



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL



**Estudo do comportamento de busca e seleção de hospedeiros dos
parasitóides de ovos *Trissolcus basalis* e *Telenomus podisi*
(Hymenoptera:Scelionidae)**

MICHELY FERREIRA SANTOS DE AQUINO

Brasília, DF
2011



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**Estudo do comportamento de busca e seleção de hospedeiros dos
parasitóides de ovos *Trissolcus basalis* e *Telenomus podisi*
(Hymenoptera:Scelionidae)**

MICHELY FERREIRA SANTOS DE AQUINO

Orientador: Dr. Raúl Alberto Laumann

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos necessários
para obtenção do título de Mestre
em Biologia Animal junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Animal da Universidade
de Brasília

Brasília, DF
2011



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

Dissertação de Mestrado

Michely Ferreira Santos de Aquino

Título:

“Estudo do comportamento de busca e seleção de hospedeiros dos
parasitóides de ovos *Trissolcus basalís* e *Telenomus podisi*
(Hymenoptera: Scelionidae).”

Comissão Examinadora:

Dr. Raúl Alberto Laumann
Presidente
Embrapa Cenargen

Dra. Ivone Rezende Diniz
Membro Titular Interno Vinculado
ao Programa UnB/IBD

Dr. Edison Ryoiti Sujii
Membro Titular Externo não
Vinculado ao Programa
Embrapa Cenargen

Dr. Miguel Michereff Filho
Membro Suplente
Externo não Vinculado ao Programa
Embrapa CNPH

Brasília, 31 de março de 2011

**A minha família,
especialmente, aos meus pais
pelo incentivo contínuo.
DEDICO**

AGRADECIMENTOS

Especialmente ao meu orientador, Dr. Raúl Alberto Laumann, pela valiosa orientação, profissionalismo, competência, pela solicitude, ensinamentos, pelo grande incentivo à pesquisa, pela amizade. Obrigada pelo apoio concedido a minha pessoa desde a graduação como aluna de iniciação científica. Meus eternos agradecimentos. Enfim, obrigada por ter acreditado em mim.

A Dr^a Maria Carolina Blassioli Moraes pelo grande auxílio durante o desenvolvimento do trabalho, especialmente quanto à identificação dos compostos químicos, pelo profissionalismo, pelas idéias e sugestões.

Ao Dr. Miguel Borges pelo apoio, profissionalismo, pelas idéias e sugestões durante a execução do trabalho.

Ao programa de Pós-graduação em Biologia Animal pela oportunidade dada a minha formação profissional.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, especialmente ao laboratório de semioquímicos de insetos, pela disponibilização da infra-estrutura e recursos necessários para a realização de todo o trabalho de pesquisa.

A professora Ivone Rezende Diniz (UnB) pelo apoio inicial no início do processo de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

À Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal (FAD-DF) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

A Dr^a Magali A. Rodrigues junto a Dr. Marcelo P. Bemquerer e Dr. Luciano P. da Silva (Embrapa Cenargen) pela grande ajuda durante a metodologia inicial do trabalho com a parte de extração e identificação química dos compostos de ovos do percevejo *E. heros*.

Ao Prof. Dr. Valdir Filgueiras Pessoa junto a Eldiane Moreira de Lima (Neurociências Comportamental – UnB) pela grande atenção e presteza com relação à realização das medidas espectrais.

A Joseane Padilha (Embrapa Cenargen) pela atenção e sugestões quanto às análises estatísticas.

A Hélio Moreira dos Santos juntamente a todos do laboratório de semioquímicos: Samantha da Silveira, Karen S. de Lima, Jonatas B. C. Ferreira, Isabela G. Grizzi, Valdeci pelo apoio e colaboração seja direta ou indiretamente na manutenção dos insetos utilizados no trabalho.

A Ramon P. de Barros pela auxílio no desenvolvimento inicial do trabalho.

A Aline Moreira Dias que me ajudou muito na realização do trabalho. Obrigada pelo empenho e dedicação.

A Ana Paula S. Lopes pelo apoio dado desde o início do mestrado.

Cecília R. Vieira pelas fotos de percevejos fornecidas.

A Diego M. Magalhães, e Márcio Wandré (Embrapa Cenargen) pelas discussões pertinentes ao trabalho e sugestões.

A Miriam F. F. Michereff e Luciane M. S. Xavier pelo apoio, ensinamentos, sugestões, durante a execução do trabalho.

Ricardo Gonçalves pelos desenhos.

A minha espetacular família, importantíssima na minha vida, que com a qual sempre obtive apoio incondicional.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
INTRODUÇÃO GERAL	1
Objetivos do trabalho	5
Estrutura da dissertação	6
CAPÍTULO I: Influência das cores do substrato no comportamento de seleção de hospedeiro dos parasitóides <i>Telenomus podisi</i> e <i>Trissolcus basal</i> (Hymenoptera: Scelionidae)	7
Introdução	7
Material e Métodos	9
Resultados	18
Discussão	25
CAPÍTULO II: Influência de características morfológicas de ovos de percevejos no comportamento de seleção de hospedeiro dos parasitóides <i>Telenomus podisi</i> e <i>Trissolcus basal</i> (Hymenoptera: Scelionidae)	29
Introdução	29
Material e Métodos	32
Resultados	41
Discussão	51
CAPÍTULO III: Influência de características químicas de ovos do percevejo <i>Euschistus heros</i> (Hemiptera: Pentatomidae) no comportamento de seleção de hospedeiro do parasitóide <i>Telenomus podisi</i> (Hymenoptera: Scelionidae)	56
Introdução	56
Material e Métodos	58
Resultados	63
Discussão	75

CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
ANEXO 1: Fotos de parasitóides de ovos parasitando ovos de <i>Euschistus heros</i>	95
ANEXO 2: Fotos de percevejos pragas da soja.....	96
ANEXO 3: Índice de Kovats (KI) e espectros de massa dos compostos identificados de extratos de ovos de <i>Euschistus heros</i>	97

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 Características (tamanho relativo, cor, disposição dos ovos e número de ovos por postura) de posturas de diferentes espécies de percevejos utilizadas neste trabalho	34
Tabela 2.2 Números de ovos parasitados por postura (média \pm desvio padrão) e sobrevivência de estágios imaturos (proporção média \pm desvio padrão) de fêmeas de <i>T. podisi</i> em diferentes hospedeiros.....	41
Tabela 2.3 Números de ovos parasitados (média \pm desvio padrão) e sobrevivência de estágios imaturos (proporção média \pm desvio padrão) de fêmeas de <i>T. basalis</i> em diferentes hospedeiros	42
Tabela 2.4 Tamanho (média \pm desvio padrão) de ovos de diferentes espécies de percevejos utilizadas neste trabalho	43
Tabela 2.5 Tempo (média \pm desvio padrão) em segundos das categorias comportamentais desenvolvidas pelas fêmeas de <i>T. podisi</i> em diferentes espécies de percevejos	45
Tabela 2.6 Tempo (média \pm desvio padrão) em segundos das categorias comportamentais desenvolvidas pelas fêmeas de <i>T. basalis</i> em diferentes espécies de percevejos	45

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1** Medidas espectrais do comprimento de onda refletido por diferentes substratos coloridos seguida pela faixa do espectro eletromagnético visível. Os números posicionados sobre os picos em cada figura representam a refletância do comprimento de onda emitido por cada cor de substrato. Foram empregadas algumas figuras com escalas menores para melhor percepção do comprimento de onda refletido12
- Figura 1.2** Esquema ilustrativo da arena (15 cm de diâmetro) utilizada (vista superior) no experimento de preferência inata. As áreas coloridas representam os substratos contendo ovos de *E. heros*13
- Figura 1.3** Esquema ilustrativo da arena (6 cm de diâmetro) utilizada nas sessões de treinamento do experimento de escolha múltipla15
- Figura 1.4** Esquema ilustrativo do experimento de escolha múltipla com detalhe das arenas utilizadas e a seqüência das sessões de treino, repouso e teste. A arena da sessão teste apresentava 15 cm de diâmetro15
- Figura 1.5** Esquema ilustrativo de arena utilizada nos experimentos de escolha dupla com o substrato recobrando uma pequena porção da parede da arena e pequena parte do fundo16
- Figura 1.6** Esquema ilustrativo dos experimentos de escolha dupla. A – Treinamento em um único substrato, verde. B – Treinamento em um único substrato laranja. C – Treinamento em dois substratos: amarelo e laranja (com hospedeiro). D – Treinamento em dois substratos: marrom (com hospedeiro) e verde. E – Treinamento em dois substratos: marrom e verde (com hospedeiro)17
- Figura 1.7** Escolha inicial (número de insetos que escolheram cada cor) dos parasitóides *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalís* por substratos de diferentes cores quando avaliados em experimentos de preferência inata19
- Figura 1.8** Proporção de parasitismo (media \pm EP) por fêmeas de *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalís* em ovos de *E. heros* presentes em substratos de diferentes cores. As barras com mesmas letras minúsculas não apresentam diferenças significativas nos valores médios da proporção de parasitismo (GLM e Análise de Deviança $P > 0,05$)19
- Figura 1.9** Escolha inicial (número de insetos que escolheram cada cor) dos parasitóides *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalís* por substratos de diferentes cores quando avaliados em experimentos de múltipla escolha20
- Figura 1.10** Proporção de parasitismo (media \pm EP) por fêmeas de *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalís* em ovos de *E. heros* presentes em substratos de diferentes cores. As barras com mesmas letras minúsculas não apresentam diferenças significativas nos valores médios da proporção de parasitismo (GLM e Análise de Deviança $P > 0,05$)20

Figura 1.11 Escolha inicial (número de insetos que escolheram cada cor) dos parasitóides *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalís* por substratos de diferentes cores após treinamento em substrato laranja com hospedeiro (ovos de *E. heros*). Mesmas letras minúsculas não apresentam diferenças significativas (Teste $\chi^2 P > 0,05$).....21

Figura 1.12 Proporção de parasitismo (media \pm EP) por fêmeas de *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalís* em ovos de *E. heros* presentes em substratos de diferentes cores na sessão teste. As barras com mesmas letras minúsculas não apresentam diferenças significativas nos valores médios da proporção de parasitismo (GLM $P > 0,05$).....21

Figura 1.13 Escolha inicial (número de insetos que escolheram cada cor) dos parasitóides *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalís* por substratos de diferentes cores após treinamento em substrato verde com hospedeiro (ovos de *E. heros*). Mesmas letras minúsculas não apresentam diferenças significativas (Teste $\chi^2 P > 0,05$).....22

Figura 1.14 Proporção de parasitismo (media \pm EP) por fêmeas de *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalís* em ovos de *E. heros* presentes em substratos de diferentes cores na sessão teste. As barras com mesmas letras minúsculas não apresentam diferenças significativas nos valores médios da proporção de parasitismo (GLM $P > 0,05$).....22

Figura 1.15 Escolha inicial (número de insetos que escolheram cada cor) dos parasitóides *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalís* após treinamento em substratos amarelo sem hospedeiro e laranja com hospedeiro (ovos de *E. heros*). Mesmas letras minúsculas não apresentam diferenças significativas (Teste $\chi^2 P > 0,05$).....23

Figura 1.16 Proporção de parasitismo (media \pm EP) por fêmeas de *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalís* em ovos de *E. heros* presentes em substratos de diferentes cores na sessão teste. As barras com mesmas letras minúsculas não apresentam diferenças significativas nos valores médios da proporção de parasitismo (GLM $P > 0,05$).....24

Figura 1.17 Escolha inicial (número de insetos que escolheram cada cor) dos parasitóides *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalís* após treinamento em substrato marrom com hospedeiro (ovos de *E. heros*) e verde sem hospedeiro. Mesmas letras minúsculas não apresentam diferenças significativas (Teste $\chi^2 P > 0,05$).....24

Figura 1.18 Proporção de parasitismo (media \pm EP) por fêmeas de *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalís* em ovos de *E. heros* presentes em substratos de diferentes cores na sessão teste. As barras com mesmas letras minúsculas não apresentam diferenças significativas nos valores médios da proporção de parasitismo (GLM $P > 0,05$).....24

Figura 1.19 Escolha inicial (número de insetos que escolheram cada cor) dos parasitóides *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalís* por substratos de diferentes cores após treinamento em substrato verde com hospedeiro (ovos de *E. heros*) e marrom sem hospedeiro. Mesmas letras minúsculas não apresentam diferenças significativas (Teste $\chi^2 P > 0,05$).....25

Figura 1.20 Proporção de parasitismo (media \pm EP) por fêmeas de *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalís* em ovos de *E. heros* presentes em substratos de diferentes cores na sessão teste. As barras com mesmas letras minúsculas não apresentam diferenças significativas nos valores médios da proporção de parasitismo (GLM $P > 0,05$).....25

Figura 2.1 Características morfológicas de ovos de diferentes espécies de percevejos e pontos utilizados para medição de diâmetro e altura dos ovos (linhas com seta dupla). Na figura pode-se observar também diferenças na coloração, ornamentação do cório, forma e tamanho relativo dos micropilos (círculos em preto). A. *Euschistus heros*. B. *Nezara viridula*. C. *Piezodorus guildinii*. D. *Chinavia ubica*36

Figura 2.2 Esquemas representativos das diferentes categorias comportamentais de reconhecimento e aceitação de hospedeiros observadas em *Trissolcus basal*, segundo Bin et al. (1993).....38

Figura 2.3 Proporção de ovos (média \pm IC95%) de diferentes espécies de percevejos selecionados para oviposição por fêmeas de *Telenomus podisi* em relação a sua posição na postura (borda ou interior). Os valores médios e os IC95% foram calculados mediante regressão logística. *** = $P < 0,001$ para a proporção de ovos parasitados na borda ou interior da postura para cada espécie de hospedeiro, ns = diferenças não significativas na a proporção de ovos parasitados na borda ou interior da postura para cada espécie de hospedeiro teste χ^2 de Wald47

Figura 2.4 Proporção de ovos (média \pm IC95%) de diferentes espécies de percevejos selecionados para oviposição por fêmeas de *Trissolcus basal* em relação a sua posição na postura (borda ou interior). Os valores médios e os IC95% foram calculados mediante regressão logística. *** = $P < 0,001$ para a proporção de ovos parasitados na borda ou interior da postura para cada espécie de hospedeiro, ns = diferenças não significativas na a proporção de ovos parasitados na borda ou interior da postura para cada espécie de hospedeiro teste χ^2 de Wald47

Figura 2.5 Proporção de ovos (média \pm IC95%) de diferentes espécies de percevejos selecionados para oviposição por fêmeas de *Telenomus podisi* em relação à seqüência de escolha (vizinho ou não vizinho). Os valores médios e os IC95% foram calculados mediante regressão logística. * = $P < 0,05$ indica diferenças significativas na proporção de ovos parasitados vizinhos ou não vizinhos nas posturas de diferentes espécies de percevejos, ns = diferenças não significativas entre a proporção de ovos parasitados vizinhos ou não vizinhos nas posturas de diferentes espécies de percevejos teste χ^2 de Wald48

Figura 2.6 Proporção de ovos (média \pm IC95%) de diferentes espécies de percevejos selecionados para oviposição por fêmeas de *Trissolcus basal* em relação à seqüência de escolha (vizinho ou não vizinho). Os valores médios e os IC95% foram calculados mediante regressão logística. *** = $P < 0,001$ indica diferenças significativas na proporção de ovos parasitados vizinhos ou não vizinhos nas posturas de diferentes espécies de percevejos, ns = diferenças não significativas entre a proporção de ovos parasitados vizinhos ou não vizinhos nas posturas de diferentes espécies de percevejos teste χ^2 de Wald.....48

Figura 2.7 Etogramas do comportamento de reconhecimento e oviposição do parasitóide de ovos *Telenomus podisi* utilizando como hospedeiros diferentes espécies de percevejos. Os números nas linhas indicam a probabilidade de transição entre comportamentos. Os números entre parênteses dentro dos retângulos indicam a frequência observada de cada comportamento. As linhas tracejadas indicam probabilidades não diferentes do acaso (teste G, $P = 0.05$). As linhas completas indicam as transições de um comportamento para outro que resultaram significativas ($P < 0,05$). E = encontro, T = tamborilamento, P = prova, O = oviposição, M = marcação, Tr = transição, L = limpeza, R = retorno, AP = abandono da postura49

Figura 2.8 Etogramas do comportamento de reconhecimento e oviposição do parasitóide de ovos *Trissolcus basalis* utilizando como hospedeiros diferentes espécies de percevejos. Os números nas linhas indicam a probabilidade de transição entre comportamentos. Os números entre parênteses dentro dos retângulos indicam a frequência observada de cada comportamento. As linhas tracejadas indicam probabilidades não diferentes do acaso (teste G, $P = 0.05$). As linhas completas indicam as transições de um comportamento para outro que resultaram significativas ($P < 0,05$). E = encontro, T = tamborilamento, P = prova, O = oviposição, M = marcação, Tr = transição, L = limpeza, R = retorno, AP = abandono da postura50

Figura 3.1 Quantidade total de compostos (média \pm EP) obtidos em um grama de ovos de *E. heros* em diferentes solventes e períodos de extração. Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas não diferem significativamente entre os solventes considerando o mesmo tempo de extração. Médias seguidas de mesmas letras minúsculas não diferem significativamente entre os períodos de extração em um mesmo solvente (ANOVA e teste de Dunn $P > 0,05$)65

Figura 3.2 Perfis cromatográficos de compostos de *E. heros* extraídos em diferentes solventes sob período de extração de 24h. Os números de 1 a 11 representam os diferentes compostos majoritários: (1) Hexadecanoato de metila, (2) *cis*-9-Hexadecenoato de metila, (3) Ácido hexadecanóico (ácido palmítico), (4) Hexadecanoato de etila, (5) Z,Z - 9,12 Octadienoato de metila (linoleato de metila), (6) *cis*-9-Octadecenoato de metila, (7) Z,Z - 9,12 - Ácido Octadienóico (ácido linoleico), (8) *cis*-9-Octadecenóico (ácido oleico), (9) Z,Z - 9,12 Octadienoato de etila (linoleato de etila) (10) Ácido octadecanóico (ácido esteárico) e (11) Octadecanoato de etila65

Figura 3.3 Porcentagem de cada composto majoritário (média \pm EP; em relação ao total) extraídos de ovos de *E. heros* em diferentes períodos de extração e com diferentes solventes (acetona, diclorometano e metanol). Os números de 1 a 11 representam os diferentes compostos majoritários: (1) Hexadecanoato de metila, (2) *cis*-9-Hexadecenoato de metila, (3) Ácido hexadecanóico (ácido palmítico), (4) Hexadecanoato de etila, (5) Z,Z - 9,12 Octadienoato de metila (linoleato de metila), (6) *cis*-9-Octadecenoato de metila, (7) Z,Z - 9,12 - Ácido Octadienóico (ácido linoleico), (8) *cis*-9-Octadecenóico (ácido oleico), (9) Z,Z - 9,12 Octadienoato de etila (linoleato de etila) (10) Ácido octadecanóico (ácido esteárico) e (11) Octadecanoato de etila66

Figura 3.4 Porcentagem de cada composto majoritário (média \pm EP; em relação ao total) obtidos de ovos de *E. heros* após extração durante 24 horas em diferentes. Os números de 1 a 11 representam os diferentes compostos majoritários: (1) Hexadecanoato de metila, (2) *cis*-9-Hexadecenoato de metila, (3) Ácido hexadecanóico (ácido palmítico), (4) Hexadecanoato de etila, (5) Z,Z - 9,12 Octadienoato de metila (linoleato de metila), (6) *cis*-9-Octadecenoato de metila, (7) Z,Z - 9,12 - Ácido Octadienóico (ácido linoleico), (8) *cis*-9-Octadecenóico (ácido oleico), (9) Z,Z - 9,12 Octadienoato de etila (linoleato de etila) (10) Ácido octadecanóico (ácido esteárico) e (11) Octadecanoato de etila.67

Figura 3.5 Quantidade (média \pm EP) de compostos majoritários obtidos de ovos de *E. heros* após 24 horas de extração em diferentes solventes. Os números de 1 a 11 representam os diferentes compostos majoritários: (1) Hexadecanoato de metila, (2) *cis*-9-Hexadecenoato de metila, (3) Ácido hexadecanóico (ácido palmítico), (4) Hexadecanoato de etila, (5) Z,Z - 9,12 Octadienoato de metila (linoleato de metila), (6) *cis*-9-Octadecenoato de metila, (7) Z,Z - 9,12 - Ácido Octadienóico (ácido linoleico), (8) *cis*-9-Octadecenóico (ácido oleico), (9) Z,Z - 9,12 Octadienoato de etila (linoleato de etila) (10) Ácido octadecanóico (ácido esteárico) e (11) Octadecanoato de etila68

Figura 3.6 Análises de variáveis canônicas mostrando as diferenças nos tempos de extração em diferentes solventes. Os símbolos representam os *scocres* individuais para cada amostra calculados a partir da CVA que maximiza a diferença entre os tratamentos nas duas dimensões consideradas (CV1 e CV2). As linhas representam os diferentes compostos presentes nas amostras, a longitude de cada linha representa a importância (magnitude relativa) da contribuição de cada composto para diferenciação dos tratamentos. As primeiras duas variáveis canônicas representam 100%, 90,55% e 99,09% da variabilidade total para acetona, metanol e diclorometano respectivamente. Os números representam os compostos majoritários: (1) Hexadecanoato de metila, (2) *cis*-9-Hexadecenoato de metila, (3) Ácido hexadecanóico (ácido palmítico), (4) Hexadecanoato de etila, (5) Z,Z - 9,12 Octadienoato de metila (linoleato de metila), (6) *cis*-9-Octadecenoato de metila, (7) Z,Z - 9,12 - Ácido Octadienóico (ácido linoleico), (8) *cis*-9-Octadecenóico (ácido oleico), (9) Z,Z - 9,12 Octadienoato de etila (linoleato de etila) (10) Ácido octadecanóico (ácido esteárico) e (11) Octadecanoato de etila70

Figura 3.7 Análise de variáveis canônicas mostrando as diferenças nas amostras obtidas em diferentes solventes após 24 h de extração. Os símbolos representam os *scocres* individuais para cada amostra calculados a partir da CVA que maximiza a diferença entre os tratamentos nas duas dimensões consideradas (CV1 e CV2). As linhas representam os diferentes compostos presentes nas amostras, a longitude de cada linha representa a importância (magnitude relativa) da contribuição de cada composto para diferenciação dos tratamentos. As primeiras duas variáveis canônicas representam 99 % da variabilidade. Os números representam os compostos majoritários (1) Hexadecanoato de metila, (2) *cis*-9-hexadecenoato de metila, (3) ácido hexadecanóico (ácido palmítico), (4) Hexadecanoato de etila, (5) Z,Z - 9,12 Octadienoato de metila (Linoleato de metila), (6) *cis*-9-octadecenoato de metila, (7) Z,Z - 9,12 - Ácido Octadienóico (ácido linoleico), (8) *cis*-9-octadecenóico (ácido oleico), (9) Z,Z - 9,12 Octadienoato de etila (Linoleato de etila) (10) ácido octadecanóico (ácido esteárico) e (11) Octadecanoato de etila.....71

Figura 3.8 Tempo de encontro (média \pm EP) das fêmeas de *T. podisi* com hospedeiros artificiais (5 pérolas de vidro de 1 mm de diâmetro) submetidos a diferentes tratamentos. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente (Teste de Kruskal-Wallis $P > 0,05$). Ex = Extrato, dicloro = diclorometano.73

Figura 3.9 Tempo de tamborilamento (média \pm EP) das fêmeas de *T. podisi* em hospedeiros artificiais (5 pérolas de vidro de 1 mm de diâmetro) submetidos a diferentes tratamentos. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente (Teste de Kruskal-Wallis $P > 0,05$). Ex = Extrato, dicloro = diclorometano.73

Figura 3.10 Probabilidade do parasitóide *T. podisi* realizar a tentativa de oviposição (média \pm IC95%) em hospedeiros artificiais (5 pérolas de vidro de 1 mm de diâmetro) submetidos a diferentes tratamentos. Os valores médios e os IC95% foram calculados mediante regressão logística. * = não sobreposição dos intervalos de confiança.74

Figura 3.11 Número de visitas do parasitóide *T. podisi* a hospedeiros artificiais (5 pérolas de vidro de 1 mm de diâmetro) submetidos a diferentes tratamentos. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente (Teste de Kruskal-Wallis $P > 0,05$). Ex = Extrato, dicloro = diclorometano.74

RESUMO

Os parasitóides são importantes componentes dos ecossistemas terrestres atuando como controladores de populações de insetos herbívoros. A busca e seleção de hospedeiros constituem etapas decisivas do ciclo vital destes insetos já que asseguram seu sucesso reprodutivo. O forrageamento das fêmeas dos parasitóides inclui uma série de passos comportamentais seqüenciais intermediados por estímulos de natureza física (visuais ou mecânicas), química (semioquímicos) ou bioquímica. O objetivo deste trabalho foi estudar a influência de características físicas e químicas do hospedeiro nos comportamentos de busca e seleção dos parasitóides de ovos *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalus*, importantes agentes de mortalidade de percevejos praga da soja. Foram realizados experimentos utilizando substratos coloridos para estudar sua influência no comportamento de busca de hospedeiros. Os parasitóides mostraram preferência inata por substratos de cor amarelo e secundariamente verde. Esta resposta não foi modificada após experiência de oviposição em substratos de diferentes cores, indicando ausência de aprendizado associativo em relação à cor de substrato. Os resultados sugerem que a resposta a cores de substratos observada estaria relacionada com a orientação para a folhagem de plantas durante a busca de hospedeiros. Em outra etapa do trabalho foram estudados os comportamentos de reconhecimento e aceitação de hospedeiros quando os parasitóides utilizaram ovos de quatro espécies de percevejos (*Euschistus heros*, *Nezara viridula*, *Piezodorus guidlinii* e *Chinavia ubica*). Neste caso foram analisadas a influência de características físicas do hospedeiro. Os parasitóides mostraram uma clara discriminação de hospedeiros parasitando somente ovos daquelas espécies de percevejos que maximizam seu sucesso reprodutivo. Embora os comportamentos de reconhecimento e aceitação de hospedeiros se apresentaram bem estereotipados, foi observado que diferenças morfológicas como tamanho e forma das posturas e cor e ornamentação dos ovos são importantes para diferenciação dos hospedeiros. A última etapa do trabalho foi dedicada ao estudo de estímulos químicos relacionados ao reconhecimento de hospedeiros. Extrações químicas de ovos de *E. heros* em diferentes solventes (acetona, metanol e diclorometano) e tempos de extração (1, 4 e 24 h) revelaram que o solvente de maior polaridade utilizado, metanol, foi o mais eficiente, extraindo maior quantidade de compostos que os obtidos nos outros solventes. Adicionalmente os extratos metanólicos induziram no parasitóide *T. podisi* os

comportamentos de reconhecimento e tentativa de oviposição, quando os mesmos foram aplicados em posturas artificiais, formadas com pérolas de vidro. A resposta observada no parasitóide resultou significativamente superior à observada frente a extratos obtidos com outros solventes ou solventes aplicados individualmente nas pérolas de vidro. Os resultados obtidos representam novas contribuições para o avanço do conhecimento do comportamento de forrageamento de parasitóides da família Scelionidae. Trabalhos futuros devem orientar-se principalmente à identificação precisa dos compostos químicos com ação cairomonal, ao estudo das interações entre estímulos físicos e químicos e a estabelecer a importância dos mesmos tanto para estimular comportamentos específicos quanto para identificar aqueles envolvidos na seleção de hospedeiros que maximizam o potencial reprodutivo dos parasitóides.

Palavras chaves: Parasitóides, comportamento, cor do substrato, morfologia do hospedeiro, cairomônios, percevejos.

ABSTRACT

Insect parasitoids are main components of terrestrial ecosystems functionin as regulators of insect herbivores populations. Search and selection of host are decisive steps in the vital cycle because ensure the reproductive success. Parasitoids females foraging include some behavioral steps mediated by physical (visual or mechanics), chemical (semiochemicals) or biochemical. The egg parasitoids *Telenomus podisi* and *Trissolcus basal* are important as mortality agents of stink bugs that are pest on soybean and some aspects of their behavior are unknown. The objective of this work was study the influence of physical and chemical characteristic of the host in the search and selection behaviors of the egg parasitoids, *Telenomus podisi* and *Trissolcus*, two important mortality agents of stink bugs that are pest on soybean. There were conducted experiments using colored substrates to study their influence in the host searching behavior. The parasitoids showed innate preference by yellow substrates and, secondarily, by green substrates. This response was not modified after oviposition experience on substrates of different colors, indicating absence of associative learning in relation to the colors of the substrate. The results suggest that the response to colour of substrate observed could be related to the orientation to plants foliages when search for hosts. In other step of the work the host identification and acceptation behaviors when the parasitoids used egg of four species of stink bugs (*Euschistus heros*, *Nezara viridula*, *Piezodorus guidlinii* e *Chinavia ubica*) were studied. In this case were analyzed the physical characteristics of hosts. The parasitoids showed a clear discrimination of host parasitizing eggs of stink bugs species that maximize their reproductive success. Although the host identification and acceptation behaviors were stereotyped it was observed that, morphological differences as size and shape of the egg masses and egg color and ornamentation are important to host differentiation. The last stage of the work was dedicated to the study of chemical stimuli related to the recognition of host. Chemical extractions of eggs of the brown stink bug, *E. heros*, in different solvents (acetone, methanol and dichloromethane) and extraction times (1,4 and 24 h) showed that the more polar solvent, methanol, was more efficient, extracting higher quantities of the compounds obtained when compared with the others solvents used. Besides methanolic extracts induced, in the parasitoid *T. podisi*, the recognition behavior and oviposition attempt, when they were applied on artificial egg mass,

formed with glass beads. The parasitoid response was significantly higher than the observed when the glass beads were treated with extracts obtained in others solvents or solvents alone. The results obtained represent new contributions to the advance of knoweldge of foraging behavior of Scelionidae wasps. Future works should be oriented, principally, to accurate identification of the chemical compounds with kairomonal action, to the study of the interactions of chemical and physical stimuli and establish both their relevance to induce specific behaviors and to identify which are related to the selection of hosts that maximize the reproductive success of these parasitoids.

Key words: Parasitoids, behaviour, substratum colour, host morphology, kairomones, stink bugs.

INTRODUÇÃO

Os parasitóides são insetos que durante seus estágios imaturos vivem como parasitas de artrópodes. Estes insetos participam na estruturação de comunidades e no controle da densidade populacional de insetos herbívoros em ecossistemas terrestres (Godfray 1994). Esta ação depende da fêmea do parasitóide encontrar e parasitar satisfatoriamente o hospedeiro.

O processo de busca e seleção de hospedeiros nos parasitóides compreende uma seqüência de passos que envolvem desde a localização do hábitat até o reconhecimento, a aceitação e a adequação do hospedeiro (Alphen van & Vet 1986; Vinson 1998; Steidle & Van Loon 2002).

Estímulos físicos e químicos servem como guia orientando o parasitóide na busca de hospedeiros (Vinson 1985; Godfray 1994). Essas pistas alteram o padrão de movimentação da fêmea do parasitóide provocando um comportamento tático, de orientação à fonte de estímulos, ou quinético, alteração do padrão de movimentação do inseto (Vilella & Della Lucia 2001).

Considerando o tamanho do parasitóide, o encontro de um hospedeiro em ambientes com variações temporais e espaciais e com uma grande variedade de estímulos representa um enorme desafio, especialmente para os que utilizam como hospedeiros ovos de insetos.

