



**Universidade de Brasília – UnB**  
**Instituto de Biologia**  
**Programa de Pós-graduação em Zoologia**

**Dissertação de Mestrado**

Respostas comportamentais dos parasitoides de  
ovos *Telenomus podisi* e *Trissolcus basal*s (Hymenoptera: Platygasteridae)  
a rastros químicos de percevejos (Hemiptera: Pentatomidae)

**Ana Carolina Gomes Lagôa**

**Brasília**  
**2016**



**Universidade de Brasília – UnB**  
**Instituto de Biologia**  
**Programa de Pós-graduação em Zoologia**

**Respostas comportamentais dos parasitoides de ovos *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalis* (Hymenoptera: Platygasteridae) a rastros químicos de percevejos (Hemiptera: Pentatomidae)**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Zoologia como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Zoologia.

**Ana Carolina Gomes Lagôa**

Orientador: Dr. Raúl Alberto Laumann  
(Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

Brasília  
2016



**Universidade de Brasília – UnB**  
**Instituto de Biologia**  
**Programa de Pós-graduação em Zoologia**

Dissertação de Mestrado  
**Ana Carolina Gomes Lagôa**

“Respostas comportamentais dos parasitoides de ovos *Telenomus podisi* e *Trissolcus basal* (Hymenoptera: Platygasteridae) a rastros químicos de percevejos (Hemiptera: Pentatomidae)”

Comissão Examinadora

---

**Dr. Raúl Alberto Laumann**

Presidente / Orientador  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

---

**Dra. Regina Helena Ferraz Macedo**

Membro Titular Interno  
Departamento de Zoologia – UnB/IB

---

**Dr. Alexandre Specht**

Membro Titular Externo  
Embrapa Cerrados

---

**Dra. Marina Regina Frizzas**

Membro Suplente Interno  
Departamento de Zoologia – UnB/IB

Brasília, 24 de março de 2016

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao programa de Pós-Graduação em Zoologia da Universidade de Brasília e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, especialmente ao Laboratório de Semioquímicos, pela oportunidade e apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelos recursos e bolsa fundamentais para a realização deste trabalho.

Agradeço muito ao meu orientador Dr. Raúl A. Laumann, que há alguns anos me deu a oportunidade de trabalhar com pesquisa, e desde então tem demonstrado dedicação e total disponibilidade em ajudar e ensinar sempre com paciência e alegria. Sou muitíssimo grata pela oportunidade, pelo seu enorme profissionalismo e humanidade!

À Dra. Maria Carolina Blassioli Moraes. Sempre disponível e interessada em instruir e colaborar para o andamento dos trabalhos do nosso laboratório. Agradeço por ser um exemplo de profissionalismo e dedicação com o que faz.

Ao Dr. Miguel Borges pelo apoio e auxílio. Sua experiência e pioneirismo contribuíram muito não só para a realização deste trabalho como para o andamento dos estudos de ecologia química no Brasil.

Ao Dr. Pedro H. B. Togni pelo auxílio no decorrer desta dissertação e pelo enorme apoio.

Aos amigos do laboratório de Semioquímicos, Msc. Márcio Wandré, Msc. Samantha Silveira, Msc. Aline Dias, Msc. Marla Hassemer, Msc. Michely Aquino, Dra. Mirian Michereff, Msc. Pedro Schimmelpheng, Msc. Alex, Samuel Divino, Vivian, Ivan, dentre outros muito importantes. Em especial, agradeço ao Msc. Diego Magalhães, que me ajudou muito, sempre com paciência e competência! Agradeço a todos pela amizade, apoio e companheirismo fundamentais para a convivência e o progresso em equipe.

À minha família querida e muito amada. Agradeço com todo meu coração aos meus pais, minha irmã Tatiane e meu sobrinho lindo Pedro Joaquim. Pois são meu porto seguro e motivo da minha alegria.

Agradeço do fundo do meu coração a dois queridos que estão sempre ao meu lado. Pessoas que são fundamentais na minha vida e em meu crescimento pessoal. Ao Bruno, que em seus poucos 14 anos tem uma sabedoria que muitos mais experientes não tem. Ao Pedro, que com sua enorme força e garra foi meu estímulo e exemplo para sempre seguir em frente e com muito orgulho do meu trabalho. Sem o amor, o companheirismo e o carinho dos dois, essa jornada teria sido muito menos prazerosa.

Muito Obrigada!



Aos meus amados pais,  
Nelson e Penha.  
Dedico e sempre dedicarei!

“A ciência é, portanto, uma perversão de si mesma,  
a menos que tenha como fim último, melhorar a humanidade.”

Nikola Tesla

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	1
Insetos parasitoides e estratégias de busca de hospedeiros.....	1
Complexo de percevejos fitófagos na cultura da soja.....	2
Parasitoides de ovos de percevejos e sua importância no controle biológico.....	4
Parasitoides de ovos de percevejos: ecologia química, aspectos básicos e aplicados ..	5
OBJETIVOS .....	7
Objetivo geral .....	7
Objetivos específicos .....	7
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	8
Capítulo 1 - Reconhecimento e preferência por rastros de percevejos pentatomídeos pelos parasitoides de ovos <i>Trissolcus basal</i> e <i>Telenomus podisi</i> .....	13
INTRODUÇÃO .....	13
MATERIAL E MÉTODOS .....	15
Insetos.....	15
Bioensaios em arena aberta .....	17
Teste sem chance de escolha .....	17
Teste com chance de escolha.....	21
Análises estatísticas .....	22
RESULTADOS .....	22
Teste sem chance de escolha.....	22
Teste com chance de escolha .....	28
DISCUSSÃO .....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	37
Capítulo 2 - Identificação dos compostos presentes nos rastros de percevejos da família Pentatomidae e estudo comportamental de <i>T. basal</i> e <i>T. podisi</i> frente ao extrato dos rastros de percevejos.....	40
INTRODUÇÃO .....	40
MATERIAIS E MÉTODOS .....	43
Insetos.....	43
Extratos dos rastros .....	44

Bioensaios em arena aberta .....	46
Sem chance de escolha .....	46
Com chance de escolha.....	48
Análises químicas.....	45
Análises estatísticas.....	49
RESULTADOS .....	50
Bioensaios .....	54
Teste sem chance de escolha .....	55
Teste com chance de escolha.....	60
Análises químicas.....	50
DISCUSSÃO .....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	69
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	73
APÊNDICE .....	74

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. (A) Criação de *Euschistus heros* em sala climatizada. Vista geral das gailolas de adultos e ninfas (a) e placas de Petri com ovos (b). (B) Gaiola (vista superior) contendo a dieta natural (c) oferecida aos percevejos e pote com chumaço de algodão embebido com água (d). .....16
- Figura 2. Gaiolas da criação dos parasitoides de ovos *Telenomus podisi*. (a) insetos adultos, (b) ovos de *E. heros* parasitados. .... 17
- Figura 3. (A) Montagem do experimento sem chance de escolha. No interior da placa de Petri (a) estão duas fêmeas do percevejo *Euschistus heros* (b), com uma superfície de vidro (arena) sobre a placa (c). (B) Imagem aproximada dos percevejos caminhando na superfície contrária da arena de vidro (vista abdominal do inseto) (d). ..... 19
- Figura 4. Equipamentos utilizados para os bioensaios. (a) Câmera para captura de imagens, (b) arena de vidro contendo os rastros impregnados de fêmeas de percevejo. 20
- Figura 5. Montagem do experimento com chance de escolha. No interior de cada área delimitada estão duas fêmeas do percevejo (a) *Euschistus heros* e (b) *Dichelops melacanthus*. (c) arena de vidro, (d) quadrado de acrílico dividido por uma cartolina e (e) indicação da área em que o percevejo caminhou. .... 22
- Figura 6. Imagem representativa de trilhas de forrageamento do parasitoide *Trissolcus basalís* em arena aberta sobre os tratamentos: (A) Controle, (B) rastro de *Euschistus heros*, (C) rastro de *Dichelops melacanthus* e (D) rastro de *Nezara viridula*. .... 24
- Figura 7. Imagem representativa de trilhas de forrageamento do parasitoide *Telenomus podisi* em arena aberta sobre os tratamentos: (A) Controle, (B) rastro de *Euschistus heros*, (C) rastro de *Dichelops melacanthus* e (D) rastro de *Nezara viridula*. .... 25
- Figura 8. Tempo de residência em segundos do movimento dos parasitoides *Trissolcus basalís* (A) e *Telenomus podisi* (B) em áreas tratadas com rastros de três espécies de percevejos e não tratadas (controle). As barras representam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão. Médias seguidas das mesmas letras não diferiram significativamente pela análise de contraste ( $P > 0,05$ ). ..... 25
- Figura 9. Distância percorrida em milímetros pelos parasitoides *Trissolcus basalís* (A) e *Telenomus podisi* (B) em áreas com rastros de três espécies de percevejos e sem rastros (controle). As barras representam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão. Médias seguidas das mesmas letras não diferiram significativamente pela análise de contraste ( $P > 0,05$ )..... 26
- Figura 10. Mudança de direção (número/s) do movimento dos parasitoides *Trissolcus basalís* (A) e *Telenomus podisi* (B) em áreas com rastros de três espécies de percevejos e sem rastros (controle). As barras representam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão. Médias seguidas das mesmas letras não diferiram significativamente pela análise de contraste ( $P > 0,05$ )..... 27

Figura 11. Proporção do tempo de residência do movimento dos parasitoides <i>Trissolcus basalis</i> (A) e <i>Telenomus podisi</i> (B) sobre combinações de rastros de percevejos. * indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste Z de proporções ( $P < 0,05$ ).....	30
Figura 12. Distância (mm) percorrida pelos parasitoides <i>Trissolcus basalis</i> (A) e <i>Telenomus podisi</i> (B) sobre os tratamentos <i>Dichelops melacanthus</i> (Dm) versus <i>Euschistus heros</i> (Eh), <i>Nezara viridula</i> (Nv) versus <i>Dichelops melacanthus</i> (Dm) e <i>Nezara viridula</i> (Nv) versus <i>Euschistus heros</i> (Eh). As barras representam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão. * indicam diferenças significativas entre os tratamentos pela análise de GLM ( $P < 0,05$ ).....	31
Figura 13. Mudança de direção (n°/s) do movimento dos parasitoides <i>Trissolcus basalis</i> (A) e <i>Telenomus podisi</i> (B) sobre os tratamentos <i>Dichelops melacanthus</i> versus <i>Euschistus heros</i> (Dm vs. Eh), <i>Nezara viridula</i> versus <i>Dichelops melacanthus</i> (Nv vs. Dm) e <i>Nezara viridula</i> versus <i>Euschistus heros</i> (Nv vs. Eh). As barras representam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão. * indicam diferenças significativas entre os tratamentos pela análise de GLM ( $P < 0,05$ ). .....	32
Figura 14. (A) Montagem do experimento para a extração dos rastros. No interior do pote plástico (a) estão 50 fêmeas do percevejo <i>Dichelops melacanthus</i> (b), tampadas com uma placa de Petri (c). (B) Extração dos rastros com o solvente hexano (d).....	45
Figura 15. Montagem do experimento sem chance de escolha. Aplicação de 5µl de extrato de rastro (a) no interior da área delimitada da arena de vidro (b). .....	48
Figura 16. Montagem do experimento com chance de escolha. No interior de cada área delimitada foram aplicados 5µL de extrato de rastro de percevejo (a). Arena de vidro (b), quadrado de acrílico dividido por uma cartolina (c) e marcação para orientar a aplicação do extrato (d). .....	49
Figura 17. Tempo de residência do movimento dos parasitoides <i>Trissolcus basalis</i> (A) e <i>Telenomus podisi</i> (B) em áreas tratadas com o extrato dos rastros de três espécies de percevejos e não tratadas (controle). As barras representam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão. Médias seguidas das mesmas letras não diferiram significativamente pela análise de contraste ( $P > 0,05$ ). .....	57
Figura 18. Trajetória do movimento dos parasitoides <i>Trissolcus basalis</i> (A) e <i>Telenomus podisi</i> (B) em áreas tratadas com rastros de três espécies de percevejos e não tratadas (controle). As barras representam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão. Médias seguidas das mesmas letras não diferiram significativamente pela análise de contraste ( $P > 0,05$ ).....	58
Figura 19. Mudança de direção do movimento dos parasitoides <i>Trissolcus basalis</i> (A) e <i>Telenomus podisi</i> (B) em áreas tratadas com rastros de três espécies de percevejos e não tratadas (controle). As barras representam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão. Médias seguidas das mesmas letras não diferiram significativamente pela análise de contraste ( $P > 0,05$ ).....	59

- Figura 20. Proporção do tempo de residência (P) do movimento dos parasitoides *Trissolcus basalis* (A) e *Telenomus podisi* (B) sobre áreas de arenas tratadas com extratos de rastros de *Dichelops melacanthus* versus *Nezara viridula* (Dm vs. Nv), *Euschistus heros* versus *Nezara viridula* (Eh vs. Nv) e *Euschistus heros* versus *Dichelops melacanthus* (Eh vs. Dm). \* indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de estatística Z ( $P < 0,05$ ). ..... 62
- Figura 21. Trajetória (mm) do movimento dos parasitoides *Trissolcus basalis* (A) e *Telenomus podisi* (B) sobre áreas de arenas tratadas com extratos de rastros de *Dichelops melacanthus* versus *Euschistus heros* (Dm vs. Eh), *Nezara viridula* versus *Dichelops melacanthus* (Nv vs. Dm) e *Nezara viridula* versus *Euschistus heros* (Nv vs. Eh). As barras representam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão. \* indicam diferenças significativas entre os tratamentos pela análise de GLM ( $P < 0,05$ ). ..... 63
- Figura 22. Mudança de direção (número/s) do movimento dos parasitoides *Trissolcus basalis* (A) e *Telenomus podisi* (B) sobre áreas de arenas tratadas com extratos de rastros de *Dichelops melacanthus* versus *Euschistus heros* (Dm vs. Eh), *Nezara viridula* versus *Dichelops melacanthus* (Nv vs. Dm) e *Nezara viridula* versus *Euschistus heros* (Nv vs. Eh). As barras representam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão. \* indicam diferenças significativas entre os tratamentos pela análise de GLM ( $P < 0,05$ )..... 64
- Figura 23. Análise quantitativa da concentração total (ng/fêmea) dos compostos encontrados nos extratos dos rastros de *Euschistus heros* e *Dichelops melacanthus*. As barras representam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão. \* indicam diferenças significativas entre os tratamentos pela análise de GLM com modelo de distribuição binomial negativa ( $P < 0,001$ ). ..... 54
- Figura 24. Cromatograma de compostos do extrato de rastros de 100 fêmeas de *Euschistus heros*. 1) pentadecanal, 2) octadecano, 3) hexadecanal, 4) nonadecano, 5) docosano, 6) heneicosanal, 7) tricosano, 8) tetracosano, 9) pentacosadieno, 10) pentacoseno, 11) pentacosano, 12) 2-metil-hexacosano, 13) hexacosano, 14) heptacosadieno, 15) heptacoseno, 16) heptacosano, 17) 13-metil-heptacosano, 18) 2-metil-octacosano, 19) octacosano, 20) esqualeno, 21) nonacosadieno, 22) nonacosano, 23) triacontano, 24) hentriacontadieno, 25) hentriaconteno, 26) hentriacontano, 27) dotriacontano, 28) tritriacontano, 29) 11-metil-pentatriacontano, C= contaminante.... 74
- Figura 25. Cromatograma de compostos do extrato de rastros de 100 fêmeas de *Dichelops melacanthus*. 1) docosano, 2) tricosano, 3) tetracosano, 4) pentacosano, 5) hexacosano, 6) 3-metil-heptacosano, 7) 2-metil-heptacosano, 8) heptacosano, 9) 3-metil-octacosano, 10) 2-metil octacosano, 11) octacosano, 12) nonacosadieno, 13) nonacosano, 14) triacontano, 15) hentriacontadieno, 16) hentriaconteno, 17) hentriacontano, 18) dotriacontano, 19) tritriacontano, 20 ) tetratriacontano, C= contaminate, E= esqualeno..... 75
- Figura 26. Cromatograma de compostos do extrato de rastros de 50 fêmeas de *Nezara viridula*. 1) nonadecano, 2) heneicosano, 3) tricosano, 4) tetracosano, 5) pentaconseno,

6) pentacosano, 7) hexacosano, 8) heptacosano, 9) 13-metil-heptacosano, 10) octacosano, 11) octacosano, 12) nonacosatrieno, 13) nonacosano, 14) triaconteno, 15) triacontano, 16) hentriacontano, 17) dotriacontano, 18) tritriaconteno, 19) tritriacontano, 20) tetratriacontano, 21) pentatriaconteno, 22) pentariacontano..... 76

Figura 27. Espectro de massas de compostos do extrato de rastros de percevejos. (A) octacoseno, (B) nonacosatrieno, (C) triaconteno, (D) pentatriaconteno, (E) pentatriacontano, (F) hentriacontadieno (*Euschistus heros*), (G) 11-metil-pentatriacontano, (H) 3-metil-octacosano, (I) hentriacontadieno (*Dichelops melacanthus*)..... 81



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos identificados nos extratos obtidos a partir dos rastros de fêmeas de *Euschistus heros*, *Dichelops melacanthus* e *Nezara viridula*. Estão identificados na tabela o índice de retenção calculado (IR calculado), o índice de retenção encontrado na literatura (IR literatura), e a presença dos compostos em cada espécie de percevejos (+) ..... 52

Tabela 2. Quantidades dos compostos presentes em rastros de fêmeas de *Euschistus heros* e *Dichelops melacanthus*. Estão identificados na tabela a quantidade média dos compostos em ng/inseto (Média ± Desvio padrão) e os compostos identificados (CG-FID acoplado ao espectrômetro de massas; coluna DB-5)..... 53

## RESUMO

Os parasitoides de ovos da família Platygasteridae (Hymenoptera) são importantes agentes do controle biológico de percevejos praga da soja. Estes insetos utilizam durante a busca de hospedeiros vários estímulos químicos e físicos. Dentre os estímulos químicos, os rastros originados pelo movimento dos hospedeiros, constituídos principalmente por hidrocarbonetos cuticulares, são importantes mediadores desta interação a curta distância. Os objetivos deste trabalho foram: verificar se os parasitoides *Trissolcus basal* e *Telenomus podisi* são (1) capazes de reconhecer e discriminar os rastros *in natura* de diferentes espécies de percevejo (Hemiptera: Pentatomidae), (2) se há seletividade por rastros dos hospedeiros preferenciais, (3) realizar um estudo comparativo da composição química dos rastros de diferentes espécies de percevejos, (4) testar o reconhecimento e a preferência dos parasitoides pelos extratos de rastros de diferentes espécies de percevejos. Para isso, foram montadas arenas de experimentação em placas de vidro onde os percevejos *Nezara viridula*, *Euschistus heros* e *Dichelops melacanthus* caminharam por uma hora, onde ficaram depositados seus rastros. Também foram realizados experimentos em arenas abertas impregnadas com trilhas com o extrato dos rastros dos percevejos. Após este período, os parasitoides *Tr. basal* e *Te. podisi* foram liberados separadamente sobre os rastros naturais ou extratos destes percevejos e seu comportamento estudado com um sistema automatizado. As análises químicas dos diferentes rastros foram feitas a partir da extração, com lavagem por solvente apolar (*n*-hexano), dos compostos liberados pelos percevejos em placas de Petri por 24h. As amostras de cada espécie de percevejo (100 insetos/ 50 µl) foram analisadas utilizando cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. *Trissolcus basal* respondeu seletivamente a rastros naturais e extratos de rastros de seu hospedeiro preferencial *N. viridula*. *Telenomus podisi* foi mais estimulado pelos rastros e extratos de *E. heros* e *D. melacanthus*. Em ambos os parasitoides os rastros químicos das espécies preferenciais retiveram os insetos por mais tempo nas áreas tratadas e estimularam a sua movimentação. Foram identificados 40 compostos, sendo 28, 21 e 22 compostos identificados nos extratos de *E. heros*, *D. melacanthus* e *N. viridula*, respectivamente. Os compostos majoritários dos extratos de *E. heros* foram o pentacosadieno, pentacosano, heptacosano e nonacosadieno. Os compostos majoritários dos extratos de *D. melacanthus* foram o heptacosano, octacosano, nonacosadieno e

nonacosano. Os compostos majoritários de *N. viridula* foram o Nonacosano e Hentriacontano. A análise quantitativa das concentrações foi realizada apenas nos extratos de *E. heros* e *D. melacanthus*. Os resultados mostram que os rastros de percevejos são estímulos que podem ser utilizados pelos parasitóides de ovos para a procura e discriminação de hospedeiros e respondem selectivamente a rastros dos seus hospedeiros preferenciais.

**Palavras-chave:** caimônios, semioquímicos, hidrocarbonetos cuticulares, seleção de hospedeiros.

## ABSTRACT

Egg parasitoids of the family Platygasteridae (Hymenoptera) are major biological control agents of stinkbugs on soybean crops. They are attracted to their hosts by using many chemical and visual stimuli. Among these stimuli, chemical trails from the movement of their hosts (foot prints) are important to host finding. Our objectives were to verify if the parasitoids *Trissolcus basalus* and *Telenomus podisi* (1) are able to recognize and discriminate natural foot prints of different bug species (Hemiptera: Pentatomidae), (2) selectively respond to foot prints of their preferred hosts, (3) test the preference and recognition of the parasitoid for the extract traces of stink bugs, (4) study the chemical composition of foot prints of different stink bug species. For this, experimental arenas were built using glass plates where different stink bugs *Nezara viridula*, *Euschistus heros* and *Dichelops melacanthus* stink bugs, walked on for an hour, where their tracks were deposited. Open arenas were also used to test the chemical extract of bug foot prints. After this period, the parasitoids *Tr. basalus* and *Te. podisi* were released separately on arenas with natural or extract of footprints of the bugs. The behavior of parasitoids on the traces of the bugs were recorded with a video camera coupled to a video card. The images were evaluated and the data generated analyzed with the software Analysis of Animal Behavior Moving (SACAM). The chemical analysis were performed with hexanic extracts obtained from foot prints of living bugs deposited in Petri dishes for 24h. Samples were analysed in gas chromatograph with FID detector and gas chromatograph coupled to a mass spectrometer, to quantification and identification of compounds respectively. *Trissolcus basalus* showed greater attraction to footprints of their preferred host, *N. viridula*. On the other hand *Telenomus podisi* was more stimulated by traces and extracts of *E. heros* and *D. melacanthus*. Forty compounds were identified, with 28, 21 and 22 compounds identified in extracts of *E. heros*, *D. melacanthus* and *N. viridula*, respectively. The major compounds of *E. heros* extracts were pentacosadiene, pentacosane, heptacosane and nonacosadiene. The major compounds of *D. melacanthus* extracts were heptacosane, octacosane, nonacosadiene and nonacosane. The major compounds of *N. viridula* were nonacosane and hentriacontane. There were significant differences in the total concentration of the compounds found in these extracts ( $\chi^2$ : 15.92,  $P < 0.001$ ) and also differences in the individual amounts of each compound present in the extracts of these bugs. Results showed that footprints of stink bugs are stimuli that could be used by egg parasitoids to

both search for host and discriminate and selectively respond to those of their preferred host.

**Keywords:** kairomones, semiochemicals, cuticular hydrocarbons, host selection.

## INTRODUÇÃO GERAL

### **Insetos parasitoides e estratégias de busca de hospedeiros**

Pela sua importante função como polinizadores, inimigos naturais e fontes de alimento e matéria prima os insetos da ordem Hymenoptera são considerados entre os mais benéficos para o ser humano. Grande parte de suas espécies possuem hábito de vida parasitoide, sendo reguladores de populações de outros artrópodes (Godfray, 1994), e importantes agentes do controle biológico (Vinson e Iwantsch, 1980). Os parasitoides de ovos são um dos principais grupos dentre os himenópteros com este hábito de vida. Por definição os parasitoides de ovos, que podem ser solitários ou gregários, são aqueles que utilizam como hospedeiros exclusivamente ovos de insetos ou outros artrópodes (Mills, 2010).

Dado seu pequeno tamanho e por serem depositados, em geral, protegidos na vegetação os ovos dos insetos são estruturas inconspícuas. (Fatouros et al., 2008). Esta característica e a heterogeneidade dos ambientes naturais são desafios para os parasitoides durante a busca e seleção de hospedeiros. Assim, diversas estratégias comportamentais foram selecionadas de modo a maximizar a busca e seleção por hospedeiros que asseguram o sucesso reprodutivo dos parasitoides (Vinson, 1984). Em geral, estes processos incluem uma sequência de comportamentos definidos como: localização do habitat, localização do hospedeiro, aceitação do hospedeiro, adequabilidade e regulação do hospedeiro (Vinson e Iwantsch, 1980; Vinson, 1984; van Alphen e Vet, 1986; Vinson, 1998, Steidle e van Loon, 2002).

A localização dos hospedeiros está diretamente relacionada a estímulos físicos e químicos encontrados no ambiente (Vinson, 1975, 1984). Estes estímulos devem fornecer ao parasitoide confiabilidade, indicando a localização e as características do hospedeiro, e detectabilidade, maximizando a detecção do mesmo (Vet e Dicke, 1992).

Utilizar como fonte de informação estímulos físicos e químicos de estágios de desenvolvimento do hospedeiro que não propriamente os ovos (desvio infoquímico), utilizar e se guiar por voláteis liberados por plantas com injúria do hospedeiro herbívoro (voláteis de plantas induzidos por herbivoria) e associar diferentes estímulos à presença do hospedeiro (aprendizagem associativa), são estratégias que evoluíram em parasitoides de ovos a fim de minimizar os possíveis obstáculos decorrentes da procura por hospedeiros inconspícuos (Vet e Dicke, 1992).

Os estímulos químicos e físicos podem ser percebidos a longas ou curtas distâncias (Laumann et al., 2010), sendo denominados pistas, quando não há intenção de comunicação intra ou interespecífica pelo emissor, ou denominados sinais quando o estímulo consiste na troca de informações entre indivíduos (comunicação) (Vinson, 1984).

### **Complexo de percevejos fitófagos na cultura da soja**

A soja, *Glycine max* L. (Fabaceae), é a principal commodity agrícola da exportação nacional (Richards et al., 2012; Raucci et al., 2015), representando 26% do total das vendas de grãos (Contini et al., 2012), sendo 102 milhões de toneladas de grãos produzidas e 68,8 milhões de toneladas do complexo soja exportadas na última safra, somando-se 27,1 bilhões de dólares (CONAB, 2016). O Brasil é o segundo maior produtor mundial, com uma área de 33 milhões de hectares distribuídos por todas as regiões da federação, com maior representatividade na região centro oeste e sul do país (Raucci et al., 2015, CONAB, 2016). Apesar da grande representatividade nacional e mundial, a soja é uma cultura que anualmente tem grandes perdas de produtividade, relacionadas ao ataque de pragas (Belorte et al., 2003) e a debilidade causada por diversas doenças (Wrather et al., 2001).

Os percevejos fitófagos da Família Pentatomidae são as principais pragas de culturas de grãos no Brasil, destacando-se em culturas como soja, feijão, milho e trigo (Panizzi, 2013). Representantes de Pentatomidae ocorrem mundialmente e compreendem aproximadamente 5000 espécies fitófagas ou predadoras (McPherson e McPherson, 2000). No Brasil destacam-se, pela sua abundância e ampla distribuição geográfica, as espécies *Euschistus heros* (Fabricius), *Piezodorus guildinii* (Westwood), *Dichelops* spp., e *Nezara viridula* (Linnaeus) (Hoffmann-Campo et al., 2000). Os percevejos colonizam a soja no final do estágio vegetativo da cultura (V5) e iniciam sua reprodução juntamente ao início da formação das vagens da planta (R3) (Corrêa-Ferreira, 2005).

Os adultos e ninfas de percevejos se alimentam da seiva e das vagens através da perfuração dos tecidos vegetais (McPherson e McPherson, 2000; Corrêa-Ferreira, 2005), debilitam e provocam a má formação e murcha das vagens e sementes que resulta na diminuição da produção de grãos, além da redução na sua qualidade (Corrêa-Ferreira et al., 2009). Adicionalmente, a toxicidade da saliva dos percevejos retarda a senescência das folhas causando retenção foliar, fenômeno conhecido como "soja louca" (Corrêa-Ferreira e Panizzi, 1999). Outro problema relacionado aos percevejos da soja é a transmissão de doenças como a levedura *Nematospora coryli* (Peglion) (Hoffmann-Campo et al., 2000), que causa a diminuição da qualidade comercial do grão.

