of *Aphidius ervi*. *Journal of Chemical Ecology* **25**:1247–1261.
- Hensley, S., & A. M. Hammond. 1968. Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. *Journal of Economic Entomology* **61**:1742–1743.
- Huis, A. V. 1981. Integrated pest management in the small farmers maize crop in Nicaragua. *Med. Landb. Wageningen* **81**:221.
- Langenheim, J. H. 1994. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology* **20**:1223–1280.
- Lewis, W., & W. Martin Jr. 1990. Semiochemicals for use with parasitoids: status and future. *Journal of Chemical Ecology* **16**:3067–3089.
- Lewis, W., & D. Nordlund. 1985. Behavior-modifying chemicals to enhance natural enemy effectiveness. Academic Press .
- Lewis, W., & J. H. Tumlinson. 1988. Host detection by chemically mediated associative learning in a parasitic wasp. *Nature Publishing Group* **331**:257–259.
- Lin, H., M. Kogan, & D. Fischer. 1990. Induced resistance in soybean to the Mexican bean beetle (Coleoptera: Coccinellidae): comparisons of inducing factors. *Environmental Entomology* **19**:1852–1857.
- Loughrin, J. H., A. Manukian, R. R. Heath, & J. H. Tumlinson. 1995. Volatiles emitted by different cotton varieties damaged by feeding beet armyworm larvae. *Journal of Chemical Ecology* **21**:1217–1227.

- Loughrin, J. H., A. Manukian, R. R. Heath, T. Turlings, & J. H. Tumlinson. 1994. Diurnal cycle of emission of induced volatile terpenoids by herbivore-injured cotton plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**:11836–11840.
- Masson, C., H. Mustaparta, et al. 1990. Chemical information processing in the olfactory system of insects. *Physiological Reviews* **70**:199–245.
- Matern, U., & R. E. Kneusel. 1988. Phenolic compounds in plant disease resistance. *Phytoparasitica* **16**:153–170.
- Matsuoka, S., A. Garcia, & G. Calheiros. 1999. Hibridação em cana-de-açúcar. *Hibridacao Artificial de Plantas*. Vicoso: Editora UFV pages 221–254.
- Mattiacci, L., M. Dicke, & M. A. Posthumus. 1995. Beta-glucosidase: an elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**:2036–2040.
- McCall, P. J., T. C. Turlings, J. Loughrin, A. T. Proveaux, & J. H. Tumlinson. 1994. Herbivore-induced volatile emissions from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seedlings. *Journal of chemical ecology* **20**:3039–3050.
- Mendonça, A. 1996. *Pragas da cana-de-açúcar*. Maceió: Insetos & Cia **1**:239.
- Mohyuddin, A., C. Inayatullah, & E. King. 1981. Host selection and strain occurrence in *Apanteles flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) and its bearing on biological control of graminaceous stem-borers (Lepidoptera: Pyralidae). *Bulletin of Entomological Research* **71**:575–581.
- Nadel, H., & J. v. Alphen. 1987. The role of host-and host-plant odours in the attraction of a parasitoid, *Epidinocarsis lopezi*, to the habitat of its host, the cassava mealybug, *Phenacoccus manihoti*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **45**:181–186.

- Naidu, K. M., & T. Sreenivasan, 1987. Conservation of sugarcane germplasm. Pages 33–53 *in* Proceedings of the Copersucar International Sugarcane Breeding Workshop. Copersucar Technology Centre, Piracicaba-SP, Brazil.
- Ngi-Song, A. J., W. A. Overholt, P. G. Njagi, M. Dicke, J. N. Ayertey, & W. Lwande. 1996. Volatile infochemicals used in host and host habitat location by *Cotesia flavipes* Cameron and *Cotesia sesamiae* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), larval parasitoids of stemborers on graminiae. *Journal of Chemical Ecology* **22**:307–323.
- Nordlund, D. A., R. L. Jones, W. J. Lewis, et al. 1981. Semiochemicals. Their role in pest control. John Wiley & Sons.
- Paré, P. W., & J. H. Tumlinson. 1999. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiology* **121**:325–332.
- Peters, N., D. Verma, et al. 1990. Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact* **3**:1990.
- Powell, W., F. Pennacchio, G. Poppy, & E. Tremblay. 1998. Strategies Involved in the Location of Hosts by the Parasitoid *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Biological Control* **11**:104–112.
- Proffit, M., G. Birgersson, M. Bengtsson, R. Reis Jr, P. Witzgall, & E. Lima. 2011. Attraction and oviposition of *Tuta absoluta* females in response to tomato leaf volatiles. *Journal of Chemical Ecology* **37**:565–574.
- Ryan, C. A., & G. Pearce. 2001. Polypeptide hormones. *Plant physiology* **125**:65–68.
- Sabelis, M., & H. v. d. Baan. 1983. Location of distant spider mite colonies by phytoseiid predators: demonstration of specific kairomones emitted by

*Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **33**:303–314.

Sabelis, M. W., & M. C. De Jong. 1988. Should all plants recruit bodyguards? Conditions for a polymorphic ESS of synomone production in plants. *Oikos* pages 247–252.

Takabayashi, J., & M. Dicke. 1996. Plant–carnivore mutualism through herbivore-induced carnivore attractants. *Trends in Plant Science* **1**:109–113.

Takabayashi, J., M. Dicke, & M. A. Posthumus. 1991*a*. Induction of indirect defence against spider-mites in uninfested lima bean leaves. *Phytochemistry* **30**:1459–1462.

Takabayashi, J., M. Dicke, & M. A. Posthumus. 1991*b*. Variation in composition of predator-attracting allelochemicals emitted by herbivore-infested plants: relative influence of plant and herbivore. *Chemoecology* **2**:1–6.

Takabayashi, J., S. Takahashi, M. Dicke, & M. Posthumus. 1995. Developmental stage of herbivore *Pseudaletia separata* affects production of herbivore-induced synomone by corn plants. *Journal of Chemical Ecology* **21**:273–287.

Tumlinson, J. H., T. C. Turlings, & W. J. Lewis. 1993. Semiochemically mediated foraging behavior in beneficial parasitic insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **22**:385–391.

Turlings, T., J. Loughrin, P. McCall, U. Röse, W. Lewis, & J. Tumlinson. 1995. How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**:4169–4174.

Turlings, T., J. Tumlinson, F. Eller, & W. Lewis. 1991*a*. Larval-damaged plants: source of volatile synomones that guide the parasitoid *Cotesia mar-*

giniventris to the micro-habitat of its hosts. *Entomologia experimentalis et applicata* **58**:75–82.

Turlings, T., & J. H. Tumlinson. 1992. Systemic release of chemical signals by herbivore-injured corn. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**:8399–8402.

Turlings, T. C., M. Bernasconi, R. Bertossa, F. Bigler, G. Caloz, & S. Dorn. 1998*a*. The induction of volatile emissions in maize by three herbivore species with different feeding habits: possible consequences for their natural enemies. *Biological Control* **11**:122–129.

Turlings, T. C., U. B. Lengwiler, M. L. Bernasconi, & D. Wechsler. 1998*b*. Timing of induced volatile emissions in maize seedlings. *Planta* **207**:146–152.

Turlings, T. C., P. J. McCall, H. T. Alborn, & J. H. Tumlinson. 1993*a*. An elicitor in caterpillar oral secretions that induces corn seedlings to emit chemical signals attractive to parasitic wasps. *Journal of Chemical Ecology* **19**:411–425.

Turlings, T. C., J. Scheepmaker, L. E. Vet, J. H. Tumlinson, & W. J. Lewis. 1990*a*. How contact foraging experiences affect preferences for host-related odors in the larval parasitoid *Cotesia marginiventris* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of chemical ecology* **16**:1577–1589.

Turlings, T. C., & J. H. Tumlinson. 1991. Do parasitoids use herbivore-induced plant chemical defenses to locate hosts? *Florida Entomologist* pages 42–50.

Turlings, T. C., J. H. Tumlinson, R. R. Heath, A. T. Proveaux, & R. E. Doolittle. 1991*b*. Isolation and identification of allelochemicals that attract the larval parasitoid, *Cotesia marginiventris* (Cresson), to the microhabitat of one of its hosts. *Journal of Chemical Ecology* **17**:2235–2251.