Os insetos herbívoros depositam seus ovos em diversos ambientes: sob superfície de plantas, rochas, solo, podendo ficar expostos ou escondidos. Além de serem sésseis e muitas vezes pouco aparentes, por estarem protegidos de diferentes maneiras, os ovos de insetos também se caracterizam pela baixa emissão de substâncias químicas voláteis (Vinson 1998). Adicionalmente, os ovos alteram sua composição rapidamente, passando de simples recursos nutricionais, vitelo, à formação dos tecidos do embrião do inseto. Isto pode modificar a susceptibilidade ao ataque por inimigos naturais (Fatouros et al. 2008), os que dispõem de curtos espaços de tempo, janelas de vulnerabilidade segundo Vinson (1998), para o ataque e uso eficiente dos hospedeiros.

Considerando estes aspectos fica evidente que para insetos parasitóides de ovos é crucial possuir estratégias de busca e seleção de hospedeiros que maximizem o encontro dos mesmos no menor tempo possível e que as mesmas sejam suficientemente plásticas para se adaptarem às mudanças ambientais.

Os estímulos que carregam informação devem possuir duas características: confiabilidade, indicando com precisão a localização e identidade do hospedeiro, e detectabilidade, facilidade de descobrir ou detectar o estímulo. Para resolver o problema da confiabilidade/detectabilidade, diferentes estratégias evoluíram: 1) desvio infoquímico, 2) sinomônios induzidos por herbivoria e 3) aprendizagem associativa (Vet et al. 1991,1995; Vet & Dick 1992).

Desse modo, as fêmeas de parasitóides necessitam de estímulos que sejam detectáveis e confiáveis para encontrar recursos pouco aparentes como ovos e que apresentam um tempo limite para sua utilização. A otimização no comportamento de busca está diretamente relacionado ao sucesso reprodutivo, pois um hospedeiro de qualidade garante o desenvolvimento satisfatório da sua descendência (Alphen van & Vet 1986).

Durante a etapa inicial de busca de hospedeiros os estímulos químicos são mais importantes sendo os físicos utilizados nas etapas finais do processo (Godfray 1994). Entre os estímulos químicos é conhecido que os sinomônios induzidos por herbivoria (compostos químicos voláteis que a planta produz após o ataque de herbívoros) são utilizados por parasitóides durante a busca de hospedeiros. (De Moraes et al. 1998; De Moraes & Lewis 1999; Potting et al. 1999; Dicke et al. 2003; Heil 2008; Colazza 2004a; Moraes et al. 2005). Além do uso de químicos voláteis induzidos pela alimentação dos herbívoros, os parasitóides de ovos também se orientam utilizando voláteis induzidos pela oviposição (Hilker & Meiners 2002; Colazza et al. 2004a, b; Hilker & Meiners 2006). Estímulos químicos produzidos pelo estágio não alvo do hospedeiro (em geral adultos), como feromônios sexual e de alarme também são explorados por parasitóides, esta estratégia é conhecida como desvio infoquímico (Mattiacci et al. 1993; Conti et al. 2003; Fiaboe et al. 2003; Salerno 2006; Laumann et al. 2009). Embora pouco estudadas, pistas visuais, como cor, também são estímulos importantes durante o processo (Wäckers & Lewis 1999; Fischer et al. 2003; Lobdell et al. 2005; Rousse et al. 2007).

Após o pouso no substrato, estímulos voláteis de curto alcance como rastros químicos deixados pelo hospedeiro na caminhada (Borges et al. 2003, Conti et al. (2003, 2004; Salerno et al. 2006; Rostás & Wölfling 2009) ou fezes (Meiners e Hilker, 1997) provocam comportamento arrestante nos parasitóide retendo-os nas áreas contaminadas com estas pistas e estimulando o comportamento de busca, caracterizado por mudanças no padrão de movimentação dos insetos.

Após o contato físico a fêmea do parasitóide pode reconhecer e aceitar o hospedeiro, passos finais que conduzem à oviposição. Vinson (1985) sugeriu que os estímulos responsáveis pelo reconhecimento são químicos não voláteis, morfológicos e físicos (forma, textura ou movimento).

Durante o processo de busca de hospedeiro a resposta do parasitóide pode ser modificada pela experiência (Vet & Dick 1992). A resposta pode aumentar após um contato prévio com o hospedeiro (sensibilização) ou pela aprendizagem. Os parasitóides são capazes de associar um estímulo experimentado na presença do hospedeiro para localizar hospedeiros subseqüentes (aprendizagem associativa) (Godfray 1994).

Os parasitóides de ovos da Família Scelionidae, mais precisamente *Telenomus podisi* Ashmead, 1881 e *Trissolcus basalis* Wollaston, 1858 (Anexo 1), são importantes agentes de mortalidade de percevejos-praga (Anexo2) (Corrêa-Ferreira & Moscardi 1995; Laumann et al. 2008) e têm sido utilizados em programas de controle biológico no Brasil e no mundo (Clarke & Walter 1995; Corrêa-Ferreira & Moscardi 1996; Corrêa-Ferreira 2002; Ehler 2002).

Estes insetos respondem a estímulos associados com a presença indireta do hospedeiro como voláteis de plantas induzidos pela herbivoria de percevejos (Colazza et al. 2004a; Moraes et al. 2005, 2008), feromônios sexuais e de alarme, (Mattiacci et al. 1993; Borges et al. 1997; Colazza et al. 1999; Pires et al. 2001; Sujii et al. 2002; Conti et al. 2003, Laumann et al. 2009), sinais vibratórios produzidos durante a comunicação sexual dos percevejos (Laumann et al. 2007) e rastros deixados por percevejos (Borges et al. 2003).

Telenomus podisi e *Trissolcus basalis* são generalistas, podem atacar várias espécies de percevejos (Orr 1998), mas mostram preferência por determinadas espécies (Corrêa-Ferreira & Moscardi 1995; Medeiros et al. 1997, 1998; Sujii et al. 2002). A preferência observada em campo e em laboratório sugere que estes parasitóides respondem seletivamente a diversos sinais provenientes dos organismos que interagem na rede tri-trófica da qual formam parte. Sinais específicos dos hospedeiros preferenciais ou das interações destes com as plantas e outros elementos do ambiente podem ser utilizados para localização, reconhecimento e, finalmente, o parasitismo.

As informações em relação ao reconhecimento e aceitação de hospedeiros para os scelionídeos são escassas. Existe pouco conhecimento a respeito dos fatores (estímulos) envolvidos neste processo e dos comportamentos relacionados aos mesmos. O reconhecimento e aceitação dos hospedeiros em Scelionidae parecem ser

influenciados por características morfológicas (forma, tamanho e cor das posturas/ovos) (Borges et al. 1999) e por cairomônios presentes na secreção produzidas pelas fêmeas para unir os ovos e colá-los ao substrato. Esta secreção, de natureza química ainda desconhecida parece ser determinante para o reconhecimento do hospedeiro e para desencadear o comportamento de oviposição (Bin et al. 1993; Borges et al. 1999, Conti et al. 2003). Entretanto, a composição exata das substâncias envolvidas no processo, assim como os principais estímulos físicos relacionados aos comportamentos que conduzem a oviposição ainda são desconhecidos para os Scelionidae.

Entre as pragas da cultura de soja, os percevejos fitófagos (Ordem: Hemiptera) são os mais importantes. O percevejo marrom, *Euschistus heros* (Fabricius), o percevejo-verde-pequeno *Piezodorus guildinii* (Westwood) e o percevejo-verde *Nezara viridula* (Linnaeus), são considerados as principais pragas da cultura no Brasil (Corrêa-Ferreira & Panizzi 1999; Corrêa-Ferreira 2002).

Os percevejos se alimentam diretamente dos grãos. Durante a alimentação, inserem o estilete e removem todo o conteúdo celular ocasionando má formação de grãos e vagens. Dessa maneira, a produção de soja fica comprometida, afetando o rendimento e a qualidade das sementes (Panizzi & Slansky Junior 1985; Villas-Bôas et al. 1990; Chocorosqui & Panizzi 2004). Na atualidade, o método utilizado com exclusividade para o controle populacional de percevejos pragas é o uso de inseticidas. Geralmente, a aplicação de inseticidas é feita de forma preventiva sendo realizada de forma conjunta com outros agrotóxicos. Aplicações de inseticidas de amplo espectro também são freqüentes na fase inicial do desenvolvimento da soja sem o monitoramento dos insetos pragas com a metodologia de pano de batida (Corrêa-Ferreira et al. 2010). Essa estratégia adotada pelos sojicultores vem acarretando desequilíbrios por eliminar os inimigos naturais que ocorrem naturalmente nas lavouras de soja além de ser prejudicial para o meio ambiente e para a saúde humana.

Métodos alternativos de controle de percevejos, a fim de reduzir os danos ao meio ambiente causados pelos inseticidas, são de grande importância para a preservação dos recursos naturais. Assim, a adoção do controle biológico para o manejo de populações pragas pode contribuir para reduzir os problemas citados anteriormente.

Os parasitóides são considerados importantes agentes de controle biológicos. Entretanto, seu uso muitas vezes se vê prejudicado por basear-se em conhecimentos empíricos sem uma base científica que assegure a eficiência dos mesmos no manejo de uma população de inseto-praga.

O desenvolvimento de pesquisas orientadas ao estudo da ecologia comportamental de insetos parasitóides pode contribuir para compreender aspectos da relação hospedeiro/parasitóide, estabelecer os passos principais do comportamento de busca de hospedeiros e oviposição e identificar os sinais envolvidos nas diferentes etapas. Estas informações, além da contribuição para o avanço do conhecimento sobre a bioecologia de insetos parasitóides, são relevantes para o manejo de parasitóides visando incrementar a sua eficiência como agentes de controle biológico.

Objetivos do Trabalho

O objetivo do presente trabalho foi estudar aspectos do comportamento de busca e seleção de hospedeiros de dois parasitóides de ovos *T. basalis* e *T. podisi*, com objetivos específicos de:

1 - Identificar a influência do substrato (cor) no comportamento de busca de hospedeiros.

2 - Estudar o efeito de características morfológicas do hospedeiro, como tamanho de ovo e forma das posturas, no reconhecimento e aceitação de hospedeiros pelos parasitóides *T. basalis* e *T. podisi*.

3 - Avaliar o efeito de substâncias químicas (caimônios de contato) presentes em ovos de *Euschistus heros* na seleção (reconhecimento e aceitação) do hospedeiro pelo parasitóide *T. podisi*.

Estrutura da Dissertação

Esta dissertação está organizada em três capítulos. Em cada um deles se apresentam as metodologias e resultados obtidos em relação aos trabalhos desenvolvidos visando atingir os objetivos propostos.

Capítulo 1 - Influência das cores do substrato no comportamento de seleção de hospedeiro dos parasitóides *Telenomus podisi* e *Trissolcus basal*s (Hymenoptera: Scelionidae),

Capítulo 2 - Influência de características morfológicas de ovos de percevejos no comportamento de seleção de hospedeiros dos parasitóides *Telenomus podisi* e *Trissolcus basal*s (Hymenoptera: Scelionidae) e,

Capítulo 3 - Influência de características químicas de ovos do percevejo *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) no comportamento de seleção de hospedeiro do parasitóide *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae).

As citações no texto e as referências bibliográficas seguem as normas de publicação da revista *Animal Behaviour*.

CAPÍTULO I

Influência das cores do substrato no comportamento de seleção de hospedeiro dos parasitóides *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalis* (Hymenoptera: Scelionidae)

Introdução

Os parasitóides podem utilizar estímulos físicos como cor, movimento, tamanho, forma, som e vibração como pistas para localização do hospedeiro (Vinson 1985). Entre estes estímulos, a cor, tem se destacado tanto como pista direta, quanto através de aprendizagem associativa em relação à localização do habitat e do hospedeiro (Wardle 1990; Schmidt et al. 1993; Wäckers & Lewis 1994, 1999; Stireman 2002; Segura et al. 2007). No contexto de pistas relacionadas ao forrageamento por alimento a cor também tem sido estudada (Wäckers 1994; Lucchetta 2008; Kugimiya 2010), entretanto, os estudos mais detalhados foram realizados com polinizadores (Menzel & Schmida 1993) existindo menos volume de informação disponível no caso dos insetos parasitóides. Para os parasitóides da Família Scelionidae e, em particular, para *Telenomus podisi* Ashmead, 1881 (Hymenoptera: Scelionidae) e *Trissolcus basalis* Wollaston, 1858 (Hymenoptera: Scelionidae) não há informação sobre a interferência das cores no comportamento de busca de hospedeiros.

A cor é definida pela tonalidade ou matiz (principal comprimento de onda refletido) e pela sua refletância (percentual de luz refletida) (Rousse 2007). É percebida pelos insetos por meio dos omatídios, receptores localizados nos olhos compostos. Os Hymenoptera apresentam um sistema visual tricromático apresentando fotorreceptores para o ultravioleta, azul e verde. A sensibilidade espectral é desviada para comprimentos de ondas curtos como o ultravioleta, invisível ao homem (Peitsch et al. 1992; Briscoe & Chittka 2001; Osorio & Vorobyev 2008). A visão de cor permite aos parasitóides durante o forrageamento por alimento, principalmente espécies que são sinovigênicas e que necessitam de carboidratos para produção e maturação de ovos durante a etapa reprodutiva, se orientarem em direção as flores para encontrar os recursos alimentares (Vinson 1985; Wäckers 1994). Carboidratos aumentam a expectativa de vida de parasitóides (Siekmann et al. 2001; Winkler et al. 2006) e dessa

maneira o tempo disponível para a busca de hospedeiros. Além da sobrevivência garantida por nutrientes os parasitóides também necessitam de hospedeiros para deposição de ovos e a cor pode ser utilizada para distinguir diferentes estruturas de plantas e outros substratos onde se encontram estes recursos (Chittka 1996). Como muitos insetos fitófagos têm preferência por diversas estruturas das plantas para ovipositar, estas estruturas podem ser diferenciadas pelos parasitóides em função da cor e desta maneira selecionar os habitats ou os microhabitats onde forragear.

Nos parasitóides, o processo de seleção de hospedeiros é influenciado pela preferência inata, experiência e aprendizagem associativa (Vinson 1998). A resposta inata corresponde à reação comportamental das fêmeas dos parasitóides diante de estímulos que não experimentaram previamente. Os estímulos que são detectados e as respostas que desencadeiam são programados geneticamente e selecionados quando conferem vantagem competitiva. A experiência é definida como uma otimização (redução) do tempo exigido para manipular e aceitar o hospedeiro após encontros repetidos de localização e oviposição no hospedeiro. O terceiro fator que interfere e contribui para otimizar o forrageamento é a aprendizagem associativa que é uma das soluções encontradas por parasitóides para resolver o problema da confiabilidade/detectabilidade de um estímulo (Vet & Dicke 1992; Vinson 1998). A aprendizagem associativa é a associação de novos estímulos experimentados durante a procura e/ou contato com um hospedeiro ao longo da vida do parasitóide. Os parasitóides podem associar estes novos estímulos com a presença de hospedeiros e utilizá-los para otimizar a busca e seleção dos mesmos. (Turlings et al. 1993; Vinson 1998).

A resposta inata pode ser modificada durante a vida adulta através da experiência, e a aprendizagem pode influenciar nesse processo (Vet et al. 1990; Lewis et al. 1990). Evidências indicam que o mecanismo de aprendizagem associativa pode ser utilizado por insetos na busca por hospedeiros (Segura et al. 2007). E no contexto de busca por alimento, respostas iniciais inatas foram modificadas por aprendizagem associativa (Stireman 2002; Lucchetta et al. 2008).

A aprendizagem é reforçada quando o ambiente não muda muito rápido dentro do ciclo de vida dos indivíduos (baixa variabilidade dentro de uma geração), mas tende a mudar de forma imprevisível de uma geração a outra (Stephens 1993).

Desta maneira a aprendizagem associativa confere aos parasitóides plasticidade de resposta frente a diferentes estímulos e confere a vantagem seletiva de permitir-lhes

explorar diferentes hospedeiros em diferentes ambientes, o que é de grande importância para parasitóides oligófagos ou polífagos.

Os estudos de busca e seleção de hospedeiros mediados por pistas visuais tem se concentrado em parasitóides de larvas e pupas, e praticamente não há conhecimentos neste contexto para parasitóides de ovos. Os ovos de insetos constituem um recurso efêmero (curta duração no tempo) e de difícil detecção no ambiente (baixa aparência devido ao tamanho, ausência de químicos voláteis e muitas vezes colocados em condições crípticas). Assim, a cor do substrato e dos próprios ovos poderiam ser utilizadas por parasitóides durante a busca de hospedeiros. O objetivo deste trabalho foi investigar se as fêmeas de parasitóides de ovos são capazes de associar a presença do hospedeiro (ovos de *E. heros*) com pistas visuais (cor do substrato). As hipóteses deste trabalho foram: 1- Os parasitóides *T. podisi* e *T. basalis* respondem diferencialmente à cor do substrato durante a busca e seleção de hospedeiros e 2- A resposta inata dos parasitóides à cor do substrato pode ser modificada por aprendizado associativo.

Material e Métodos

Criação de Insetos

As colônias do percevejo *Euschistus heros* e dos parasitóides de ovos *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalis* foram mantidas em laboratório em sala climatizada sob 26°C ± 2°C, 60 ± 10% de umidade relativa e 14:10 horas de fotofase e escotofase, respectivamente, no laboratório de Semioquímicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília DF, Brasil.

Percevejos

Adultos de *Euschistus heros* foram mantidos em gaiolas plásticas de 8 L com sementes de amendoim (*Arachis hypogaea*), soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e girassol (*Helianthus annuus* (L.)) coladas com cola branca (não tóxica, lavável) em cartelas de papel (10 cm de comprimento x 8 cm de largura) e vagens frescas de feijão (*Phaseolus vulgaris* (L.)) como dieta natural. Para permitir a circulação de ar a parte superior da gaiola foi forrada com tecido tipo organza. Água foi oferecida em potes plásticos de 350 mL com tampa. Um pavio de algodão hidrófilo foi colocado no centro da tampa. Telas de nylon de 15 cm² foram colocadas nas gaiolas servindo como substrato para

oviposição. Os ovos coletados foram colocados em placa de Petri (9 cm de diâmetro) e após a eclosão das ninfas as mesmas foram alimentadas com sementes e vagens até atingirem o terceiro instar. A partir desse estágio as ninfas foram transferidas para gaiolas plásticas contendo a dieta descrita anteriormente (Borges et al. 2006; Silva et al. 2007). Para obtenção de ovos com idade conhecida, as posturas foram coletadas diariamente para a utilização nos experimentos.

Parasitóides

Casais de *Trissolcus basal* e *Telenomus podisi* foram mantidos em gaiolas plásticas (cultura de tecido de 25 cm² - ICN Biomedicals, Irvine, CA) tampadas com um chumaço de algodão. Mel foi oferecido como alimento para os adultos. Ovos de *E. heros* foram oferecidos como hospedeiro e deixados por 48 h para permitir a oviposição do parasitóide. Após esse período os ovos foram transferidos para outra gaiola de mesmas dimensões para incubação. As fêmeas de ambas as espécies utilizadas nos bioensaios foram acasaladas, sem experiência de oviposição e apresentavam 24 – 48 h de idade adulta.

Procedimento geral para os experimentos com cores

Todos os experimentos foram conduzidos em sala climatizada conforme descrito anteriormente para a criação de insetos e iluminação com luz fluorescente (4 x 40 w – intensidade 450 Lux). Os substratos utilizados nos experimentos foram papéis coloridos Reipel Color Set (amarelo n° 418, verde n° 428, branco n°437, laranja n°420, marrom n° 431 e preto n°432; sistema CMYK). Esses papéis foram dispostos em arenas fechadas formadas por placas de Petri de 15 cm de diâmetro x 2,5 cm de altura de maneira a formar áreas coloridas equidistantes.

As cores selecionadas se assemelhavam às cores de plantas e/ou de ovos de percevejos. *T. podisi* e *T. basal* parasitam ovos de percevejos de diferentes cores (amarelo, bege, preto, verde e marrom), estes ovos são depositados em diferentes estruturas das plantas hospedeiras (p. ex. vagens, caules e folhas de soja) que também variam na cor com diferentes tonalidades de verde ou marrom, dependendo do estágio de desenvolvimento da planta.

Para estabelecer com precisão a cor dos substratos utilizados nos experimentos e eliminar a subjetividade dos padrões de cores percebidos pelo olho humano foram

realizadas medidas espectrais dos substratos (Figura 1.1) utilizando espectrofotômetro USB 2000 (Ocean Optics) conectado a um laptop PC sob a iluminação de luz fluorescente da sala onde se realizaram os bioensaios. Uma fibra óptica (R 400-7-UV-VIS, Ocean Optics), ligada ao espectrômetro, capta a luz refletida de cada substrato colorido em relação a uma superfície padrão de refletância (sulfato de bário). A superfície padrão, também denominada de branco total, reflete todos os comprimentos de onda que nela incidem. Para o espectrofotômetro todas as medidas de refletância obtidas foram normalizadas em relação à superfície de sulfato de bário, utilizando-o como referência. A fibra óptica foi colocada a 1 cm do item coletado e a 45° do mesmo, para padronizar a coleta de dados e minimizar a captação da reflexão especular.

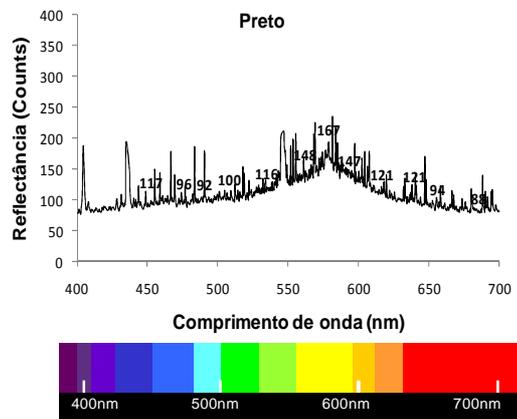
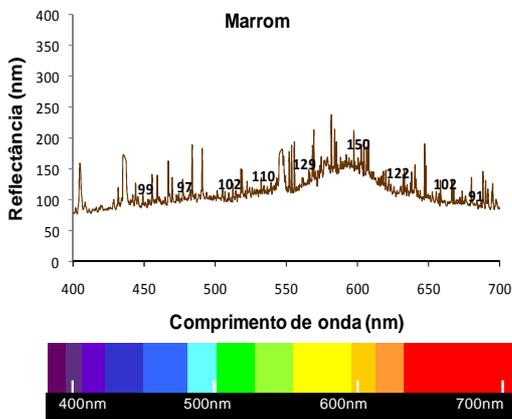
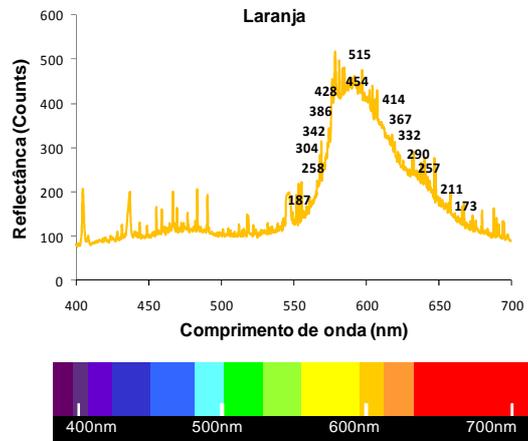
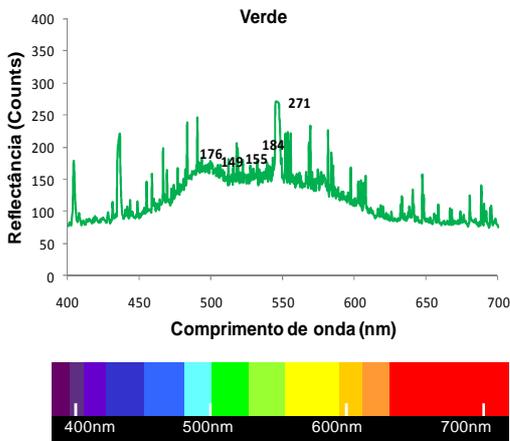
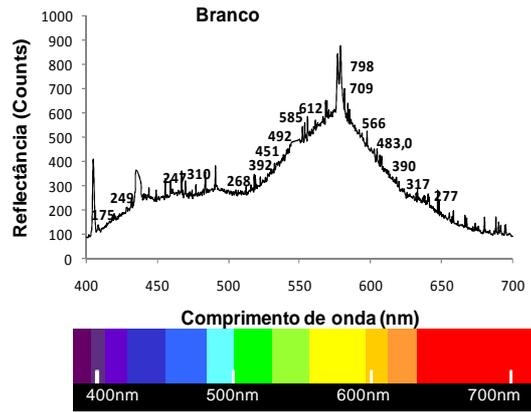
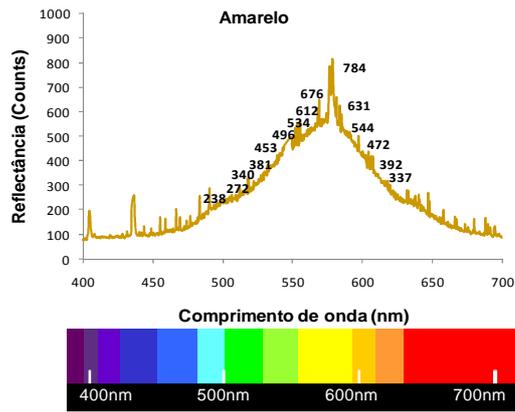


Figura 1.1 Medidas espectrais do comprimento de onda refletido por diferentes substratos coloridos seguida pela faixa do espectro eletromagnético visível. Os números posicionados sobre os picos em cada figura representam a refletância do comprimento de onda emitido por cada cor de substrato. Foram empregadas algumas figuras com escalas menores para melhor percepção do comprimento de onda refletido.

Experimento para avaliação da preferência inata de cores

O objetivo deste experimento foi verificar se há uma preferência inata dos parasitóides para uma determinada cor. As arenas anteriormente descritas foram divididas em cinco áreas coloridas (amarelo, verde, marrom, preto e branco). A divisão de cada área foi baseada em ângulos com auxílio de transferidor. Cada área foi determinada por um ângulo de 48° , medido desde o centro da placa até a parede externa da arena. As áreas foram separadas por espaços delimitados por ângulos de 24° . Dessa maneira, as áreas ficaram equidistantes entre si. Na borda externa da arena as áreas foram complementadas com uma área vertical de 2,5 cm de altura e 3,5 cm de largura. Posturas de *E. heros* ($n = 10$ ovos) foram inseridas no fundo de cada área (Figura 1.2). Uma fêmea de *T. podisi* ou *T. basalis* foi introduzida no centro da arena e sua escolha registrada. Foi considerada escolha quando a fêmea permaneceu por pelo menos 10 segundos num dos substratos. Posteriormente, a fêmea foi mantida na arena por um período de 6 horas para parasitismo. Foram testadas 80 fêmeas de cada espécie de parasitóide.

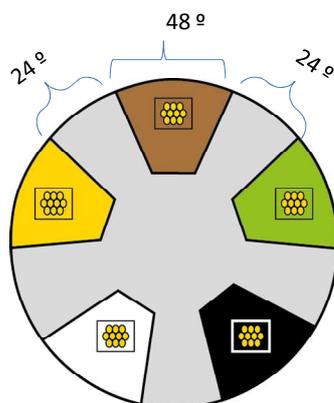


Figura 1.2 Esquema ilustrativo em vista superior da arena (15 cm de diâmetro) utilizada no experimento de preferência inata. As áreas coloridas representam os substratos contendo ovos de *E. heros*.

Aprendizagem associativa

O objetivo deste experimento foi avaliar a capacidade do inseto de associar a cor do substrato à presença do recurso (ovos de *E. heros*), após experiência(s) de oviposição. As cores mais (amarelo) e menos (preto) selecionadas no experimento de

preferência inata foram utilizadas neste experimento. Uma cor adicional, de comprimento de onda próximo ao amarelo: a cor laranja, também foi selecionada. Este experimento envolveu diferentes bioensaios nos quais cada fêmea experimentou: sessão treino (2 horas) (ver definição das seções abaixo), seguido de repouso (uma hora); uma segunda sessão de treino (duas horas), seguido novamente de repouso (uma hora) e de uma sessão teste para registro da escolha da cor do substrato. Na sessão teste as fêmeas foram mantidas por seis horas para parasitismo. Os bioensaios realizados são detalhados a seguir.

Escolha múltipla

Sessão treino: Placas de Petri de 6 cm de diâmetro x 2,5 cm de altura foram cobertas completamente por substrato preto e no centro da placa uma postura de *E. heros* com 10 ovos (Figura 1.3). Fêmeas de *T. podisi* e *T. basalis* foram treinadas neste substrato seguindo a seqüência de treino-repouso descrita anteriormente.

Sessão de repouso: as fêmeas dos parasitóides foram mantidas individualizadas em tubos de ensaio de 7 cm de comprimento x 1,5 cm de diâmetro por uma hora antes de uma nova sessão de treino ou da sessão teste.

Sessão teste: Após o treinamento, as fêmeas foram inseridas em arena de múltipla escolha (segundo a descrição acima) contendo as cores amarelo, verde, marrom, preto e branco, todas as áreas coloridas possuíam no centro uma postura com 10 ovos de *E. heros*. Este experimento teve o intuito de verificar se a fêmea associava a cor ao recurso (objetivo do experimento de aprendizagem associativa), mesmo na sessão teste contendo a cor que foi escolhida no experimento de preferência inata. Foram testadas 25 fêmeas de cada espécie de parasitóide (Figura 1.4).

O tempo de treinamento de duas horas foi escolhido para tentar manter a motivação para a busca por hospedeiro. O tempo total considerando as duas sessões treino e sessão teste e o número de ovos estão dentro do período de exploração de massa de ovos para *T. basalis* em ovos de *Nezara viridula* (Cusumano et al. 2011).

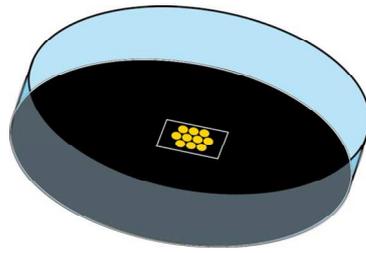


Figura 1.3 Esquema ilustrativo da arena (6 cm de diâmetro) utilizada nas sessões de treinamento do experimento de escolha múltipla

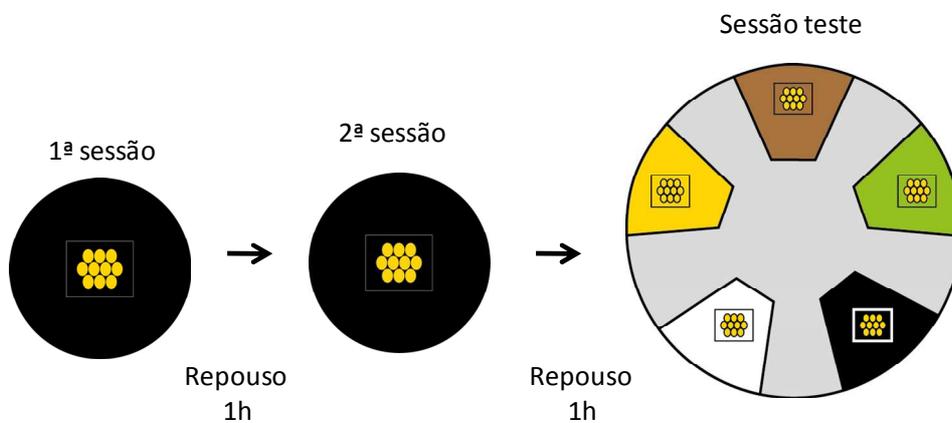


Figura 1.4 Esquema ilustrativo do experimento de escolha múltipla com detalhe das arenas utilizadas e a seqüência das sessões de treino, repouso e teste. A arena da sessão teste apresentava 15 cm de diâmetro.