O principal método utilizado para o controle das populações de percevejos é a aplicação de inseticidas químicos (Corrêa-Ferreira e Panizzi, 1999), como os organofosforados, ciclodienos e piretroides (Willrich et al., 2003; Sosa-Gómez e Silva, 2010). Contudo, apesar desse método ser bastante difundido e eficaz em curto prazo, há vários problemas derivados do seu uso, principalmente os relacionados à saúde humana



(Benedetti et al., 2013) e ao impacto na biodiversidade local e no meio ambiente em geral (Pimentel, 1995; Fearnside, 2001; Ortega et al., 2005). Em relação aos percevejos, há o aparecimento de populações resistentes, reduzindo a eficiência dos produtos e a necessidade da aplicação de novos inseticidas (Sosa-Gomez et al., 2001), o que também afeta os insetos polinizadores (Costa et al., 2014; Rundlöf et al., 2015) e inimigos naturais (Veire et al., 1996; Salerno et al., 2002) que são importantes agentes do controle biológico (Hoffmann-Campo et al., 2000). Desta forma, os prejuízos gerados pelos percevejos na agricultura não envolvem somente as perdas diretas de produtividade, já que estão relacionados também aos gastos para o seu controle com inseticidas químicos e aos custos indiretos, derivados dos efeitos negativos do uso destes produtos.

### **Parasitoides de ovos de percevejos e sua importância no controle biológico**

Uma alternativa ao uso convencional de inseticidas é a utilização de controle biológico. Na cultura da soja, os principais inimigos naturais de percevejos fitófagos são as vespas parasitoides de ovos (Hymenoptera: Platygasteridae: Telenominae). Estas podem ser consideradas eficientes agentes de controle biológico devido a suas características biológicas e comportamentais (Vinson e Iwantsch, 1980; Laumann et al., 2010). *Trissolcus basalis* (Wollaston) e *Telenomus podisi* (Ashmead) são as principais espécies de Telenominae no Brasil (Corrêa-Ferreira e Panizzi, 1999), sendo potenciais agentes de controle biológico de Pentatomídeos associados à cultura da soja (Sampaio, 2009).

Assim como outros parasitoides de ovos, os Telenominae ocasionam a morte do hospedeiro seja por efeitos tóxicos de substâncias injetadas pela fêmea durante a oviposição nos ovos do hospedeiro ou pelo próprio crescimento do embrião do

parasitoide que consome os nutrientes do ovo hospedeiro (Borges et al., 1999; Corrêa-Ferreira e Panizzi, 1999; Parra et al., 2002).

Estes insetos têm sido utilizados com sucesso em programas de controle biológico em diversos locais do mundo (Corrêa-Ferreira, 2002). No Brasil Corrêa-Ferreira e Moscardi (1996) mostraram que liberações inoculativas de *Tr. basalis* foram eficientes no controle do percevejo verde *Nezara viridula*. Contudo, a dificuldade na produção dos parasitoides de ovos, para os que não dispõem de uma dieta artificial, tem impedido a extensão deste programa a outras regiões do Brasil. No entanto, o manejo comportamental destes inimigos naturais com semioquímicos como uma ferramenta para incrementar o controle biológico conservativo pode ser uma ação relevante para estimular o avanço deste e outros programas de controle biológico de percevejos (Borges et al., 2011).

### **Parasitoides de ovos de percevejos: ecologia química, aspectos básicos e aplicados**

A ecologia comportamental dos parasitoides Telenominae, especialmente os mecanismos de busca e seleção de hospedeiros, ainda é pouco conhecida, havendo informações de aspectos isolados dentro das diferentes etapas de forrageamento e, em muitos casos, sem uma determinação precisa dos estímulos envolvidos nos comportamentos.

Em relação aos parasitoides de percevejos tem-se determinado que voláteis induzidos pela herbivoria de ninfas e adultos de percevejos induzem a produção e liberação em diversas plantas, como a soja, feijão, feijão guandu, milho, arroz e girassol um complexo de voláteis que atraem os parasitoides *Te. podisi* e *Tr. basalis* (Colazza et al., 2004, Moraes et al., 2008, Michereff et al., 2011, Dias, 2015; Melo Machado et al., 2014). Estes compostos, conhecidos como voláteis induzidos por herbivoria (VIHs)

atuam como sinomônios, sendo parte importante das defesas contra herbívoros nas plantas e relevantes como pistas para orientar o parasitoide enquanto procura por hospedeiros. Outra fonte de semioquímicos com potencial para modificar os padrões de comportamento dos parasitoides de ovos são voláteis produzidos pelos próprios hospedeiros. Neste sentido, voláteis dos percevejos como feromônios sexuais (Borges et al. 1998, Colazza et al. 1999 e Conti et al. 2003) e compostos com função defensiva produzidos nas glândulas metatorácicas nos adultos e nas glândulas abdominais dorsais nas ninfas (Mattiacci et al., 1993 Laumann et al. al 2009) são percebidos e atraem os parasitoides.

Os voláteis induzidos por herbivoria e os feromônios liberados pelos hospedeiros atuam nas etapas de localização de habitat. Uma vez no habitat do hospedeiro os Telenominae utilizam estímulos químicos voláteis e não voláteis e estímulos mecânicos para localizar o hospedeiro. As informações em relação ao uso de estímulos nestas etapas da busca de hospedeiros ainda são escassas e fragmentadas. O maior volume de trabalhos realizados está relacionado a rastros ou trilhas do movimento do hospedeiro ("footprints") (Colazza, 1999, Borges et al., 2003), embora outros estímulos como sinais vibratórios emitidos para comunicação sexual pelos percevejos ou cores do substrato e dos ovos tenham efeito comprovado no comportamento de busca de hospedeiros (Laumann et al., 2011, Aquino et al., 2012).

Os rastros químicos são constituídos principalmente por hidrocarbonetos de cadeia longa presentes na cutícula dos insetos, e se originam a partir de deposições destes hidrocarbonetos nos tarsos, que são liberados nos substrato durante a locomoção dos insetos (Colazza et al., 2009). Os rastros são utilizados pelos parasitoides após terem localizado o habitat dos hospedeiros e, em geral, o contato com os mesmos estimulam os parasitoides a incrementarem a procura e o movimento nas áreas onde

fORAGEIAM (BORGES ET AL., 2003, COLAZZA ET AL., 2009). DESTA FORMA, OS RASTROS Podem ser determinantes nos comportamentos de busca, reconhecimento e seleção dos hospedeiros e podem auxiliar os parasitóides a identificar locais do ambiente onde a probabilidade de encontrar ovos é maior.

Neste trabalho, foi estudada a influência de hidrocarbonetos cuticulares e outros compostos presentes em rastros de percevejos adultos no comportamento de busca por hospedeiros das duas principais espécies de parasitoides de ovos encontradas no Brasil, *Tr. basalis* e *Te. podisi*. Espera-se que os resultados contribuam para o desenvolvimento de ferramentas para o manejo comportamental destes agentes de controle biológico. A identificação de compostos químicos que atraiam e/ou retenham os insetos em determinadas áreas é o passo inicial para a obtenção de produtos a base de semioquímicos que possam ser utilizados para aumentar a densidade de parasitoides em áreas de interesse e incrementar seu impacto nas populações de percevejos praga, mediante um aumento dos índices de parasitismo em ovos.

## OBJETIVOS

### **Objetivo geral**

Avaliar a influência de hidrocarbonetos cuticulares de rastros de percevejos no comportamento de busca por hospedeiros dos parasitoides de ovos, *Tr. basalis* e *Te. podisi*.

### **Objetivos específicos**

- Avaliar o comportamento de *Tr. basalis* e *Te. podisi* em resposta ao contato com rastros naturais de *E. heros*, *N. viridula* e *Dichelops melacanthus* (Dallas);

- Determinar se há o reconhecimento e discriminação dos rastros das diferentes espécies de percevejos;
- Determinar se há preferência por rastros e se isto está relacionado com a preferência de hospedeiros de cada parasitoide.
- Identificar a composição química dos rastros de *E. heros*, *N. viridula* e *D. melacanthus*.
- Avaliar o comportamento de *Tr. basalis* e *Te podisi* em resposta aos extratos químicos dos rastros de *E. heros*, *N. viridula* e *D. melacanthus*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aquino, M.F.S.; Dias, A.M.; Borges, M.; Moraes, M.C.B.; Laumann, R.A. Influence of visual cues on host-searching and learning behaviour of the egg parasitoids *Telenomus podisi* and *Trissolcus basalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. v.145, n.2, p. 162–174, 2012.

Belorte, L.C.; Z.A. Ramiro, A.M.; Faria, C.A.B. Marino. Danos causados por percevejos (Hemiptera: Pentatomidae) em cinco cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill, 1917) no município de Araçatuba, SP. **Arquivo do instituto biológico**. v.70, n.2, p.169–175, 2003.

Benedetti, D.; Nunesa, E.; Sarmiento, M.; Porto, C.; Santos, C.E.I.; Dias, J.F.; Silva, J. Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: Evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays. **Mutation Research**. v.752, p.28–33, 2013.

Borges, M.; Schmidt, F.G.V.; Sujii, E.R.; Medeiros, M.A.; Mori, K.; Zarbin, P.H.G.; Ferreira, T.B. Field responses of stink bugs to the natural and synthetic pheromone of the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). **Physiological Entomology**. v.23, n.3, p.202–207, 1998.

Borges, M.; Colazza, S.; Ramirez-Lucas, P.; Chauhan, K.R.; Moraes, M.C.B.; Aldrich, J.R. Kairomonal effect of walking traces from *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae) on two strains of *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae). **Physiological Entomology**. v.28, n.4, p.349–355, 2003.

Borges, M.; Moraes, M.C.B.; Peixoto, M.F.; Pires, C.S.S.; Sujii, E.R.; Laumann, R.A. Monitoring the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) with pheromone-baited traps in soybean fields. **Journal of Applied Entomology**. v.135, p.68–80, 2011.

Colazza, S.; Salerno, G.; Wajnberg, E. Volatile and contact chemicals released by *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae) have a kairomonal effect on the egg parasitoid *Trissolcus basalus* (Hymenoptera: Scelionidae). **Biological Control**. v.16, n.3, p.310–317, 1999.

Colazza, S.; Fucarino, A.; Peri, E.; Salerno, G.; Conti, E.; Bin, F. Insect oviposition induces volatile emission in herbaceous plants that attracts egg parasitoids. **The Journal of Experimental Biology**. v.207, p.47–53, 2004.

Colazza, S.; Lo Bue, M.; Lo Giudice, D.; Peri, E. The response of *Trissolcus basalus* to footprint contact kairomones from *Nezara viridula* females is mediated by leaf epicuticular waxes. **Naturwissenschaften**. v.96, p.975–981, 2009.

Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2015/16 – Oitavo Levantamento. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. p. 01–29, 2016.

Conti, E.; Salerno, G.; Bin, F.; Williams, H.J.; Vinson, S.B. Chemical cues from *Murgantia histrionica* eliciting host location and recognition in the egg parasitoid *Trissolcus brochymenae*. **Journal of Chemical Ecology**. v.29, n.1, p.115–130, 2003.

Contini, E.; Pena Júnior, M.A.G.; Santana, C.A.M.; Martha Júnior, G. Exportações: motor do agronegócio brasileiro. **Revista da política agrícola**. v.21, n.2, p.88–102, 2012.

Corrêa-Ferreira, B.S. e Moscardi, F. Biological control of soybean stink bugs by inoculative releases of *Trissolcus basalus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. v.79, n.1, p.1–7, 1996.

Corrêa-Ferreira, B.S e Panizzi, A.R. Percevejos da Soja e seu Manejo. **Embrapa-CNPSO, Circular técnica**. n.24, p.01– 45, 1999.

Corrêa-Ferreira, B.S. *Trissolcus basalus* para o controle de percevejos da soja. Em: Parra, J.R.P. **Controle biológico no Brasil: Parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole. p.01–635, 2002.

Corrêa-Ferreira, B.S. Suscetibilidade da soja a percevejos na fase anterior ao desenvolvimento das vagens. **Pesquisa Agropecuária brasileira**. v.40, n.11, p.1067–1072, 2005.

Corrêa-Ferreira, B.S.; Krzyzanowski, F.C.; Minami, C.A. Percevejo e a qualidade da semente de soja – Série sementes. **Circular Técnica da Embrapa Soja**. n.67, p.01–15, 2009.

Costa, E.M.C.; Araujo, E.L.; Maia, A.V.P.; Silva, F.E.L.; Bezerra, C.E.S.; Silva, J.G. Toxicity of insecticides used in the Brazilian melon crop to the honey bee *Apis mellifera* under laboratory conditions. **Apidologie**. v.45, n.1, p.34–44, 2014.

Dias, A.M. Resposta olfativa de *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Platygasteridae) para voláteis de plantas induzidos por herbivoria e oviposição de *Euschistus heros*

(Hemiptera: Pentatomidae). **Repositório Institucional da Universidade Federal de Lavras**. 2015.

Fatouros, N.E.; Dicke, M.; Mumm, R.; Meiners, T.; Hilker, M. Foraging behavior of egg parasitoids exploiting chemical information. **Behavioral Ecology**. v.19, p.677–689, 2008.

Fearnside, P.M. Soybean cultivation as a threat to the environment in Brazil. **Environmental Conservation**. v.28, n.1, p.23–38, 2001.

Godfray, H.C. Parasitoids. Behavioral and evolutionary ecology. **Princeton University Press**. pp.473, 1994.

Hoffmann-Campo, C.B.; Moscardi, F.; Corrêa-Ferreira, B.S.; Oliveira, L.J.; Sosa-Gómez, D.R.; Panizzi, A.R.; Corso, I.C. Gazzoni, D.L.; Oliveira, E.B. Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado. **Circular Técnica da Embrapa Soja**. n. 30, p.01–69, 2000.

Laumann, R.A.; Aquino, M.F.S.; Moraes, M.C.B.; Pareja, M.; Borges, M. Response of the egg parasitoids *Trissolcus basalis* and *Telenomus podisi* to compounds from defensive secretions of stink bugs. **Journal of Chemical Ecology**. v.35, n.1, p.8–19, 2009.

Laumann, R.A.; Čokl, A.; Lopes, A.P.S.; Ferreira, J.B.C.; Moraes, M.C.B.; Borges, M. Silent singers are not safe: selective response of a parasitoid to substrate-borne vibratory signals of stink bugs. **Animal Behaviour**. v.82, n.5, p.1175–1183, 2011.

Laumann, R.A.; Moraes, M.C.B.; Silva, J.P.; Vieira, A.M.C.; Silveira, S.; Borges, M. Egg parasitoid wasps as natural enemies of the neotropical stink bug *Dichelops melacanthus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v.45, n.5, p.442–449, 2010.

Mattiacci, L.; Vinson, S.B.; Williams, H.J.; Aldrich, J.R.; Bin, F. A long-range attractant kairomone for egg parasitoid *Trissolcus basalis*, isolated from defensive secretion of its host, *Nezara viridula*. **Journal of Chemical Ecology**. v.19, n.6, p.1167–1181, 1993.

McPherson, J.E.; McPherson, R.M. Stink bugs of economic importance in America north of Mexico. Em: McPherson, J.E. e McPherson, R.M. **Stink bugs of economic importance in America north of Mexico**. Boca Raton: CRC Press LLC. p.01–253, 2000.

Melo-Machado, R.C.; Sant'Ana, J.; Blassioli-Moraes, M.C.; Laumann, R.A.; Borges, M. Herbivory-induced plant volatiles from *Oryza sativa* and their influence on chemotaxis behaviour of *Tibraca limbativentris* stal. (Hemiptera: Pentatomidae) and egg parasitoids. **Bulletin of Entomological Research**. v.104, n.03, p.347–356, 2014.

Michereff, M.F.F.; Laumann, R.A.; Borges, M.; Michereff-Filho, M.; Diniz, I.R.; Neto, A.L.F.; Moraes, M.C.B. Volatiles Mediating a Plant-Herbivore-Natural Enemy

Interaction in Resistant and Susceptible Soybean Cultivars. **Journal of Chemical Ecology**. v.37, n.3, p.273–285, 2011.

Mills, N.J.; Kean, J.M. Behavioral studies, molecular approaches, and modeling: Methodological contributions to biological control success. **Biological Control**. v.52, n.3, p.255–262, 2010.

Moraes, M.C.B.; Pareja, M.; Laumann, R.A.; Hoffmann-Campo, C.B.; Borges, M. Response of the parasitoid *Telenomus podisi* to induced volatiles from soybean damaged by stink bug herbivory and oviposition. **Journal of Plant Interactions**. v.3, n.2, p.111–118, 2008.

Ortega, E.; Cavalett, O.; Bonifácio, R.; Watanabe, M. Brazilian soybean production: emergy analysis with an expanded scope. **Bulletin of Science, Technology & Society**. v.25, n.4, p.323–334, 2005.

Panizzi, A.R. History and contemporary perspectives of the integrated pest management of soybean in Brazil. **Neotropical Entomology**. v.42, n.2, p.119–127, 2013.

Parra, J.R.P. Criação massal de inimigos naturais . Em: Parra, J.R.P.; Botelho, P.S.M.; Corrêa-Ferreira, B.S.; Bento, J.M.S. **Controle Biológico no Brasil – Parasitóides e Predadores**. São Paulo: Editora Manole. p.143–161, 2002.

Pimentel, D. Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. **Journal of Agricultural and Environmental Ethics**. v.8, n.1, p.17–29, 1995.

Raucci, G.S.; Moreira, C.S.; Alves, P.A.; Mello, F.F.C.; Frazão, L.A.; Cerri, C.E.P.; Cerri, C.C. Greenhouse gas assessment of Brazilian soybean production: a case study of Mato Grosso State. **Journal of Cleaner Production**. v.96, n.1, p.418–425, 2015.

Richards, P.D.; Myers, R.J.; Swinton, S.M.; Walker, R.T. Exchange rates, soybean supply response, and deforestation in South America. **Global Environmental Change**. v.22, n.2, p.454–462, 2012.

Rundlöf, M.; Andersson, G.K.S.; Bommarco, R.; Fries, I.; Hederström, V.; Herbertsson, L.; Jonsson, O.; Klatt, B.K.; Pedersen, T.R.; Yourstone, J.; Smith, H.G. Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. **Nature**. v.521, p.77–80, 2015.

Salerno, G.; Colazza, S.; Conti, E. Sub-lethal effects of deltamethrin on walking behaviour and response to host kairomone of the egg parasitoid *Trissolcus basalis*. **Pest Management Science**. v.58, n.7, p.663–668, 2002.

Sampaio, M.V. Controle biológico de pragas com uso de parasitóides. **Informe Agropecuário**. v.251, n.30, p.41–46, 2009.

Sosa-Gómez, D.R.; Corso I.C.; Morales, M. Insecticide Resistance to Endosulfan, Monocrotophos and Metamidophos in the Neotropical Brown Stink Bug, *Euschistus heros* (F.). **Neotropical Entomology**. v.30 n.2 p.317–320, 2001.



Sosa-Goméz, D.R.; Silva, J.J. Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*) resistance to methamidophos in Paraná, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.45, n.7, p.767–769, 2010.

Steidle, J.L.M; van Loon, J.J.A. Chemoecology of parasitoid and predator oviposition behavior. Em: Hilker, M. e Meiners, T. **Chemoecology of Insect Eggs and Egg Deposition**. Berlin: Blackwell. p. 291–348, 2002.

van Alphen, J.J.M. e Vet, L.E.M. An evolutionary approach to host finding and selection. Em: Waage, J.K. e Greathead, D.J. **Insect Parasitoids**. London: Academic Press. p.23–61. 1987.

van Veire, M.; Smagghe, G.; Degheele, D. Laboratory test method to evaluate the effect of 31 pesticides on the predatory bug, *Orius laevigatus* (Het: Anthocoridae). **Entomophaga**. v.41, n.2, p.235–243, 1996.

Vet, L.E.M. e Dicke, M. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. **Annual Review of Entomology**. v.37, p.141–172, 1992.

Vinson, S.B. Biochemical Coevolution between Parasitoids and their Hosts. Em: Price, P.W. **Evolutionary Strategies of Parasitic Insects and Mites**. New York: Plenum. p.14–48, 1975.

Vinson, S.B. How parasitoids locate their hosts. Em: Lewis, T. **Insect Communication**. Londres: Academic Press. p.325–348, 1984.

Vinson, S.B. e Iwantsch, G.F. Host suitability for insect parasitoids. **Annual Review of Entomology**. v.25, p.397–419, 1980.

Vinson, S.B.; Pennacchio, F.; Lanzrein, B. Interactions between parasitoids and their hosts: An introduction and perspective. **Journal of Insect Physiology**. v.44, p.701–702, 1998.

Willrich, M.M.; Leonard, B.R.; Cook, D.R. Laboratory and field evaluations of insecticide toxicity to stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). **Journal of Cotton Science**. v.7, p.156–163, 2003.

Wrather, J.A.; Anderson, T.R.; Arsyad, D.M.; Tan, Y.; Ploper, L.D.; Porta-Puglia, A.; Ram, H.H.; Yorinori, J.T. Soybean disease loss estimates for the top ten soybean-producing countries in 1998. **Canadian Journal of Plant Pathology**. v.23, n.2, p.115–121 2001.

## Capítulo 1

### Reconhecimento e preferência dos parasitoides de ovos *Trissolcus basalís* e *Telenomus podisi* por rastros de três espécies de pentatomídeos

#### INTRODUÇÃO

Os rastros químicos são liberados pelos insetos enquanto caminham pelo substrato (Colazza et al. 1999; Borges et al. 2003; Conti et al. 2004) e são constituídos basicamente por hidrocarbonetos de cadeia longa com alto peso molecular (Lo Giudice, 2009). Essas características conferem aos rastros baixa volatilidade, dessa forma os compostos ficam aderidos ao substrato onde os insetos se locomovem (Colazza et al., 2009). Em relação aos percevejos da família Pentatomidae não há na literatura indícios que associem os rastros químicos a alguma função para estes insetos, acredita-se que são apenas deposições de hidrocarbonetos cuticulares nos tarsos liberados ocasionalmente no substrato (Colazza et al., 2009).

Porém, os parasitoides identificam os rastros químicos no substrato e os utilizam como pistas durante a busca e seleção de hospedeiros (Colazza et al. 1999; Borges et al., 2003; Conti et al., 2004; Salerno et al., 2009). A obtenção de informação a partir de rastros, assim como de outros estímulos químicos, fazem parte de um intrincado processo de evolução desses inimigos naturais (Turlings et al., 1993; Vet et al., 1995). Essas substâncias são percebidas pelo parasitoide através de estruturas e órgãos olfativos: as sensilas, distribuídas por todo o corpo e principalmente nas antenas (Bell e Tobin, 1982; Bell et al., 1995).

Os rastros são utilizados pelos parasitoides após terem localizado o habitat do hospedeiro (Laumann et al., 2011), e em geral, o contato com os mesmos estimulam os parasitoides a incrementarem a procura e o movimento nas áreas onde forrageiam,

através da supressão do voo, aumento de locomoção na área contaminada e incremento do tamborilamento das antenas sobre o estímulo químico (Vinson et al., 1998; Borges et al., 2003).

Os Telenominae possuem ampla gama de hospedeiros que podem ser utilizados na ausência de seu hospedeiro preferencial (Bruni et al., 2000; Austin et al., 2005). Como exemplo, o parasitoide *Tr. basalis* parasita preferencialmente ovos de *N. viridula* (Sujii et al., 2002), mas, na ausência ou baixa abundância deste, pode parasitar ovos de outras espécies de percevejos como, por exemplo, *D. melacanthus* (Laumann et al., 2010). O mesmo ocorre com *Te. podisi* que tem como hospedeiro preferencial o percevejo *E. heros* e, na sua ausência, pode parasitar ovos de outros percevejos pentatomídeos (Sujii et al., 2002; Borges et al., 2003).

O reconhecimento e a diferenciação dos rastros dos hospedeiros podem ser relevantes no comportamento de busca e seleção de hospedeiros. Se os parasitoides podem reconhecer e discriminar rastros de diferentes espécies de percevejos, podem tornar mais eficiente seu comportamento de busca reduzindo o tempo sobre rastros de machos de percevejos ou rastros de hospedeiros não preferenciais (Colazza et al., 1999), otimizando assim a procura e exploração de hospedeiros que maximizam seu sucesso reprodutivo. Por exemplo, o parasitoide *Tr. basalis* reconhece e diferencia os rastros de fêmeas e machos de *Nezara viridula*. O *n*-nonadecano ( $nC_{19}$ ) exclusivo do rastros de machos é uma informação que o parasitoide utiliza para discriminar os rastros deste sexo em relação aos rastros das fêmeas (Colazza et al., 2007). Essa é uma estratégia importante, pois seguir os rastros de fêmeas poderia encurtar o tempo de procura pelos ovos e maximizar o parasitismo. O desenvolvimento do embrião do hospedeiro altera a composição do ovo tornando-o um recurso inviável rapidamente, (Fatouros et al., 2008). Portanto, discriminar entre os sexos dos hospedeiros através dos rastros pode ser uma

estratégia que ajude a minimizar os efeitos da curta janela de vulnerabilidade do hospedeiro (Vinson, 1998).

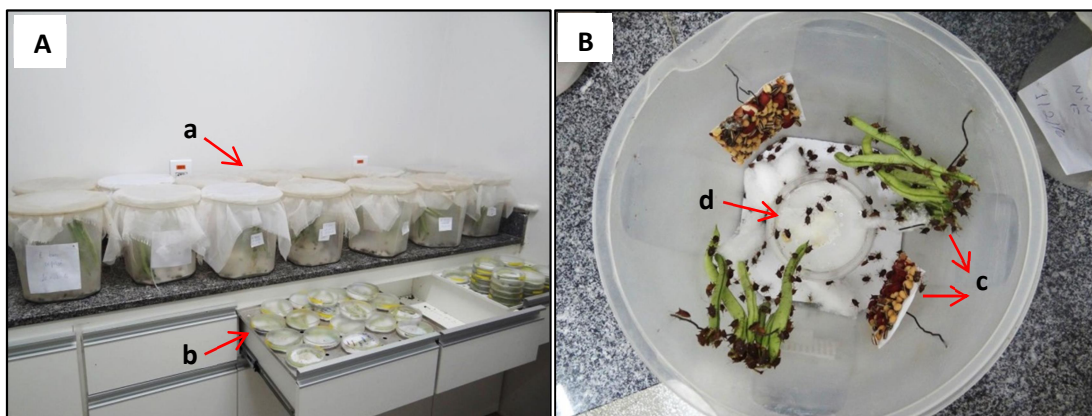
Interações envolvendo rastros químicos são bastante difundidas entre insetos coespecíficos ou heteroespecíficos (Witjes et al., 2011). Exemplos são a interação entre o pulgão *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus) (Hemiptera: Aphididae) e a joaninha predadora *Coccinella septempunctata* (Linnaeus) (Coleoptera: Coccinellidae), onde através dos rastros deixados no substrato pulgões identificam os rastros do inimigo natural e evitam as áreas contaminadas reduzindo assim o risco de predação (Ninkovic et al., 2013). Em insetos sociais os rastros químicos são utilizados como indicação da entrada de seus ninhos (Butler et al., 1969), e em abelhas são indicadores de flores recentemente visitadas e possivelmente esgotadas de néctar (Goulson et al., 2001; Gawleta et al., 2005).