- Turlings, T. C., J. H. Tumlinson, & W. Lewis. 1990*b*. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science* **250**:1251–1253.
- Turlings, T. C., F. L. Wäckers, L. E. Vet, W. J. Lewis, & J. H. Tumlinson, 1993*b*. Learning of host-finding cues by hymenopterous parasitoids. Pages 51–78 *in* *Insect learning*. Springer.
- van Dillewijn, C., et al. 1952. Botany of sugarcane. Botany of sugarcane page 371.
- van Wijk, M., P. J. De Bruijn, & M. W. Sabelis. 2008. Predatory mite attraction to herbivore-induced plant odors is not a consequence of attraction to individual herbivore-induced plant volatiles. *Journal of Chemical Ecology* **34**:791–803.
- Van Wijk, M., P. J. de Bruijn, & M. W. Sabelis. 2010. The predatory mite *Phytoseiulus persimilis* does not perceive odor mixtures as strictly elemental objects. *Journal of Chemical Ecology* **36**:1211–1225.
- van Wijk, M., P. J. de Bruijn, & M. W. Sabelis. 2011. Complex odor from plants under attack: herbivore's enemies react to the whole, not its parts. *PloS one* **6**:e21742.
- Vet, L., & M. Dicke. 1992. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annual Review of Entomology* **37**:141–172.
- Vet, L. E., & A. W. Groenewold. 1990. Semiochemicals and learning in parasitoids. *Journal of Chemical Ecology* **16**:3119–3135.
- Visser, J. 1986. Host odor perception in phytophagous insects. *Annual Review of Entomology* **31**:121–144.
- Von Mérey, G. E., N. Veyrat, E. d. Lange, T. Degen, G. Mahuku, R. L. Valdez, T. C. Turlings, & M. D'Álessandro. 2012. Minor effects of two eli-

citors of insect and pathogen resistance on volatile emissions and parasitism of *Spodoptera frugiperda* in Mexican maize. *Biological Control* **60**:7–15.

Whitman, D. W., & F. J. Eller. 1990. Parasitic wasps orient to green leaf volatiles. *Chemoecology* **1**:69–76.

Yoneya, K., S. Kugimiya, & J. Takabayashi. 2009. Can herbivore-induced plant volatiles inform predatory insect about the most suitable stage of its prey? *Physiological Entomology* **34**:379–386.

Zhang, P.-J., S.-J. Zheng, J. J. van Loon, W. Boland, A. David, R. Mumm, & M. Dicke. 2009. Whiteflies interfere with indirect plant defense against spider mites in Lima bean. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**:21202–21207.

## Conclusões Gerais

A vespa parasítica *Cotesia flavipes* possui a capacidade de distinguir entre voláteis de plantas de cana de açúcar ilesas e plantas infestadas com *Diatraea saccharalis*. Mostrando que o complexo planta - herbívoro libera uma mistura de compostos voláteis que atrai a este inimigo natural. No entanto, quando dada a escolha entre as diferentes espécies de canas infestadas, o parasitoide apresentou preferência por alguma espécie no teste de olfatômetro, mas quando foram oferecidas as plantas em campo não conseguiu distinguir, na situação testada, entre as fontes de odores produzidas. Este resultado sugere que o perfil de compostos voláteis emitidos pelas plantas infestadas pode ser similar e que as condições ambientais podem alterar o comportamento dos inimigos naturais.

Os compostos voláteis que foram coletados de plantas ilesas e plantas induzidas por *D. saccharalis*, encontrou-se uma diferença na composição destes compostos entre plantas de cana de açúcar infestadas e ilesas. Isso pode explicar a maior atratividade das vespas testadas no experimento de olfatômetro. No entanto quando se comparou os compostos de cada espécie tanto ilesa quanto infestada, notou-se que o perfil de voláteis emitidos das plantas RB867515 foi bastante similar.

A broca *D. saccharalis*, tem a capacidade de se desenvolver nas diferentes espécies de cana de açúcar provocando perdas nas lavouras, já que, invertem a sacarose, diminuindo a pureza do caldo. Dessa forma, é importante considerar o tercer nível trófico, que se vera influenciado por a interação planta-herbívoro, assim será possível ter um controle eficaz com a exploração dos sinais que protegem a cultura.