Escolha dupla

As arenas utilizadas para treinamento e teste foram de 15 cm de diâmetro para permitir que o inseto caminhasse e procurasse pelo hospedeiro. As arenas foram divididas em duas áreas. A divisão de cada área foi baseada em ângulos com auxílio de transferidor. Cada área foi determinada por um ângulo de 64° , medido desde o centro da placa até a parede externa da arena (Figura 1.5). As áreas foram separadas por espaços delimitados por ângulos de 116° . Dessa maneira, as áreas ficaram equidistantes entre si. Para cada combinação de cores foram testadas de 20 a 25 fêmeas de cada espécie de parasitóide. Foram conduzidos uma série de experimentos conforme a seguir:

- Treinamento em substrato de cor laranja com hospedeiro e teste de escolha com substratos de cores amarelo e laranja ambos com hospedeiro (Figura 1.6 A).
- Treinamento em substrato de cor verde com hospedeiro e teste de escolha com substratos de cores verde e amarelo ambos com hospedeiro (Figura 1.6 B).
- Treinamento em substratos de cor laranja (com hospedeiro) e amarelo (sem hospedeiro), após escolha entre substratos laranja e amarelo ambos com hospedeiro (Figura 1.6 C).
- Treinamento em substratos de cor marrom (com hospedeiro) e verde (sem hospedeiro) e após, escolha entre substratos verde e marrom ambos com hospedeiro (Figura 1.6 D).
- Treinamento em substratos verde (com hospedeiro) e marrom (sem hospedeiro) e após, escolha entre substratos verde e marrom ambos com hospedeiros (Figura 1.6 E).

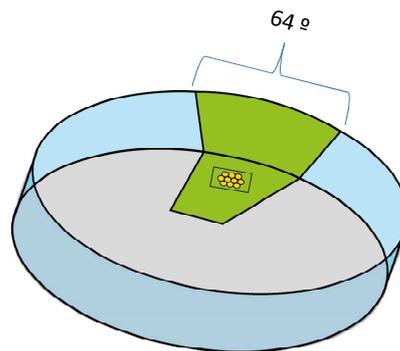


Figura 1.5 Esquema ilustrativo de arena utilizada nos experimentos de escolha dupla com o substrato recobrendo uma pequena porção da parede da arena e pequena parte do fundo.

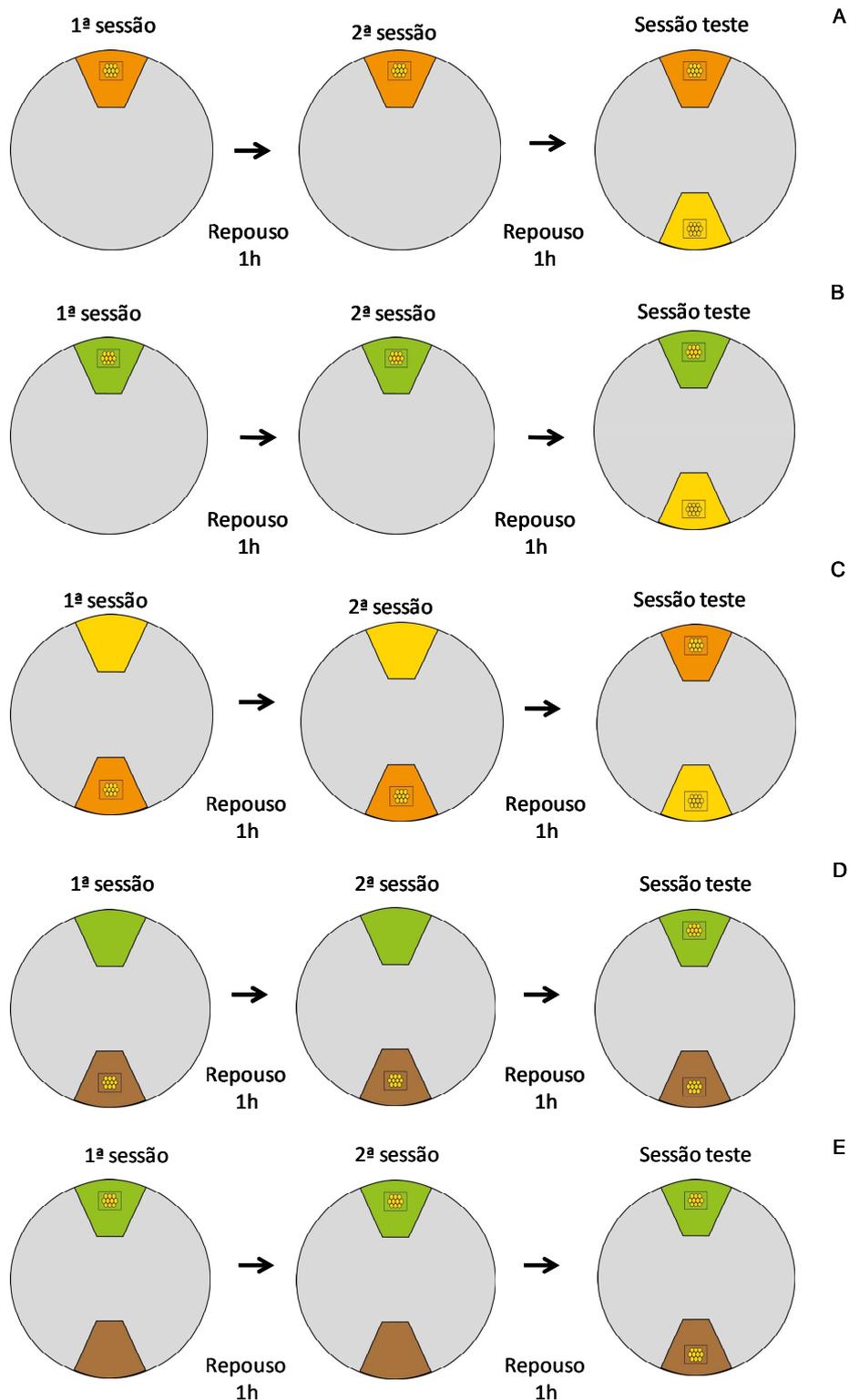


Figura 1.6 Esquema ilustrativo dos experimentos de escolha dupla. A – Treinamento em um único substrato, verde. B – Treinamento em um único substrato laranja. C – Treinamento em dois substratos: amarelo e laranja (com hospedeiro). D – Treinamento em dois substratos: marrom (com hospedeiro) e verde. E – Treinamento em dois substratos: marrom e verde (com hospedeiro).

Análise Estatística

As escolhas por substratos de diferentes cores foram analisadas através de teste χ^2 testando se a escolha por diferentes cores foi significativamente diferente do acaso (todas as cores com a mesma chance de serem escolhidas). Para avaliar a influência da cor no parasitismo os valores médios de proporção de ovos parasitados foram comparados através de modelos lineares generalizados (GLM) e Análise de Deviança, utilizando distribuição binomial de erros nos modelos (Zuur et al. 2009). Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa R 2.10.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM 2009).

Resultados

Preferência inata

As duas espécies de parasitóides mostraram diferenças na preferência pelas cores do substrato, quando avaliada através da escolha inicial (teste $\chi^2 = 42,12$ $P < 0,001$ para *T. podisi* e $\chi^2 = 49,62$ $P < 0,001$ para *T. basalis*). Ambos os parasitóides escolheram preferencialmente substratos de cor amarela, sendo que o substrato de cor preta foi o menos atrativo para ambas as espécies (Figura 1.7). Adicionalmente, *T. podisi* parasitou maior número de ovos que se encontravam no substrato amarelo em comparação aos ovos que estavam sobre outras cores (GLM e Análise de Deviança $z = 438,70$ $P < 0,001$) (Figura 1.8). Situação similar foi observada em *T. basalis* que mostrou maiores índices de parasitismo em substratos das cores amarelo e verde (GLM e Análise de Deviança $z = 503,25$ $P = 0,001$) (Figura 1.8).

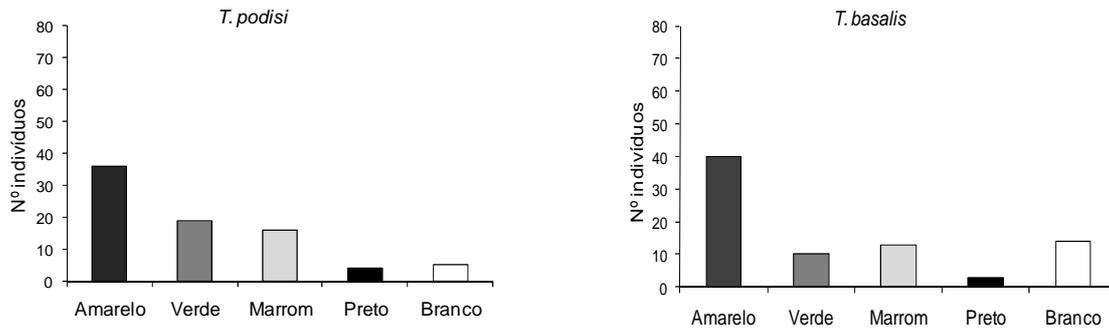


Figura 1.7 Escolha inicial (número de insetos que escolheram cada cor) dos parasitóides *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalís* por substratos de diferentes cores quando avaliados em experimentos de preferência inata.

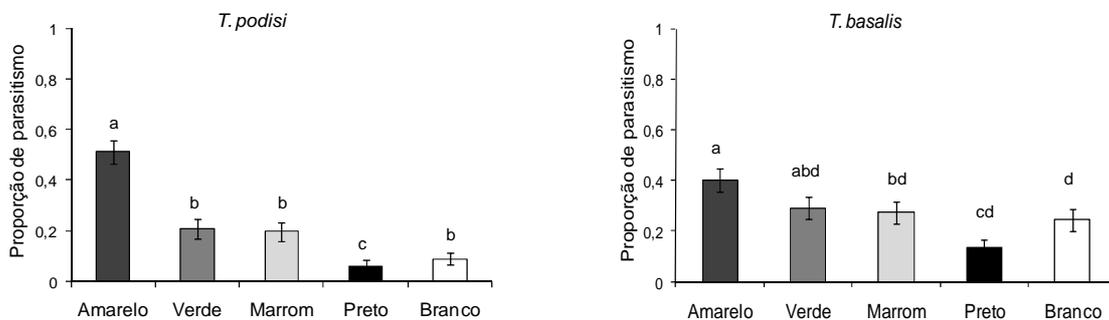


Figura 1.8 Proporção de parasitismo (media \pm EP) por fêmeas de *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalís* em ovos de *E. heros* presentes em substratos de diferentes cores. As barras com mesmas letras minúsculas não apresentam diferenças significativas nos valores médios da proporção de parasitismo (GLM e Análise de Deviança $P > 0,05$).

Múltipla escolha

Após treinamento em substrato de cor preta as fêmeas de *T. podisi* e *T. basalís* foram mais atraídas, em bioensaios de múltipla escolha, pela cor amarela, o que sugere que não houve associação entre estímulo e sucesso reprodutivo (Figura 1.9). Para as duas espécies de parasitóides foram encontradas diferenças significativas na escolha inicial por substratos de diferentes cores (Teste $\chi^2 = 48,93$ $P < 0,001$ para *T. podisi* e $\chi^2 = 10,26$ $P = 0,03$ para *T. basalís*) sendo mantida a preferência pela cor amarela (Figura 1.9). Nestes experimentos nenhuma fêmea de *T. podisi* mostrou resposta a substratos de cores pretas. Da mesma maneira a proporção de ovos parasitados não ocorreu ou foi menor em substratos de cor preta em relação aos substratos de outras cores (Análises de GLM e de Deviança $z = 100,56$ $P < 0,001$ para *T. podisi* e $z = 144,12$ $P < 0,03$ para *T. basalís*) (Figura 1.10).

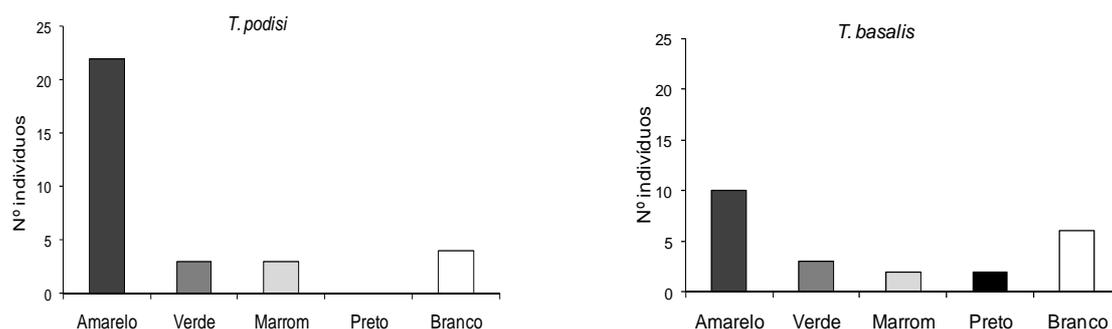


Figura 1.9 Escolha inicial (número de insetos que escolheram cada cor) dos parasitoides *Telenomus podisi* e *Trisolcus basalis* por substratos de diferentes cores quando avaliados em experimentos de múltipla escolha.

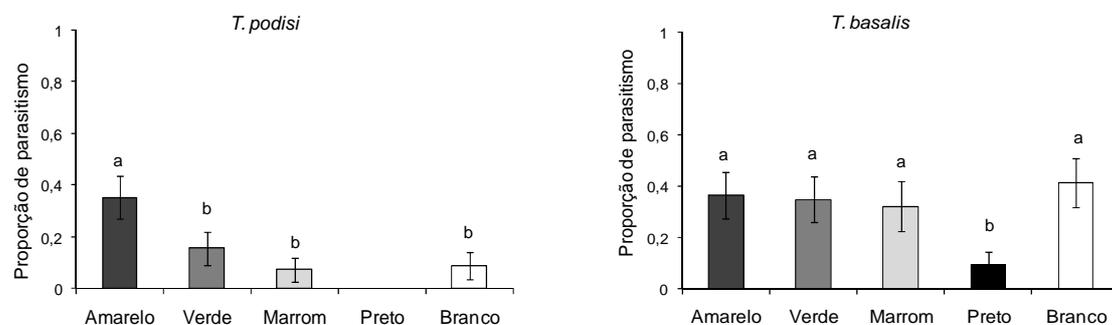


Figura 1.10 Proporção de parasitismo (media \pm EP) por fêmeas de *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalis* em ovos de *E. heros* presentes em substratos de diferentes cores. As barras com mesmas letras minúsculas não apresentam diferenças significativas nos valores médios da proporção de parasitismo (GLM e Análise de Deviança $P > 0,05$).

Dupla escolha

No primeiro experimento de escolha dupla no qual o treinamento foi desenvolvido apenas em substrato laranja os parasitoides mostraram resposta diferenciada. *T. podisi* mostrou preferência pelo substrato de cor amarela e *T. basalis* não discriminou entre as cores do substrato sendo suas escolhas não significativamente diferentes do esperado pelo acaso, (Teste $\chi^2 = 6,36$ $P = 0,01$ para *T. podisi* e $\chi^2 = 1,31$ $P = 0,25$ para *T. basalis*) (Figura 1.11). Os índices de parasitismo seguiram a mesma tendência (Análise GLM $t = 2,24$ $P = 0,02$ para *T. podisi* e $t = 1,02$ $P = 0,31$ para *T. basalis*) (Figura 1.12).

O treinamento em substrato verde continuou a revelar a tendência de preferência para a cor amarela (Figura 1.13). A preferência para o substrato amarelo foi significativa apenas para *T. basalis* (Teste $\chi^2 = 2,90$ $p = 0,08$ para *T. podisi* e $\chi^2 = 11,3$ $P < 0,001$ para *T. basalis*). Entretanto, os índices de parasitismo em substratos de ambas as cores foram diferentes somente em *T. podisi* onde se observou maior proporção de ovos parasitados no substrato da cor amarela (Análise GLM $t = 1,951$ $P = 0,05$ para *T. podisi* e $t = 0,68$ $P = 0,49$ para *T. basalis*) (Figura 1.14).

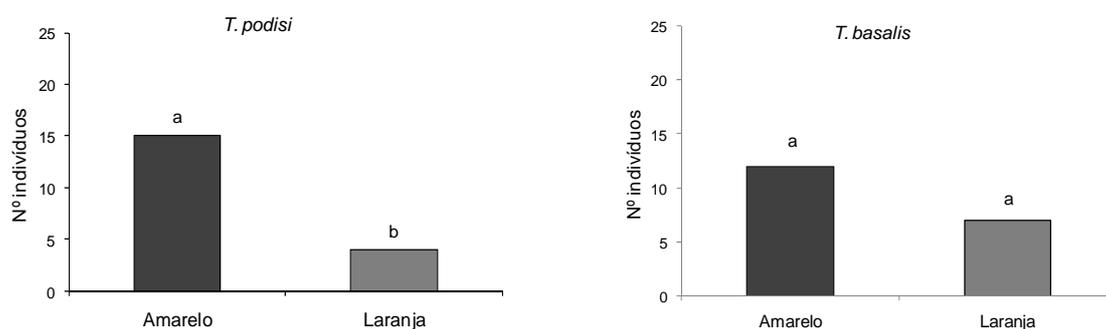


Figura 1.11 Escolha inicial (número de insetos que escolheram cada cor) dos parasitóides *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalis* por substratos de diferentes cores após treinamento em substrato laranja com hospedeiro (ovos de *E. heros*). Mesmas letras minúsculas não apresentam diferenças significativas (Teste χ^2 $P > 0,05$).

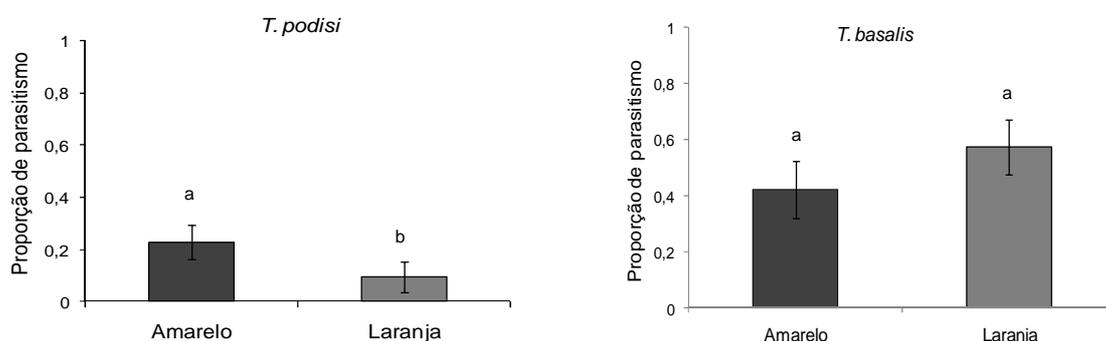


Figura 1.12 Proporção de parasitismo (media \pm EP) por fêmeas de *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalis* em ovos de *E. heros* presentes em substratos de diferentes cores na sessão teste. As barras com mesmas letras minúsculas não apresentam diferenças significativas nos valores médios da proporção de parasitismo (GLM $P > 0,05$).

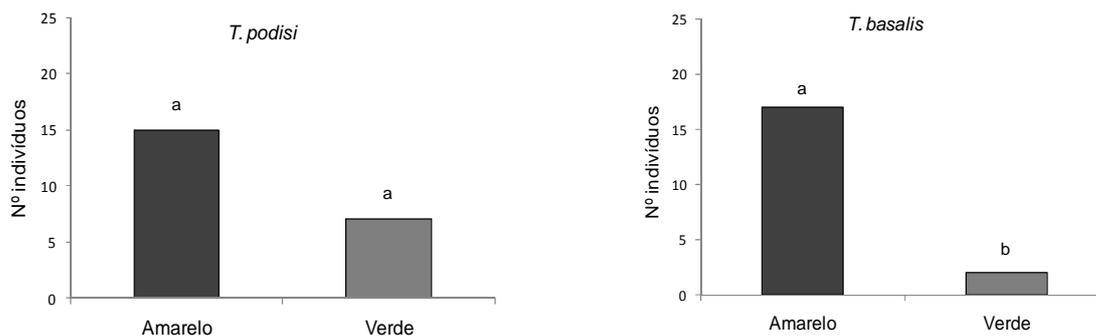


Figura 1.13 Escolha inicial (número de insetos que escolheram cada cor) dos parasitóides *Telenomus podisi* e *Trisolcus basalis* por substratos de diferentes cores após treinamento em substrato verde com hospedeiro (ovos de *E. heros*). Mesmas letras minúsculas não apresentam diferenças significativas (Teste χ^2 P > 0,05).

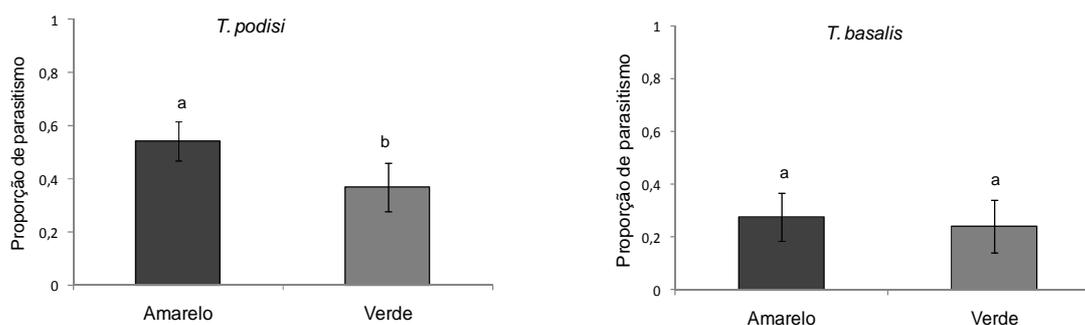


Figura 1.14 Proporção de parasitismo (media \pm EP) por fêmeas de *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalis* em ovos de *E. heros* presentes em substratos de diferentes cores na sessão teste. As barras com mesmas letras minúsculas não apresentam diferenças significativas nos valores médios da proporção de parasitismo (GLM P > 0,05).

Quando os insetos foram treinados utilizando dois substratos, cor preferida (amarelo) e laranja (sendo os ovos de *E. heros* posicionados apenas nesta cor), os parasitóides continuaram não associando a cor ao recurso nas sessões teste (Figura 1.15). A primeira escolha foi orientada para o substrato amarelo resultando em diferenças significativas para *T. podisi* (Teste $\chi^2 = 6$ P = 0,01). As fêmeas de *T. basalis* não mostraram preferência (Teste $\chi^2 = 0,04$ P = 0,82). Em relação ao parasitismo nesses substratos, os índices de parasitismo não foram significativamente diferentes nos substratos das duas cores (Análise de GLM t = -0,883 P = 0,377 para *T. podisi* e t = -0,310 P = 0,757 para *T. basalis*) (Figura 1.16).

Após verificar que os parasitóides não mostraram aprendizagem associativa quando a cor preferida esteve presente nos experimentos, as cores verde e marrom foram selecionadas para estudar se os parasitóides apresentam a capacidade de associar a cor ao recurso. Primeiramente, treinando em marrom e verde, mas o hospedeiro presente apenas em substrato marrom não se observou preferência pelo substrato (Teste $\chi^2 = 1,08$ $P = 0,29$ para *T. podisi* e $\chi^2 = 1,28$ $P = 0,25$ para *T. basalis*) (Figura 1.17). Os ovos posicionados sobre ambos os substratos foram parasitados com a mesma proporção (Análise de GLM $t = -0,895$ $P = 0,371$ para *T. podisi* e $t = 0,591$ $P = 0,5548$ para *T. basalis*) (Figura 1.18). Posteriormente, o treinamento ocorreu novamente nos substratos de mesma cor, porém o recurso posicionado em substrato verde. Neste bioensaio, apenas *T. basalis* associou a cor ao recurso na sessão teste, escolhendo preferencialmente o substrato verde (Teste $\chi^2 = 8,16$ $P = 0,004$). *T. podisi* não apresentou preferência por cor (Teste $\chi^2 = 0$ $p = 1$) (Figura 1.19). As cores não influenciaram os índices de parasitismo em substratos de ambas as cores (Análise de GLM $t = 0,883$ $P = 0,377$ para *T. podisi* e $t = 0,639$ $P = 0,523$ para *T. basalis*) (Figura 1.20).

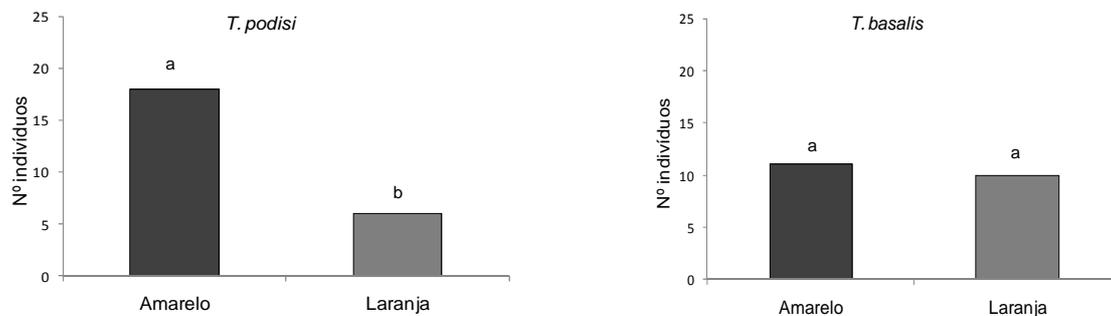


Figura 1.15 Escolha inicial (número de insetos que escolheram cada cor) dos parasitóides *Telenomus podisi* e *Trisolcus basalis* por substratos de diferentes cores após treinamento em substratos amarelo sem hospedeiro e laranja com hospedeiro (ovos de *E. heros*). Mesmas letras minúsculas não apresentam diferenças significativas (Teste χ^2 $P > 0,05$).

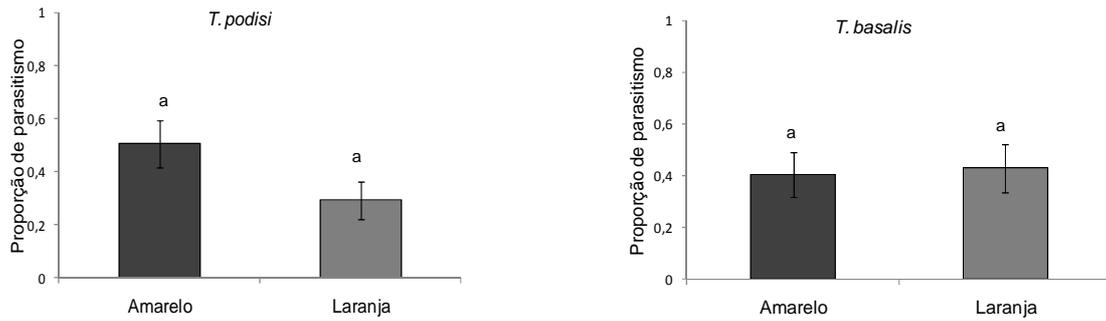


Figura 1.16 Proporção de parasitismo (media \pm EP) por fêmeas de *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalís* em ovos de *E. heros* presentes em substratos de diferentes cores na sessão teste. As barras com mesmas letras minúsculas não apresentam diferenças significativas nos valores médios da proporção de parasitismo (GLM $P > 0,05$).

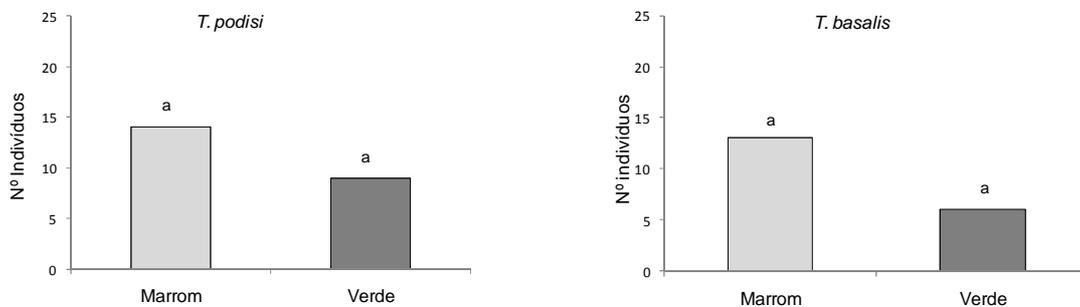


Figura 1.17 Escolha inicial (número de insetos que escolheram cada cor) dos parasitóides *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalís* por substratos de diferentes cores após treinamento em substrato marrom com hospedeiro (ovos de *E. heros*) e verde sem hospedeiro. Mesmas letras minúsculas não apresentam diferenças significativas (Teste $\chi^2 P > 0,05$).

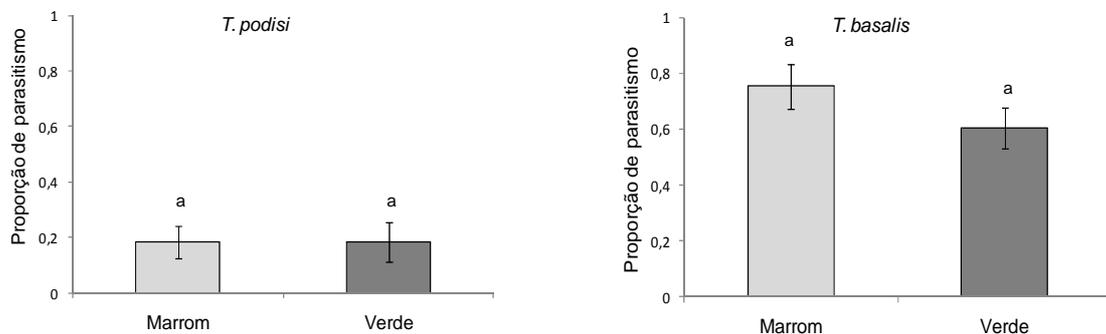


Figura 1.18 Proporção de parasitismo (media \pm EP) por fêmeas de *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalís* em ovos de *E. heros* presentes em substratos de diferentes cores na sessão teste. As barras com mesmas letras minúsculas não apresentam diferenças significativas nos valores médios da proporção de parasitismo (GLM $P > 0,05$).

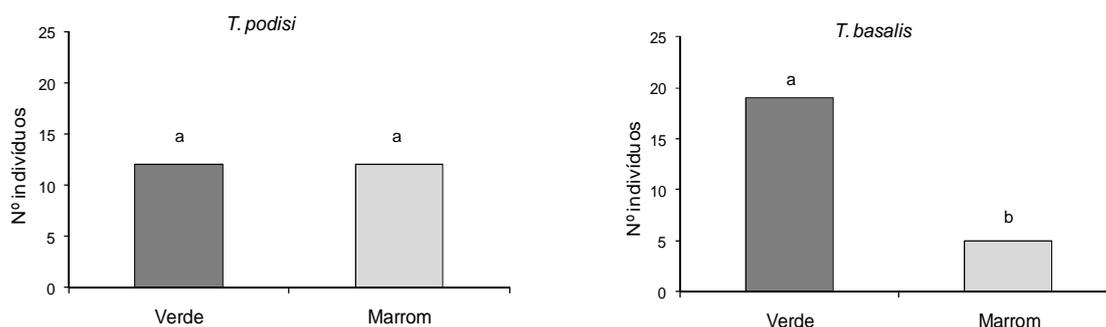


Figura 1.19 Escolha inicial (número de insetos que escolheram cada cor) dos parasitóides *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalís* por substratos de diferentes cores após treinamento em substrato verde com hospedeiro (ovos de *E. heros*) e marrom sem hospedeiro. Mesmas letras minúsculas não apresentam diferenças significativas (Teste $\chi^2 P > 0,05$).