Compreender como esses estímulos químicos influenciam o forrageamento dos parasitoides *Tr. basalis* e *Te. podisi* é importante para o estudo comportamental das duas espécies, bem como para sua utilização como agentes do controle biológico de pragas. O objetivo deste capítulo foi estudar as respostas de *Tr. basalis* e *Te. podisi* frente a rastros de diferentes espécies de percevejos, incluindo hospedeiros preferenciais e não preferenciais. A hipótese avaliada foi que os parasitoides *Te. podisi* e *Tr. basalis* mostram respostas comportamentais diferentes frente a rastros naturais de *N. viridula*, *E. heros* e *D. melacanthus*. três espécies de percevejos avaliadas, com incremento do comportamento de busca nos rastros das espécies de hospedeiros preferenciais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Insetos**

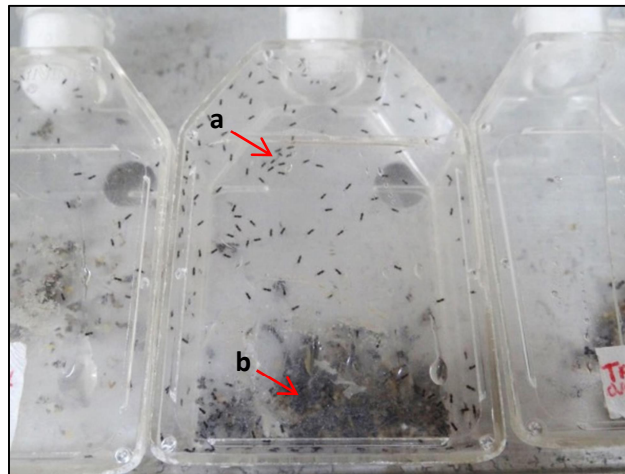
Foram utilizados neste trabalho percevejos provenientes de uma criação massal previamente estabelecida no Laboratório de Semioquímicos da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, mantidos em sala climatizada, sob as condições de  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $65\pm 10\%$  UR e 14 horas de fotofase. Os percevejos *N. viridula*, *D. melacanthus* e *E. heros* foram acondicionados em gaiolas plásticas de 8L separados por espécie. A alimentação foi provida com dieta natural contendo sementes de girassol (*Heliantus annus* L. [Asteraceae]), amendoim (*Arachis hypogaea* L. [Fabaceae]), soja (*Glycine max* L. [Fabaceae]) e vagens verdes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L. [Fabaceae]) e fonte de água (Figura 1).



**Figura 1.** (A) Criação de *Euschistus heros* em sala climatizada. Vista geral das gaiolas de adultos e ninfas (a) e placas de Petri com ovos (b). (B) Gaiola (vista superior) contendo a dieta natural (c) oferecida aos percevejos e pote com chumaço de algodão embebido com água (d).

A cada dois dias os ovos dos percevejos foram coletados do interior das gaiolas e acondicionados em placas de Petri de 9 cm de diâmetro até a emergência das ninfas. As ninfas foram mantidas em potes plásticos com a mesma dieta oferecida para os adultos, como descrito anteriormente. Ao atingirem a fase adulta os indivíduos foram separados por sexo. Depois de atingida a maturidade sexual (aproximadamente 10 a 12 dias na fase adulta) (Costa et al., 1998), as fêmeas virgens de cada espécie de percevejo foram utilizadas para a realização dos experimentos.

Os adultos dos parasitoides *Tr. basalis* e *Te. podisi* foram alimentados com mel puro e mantidos em gaiolas plásticas (frascos para cultura de tecidos de 25 cm<sup>3</sup> - ICN Biomedicals<sup>®</sup>) (Figura 2). Para oviposição dos parasitoides foram oferecidos às fêmeas posturas de *E. heros* obtidas da criação previamente descrita. Após 48 horas os ovos de percevejos oferecidos para os parasitoides foram separados dos indivíduos adultos e colocados em outra gaiola para permitir o desenvolvimento dos estágios imaturos dos parasitoides. As gaiolas com ovos parasitados foram revisadas diariamente para separação dos parasitoides recém emergidos. As fêmeas dos parasitoides foram divididas em dois grupos: uma parte das fêmeas foi mantida na criação e outro grupo foi destinado à execução dos bioensaios. As fêmeas utilizadas nos bioensaios tinham idade entre 24 a 48 horas e foram mantidas previamente com machos para estarem acasaladas, mas sem experiência de oviposição. As criações, de percevejos e de parasitoides, foram mantidas em salas separadas.

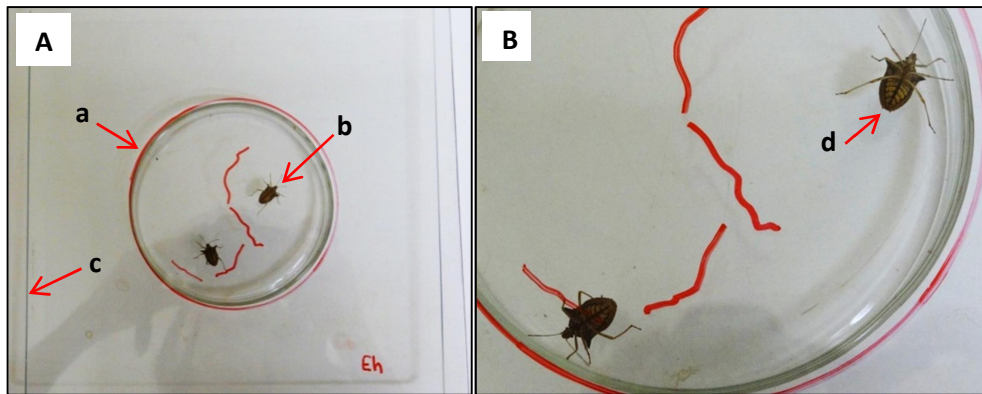


**Figura 2.** Gaiolas da criação dos parasitoides de ovos *Telenomus podisi*. (a) insetos adultos, (b) ovos de *E. heros* parasitados.

### **Bioensaios em arena aberta**

#### *Teste sem chance de escolha*

Para avaliar a possível ação dos compostos presentes nos rastros de percevejos, foram realizados testes em arenas abertas compostas por uma superfície de vidro de borossilicato (4 mm de espessura, 20 cm x 20 cm). Nessa placa foi delimitada uma área central de 63 cm<sup>2</sup> utilizando uma placa de Petri de 9 cm de diâmetro. No interior da placa de Petri, disposta no centro da arena, foram introduzidas fêmeas das diferentes espécies de percevejos selecionadas para o estudo e mantidas no local por uma hora para depositarem seus rastros durante sua locomoção (Figura 3). Foram utilizadas fêmeas nos experimentos, pois de acordo com Colazza et al. (2007) os parasitoides discriminam os sexos dos hospedeiros através dos rastros, havendo preferência pelos rastros de fêmeas. Desta maneira, ao final do período de uma hora a arena continha uma área de aproximadamente 63 cm<sup>2</sup> com os rastros do inseto e o restante da área da placa de vidro sem rastros. Durante o tempo em que as fêmeas de percevejo caminharam pelo centro da arena, foi feito o monitoramento do experimento em intervalos de 15 minutos, o setor no qual o percevejo se encontrava foi marcado com caneta estilográfica na superfície oposta à aquela onde os indivíduos estavam caminhando. Esse procedimento foi realizado para garantir que a área tratada tivesse rastros na maior parte da sua superfície. Para preparar os bioensaios com rastros de *N. viridula* foi utilizada uma fêmea por arena, e para bioensaios com *E. heros* e *D. melacanthus* duas fêmeas por arena devido à diferença de tamanho entre as espécies (fêmeas de *N. viridula* possuem aproximadamente o dobro do tamanho corporal em relação as outras duas espécies de percevejos avaliadas). Esse procedimento foi adotado para padronizar a quantidade de rastros depositados por cada espécie na arena. Como controle, foram utilizadas arenas com vidros totalmente limpos que não tiveram contato com os percevejos.

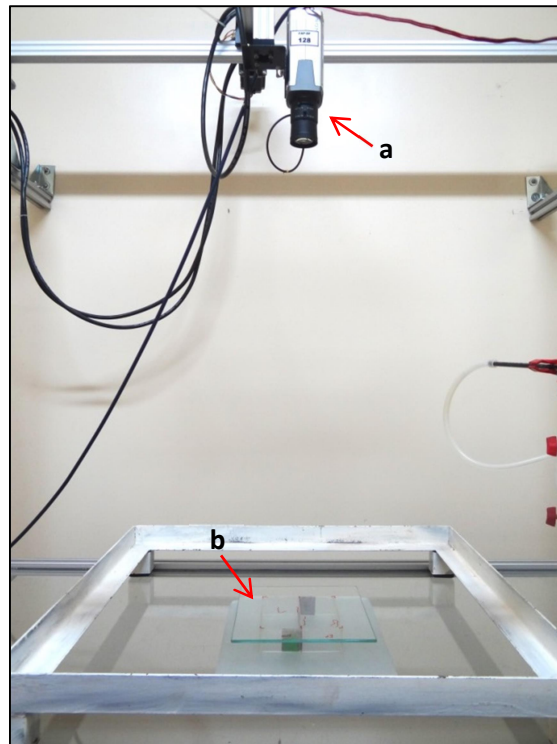


**Figura 3.** (A) Montagem do experimento sem chance de escolha. No interior da placa de Petri (a) estão duas fêmeas do percevejo *Euschistus heros* (b), com uma superfície de vidro (arena) sobre a placa (c). (B) Imagem aproximada dos percevejos caminhando na superfície contrária da arena de vidro (vista abdominal do inseto) (d).

Fêmeas de cada espécie de parasitoide foram liberadas no centro da arena e seu comportamento foi monitorado por um período de 10 minutos ou até o parasitoide abandonar a arena. Para o monitoramento foi utilizada uma câmera de vídeo com filtro para luz infravermelha posicionada sobre a arena (SONY SPT M324CE; Sony, Minato-KU, Tokyo, Japão, ajustada com lentes 12.5-75.0 mm/F1.8) (Figura 4). Para trabalhar em condições homogêneas de iluminação da arena, a mesma foi iluminada na parte inferior com duas fontes de luz infravermelho de 64 leds cada uma. A sala foi iluminada com duas lâmpadas fluorescentes de 40 W. As imagens capturadas pela câmera foram digitalizadas por uma placa de captura de vídeo (PC-Studio PCTV Pinnacle System), e enviadas para um computador. No computador as imagens geradas foram gravadas e processadas utilizando o Software para Análise do Comportamento de Animais em Movimento (SACAM). (Jorge et al., 2005). As variáveis medidas pelo SACAM foram: tempo de residência nas áreas da arena tratada e não tratada (s), trajetória do parasitoide sobre a arena (mm percorridos) e mudança na direção da trajetória (nº de mudanças/s), considerando mudança de direção quando a trajetória do parasitoide mudou em um ângulo superior à metade do comprimento corporal do inseto. Estas



variáveis permitem quantificar se os estímulos presentes nas arenas de bioensaios (rastros dos percevejos) modificam o padrão de busca do inseto incrementando o tempo que o inseto permanece nas áreas tratadas e mudando seu padrão geral de movimentação (aumento da área procurada e aumento da quinese).



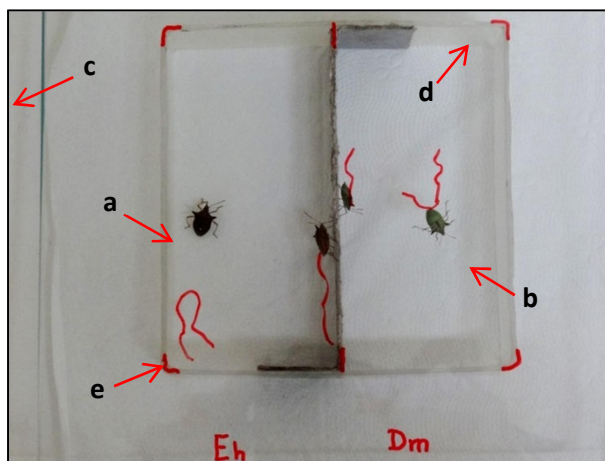
**Figura 4.** Equipamentos utilizados para os bioensaios. (a) Câmera para captura de imagens, (b) arena de vidro contendo os rastros impregnados de fêmeas de percevejo.

Em cada tratamento (rastros de *E. heros*, *N. viridula* e *D. melacanthus*) e controle, foram realizadas 40 repetições para *Tr. basalis* e *Te. podisi*, alternando-se a observação de parasitoides expostos aos tratamentos e controle. Cada arena, com os rastros dos percevejos ou controle, foi utilizada em cinco repetições, não comprometendo a qualidade dos rastros depositados ou impregnando resíduos deixados por parasitoides anteriormente observados (Peri et al., 2006). Posteriormente aos

bioensaios a arena foi lavada com detergente neutro, descontaminada com acetona 100%, e mantida em estufa a 120°C por pelo menos 4 horas.

#### *Teste com chance de escolha*

Os bioensaios de preferência foram realizados em arena aberta tal qual mencionado anteriormente. Porém a área teste, onde os percevejos foram liberados para depositarem os rastros, foi formada por um quadrado de acrílico com 20 cm<sup>2</sup> e 5 cm de altura. Este quadrado foi dividido ao meio por uma cartolina. Desta forma, em cada uma das áreas delimitadas do quadrado foi colocada uma espécie de percevejo (Figura 5), criando assim uma arena de experimentação com rastros de duas espécies de percevejos. Foram três combinações de tratamentos avaliadas (rastros de *E. heros* versus *N. viridula*, rastros de *E. heros* versus *D. melacanthus* e rastros de *N. viridula* versus *D. melacanthus*). Para cada uma das três combinações foi avaliado o comportamento de *Tr. basalis* e *Te. podisi* separadamente, totalizando 40 repetições para cada combinação de tratamentos e espécie de parasitoide. A lavagem do material dos bioensaios e a captura da imagem do movimento do parasitoide foram realizadas seguindo os procedimentos detalhados para os bioensaios sem chance de escolha.



**Figura 5.** Montagem do experimento com chance de escolha. No interior de cada área delimitada estão duas fêmeas do percevejo (a) *Euschistus heros* e (b) *Dichelops melacanthus*. (c) arena de vidro, (d) quadrado de acrílico dividido por uma cartolina e (e) indicação da área em que o percevejo caminhou.

### *Análises estatísticas*

Para os testes sem chance de escolha os dados referentes ao tempo de residência dos parasitoides sobre os rastros, a trajetória do parasitoide sobre a arena e mudança de direção do parasitoide ao longo das avaliações foram comparados entre os tratamentos utilizando Modelos Lineares Generalizados (GLM) e Análise de Deviança separadamente para cada espécie de parasitoide. Os modelos incluíram distribuição de erros Gamma para tempo de residência e trajetória e Poisson para mudança de direção. Quando os tratamentos mostraram efeitos significativos os valores médios de cada variável e tratamento foram comparados utilizando teste de contrastes. Para os testes com chance de escolha, a proporção do tempo em cada área foi avaliada com teste Z de proporções. O teste foi aplicado considerando a proporção do tempo de residência numa das áreas de experimentação contrastando-os com a hipótese de não preferência (distribuição do tempo de residência igual 50% em cada área). O teste foi aplicado separadamente para cada parasitoide e para cada combinação de tratamentos. Os dados referentes à trajetória e a mudança de direção do parasitoide sobre a arena foram comparados entre os tratamentos utilizando GLM com distribuição de erros binomial. Todas as análises foram realizadas utilizando o software R (R Development Core Team, 2010).

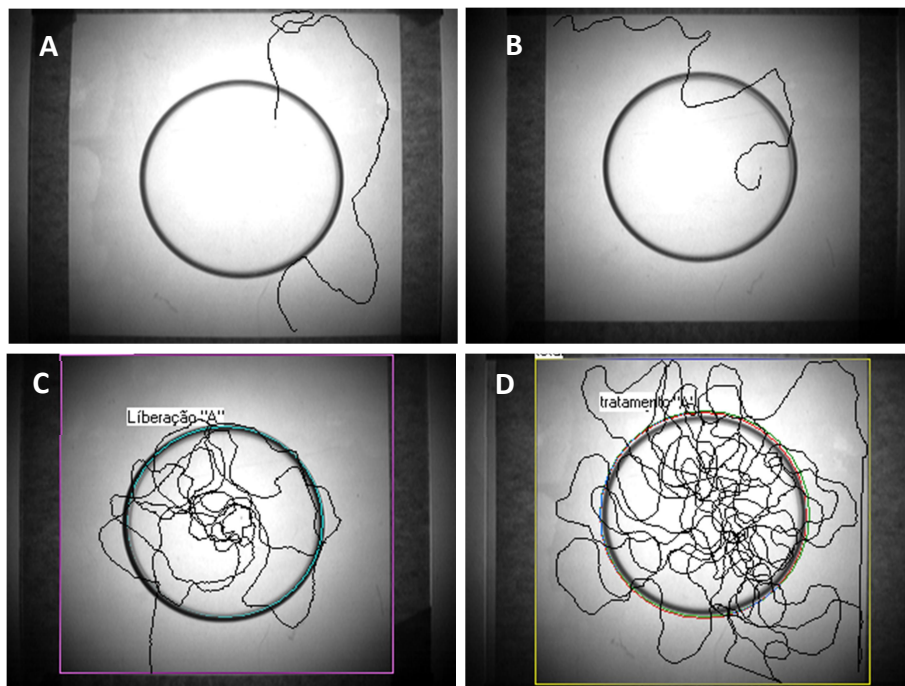
## RESULTADOS

### **Teste sem chance de escolha**

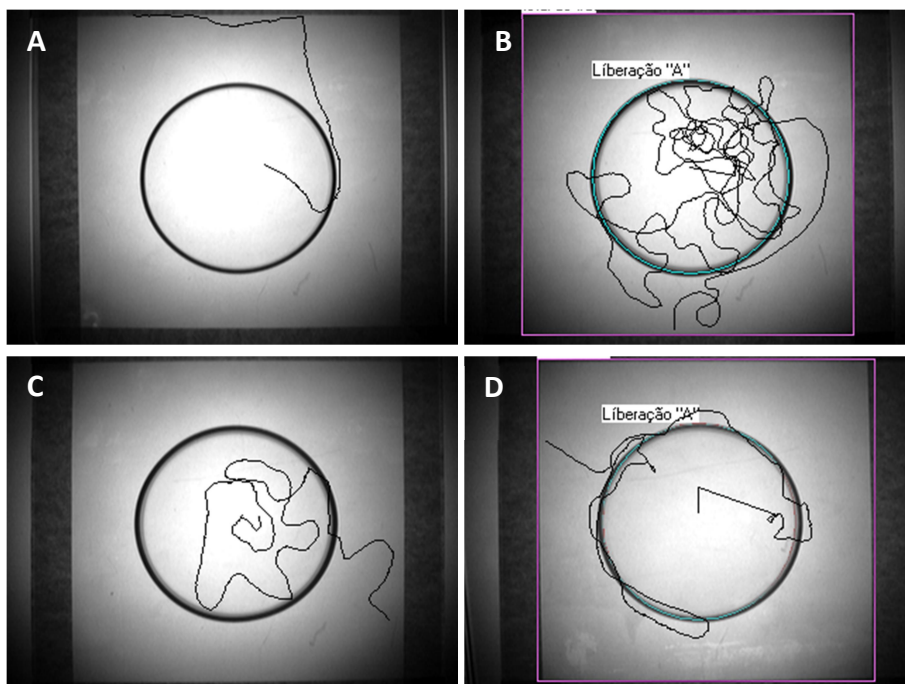
O comportamento dos parasitoides foi diferente em função dos rastros de cada espécie de percevejo (Figuras 6 e 7). O tempo médio de residência do parasitoide *Tr. basalis* sobre os rastros dos percevejos diferiu significativamente entre os tratamentos ( $F = 27,698$ ;  $g.l.=3,159$ ;  $P < 0,001$ ) (Figura 8). Os indivíduos observados passaram significativamente mais tempo forrageando nos rastros do percevejo *N. viridula* em relação aos outros tratamentos, e nos rastros de *D. melacanthus* e *E. heros* em relação ao controle (Figura 8). O tempo médio de forrageamento do parasitoide *Te. podisi* também foi significativamente afetado pelos tratamentos ( $F = 30,672$ ;  $g.l.=3,159$ ;  $P < 0,001$ ), sendo que fêmeas desta espécie forragearam por mais tempo sobre os rastros dos percevejos *E. heros* e *D. melacanthus* em relação aos rastros de *N. viridula* e ao controle (Figura 8).

A distância (trajetória) de forrageamento também foi afetada pelos rastros das espécies de percevejo aos quais os parasitoides *Tr. basalis* ( $F = 21,142$ ;  $g.l.=3,159$ ;  $P < 0,001$ ) e *Te. podisi* ( $F = 18,207$ ;  $g.l.=3,159$ ;  $P < 0,001$ ) foram expostos no experimento (Figura 9). Novamente cada espécie de parasitoide apresentou um padrão diferente em relação à trajetória percorrida (Figura 9). O parasitoide *T. basalis* percorreu uma trajetória maior sobre os rastros do percevejo *N. viridula* (Figura 9) enquanto que *Te. podisi* percorreu uma trajetória maior sobre os rastros de *E. heros* e *D. melacanthus* (Figura 9).

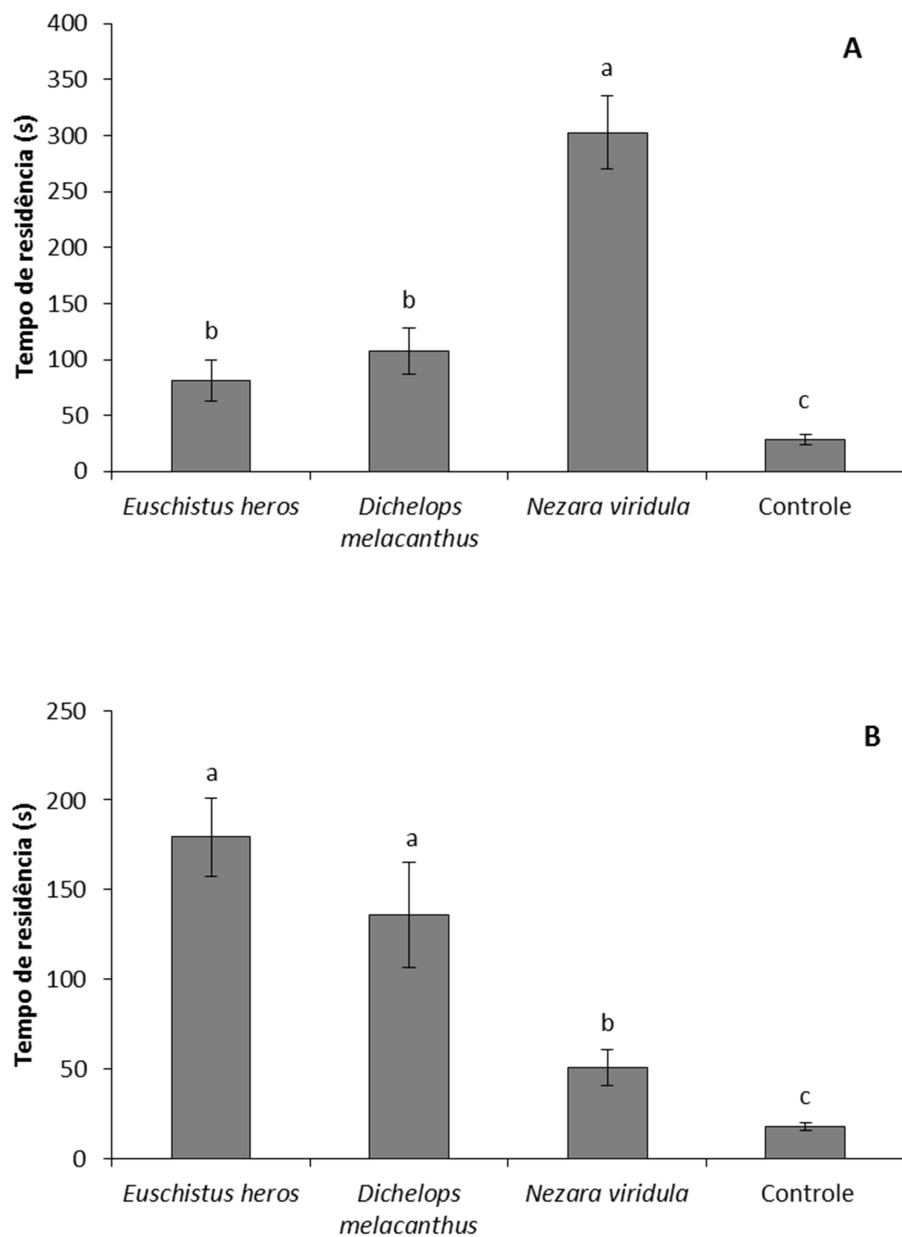
A mudança de direção no percurso do parasitoide *Tr. basalis* sobre os rastros de *Dichelops melacanthus* foi significativamente maior da registrada nos demais tratamentos ( $\chi = 341,980$ ;  $g.l.=3,159$ ;  $P < 0,001$ ) (Figura 10). O parasitoide *Te. podisi* ( $\chi = 140,100$ ;  $g.l.=3,159$ ;  $P < 0,001$ ) (Figura 10) mostrou um número de mudanças de direção/s significativamente maior nos tratamentos com rastros de *E. heros* e *D. melacanthus* em relação ao tratamento com rastros de *N. viridula* e ao controle.



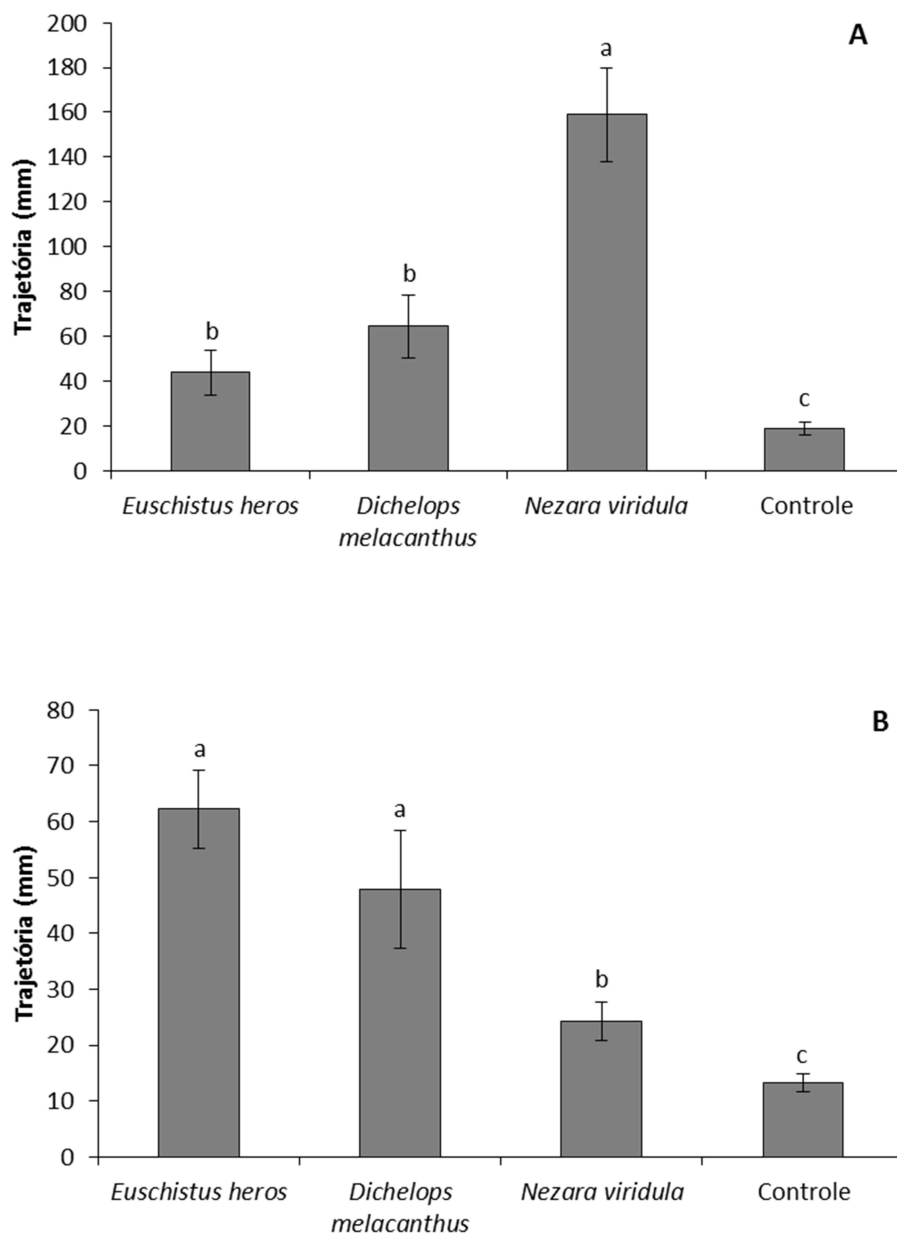
**Figura 6.** Imagem representativa de trilhas de forrageamento do parasitoide *Trissolcus basaliss* em arena aberta sobre os tratamentos: (A) Controle, (B) rastro de *Euschistus heros*, (C) rastro de *Dichelops melacanthus* e (D) rastro de *Nezara viridula*.



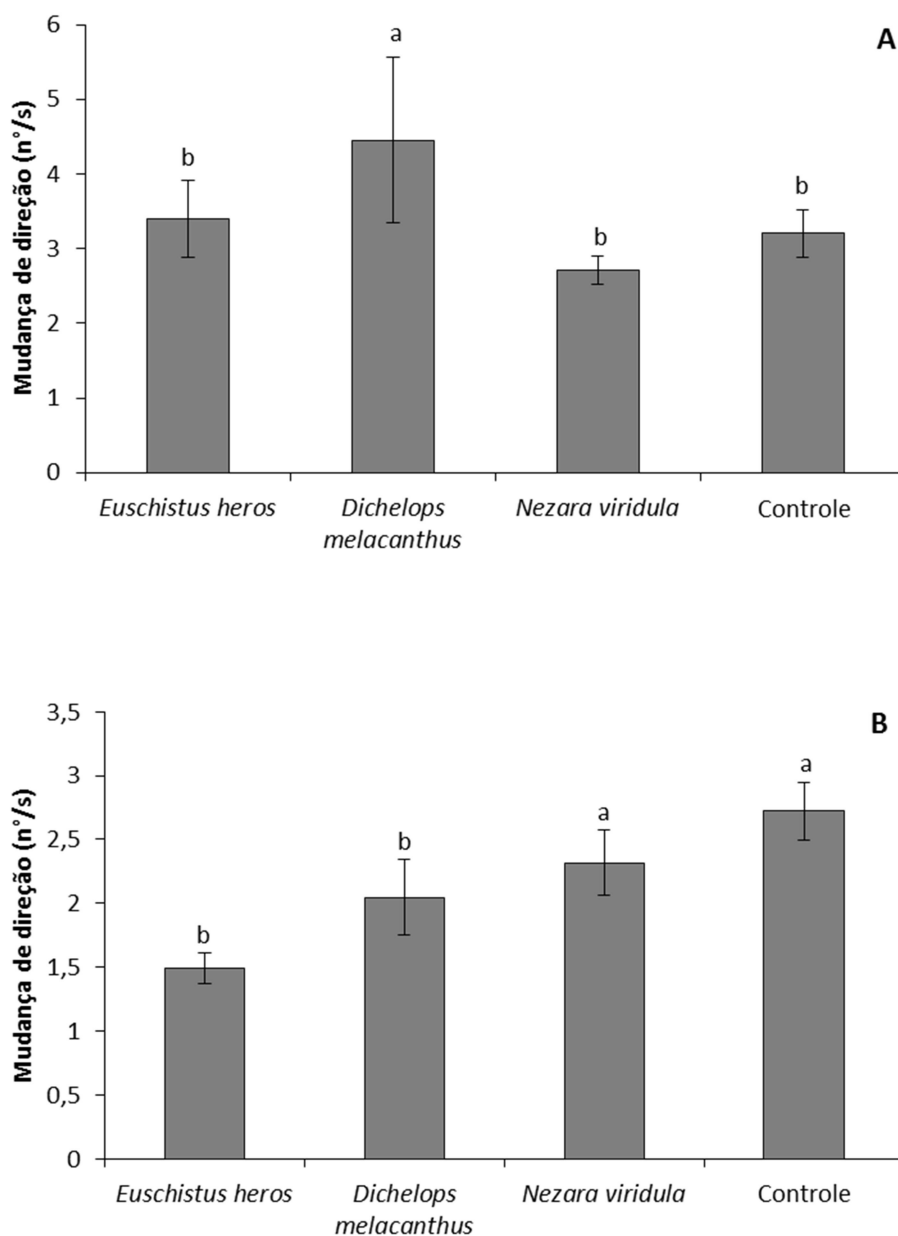
**Figura 7.** Imagem representativa de trilhas de forrageamento do parasitoide *Telenomus podisi* em arena aberta sobre os tratamentos: (A) Controle, (B) rastro de *Euschistus heros*, (C) rastro de *Dichelops melacanthus* e (D) rastro de *Nezara viridula*.



**Figura 8.** Tempo de residência em segundos do movimento dos parasitoides *Trissolcus basalus* (A) e *Telenomus podisi* (B) em áreas tratadas com rastros de três espécies de percevejos e não tratadas (controle). As barras representam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão. Médias seguidas das mesmas letras não diferiram significativamente pela análise de contraste ( $P > 0,05$ ).



**Figura 9.** Distância percorrida em milímetros pelos parasitoides *Trissolcus basalis* (A) e *Telenomus podisi* (B) em áreas com rastros de três espécies de percevejos e sem rastros (controle). As barras representam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão. Médias seguidas das mesmas letras não diferiram significativamente pela análise de contraste ( $P > 0,05$ ).



**Figura 10.** Mudança de direção (número/s) do movimento dos parasitoides *Trissolcus basalis* (A) e *Telenomus podisi* (B) em áreas com rastros de três espécies de percevejos e sem rastros (controle). As barras representam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão. Médias seguidas das mesmas letras não diferiram significativamente pela análise de contraste ( $P > 0,05$ ).



## Teste com chance de escolha

Ambos os parasitoides mostraram respostas seletivas frente a rastros do seus hospedeiros preferenciais. Quando contrastado os tratamentos dos rastros de *E. heros* versus *D. melacanthus* o parasitoide *Tr. basalis* passou mais tempo sobre os rastros de *D. melacanthus* ( $Z=2,150$ ; 1 g.l.;  $P=0,015$ ) (Figura 11). Porém, não houve diferenças significativas quanto a trajetória ( $\chi= 0,658$ ; g.l.=1-79;  $P=0,417$ ) e mudança de direção ( $\chi= 0,190$  g.l.=1-79;  $P=0,662$ ) para a mesma combinação de tratamentos (Figura 12 e 13).

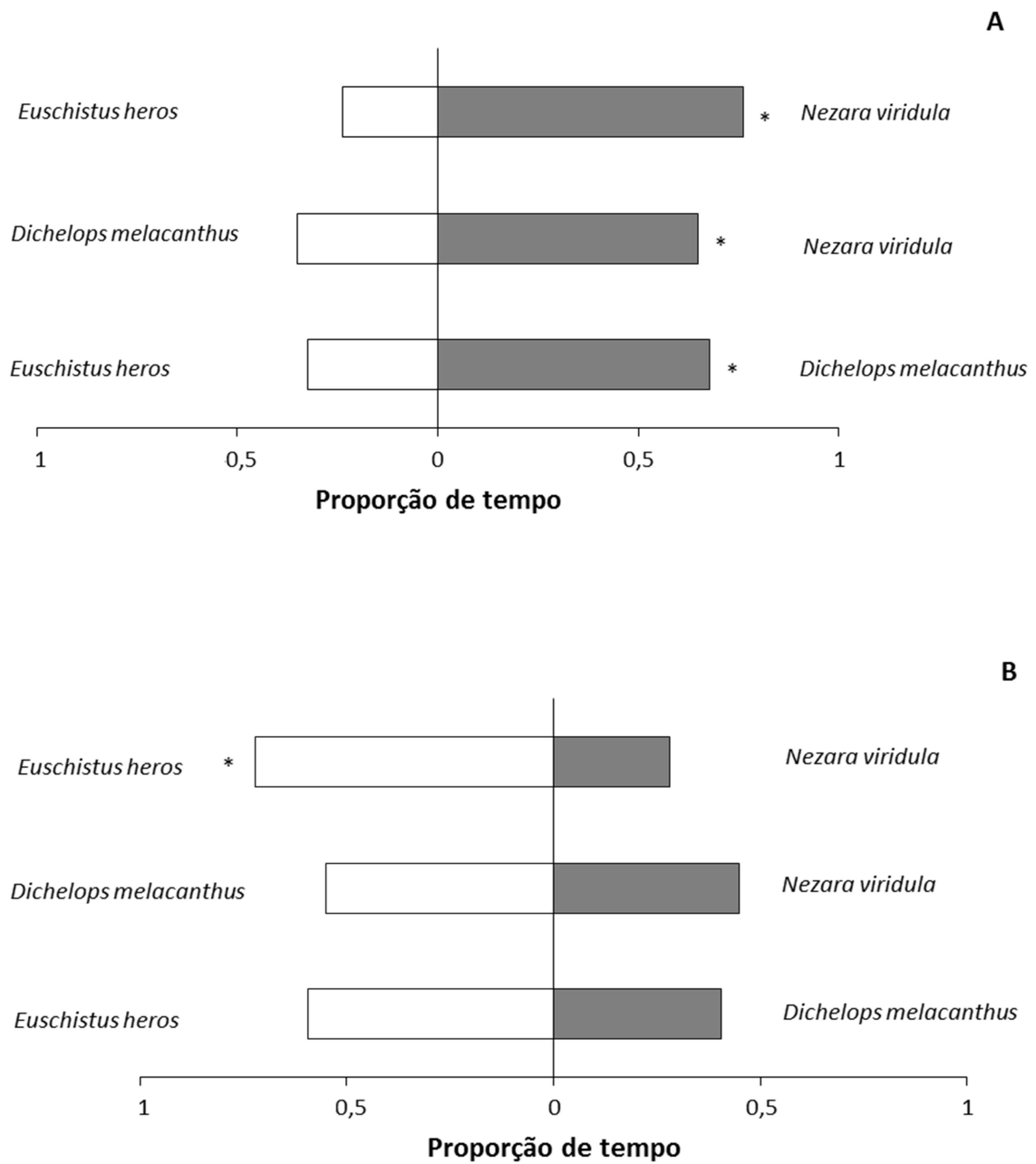
Quando contrastados os tratamentos de rastros de *N. viridula* versus *D. melacanthus* o parasitoide *Tr. basalis* passou significativamente mais tempo sobre os rastros de *N. viridula* ( $Z=1.68$ ; 1 g.l.;  $P= 0,046$ ) (Figura 11). No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para as variáveis Trajetória ( $\chi =0,519$ ; g.l.=1-71;  $P= 0,471$ ) e Mudança de direção ( $\chi= 0,525$ ; g.l.=1-71;  $P= 0,468$ ) (Figura 12 e 13).

O parasitoide *Tr. basalis* passou significativamente mais tempo sobre os rastros de *N. viridula* do que sobre os rastros de *E. heros* quando esses foram contrastados (Figura 11) ( $Z= 3,288$ ; 1 g.l.;  $P<0,001$ ). Foram detectadas diferenças significativas entre os dois tratamentos quando avaliadas as variáveis Trajetória ( $\chi =10.250$ ; g.l.=1-79;  $P= 0,001$ ), e Mudança de direção ( $\chi= 3,975$  ; g.l.=1-79;  $P=0,046$ ) (Figura 12 e 13).

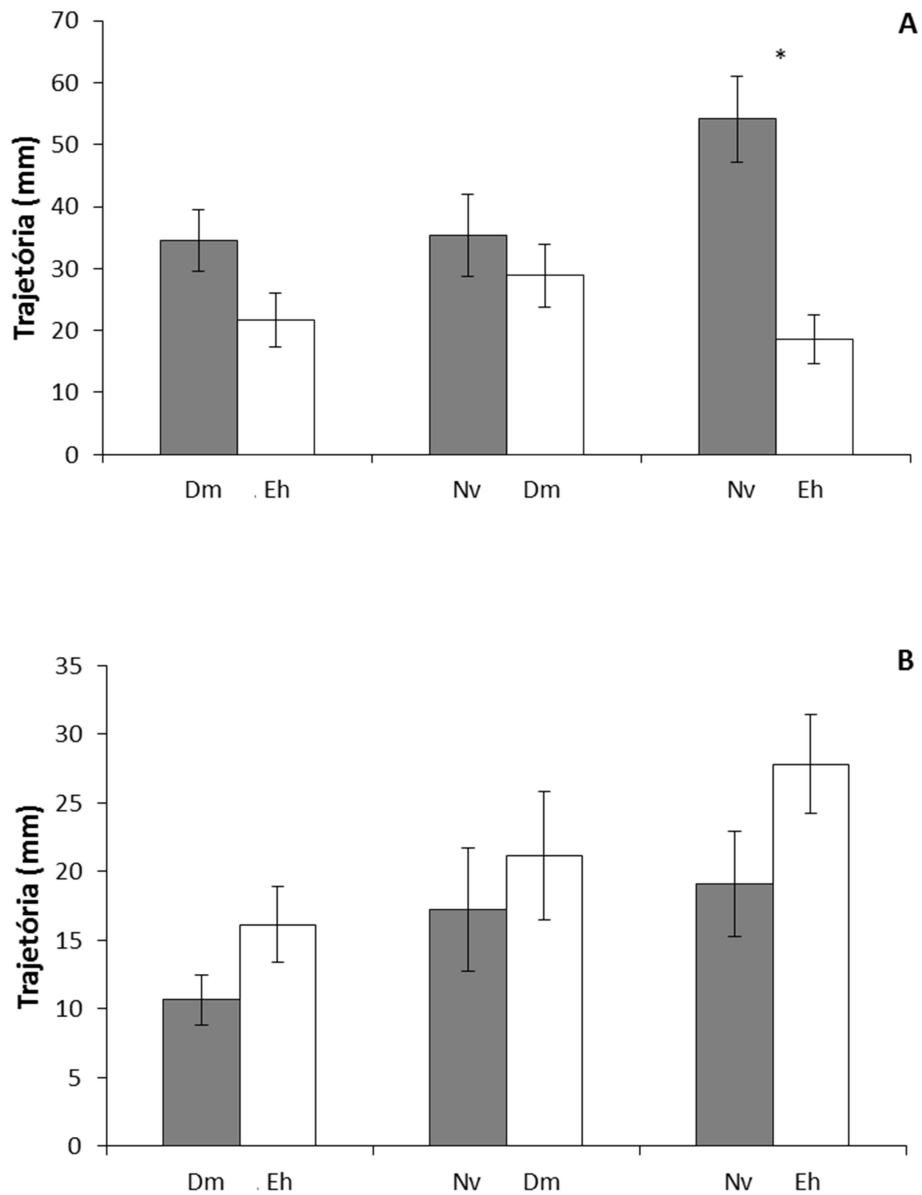
Não houve diferença significativa para as variáveis tempo de residência ( $Z= 1,109$ ; 1 g.l.;  $P= 0,133$ ), trajetória ( $\chi= 1,816$ ; g.l.=1-75;  $P=0,177$ ) e mudança de direção ( $\chi=1,000$ ; g.l.=1-75;  $P=0,317$ ) do parasitoide *Te. podisi* frente aos tratamentos *E. heros* versus *D. melacanthus* (Figuras 11, 12 e 13).

*Te. podisi* passou significativamente mais tempo sobre os rastros de *E. heros* do que sobre os rastros de *N. viridula* quando estes tratamentos foram contrastados ( $Z=2,782$ ; 1 g.l.;  $P=0,002$ ) (Figura 11). Porém, não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto as variáveis Trajetória ( $\chi=1,900$  ; g.l.=1-79;  $P=0,168$ ) e Mudança de direção ( $\chi=2,731$ ; g.l.=1-79;  $P=0,098$ ) (Figuras 12 e 13).

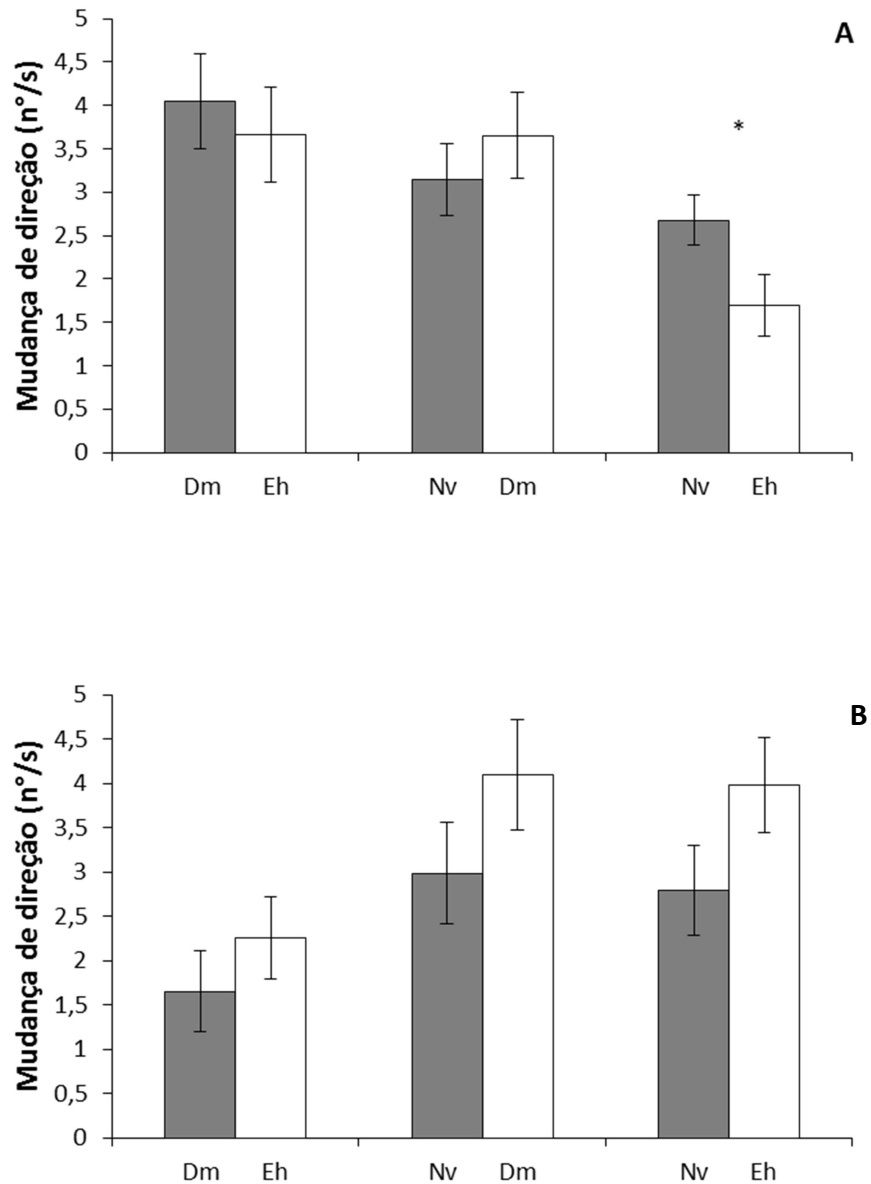
Não houve diferença significativa quanto ao tempo de residência do parasitoide *T. podisi* frente aos rastros de *N. viridula* versus *D. melacanthus* ( $Z= 0,556$ ; g.l.;  $P=0,288$ ) (Figura 11), assim como para as variáveis trajetória ( $\chi= 0,286$ ; g.l.=1-61;  $P=0,592$ ) e mudança de direção ( $\chi= 1,333$ ; g.l.=1-61;  $P=0,248$ ) (Figuras 12 e 13).



**Figura 11.** Proporção do tempo de residência do movimento dos parasitoides *Trissolcus basalis* (A) e *Telenomus podisi* (B) sobre combinações de rastros de percevejos. \* indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste Z de proporções ( $P < 0,05$ ).



**Figura 12.** Distância (mm) percorrida pelos parasitoides *Trissolcus basalis* (A) e *Telenomus podisi* (B) sobre os tratamentos *Dichelops melacanthus* (Dm) versus *Euschistus heros* (Eh), *Nezara viridula* (Nv) versus *Dichelops melacanthus* (Dm) e *Nezara viridula* (Nv) versus *Euschistus heros* (Eh). As barras representam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão. \* indicam diferenças significativas entre os tratamentos pela análise de GLM ( $P < 0,05$ ).



**Figura 13.** Mudança de direção (n°/s) do movimento dos parasitoides *Trissolcus basalis* (A) e *Telenomus podisi* (B) sobre os tratamentos *Dichelops melacanthus* versus *Euschistus heros* (Dm vs. Eh), *Nezara viridula* versus *Dichelops melacanthus* (Nv vs. Dm) e *Nezara viridula* versus *Euschistus heros* (Nv vs. Eh). As barras representam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão. \* indicam diferenças significativas entre os tratamentos pela análise de GLM ( $P < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

Os parasitoides *Te. podisi* e *Tr. basalis* foram capazes de identificar e discriminar rastros de diferentes espécies de percevejos, bem como seguir seletivamente os rastros dos hospedeiros preferenciais. Nos testes sem chance de escolha *Tr. basalis* permaneceu mais tempo sobre os rastros de *N. viridula* enquanto que *Te. podisi* sobre os rastros de *E. heros*. No teste com chance de escolha, em todas as combinações dos tratamentos, o parasitoide *Tr. basalis* preferiu forragear sobre os rastros dos seu hospedeiro preferencial. O parasitoide *Te. podisi* permaneceu o mesmo tempo sobre rastros do seu hospedeiro preferencial e do hospedeiro alternativo *D. melacanthus*.

Assim como observado por Colazza et al. (1999; 2007) e Borges et al. (2003), os parasitoides de ovos *Tr. basalis* e *Te. podisi* apresentam mudanças comportamentais quando em contato com os rastros de percevejos. Colazza et al. (1999; 2007) verificaram que fêmeas de *Tr. basalis* são capazes de reconhecer e diferenciar os rastros de machos e fêmeas de *N. viridula*. Borges et al. (2003), estudando duas populações de *Te. podisi*, uma dos EUA e outra do Brasil, observaram que cada população apresentou diferentes respostas aos rastros dos hospedeiros. A população brasileira reconheceu os rastros de fêmeas de seu hospedeiro habitual *E. heros*, já os parasitoides da população dos EUA não reconheceram rastros desta espécie de percevejos Neotropicais (Borges et al., 2003).

Em geral, parasitoides Telenominae possuem hábitos generalistas (Bruni et al.; 2000; Fatouros et al., 2008; Laumann et al., 2009), pois são capazes de parasitar ovos de diferentes espécies de Pentatomidae (Austin et al., 2005). Apesar disso, algumas espécies mostram preferência por certos hospedeiros onde o desenvolvimento da sua progênie é favorecido (Corrêa-ferreira e Moscardi, 1996; Sujii et al., 2002; Lopes, 2011).

Respostas seletivas dos parasitóides *Tr. basalis* e *Te. podisi* também foram relatadas para estímulos utilizados nas etapas iniciais da procura por hospedeiros como voláteis de plantas (Lopes et al. 2012), semioquímicos dos hospedeiros (Laumann et al. 2009) e para estímulos utilizados após a localização do habitat (Colazza et al., 2007, Aquino, 2011).

Laumann et al. (2011) expuseram o parasitoide de ovos *Te. podisi* a sinais vibratórios de diferentes percevejos pentatomídeos, e observaram que estes foram mais estimulados pelas vibrações de fêmeas de *E. heros*, seu hospedeiro preferencial.

Assim, a seletividade frente a estímulos de diferentes origens, incluindo as respostas seletivas observadas neste trabalho a rastros de percevejos, sustentam a hipótese que os parasitoides de ovos identificam e discriminam estímulos relacionados aos hospedeiros que oferecem melhores condições à sua prole com óbvias vantagens adaptativas. Em condições naturais os parasitoides devem tomar diferentes decisões em relação aos estímulos encontrados no ambiente de modo a favorecer o encontro com o hospedeiro final. Os resultados dos experimentos com chance de escolha, frente a diferentes rastros, demonstram claramente a capacidade inata desses insetos em tomar decisões e escolher o recurso que potencializa o encontro com hospedeiros que oferecem melhores condições para o desenvolvimento da sua progênie.

Os resultados também sugerem que ambos os parasitoides em estudo apresentam estratégias de busca diferentes. O tempo de residência observado sobre os rastros foi maior para o parasitoide *Tr. basalis* em comparações a *Te. podisi*. Este fato é de grande importância ao considerar padrões de comportamento neste grupo de parasitoides e, desde o ponto de vista aplicado, se sugere que as estratégias de manejo destes inimigos naturais para o controle biológico devem ser analisadas caso a caso.

O parasitoide *Te. podisi* apresentou preferência ou foi estimulado pelos rastros de *E. heros* e *D. melacanthus*. Os resultados para ambos os tratamentos em experimentos com e sem chance de escolha não apresentaram diferenças significativas frente as duas espécies de hospedeiro. No entanto, o parasitoide *Tr. basalis* em todos os experimentos preferiu e foi significativamente mais estimulado apenas pelos rastros de seu hospedeiro preferencial. Mais uma vez, o resultado sugere que há uma diferença na estratégia de forrageamento de ambas as espécies de parasitoides, onde, de certa forma, o parasitoide *Te. podisi* foi menos seletivo do que o parasitoide *Tr. basalis*

Conti et al. (2004) mostraram uma relação entre a historia evolutiva em comum de *Trissolcus simoni* (Mayr) e *Trissolcus brochymenae* (Ashmead) e seus hospedeiros preferenciais, *Euschistus ventrale* e *Murgantia histrionica*, respectivamente. Em bioensaios realizados em laboratório os autores observaram que os parasitoides *Tr. brochymenae* e *Tr. simoni*, respondem aos voláteis liberados por seus hospedeiros preferenciais, *M. histriônica* e *E. ventrale*, respectivamente. Porém, *T. simoni* não responde aos voláteis de *M. histriônica* e *T. brochymenae* responde parcialmente aos voláteis de *E. ventrale*, mostrando o reconhecimento e especificidade dos compostos liberados. Porém, de acordo com Salerno (2000), essas espécies de parasitoides estão associadas a dez ou mais espécies de hospedeiros pentatomídeos. Esses resultados mostram que apesar de possuírem diferentes hospedeiros, esses parasitoides reconhecem e preferem os voláteis de seus hospedeiros preferenciais. Salerno et al, (2006) mencionam sobre uma provável coevolução entre as espécies de parasitoide *Tr. basalis* e o hospedeiro *N. viridula*, porém, não há outros trabalhos ou evidencias que a comprove em relação aos parasitoides *Tr. basalis* e *Te. podisi* e seus hospedeiros preferenciais *N. viridula* e *E. heros*, respectivamente. No entanto, é clara a alta



especificidade comportamental dos parasitoides quanto aos semioquímicos de seus hospedeiros.

A utilização de rastros de percevejos por parasitoides de ovos coincide com a hipótese de confiabilidade/detectabilidade proposta por Vet e Dicke (1992) que propõe que estímulos diretamente relacionados com hospedeiros difíceis de serem detectados no ambiente (como é o caso de ovos de insetos), são substituídos por estímulos mais conspícuos, mesmo que eles não indiquem diretamente a presença/localização do hospedeiro. A estratégia de uso dos estímulos químicos originados em outros estágios do ciclo vital que não o hospedeiro, por exemplo, os estímulos provenientes de insetos adultos em lugar de estímulos originados nos ovos, é definida como desvio infoquímico (Vet e Dicke, 1992), e esta seria a estratégia relacionada ao uso de rastros químicos por *Tr. basalis* e *Te. podisi*.

Os resultados apresentados indicam que os rastros dos seus hospedeiros preferenciais são uma pista química importante para reter o parasitoide em áreas onde a probabilidade de encontrar ovos de percevejos que oferecem melhor condição de desenvolvimento à sua progênie é maior, diminuindo o tempo de busca e o gasto de energia forrageando. Estes resultados sugerem que a seleção de hospedeiros pelos parasitoides pode desenvolver-se em etapas prévias ao contato direto com o hospedeiro (posturas/ovos de percevejos), e coincide com o reportado previamente para outros estímulos (químicos ou físicos) (Colazza et al., 1999; Borges et al., 2003; Laumann et al., 2009; 2011; Lopes et al., 2011). Desta forma, nestes parasitoides a discriminação e preferência entre os estímulos originados do seu hospedeiro preferencial e alternativos, pode ser um padrão geral de comportamento nos Platygastriidae durante a procura de hospedeiros. Futuros trabalhos devem ser realizados a fim de observar o comportamento dos parasitoides frente a estímulos de diferente natureza.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Austin, A.D; Johnson, N.F; Downton, M. Systematic, evolution and biology of scelionid and platygastriid wasps. **Annual Reviews of Entomology**. v.50, p.553–582, 2005.
- Bell, W.J.; Tobin, T.R. Chemo-Orientation. **Biological Reviews**. v.57, p.219–260, 1982.
- Bell, W.J.; Kipp, L.R.; Collins, R.D. The role of chemoorientation in search behavior. Em: Cardé, R.T e Bell, W.J. **Chemical Ecology of Insects 2**. New York: Chapman & Hall. p.105–152, 1995.
- Borges, M.; Colazza, S.; Ramirez-Lucas, P.; Chauhan, K.R.; Moraes, M.C.B.; Aldrich, J.R. Kairomonal effect of walking traces from *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae) on two strains of *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae). **Physiological Entomology**. v.28, n.4, p.349–355, 2003.
- Bruni, R.; Sant'Ana, J.; Aldrich, J.R.; Bin, F. Influence of host pheromone on egg parasitism by scelionid wasps: comparison of phoretic and nonphoretic parasitoids. **Journal of Insect Behavior**. v.13, n.2, p.165–173, 2000.
- Butler, C.G.; Fletcher, D.J.C.; Watler, D. Nest-entrance marking with pheromones by the honeybee *Apis mellifera* L., and by a wasp, *Vespula vulgaris* L. **Animal Behaviour**. v.17, n.1, p.142–147, 1969.
- Colazza, S.; Salerno, G.; Wajnberg, E. Volatile and contact chemicals released by *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae) have a kairomonal effect on the egg parasitoid *Trissolcus basalis* (Hymenoptera: Scelionidae). **Biological Control**. v.16, n.3, p.310–317, 1999.
- Colazza, S.; Aquila, G.; De Pasquale, C.; Peri, E.; Millar, J.G. The egg parasitoid *Trissolcus basalis* uses *n*-nonadecane, a cuticular hydrocarbon from its stink bug host *Nezara viridula*, to discriminate between female and male hosts. **Journal of Chemical Ecology**. v.33, p.1405–1420, 2007.
- Colazza, S.; Lo Bue, M.; Lo Giudice, D.; Peri, E. The response of *Trissolcus basalis* to footprint contact kairomones from *Nezara viridula* females is mediated by leaf epicuticular waxes. **Naturwissenschaften**. v.96, p.975–981, 2009.
- Conti, E.; Salerno, G.; Bin, F.; Vinson, S.B. The role of host semiochemicals in parasitoid specificity: a case study with *Trissolcus brochymenae* and *Trissolcus simoni* on pentatomid bugs. **Biological Control**. v.29 p.435–444, 2004.
- Corrêa-Ferreira, B.S. e Moscardi, F. Biological control of soybean stink bugs by inoculative releases of *Trissolcus basalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. v.79, n.1, p.1–7, 1996.
- Fatouros, N.E.; Dicke, M.; Mumm, R.; Meiners, T.; Hilker, M. Foraging behavior of egg parasitoids exploiting chemical information. **Behavioral Ecology**. v.19, p.677–689, 2008.