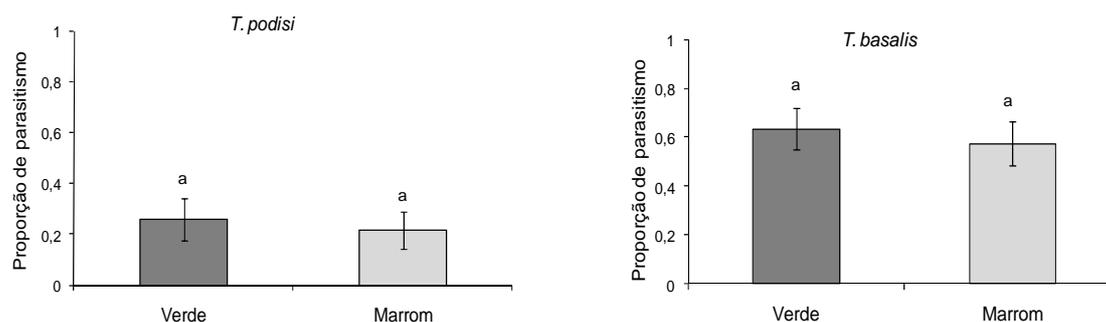


Figura 1.20 Proporção de parasitismo (media \pm EP) por fêmeas de *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalís* em ovos de *E. heros* presentes em substratos de diferentes cores na sessão teste. As barras com mesmas letras minúsculas não apresentam diferenças significativas nos valores médios da proporção de parasitismo (GLM $P > 0,05$).

Discussão

Os parasitóides *T. podisi* e *T. basalis* mostraram uma preferência inata pelos substratos de cor amarela. A preferência para esta cor não foi modificada no experimento de aprendizagem associativa, as fêmeas dos parasitóides escolheram os substratos de cor amarela (na sessão teste) ainda quando os mesmos não tinham recursos (ovos de *E. heros*) nas sessões de treinamento. Nos experimentos de aprendizagem associativa sem substratos amarelos, os parasitóides foram pouco influenciados pela cor do substrato onde se encontrava o recurso.

Evidências obtidas de estudos de laboratório e campo relatam a preferência de *T. podisi* por ovos de *Euschistus heros* e *T. basalis* por ovos *Nezara viridula* (Corrêa-Ferreira & Moscardi 1995; Pacheco & Corrêa-Ferreira, 2000; Sujii et al. 2002). A preferência pela cor amarela observada neste trabalho poderia estar relacionada com a cor dos ovos de hospedeiros preferenciais, sendo amarelo para *E. heros* e entre amarelo claro e bege para *N. viridula*, entretanto esta hipótese deve ser avaliada em experimentos com massas de ovos (naturais e/ou artificiais) de diferentes cores.

No espectro visível, a tonalidade amarela absorve radiações de comprimentos de ondas curtos como azul e violeta e reflete comprimentos de onda das cores verde, amarelo, laranja-vermelho (Mazokhin-Porshnyakov 1969). As medidas de refletância de substrato para a cor amarela realizadas neste trabalho confirmam isto, houve picos pronunciados na região do verde – amarelo (Figura 1.1). Os Hymenoptera possuem receptores sensoriais para radiações na faixa do verde/amarelo (Peitsch et al. 1992; Briscoe & Chittka 2001; Osorio & Vorobyev 2008) o que justifica, desde o ponto de vista fisiológico, a resposta a substratos de cor amarela observada neste trabalho.

A maioria de insetos diurnos é atraída por cores de tonalidade amarela, pois esta cor age como um estímulo supernormal já que emite radiações na faixa do espectro visível similares à folhagem, mas com maior intensidade (Schoonhoven et al. 2008). Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que *T. basalis* e *T. podisi* poderiam responder seletivamente à cor amarela e de forma inata a cores relacionadas com o hábitat do hospedeiro. Parasitóides de ovos têm respostas inatas para pistas derivadas do hospedeiro (Vet et al. 1995). Entretanto, respostas inatas associadas a pistas relacionadas ao hábitat podem ser observadas quando as mesmas indicam com previsibilidade a presença do hospedeiro apropriado. A refletância na região do verde emitida pelo substrato amarelo, observada neste trabalho, poderia, também, representar uma pista relacionada ao hábitat do hospedeiro (plantas) e, provavelmente, a resposta possa ser indicativa do uso da cor do substrato durante a busca e seleção de hospedeiros.

A intensidade de refletância pode ter sido outro fator que influenciou a resposta dos insetos. Em comparação a outras cores e nas condições de experimentação, o substrato de cor amarelo mostrou maior intensidade de refletância segundo as medidas espectrais realizadas (Figura 1.1). Segundo Schoonhoven et al. (2008) insetos usam as diferenças na intensidade de refletância entre espécies de plantas ou entre folhas dentro de uma mesma planta como critério de seleção visual das plantas hospedeiras. Ainda conforme esses autores, apesar das plantas serem verdes, emitindo um comprimento de

onda dominante na faixa de 500-580 nm, a intensidade de luz refletida pode variar entre as espécies de planta devido à presença de tricomas ou cristais de cera na superfície da folha.

Outro aspecto a considerar na orientação de parasitóides a substratos coloridos é o estado nutricional das fêmeas. Os parasitóides adultos que não se alimentam do hospedeiro, como é o caso dos insetos utilizados neste trabalho, enfrentam um *trade-off* entre busca de hospedeiro ou de alimento (Bernstein & Jervis 2008). Assim, os parasitóides devem alocar o tempo para cada atividade integrando a informação em três parâmetros: a probabilidade de encontrar alimento, estado interno (reservas metabólicas) e disponibilidade de hospedeiro (Sirot & Bernstein 1996; Tenhumberg et al. 2006). Wäckers (1994), em um experimento em laboratório para verificar o efeito da privação de alimento na preferência visual do parasitóide *Cotesia rubecula* (Hymenoptera: Braconidae), mostrou que quando os indivíduos eram alimentados, a preferência se concentrava em alvos de cor verde, porém, quando o parasitóide foi privado de alimento preferia alvos amarelos, indicando uma adaptação para o forrageamento por alimento (néctar ou outras substâncias açucaradas das flores) quando a escolha era a cor amarela. Os parasitóides utilizados neste trabalho não foram privados de alimentos, desta maneira a preferência observada pelos substratos de cor amarela não seria resultado do forrageamento por alimento. Esta hipótese deve ser avaliada em trabalhos futuros utilizando parasitóides em diferentes condições de alimentação.

Em várias espécies de parasitóides foi constatado aprendizado associativo para pistas relacionadas com o hábitat e com o hospedeiro (Wardle 1990; Schmidt et al. 1993; Segura et al. 2007). No presente trabalho os parasitóides não foram condicionados para cores de substratos onde encontraram e parasitaram ovos de *E. heros*, não se constatando aprendizagem associativa.

A capacidade dos parasitóides de ovos para o aprendizado associativo tem sido um assunto intensamente debatido na literatura. O aprendizado associativo nos parasitóides tem sido associado com insetos que procuram por recursos em ambientes altamente variáveis em tempo e espaço. Adicionalmente, parasitóides com comportamentos complexos devem realizar um grande número de escolhas durante a procura por hospedeiros e nestes casos o aprendizado associativo seria adaptativo (Vet et al. 1995). Como os parasitóides de ovos apresentam curta longevidade e capacidade de busca limitada, associado ao fato de procurar por recursos relativamente abundantes em comparação a outros estágios como larvas ou pupas (Fatouros et al. 2008), não seria

esperado encontrar com frequência aprendizado associativo nestes insetos (Vet et al. 1995). Entretanto, devido aos ovos serem um recurso de difícil detecção e inconspícuo (tamanho pequeno e ausência de sinais químicos), vários autores tem proposto que o aprendizado associativo, principalmente relacionando semioquímicos de plantas, pode ser um fato comum nos parasitóides de ovos (Vet et al. 1995; Vinson 1998; Fatouros et al. 2008).

Os resultados obtidos sugerem que para os parasitóides avaliados, a resposta a cores de substratos é fortemente inata com pouca influência da experiência do parasitóide em substratos de diferentes cores onde se obteve sucesso reprodutivo. A resposta inata a cores de substratos específicas (principalmente amarelo), está em relação à resposta visual destes insetos na região do espectro visível nos quais seus receptores (omatídios) respondem preferentemente (Brown et al. 1998), e teria relação com a orientação para a folhagem de plantas durante a busca de hospedeiros

CAPÍTULO II

Influência de características morfológicas de ovos de percevejos no comportamento de seleção de hospedeiro dos parasitóides *Telenomus podisi* e *Trissolcus basal* (Hymenoptera: Scelionidae)

Introdução

O controle biológico é um fenômeno que consiste na supressão/diminuição populacional de pragas pela ação de inimigos naturais. Entre os inimigos naturais de insetos incluem-se predadores, patógenos (bactérias, fungos e vírus) e parasitóides (Mills & Wajnberg 2008). Os parasitóides são os principais agentes de mortalidade de insetos herbívoros, pois podem atacar todos os estágios de vida do hospedeiro (Cornell & Hawkins 1995). No entanto, seu impacto em populações de insetos depende da habilidade das fêmeas dos parasitóides para encontrar e parasitar o hospedeiro. A ecologia comportamental de insetos parasitóides é, portanto, um assunto central para o desenvolvimento de programas de controle biológico de sucesso (Mills & Wajnberg 2008). Nesse sentido faz-se necessário compreender aspectos relevantes das interações hospedeiro-parasitóide e, principalmente, os mecanismos envolvidos nas etapas finais do processo de seleção de hospedeiros.

Após o contato físico com o hospedeiro, os parasitóides desenvolvem uma série de comportamentos que incluem o reconhecimento, a aceitação e a adequação do hospedeiro. Estes comportamentos são objeto de seleção para otimizar a oviposição e o desenvolvimento satisfatório da sua prole.

O sucesso reprodutivo da fêmea do parasitóide é determinado pelo número de ovos que coloca e pela sobrevivência dos descendentes. Diferentes hospedeiros podem apresentar diferenças morfológicas, bioquímicas e/ou fisiológicas que condicionam diversos aspectos do *fitness* do parasitóide imaturo. O desenvolvimento e sobrevivência de parasitóides imaturos são influenciados pelo tamanho, espécie e estado nutricional do hospedeiro durante o parasitismo (Godfray 1994; Harvey 2000; Karamaouna & Copland 2000; Paramasivan et al. 2004; Ode 2006).

O tamanho do hospedeiro é um importante componente da sua qualidade, pois determina a quantidade de recursos disponíveis para o desenvolvimento do parasitóide. Em geral, hospedeiros maiores contêm mais recursos e podem ser considerados de

qualidade superior, já que podem influenciar sua sobrevivência e seu tamanho quando adulto (Godfray 1994). Isto é ainda mais crítico quando o hospedeiro é um estágio de desenvolvimento que não aumenta de tamanho, como por exemplo, os ovos de insetos. Desta maneira, as fêmeas dos parasitóides de ovos recebem forte pressão de seleção a respeito do tamanho dos hospedeiros escolhidos para ovipositar.

Assim, o sucesso reprodutivo dos parasitóides depende de estratégias para a busca de hospedeiros que maximizem os encontros bem sucedidos. É conhecido que os parasitóides de ovos utilizam sinais de diferente natureza durante a procura de hospedeiros como: sinomônios de plantas, produzidos em resposta ao ataque de herbívoros e à oviposição (Hilker & Meiners 2002, 2006; Dicke et al. 2003; Heil 2008), substâncias químicas responsáveis pela comunicação intraespecífica dos hospedeiros como ferômonios (Laumann et al. 2009), produtos do hospedeiro como escamas das asas de mariposas (Fatouros et al. 2005; Yong et al. 2007) e/ou compostos químicos de rastros de hospedeiros deixados sobre o substrato onde caminham (Borges et al. 2003; Rostás & Wölfling 2009).

Uma vez localizado o hospedeiro, o parasitóide desenvolve vários comportamentos que culminam com a oviposição ou não, estes comportamentos são orientados a obter as informações necessárias para reconhecimento e seleção do hospedeiro. O desenvolvimento de cada etapa depende do estilo de vida e do estágio atacado (Vinson 1984, 1985).

Inicialmente, o parasitóide examina o hospedeiro, em geral com as antenas e às vezes com sensilas do aparelho bucal (Vinson 1984, 1985, 1998), num processo que permite estabelecer a identidade, estágio de desenvolvimento e tamanho do hospedeiro. Nesta etapa, diferentes estímulos como forma, textura, cor, tamanho e substâncias químicas (caïromônios) auxiliam o inseto na identificação e seleção de hospedeiros adequados para oviposição (Vinson 1984, 1985, 1998).

No caso de parasitóides de ovos, após o reconhecimento, a fêmea realiza a prova, procurando um lugar apropriado para a perfuração do cório do ovo com seu ovipositor. As sensilas presentes no ovipositor auxiliam na avaliação do ambiente interno (Vinson 1998). Finalmente, o parasitóide procede à oviposição ou o abandono do hospedeiro.

Os parasitóides de ovos da família Scelionidae são inimigos naturais de percevejos, e algumas espécies, mais precisamente, *Telenomus podisi* Ashmead, 1881 (Hymenoptera: Scelionidae) e *Trissolcus basalís* Wollaston, 1858 (Hymenoptera:

Scelionidae) têm sido utilizados em programas de controle de pragas em muitos países (Clarke & Walter 1995; Corrêa-Ferreira & Moscardi 1996; Corrêa-Ferreira 2002; Ehler 2002). Na região Sul do Brasil liberações inoculativas de *T. basalis* podem controlar populações de percevejos (Corrêa-Ferreira & Moscardi 1996). Na área rural de produção agrícola do Distrito Federal estas espécies mostraram altos índices de parasitismo em ovos de *Euschistus heros* Fabricius, 1798 (Hemiptera: Pentatomidae) (Medeiros et al. 1997).

Segundo a literatura *T. podisi* e *T. basalis* parasitam ovos de várias espécies de percevejos, no entanto, apresentam preferência por determinadas espécies. Sendo *E. heros* o hospedeiro preferencial de *T. podisi* e *Nezara viridula* Linnaeus, 1758 (Hemiptera: Pentatomidae) o hospedeiro preferencial de *T. basalis* (Corrêa-Ferreira & Moscardi 1995; Pacheco & Corrêa-Ferreira 1998; Sujii et al. 2002). Isto se reflete tanto nos índices de parasitismo em campo (Corrêa-Ferreira & Moscardi 1995) como em parâmetros da biologia reprodutiva dos parasitóides mencionados. Por exemplo, a fecundidade média das fêmeas de *T. basalis* em ovos de *E. heros* (Hemiptera: Pentatomidae) (Laumann et al. 2008) é menor que a fecundidade média em ovos de *N. viridula* (Corrêa-Ferreira & Zamataro 1989; Corrêa-Ferreira & Moscardi 1994).

Apesar de a biologia de várias espécies de Scelionidae ser conhecida (Laumann et al. 2008), estudos relativos aos mecanismos de reconhecimento e aceitação de diferentes hospedeiros, assim como a influência de características físicas nestes processos são escassos (Borges et al. 1999).

O objetivo deste trabalho foi verificar a influência de tamanho de ovos e sua distribuição na postura de quatro espécies de percevejos (*Euschistus heros*, *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii* Westwood, 1837 e *Chinavia ubica* Rolston, 1983) da família Pentatomidae no comportamento de seleção de hospedeiros dos parasitóides de ovos *T. podisi* e *T. basalis*. Para atingir o objetivo proposto foram avaliadas as seguintes hipóteses: 1- características morfológicas (como tamanho e distribuição e número de ovos na postura) dos ovos de diferentes espécies de percevejos condicionam o reconhecimento e aceitação dos hospedeiros e 2- o parasitóide pode utilizar estas características para reconhecer os hospedeiros preferenciais *E. heros* no caso de *T. podisi* e *N. viridula* no caso de *T. basalis*.

Material e Métodos

Criação de Insetos

As colônias dos percevejos *Euschistus heros*, *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii* e *Chinavia ubica* e dos parasitóides de ovos *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalıs* foram mantidos em laboratório em sala climatizada no laboratório de Semioquímicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília DF, Brasil. As condições ambientais da sala foram: $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 10\%$ de umidade relativa e iluminação de 14h:10h de fotofase e escotofase respectivamente.

Percevejos

As espécies utilizadas neste trabalho foram criadas seguindo as metodologias descritas em Borges et al. (2006) e Silva et al. (2007). Os insetos foram mantidos em gaiolas plásticas de 8 L com sementes de amendoim (*Arachis hypogaea*), soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e girassol (*Helianthus annuus* (L.)) coladas com cola branca (Cas Colar) não tóxica em cartelas de papel (10cm de comprimento x 8 cm de largura) e vagens frescas de feijão (*Phaseolus vulgaris* (L.)) como dieta natural. Para permitir a circulação de ar, a parte superior da gaiola foi forrada com tecido tipo organza. Água foi oferecida em potes plásticos de 350 mL. Para *N. viridula* foram incorporadas, como complemento da dieta, plantas de soja no estágio V3, acondicionadas em potes plásticos (5,2 cm de diâmetro e 8,6 cm de altura) contendo vermiculita como substrato. Para *Chinavia ubica* e *Piezodorus guildinii* a dieta foi complementada com adição de picão (*Bidens pilosa* L.), falso boldo (*Boldea fragrans* (Ruiz & Pav.) Endl.) e soja perene (*Glycine wightii* (Wight & Arn.) Verdc.). Telas de nylon de 15 cm² foram colocadas nas gaiolas servindo como substrato para oviposição. Os ovos coletados foram colocados em placa de Petri (9 cm de diâmetro) e após a eclosão das ninfas as mesmas foram alimentadas com sementes e vagens até atingirem o terceiro instar. A partir desse estágio as ninfas foram transferidas para gaiolas plásticas contendo a dieta descrita anteriormente. Para obtenção de ovos com idade conhecida, posturas das quatro espécies de percevejos foram coletadas diariamente para a utilização nos experimentos, desta maneira em todos os experimentos foram utilizados ovos com < 24 h de idade.

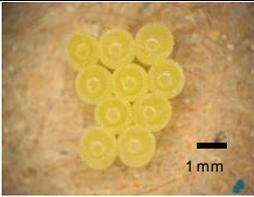
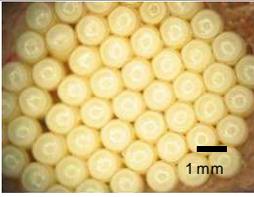
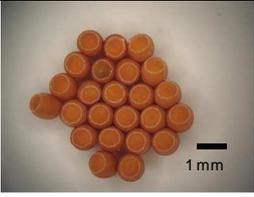
Parasitóides

Casais de *Trissolcus basalis* e *Telenomus podisi* foram mantidos em gaiolas plásticas (cultura de tecido de 25 cm² - ICN Biomedicals, Irvine, CA) tampadas com um chumaço de algodão. Mel foi oferecido como alimento para os adultos. Ovos de *E. heros* foram oferecidos como hospedeiro e deixados por 48 h para permitir a oviposição. Após esse período os ovos foram transferidos para outra gaiola de mesmas dimensões para incubação. As fêmeas de ambas as espécies utilizadas nos bioensaios foram acasaladas, sem experiência de oviposição e apresentavam 24 – 48 h de idade adulta.

Determinação de características morfológicas de ovos de diferentes espécies de percevejos.

Ovos de *E. heros*, *N. viridula*, *P. guildinii* e *C. ubica* utilizados nos experimentos apresentam diferentes características morfológicas como: distribuição e número de ovos por postura, tamanho e coloração (Tabela 2.1). O tamanho dos ovos, número de ovos e sua distribuição numa postura foram estabelecidas a fim de analisar a sua influência no comportamento dos parasitóides.

Tabela 2.1 Características (tamanho relativo, cor, disposição dos ovos e número de ovos por postura) de posturas de diferentes espécies de percevejos utilizadas neste trabalho.

Espécie	Tamanho, forma e cor da postura.	Número de ovos/postura (Média ± DP)
<i>Euschistus heros</i>		9,13 ± 1,18 (n = 30 posturas)
<i>Nezara viridula</i>		60,63 ± 18,38 (n = 30 posturas)
<i>Chinavia ubica</i>		27,46 ± 4,71 (n = 30 posturas)
<i>Piezodorus guildinii</i>		19,56 ± 6,65 (n = 30 posturas)

Para avaliar se o tamanho é um dos aspectos determinantes para seleção do ovo do hospedeiro, previamente às observações comportamentais todos os ovos das posturas (n=30 posturas/hospedeiro/parasitóide) utilizadas foram medidos (diâmetro e altura) (Figura 2.1) e, posteriormente, o seu volume calculado. Um microscópio estereoscópico (Zeiss Germany, Stemi SV 11) com ocular graduada foi utilizado para as medições. Posturas de cada espécie foram coladas com goma arábica não tóxica (Super Radex) em tiras de cartolina (5 cm de comprimento x 0,8 cm de altura). Um desenho esquemático foi feito em planilha e cada ovo foi identificado com um número sequencial da esquerda para a direita. Esse procedimento evita erros durante a medição. Nos ovos posicionados no interior da postura a medida da altura foi estimada utilizando o valor médio da altura dos ovos da postura localizados nas bordas da mesma (ovos externos). As medidas

realizadas no microscópio foram convertidas para milímetros com régua “mini scale” na mesma escala de aumento utilizada para a medição dos ovos.

Após finalizadas as medidas, as posturas foram utilizadas nos experimentos de comportamento com parasitóides de ovos.

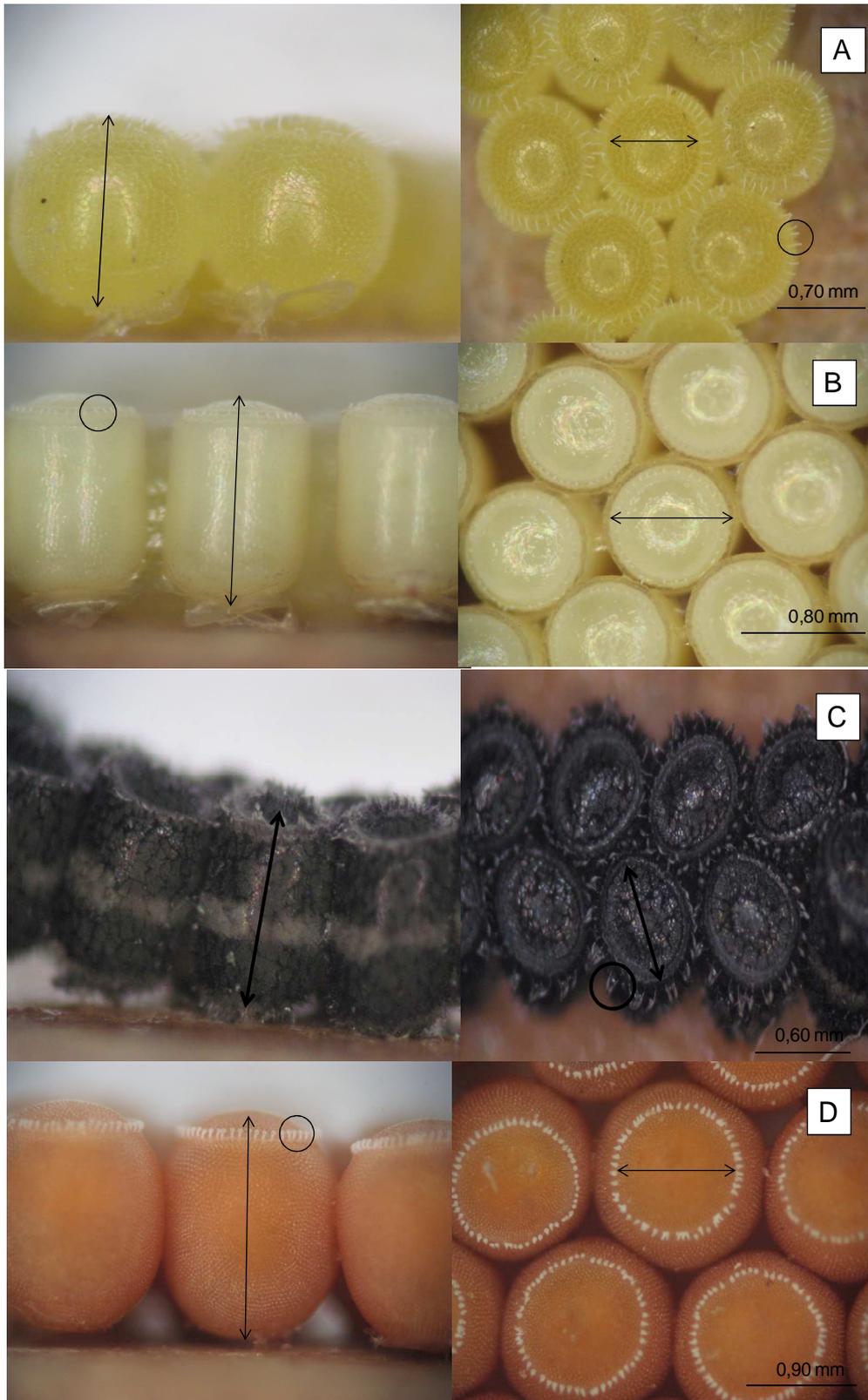


Figura 2.1 Características morfológicas de ovos de diferentes espécies de percevejos e pontos utilizados para medição de diâmetro e altura dos ovos (linhas com seta dupla). Na figura pode-se observar também diferenças na coloração, ornamentação do cório, forma e tamanho relativo dos micropilos (círculos em preto). A. *Euschistus heros*. B. *Nezara viridula*. C. *Piezodorus guildinii*. D. *Chinavia ubica*.

Observação do comportamento de reconhecimento e aceitação de hospedeiros

Posturas de *E. heros*, *N. viridula*, *P. guildinii* e *C. ubica* (n=30/posturas/parasitóide) foram inseridas individualmente no centro de arenas formadas por placas de Petri de 7 cm de diâmetro x 2,5 cm de altura. Fêmeas de *T. podisi* ou *T. basalis* foram introduzidas nas arenas para observação das categorias comportamentais. Foram registradas as categorias comportamentais e o tempo de duração de cada uma delas (Figura 2.2). Para identificação das categorias comportamentais utilizaram-se como referências as estabelecidas previamente por Bin et al. (1993) para *Trissolcus basalis*:

Encontro – que corresponde o tempo decorrido desde a liberação da fêmea na arena até o encontro com a postura.

Tamborilamento – exame dos hospedeiros com as antenas, realizando movimentos de percussão na superfície e laterais dos ovos.

Prova – exploração da lateral do ovo e inserção do ovipositor através do cório alcançando o interior.

Oviposição – caracterizada por movimentos rítmicos do abdômen no sentido do eixo longitudinal do corpo.

Marcação – caracterizada por movimentos em zig-zag realizados com o ovipositor estendido sobre a superfície do ovo, vários autores indicam que com este movimento a fêmea deposita um feromônio de marcação no ovo, entretanto, o mesmo não foi isolado até o momento.

Em observações prévias dos comportamentos de *T. podisi* e *T. basalis* foram registrados com relativa frequência alguns comportamentos complementares aos descritos por Bin et al. (1993). Esses comportamentos são detalhados a seguir e também foram inclusos nas observações e análises deste trabalho.

Limpeza - corresponde à limpeza feita pelo parasitóide das suas antenas, asas, patas, tórax e abdômen.

Transição entre comportamentos - o parasitóide anda sobre a postura tamborilando alguns ovos até se concentrar novamente em um ovo e começar o comportamento de reconhecimento e aceitação de hospedeiro.

Retorno – corresponde ao retorno a um ovo previamente visitado e onde a fêmea já realizou alguns dos comportamentos anteriormente descritos (tamborilamento, prova ou oviposição).

Abandono – corresponde à saída da fêmea do parasitóide de perto da postura após a exploração da mesma, se deslocando a uma distância considerável (periferia da placa).

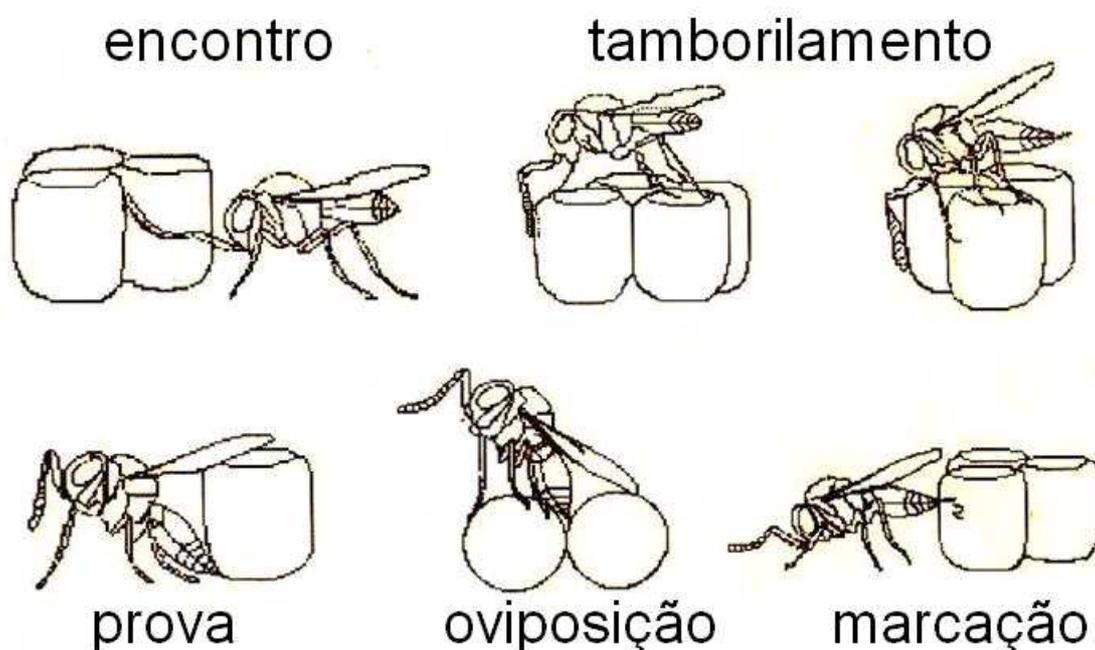


Figura 2.2 Esquemas representativos das diferentes categorias comportamentais de reconhecimento e aceitação de hospedeiros observadas em *Trissolcus basal*, segundo Bin et al. (1993).

As observações de comportamento em ovos de diferentes espécies de percevejos foram conduzidas sob microscópio estereoscópico (Zeiss Germany, Stemi SV6). Fêmeas de cada espécie (n=30/espécie/hospedeiro) foram observadas individualmente. As observações foram realizadas até o abandono da postura pela fêmea.

Os ovos selecionados para oviposição foram identificados segundo as numerações realizadas previamente para relacionar a escolha do parasitóide com o tamanho do ovo. Adicionalmente, e com o intuito de estabelecer se existe algum padrão

de exploração da postura, a posição dos ovos escolhidos para parasitar foi registrada seguindo dois critérios: 1- posição na postura (borda ou interior) e 2- seqüência de ovos

escolhidos para oviposição. No último caso, a partir de cada ovo selecionado para oviposição, foi registrado se o próximo ovo selecionado foi um vizinho (ovo em contato físico com o anteriormente selecionado) ou não vizinho (ovo sem contato físico com o parasitado previamente).