- Gawleta, N; Zimmermann, Y; Eltz, T. Repellent foraging scent recognition across bee families. **Apidologie**. v.36, n.3, p.325–330, 2005.
- Goulson, D; Chapman, J. W; Hughes, W. Discrimination of unrewarding flowers by bees; direct detection of rewards and use of repellent scent marks. **Journal of Insect Behavior**. v. 14, n. 5, p. 669–678, 2001.
- Jorge, L.A.C.; Laumann, R.; Borges, M.; Moraes, M.C.B.; Cruz, R.A.; Milare, B.N.; Palhares, L. Software para avaliação do comportamento de insetos. **Embrapa Instrumentação Agropecuária**. n.30, p.01–07, 2005.
- Laumann, R.A.; Aquino, M.F.S.; Moraes, M.C.B.; Pareja, M.; Borges, M. Response of the egg parasitoids *Trissolcus basalis* and *Telenomus podisi* to compounds from defensive secretions of stink bugs. **Journal of Chemical Ecology**. v.35, n.1, p.8–19, 2009.
- Laumann, R.A.; Čokl, A.; Lopes, A.P.S.; Ferreira, J.B.C.; Moraes, M.C.B.; Borges, M. Silent singers are not safe: selective response of a parasitoid to substrate-borne vibratory signals of stink bugs. **Animal Behaviour**. v.82, n.5, p.1175–1183, 2011.
- Laumann, R.A.; Moraes, M.C.B.; Silva, J.P.; Vieira, A.M.C.; Silveira, S.; Borges, M. Egg parasitoid wasps as natural enemies of the neotropical stink bug *Dichelops melacanthus*. **Pesquisa agropecuária Brasileira** v.45, n.5, p.442–449, 2010.
- Lo Giudice, D. Contact chemo-orientation in insect parasitoids: the case study of mate-finding in *Metaphycus luteolus* and host-finding in *Trissolcus basalis*. **Repositório Institucional da Universidade de Palermo**. 2009.
- Lopes, A.P.S. Ecologia química das interações tri-tróficas plantas-percevejos-parasitoides de ovos. **Repositório institucional da Universidade de Brasília**. 2011.
- Lopes, A.P.S.; Diniz, I.R.; Moraes, M.C.B.; Borges, M., Laumann, R.A. Defesas induzidas por herbivoria e interações específicas no sistema tritrófico soja-percevejos-parasitoides de ovos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.47, n.6, p.875–878, 2012.
- Ninkovic, V.; Feng, Y.; Olsson, U.; Pettersson, J. Ladybird footprints induce aphid avoidance behavior. **Biological Control**. v.65, n.1, p.63–71, 2013.
- Peri, E; Wanjnberg, E; Colazza, S. Effect of host kairomones and oviposition experience of an egg parasitoid. **Journal of Experimental Biology**. v.209, p.3629–3635, 2006.
- R Development Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2010. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.Rproject.org/>.

Salerno, G. Evaluation of host specificity in pentatomid parasitoids through their response to the host unit. **Repositório Institucional da Universidade de Perugia**. 2000.

Salerno, G.; Conti, E.; Peri, E.; Colazza, S.; Bin, F. Kairomone involvement in the host specificity of the egg parasitoid *Trissolcus basalis* (Hymenoptera: Scelionidae). **European Journal of Entomology**. v.103, p.311–318, 2006.

Sujii, E.R.; Costa, M.L.M.; Pires, C.S.S.; Colazza, S.; Borges, M. Inter and intra-guild interactions in egg parasitoid species of the soybean stink bug complex. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.37, n.11, p.1541–1549, 2002.

Turlings, T.C.J.; McCall, P.J.; Alborn, H.T.; Tumlinson, J.H. An elicitor in caterpillar oral secretions that induces corn seedlings to emit chemical signals attractive to parasitic wasps. **Journal of Chemical Ecology**. v.19, n.3, p.411–425, 1993.

Vet, L.E.M. e Dicke, M. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. **Annual Review of Entomology**. v.37, p.141–172, 1992.

Vet, L.E.M.; Lewis, W.J.; Cardé, R.T. Parasitoid foraging and learning. Em: Cardé, R.T e Bell, W.J. **Chemical Ecology of Insects 2**. New York: Chapman & Hall. p.65–101, 1995.

Vinson, S.B.; Pennacchio, F.; Lanzrein, B. Interactions between parasitoids and their hosts: An introduction and perspective. **Journal of Insect Physiology**. v.44, p.701–702, 1998.

Witjes, S.; Witsch, K.; Eltz, T. Reconstructing the pollinator community and predicting seed set from hydrocarbon footprints on flowers. **Oecologia**. v.166, n.1, p.161–174, 2011.

## Capítulo 2

### Identificação dos compostos presentes nos rastros de percevejos da família Pentatomidae e estudo comportamental de *T. basalis* e *T. podisi* frente a extratos dos rastros de percevejos

#### INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos cuticulares são constituídos por compostos alifáticos e em sua maioria apolares (Blomquist et al., 1987). São formados pela mistura complexa de alcanos, alcenos e alcanos de cadeia ramificada, que são as três maiores classes de hidrocarbonetos presentes na cutícula dos insetos (Blomquist e Bagnères, 2010). Foram primeiramente identificadas por Baker et al. (1963) em baratas (*Periplaneta americana* L.).

De modo geral, são sintetizados em células denominadas oenócitos próximo ao tegumento abdominal dos insetos (Diehl, 1975; Fan et al., 2003) e transportado por canais que os depositam na camada superficial da cutícula (epicutícula) (Locke, 1965; Hadley, 1981). A cutícula está diretamente relacionados à capacidade adaptativa dos insetos, uma vez que é responsável pela proteção do tegumento contra a dissecação, a absorção e sequestro de substâncias tóxicas, sendo também uma barreira para a entrada de microrganismos (Blomquist et al., 1987). Além da proteção física e química do organismo, os hidrocarbonetos cuticulares também desempenham a importante função de mediador da comunicação entre os insetos. Atuam, por exemplo, como feromônios sexuais, de agregação e como um indício de castas em insetos sociais (Blomquist et al., 1987).

Nos parasitoides de ovos da família Platygasteridae os hidrocarbonetos são utilizados como feromônios sexuais, onde machos fazem a discriminação dos sexos e da

idade das fêmeas (Salerno et al., 2012), e também como ferramenta durante o comportamento de busca e seleção de hospedeiros. Por exemplo, além dos rastros químicos do hospedeiro, que constituem uma pista confiável ao parasitoide (Colazza et al., 1999; Borges et al., 2003; Frati et al., 2013; Peri et al., 2013), hidrocarbonetos presentes na secreção do córion do ovo, que atuam como substância adesiva dos ovos ao substrato (Bin et al., 1993; Borges et al., 1999; Conti et al., 2003), são fundamentais para o reconhecimento do hospedeiro.

Os hidrocarbonetos são encontrados por toda a cutícula dos insetos (Jackson e Baker, 1970). No caso dos percevejos pentatomídeos, encontram-se mais concentrados nos tarsos (Colazza et al., 2009), o que explica a liberação desses compostos constituintes da cutícula sobre a superfície do substrato. Os rastros de percevejos são constituídos por hidrocarbonetos de cadeia longa e possuem primariamente alcanos lineares (Colazza et al., 2007). Além de alcanos, Lo Giudice (2009) documentou, nos rastros das fêmeas de *N. viridula*, a presença de diglicerídeos e triglicerídeos de alto peso molecular, ácidos graxos e álcoois de cadeia longa. Assim, em geral, os rastros são formados por misturas de compostos com alto peso molecular e pouca volatilidade.

A primeira demonstração da atividade cairomonal de rastros de percevejos para parasitoides de ovos da família Platygastriidae foi realizada por Colazza et al. (1999), onde fêmeas de *Tr. basalis* foram atraídas e estimuladas por rastros de fêmeas de *N. viridula*. Desde então, esses e outros autores vem estudando a relevância dos rastros para os parasitoides de ovos como uma importante ferramenta no comportamento de busca e seleção de hospedeiros. Além de reconhecerem os rastros de *N. viridula*, os parasitoides *Tr. basalis* também discriminam entre os sexos do hospedeiro (Peri et al., 2006). Isso acontece pela percepção da presença do alcano linear *n*-nonadecano em rastros de machos e ausência do mesmo em rastros de fêmeas (Colazza et al., 2007).

Borges et al. (2003) demonstraram que populações isoladas de *Te. podisi* apresentam diferentes respostas aos caimônios provenientes de um mesmo hospedeiro. O comportamento de uma população brasileira e de uma população norte americana de *Te. podisi* foi avaliado frente a rastros do percevejo *E. heros*, seu hospedeiro preferencial. Observou-se que a população norte americana, sem contato com este percevejo não mostrou resposta comportamental após o contato com os rastros de *E. heros*. Esta espécie de percevejo não ocorre em regiões temperadas, porém, é abundante na região Neotropical.

Outro caso de atratividade e retenção de inimigos naturais por rastros de hospedeiros pentatomídeos foi observado para o parasitoide *Tr. brochymenae* e seu hospedeiro preferencial *Murgantia histrionica* (Hahn), (Conti et al., 2003). Adicionalmente, Salerno et al. (2009) observaram que há a discriminação e preferência deste parasitoide por rastros de fêmeas grávidas em relação aos rastros de fêmeas virgens ou fêmeas que já haviam ovipositado. Em contrapartida, Conti et al. (2004) observaram que o parasitoide *Tr. simoni* é igualmente estimulado pelos rastros de fêmeas de *Euridema ventrale* (Kolenati), seu hospedeiro preferencial, *M. histriônica* e *N. viridula*.

Trabalhos prévios também avaliaram a influência do substrato sobre os rastros, quanto à sua composição química e sobre o comportamento dos parasitoides de ovos. Dessa forma, observou-se a partir de microscopia eletrônica de varredura, que as ceras epicuticulares das plantas são capazes de absorver os rastros dos percevejos, o que incrementa a retenção do parasitoide sobre a área em comparação a folhas sem essa camada lipídica (Colazza et al., 2009). Essa retenção possivelmente ocorre pela interação de compostos apolares de hidrocarbonetos cuticulares de insetos e das ceras

epicuticulares das folhas, compostas principalmente por alcanos lineares, cetonas e álcoois secundários (Lo giudice et al., 2011).

O objetivo do presente capítulo foi verificar se existem diferenças na constituição química dos extratos de rastros de fêmeas *E. heros*, *D. melacanthus* e *N. viridula*, bem como avaliar se os extratos influenciam o comportamento dos parasitoides e se há a preferência pelos extratos dos rastros de seus hospedeiros preferenciais. A hipótese avaliada é que os parasitoides de ovos *Tr. basalis* e *Te. podisi* apresentam diferenças comportamentais, similares às observadas em rastros naturais, em relação aos extratos de rastros de diferentes espécies de percevejos, havendo seletividade de resposta frente a extratos de rastros de hospedeiros preferenciais, e que essa resposta está relacionada a diferentes composições químicas dos rastros de cada espécie de percevejo.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### **Insetos**

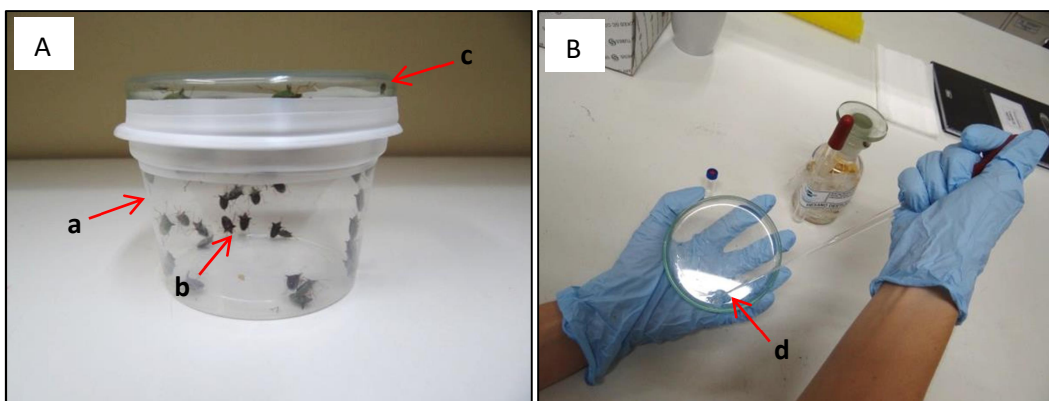
Os insetos utilizados foram provenientes de criação localizada no laboratório de Semioquímicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. As fêmeas de percevejos utilizadas para a extração dos rastros foram separadas dos demais insetos da criação massal, para minimizar o contato com fezes e outras substâncias como foromônios sexuais, por exemplo. Os percevejos foram mantidos em gaiolas plásticas sob condições controladas de temperatura e umidade com dieta a base de grãos e vagem de feijão. Os parasitoides foram mantidos em gaiolas plásticas contendo mel como



dieta. Ambas as criações foram acondicionadas e mantidas conforme os procedimentos descritos no primeiro capítulo desta dissertação.

### **Extração dos rastros**

Para a obtenção de extratos de rastros de *E. heros* e *D. melacanthus*, entre 30 a 50 fêmeas de cada espécie foram colocadas em potes de plástico (250 mL) tampados com uma placa de Petri de vidro de borossilicato (9 cm diâmetro) e vedados com fita de teflon (veda rosca) (Figura 14). Os insetos foram mantidos por 24 horas em sala climatizada ( $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $65\pm 10\%$  UR e fotoperíodo de 14 horas), sem água ou alimento. Posteriormente, cada placa de Petri foi lavada com aproximadamente 1 mL de solvente apolar, *n*-hexano, por 30 segundos. O solvente foi colocado na superfície interna da placa com a ajuda de uma pipeta, que também serviu para a raspagem da superfície (Figura 14). O conteúdo foi armazenado em frascos de vidro de borossilicato de 4 mL e pré-concentradas em fluxo de  $\text{N}_2$  para um volume de 50  $\mu\text{L}$ . Amostras obtidas com diferentes grupos de insetos de cada espécie foram combinadas de modo que houvesse o equivalente a 100 fêmeas por frasco, sendo o volume novamente pré-concentrado para 50  $\mu\text{L}$ . Desta forma foram obtidos extratos com o equivalente aos rastros de 100 fêmeas/frasco para a posterior utilização nos bioensaios e nas análises químicas. A extração dos rastros de fêmeas de *N. viridula* foi conduzida como o descrito para as demais espécies, mas em cada pote foram colocadas de 5 a 15 fêmeas, pois devido a dificuldades na criação desse percevejo dispôs-se de menor quantidade de material biológico. Posteriormente as amostras combinadas renderam uma única amostra pré-concentrada em fluxo de  $\text{N}_2$  a 50  $\mu\text{L}$  com o equivalente a 50 fêmeas. Foram utilizadas 50 fêmeas de *N. viridula* por amostra porque cada uma corresponde ao tamanho de duas fêmeas de *E. heros* e *D. melacanthus*.



**Figura 14.** (A) Montagem do experimento para a extração dos rastros. No interior do pote plástico (a) estão 50 fêmeas do percevejo *Dichelops melacanthus* (b), tampadas com uma placa de Petri (c). (B) Extração dos rastros com o solvente hexano (d).

### Análises químicas

Cinco microlitros de cada amostra foram separados e 1  $\mu\text{L}$  de acetato de (*Z*)-3-hexenila (0,015 mg/mL) foi adicionado como padrão interno. Posteriormente, para a realização das análises 1  $\mu\text{L}$  da mistura foi injetada em cromatógrafo gasoso (CG) (Agilent 7890, coluna apolar DB-5, 60 m de comprimento x 0,32 mm de diâmetro, filme 1,0  $\mu\text{m}$ , Supelco, Bellefonte, PA, EUA) utilizando nitrogênio como gás de arrastre. O equipamento possui um detector de ionização por chama (DIC) a 300°C. Utilizou-se um programa de temperaturas com duas rampas iniciando a 50°C/2min, 5°C/min até 200°C mantida essa temperatura por 1 minuto e 10°C/min até 280°C mantendo essa temperatura por mais 30 minutos. A quantificação dos compostos foi realizada por comparação das áreas respectivas de cada composto em relação à área do padrão interno.

Os compostos foram identificados a partir da injeção de 1  $\mu\text{L}$  da mistura em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas, CG-EM (CG Agilent GC7890A acoplado ao EM Agilent 5975 MSD). O equipamento é possui um analisador quadrupolar equipado com uma coluna apolar DB-5 (30 m de comprimento x 0.25 mm

de diâmetro, filme 0.25  $\mu\text{m}$ , J&W Scientific, Folsom, CA, EUA), e ionização por impacto de elétrons (70-eV, 200°C). Os dados foram analisados com o software ChemStation e a identificação de cada composto foi obtida comparando-se o padrão de fragmentação dos compostos das amostras com o de dados catalogados em bibliotecas espectrais (NIST) e através do cálculo do índice de retenção (IR), utilizando como parâmetros de referência uma mistura de padrões de alcanos (C9-C40, Supelco - USA) que foi injetada no equipamento nas mesmas condições descritas anteriormente e de dados de IR obtidos na literatura.

### **Bioensaios em arena aberta**

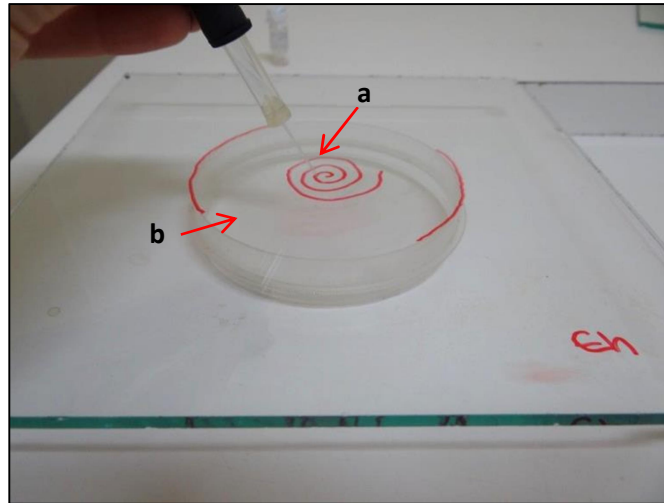
#### *Sem chance de escolha*

Foram realizados testes em arenas abertas compostas por uma superfície de vidro de borossilicato (4 mm de espessura, 20 cm x 20 cm). Nessa placa foi delimitada uma área central circular de 63  $\text{cm}^2$  (9 cm de diâmetro). Uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$  de extrato hexânico dos rastros das fêmeas de percevejos foi distribuída nesta superfície (Figura 15). Para que houvesse uma distribuição homogênea dos extratos a alíquota de 5  $\mu\text{L}$  foi distribuída a partir do centro da área circular traçando uma espiral concêntrica com o capilar de vidro. Como controle, foi criada uma trilha com 5  $\mu\text{L}$  de hexano, aplicada da mesma forma que os demais tratamentos.

Uma fêmea de cada espécie de parasitoide foi liberada no centro da arena, em contato direto com os extratos, e seu comportamento foi monitorado por um período de 10 minutos ou até o parasitoide abandonar a arena. Para o monitoramento foi utilizada uma câmera de vídeo com receptores para luz infravermelha posicionada sobre a arena (SONY SPT M324CE; Sony, Minato-KU, Tokyo, Japão, ajustada com lentes 12.5-75.0 mm/F1.8). As imagens foram digitalizadas por uma placa de captura de vídeo (PC-Studio PCTV Pinnacle System), e enviadas para um computador. No computador as

imagens geradas foram gravadas e processadas utilizando o Software para Análise do Comportamento de Animais em Movimento (SACAM) (Jorge et al., 2005). As variáveis medidas pelo SACAM foram: tempo de residência nas áreas da arena tratada e não tratada (s), trajetória do parasitoide sobre a arena (mm percorridos) e mudança na direção da trajetória (nº de mudanças/s). Foi considerada mudança de direção quando a trajetória do parasitoide mudou em um ângulo superior à metade do comprimento corporal do inseto. Estas variáveis permitem quantificar se os estímulos presentes nas arenas de bioensaios (rastros dos percevejos) modificam o padrão de busca do inseto incrementando o tempo que o inseto permanece nas áreas tratadas e mudando seu padrão geral de movimentação (aumento da área procurada e aumento da quinese).

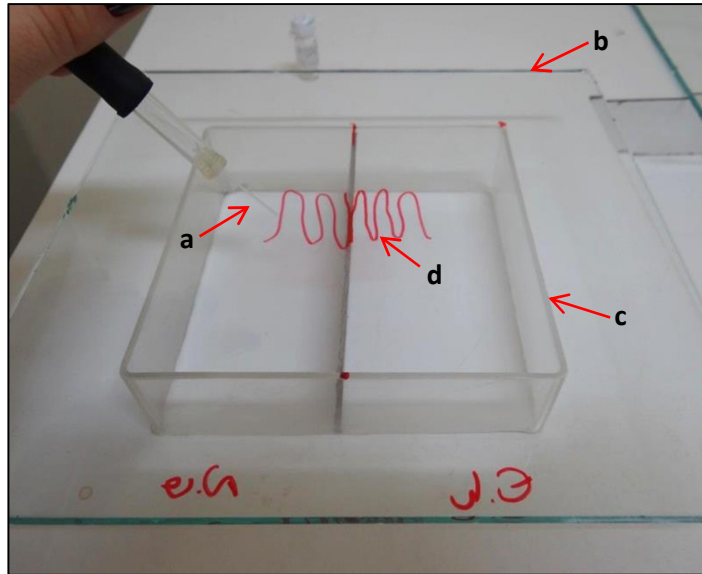
Em cada tratamento (extrato dos rastros de *E. heros*, *N. viridula* e *D. melacanthus*) e controle foram realizadas 40 repetições para *Tr. basalis* e *Te. podisi*, alternando-se a observação de parasitoides expostos aos tratamentos e controle. Cada arena, com os extratos dos rastros dos percevejos ou controle, foi utilizada em cinco repetições, não comprometendo a qualidade dos extratos espalhados ou impregnando resíduos deixados por parasitoides anteriormente observados (Peri et al., 2006). Posteriormente aos bioensaios a arena foi lavada com detergente neutro, descontaminada com acetona 100%, e mantida em estufa a 40°C por pelo menos 4 horas.



**Figura 15.** Montagem do experimento sem chance de escolha. Aplicação de 5 $\mu$ l de extrato de rastro (a) no interior da área delimitada da arena de vidro (b).

#### *Com chance de escolha*

Os bioensaios de preferência foram realizados em arena aberta tal qual mencionado anteriormente. Porém a área teste, onde o extrato foi aplicado, foi formada por um quadrado de acrílico com 20 cm<sup>2</sup> e 5 cm de altura. Este quadrado foi dividido ao meio por uma cartolina. Desta forma, em cada uma das áreas delimitadas do quadrado foram colocados 5  $\mu$ L de extrato de cada espécie de percevejo (Figura 16), criando assim uma arena de experimentação com extrato dos rastros de duas espécies de percevejos. Foram três combinações de tratamentos avaliadas: extrato dos rastros de *E. heros* versus *D. melacanthus*, *E. heros* versus *N. viridula* e *N. viridula* versus *D. melacanthus*. Para cada uma das três combinações foi avaliado o comportamento de *Tr. basalis* e *Te. podisi* separadamente, somando 40 repetições para cada combinação de tratamentos e espécie de parasitoide. A limpeza do material dos bioensaios e a captura da imagem do movimento do parasitoide foram realizadas seguindo os procedimentos detalhados para os bioensaios sem chance de escolha.



**Figura 16.** Montagem do experimento com chance de escolha. No interior de cada área delimitada foram aplicados 5 $\mu$ L de extrato de rastro de percevejo (a). Arena de vidro (b), quadrado de acrílico dividido por uma cartolina (c) e marcação para orientar a aplicação do extrato (d).

### **Análises estatísticas**

Todas as variáveis avaliadas nos bioensaios sem chance de escolha foram analisadas e comparadas entre os tratamentos através de modelos lineares generalizados (GLM) e análise de deviança separadamente para cada espécie de parasitoide. Os modelos incluíram distribuição de erros Gamma para tempo de residência e trajetória e Poisson para mudança de direção. Para os tratamentos que mostraram efeitos significativos os valores médios de cada variável foram comparados utilizando teste de contrastes. Para os testes com chance de escolha, a proporção do tempo em cada área foi avaliada com teste Z de proporções. O teste foi aplicado considerando a proporção do tempo de residência numa das áreas de experimentação contrastando-os com a hipótese de não preferência (distribuição do tempo de residência igual (50%) em cada área). O teste foi aplicado separadamente para cada parasitoide e para cada combinação de tratamentos. Os dados referentes à trajetória e a mudança de direção do parasitoide

sobre a arena foram comparados entre os tratamentos utilizando GLM com distribuição de erros binomial. Todas as análises foram realizadas utilizando o software R (R Development Core Team, 2010).

A concentração total dos compostos por espécie foi obtida a partir de modelos lineares generalizados (GLM) com análise de deviança e distribuição de erros binomial utilizando o software R (R Development Core Team, 2010).

## RESULTADOS

### **Análises químicas**

As análises químicas dos extratos dos rastros de *E. heros*, *D. melacanthus* e *N. viridula*, mostraram a presença de 40 compostos no total, sendo eles da classe dos alcenos, alcenos metilados, alcanos metilados, álcoois de cadeia longa, terpenos e principalmente alcanos lineares (Katzav-Gozansky, 2003). Foram identificadas diferenças qualitativas entre as amostras dos rastros dos percevejos (Tabela 3), observando-se 28, 21 e 22 compostos nos extratos de *E. heros*, *D. melacanthus* e *N. viridula*, respectivamente. Os compostos pentadecanal, octadecano, hexadecanal, heneicosanal, pentacosadieno, 2-metilhexacosano, heptacosadieno, heptacoseno e 11-metilpentatriacontano foram encontrados apenas nos extratos dos rastros de *E. heros*. Os compostos 3-metil heptacosano, 2-metil heptacosano e 3-metil octacosano foram identificados somente em rastros de *D. melacanthus*. Os compostos heneicosano, 1-octacoseno, nonacosatrieno, 1-triaconteno, tritriaconteno, pentatriaconteno e pentariacontano foram exclusivos dos extratos de *N. viridula*.

Os compostos majoritários dos extratos de *E. heros* foram o pentacosadieno, pentacosano, heptacosano e nonacosadieno. Os compostos majoritários dos extratos de

*D. melacanthus* foram o heptacosano, octacosano, nonacosadieno e nonacosano. Os compostos majoritários de *N. viridula* foram o nonacosano e hentriacontano.