Com os dados da observação da seqüência de comportamentos foram construídos etogramas para verificar a seqüência comportamental seguida por cada parasitóide em cada hospedeiro e dessa maneira, analisar o comportamento de cada parasitóide em diferentes espécies de percevejos.

Após as observações comportamentais, as posturas foram identificadas e colocadas em tubos de ensaio (7,5 cm de comprimento e 1,0 cm de diâmetro) para incubação dos ovos. Nestas posturas foram avaliados o número de ovos parasitados e a proporção de descendentes (número de adultos emergidos/total de ovos parasitados).

Análises Estatísticas

Os valores médios dos parâmetros morfométricos dos ovos (diâmetro, altura e volume) das diferentes espécies de percevejos foram comparados utilizando teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn para comparações múltiplas par a par. Para verificar se há uma preferência da fêmea do parasitóide pelo tamanho de ovo para a oviposição foram comparados ovos selecionados versus não selecionados em cada espécie de percevejo através de teste de Mann-Whitney.

O tempo de cada categoria comportamental observada para cada espécie de parasitóide em cada um dos hospedeiros foi comparado através de teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn para comparações múltiplas par a par. Para *T. podisi* os dados do comportamento de marcação em *N. viridula* e *C. ubica* foram retirados da análise devido à escassez de dados (apenas um ovo marcado em *N. viridula* e dois ovos marcados em *C. ubica*), esta categoria comportamental foi comparada entre *E. heros* e *P. guildinii* por meio do teste de Mann-Whitney. Em *T. basalis* os dados de marcação em ovos de *C. ubica* foram retirados da análise já que este comportamento foi observado somente em três ovos dessa espécie. Os dados de limpeza para *E. heros* e *P. guildinii* também foram retirados pelo fato desse comportamento não ter ocorrido nestes

hospedeiros. Assim, este comportamento foi comparado apenas entre *N. viridula* e *C. ubica* através do teste de Mann-Whitney.

As escolhas realizadas pelos parasitóides relativas a posição do ovo na postura (borda ou interior) e seqüência de oviposição (ovo vizinho ou não vizinho) foram analisadas através de regressão logística estimando a probabilidade de escolha de ovos na borda das posturas e do ovo vizinho após uma oviposição. As hipóteses de não preferência entre ovos na borda ou no interior da postura e, ovos vizinho e não vizinho na seqüência de seleção (50% de seleção em cada uma das opções) foram avaliadas através de teste χ^2 de Wald.

A freqüência de observação dos comportamentos em diferentes hospedeiros foi utilizada para construção de etogramas. Para isto, os dados das observações das fêmeas em cada espécie de hospedeiro (n=30/hospedeiro) foram utilizados para criar uma matriz de transição de primeira ordem (Matriz de Markov) onde foram consideradas as freqüências totais de cada uma das transições (passagem de uma categoria comportamental para outra). As probabilidades de transição foram calculadas a partir da freqüência de transição entre dois eventos divididos pelo número total de observações do primeiro evento (Haccou & Meelis 1992). Os valores esperados para as células da matriz foram calculados através do método de Goodman (método de ajuste iterativo) (Goodman 1968), a significância estatística das transições foram avaliadas individualmente através do teste G. Com estas informações foram construídos os respectivos etogramas para cada espécie de parasitóide utilizando os diferentes hospedeiros avaliados.

Para analisar o número de ovos parasitados foi utilizada análise de modelos lineares generalizados (GLM) e análise de Deviança especificando erros com distribuição de Poisson, e para a proporção de sobrevivência dos estágios imaturos do parasitóide em cada espécie de hospedeiro foi utilizada a mesma análise, porém, especificando erros com distribuição binomial. No caso de *T. podisi* foram retirados das análises os dados de *N. viridula* (nenhum ovo parasitado) e *C. ubica* (um ovo parasitado). Para *T. basalis*, os dados da espécie *C. ubica* foram retirados das análises, pois somente dois ovos dessa espécie foram parasitados. A proporção de descendentes não foi analisada para *T. podisi*, pois apenas em ovos de *E. heros* este parasitóide teve sobrevivência satisfatória (em ovos de *N. viridula* e *C.ubica* não se obteve nenhum descendente e, em ovos de *P. guildinii* se obteve apenas um adulto). Para *T. basalis*, os

dados de *C. ubica* para a proporção de adultos emergidos não foram analisados, pois neste hospedeiro, somente um parasitóide completou o desenvolvimento.

Resultados

As fêmeas de *T. podisi* obtiveram sucesso similar de parasitismo (representado pelo número de ovos parasitados) em ovos de *E. heros* e *P. guildinii* (GLM $t = -1,071$ $P = 0,28$) (Tabela 2.2). Entretanto, somente foi obtida descendência em ovos de *E. heros*. No caso de ovos parasitados de *P. guildinii* somente um adulto conseguiu se desenvolver (Tabela 2.2). As fêmeas de *T. basalis* parasitaram ovos de *E. heros*, *N. viridula* e *P. guildinii*, porém o número de ovos parasitados foi maior em *E. heros* e *N. viridula* em comparação a *P. guildinii* (GLM, análise de Deviança $z = 667,73$ $P < 0,001$) (Tabela 2.3). Em relação à sobrevivência dos estágios imaturos não houve diferenças significativas quando os parasitóides se desenvolveram em diferentes hospedeiros nos quais houve parasitismo (GLM e Análise de Deviança $z = 16,38$ $P = 0,61$) (Tabela 2.3).

Tabela 2.2 Números de ovos parasitados por postura (média \pm desvio padrão) e sobrevivência de estágios imaturos (proporção média \pm desvio padrão) de fêmeas de *T. podisi* em diferentes hospedeiros.

Espécies	Números de ovos parasitados/postura		Sobrevivência (proporção)	
	Média	n	Média	n
<i>E. heros</i>	4,63 \pm 3,45a	268	0,61 \pm 0,36	139
<i>N. viridula</i>	--	1819	--	
<i>P. guildinii</i>	3,30 \pm 5,45a	591	--	
<i>C. ubica</i>	--	781	--	

Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na coluna não apresentam diferenças significativas, $P > 0,05$. Análise de GLM. -- indica ausência de observação de parasitismo e, conseqüentemente, sobrevivência de imaturos nas respectivas espécies de hospedeiros

Tabela 2.3 Números de ovos parasitados (média \pm desvio padrão) e sobrevivência de estágios imaturos (proporção média \pm desvio padrão) de fêmeas de *T. basalis* em diferentes hospedeiros.

Espécies	Números de ovos parasitados		Sobrevivência	
	Média	n	Média	n
<i>E. heros</i>	7,46 \pm 3,07a	280	0,73 \pm 0,25a	225
<i>N. viridula</i>	7,16 \pm 10,37a	1759	0,73 \pm 0,25a	219
<i>P. guildinni</i>	1,56 \pm 4,88b	413	0,95 \pm 0,08a	48
<i>C. ubica</i>	--	824	--	

Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na coluna não apresentam diferenças significativas, $P > 0,05$. GLM e análise de Deviança. -- indica ausência de observação de parasitismo e, conseqüentemente, sobrevivência de imaturos nas respectivas espécies de hospedeiros

O tamanho do hospedeiro foi uma característica que pouco influenciou na decisão das fêmeas de parasitóides estudadas. Ao comparar o tamanho de ovos escolhidos e não escolhidos para oviposição nas posturas de uma mesma espécie foi observado que fêmeas de *T. podisi* foram influenciadas pelo tamanho somente quando utilizaram como hospedeiro *E. heros* (Teste de Mann-Whitney $T = 15219,000$ $P = 0,008$; em relação ao volume, com média de $0,39 \pm 0,15 \text{ mm}^3$, $n = 167$ para ovos selecionados e $0,41 \pm 0,13 \text{ mm}^3$, $n = 101$ para ovos não selecionados). O tamanho do ovo selecionado versus não selecionado para as outras espécies de percevejos não mostrou diferenças significativas (resultados não apresentados). As fêmeas de *Trissolcus basalis* não mostraram preferência em relação ao tamanho dos ovos de posturas individuais durante a seleção para o parasitismo.

Mesmo sendo observadas claras diferenças no tamanho dos ovos entre as espécies de percevejos selecionadas neste estudo (Tabela 2.4) e entre posturas da mesma espécie (Kruskal-Wallis $P < 0,05$ para todas as espécies) observou-se que dentro de uma mesma postura os ovos são homogêneos no tamanho (Coeficiente de Variação médio, calculado a partir do tamanho médio e DP de cada postura utilizada, das variáveis de tamanho $< 10\%$ em todas as espécies de percevejos).

Tabela 2.4 Tamanho (média \pm desvio padrão) de ovos de diferentes espécies de percevejos utilizadas neste trabalho.

Espécies	Diâmetro (mm)		Altura (mm)		Volume (mm)	
	Média	n	Média	n	Média	n
<i>E. heros</i>	0,71 \pm 0,10a	267	0,96 \pm 0,07a	268	0,40 \pm 0,14 a	268
<i>N. viridula</i>	0,80 \pm 0,03b	1820	1,21 \pm 0,05b	1819	0,61 \pm 0,06b	1819
<i>P. guildinii</i>	0,61 \pm 0,04c	587	0,99 \pm 0,06a	587	0,29 \pm 0,04 c	587
<i>C. ubica</i>	0,87 \pm 0,04d	782	1,32 \pm 0,07c	782	0,79 \pm 0,08d	782

Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na coluna não apresentam diferenças significativas entre as espécies. Teste de Kruskal-Wallis H = 2408,03; P < 0,001 para o diâmetro, H = 2681,24; P < 0,001 para altura e H = 2606,310; P < 0,001 para volume, e teste de Dunn P < 0,05.

Os comportamentos dos parasitóides em diferentes espécies de percevejos apresentaram-se relativamente constantes sendo observadas seqüências de comportamentos similares. O tempo de encontro com as posturas foi diferente apenas para as fêmeas de *T. basalis* (teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn H = 13,85 P = 0,003) que levou em média maior tempo para encontrar posturas de *E. heros*. O tempo de tamborilamento em diferentes hospedeiros mostrou diferenças significativas para ambos os parasitóides (teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn H = 57,83 P < 0,001 para *T. podisi* e H = 57,83 P < 0,001 para *T. basalis*) (Tabelas 2.5 e 2.6). As fêmeas de *T. podisi* mostraram um tempo de tamborilamento menor em ovos de *E. heros*, seu hospedeiro preferencial, e em ovos de *C. ubica* em relação ao tempo de tamborilamento em ovos de *N. viridula* e *P. guildinii* (Tabela 2.5). Por sua vez, o comportamento de tamborilamento de *T. basalis* foi o oposto ao encontrado por *T. podisi* em *E. heros* já que as fêmeas deste parasitóide apresentaram maior tempo de tamborilamento para os ovos de *N. viridula*, seu hospedeiro preferencial (Tabela 2.6).

As etapas seguintes, prova e oviposição, foram realizadas preferencialmente na metade inferior dos ovos, quando estes se encontravam na borda da postura. O comportamento de prova foi executado na região do ovo onde a fêmea tocou com as antenas pela última vez, durante a exploração do mesmo pelo tamborilamento. As fêmeas de *T. podisi* durante o comportamento de oviposição exibiram movimentos rítmicos muito pronunciados com a cabeça, além de movimentos do abdome no sentido do eixo longitudinal do corpo. Os tempos dos comportamentos de prova e oviposição para *T. podisi* foram diferentes entre os hospedeiros (teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn H = 176,63 P < 0,001 para prova e H = 47,60 P < 0,001 para oviposição). Entretanto, estes comportamentos foram semelhantes em *E. heros* e *N. viridula* (Tabela

2.5). A duração dos comportamentos de prova e oviposição para *T. basalis* também foram diferentes nas espécies de percevejos (teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn $H = 228,41$ $P < 0,001$ para prova e $H = 298,91$ $P < 0,001$ para oviposição). Porém, a duração do comportamento de prova em *N. viridula* foi semelhante a *P. guildinii*. As fêmeas de *T. basalis* levaram maior tempo para ovipositar ovos de *N. viridula*, seu hospedeiro preferencial (Tabela 2.6).

A marcação, realizada após a oviposição, não foi observada em todas as espécies de hospedeiros. Nos hospedeiros onde a marcação foi freqüentemente executada houve diferenças significativas no tempo médio de duração da marcação para ambos parasitóides (Teste de Mann-Whitney $T = 9795,500$ $P = 0,007$ para *T. podisi* e teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn $H = 43,87$ $P < 0,001$ para *T. basalis*) (Tabelas 2.5 e 2.6). O tempo de transição, calculado entre a oviposição num hospedeiro e outro, foi significativamente diferente, sendo menor no hospedeiro preferencial de *T. podisi* e intermediário no hospedeiro preferencial de *T. basalis* (teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn $H = 30,67$ $P = < 0,001$ para *T. podisi* e $H = 36,04$ $P < 0,001$ para *T. basalis*) (Tabelas 2.5 e 2.6).

Tabela 2.5 Tempo (média \pm desvio padrão) em segundos das categorias comportamentais desenvolvidas pelas fêmeas de *T. podisi* em diferentes espécies de percevejos.

Espécies	Encontro		Tamborilamento		Prova		Oviposição		Marcação		Tempo de transição		Limpeza	
	Média	n	Média	n	Média	n	Média	n	Média	n	Média	n	Média	n
<i>E. heros</i>	141,5 \pm 159,65a	30	14,82 \pm 6,48a	179	9,44 \pm 4,76a	177	194,52 \pm 72,17a	176	31 \pm 8,38a*	143	29,26 \pm 49,26a	106	29,50 \pm 64,06a	14
<i>N. viridula</i>	68,57 \pm 88,04a	30	23,90 \pm 17,95b	66	9,70 \pm 7,22a	60	226,22 \pm 152,20a	53			121,07 \pm 270,59b	42	80,10 \pm 86,39b	19
<i>P. guildinii</i>	100,93 \pm 104,56a	30	22,58 \pm 11,90b	162	16,65 \pm 8,41b	154	166,32 \pm 66,56b	133	28,28 \pm 10,20b*	94	51,89 \pm 67,72b	88	69,70 \pm 116,49ab	15
<i>C. ubica</i>	118,06 \pm 130,60a	30	17,27 \pm 13,25a	137	25,80 \pm 19,51c	128	138,56 \pm 134,40b	62			48,15 \pm 52,61b	65	43,61 \pm 73,44ab	13

Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na coluna não apresentam diferenças significativas $P > 0,05$ teste de Dunn e * teste de Mann-Whitney.

A ausência de dados em relação a marcação para *N. viridula* e *C. ubica* foi devido a insuficiência de dados (apenas um ovo marcado em *N. viridula* e dois ovos marcados em *C. ubica*) o que impossibilitou a comparação.

Tabela 2.6 Tempo (média \pm desvio padrão) em segundos das categorias comportamentais desenvolvidas pelas fêmeas de *T. basalis* em diferentes espécies de percevejos.

Espécies	Encontro		Tamborilamento		Prova		Oviposição		Marcação		Tempo de transição		Limpeza	
	Média	n	Média	n	Média	n	Média	n	Média	n	Média	n	Média	n
<i>E. heros</i>	242,60 \pm 163,49a	30	10,75 \pm 6,00a	296	10,01 \pm 5,12a	297	110,59 \pm 48,27a	285	16,03 \pm 4,31a	268	42,12 \pm 79,77a	163		
<i>N. viridula</i>	186,26 \pm 148,87ab	30	17,25 \pm 11,18b	345	20,63 \pm 15,22b	334	199,70 \pm 104,70b	296	19,14 \pm 7,50b	222	48,14 \pm 71,07b	150	18,61 \pm 53,35a*	26
<i>P. guildinii</i>	123,93 \pm 120,36b	30	13,19 \pm 8,29c	116	10,84 \pm 5,74a	103	96,49 \pm 21,57ac	59	13,84 \pm 3,41c	57	83,59 \pm 167,36c	78		
<i>C. ubica</i>	125,76 \pm 127,09b	30	14,20 \pm 7,98c	399	22,91 \pm 17,66b	383	90,75 \pm 127,10c	111			46,60 \pm 60,62bc	110	26,72 \pm 54,56a*	18

Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na coluna não apresentam diferenças significativas $P > 0,05$ teste de Dunn e * teste de Mann-Whitney.

A ausência de dados em relação a marcação para *C. ubica* foi devido a insuficiência de dados (apenas três ovos marcados) impossibilitando a comparação. A ausência de dados em relação a limpeza para *E. heros* e *P. guildinii* foi devido a não desenvolvimento deste comportamento nestas espécies.

Ao encontrar posturas de diferentes espécies de percevejos as fêmeas de *T. podisi* e *T. basalis* preferiram parasitar os ovos posicionados na borda das posturas. Essa escolha foi significativamente diferente para *T. podisi* em posturas de *E. heros* (teste χ^2 de Wald $\chi^2 = 60,50$ $P < 0,001$) e *N. viridula* (teste χ^2 de Wald $\chi^2 = 5,78$ $P = 0,01$) e para *T. basalis* em posturas de *E. heros* (teste χ^2 de Wald $\chi^2 = 84,78$ $P < 0,001$), *N. viridula* (teste χ^2 de Wald $\chi^2 = 12,62$ $P < 0,001$) e *C. ubica* (teste χ^2 de Wald $\chi^2 = 16,92$ $P < 0,001$) (Figuras 2.3 e 2.4).

A respeito da seqüência de oviposição, em posturas de *N. viridula* as fêmeas de *T. podisi*, após parasitar um ovo, escolheram na seqüência ovos que não tinham contato físico com o previamente parasitado (não vizinho) (teste χ^2 de Wald $\chi^2 = 5,52$ $P = 0,01$). Em ovos de *E. heros*, *P. guildinii* e *C. ubica* não foram observadas diferenças na escolha entre ovos vizinhos e não vizinhos (teste χ^2 de Wald $\chi^2 = 0,71$ $P = 0,39$ para *E. heros*; $\chi^2 = 1,15$ $P = 0,28$ para *P. guildinii* e $\chi^2 = 3,73$ $P = 0,05$ para *C. ubica*) (Figuras 2.5). As fêmeas de *T. basalis* escolheram preferencialmente ovos vizinhos na seqüência de oviposição quando parasitaram posturas de *E. heros* e *N. viridula* (teste χ^2 de Wald $\chi^2 = 48,49$ $P < 0,001$ para *E. heros* e $\chi^2 = 18,52$ $P < 0,001$ para *N. viridula*). Em ovos de *P. guildinii* e *C. ubica* não houve diferenças entre os ovos classificados como vizinho e não vizinho selecionados para ovipositar (teste χ^2 de Wald $\chi^2 = 1,77$ $P = 0,18$ para *P. guildinii* e $\chi^2 = 0,12$ $P = 0,72$ para *C. ubica*) (Figura 2.6).

Os etogramas mostraram que o comportamento de oviposição se apresenta com etapas bem definidas com transições (passagem de um comportamento a outro) significativas o que indica que estes comportamentos são bem estereotipados, inatos e independentes do hospedeiro encontrado. Os comportamentos de limpeza e transição resultaram mais aleatórios e, em geral, apresentaram transições não significativas. Em hospedeiros não preferenciais as fêmeas não executam a marcação e as transições comportamentais significativas se apresentam com menor freqüência (Figuras 2.7 e 2.8).

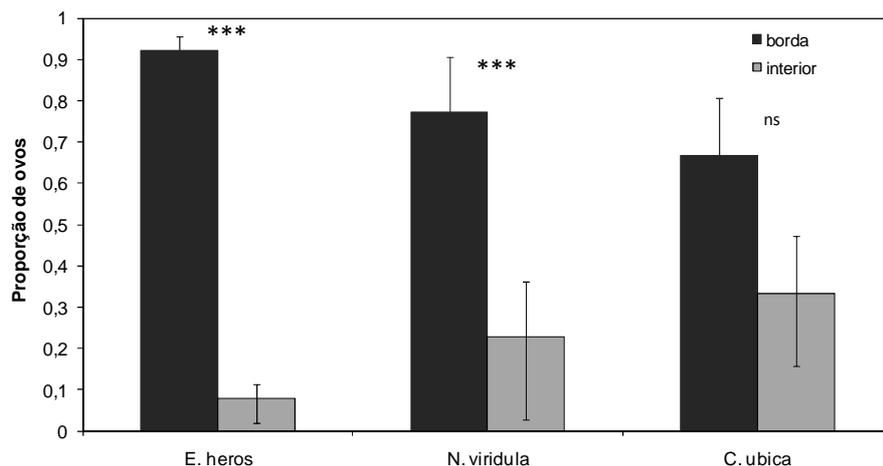


Figura 2.3 Proporção de ovos (média ± IC95%) de diferentes espécies de percevejos selecionados para oviposição por fêmeas de *Telenomus podisi* em relação a sua posição na postura (borda ou interior). Os valores médios e os IC95% foram calculados mediante regressão logística. *** = $P < 0,001$ para a proporção de ovos parasitados na borda ou interior da postura para cada espécie de hospedeiro, ns = diferenças não significativas na a proporção de ovos parasitados na borda ou interior da postura para cada espécie de hospedeiro teste χ^2 de Wald.

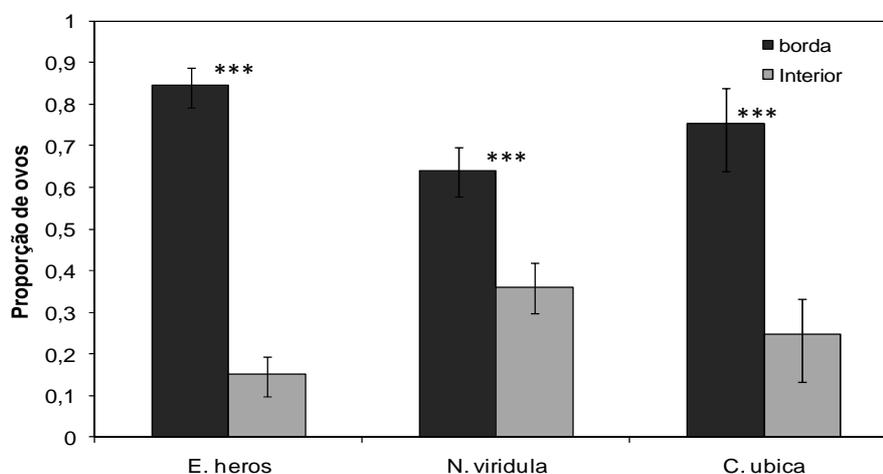


Figura 2.4 Proporção de ovos (média ± IC95%) de diferentes espécies de percevejos selecionados para oviposição por fêmeas de *Trissolcus basalidis* em relação a sua posição na postura (borda ou interior). Os valores médios e os IC95% foram calculados mediante regressão logística. *** = $P < 0,001$ para a proporção de ovos parasitados na borda ou interior da postura para cada espécie de hospedeiro, ns = diferenças não significativas na a proporção de ovos parasitados na borda ou interior da postura para cada espécie de hospedeiro teste χ^2 de Wald.

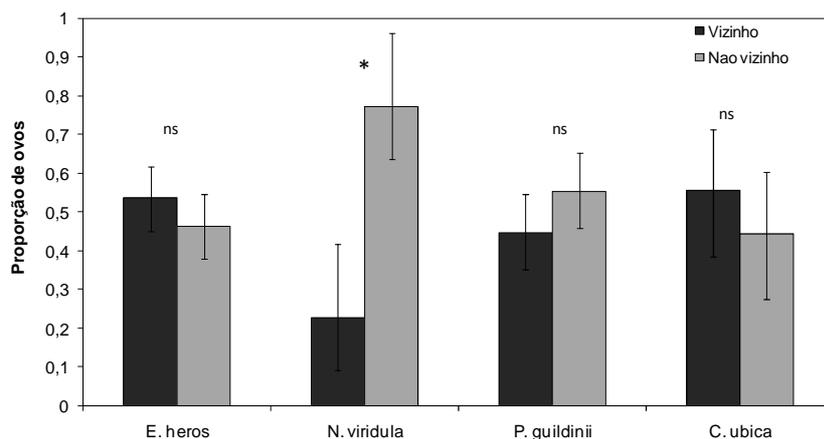


Figura 2.5 Proporção de ovos (média \pm IC95%) de diferentes espécies de percevejos selecionados para oviposição por fêmeas de *Telenomus podisi* em relação à seqüência de escolha (vizinho ou não vizinho). Os valores médios e os IC95% foram calculados mediante regressão logística. * = $P < 0,05$ indica diferenças significativas na proporção de ovos parasitados vizinhos ou não vizinhos nas posturas de diferentes espécies de percevejos, ns = diferenças não significativas entre a proporção de ovos parasitados vizinhos ou não vizinhos nas posturas de diferentes espécies de percevejos teste χ^2 de Wald.

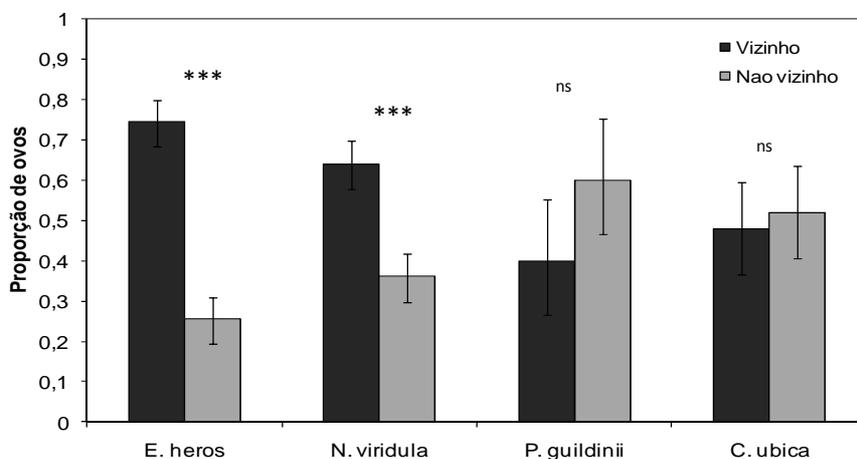


Figura 2.6 Proporção de ovos (média \pm IC95%) de diferentes espécies de percevejos selecionados para oviposição por fêmeas de *Trissolcus basalidis* em relação à seqüência de escolha (vizinho ou não vizinho). Os valores médios e os IC95% foram calculados mediante regressão logística. *** = $P < 0,001$ indica diferenças significativas na proporção de ovos parasitados vizinhos ou não vizinhos nas posturas de diferentes espécies de percevejos, ns = diferenças não significativas entre a proporção de ovos parasitados vizinhos ou não vizinhos nas posturas de diferentes espécies de percevejos teste χ^2 de Wald.

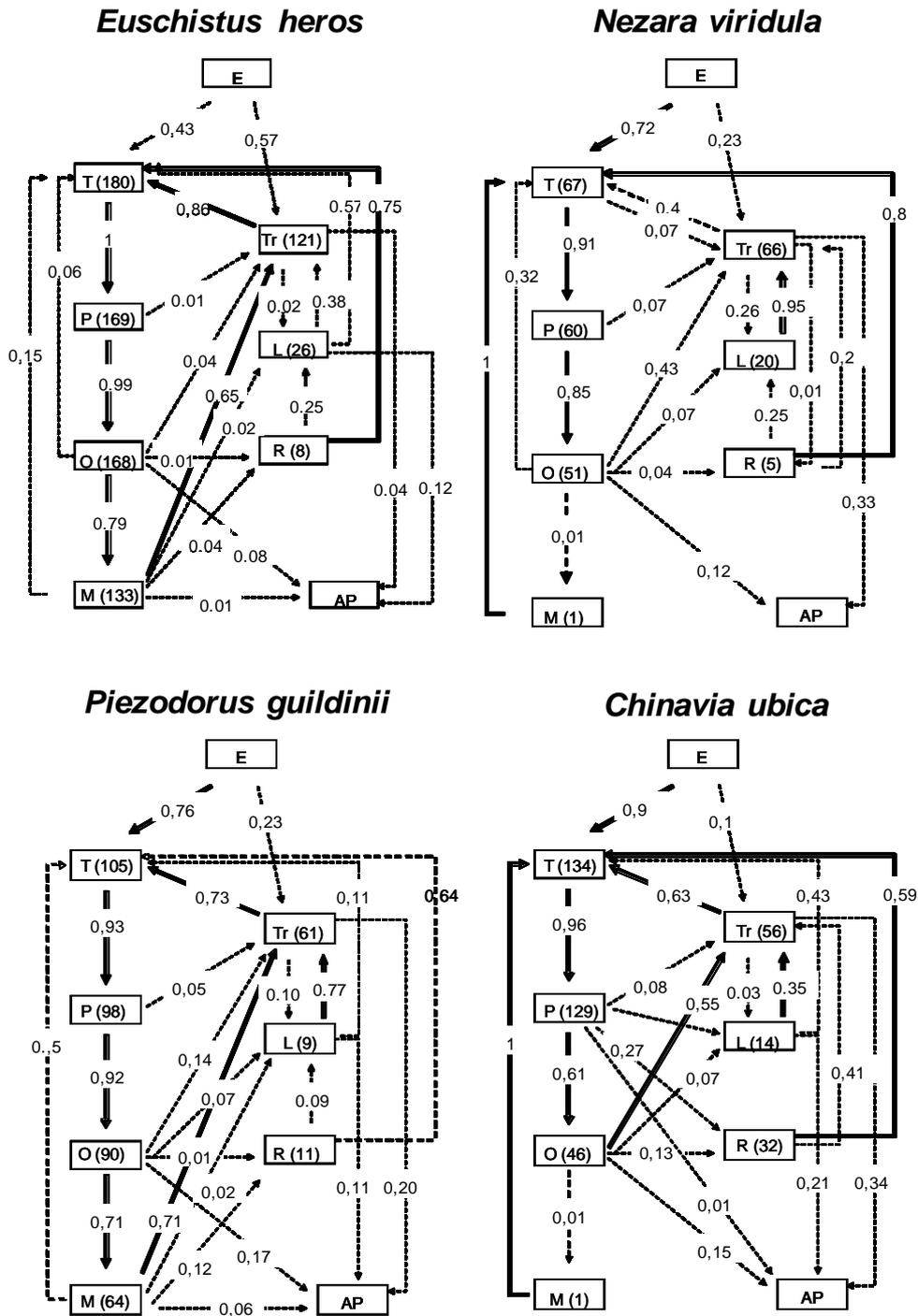


Figura 2.7 Etogramas do comportamento de reconhecimento e oviposição do parasitóide de ovos *Telenomus podisi* utilizando como hospedeiros diferentes espécies de percevejos. Os números nas linhas indicam a probabilidade de transição entre comportamentos. Os números entre parênteses dentro dos retângulos indicam a frequência observada de cada comportamento. As linhas tracejadas indicam probabilidades não diferentes do acaso (teste G, $P = 0,05$). As linhas completas indicam as transições de um comportamento para outro que resultaram significativas ($P < 0,05$). E = encontro, T = tamborilamento, P = prova, O = oviposição, M = marcação, Tr = transição, L = limpeza, R = retorno, AP = abandono da postura.