A análise quantitativa foi realizada apenas entre os extratos de *E. heros* e *D. melacanthus*. A quantidade total dos compostos encontrados nesses extratos foi significativamente diferente ( $\chi$ : 15,92;  $P < 0,001$ ) (Figura 23). A quantidade de cada composto também foi diferente nos rastros destas duas espécies. *D. melacanthus* depositou uma quantidade maior de alguns compostos em relação ao percevejo *E. heros* (Tabela 4).

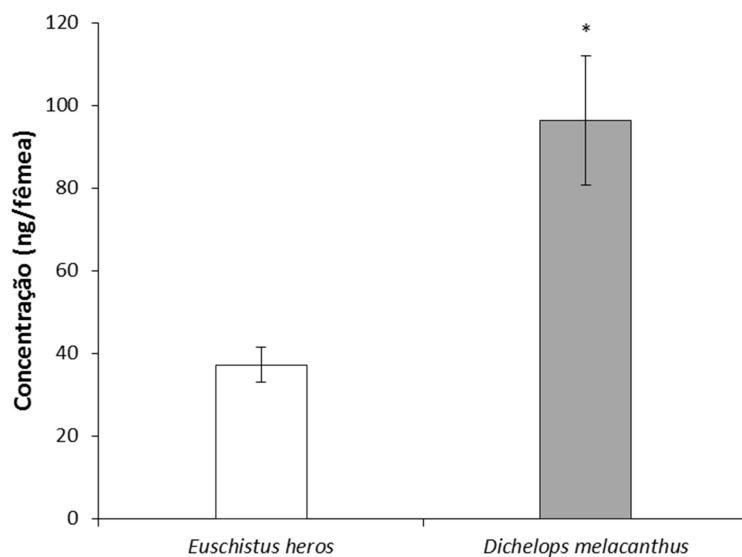


**Tabela 1.** Compostos identificados nos extratos obtidos a partir dos rastros de fêmeas de *Euschistus heros*, *Dichelops melacanthus* e *Nezara viridula*. Estão identificados na tabela o índice de retenção calculado (IR calculado), o índice de retenção encontrado na literatura (IR literatura), e a presença dos compostos em cada espécie de percevejos (+)

n°	Compostos	IR calculado	IR literatura	Espécies		
				<i>E. heros</i>	<i>D. melacanthus</i>	<i>N. viridula</i>
1	Pentadecanal	1512	1513	+		
2	Octadecano	1800	1800	+		
3	Hexadecanal	1819	1819	+		
4	Nonadecano	1902	1900	+		+
5	Docosano	2196	2200	+	+	
6	Heneicosanal	3240	2342	+		
7	Heneicosano	2099	2100			+
8	Tricosano	2300	2300	+	+	
9	Tetracosano	2401	2400	+	+	+
10	Pentacosadieno	2531	2531	+		
11	Pentacoseno	2485	2488	+	+	+
12	Pentacosano	2501	2500	+	+	+
13	2-Metil hexacosano	2657	2656	+		
14	Hexacosano	2601	2600	+	+	+
15	3-Metil heptacosano	2773	2773		+	
16	2-Metil heptacosano	2762	2761		+	
17	Heptacosadieno	2673	2673	+		
18	Heptacoseno	2686	2688	+		
19	Heptacosano	2702	2700	+	+	+
20	13-Metil heptacosano	2732	2733	+		+
21	3-Metil octacosano	-	2869		+	
22	2-Metil octacosano	2857	2857	+	+	
23	1-Octacoseno	-	2791			+
24	Octacosano		2800	+	+	+
25	Esqualeno	2817	2818	+	+	
26	Nonacosadieno	2876	2876	+	+	
27	Nonacosatrieno	-	2919			+
28	Nonacosano	2902	2900	+	+	+
29	1-Triaconteno		2975			+
30	Triacontano	3002	3000	+	+	+
31	Hentriacontadieno	-	-	+	+	
32	Hentriaconteno	3085	3085	+	+	
33	Hentriacontano	3102	3100	+	+	+
34	Dotriacontano	3200	3200	+	+	+
35	Tritriaconteno	-	3271			+
36	Tritriacontano	3301	3300	+	+	+
37	Tetratriacontano	3400	3400		+	+
38	11-Metil pentatriacontano	-	3533	+		
39	Pentatriaconteno	-	-			+
40	Pentariacontano	-	3500			+

**Tabela 2.** Quantidades dos compostos presentes em rastros de fêmeas de *Euschistus heros* e *Dichelops melacanthus*. Estão identificados na tabela a quantidade média dos compostos em ng/inseto (Média ± Desvio padrão) e os compostos identificados (CG-FID acoplado ao espectrômetro de massas; coluna DB-5)

Compostos	Quantidade (ng/inseto)	
	<i>Euschistus heros</i>	<i>Dichelops melacanthus</i>
Pentadecanal	5,20 ± 3,02	-
Octadecano	13,06 ± 18,22	-
Hexadecanal	22,83 ± 10,30	-
Nonadecano	61,24 ± 26,33	-
Docosano	4,70 ± 5,54	7,98 ± 7,28
Heneicosanal	30,49 ± 59,29	-
Tricosano	16,66 ± 4,76	27,87 ± 13,80
Tetracosano	11,93 ± 5,02	57,52 ± 64,11
Pentacosadieno	27,38 ± 5,89	-
Pentacoseno	22,30 ± 9,07	-
Pentacosano	74,96 ± 23,90	104,28 ± 115,98
2-Metil hexacosano	15,95 ± 4,86	-
Hexacosano	44,99 ± 61,40	166,54 ± 183,93
3-Metil heptacosano	-	151,10 ± 173,08
2-Metil heptacosano	-	20,51 ± 34,29
Heptacosadieno	73,58 ± 29,50	-
Heptacoseno	32,35 ± 9,72	-
Heptacosano	56,64 ± 20,32	104,06 ± 107,11
13-Metil heptacosano	17,42 ± 11,41	-
3-Metil octacosano	-	109,62 ± 245,12
2-Metil octacosano	34,11 ± 19,73	97,64 ± 74,74
Octacosano	32,00 ± 27,32	82,24 ± 67,59
Esqualeno	32,00 ± 27,32	62,08 ± 20,86
Nonacosadieno	227,50 ± 101,52	670,94 ± 216,93
Nonacosano	101,87 ± 56,64	108,11 ± 124,81
Triacontano	9,21 ± 4,46	58,34 ± 82,82
Hentriaconteno	2,10 ± 2,01	54,22 ± 116,48
Hentriacontano	28,33 ± 15,62	102,12 ± 40,45
Dotriacontano	2,87 ± 2,16	24,79 ± 21,32
Tritriacontano	4,08 ± 4,36	13,02 ± 10,21
Tetratriacontano	-	0,84 ± 1,07



**Figura 23.** Análise quantitativa da quantidade total (ng/fêmea) dos compostos encontrados nos extratos dos rastros de *Euschistus heros* e *Dichelops melacanthus*. As barras representam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão. \* indicam diferenças significativas entre os tratamentos pela análise de GLM com modelo de distribuição binomial negativa ( $P < 0,001$ ).

## Bioensaios

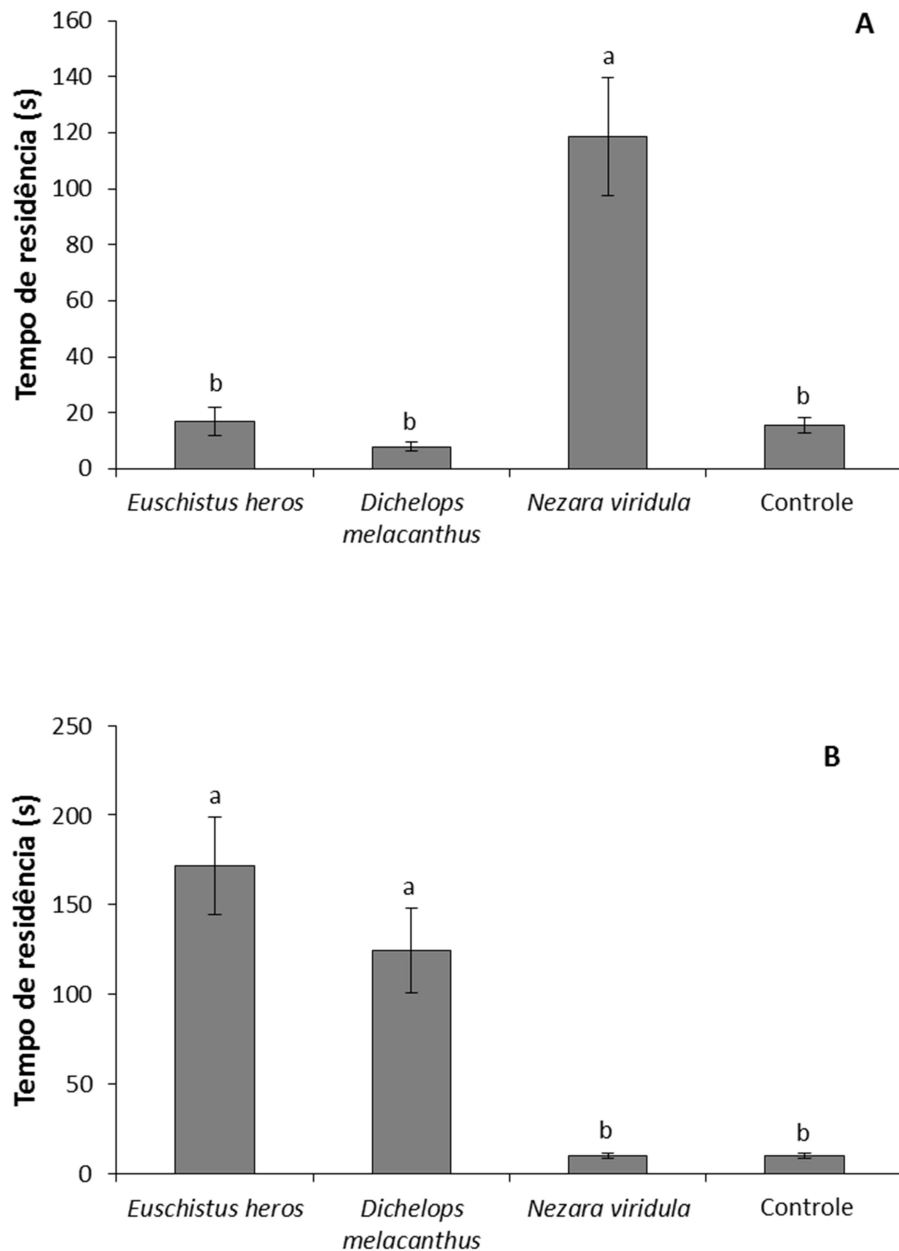
### *Teste sem chance de escolha*

*Trissolcus basalis* permaneceu mais tempo sobre os rastros de *N. viridula*, havendo diferenças significativas entre esse tratamento e os demais ( $F = 30,386$ ;  $gl = 3-150$ ;  $P < 0,001$ ). Adicionalmente, não houve diferenças significativas entre o tempo médio de residência dos demais tratamentos entre si (Figura 17). Os diferentes tratamentos afetaram significativamente o tempo médio de residência do parasitoide *Te. podisi* ( $F=70,602$ ;  $gl = 3-157$ ;  $P < 0,001$ ). Os parasitoides ficaram significativamente mais tempo sobre os rastros de *E. heros* e *D. melacanthus*. Ambos os tratamentos não diferiram entre si, mas foram significativamente diferentes do tratamento com rastros de *N. viridula* e do controle (Figura 17).

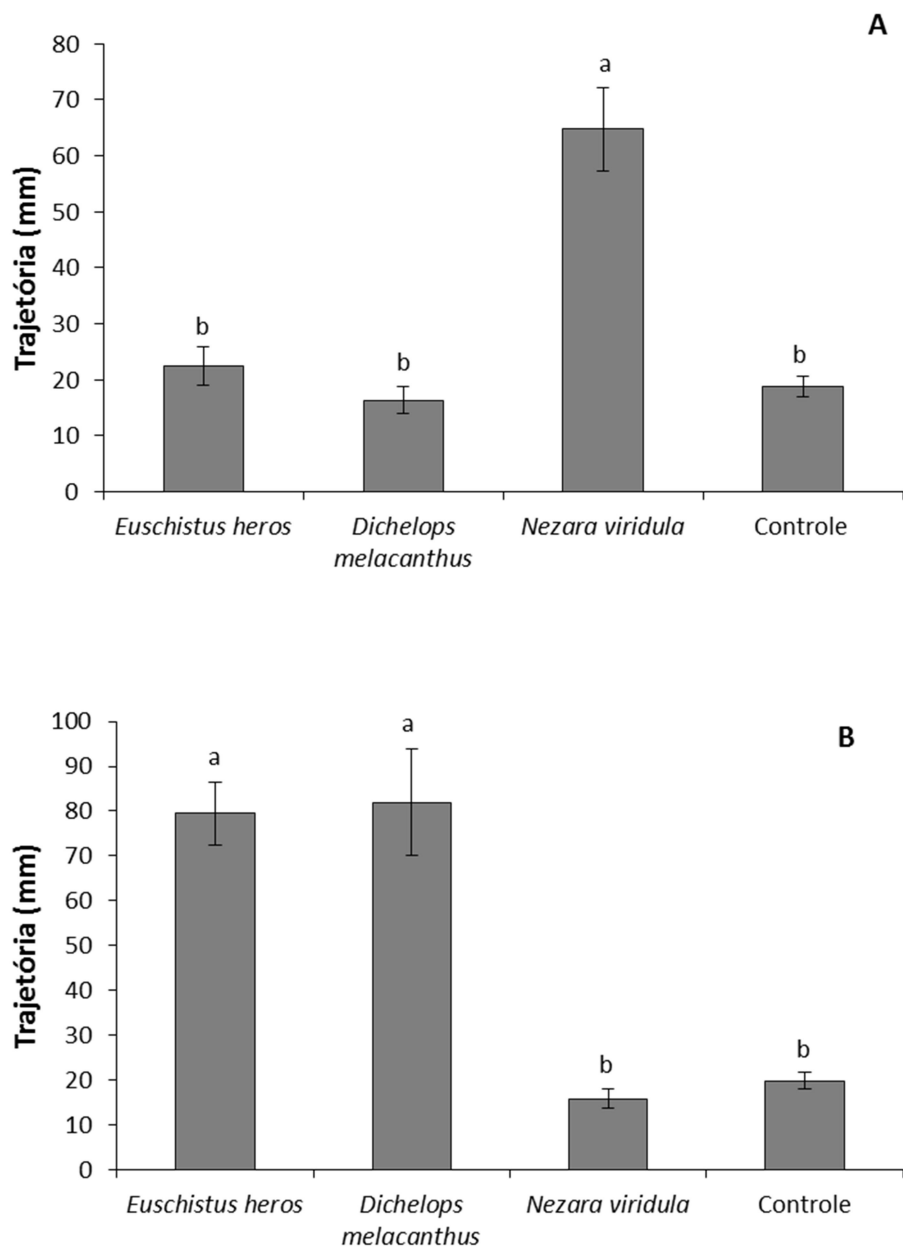
A distância (trajetória) percorrida pelos parasitoides *Tr. basalis* e *Te. podisi* em extratos de rastros de diferentes percevejos diferiram significativamente ( $F = 27,066$ ;  $gl = 3-150$ ;  $P < 0,001$  para *Tr. basalis* e  $F = 85,353$ ;  $gl = 3-157$ ;  $P < 0,001$  para *T. podisi*). *Trissolcus basalis* apresentou uma trajetória maior em rastros de *N. viridula* em relação aos demais tratamentos (Figura 18). O parasitoide *Te. podisi* percorreu a mesma distância sobre os rastros de *E. heros* e *D. melacanthus*, não havendo diferenças significativas entre ambos tratamentos. Porém, houve diferenças significativas destes dois tratamentos em relação ao controle e ao rastro de *N. viridula* (Figura 18).

O número médio de mudanças de direção por segundo diferiu significativamente entre os tratamentos em relação ao percurso de *Tr. basalis* ( $\chi = 408,230$ ;  $gl = 3-150$ ;  $P < 0,001$ ), e de *Te. podisi* ( $\chi = 352,670$ ;  $gl = 3-157$ ;  $P < 0,001$ ). A mudança de direção de *Tr. basalis* foi significativamente maior sobre os rastros de *D. melacanthus*, e menor sobre os rastros de *E. heros*, sobre o controle e principalmente sobre os rastros de *N. viridula* (Figura 19). A mudança de direção no percurso de *Te. podisi* foi

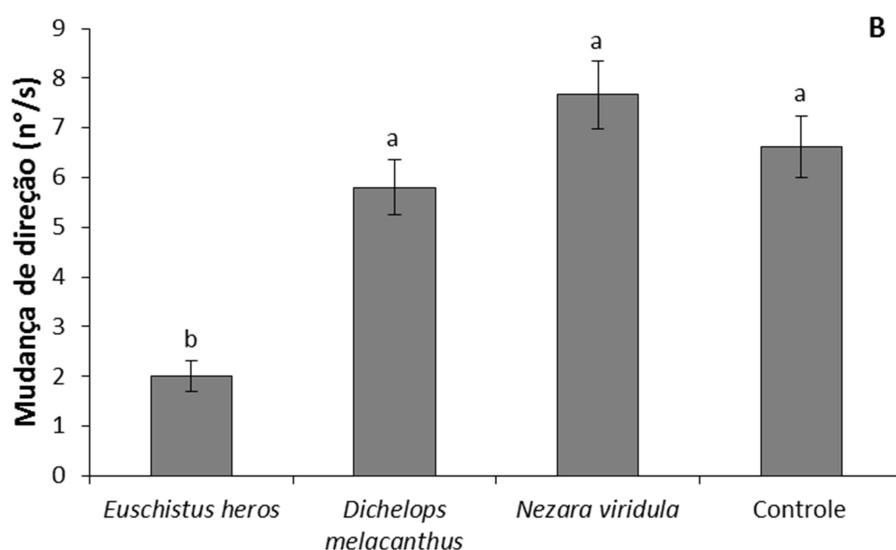
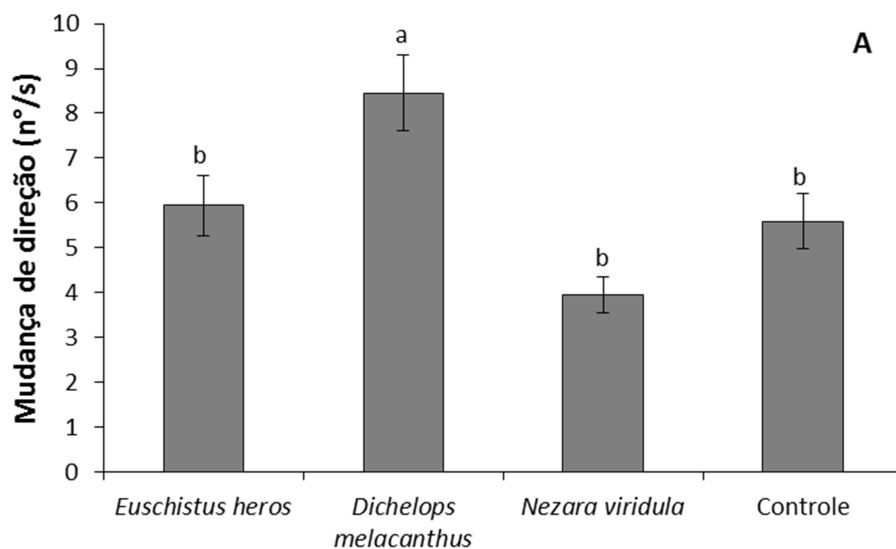
significativamente maior sobre os rastros de *N. viridula* e menor sobre os rastros de *D. melacanthus*, sobre o controle e principalmente sobre os rastros *E. heros* (Figura 19).



**Figura 17.** Tempo de residência do movimento dos parasitoides *Trissolcus basalidis* (A) e *Telenomus podisi* (B) em áreas tratadas com o extrato dos rastros de três espécies de percevejos e não tratadas (controle). As barras representam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão. Médias seguidas das mesmas letras não diferiram significativamente pela análise de contraste ( $P > 0,05$ ).



**Figura 18.** Trajetória do movimento dos parasitoides *Trissolcus basalis* (A) e *Telenomus podisi* (B) em áreas tratadas com rastros de três espécies de percevejos e não tratadas (controle). As barras representam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão. Médias seguidas das mesmas letras não diferiram significativamente pela análise de contraste ( $P > 0,05$ ).



**Figura 19.** Mudança de direção do movimento dos parasitoides *Trissolcus basalis* (A) e *Telenomus podisi* (B) em áreas tratadas com rastros de três espécies de percevejos e não tratadas (controle). As barras representam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão. Médias seguidas das mesmas letras não diferiram significativamente pela análise de contraste ( $P > 0,05$ ).



### *Teste com chance de escolha*

*Trissolcus basalis* não mostrou discriminação entre rastros de *E. heros* versus *D. melacanthus* já que não foram observadas diferenças significativas para o tempo de residência ( $Z=0,876$ ; 1 g.l.;  $P=0,190$ ) (Figura 20), trajetória ( $\chi= 1,862$ ; g.l.=1-59;  $P=0,172$ ) (Figura 21), e mudança de direção ( $\chi=0,235$ ; g.l.=1-59;  $P=0,627$ ) nos trajetos do parasitoide em áreas tratadas com extratos de ambas as espécies de percevejos (Figura 22).

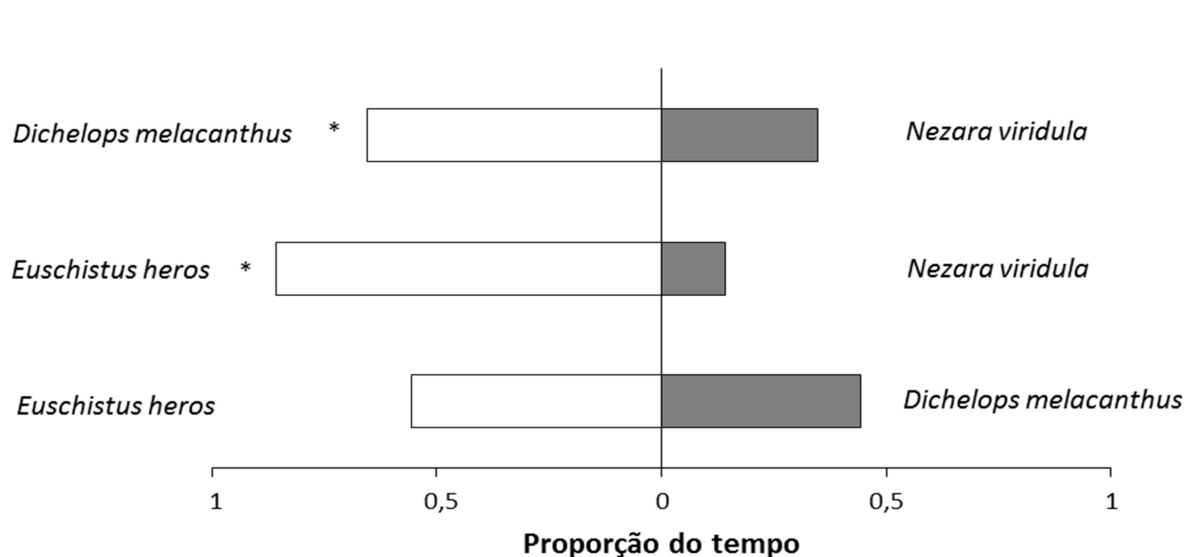
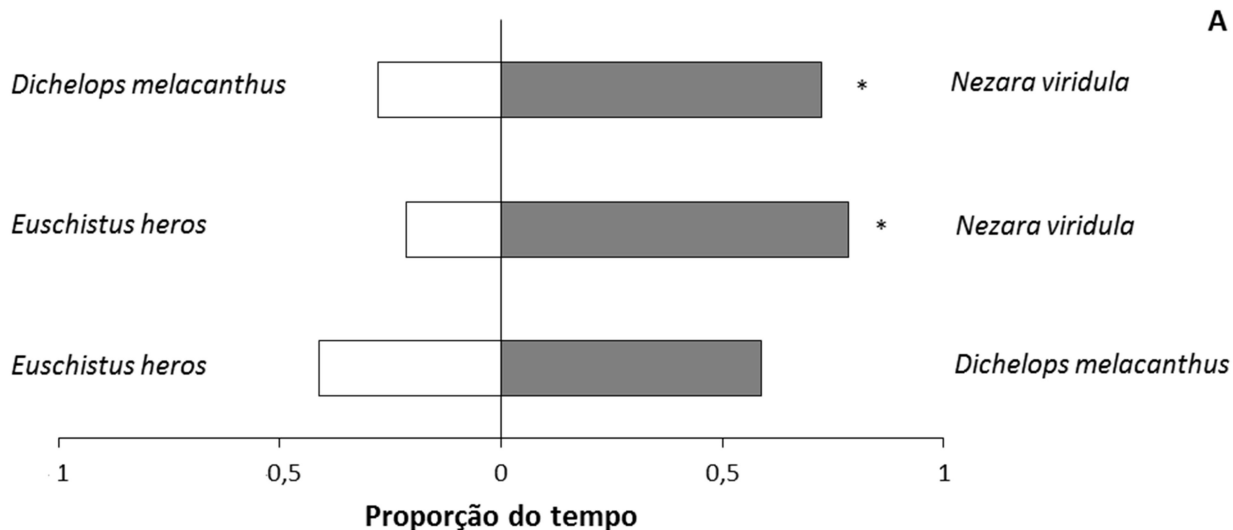
Ao contrastar extratos de rastros de *N. viridula* versus *D. melacanthus* o parasitoide *Tr. basalis* mostrou tempo de residência ( $Z=2,369$ ; 1 g.l.;  $P=0,008$ ) e trajetória ( $\chi = 10,722$ ; g.l.=1-57;  $P= 0,001$ ) significativamente maiores sobre os rastros de *N. viridula* (Figura 20 e 21). No entanto, em rastros de *D. melacanthus* o número de mudanças de direção foi significativamente maior ( $\chi= 5,872$ ; g.l.=1-57;  $P= 0,01$ ) (Figura 22).

Quando contrastados os tratamentos *N. viridula* versus *E. heros* o parasitoide *Tr. basalis* passou significativamente mais tempo sobre os extratos de rastros de *N. viridula* ( $Z=3,118$ ; 1 g.l.;  $P<0,001$ ) e sua trajetória também foi significativamente maior sobre extratos desta espécie ( $\chi= 12,324$ ; g.l.=1-61;  $P<0,001$ ) (Figuras 20 e 21). Não houve diferenças significativas entre os dois tratamentos para a variável mudança de direção ( $\chi= 3,409$ ; g.l.=1-61;  $P=0,064$ ) (Figura 22).

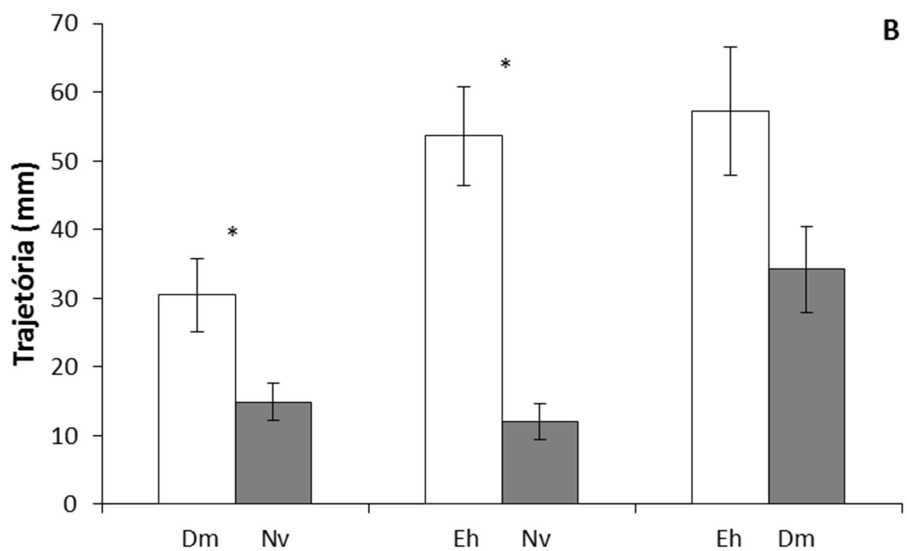
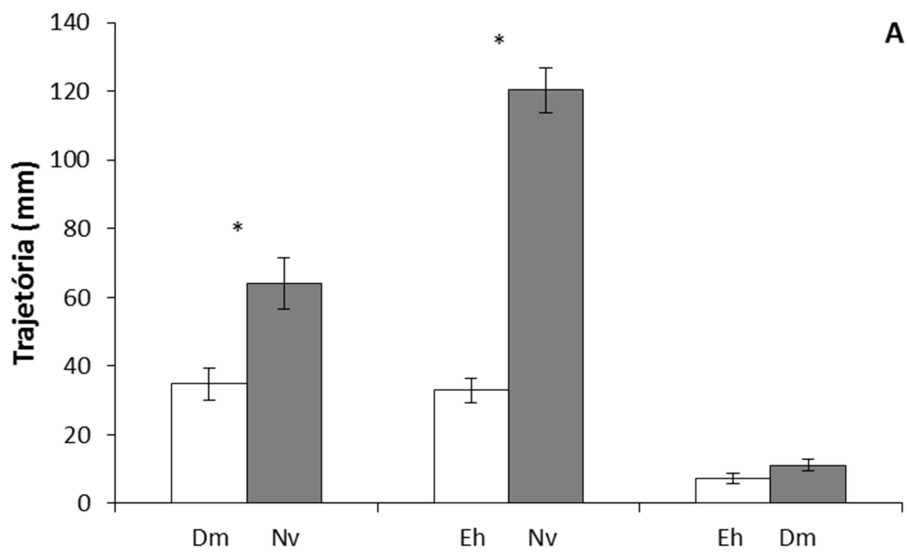
*Te. podisi* não discriminou extratos de rastros de *E. heros* quando contrastados com extratos de *D. melacanthus* (tempo de residência:  $Z=0,624$ ; 1 g.l.;  $P=0,266$ , trajetória:  $\chi= 3,070$ ; g.l.=1-77;  $P=0,079$  e mudança de direção:  $\chi= 0,315$ ; g.l.=1-77;  $P=0,574$ ) do parasitoide *Te. podisi* frente ao tratamento dos rastros de *E. heros* versus *D. melacanthus* (Figuras 20, 21 e 22).

O tempo de residência ( $Z=4,021$ ; 1 g.l.;  $P<0,001$ ) e a trajetória ( $\chi= 27,611$ ; g.l.=1-63;  $P<0,001$ ) do parasitoide *Te. podisi* foram significativamente maiores sobre rastros de *E. heros* em relação a rastros de *N. viridula* (Figuras 20 e 21). Não houve diferença significativa entre os tratamentos quando avaliada a mudança de direção dos parasitoides ( $\chi= 1,607$ ; g.l.=1-63;  $P=0,204$ ) (Figura 22).

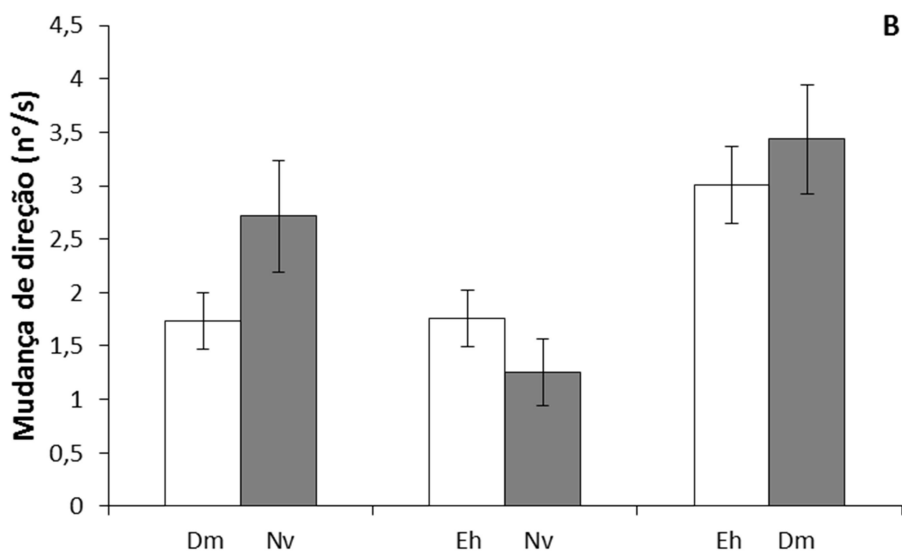
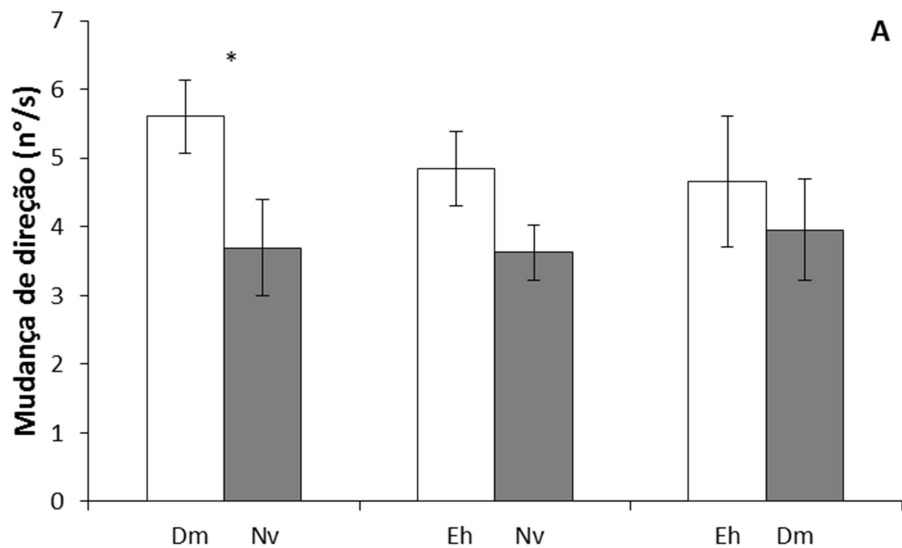
Houve diferença significativa quanto ao tempo de residência do parasitoide *T. podisi* frente aos extratos de rastros de *N. viridula* versus *D. melacanthus* ( $Z= 1,643$ ; 1 g.l.;  $P= 0,05$ ) (Figura 20), assim como para a variável trajetória ( $\chi= 5,444$ ; g.l.=1-59;  $P=0,019$ ) (Figura 21). No entanto, não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto a mudança de direção do parasitoide ( $\chi= 3,197$ ; g.l.=1-59;  $P=0,073$ ) (Figura 22).



**Figura 20.** Proporção do tempo de residência do movimento dos parasitoides *Trissolcus basalis* (A) e *Telenomus podisi* (B) sobre áreas de arenas tratadas com extratos de rastros de *Dichelops melacanthus* versus *Nezara viridula*, *Euschistus heros* versus *Nezara viridula* e *Euschistus heros* versus *Dichelops melacanthus*. \* indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de estatística Z ( $P < 0,05$ ).



**Figura 21.** Trajetória (mm) do movimento dos parasitoides *Trissolcus basalidis* (A) e *Telenomus podisi* (B) sobre áreas de arenas tratadas com extratos de rastros de *Dichelops melacanthus* versus *Euschistus heros* (Dm vs. Eh), *Nezara viridula* versus *Dichelops melacanthus* (Nv vs. Dm) e *Nezara viridula* versus *Euschistus heros* (Nv vs. Eh). As barras representam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão. \* indicam diferenças significativas entre os tratamentos pela análise de GLM ( $P < 0,05$ ).



**Figura 22.** Mudança de direção (número/s) do movimento dos parasitoides *Trissolcus basalis* (A) e *Telenomus podisi* (B) sobre áreas de arenas tratadas com extratos de rastros de *Dichelops melacanthus* versus *Euschistus heros* (Dm vs. Eh), *Nezara viridula* versus *Dichelops melacanthus* (Nv vs. Dm) e *Nezara viridula* versus *Euschistus heros* (Nv vs. Eh). As barras representam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão. \* indicam diferenças significativas entre os tratamentos pela análise de GLM ( $P < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

Os bioensaios realizados com extratos dos rastros de percevejos corroboram os resultados obtidos em bioensaios com rastros naturais (Capítulo 1). Assim como o observado para rastros naturais, as respostas de ambos os parasitoides foram seletivas. *Trissolcuss basalis* respondeu seletivamente a rastros de *N. viridula*, seu hospedeiro preferencial. *Te. podisi* também discriminou os hospedeiros respondendo preferencialmente a extratos de rastros de *E. heros* e *D. melacanthus*. Segundo a hipótese de trabalho a predição de que *Te. podisi* seria significativamente mais estimulado pelos extratos de rastros de seu hospedeiro preferencial em comparação aos rastros de outros percevejos pentatomídeos foi corroborada parcialmente. Os experimentos realizados, com e sem chance de escolha, mostraram que este parasitoide é menos seletivo que *Tr. basalis*, forrageando igualmente sobre rastros de *E. heros* e *D. melacanthus*. Apesar dos comportamentos similares de *Te. podisi* em rastros *E. heros* e *D. melacanthus* observaram-se diferenças quantitativas e qualitativas na composição química dos rastros de ambas as espécies.

A comparação da composição dos extratos de rastros indica que rastros de *E. heros* possuem uma variedade maior de compostos em relação aos rastros de *D. melacanthus*, embora nesta espécie as quantidades total e individual dos compostos (medida em ng/inseto) em comum seja maior. Adicionalmente, dentre os compostos majoritários encontrados nos rastros das duas espécies apenas o Nonacosadieno é compartilhado.

Os resultados sugerem que a habilidade de discriminar os rastros de diferentes espécies de percevejos pode ser influenciada pelas diferenças quali e quantitativas da composição química dos rastros. Esse resultado é relevante não apenas por relacionar as diferenças na composição química dos rastros ao comportamento dos parasitoides,

mas também por ser o primeiro trabalho que sugere a identificação e as diferenças constituintes entre os rastros/cutícula dessas duas espécies de percevejos.

O nonacosano e o hentriacontano foram os compostos majoritários encontrados nos rastros de *N. viridula*, assim como observado por Colazza et al. (2007) e LoGiudice et al. (2011), respectivamente. No entanto, os compostos tritriacontano, tetracontano, tricosano, docosano, heneicosano, pentaconseno, 13-metilheptacosano, 1-octacoseno, nonacosatrieno, 1-triaconteno, tritriaconteno, pentatriaconteno e pentariacontano, não foram identificados por Colazza et al. (2007) durante as análises dos compostos encontrados nos tarsos e cutículas dissecadas de fêmeas e machos de *N. viridula*. Estas diferenças sugerem que os diferentes métodos de obtenção dos extratos podem influenciar a composição dos extratos de hidrocarbonetos cuticulares o que deve ser considerado em trabalhos futuros.

*Nezara viridula* apresentou diferenças na composição dos rastros em comparação aos das outras duas espécies avaliadas. No entanto, o número de amostras obtidas para esta espécie foi muito inferior ao obtido para as demais, o que inviabilizou a realização dos cálculos de concentração detalhada e sua comparação entre os rastros de *E. heros* e *D. melacanthus*. Encontrou-se nas amostras de *E. heros* e *N. viridula* o composto Nonadecano ( $nC_{19}$ ) em baixa concentração. Relatos anteriores indicam que este hidrocarboneto foi encontrado somente em machos de *N. viridula* e que seria a principal pista que permite a discriminação entre rastros de machos e fêmeas observada em *Tr. basalis*, que forrageia preferencialmente em rastros de fêmeas deste percevejo (Colazza et al. 2007). Os autores também observaram que a concentração total dos compostos encontrados nos extratos de fêmeas é duas vezes maior do que o encontrado para machos de *N. viridula*, o que sugere que, além de compostos específicos, a

discriminação dos sexos dos hospedeiros através dos rastros aconteça principalmente pela acentuada diferença entre as concentrações dos extratos de machos e fêmeas.

No caso da discriminação entre rastros de diferentes espécies os resultados apresentados aqui sugerem que a discriminação pode ser mais complexa e influenciada pela composição geral dos rastros e não por um composto simplesmente. No entanto, para confirmar esta hipótese experimentos com rastros artificiais formados com diferentes combinações dos hidrocarbonetos encontrados nas diferentes espécies devem ser conduzidos.

Assim como observado para os Platygasteridae, parasitoides de outras famílias também se guiam por rastros de hospedeiros. Por exemplo, o parasitoide *Cephalonomia tarsalis* (Ashmead) (Hymenoptera: Bethyridae) é atraído pelos rastros do seu hospedeiro, o besouro *Oryzaephilus surinamensis* (Linnaeus) (Collatz et al., 2008). Assim como, o parasitoide *Poecilostictus cothurnatus* (Gravenhorst) (Hymenoptera: Ichneumonidae) é atraído pelos rastros liberados pela cutícula das lagartas de *Bupalus piniarius* (Linnaeus) (Klomp, 1980). Rostás et al. (2008; 2009) verificaram a atratividade do parasitoide *Cotesia marginiventris* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae) pelos rastros da lagarta de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith).

Os hidrocarbonetos encontrados nos rastros de *E. heros*, *D. melacanthus* e *N. viridula* são compartilhados com muitas outras espécies de seres vivos. Por exemplo, o composto majoritário dos rastros de *E. heros* e *D. melacanthus* é também constituinte dos hidrocarbonetos cuticulares de operárias de *Melipona marginata* (Lepeletier) (Ferreira-Caliman et al., 2010), dos hidrocarbonetos cuticulares do vaga-lume asiático *Lucidina biplagiata* e do norte americano *Photuris lucicrescens* (Barber) (Shibue et al., 2004). Esse hidrocarboneto também é encontrado nas algas unicelulares *Emiliania huxleyi* (Lohmann) e *Gephyrocapsa oceanica* (Kamptner) (Nakamura et al., 2015). O



composto nonacosano, que é o mais abundante nos rastros de *N. viridula* é encontrado no óleo essencial de *Marrubium anisodon* (K.Koch) (Kırimer et al., 2015), e de sementes de *Aerva javanica* (Burm.f) (Samejo et al., 2013). Também está presente nos hidrocarbonetos cuticulares dos casulos de sarcófágides (Vianna Braga et al., 2013). Estes dados reforçam a hipótese de que a composição específica dos compostos (diversidade de compostos e suas quantidades) é o que determina a especificidade do estímulo e a sua discriminação pelos parasitoides de ovos.

Alguns dos compostos mais comuns encontrados na cutícula lipídica de plantas são os alcanos (Kolattukudy et al., 1974). Estes, são os compostos mais abundantes nas folhas de soja (*Glycine max* L.), sendo predominantemente constituídos por heptacosano, nonacosano, hentriacontano e tritriacontano (Kim et al., 2007). Estes compostos são também encontrados em flores de feijão fava (*Vicia faba* L.) (Kolattukudy et al., 1974), e grãos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) (Rizk et al., 1992). Os alcanos mencionados foram encontrados nos rastros/cutícula de *E. heros*, *D. melacanthus* e *N. viridula*. Essas plantas são hospedeiras e parte da dieta de muitos percevejos pentatomídeos. De acordo com Blomquist e Jackson (1973) os hidrocarbonetos da dieta podem ser incorporados à cutícula dos insetos, ainda que os insetos sintetizem a maioria dos seus hidrocarbonetos cuticulares (Nelson e Blomquist, 1995).

Os resultados obtidos indicam que, similarmente ao observado nos experimentos com rastros naturais de percevejos (Capítulo 1), os parasitoides *Tr. basalis* e *Te. podisi* reconheceram e discriminaram extratos de rastros. Este comportamento parece ser influenciado pelas diferenças na composição química dos rastros de cada espécie de percevejo estudada. Assim, este mecanismo permitiria ao parasitoide forragear mais intensivamente em áreas onde a probabilidade de encontrar hospedeiros, que

maximizem seu sucesso reprodutivo, é maior. A compreensão das etapas de forrageamento, entender como os estímulos químicos influenciam o comportamento dos parasitoides e principalmente conhecer a constituição desses semioquímicos, podem ser importantes tecnologias agregadas às práticas do Manejo Integrado de Pragas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baker, G.L.; Vroman, H.E.; Padmore, J. Hydrocarbons of the American cockroach. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.13, n.5, p.360–365, 1963.

Bin, F.; Vinson, S.B.; Strand, M.R.; Colazza, S.; Jones Jr, W.A. Source of an egg kairomone for *Trissolcus basalus*, a parasitoid of *Nezara viridula*. **Physiological Entomology**. v.18, p.7–15, 1993.

Blomquist, G.J.; Jackson, L.L. Incorporation of labelled dietary *n*-alkanes into cuticular lipids of the grasshopper *Melanoplus sanguinipes*. **Journal of Insect Physiology**. v.19, n.8, p.1639–1647, 1973.

Blomquist, G.J.; Nelson, D.R.; Renobales, M. Chemistry, Biochemistry, and Physiology of Insect Cuticular Lipids. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. v.6, p.227–265, 1987.

Blomquist, G.J e Bagnères, A.G. Introduction: history and overview of insect hydrocarbons. Em: Blomquist, G.J e Bagnères, A.G. **Insect Hydrocarbons. Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology**. Cambridge: Cambridge University Press. p.3–18, 2010.

Borges, M.; Costa, M.L.M.; Sujii, E.R.; Cavalcanti M.G.; Redígolo, G.F.; Resck, I.S.; Vilela, E.F. Semiochemical and physical stimuli involved in host recognition by *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae) toward *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). **Physiological Entomology**. v.24, 227–233, 1999.

Borges, M.; Colazza, S.; Ramirez-Lucas, P.; Chauhan, K.R.; Moraes, M.C.B.; Aldrich, J.R. Kairomonal effect of walking traces from *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae) on two strains of *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae). **Physiological Entomology**. v.28, n.4, p.349–355, 2003.

Braga, M.V. Pinto, Z.T.; Queiroz, M.M.C.; Matsumoto, N.; Blomquist, G.J. Cuticular hydrocarbons as a tool for the identification of insect species: Puparial cases from Sarcophagidae. **Acta Tropica**. v.128, n.3, p.479–485, 2013.

Colazza, S.; Salerno, G.; Wajnberg, E. Volatile and contact chemicals released by *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae) have a kairomonal effect on the egg

parasitoid *Trissolcus basalis* (Hymenoptera: Scelionidae). **Biological Control**. v.16, n.3, p.310–317, 1999.

Colazza, S.; Aquila, G.; De Pasquale, C.; Peri, E.; Millar, J.G. The egg parasitoid *Trissolcus basalis* uses *n*-nonadecane, a cuticular hydrocarbon from its stink bug host *Nezara viridula*, to discriminate between female and male hosts. **Journal of Chemical Ecology**. v.33, p.1405–1420, 2007.

Colazza, S.; Lo Bue, M.; Lo Giudice, D.; Peri, E. The response of *Trissolcus basalis* to footprint contact kairomones from *Nezara viridula* females is mediated by leaf epicuticular waxes. **Naturwissenschaften**. v.96, p.975–981, 2009.

Collatz, J.; Steidle, J.L.M. Hunting for moving hosts: *Cephalonomia tarsalis*, a parasitoid of free-living grain beetles. **Basic and Applied Ecology**. v.9, n.4, p.452–457, 2008.

Conti, E.; Salerno, G.; Bin, F.; Williams, H.J.; Vinson, S.B. Chemical cues from *Murgantia histrionica* eliciting host location and recognition in the egg parasitoid *Trissolcus brochymenae*. **Journal of Chemical Ecology**. v.29, n.1, p.115–130, 2003.

Conti, E.; Salerno, G.; Bin, F.; Vinson, S.B. The role of host semiochemicals in parasitoid specificity: a case study with *Trissolcus brochymenae* and *Trissolcus simoni* on pentatomid bugs. **Biological Control**. v.29 p.435–444, 2004.

Diehl, P.A. Synthesis and release of hydrocarbons by the oenocytes of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. **Journal of Insect Physiology**. v.21, n.6, p.1237–1246, 1975.

Fan, Y.; Zurek, L.; Dykstra, M.J.; Schal, C. Hydrocarbon synthesis by enzymatically dissociated oenocytes of the abdominal integument of the German Cockroach, *Blattella germanica*. **Naturwissenschaften**. v.90, n.3, p.121–126, 2003.

Ferreira-Caliman, M.J.; Nascimento, F.S.; Turatti, I.C.; Mateus, S.; Lopes, N.P.; Zucchi, R. The cuticular hydrocarbons profiles in the stingless bee *Melipona marginata* reflect task-related differences. **Journal of Insect Physiology**. v.56, n.7, p.800–804, 2010.

Frati, F.; Salerno, G.; Conti, E. Cabbage waxes affect *Trissolcus brochymenae* response to short-range synomones. **Insect Science**. v.20, p.753–762, 2013.

Hadley, N.F. Cuticular lipids of terrestrial plants and arthropods: a comparison of their structure, composition, and waterproofing function. **Biological Reviews**. v.56, n.1, p.23–47, 1981.

Jackson, L.L.; Baker, G.L. Cuticular lipids of insects. **Lipids**. v.5, n.2, p.239–246, 1970.

Jorge, L.A.C.; Laumann, R.; Borges, M.; Moraes, M.C.B.; Cruz, R.A.; Milare, B.N.; Palhares, L. Software para avaliação do comportamento de insetos. **Embrapa Instrumentação Agropecuária**. n.30, p.01–07, 2005.

Katzav-Gozansky, T.; Soroker, V.; Kamer, J.; Schulz, C.M.; Francke, W.; Hefetz, A. Ultrastructural and chemical characterization of egg surface of honeybee worker and queen-laid eggs. **Chemoecology**. v.13, n.3, p.129–134, 2003.

Kim, K.S.; Park, S.H.; Kim, D.K.; Jenks, M.A. Influence of water deficit on leaf cuticular waxes of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). **International Journal of Plant Sciences**. v.168, n.3, p.307–316, 2007.

Klomp, H. Parasitic Wasps as Sleuthhounds Response of an Ichneumon Wasp To the Trail of Its Host. **Netherlands Journal of Zoology**. v.31, n.4, p.762–772, 1980.

Kolattukudy, P.E.; Croteau, R.; Brown, L. Structure and Biosynthesis of Cuticular Lipids. Hydroxylation of palmitic acid and decarboxylation of C<sub>28</sub>, C<sub>30</sub>, and C<sub>32</sub> acids in *Vicia faba* flowers. **Plant Physiology**. v.54, p.670–677, 1974.

Kırimer, N.; Kürkçüoğlu, M.; Akgül, G.; Can Başer, K.H.; Mahmoud, A.A. Composition of the Essential Oil of *Marrubium anisodon* C. Koch of Turkish Origin. **Records of Natural Products**. v.9, n.2, p.234–236, 2015.

Locke, M. Permeability of Insect Cuticle to Water and Lipids. **Science**. v.147, n.3655, p.295–298, 1965.

Lo Giudice, D. Contact chemo-orientation in insect parasitoids: the case study of mate-finding in *Metaphycus luteolus* and host-finding in *Trissolcus basalus*. **Repositório Institucional da Universidade de Palermo**. 2009.

Lo Giudice, D.; Riedel, M.; Rostás, M.; Peri, E.; Colazza, S. Host Sex Discrimination by an Egg Parasitoid on Brassica Leaves. **Journal of Chemical Ecology**. v.37, p.622–628, 2011.

Nakamura, H.; Sawada, K.; Araie, H.; Suzuki, I.; Shiraiwa, Y. *n*-Nonacosadienes from the marine haptophytes *Emiliania huxleyi* and *Gephyrocapsa oceanica*. **Phytochemistry**. v.111, p.107–113, 2015.

Nelson, D.R.; Blomquist, G.J. Insect waxes. Em: Hamilton, R.J. **Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions**. Dundee: Oily Press. p.1–90, 1995.

Peri, E.; Wanjnberg, E.; Colazza, S. Effect of host kairomones and oviposition experience of an egg parasitoid. **Journal of Experimental Biology**. v.209, p.3629–3635, 2006.

Peri, E.; Frati, F.; Salerno, G.; Conti, E.; Colazza, S. Host Chemical Footprints Induce Host Sex Discrimination Ability in Egg Parasitoids. **PLoS ONE**. v.8, n.11, p.1–7, 2013.

R Development Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2010. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.Rproject.org/>.

Rizk, A.M.; Ismail, S.I.; Azzam, S.A.; Wood, G. Constituents of green beans *Phaseolus vulgaris* (lipids and flavonoids). **Qatar University Science Journal**. v.12, p.69–72, 1992.

Rostás, M.; Ruf, D.; Zabka, V.; Hildebrandt, U. Plant surface wax affects parasitoid's response to host footprints. **Naturwissenschaften**. v. 95, p.997–1002, 2008.

Rostás, M.; Wölfling, M. Caterpillar Footprints as Host Location Kairomones for *Cotesia marginiventris*: Persistence and Chemical Nature. **Journal of Chemical Ecology**. v.35, n.1, p.20–27, 2009.

Salerno, G.; Frati, F.; Conti, E.; De Pasquale, C.; Peri, E.; Colazza, S. A finely tuned strategy adopted by an egg parasitoid to exploit chemical traces from host adults. **Journal of Experimental Biology**. v.212, p.1825–1831, 2009.

Salerno, G.; Iacovone, A.; Carlin, S.; Frati, F.; Conti, E.; Anfora, G. Identification of sex pheromone components in *Trissolcus brochymenae* females. **Journal of Insect Physiology**. v.58, p.1635–1642, 2012.

Samejo, M.Q.; Memon, S.; Bhangar, M.I.; Khan, K.M. Comparison of chemical composition of *Aerva javanica* seed essential oils obtained by different extraction methods. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.26, n.4, p.757–760, 2013.

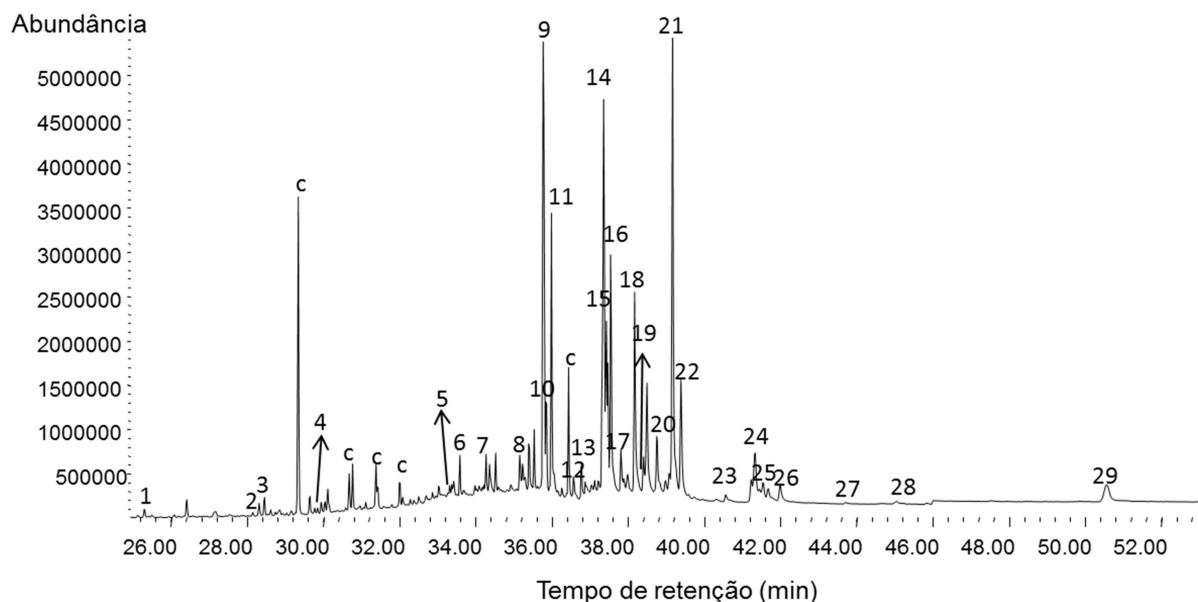
Shibue, K.; Goto, Y.; Kawashima, I.; Shibue, T. Chemical Analysis of Surface Hydrocarbons in Fireflies by Direct Contact Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Analytical Sciences**. v.20, n.12, p.1729–1731, 2004.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

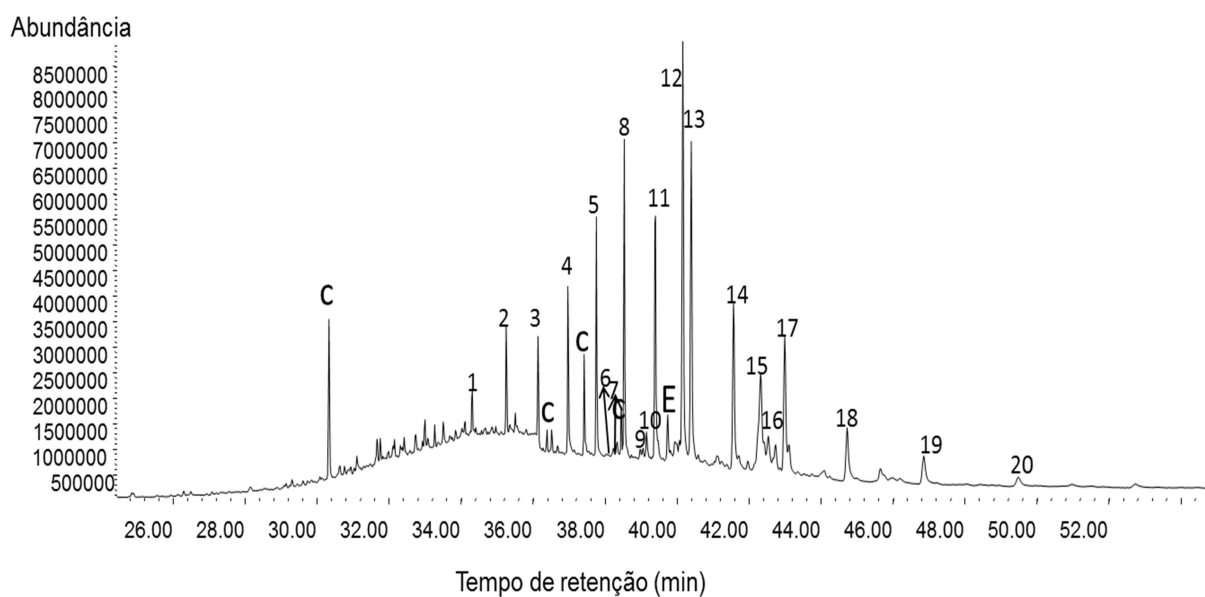
Através de estudos com rastros das três espécies de percevejo, *N. viridula*, *D. melacanthus* e *E. heros*, testando-se a atração, reconhecimento e preferência dos rastros dos hospedeiros pelas duas espécies de parasitoides *Tr. basalis* e *Te. podisi*, conclui-se que: os rastros do percevejo *N. viridula*, hospedeiro preferencial do parasitoide de ovos *Tr. basalis*, estimularam o comportamento de busca deste parasitoide, enquanto que *Te. podisi* foi estimulado pelos rastros deixados por *E. heros*, seu hospedeiro preferencial. Os resultados sugerem que os parasitoides podem reconhecer e discriminar rastros de diferentes espécies de percevejos e que esta discriminação estaria influenciada pela diferente composição química dos rastros.