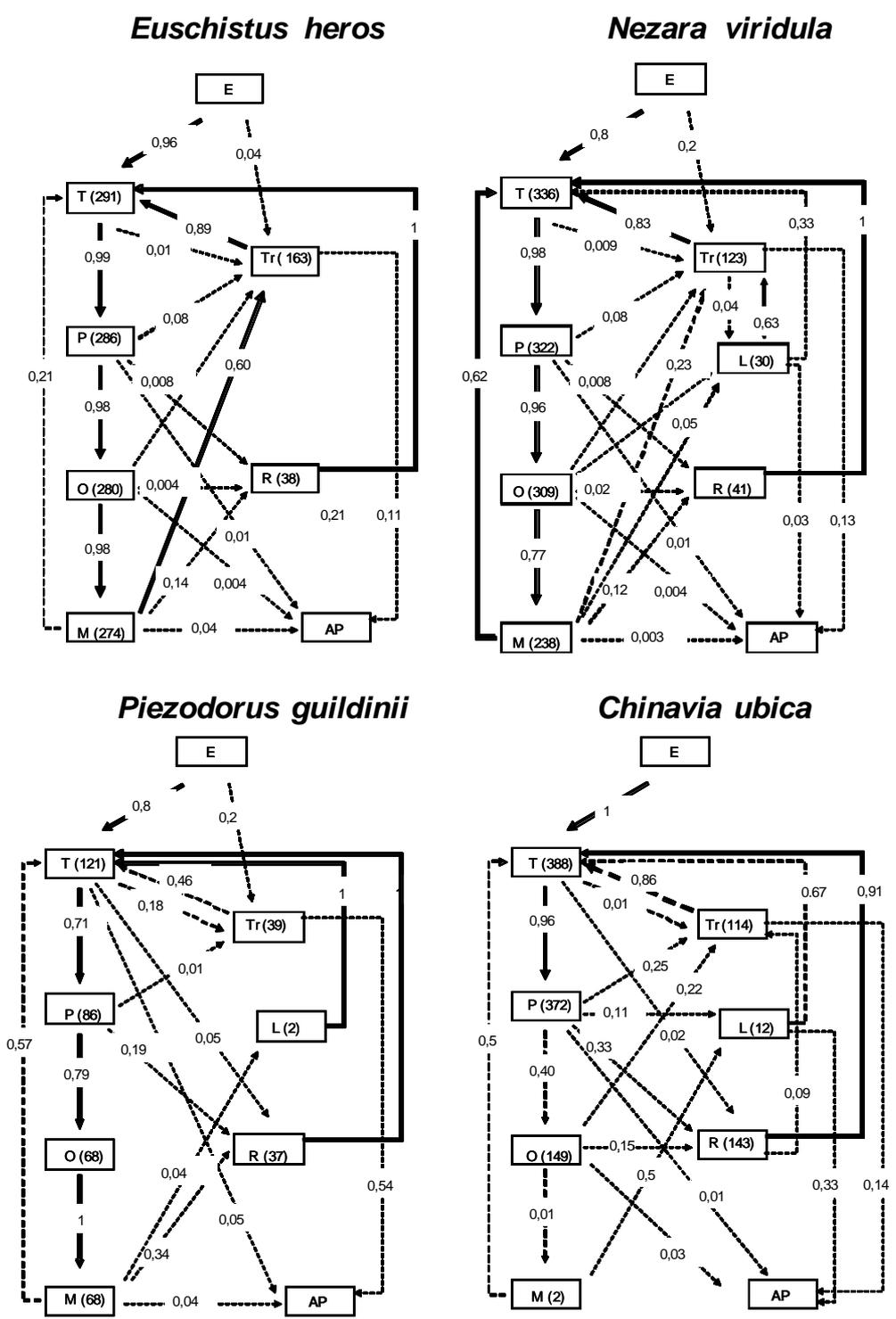


Figura 2.8 Etogramas do comportamento de reconhecimento e oviposição do parasitóide de ovos *Trissolcus basalis* utilizando como hospedeiros diferentes espécies de percevejos. Os números nas linhas indicam a probabilidade de transição entre comportamentos. Os números entre parênteses dentro dos retângulos indicam a frequência observada de cada comportamento. As linhas tracejadas indicam probabilidades não diferentes do acaso (teste G, $P = 0,05$). As linhas completas indicam as transições de um comportamento para outro que resultaram significativas ($P < 0,05$). E = encontro, T = tamborilamento, P = prova, O = oviposição, M = marcação, Tr = transição, L = limpeza, R = retorno, AP = abandono da postura.

Discussão

Os parasitóides avaliados neste trabalho mostraram uma clara discriminação dos hospedeiros oferecidos para parasitismo. *T. podisi* mostrou maiores índices de parasitismo em ovos de *E. heros* e *P. guildinii*. As fêmeas de *T. basalis* mostraram maiores índices de parasitismo em ovos de *E. heros* e *N. viridula* e moderado parasitismo em ovos de *P. guildinii*. Com exceção do parasitismo de *T. basalis* em *P. guildinii*, para ambas as espécies de parasitóides a mortalidade (ovos parasitados) de hospedeiros preferenciais e alternativos foi alta, concordando com os resultados de Sujii et al. (2002) em estudos de laboratório com estas espécies de parasitóides.

Ao considerar a proporção de adultos emergidos nas diferentes espécies de percevejos (sobrevivência de estágios imaturos), o hospedeiro mais adequado para o desenvolvimento de *T. podisi* foi *E. heros* o que concorda com dados de literatura (Pacheco & Corrêa-Ferreira 2000). O desenvolvimento dos estágios imaturos de *T. podisi* em *P. guildinii*, um hospedeiro anteriormente citado como adequado para este parasitóide (Pacheco & Corrêa-Ferreira 1998; Sujii et al. 2002), não foi satisfatório. *T. basalis* se desenvolveu satisfatoriamente em ovos de *E. heros*, *N. viridula* e *P. guildinii*, não havendo diferenças na proporção de adultos emergidos nestes hospedeiros, o que discorda com dados de campo previamente reportados por Corrêa-Ferreira & Moscardi (1995) no qual *T. basalis* esteve mais associado a *N. viridula*, resultando em maior número de adultos emergidos nesta espécie.

Os resultados mostraram que ambos os parasitóides, na ausência do hospedeiro preferencial, investem seu esforço reprodutivo parasitando hospedeiros alternativos, ainda que, em alguns casos, não encontrem, nestes hospedeiros, condições totalmente favoráveis ao desenvolvimento dos seus estágios imaturos.

O parasitismo de *T. basalis* no seu hospedeiro preferencial (*N. viridula*) foi similar ao observado no hospedeiro alternativo (*E. heros*). Isto pode ter sido influenciado pelas condições experimentais. Em geral, *T. basalis* apresenta índices de parasitismo altos (+ 50% dos ovos de cada postura parasitados) em posturas de *N. viridula* (Corrêa-Ferreira & Zamataro 1989; Corrêa-Ferreira & Moscardi 1995; Sujii et al. 2002). As posturas de *N. viridula*, em geral são grandes (as utilizadas neste trabalho apresentaram $60,63 \pm 18,38$ ovos/postura). Os scelionídeos são parasitóides sinovigênicos, produzem ovos ao longo da sua vida e, em geral, em posturas com grande número de ovos podem permanecer por 24 a 72 hs sobre as mesmas (Orr, 1998).

Possivelmente, *T. basalis* poderia ter parasitado um número maior de ovos se o experimento tivesse sido executado com uma duração de tempo maior (por exemplo, deixando o parasitóide na postura até que o mesmo a abandonasse voando para outro sítio).

Um outro fator que pode ter contribuído para o alto parasitismo e descendência de *T. basalis* no hospedeiro alternativo, *E. heros*, é o fato de que os insetos utilizados neste trabalho provêm de uma colônia mantida durante várias gerações em ovos de *E. heros* o que pode contribuir para uma adaptação do parasitóide a este hospedeiro.

Os ovos de diferentes espécies de Pentatomidae utilizados neste trabalho apresentam claras diferenças na coloração, ornamentação do cório, forma e tamanho dos micrópilos (não quantificadas), características que podem influenciar o reconhecimento e seleção pelos parasitóides. Além disto, a distribuição dos ovos nas posturas (número e disposição dos ovos) e o tamanho dos mesmos também são diferentes e poderiam influenciar o comportamento dos parasitóides. Entretanto, apesar de os ovos das diferentes espécies de percevejos utilizados como hospedeiros apresentam-se mais homogêneos, formato em barril, padrão comum encontrado nesta família (Southwood et al. 1956) alguns ovos são mais globulares (*E. heros* e *C. ubica*) e outros mais esféricos (ver fotos em metodologia).

Os parasitóides avaliados discriminam posturas/ovos de diferentes espécies de percevejos, mas não é possível afirmar que a discriminação é baseada somente em características morfológicas já que outros sinais, por exemplo, químicos (Bin et al. 1993; Borges et al. 1999, ver capítulo 3 desta dissertação para maiores precisões) podem estar presentes na superfície dos ovos auxiliando a identificação e discriminação de hospedeiros.

Quando foi avaliada a discriminação dos ovos dentro de uma postura, foi observado que o tamanho do hospedeiro selecionado para parasitar não influenciou as fêmeas de ambos os parasitóides. Os ovos de insetos, diferentemente de larvas que em muitos casos após serem parasitadas continuam seu crescimento, constituem um recurso finito e dessa maneira exercem uma pressão seletiva nas fêmeas dos parasitóides que devem avaliar com precisão os recursos disponíveis para a sua descendência (Godfray 1994; Vinson 1998). O tamanho dos ovos pode ser uma medida geral da quantidade de recursos disponíveis. Os parasitóides utilizados neste trabalho são solitários (Corrêa-Ferreira 2002), uma única larva completa seu desenvolvimento em cada hospedeiro. Dessa maneira, as fêmeas devem avaliar um tamanho mínimo e/ou máximo para o

desenvolvimento de sua prole. No entanto, as variações de tamanho de ovos dentro de uma mesma postura em cada espécie de percevejo são pequenas (coeficiente de variação médio para todas as espécies utilizadas neste trabalho < 10%) e isto pode explicar a ausência de discriminação de ovos parasitados e não parasitados em relação ao tamanho.

As observações dos comportamentos de reconhecimento e aceitação de hospedeiros para *T. podisi* e *T. basalis* foram consistentes com as observações de outros autores para parasitóides da família Scelionidae (Strand & Vinson 1983a; Bin et al. 1993; Weber et al. 1996).

Os diferentes hospedeiros condicionaram o tempo investido pelos parasitóides em cada etapa da seleção e oviposição. Frente ao hospedeiro preferencial os parasitóides mostraram comportamentos opostos. *T. podisi* parece reconhecer e aceitar rapidamente seu hospedeiro preferencial, *E. heros* (menor tempo de tamborilamento e de prova), enquanto que *T. basalis* investiu mais tempo no reconhecimento e aceitação de ovos de *N. viridula*. Estas diferenças poderiam estar influenciadas tanto por motivos filogenéticos/evolutivos relativos aos comportamentos de parasitóides de diferentes gêneros como por diferenças nas características físicas e químicas dos ovos de diferentes espécies de percevejos (Strand & Vinson 1983a,b; Vinson 1985; Bin et al. 1993).

O tempo destinado a oviposição por *T. basalis* em seu hospedeiro preferencial, *N. viridula*, foi maior que em ovos de outras espécies de percevejos. O comportamento seguinte, a marcação, que foi freqüente nos hospedeiros preferenciais e em alguns alternativos, consumiu maior tempo nos hospedeiros preferenciais para ambas as espécies de parasitóides. A marcação é um processo que auxilia a fêmea na discriminação de hospedeiros pela deposição de substâncias químicas e constitui um sinal de alerta de que o hospedeiro se encontra parasitado, evitando assim superparasitismo (mais de um ovo no mesmo hospedeiro) ou hiperparasitismo (parasitismo por mais de uma espécie de parasitóides) (Nufio & Papaj 2001; Rosi et al. 2001; Stelinski et al. 2009). Desta maneira, o maior investimento na marcação dos ovos dos hospedeiros que garantem ótimo desenvolvimento dos estágios imaturos resulta numa vantagem seletiva para o parasitóide. Além disso, o feromônio de marcação apresenta durabilidade baixa e isso poderia evitar ataques de hiperparasitóides.

A marcação é freqüentemente uma indicação de oviposição (Weber et al. 1996). Neste trabalho a marcação esteve associada a parasitismo em quase todos os casos, sendo raros os ovos nos quais ocorreu parasitismo sem marcação.

Ao analisar a preferência de oviposição por ovos situados na borda ou interior das posturas foi observado que os ovos situados na borda são mais vulneráveis ao parasitismo. Segundo Gross (1993) a arquitetura ou arranjo de massas de ovos são consideradas defesas morfológicas do hospedeiro contra o ataque de parasitóides. Os ovos de percevejos estudados neste trabalho que estão situados no interior da postura ficam com menor superfície exposta comparados aos ovos da borda e dessa maneira apresentam menor probabilidade de sofrerem o ataque de parasitóides.

As fêmeas de *T. podisi* não seguem um padrão na escolha de ovos para parasitar, ao efetuar oviposições sucessivas os ovos selecionados podem ou não serem vizinhos (ovo em contato direto com o previamente parasitado). Este padrão de exploração das posturas, sem uma seqüência estereotipada para parasitar os ovos, observado em diferentes hospedeiros, pode ser uma das causas que expliquem a evolução de um feromônio de marcação nos scelionídeos já que permitiria explorar posturas com grande número de ovos (como as dos pentatomídeos) evitando o superparasitismo ou o hiperparasitismo. Em scelionídeos, o feromônio de marcação de hospedeiros modifica o comportamento de oviposição de co-específicos, as fêmeas de *T. basalis* quando em contato com massas de ovos parasitadas por co-específicos abandonam o hospedeiro mais rapidamente (Rosi et al. 2001).

As fêmeas de *T. basalis* mostraram uma alta probabilidade de parasitismo em ovos vizinhos quando exploraram posturas de *E. heros* e *N. viridula*. Neste sentido, *T. basalis* em presença de um hospedeiro que favorece sua reprodução, como o caso das duas espécies de percevejos mencionadas, otimiza a exploração do mesmo evitando gastar o tempo examinando ovos em posições mais distantes.

Os etogramas para ambas as espécies de parasitóides confirmaram o observado ao analisar os tempos dos comportamentos de reconhecimento e aceitação de hospedeiros. A seqüência de comportamentos básicos desde o encontro até a marcação é estereotipada e não mostra variações segundo a espécie de hospedeiro. A maior diferença observada é em relação à oviposição ou marcação, que se observaram em menor freqüência em hospedeiros não preferenciais, o que sugere que tanto a inspeção externa (tamborilamento) quanto a interna (prova) são decisivas para o reconhecimento e seleção dos hospedeiros e reforça a hipótese de que estímulos físicos e químicos

devem estar envolvidos neste processo. Segundo observações de Weber et al. (1996) os scelionídeos somente marcam ovos onde tem realizado oviposição satisfatória. Sendo assim, as observações da baixa frequência de marcação em ovos de algumas espécies de percevejos pelos parasitóides *T. podisi* e *T. basalis* estariam diretamente relacionadas com os baixos índices de parasitismo observado nestas mesmas espécies.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o número e distribuição de ovos numa postura podem influenciar no processo de reconhecimento e aceitação de hospedeiros dos parasitóides *T. podisi* e *T. basalis*, entretanto, não é possível descartar a influência de outros fatores morfológicos como ornamentação do cório número de micropilos e cor dos ovos e presença de sinais de outra natureza, principalmente químicos. Trabalhos futuros devem concentrar-se na identificação dos estímulos envolvidos em cada etapa que auxiliem na interpretação das observações feitas neste trabalho.

CAPÍTULO III

Influência de características químicas de ovos do percevejo *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) no comportamento de seleção de hospedeiro do parasitóide *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae)

Introdução

Após o contato físico com o hospedeiro os parasitóides realizam o reconhecimento e aceitação do mesmo, influenciados pelas interações de estímulos físicos (forma, textura, tamanho) e químicos (semioquímicos internos e/ou externos) (Vinson 1984, 1985, 1998). Os estímulos químicos que são utilizados por parasitóides para identificar seu hospedeiro, em geral atuam como caïromônios (substâncias químicas envolvidas na comunicação interespecífica de organismos que favorecem seletivamente apenas o receptor) (Lewis & Martin 1990).

Pistas químicas para o reconhecimento do hospedeiro foram descritas para diferentes sistemas hospedeiros-parasitóides. Parasitóides de afídeos (Homoptera) utilizam caïromônios presentes na cutícula de seus hospedeiros (Powell et al. 1998; Muratori et al. 2006). Análises químicas de exuvias de afídeos revelaram que os compostos químicos presentes são: hidrocarbonetos, ésteres, álcools e aldeídos (Muratori et al. 2006). O parasitóide *Aphytis melinus* DeBach, 1959 (Hymenoptera: Aphelinidae) utiliza *O*-caffeoilytyrosine, como caïromônio de contato para o reconhecimento e aceitação de sua cochonilha hospedeira *Aonidiella aurantii* Maskell, 1879 (Hemiptera: Diaspididae) (Millar & Hare 1993). O comportamento de aceitação de hospedeiro do parasitóide pupal *Diadromus pulchellus* Wesrnael, 1845 (Hymenoptera: Ichneumonidae) é desencadeado principalmente por polipeptídios presentes no casulo de *Acrolepiopsis assectella* Zeller, 1839 (Lepidoptera: Acrolepiidae) (Bénédet et al. 1999). O parasitóide *Tetrastichus hagenowii* Ratzeburg, 1852 (Hymenoptera: Eulophidae) utiliza oxalato de cálcio originado na glândula coleterial (ou acessória) do sistema reprodutor feminino como também mucopolissacarídeos originados da glândula salivar para reconhecimento de ootecas de *Periplaneta americana*, Linnaeus, 1758 (Blattodea: Blattidae), (Vinson & Piper 1986).

Em parasitóides de ovos há vários registros de que caïromônios presentes nos ovos são importantes para o reconhecimento de hospedeiros. Esses estudos têm sido

realizados para parasitóides que atacam ovos de Coleoptera (Leonard et al. 1987; Meiners & Hilker 1997; Meiners et al. 1997) de Lepidoptera (Strand & Vinson 1983b; Nordlund et al. 1987; De Santis et al. 2008), e Hemiptera (Bin et al. 1993; Borges et al. 1999; Lou & Cheng 2001; Conti et al. 2003).

Para parasitóides da família Scelionidae que atacam ovos de lepidópteros, o cairomônio de reconhecimento é formado por uma mistura de compostos protéicos, originados na secreção da glândula acessória, que aderem os ovos ao substrato (Strand & Vinson 1983b, Nordlund et al. 1987; De Santis et al. 2008). Para aqueles que se desenvolvem em ovos de Hemiptera a fonte de cairomônios sugerida são as secreções das células foliculares presentes no sistema reprodutor e que servem para aderir os ovos ao substrato durante a oviposição (Bin et al. 1993). Algumas tentativas para a identificação dos cairomônios responsáveis pelo reconhecimento e aceitação de ovos de pentatomídeos foram feitas por Bin et al. (1993) e Borges et al. (1999) mas nenhum composto foi caracterizado. Tooker & De Moraes (2007) interessados na caracterização de voláteis de plantas induzidos pela deposição de ovos de herbívoros e suspeitando de que a oviposição pode desencadear uma resposta hipersensitiva na planta, trabalharam com ovos de várias espécies de insetos e verificaram que ovos de *Nezara viridula* Linnaeus, 1758 contém ácido jasmônico, ácido salicílico e ácido benzóico.

A identificação de cairomônios responsáveis pelo reconhecimento e aceitação de hospedeiros pelos parasitóides pode permitir a criação massal destes insetos em meio artificial, facilitando a aceitação de hospedeiros (ovos) artificiais e permitindo a oviposição e desenvolvimento nos mesmos (Strand & Vinson 1983b). A produção massal é fundamental em programas de liberação de parasitóides, os que podem ser favorecidos com métodos artificiais de criação que permitem a produção em grande escala dos agentes de controle biológico (Grenier 1997). Outra aplicação prática destes conhecimentos é a possibilidade de manipulação do comportamento de inimigos naturais de pragas em campo. Pelo efeito arrestante, os cairomônios podem reter os parasitóides em áreas desejadas (Lewis e Martin 1990; Powell & Pickett 2003)

O parasitóide de ovos *Telenomus podisi* Ashmead, 1881 (Hymenoptera: Pentatomidae) utiliza como hospedeiro preferencial ovos do percevejo marrom *Euschistus heros* Fabricius, 1798 (Hemiptera: Pentatomidae) e cairomônios presentes neste hospedeiro podem contribuir para o reconhecimento desta espécie. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito de características químicas presentes em ovos de *E. heros* no comportamento de reconhecimento e aceitação de hospedeiros do parasitóide

de ovos *T. podisi*. Sendo os objetivos específicos de: 1) desenvolver uma metodologia para extração e isolamento das substâncias químicas presentes na cobertura externa dos ovos do hospedeiro, 2) identificar a composição dos extratos e 3) verificar a atividade biológica dos mesmos através de bioensaios com fêmeas do parasitóide. A hipótese é a de que substâncias químicas presentes nos ovos são utilizadas pelo parasitóide para reconhecer e aceitar o hospedeiro durante o comportamento de oviposição.

Material e Métodos

Extração e análises químicas

Massas de ovos de *E. heros* (< 24 h após a oviposição) foram coletadas da colônia de laboratório, mantidas seguindo a metodologia descrita nos Capítulos 1 e 2 desta dissertação, e pesados em balança analítica (Metler AT 200, SNR L34100) até se obter um grama (~2000 ovos). Conjuntos de um grama de ovos foram transferidos para frascos de 4 ml de vidro de boro silicato com fundo cônico. Três solventes, de diferentes polaridades, foram avaliados para a extração dos compostos dos ovos: metanol, acetona e diclorometano. Os diferentes solventes foram adicionados aos frascos com os ovos no volume necessário para cobrir completamente os ovos (aproximadamente 2,5 mL de solvente). Inicialmente foram avaliados três períodos de extração (1, 4 e 24 h) nos quais os ovos foram mantidos nos solventes. Os frascos com os ovos nos diferentes solventes foram mantidos a temperatura ambiente por trinta minutos em banho de ultrassom (UNIQUE, USC- 2800A). Após os diferentes intervalos de tempo, o solvente foi separado do resíduo sólido com o auxílio de uma pipeta Pasteur e filtrado com filtro microporo (SUPELCO, Iso - DiscTM PFTE-4-4, 4mm x 0.45 µm). Os extratos obtidos foram pré-concentrado sob um fluxo de nitrogênio até um volume de 100 µL e armazenados em freezer (-20°C) até serem utilizados em análises químicas ou em bioensaios.

Para quantificação e identificação dos compostos foram utilizados cinco extratos de cada período de extração e solvente utilizado. Extratos adicionais (n = 5) do período de 24 h e de cada solvente foram obtidos para utilização em bioensaios.

Após observações em extrações prévias foi verificado que os extratos obtidos em acetona continham uma grande quantidade de água, provavelmente removida dos ovos. Para eliminar o excesso de água foi realizada a separação da fase aquosa da fase

orgânica adicionando 300 μL de hexano. Em seguida, a amostra foi agitada manualmente por um minuto e deixada em repouso sobre superfície plana até a formação de duas fases sendo a superior orgânica e a inferior aquosa. A fase orgânica foi retirada e transferida para outro frasco. A fim de obter uma amostra sem resíduos de água foi adicionada na fase orgânica uma pequena porção (com a ponta de uma espátula) de Sulfato de magnésio (Riedel-de Haën). O volume foi filtrado novamente em filtro microporo e pré-concentrado até 100 μL . Devido à diferença de volatilidade dos solventes (acetona/hexano) no volume final os compostos ficaram diluídos em hexano.

Os extratos foram analisados utilizando cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chama (CG-DIC) para quantificação. Para identificação dos compostos um extrato de cada solvente foi selecionado para análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS).

Para quantificação dos compostos foi utilizada a metodologia do padrão interno (PI), para isto 1 μL de uma solução de octadecano em concentração de 1 mg/mL foi adicionado em cada amostra dos extratos de ovos de 100 μL . Posteriormente, a solução foi agitada em vortex por cinco segundos para homogeneização da amostra. Uma alíquota de 1 μL do extrato foi injetada em cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chamas GC-DIC (Agilent 7890A), injetor no modo splitless, temperatura do injetor de 250°C e do detector de 270°C equipado com uma coluna DB-5, (5%-fenil-metilpolisiloxano, 0,250 mm de diâmetro X 30 m de comprimento, com filme espessura de 0.25 μm , J&W Scientific). O programa de temperatura utilizado foi de 50°C por 2 min, com incremento posterior de 5°C/min até chegar a 180°C e, posteriormente, um incremento de 10°C/min até chegar a 250°C totalizando um tempo de corrida de 55,1 minutos. Gás hélio foi utilizado como gás de arraste. A quantificação dos compostos foi realizada por meio da comparação da área do composto em relação à área do padrão interno obtida no cromatograma.

Os componentes majoritários obtidos na extração dos ovos foram identificados utilizando um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrometro de massas (GC-MS) (Agilent 5975 MSD) com ionização por impacto de elétrons (energia de ionização de 70eV) com analisador quadrupolar. Os extratos foram injetados no modo splitless e hélio foi usado como gás de arraste. A identificação foi realizada comparando-se o padrão de fragmentação do composto com o padrão de fragmentação de dados da biblioteca de espectro de massas (NIST 2009 e Wiley 2009). As identificações dos

compostos com exceção de, *cis*-9-hexadecenoato de metila (composto identificado somente através do KI e da comparação do padrão de fragmentação com a biblioteca NIST), foram confirmadas pela comparação do padrão de fragmentação e índice de Kováts (KI) e padrões autênticos (Anexo 3) foram injetados no espectrômetro de massas nas mesmas condições das amostras. Todos os padrões, com exceção de ácido linoleico que foi fornecido pelo Departamento de Química da Universidade de Brasília, foram adquiridos da Sigma Aldrich (EUA). Os ésteres de metila e etila foram obtidos através da derivatização dos ácidos Hexadecanóico, Linolêico e Octadecanóico com trimetilsilildiazometano para formação do metil-éster e N,N dimetilformamida dietil acetal para formação dos etil-ésteres. Para a formação do metil-éster, em 100 µL de uma solução 0,05 mg/mL foi adicionado 2 µL do reagente trimetilsilildiazometano que foi mantido a temperatura ambiente por 30 minutos, após esse período 2 µL de ácido acético 1 M em hexano foi adicionado e mantido a temperatura ambiente por 30 minutos para reagir com o excesso do trimetilsilildiazometano. Para a formação dos etil-ésteres a 100 µL de uma solução 0,05 mg/mL dos ácidos, foi adicionado 5 µL do reagente N,N dimetilformamida dietil acetal e deixou-se reagir por duas horas a temperatura ambiente. Os extratos derivatizados foram injetados no CG-DIC para comparação dos tempos de retenção e cálculo do índice de Kováts.

Bioensaios

Para verificar a atividade biológica dos extratos foram realizados bioensaios com os extratos obtidos dos diferentes solventes no período de extração de 24 horas. Estes extratos foram escolhidos já que neste período a extração resultou mais uniforme em relação aos outros períodos de extração.

Os extratos foram aplicados em pérolas de vidro de formato circular (1 mm de diâmetro) que foram utilizadas para simular ovos e posturas de percevejos (Bin et al. 1993; Borges et al. 1999). A utilização das pérolas permite trabalhar com um substrato similar em forma e tamanho aos ovos utilizados como hospedeiros pelo parasitóide, mas que não apresentam outros estímulos associados como cor e substâncias químicas, entre outros. Adicionalmente, por serem de vidro, as pérolas podem ser lavadas com diferentes solventes e mantidas em estufa a altas temperaturas (+ 100 °C) para eliminação de qualquer contaminante.

Um conjunto de cinco pérolas de vidro foram inseridas em vials de fundo cônico de 4 mL no qual se adicionaram 5 µL (1 µL para cada pérola) de um dos extratos a serem avaliados. As pérolas foram mantidas em contato com o extrato durante 1 minuto. Posteriormente, as pérolas foram colocadas no centro de um quadrado (1,0 x 1,0 cm) de parafilme (American National Can) posicionado no centro de uma placa de Petri (7 cm de diâmetro) e foram mantidas em temperatura ambiente até a evaporação total do solvente.

Uma fêmea de *T. podisi* foi introduzida na arena e observados e registrados os seguintes comportamentos:

Tempo de Encontro – tempo transcorrido desde a liberação do parasitóide até o encontro com o conjunto de pérolas.

Tamborilamento – exame dos hospedeiros com as antenas, realizando movimentos de percussão na superfície e laterais dos ovos.

Tentativa de oviposição – o parasitóide estende o ovipositor e tenta perfurar o hospedeiro artificial, pela impossibilidade de perfurar a pérola.

Número de visitas – número de vezes em que o parasitóide faz contato com a postura artificial realizando pelo menos o tamborilamento.

As fêmeas que não responderam (parasitóides que não realizaram contato físico com o conjunto de pérolas) após 10 minutos de serem introduzidas nas arenas foram excluídas das análises. Foi considerado abandono da postura quando a fêmea deixou a mesma e não retornou após 5 minutos. Os bioensaios foram realizados com pérolas tratadas com os extratos dos ovos obtidos nos diferentes solventes ou tratadas apenas com os solventes (controle) e pérolas sem tratar (sem qualquer estímulo: extrato de ovos ou solvente). No caso dos extratos obtidos em acetona, foi utilizado hexano como controle devido a solução final (extratos de ovos em acetona) ser diluída neste solvente (ver metodologia de preparação dos extratos em acetona). Foram avaliadas 20 fêmeas de *T. podisi* para cada tratamento (extrato, solvente (controle) ou pérolas sem tratamento químico). As fêmeas utilizadas foram provenientes de uma colônia de laboratório mantida segundo os procedimentos e condições descritas no Capítulo 1 desta dissertação. Todas as fêmeas utilizadas nos bioensaios foram de 24 a 48 h de idade e mantidas previamente com machos para assegurar a sua fecundação.

Análises estatísticas

A quantidade total de compostos extraídos (ng/g de ovos) com os diferentes solventes e tempos de extração foram analisados por ANOVA de dois fatores e os valores médios da quantidade de compostos em cada solvente e tempo de extração foram comparados pelo teste de Dunn ($p < 0,05$).

Para analisar a composição relativa de cada composto nas misturas obtidas nos diferentes solventes foi utilizada uma análise composicional (Aitchison, 1986). Esta análise foi desenvolvida para utilização de métodos estatísticos multivariados criando uma composição a partir da mistura de compostos presentes em amostras complexas. Nesta composição a contribuição de cada composto é considerada em relação ao resto dos componentes. Para isto a concentração relativa de cada composto em cada amostra foi convertida a uma proporção em relação ao total e valores 0 de concentração corrigidos segundo Aitchison (1986). Posteriormente, os valores foram expressos como a proporção da média geométrica de cada amostra e transformados a logaritmo natural (log-razão). Os dados assim transformados foram utilizados na análise de variância multivariada (MANOVA) utilizando cada composto como uma variável. Foram realizadas MANOVAs para avaliar a influência dos diferentes tempos de extração em relação a cada tipo de solvente e para avaliar a influência dos solventes quando foi utilizado o tempo de extração de 24 h. A significância destes fatores foi estabelecida pelo teste F. Para determinar a contribuição dos compostos (variáveis) que mais influenciaram para separar os diferentes tratamentos foram realizadas análises de variáveis canônicas (AVC). Com esta análise discriminante pode-se observar em forma gráfica se os diferentes níveis dos fatores considerados (tempos no caso da análise em cada solvente ou solventes no caso da análise para extratos de 24 h) podem separar-se em um gráfico de duas dimensões. Adicionalmente, pelo cálculo dos coeficientes ou cargas (*loadings*) para cada variável pode-se avaliar quais as variáveis (compostos neste caso) que mais contribuem para separar os níveis dos fatores e quais destes estão mais relacionadas com os diferentes níveis do fator.

Para os bioensaios o tempo médio dos comportamentos de encontro e tamborilamento e número de visitas para cada extrato, solvente e pérolas sem tratamento químico foram analisados pelo teste de Kruskal Wallis e a comparação entre os valores médios de cada parâmetro foi feita pelo teste de Dunn a $p < 0,05$. A probabilidade média (e o correspondente intervalo de confiança de 95 %) de

desenvolver o comportamento de tentativa de oviposição quando as fêmeas de *T. podisi* foram avaliadas em presença de pérolas de vidro tratadas com extratos ou solventes foram calculadas utilizando regressão logística. Posteriormente, a significância das diferenças entre a probabilidade de desenvolver a tentativa de oviposição em pérolas tratadas com extratos dos diferentes solventes e pérolas tratadas com o solvente respectivo foi avaliada mediante o critério de não sobreposição dos intervalos de confiança.

Resultados

As extrações em acetona, metanol e diclorometano nos períodos de 1 e 4 horas não ocasionaram mudanças morfológicas marcantes nos ovos de *E. heros*. Entretanto, algumas mudanças na aparência física dos ovos ocorreram no período de extração de 24 horas, os ovos submersos nos solventes avaliados durante este período mostraram um aspecto túrgido após as extrações. O material adesivo, que mantém os ovos unidos nas posturas, não foi retirado por nenhum dos solventes utilizados. Sua presença foi constatada até mesmo em ovos submetidos à extração de 24 horas em todos os solventes.

O tipo de solvente influenciou a quantidade total (ng/g de ovos) de compostos obtidos (ANOVA $F = 6,54$ gl= 2,27 $P = 0,005$), entretanto o tempo de extração e a interação entre os fatores foram não significativos ($F = 1,47$ gl = 2,27 $P = 0,25$ e $F = 1,68$ gl= 4,27 $P = 0,18$ respectivamente). Na extração realizada com metanol no período de 24 horas obteve-se uma quantidade de compostos maior em comparação a acetona e diclorometano no mesmo período de extração, adicionalmente, a quantidade de compostos obtidos com este solvente e neste período de extração foi superior à quantidade obtida quando a extração foi realizada no período de 1 hora (Figuras 3.1).

Foram identificados 11 compostos majoritários, todos derivados de ácidos graxos de cadeia longa C_{16} e C_{18} , nos extratos de ovos de *E. heros* obtidos em acetona, metanol ou diclorometano (Figuras 3.2 e 3.3). A composição das amostras, estimada a partir da percentagem de cada composto em relação ao total de compostos, foi influenciada pelo solvente e período de extração. Alguns compostos como o ácido hexadecanóico (ácido palmítico) e *Z,Z* - 9,12 ácido octadienóico (ácido linoléico) foram abundantes em todos os solventes, entretanto houve variações em suas porcentagens em diferentes períodos de extração em cada solvente (Figura 3.3). As amostras obtidas no

período de 24 h apresentaram-se mais homogêneas (menores indicadores de dispersão dos dados, neste caso EP), diferentemente do observado nos períodos de 1 e 4 h (Figura 3.3). Os compostos *cis*-9-octadecenoato de metila e *Z,Z* - 9,12 Octadienoato de etila (linoleato de etila) para as amostras obtidas em acetona em 24 h, estavam coeluídas o que dificultou sua separação pelo equipamento.

No período de extração de 24 horas a porcentagem de cada composto, em relação à quantidade total, não mostrou um padrão definido e se apresentou em quantidades variáveis em cada solvente (Figura 3.4). As extrações no solvente de maior polaridade (metanol) foram mais eficientes que as extrações em acetona ou diclorometano para a maior parte dos compostos encontrados nas amostras, quando se analisou a quantidade de cada composto (ng do composto/g de ovos) extraída no período de 24 h (figura 3.5).

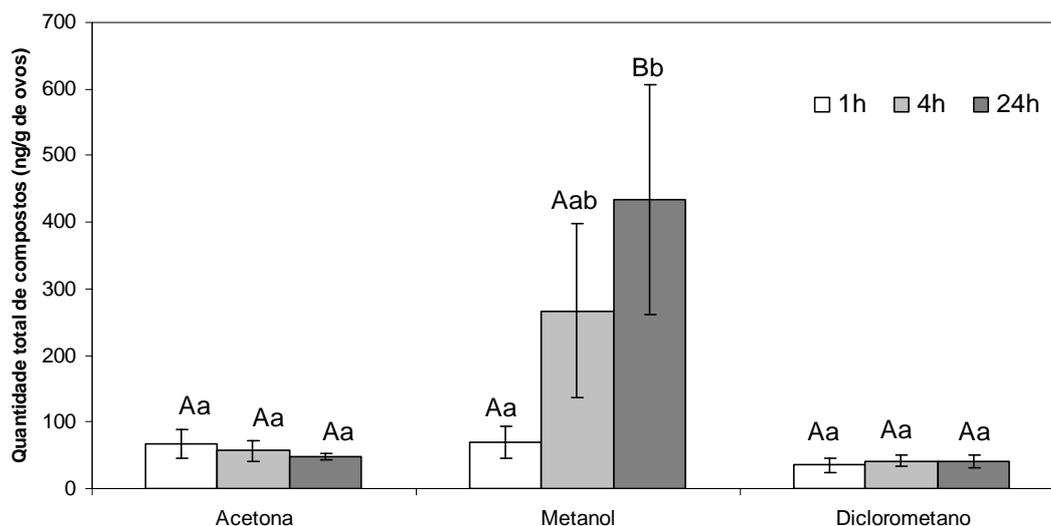


Figura 3.1 Quantidade total de compostos (média \pm EP) obtidos em um grama de ovos de *E. heros* em diferentes solventes e períodos de extração. Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas não diferem significativamente entre os solventes considerando o mesmo tempo de extração. Médias seguidas de mesmas letras minúsculas não diferem significativamente entre os períodos de extração em um mesmo solvente (ANOVA e teste de Dunn $P > 0,05$).

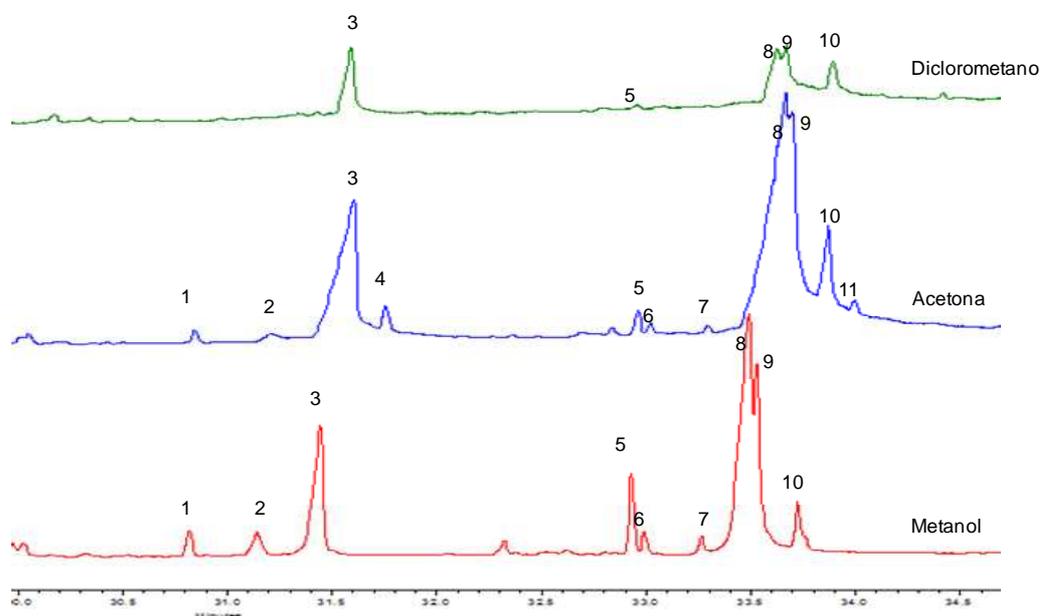


Figura 3.2 Perfis cromatográficos de compostos de *E. heros* extraídos em diferentes solventes sob período de extração de 24h. Os números de 1 a 11 representam os diferentes compostos majoritários: (1) Hexadecanoato de metila, (2) *cis*-9-Hexadecenoato de metila, (3) Ácido hexadecanóico (ácido palmítico), (4) Hexadecanoato de etila, (5) *Z,Z*-9,12 Octadienoato de metila (linoleato de metila), (6) *cis*-9-Octadecenoato de metila, (7) *Z,Z*-9,12 - Ácido Octadienóico (ácido linoleico), (8) *cis*-9-Octadecenóico (ácido oleico), (9) *Z,Z*-9,12 Octadienoato de etila (linoleato de etila) (10) Ácido octadecanóico (ácido esteárico) e (11) Octadecanoato de etila.

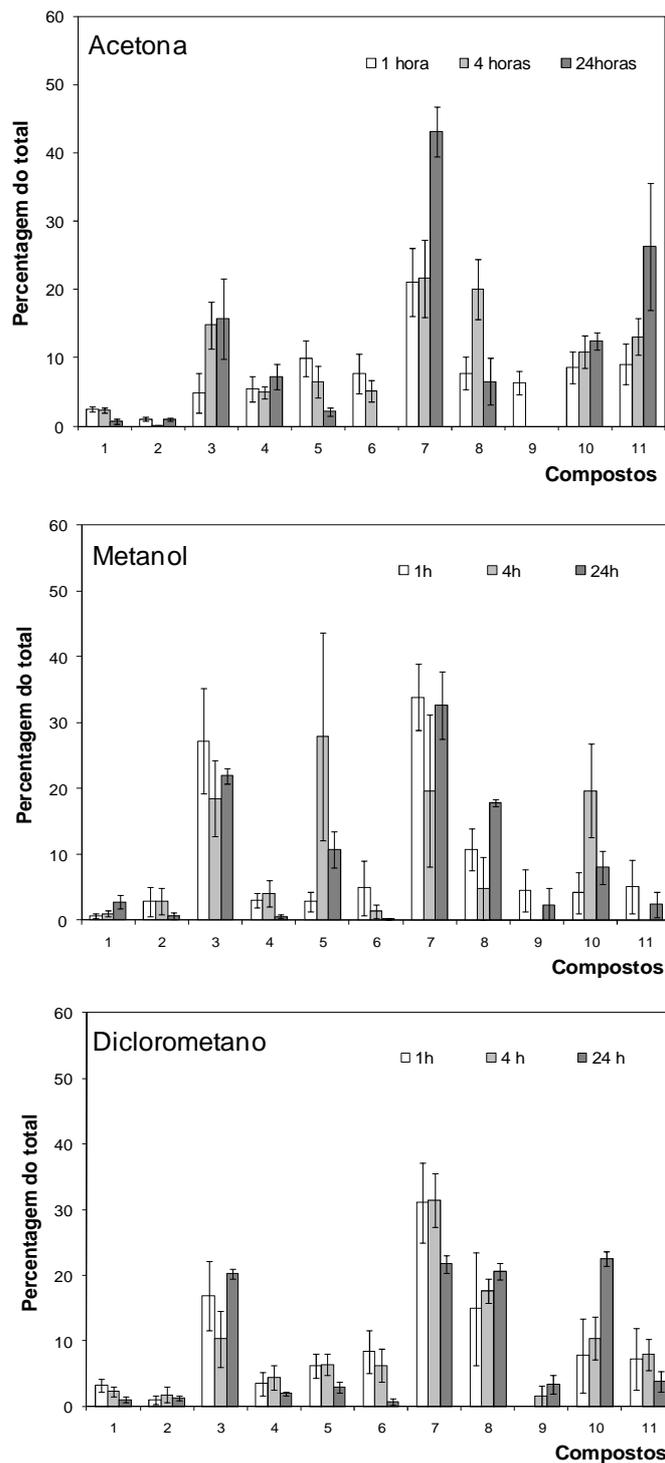


Figura 3.3 Porcentagem de cada composto majoritário (média \pm EP; em relação ao total) extraídos de ovos de *E. heros* em diferentes períodos de extração e com diferentes solventes (acetona, diclorometano e metanol). Os números de 1 a 11 representam os diferentes compostos majoritários: (1) Hexadecanoato de metila, (2) *cis*-9-Hexadecenoato de metila, (3) Ácido hexadecanóico (ácido palmítico), (4) Hexadecanoato de etila, (5) *Z,Z*-9,12 Octadienoato de metila (linoleato de metila), (6) *cis*-9-Octadecenoato de metila, (7) *Z,Z*-9,12 - Ácido Octadienóico (ácido linoleico), (8) *cis*-9-Octadecenóico (ácido oleico), (9) *Z,Z*-9,12 Octadienoato de etila (linoleato de etila) (10) Ácido octadecanóico (ácido esteárico) e (11) Octadecanoato de etila.

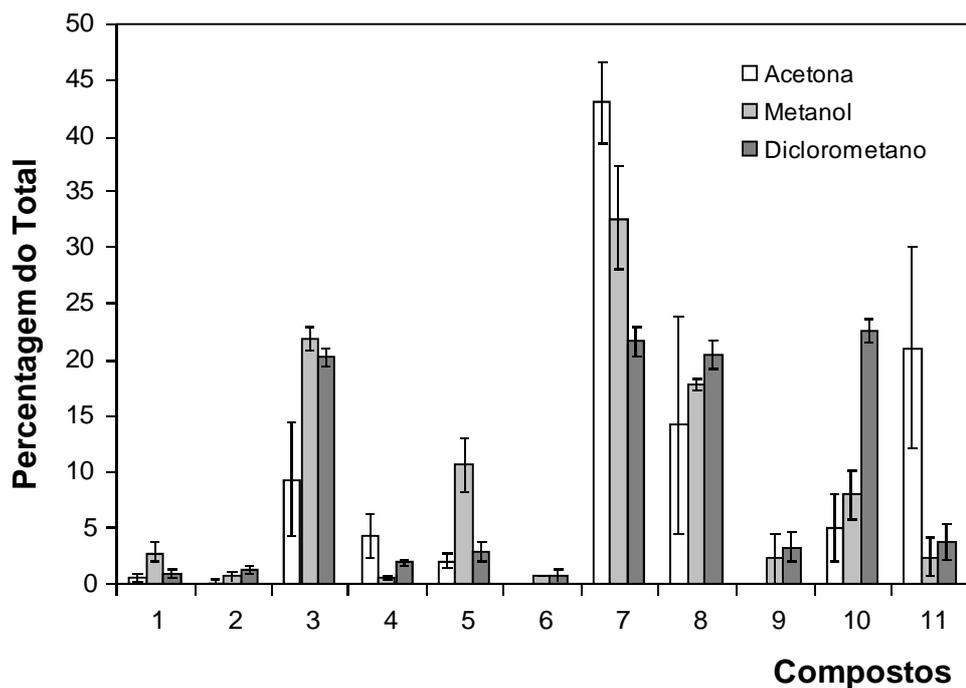


Figura 3.4 Porcentagem de cada composto majoritário (média \pm EP; em relação ao total) obtidos de ovos de *E. heros* após extração durante 24 horas em diferentes. Os números de 1 a 11 representam os diferentes compostos majoritários: (1) Hexadecanoato de metila, (2) *cis*-9-Hexadecenoato de metila, (3) Ácido hexadecanóico (ácido palmítico), (4) Hexadecanoato de etila, (5) *Z,Z* - 9,12 Octadienoato de metila (linoleato de metila), (6) *cis*-9-Octadecenoato de metila, (7) *Z,Z* - 9,12 - Ácido Octadienóico (ácido linoleico), (8) *cis*-9-Octadecenóico (ácido oleico), (9) *Z,Z* - 9,12 Octadienoato de etila (linoleato de etila) (10) Ácido octadecanóico (ácido esteárico) e (11) Octadecanoato de etila.

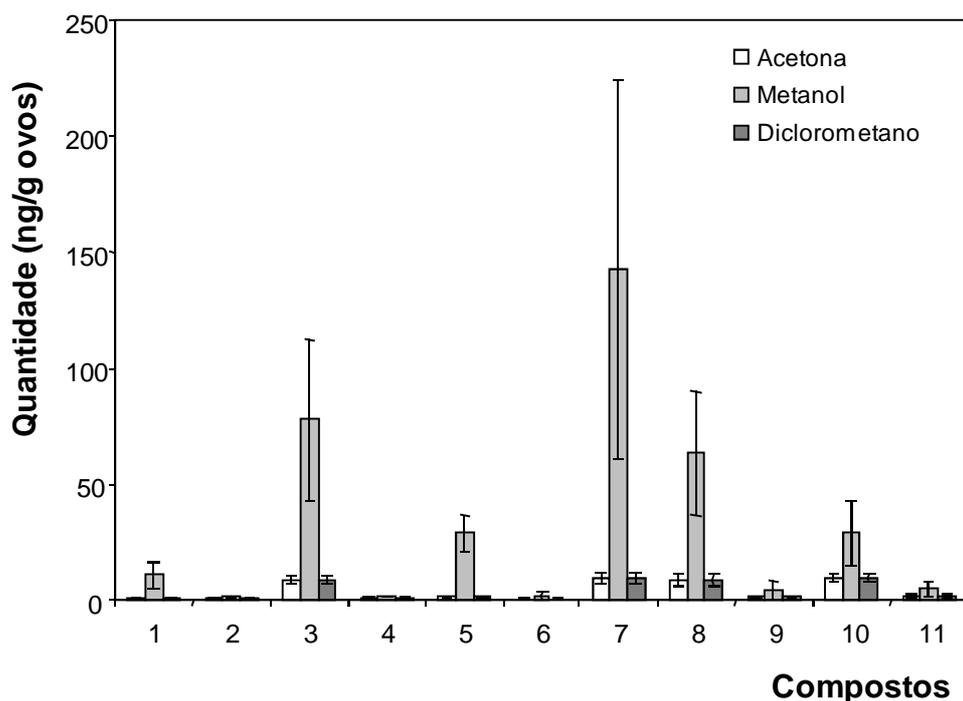


Figura 3.5 Quantidade (média \pm EP) de compostos majoritários obtidos de ovos de *E. heros* após 24 horas de extração em diferentes solventes. Os números de 1 a 11 representam os diferentes compostos majoritários: (1) Hexadecanoato de metila, (2) *cis*-9-Hexadecenoato de metila, (3) Ácido hexadecanóico (ácido palmítico), (4) Hexadecanoato de etila, (5) *Z,Z* - 9,12 Octadienoato de metila (linoleato de metila), (6) *cis*-9-Octadecenoato de metila, (7) *Z,Z* - 9,12 - Ácido Octadienóico (ácido linoleico), (8) *cis*-9-Octadecenóico (ácido oleico), (9) *Z,Z* - 9,12 Octadienoato de etila (linoleato de etila) (10) Ácido octadecanóico (ácido esteárico) e (11) Octadecanoato de etila.

A análise multivariada revelou que há diferenças na composição das amostras entre os períodos para cada solvente (Manova teste de Wilks $\lambda = 3,48 \times 10^{-6}$, $gl = 4,22$, $F = 97,26$ $P < 0,001$, para acetona; $\lambda = 0,00015$, $gl = 4,22$, $F = 3,58$ $P < 0,05$ para metanol, e $\lambda = 1,08 \times 10^{-5}$, $gl = 4,22$, $F = 55,28$ $P < 0,001$, para diclorometano) (Figura 3.6). Para as amostras obtidas em acetona e metanol a maioria dos compostos está relacionada com o período de extração de 24 h. Os compostos hexadecanoato de metila, ácido linoleico, ácido oleico e ácido octadecanóico foram os que mais contribuíram para separar os tratamentos (períodos de extração) obtidos em metanol.

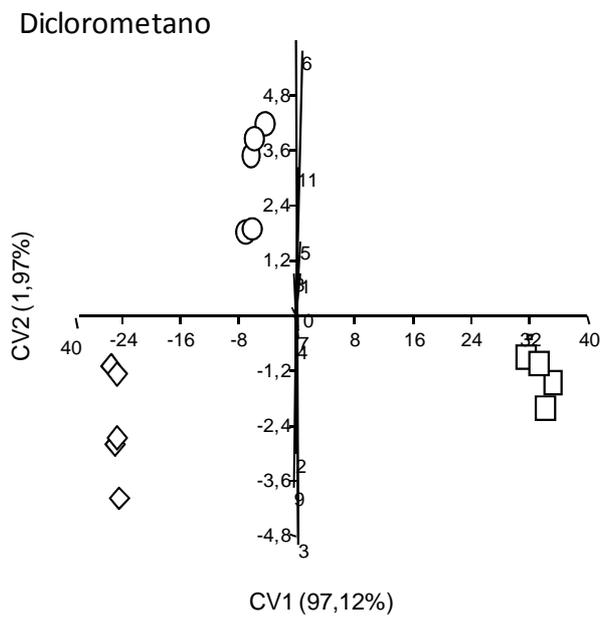
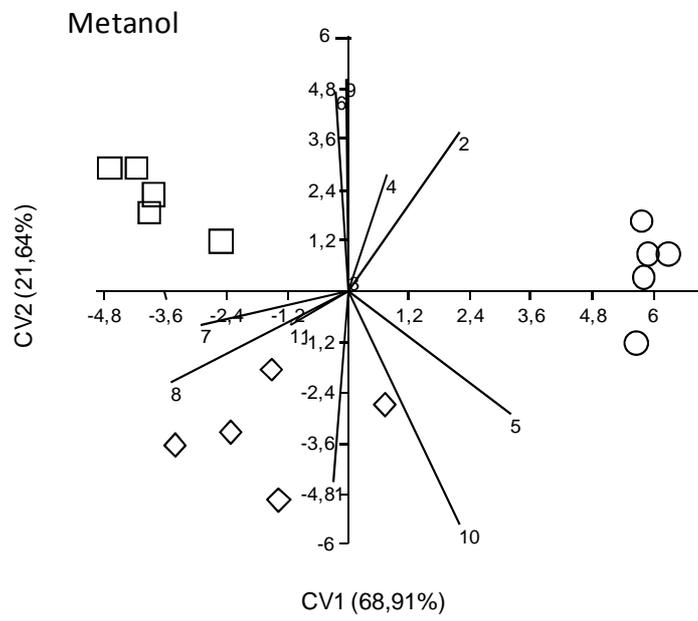
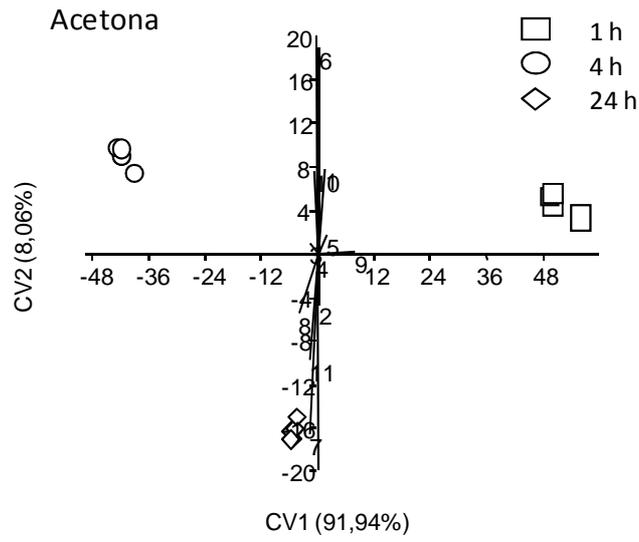


Figura 3.6 Análises de variáveis canônicas mostrando as diferenças nos tempos de extração em diferentes solventes. Os símbolos representam os *scores* individuais para cada amostra calculados a partir da CVA que maximiza a diferença entre os tratamentos nas duas dimensões consideradas (CV1 e CV2). As linhas representam os diferentes compostos presentes nas amostras, a longitude de cada linha representa a importância (magnitude relativa) da contribuição de cada composto para diferenciação dos tratamentos. As primeiras duas variáveis canônicas representam 100%, 90,55% e 99,09% da variabilidade total para acetona, metanol e diclorometano respectivamente. Os números representam os compostos majoritários: (1) Hexadecanoato de metila, (2) *cis*-9-Hexadecenoato de metila, (3) Ácido hexadecanóico (ácido palmítico), (4) Hexadecanoato de etila, (5) Z,Z - 9,12 Octadienoato de metila (linoleato de metila), (6) *cis*-9-Octadecenoato de metila, (7) Z,Z - 9,12 - Ácido Octadienóico (ácido linoleico), (8) *cis*-9-Octadecenoico (ácido oleico), (9) Z,Z - 9,12 Octadienoato de etila (linoleato de etila) (10) Ácido octadecanóico (ácido esteárico) e (11) Octadecanoato de etila.

Quando a análise qualitativa multivariada foi conduzida para os extratos obtidos em diferentes solventes sob o período de 24 horas não revelou diferenças significativas entre os tratamentos (Manova teste de Wilks $\lambda = 0,01$ gl = 4,22 F = 1,67 P < 0,34), entretanto a CVA separou os tratamentos em grupos bem definidos (Figura 3.7). Sendo os compostos ácido linoleico e octadecanoato de etila mais relacionados a acetona, hexadecanoato de metila e linoleato de metila mais relacionados a metanol e linoleato de etila e ácido octadecanóico mais relacionados a diclorometano.

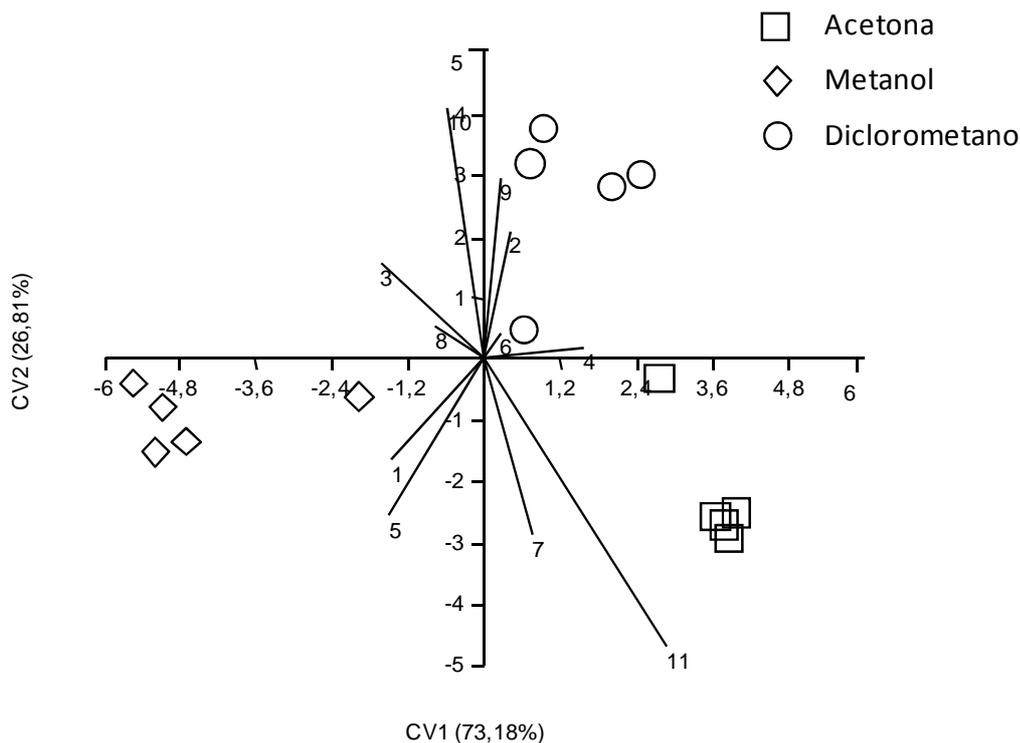


Figura 3.7 Análise de variáveis canônicas mostrando as diferenças nas amostras obtidas em diferentes solventes após 24 h de extração. Os símbolos representam os *scoces* individuais para cada amostra calculados a partir da CVA que maximiza a diferença entre os tratamentos nas duas dimensões consideradas (CV1 e CV2). As linhas representam os diferentes compostos presentes nas amostras, a longitude de cada linha representa a importância (magnitude relativa) da contribuição de cada composto para diferenciação dos tratamentos. As primeiras duas variáveis canônicas representam 99 % da variabilidade. Os números representam os compostos majoritários (1) Hexadecanoato de metila, (2) *cis*-9-hexadecenoato de metila, (3) ácido hexadecanóico (ácido palmítico), (4) Hexadecanoato de etila, (5) Z,Z - 9,12 Octadienoato de metila (Linoleato de metila), (6) *cis*-9-octadecenoato de metila, (7) Z,Z - 9,12 - Ácido Octadienóico (ácido linoleico), (8) *cis*-9-octadecenóico (ácido oleico), (9) Z,Z - 9,12 Octadienoato de etila (Linoleato de etila) (10) ácido octadecanóico (ácido esteárico) e (11) Octadecanoato de etila.

Os bioensaios em hospedeiros artificiais foram realizados com os extratos de 24h devido a maior quantidade de compostos e homogeneidade quantitativa das amostras.

O tempo de encontro do parasitóide *T. podisi* com as posturas não diferiu entre os tratamentos (Teste de Kruskal-Wallis $H = 6,12$ $P = 0,41$) (Figura 3.8). Quando em contato com o hospedeiro artificial, todos os tratamentos induziram comportamento de reconhecimento de hospedeiro observando-se diferenças entre os tempos de tamborilamento (Teste de Kruskal-Wallis $H = 39,25$ $P < 0,001$). Ao comparar o tempo de tamborilamento entre pérolas tratadas com extratos e seus respectivos solventes, o extrato em metanol foi o único tratamento onde o tempo de tamborilamento (examinação) nas pérolas foi superior ao controle (metanol) (Figura 3.9). O tempo de tamborilamento nas pérolas sem tratamento (pérolas sem aplicação de extratos ou solventes) não foi diferente do tempo de tamborilamento nas pérolas tratadas com os solventes (Figura 3.9). Após o tamborilamento das posturas as fêmeas tentaram ovipositar nas pérolas submetidas aos diferentes tratamentos, com exceção do extrato em diclorometano. No entanto, a probabilidade de desenvolver a tentativa de oviposição nas pérolas tratadas com extratos e os respectivos solventes somente foi significativamente maior no caso dos extratos obtidos com metanol (Figura 3.10). Assim como nas pérolas tratadas com extratos de diclorometano, a tentativa de oviposição também não foi observada nas pérolas sem tratamento químico.

As pérolas tratadas com os diferentes extratos de ovos, solventes ou sem tratar (não embebidas de extratos ou solventes) motivaram de maneira diferencial as fêmeas de *T. podisi*. O número de visitas nas posturas artificiais foi significativamente diferente entre os tratamentos (Teste de Kruskal-Wallis $H = 16,70$ $P = 0,01$). O extrato em metanol foi o único tratamento em que as fêmeas de *T. podisi* realizaram maior número de visitas em comparação ao solvente (Figura 3.11).