Trabalhos futuros devem ser realizados a fim de analisar a influência dos rastros num contexto próximo ao natural. Contrastando-o a outros estímulos utilizados pelos parasitoides durante a busca e seleção de hospedeiros, avaliando-se a relevância do rastro entre todas as etapas do forragamento do parasitoide. Quanto à composição química dos rastros/hidrocarbonetos cuticulares, devem ser identificados quais os compostos relevantes na atratividade do parasitoide. Um futuro objetivo poderia ser a elaboração de extratos sintéticos para conduzir experimentos em campo que testem a capacidade de retenção do parasitoide em áreas de interesse, verificando-se sua influência nas taxas de parasitismo.

## APÊNDICE

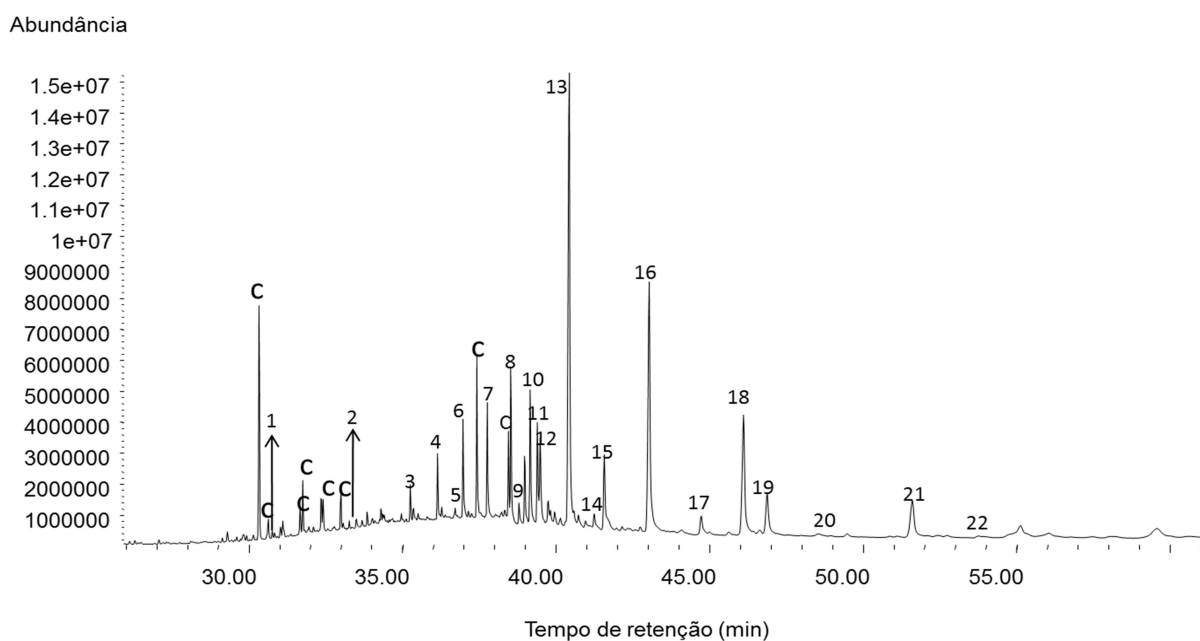


**Figura 24.** Cromatograma de compostos do extrato de rastros de 100 fêmeas de *Euschistus heros*. 1) pentadecanal, 2) octadecano, 3) hexadecanal, 4) nonadecano, 5) docosano, 6) heneicosanal, 7) tricosano, 8) tetracosano, 9) pentacosadieno, 10) pentacoseno, 11) pentacosano, 12) 2-metil-hexacosano, 13) hexacosano, 14) heptacosadieno, 15) heptacoseno, 16) heptacosano, 17) 13-metil-heptacosano, 18) 2-metil-octacosano, 19) octacosano, 20) esqualeno, 21) nonacosadieno, 22) nonacosano, 23) triacontano, 24) hentriacontadieno, 25) hentriaconteno, 26) hentriacontano, 27) dotriacontano, 28) tritriacontano, 29) 11-metil-pentatriacontano, C= contaminante.

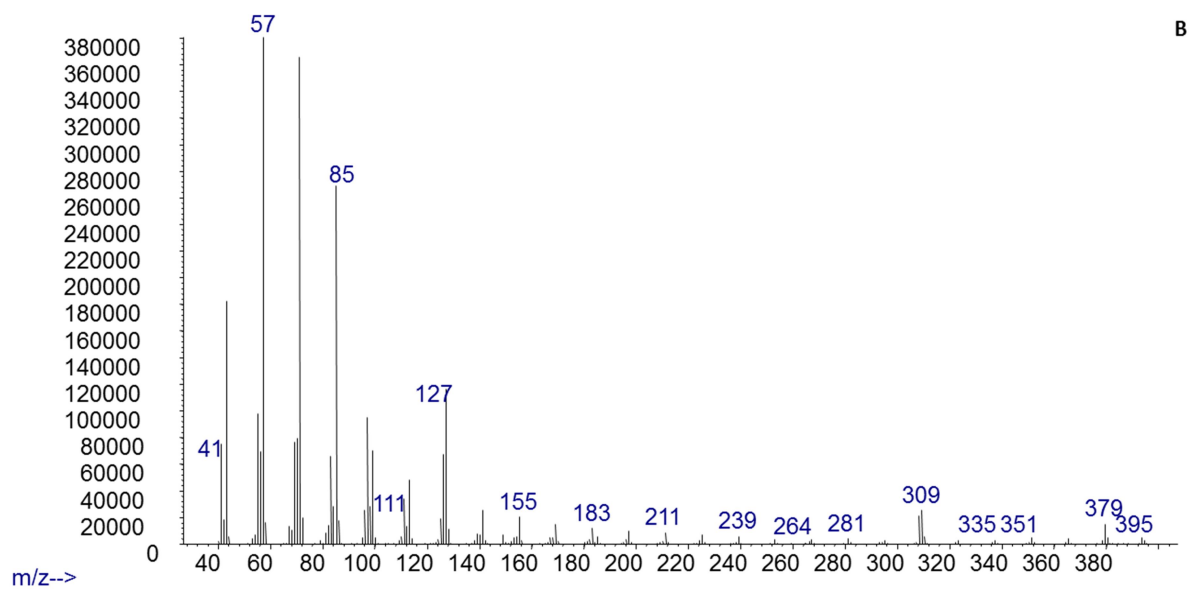
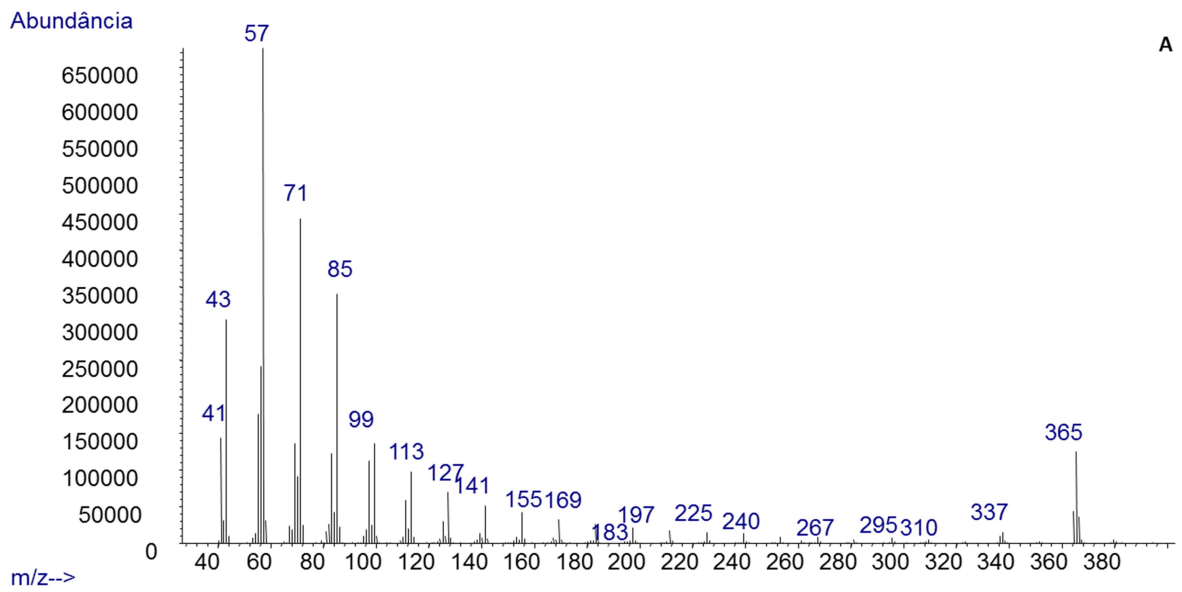


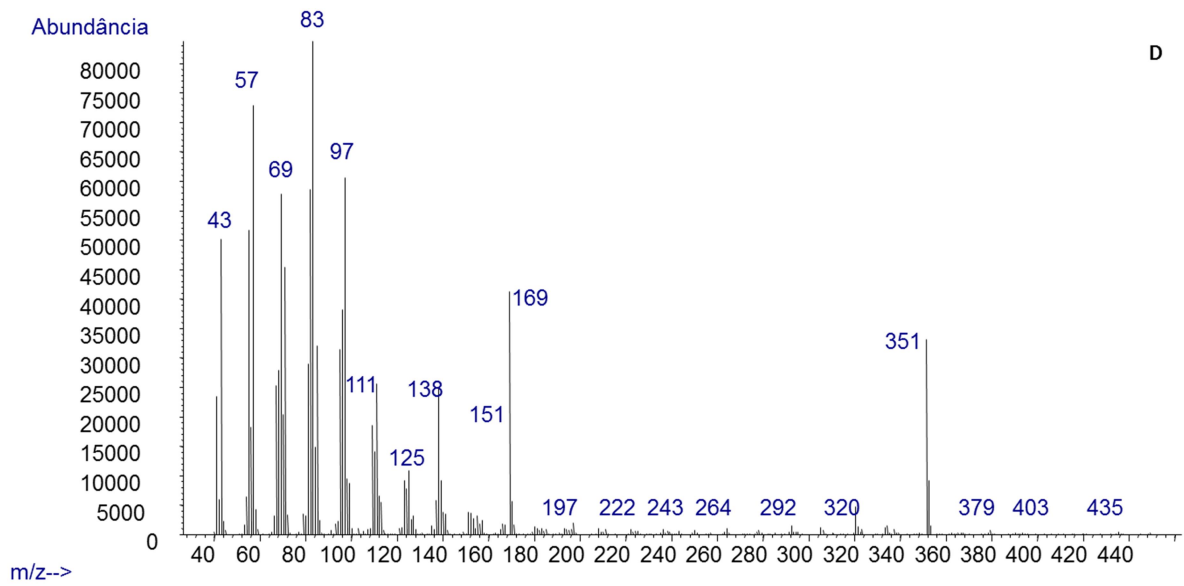
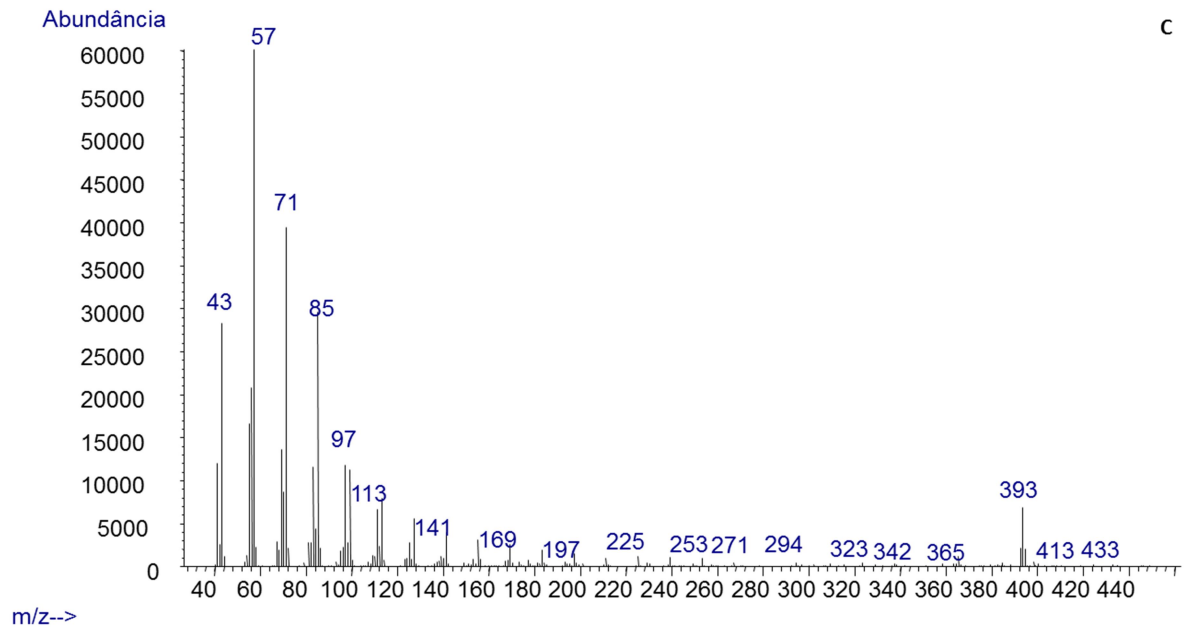
**Figura 25.** Cromatograma de compostos do extrato de rastros de 100 fêmeas de *Dichelops melacanthus*. 1) docosano, 2)tricosano, 3) tetracosano, 4) pentacosano, 5) hexacosano, 6) 3-metil-heptacosano, 7) 2-metil-heptacosano, 8) heptacosano, 9) 3-metil-octacosano, 10) 2-metil octacosano, 11) octacosano, 12) nonacosadieno, 13) nonacosano, 14) triacontano, 15) hentriacontadieno, 16) hentriaconteno, 17) hentriacontano, 18) dotriacontano, 19) tritriacontano, 20 ) tetratriacontano, C=contaminante, E= esqualeno.

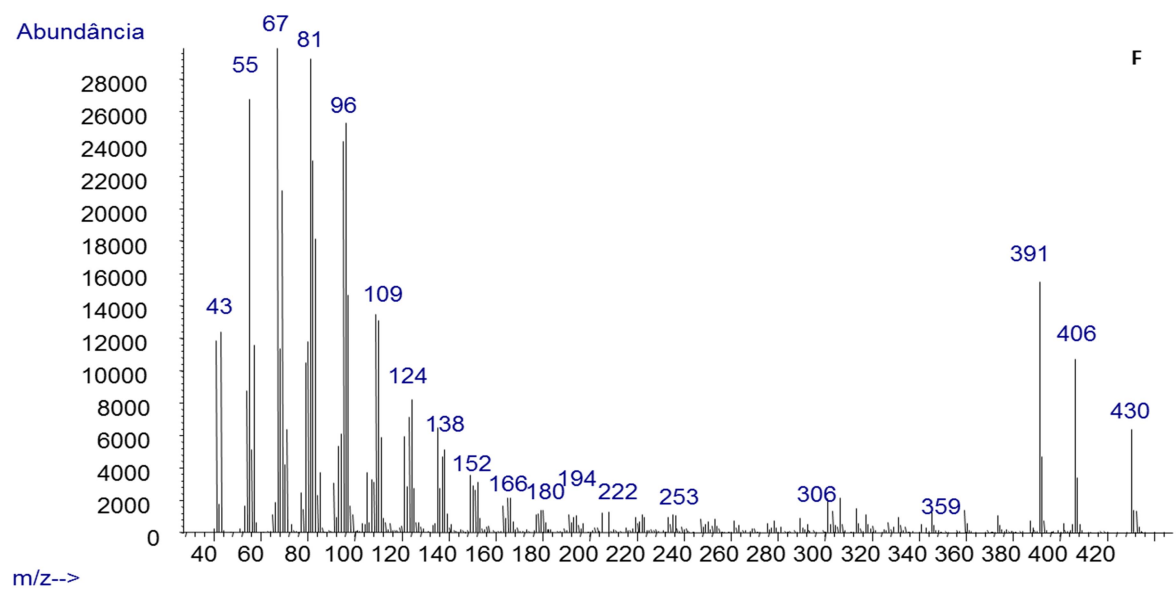
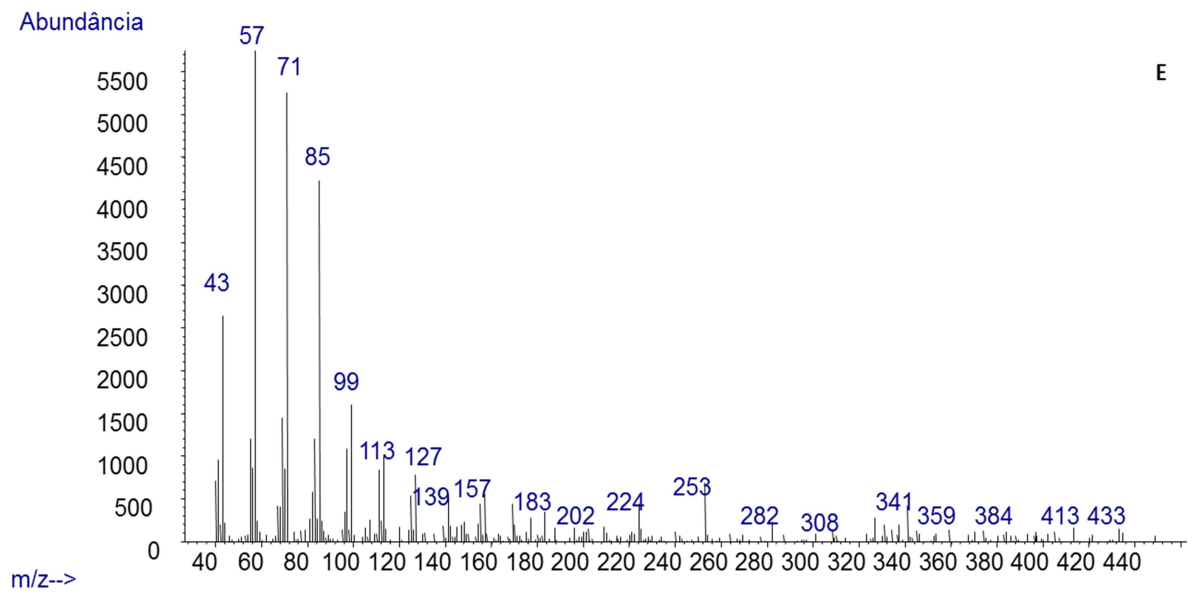


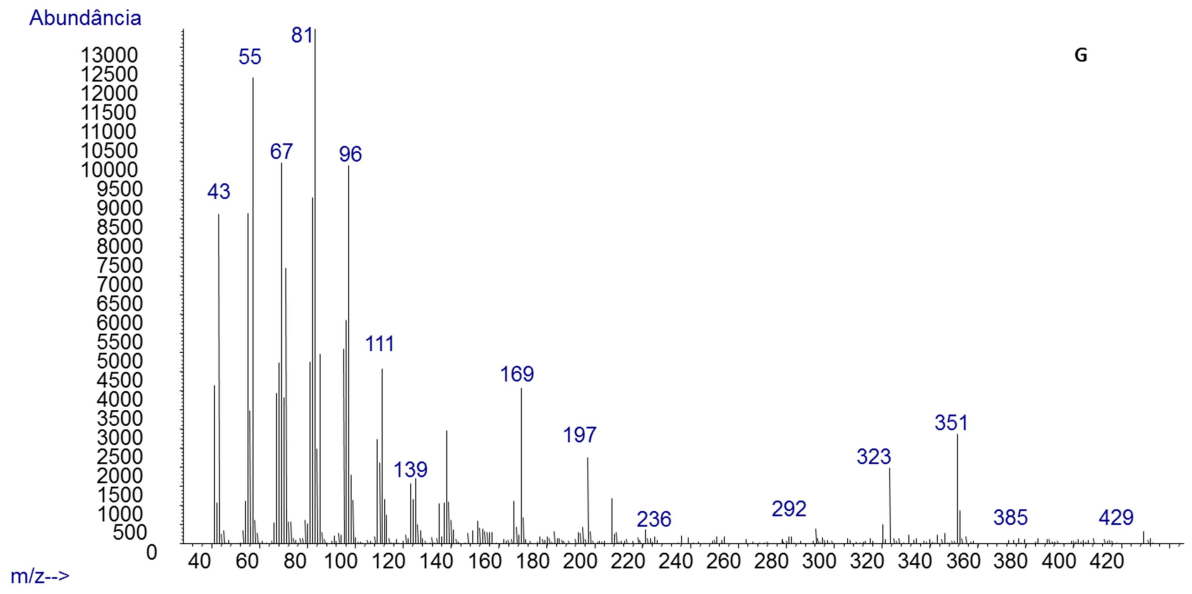


**Figura 26.** Cromatograma de compostos do extrato de rastros de 50 fêmeas de *Nezara viridula*. 1) nonadecano, 2) heneicosano, 3) tricosano, 4) tetracosano, 5) pentaconseno, 6) pentacosano, 7) hexacosano, 8) heptacosano, 9) 13-metil-heptacosano, 10) octacoseno, 11) octacosano, 12) nonacosatrieno, 13) nonacosano, 14) triaconteno, 15) triacontano, 16) hentriacontano, 17) dotriacontano, 18) tritriaconteno, 19) tritriacontano, 20) tetratriacontano, 21) pentatriaconteno, 22) pentariacontano.

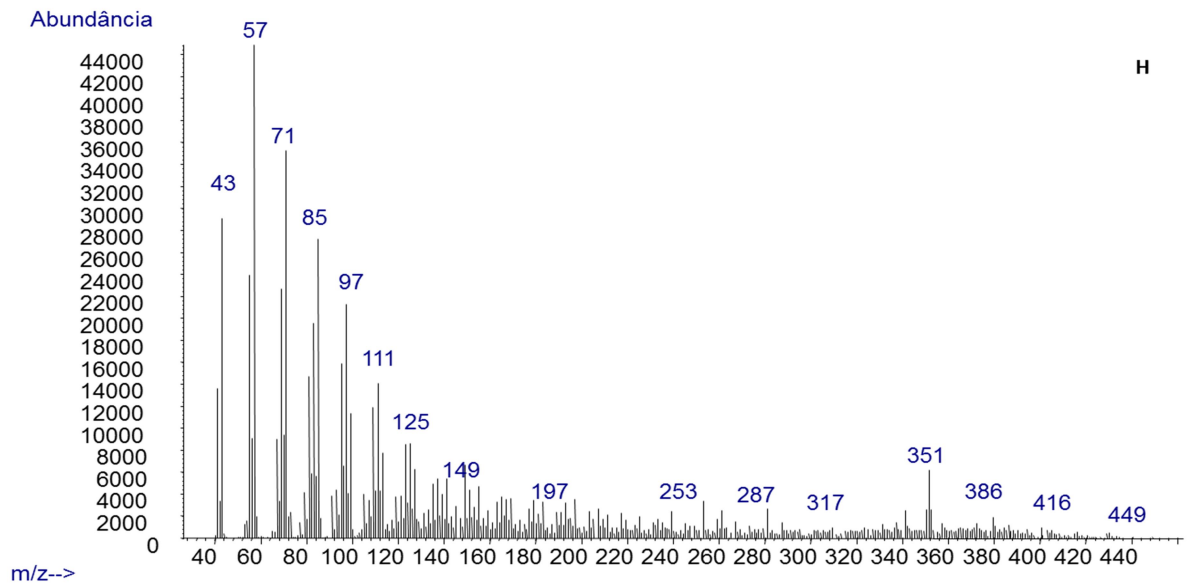




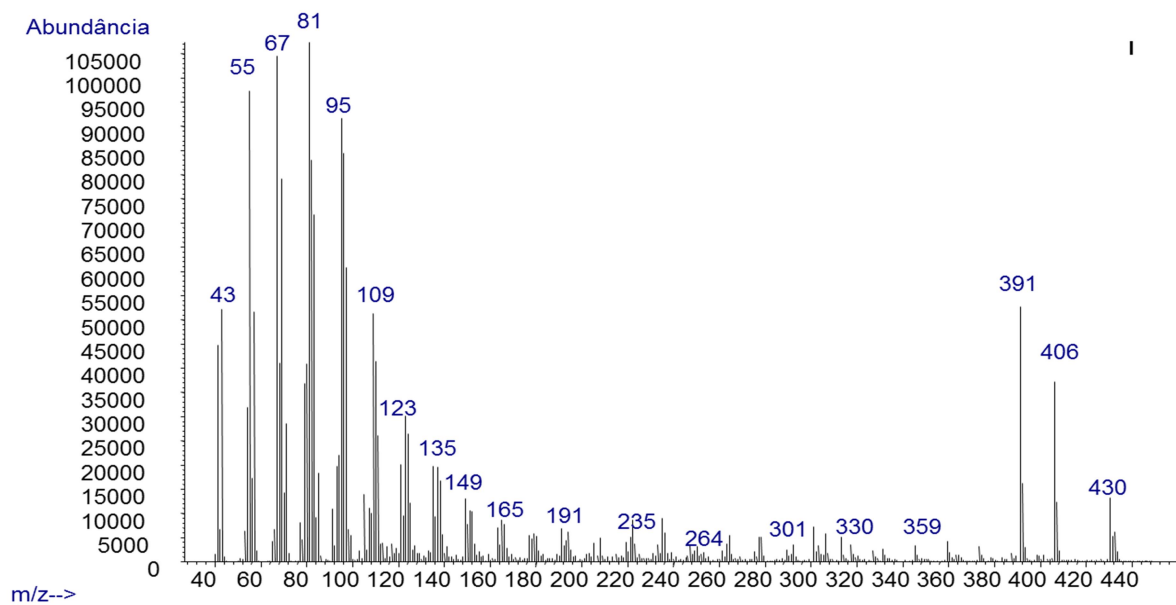




G



H



**Figura 27.** Espectro de massas de compostos do extrato de rastros de percevejos. (A) octacoseno, (B) nonacosatrieno, (C) triaconteno, (D) pentatriaconteno, (E) pentatriacontano, (F) hentriacontadieno (*Euschistus heros*), (G) 11-metil-pentatriacontano, (H) 3-metil-octacosano, (I) hentriacontadieno (*Dichelops melacanthus*).