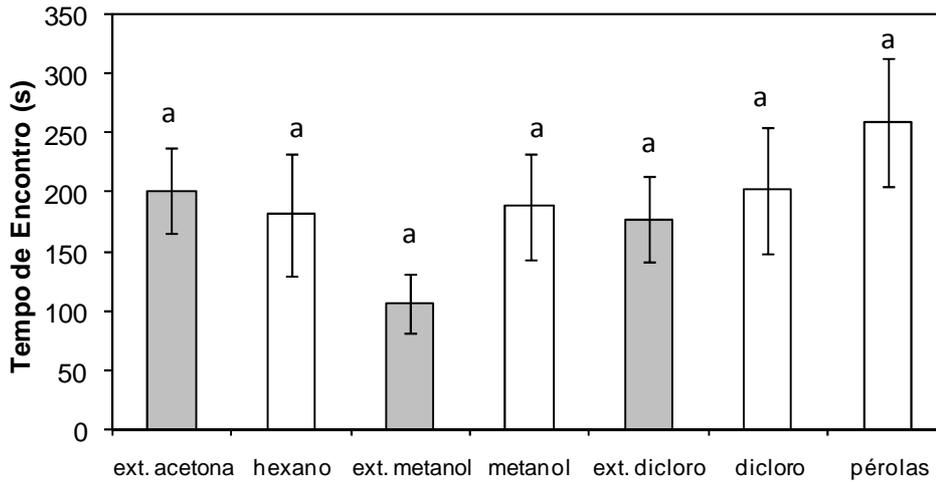


Figura 3.8 Tempo de encontro (média \pm EP) das fêmeas de *T. podisi* com hospedeiros artificiais (5 pérolas de vidro de 1 mm de diâmetro) submetidos a diferentes tratamentos. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente (Teste de Kruskal-Wallis $P > 0,05$). Ex = Extrato, dicloro = diclorometano.

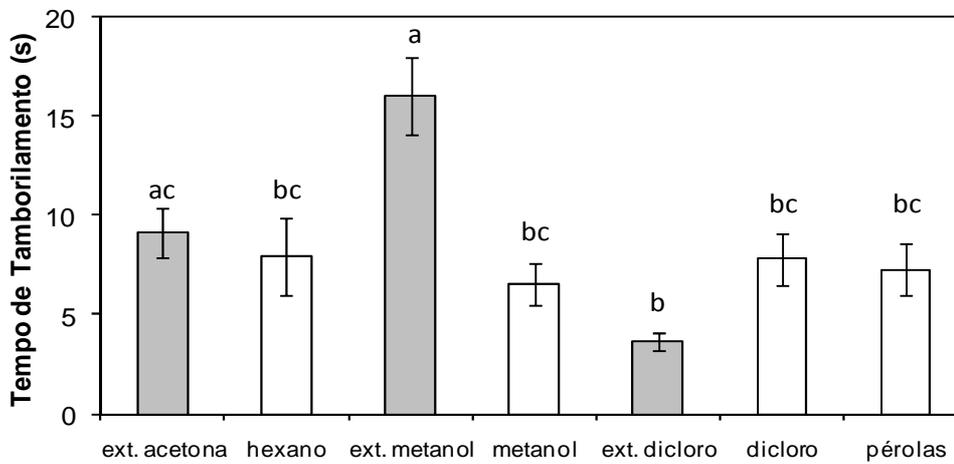


Figura 3.9 Tempo de tamborilamento (média \pm EP) das fêmeas de *T. podisi* em hospedeiros artificiais (5 pérolas de vidro de 1 mm de diâmetro) submetidos a diferentes tratamentos. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente (Teste de Kruskal-Wallis $P > 0,05$). Ex = Extrato, dicloro = diclorometano.

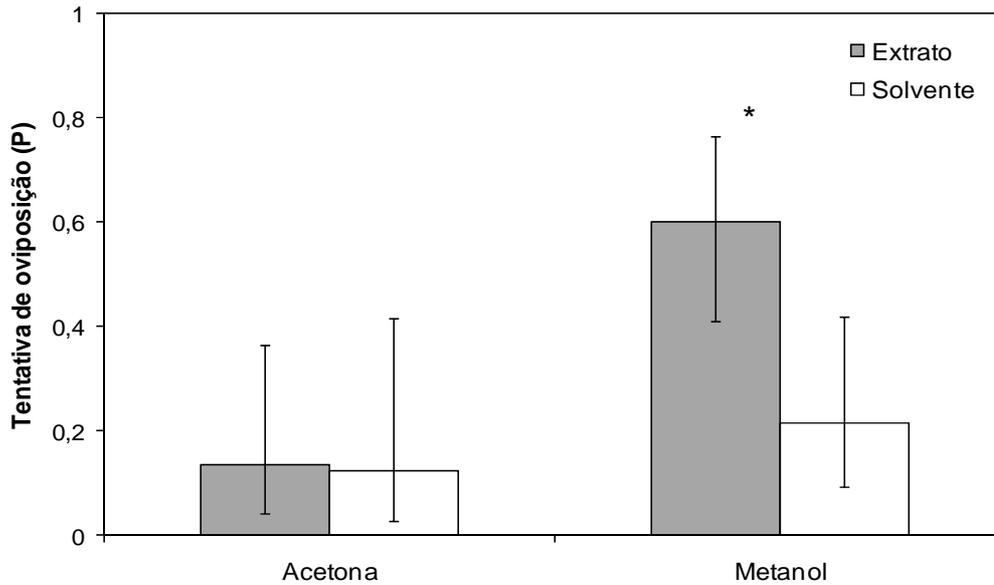


Figura 3.10 Probabilidade do parasitóide *T. podisi* realizar a tentativa de oviposição (média \pm IC95%) em hospedeiros artificiais (5 pérolas de vidro de 1 mm de diâmetro) submetidos a diferentes tratamentos. Os valores médios e os IC95% foram calculados mediante regressão logística. * = não sobreposição dos intervalos de confiança.

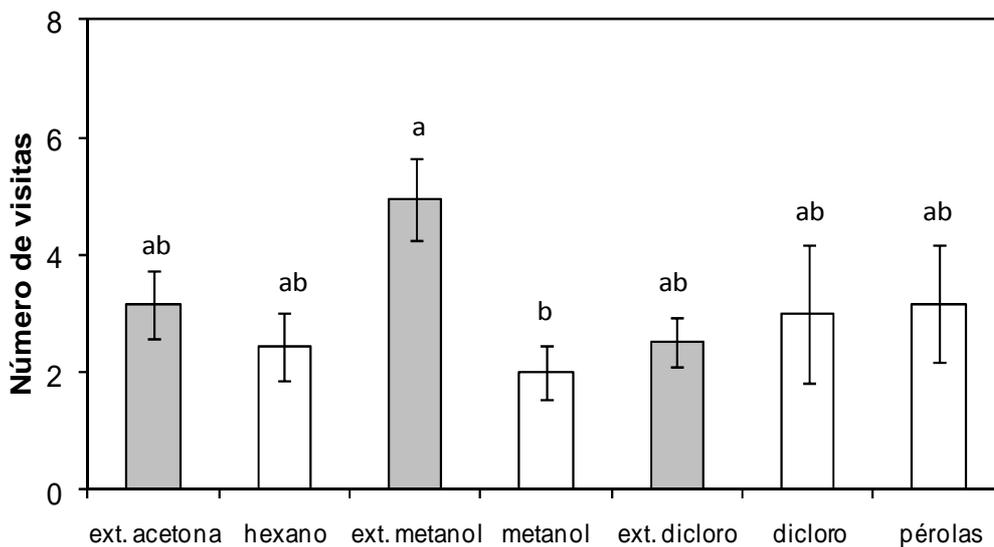


Figura 3.11 Número de visitas do parasitóide *T. podisi* a hospedeiros artificiais (5 pérolas de vidro de 1 mm de diâmetro) submetidos a diferentes tratamentos. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente (Teste de Kruskal-Wallis $P > 0,05$). Ex = Extrato, dicloro = diclorometano.

Discussão

As extrações químicas de ovos de *E. heros* em acetona, diclorometano e metanol revelaram que todos os solventes extraíram os mesmos compostos majoritários. Devido às diferenças nas características químicas, os solventes, bem como o período de extração influenciaram na quantidade final de cada composto com quantidades maiores ou menores dependendo do período de extração e/ou do solvente. Entretanto, as diferenças observadas na quantidade individual e total dos compostos mostraram que metanol parece ser o melhor solvente, extraindo uma quantidade maior de compostos em comparação a acetona e diclorometano.

Alguns compostos identificados no presente trabalho como ácido hexadecanóico (ácido palmítico), ácido octadecanóico (ácido esteárico) e ácido cis-9-octadecenóico (ácido oleico) foram similares aos identificados no trabalho de Liu et al. (2008) em ovos de Lepidoptera os quais juntamente com outros compostos mostraram deterrência de oviposição para o herbívoro.

As fêmeas de *T. podisi* realizaram o reconhecimento (tamborilamento) sobre o conjunto de pérolas cobertas com extratos totais de ovos do hospedeiro *E. heros* o que confirma a hipótese que substâncias químicas presentes nos ovos são utilizadas pelo parasitóide para reconhecer e aceitar o hospedeiro durante o comportamento de oviposição. Adicionalmente, os resultados obtidos concordam com informações prévias de que substâncias químicas presentes no hospedeiro atuam como cairomônios de reconhecimento em insetos parasitóides (Strand & Vinson 1983b; Leonard et al. 1987; Nordlund et al. 1987; Bin et al. 1993; Meiners & Hilker 1997; Meiners et al. 1997; Borges et al. 1999; Lou & Cheng 2001; Conti et al. 2003 & De Santis et al. 2008).

Os comportamentos de reconhecimento e aceitação de hospedeiros observados em pérolas de vidro tratadas com extratos de ovos de *E. heros* foram similares aos observados em ovos naturais (ver descrição no Capítulo 2 desta dissertação), com exceção obviamente, da oviposição pela impossibilidade de inserção do ovipositor, e do comportamento de marcação que é posterior à oviposição.

Os comportamentos de extensão do ovipositor e tentativa de perfuração, que neste trabalho foram considerados como tentativa de oviposição, também foram observados nos bioensaios com pérolas de vidro tratadas com os extratos obtidos em diferentes solventes, entretanto somente no extrato com metanol a probabilidade de realizar este comportamento foi significativamente diferente à registrada em pérolas

tratadas com o solvente. Adicionalmente, os extratos obtidos neste solvente mostraram maior atividade biológica para *T. podisi* induzindo o tamborilamento por mais tempo e aumentando o número de visitas, o que sugere que os compostos responsáveis pelo reconhecimento sejam polares. O longo período de extração de 24 horas provavelmente tenha retirado compostos químicos do interior dos ovos de *E. heros*, entretanto, não impediu que as fêmeas realizassem o comportamento de reconhecimento de hospedeiro.

O registro de tamborilamento em pérolas sem estímulos químicos (sem tratamento) e de tentativa de oviposição em pérolas tratadas apenas com solvente indicam que o processo de reconhecimento também é influenciado por características físicas. Estas observações sugerem que a presença do cairômonio pode reforçar o reconhecimento do hospedeiro que inicialmente é mais influenciado por características físicas.

Em Scelionidae os cairômônios de reconhecimento de hospedeiro parecem estar relacionados com o sistema reprodutor do hospedeiro. Nordlund et al. (1987) observaram que *Telenomus remus* Nixon, 1937 reconhece e aceita pérolas de vidro tratadas com extrato do material da glândula acessória de *Spodoptera frugiperda* Smith, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae) o mesmo comportamento foi observado com frações protéicas desse material. Esta observação sugere que, provavelmente, proteínas ou peptídeos estejam relacionados ao comportamento de reconhecimento. De Santis et al. (2008) mostraram que a presença da secreção da glândula acessória de *Sesamia nonagrioides* Lefebvre, 1827 (Lepidoptera: Noctuidae) aplicada em pérolas de vidro induzem o comportamento de reconhecimento e aceitação do parasitóide *Telenomus busseolae* Gahan, 1922 (Hymenoptera: Scelionidae). O material responsável por estimular o reconhecimento não foi caracterizado, mas investigações histoquímicas revelaram ser glicoconjugados.

Bin et al. (1993) realizaram os primeiros esforços para isolamento do cairômônio responsável pelo reconhecimento de hospedeiro em scelionídeos que atacam pentatomídeos. Estes autores verificaram que o parasitóide *T. basalis* desenvolve comportamento de reconhecimento e tentativa de oviposição em pérolas de vidro tratadas com extratos do ovariolo proximal de *Nezara viridula*, onde se encontra a secreção adesiva responsável por aderir os ovos na postura e ao substrato. Esta secreção é originada nas células foliculares. Borges et al. (1999) verificaram que as fêmeas de *Telenomus podisi* respondem a extratos acetonícos de ovos do percevejo *Euschistus heros* e concluem que o cairômônio deve ser uma substância ou uma mistura pouco

volátil. Conti et al. (2003) trabalhando com o percevejo *Murgantia histrionica* Hahn, 1834 e o parasitóide *Trissolcus brochymenae* Ashmead, 1893 confirmaram que substâncias químicas de ovos de Pentatomidae estimulam o reconhecimento de hospedeiros. Apesar destas evidências nenhuma caracterização química tem sido realizada até o momento.

Os resultados deste trabalho mostraram o efeito cairomonal de extrato de ovos de *E. heros* para o parasitóide *T. podisi*. Além da composição qualitativa dos extratos avaliados os resultados sugerem que o comportamento de reconhecimento de *T. podisi* estaria relacionado com a concentração de compostos. Esta hipótese se sustenta pela maior atividade biológica observada em extratos de metanol que foi o que mostrou maior concentração absoluta e relativa dos compostos extraídos. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade de que compostos minoritários também sejam importantes nesse processo.

O presente trabalho constitui a primeira tentativa de descrever a composição química de cairomônios presentes em ovos de *E. heros*. Trabalhos futuros com bioensaios de frações de extratos de ovos serão importantes para determinar a fração mais ativa e, posteriormente, o(s) os composto(s) de maior atividade no reconhecimento do hospedeiro. Assim também a presença de compostos minoritários e sua possível atividade biológica devem ser estabelecidos.

Considerações finais

Os parasitóides de ovos *Telenomus podisi* e *Trissolcus basalis* mostraram preferência inata por substrato de cor amarela. A sensibilidade a esta cor está relacionada com os fotorreceptores presentes em Hymenoptera e teria relação com a detecção do habitat (plantas) onde se encontram os ovos de percevejos. Esta preferência inata não foi modificada quando as fêmeas tiveram experiência em substratos de cores diferentes não se caracterizando aprendizagem associativa.

Os parasitóides de ovos discriminaram os hospedeiros, selecionando aqueles que garantem maior sucesso reprodutivo. A discriminação se realiza durante o comportamento de oviposição e pode estar influenciada pelas características morfológicas das posturas das diferentes espécies de percevejos avaliadas.

Foi comprovada a presença de substâncias com efeito cairomonal para o parasitóide *Telenomus podisi*, presentes em ovos do percevejo marrom *Euschistus heros*. Estes cairomônios estão envolvidos no processo de reconhecimento e seleção do hospedeiro. O metanol mostrou ser o solvente mais eficiente para extração das substâncias com ação cairomonal, sugerindo que estes devem ser compostos polares.

Trabalhos futuros devem orientar-se principalmente à identificação precisa dos compostos químicos com ação cairomonal, ao estudo das interações entre estímulos físicos e químicos e ao estabelecimento da importância dos mesmos para estimular cada passo do comportamento de oviposição.

Referências bibliográficas

- Aitchison J.** 1986. *The statistical analysis of compositional data*. Chapman & Hall, Inc, Bristol.
- Alphen van, J. J. M. & Vet, L.E.M.** 1986. An evolutionary approach to host finding and selection. In: *Insect Parasitoids* (Ed. Waage, J. & Greathead), pp. 23–62. London: Academic Press.
- Bénédet, F., Bigot, Y., Renault, S., Pouzat, J. & Thibout, E.** 1999. Polypeptides of *Acrolepiopsis assectella* cocoon (Lepidoptera: Yponomeutoidea): an external host-acceptance kairomone for the parasitoid *Diadromus pulchellus* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Journal of Insect Physiology*, **45**, 375–384.
- Bernstein, C. & Jervis M. A.** 2008. Food-searching in parasitoids: the dilemma of choosing between “immediate” or future fitness gains. In: *Behavioural ecology of insect parasitoids* (Ed. by Wajnberg, E., Bernstein, C., van Alphen, J. J. M.), pp 129–171. Oxford: Blackwell Publishing.
- Bin, F., Vinson, S. B., Strand, M. R., Colazza, S. & Jones, W. A.** 1993. Source of an egg kairomone for *Trissolcus basalus*, a parasitoid of *Nezara viridula*. *Physiological Entomology*, **18**, 7–15.
- Borges, M., Ferreira, L. T., Costa, M. L. M., Scarpati, M. V., Santos, H. M. & Lourenço, R. T.** 1997. Semioquímicos associados aos parasitóides *Trissolcus basalus* e *Telenomus podisi*, para o controle dos percevejos, *Nezara viridula* e *Euschistus heros*, pragas da soja. *Comunicado Técnico*, **18**, Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.
- Borges, M., Costa, M. L. M., Sujii, E. R., Cavalcanti, M. Das G., Redígolo, G. F., Resck, I. S. & Vilela, E. F.** 1999. Semiochemical and physical stimuli involved in host recognition by *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae) toward *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). *Physiological Entomology*, **24**, 227–233.

- Borges, M., Colazza, S., Ramirez-Lucas, P., Chauhan, K. R., Moraes, M. C. B. & Aldrich, J. R.** 2003. Kairomonal effect of walking traces from *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae) on two strains of *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae). *Physiological Entomology*, **28**, 349–355.
- Borges, M., Laumann, R. A., Silva, C. C. A. da., Moraes, M.C.B., Santos, H. M. dos & Ribeiro, D. T.** 2006. Metodologia de criação e manejo de colônias de percevejos da soja (Hemiptera - Pentatomidae) para estudos de comportamento e ecologia química. *Documentos*, **182**, Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.
- Briscoe, A. D. & Chittka, L.** 2001. The evolution of colour vision in insects. *Annual Review Entomology*, **46**, 471–510.
- Brown, P.E., Frank C. P., Groves, H. L. & Anderson, M.** 1998. Spectral sensitivity and visual conditioning in the parasitoid wasp *Trybliographa rapae* (Hymenoptera: Cynipidae). *Bulletin of Entomological Research*, **88**, 239–245.
- Chittka, L.** 1996. Optimal sets of color receptors and color opponent systems for coding of natural objects in insect vision. *Journal of Theoretical Biology*, **181**, 179–196.
- Chocorosqui, V. R. & Panizzi, A. R.** 2004. Impact of cultivation systems on *Dichelops melacanthus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) population and damage and its chemical control on wheat. *Neotropical Entomology*, **33**, 487–492.
- Clarke, A. R. & Walter, G. H.** 1995. “Strains” and the classical biological control of insects pests. *Canadian Journal of Zoology*, **73**, 1777–1790.
- Colazza, S., Salerno, G. & Wajnberg, E.** 1999. Volatile contact chemicals released by *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae) have a kairomonal effect on the egg parasitoid *Trissolcus basalus* (Hymenoptera: Scelionidae). *Biological Control*, **16**, 310–317.

- Colazza, S., Mcelfresh, J. S. & Millar, J. G.** 2004a. Identification of volatile synomones, induced by *Nezara viridula* feeding and oviposition on bean spp., that attract the egg parasitoid *Trissolcus basalis*. *Journal of Chemical Ecology*, **30**, 945–964.
- Colazza, S., Fucarino, A., Peri, E., Salerno, G., Conti, E. & Bin, F.** 2004b. Insect oviposition induces volatile emission in herbaceous plants that attracts egg parasitoids. *Journal of Experimental Biology*, **207**, 47–53.
- Conti, E., Salerno, G., Bin, F., Williams, H. J. & Vinson, S. B.** 2003. Chemical cues from *Murgantia histrionica* eliciting host location and recognition in the egg parasitoid *Trissolcus brochymenae*. *Journal of Chemical Ecology*, **29**, 115–130.
- Conti, E., Salerno, G., Bin, F. & Vinson, S. B.** 2004. The role of host semiochemicals in parasitoid specificity: a case study with *Trissolcus brochymenae* and *Trissolcus simoni* on pentatomid bugs. *Biological Control*, **29**, 435–444.
- Cornell, H. V. & Hawkins, B. A.** 1995. Survival patterns and mortality sources of herbivorous insects: some demographic trends. *American Naturalist*, **145**, 563–593.
- Corrêa-Ferreira, B. S.** 2002. *Trissolcus basalis* para o controle de percevejos da soja. In: *Controle Biológico no Brasil Parasitóides e Predadores* (Ed. Parra, J. R. P., Botelho, P. S., Corrêa-Ferreira, B., Bento, J. M. S.), pp. 449–476. São Paulo: Manole Ltda.
- Corrêa-Ferreira, B. S., Alexandre, T. M. & Pellizzaro, E. C.** 2010. Práticas de manejo de pragas utilizadas na soja e seu impacto sobre a cultura. *Circular Técnica*, **78**, Londrina: Centro Nacional de Pesquisa de Soja.
- Corrêa-Ferreira, B. S. & Moscardi, F.** 1994. Temperature effect on the biology and reproductive performance of the egg parasitoid *Trissolcus basalis* (Woll.). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, **23**, 399–408.

- Corrêa-Ferreira, B. S. & Moscardi, F.** 1995. Seasonal occurrence and host spectrum of egg parasitoids associated with soybean stink bugs. *Biological Control*, **5**, 196–202.
- Corrêa-Ferreira, B. S. & Moscardi, F.** 1996. Biological control of soybean stink bugs by inoculative releases of *Trissolcus basalis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **79**, 1–7.
- Corrêa-Ferreira, B. S. & Panizzi, A. R.** 1999. Percevejos da soja e seu manejo. *Circular Técnica*, **24**, Londrina: Centro Nacional de Pesquisa de Soja.
- Corrêa-Ferreira, B. S. & Zamataro, C. E. O.** 1989. Capacidade reprodutiva e longevidade dos parasitóides de ovos *Trissolcus basalis* (Wollaston) e *Trissolcus mitsukurii* Ashmead (Hymenoptera: Scelionidae). *Revista Brasileira de Biologia*, **49**, 621–626.
- Cusumano, A., Ezio, P., Vinson, S. B. & Colazza, S.** 2011. Intraguild interactions between two egg parasitoids exploring host patches. *Biological Control*, **56**, 173–184.
- De Moraes, C. M. & Lewis, W. J.** 1999. Analyses of Two Parasitoids with Convergent Foraging Strategies. *Journal of Insect Behavior*, **12**, 571–583.
- De Moraes, C. M., Lewis, W. J., Pare, P. W., Alborn, H. T. & Tumlinson, J. H.** 1998. Herbivore-Infested plants selectively attract parasitoids. *Nature*, **393**, 570–573.
- De Santis, F., Conti, E., Romani, R., Salerno, G., Parillo, F. & Bin, F.** 2008. Colleterial glands of *Sesamia nonagrioides* as a source of the host-recognition kairomone for the egg parasitoid *Telenomus busseolae*. *Physiological Entomology*, **33**, 7–16.

- Dicke, M., Van Poecke, R. M. P. & De Boer, J. G.** 2003. Inducible indirect defence of plants: from mechanisms to ecological functions. *Basic and Applied Ecology*, **4**, 27–42.
- Ehler, L. E.** 2002. An evaluation of some natural enemies of *Nezara viridula* in northern California. *Biocontrol*, **47**, 309–325.
- Fatouros, N. E., Bukovinszky, G., Kalkers, L. A., Soler Gamborena, R., Dicke, M. & Hilker, M.** 2005. Oviposition-induced plant cues: do they arrest *Trichogramma* wasps during host location? *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **115**, 207–215.
- Fatouros, N. E., Dicke, M., Mumm, R., Meiners, T. & Hilker, M.** 2008. Foraging behavior of egg parasitoids exploiting chemical information. *Behavioral Ecology*, **19**, 677–689.
- Fiaboe, M. K., Chabi-Olaye, A., Gounou, S., Smith, H., Borgemeister, C. & Schultheiss, F.** 2003. *Sesamia calamistis* calling behavior and its role in host finding of egg parasitoids *Telenomus busseolae*, *Telenomus isis*, and *Lathromeris ovicida*. *Journal of Chemical Ecology*, **29**, 921–929.
- Fischer, S., Samietz, J., Wäckers, F. L. & Dom, S.** 2003. Perception of achromatic cues during host location of a pupal parasitoid. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **106**, 63–66.
- Godfray, H. C. J.** 1994. *Parasitoids, Behavioural and Evolutionary Ecology*. New Jersey: Princeton University Press.
- Goodman, L. A.** 1968. The analysis of cross-classified data: independence, quasiindependence, and interactions in contingency tables with or without missing entries. *Journal of the American Statistical Association*, **63**, 1091–1131.
- Greany, P. D., Vinson, S. B. & Lewis, W. J.** 1984. Insect parasitoids: finding new opportunities for biological control. *Bioscience*, **34**, 690–696.

- Grenier, S. A.** 1997. Desenvolvimento e produção in vitro de *Trichogramma*. In: *Trichogramma e o Controle Biológico Aplicado* (Ed. By Parra, J. R. P. & Zucchi, R. A.), pp. 235– 258. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz-FEALQ.
- Gross, P.** 1993. Insect behavioral and morphological defenses against parasitoids. *Annual Review Entomology*, **38**, 251–273.
- Haccou, P. & Meelis, E.** 1992. *Statistical Analysis of Behavioral Data*. Oxford: University Press.
- Harvey, J. A.** 2000. Dynamic effect of parasitism by an endoparasitoid wasp on the development of two host species: implications for host quality and parasitoids fitness. *Ecological Entomology*, **25**, 267–278.
- Heil, M.** 2008. Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist*, **178**, 41–61.
- Hilker, M. & McNeil, J.** 2008. Chemical and behavioral ecology in insects parasitoids: how to behave optimally in a complex odorous environment. In: *Behavioral ecology of insect parasitoids* (Ed. Wajnberg, E.; Bernstein, C.; van Alphen, J. J. M), pp 92–112. Oxford: Blackwell Publishing.
- Hilker, M. & Meiners, T.** 2002. Induction of plant responses to oviposition and feeding of herbivorous arthropods: a comparison. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **104**, 181–192.
- Hilker, M. & Meiners, T.** 2006. Early herbivore alert: insect eggs induce plant defense. *Journal of Chemical Ecology*, **32**, 1379–1397.
- Karamaouna, F. & Copland, M. J. W.** 2000. Host suitability, quality and host size preference of *Leptomastix epona* and *Pseudaphycus flavidulus*, two endoparasitoids of the mealybug *Pseudococcus viburni*, and host size effect on parasitoid sex ratio and clutch size. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **96**, 149–158.

- Kugimiya, S., Uefune, M., Shimoda, T. & Takabayashi, J.** 2010. Orientation of the parasitic wasp, *Cotesia vestalis* (Haliday) (Hymenoptera: Braconidae), to visual and olfactory cues of field mustard flowers, *Brassica rapa* L. (Brassicaceae), to exploit food sources. *Applied Entomology and Zoology*, **45**, 369–375.
- Laumann, R. A., Aquino, M. F. S., Moraes, M. C. B., Pareja, M. & Borges, M.** 2009. Response of the Egg Parasitoids *Trissolcus basalis* and *Telenomus podisi* to Compounds from Defensive Secretions of Stink Bugs. *Journal of Chemical Ecology*, **35**, 8–19.
- Laumann, R. A., Moraes, M. C. B., Cokl, A. & Borges, M.** 2007. Eavesdropping on sexual vibratory signals of stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) by the egg parasitoid *Telenomus podisi*. *Animal Behaviour*, **73**, 637–649.
- Laumann, R. A., Moraes, M. C. B., Pareja, M., Alarcão, G. C., Botelho, A. C., Maia, A., Leonardecz Neto, N. H. E. & Borges, M.** 2008. Comparative biology and functional response of *Trissolcus* spp. (Hymenoptera: Scelionidae) and implications for stink-bugs (Hemiptera: Pentatomidae) biological control. *Biological Control*, **44**, 32–41.
- Leonard, D. E., Wu, Z-X & Ferro, D. N.** 1987. Responses of parasite *Edovum puttleri* to kairomone from eggs of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Chemical Ecology*, **13**, 335–344.
- Lewis, W. J. & Martin, W. R., JR.** 1990. Semiochemicals for use with parasitoids: Status and future. *Journal of Chemical Ecology*, **16**, 3067–3089.
- Lewis, W. J., Vet, L. E. M., Tumlinson, J. H., Lenteren, J. C. van & Papaj, D. R.** 1990. Variations in parasitoid foraging behavior: essential element of a sound biological control theory. *Environmental Entomology*, **19**, 1183–1193.
- Liu, M., Yu, H. & Li, G.** 2008. Oviposition deterrents from eggs of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): Chemical identification and analysis by electroantennogram. *Journal of Insect Physiology*, **54**, 656–662

- Lobdell, C. E., Yong, T-H. & Hoffmann, M. P.** 2005. Host color preferences and short-range searching behavior of the egg parasitoid *Trichogramma ostrinae*. *Entomologia Experimentalis et applicata*, **116**, 127–134.
- Lou, Y. & Cheng, J.** 2001. Host-recognition kairomone from *Sogatella furcifera* for the parasitoid *Anagrus nilaparvatae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **101**, 59–67.
- Lucchetta, P., Bernstein, C., Théry, M., Lazzari, C. & Desouhant, E.** 2008. Foraging and associative learning of visual signals in a parasitic wasp. *Animal Cognition*, **11**, 525–533.
- Mattiacci, L., Vinson, S. B., Williams, H. J., Aldrich, J. R. & Bin, F.** 1993. A long range attractant kairomone for egg parasitoid *Trissolcus basalis*, isolated from defensive secretion of its host, *Nezara viridula*. *Journal of Chemical Ecology*, **19**, 1167–1181.
- Mazokhin-Porshnyakov, G. A.** 1969. *Insect vision*. New York: Plenum press.
- Medeiros, M. A., Schmidt, F. V. G., Loiacono, M. S., Carvalho, V. & Borges, M.** 1997. Parasitismo e predação em ovos de *Euschistus heros* (Fab.) (Heteroptera: Pentatomidae) no Distrito Federal, Brasil. *Annais da Sociedade Entomologica do Brasil*, **26**, 397–401.
- Medeiros, M. A., Loiacono, M. S., Borges, M. & Schmidt, F. V. G.** 1998. Incidência natural de parasitóides em ovos de percevejos (Hemiptera; Pentatomidae) encontrados na soja no distrito Federal. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, **33**, 1431–1435.
- Meiners, T. & Hilker, M.** 1997. Host location in *Oomyzus gallerucae* (Hymenoptera: Eulophidae), an egg parasitoid of the elm leaf beetle *Xanthogaleruca luteola* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Oecologia*, **112**, 87–93.

- Meiners, T., Köpf, A., Stein, C. & Hilker, M. 1997.** Chemical Signals Mediating Interactions Between *Galeruca tanacetii* L. (Coleoptera, Chrysomelidae) and Its Egg Parasitoid *Oomyzus galerucivorus* (Hedqvits) (Hymenoptera, Eulophidae). *Journal of Insect Behavior*, **10**, 523–539.
- Menzel, R. & Shmida, A. 1993.** The ecology of flower colours and the natural colour vision of insect pollinators: the Israeli flora as a study case. *Biological Reviews*, **68**, 81–120.
- Millar, J. G. & Hare, J. D. 1993.** Identification and synthesis of a kairomone inducing oviposition by parasitoid *Aphytis melinus* from California red scale covers. *Journal of Chemical Ecology*, **19**, 1721–1736.
- Mills, N. J. & Wajnberg, E. 2008.** Optimal foraging behavior and efficient biological control methods. In: *Behavioural ecology of insect parasitoids* (Ed. by Wajnberg, E., Bernstein, C., van Alphen, J. J. M.), pp 3–30. Oxford: Blackwell Publishing.
- Moraes, M. C. B., Laumann, R. A., Sujii, E. R., Pires, C. S. & Borges, M. 2005.** Induced volatiles in soybean and pigeon pea plants artificially infested with the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, and their effect on the egg parasitoid, *Telenomus podisi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **115**, 227–237.
- Moraes, M. C. B., Pareja, M., Laumann, R. A, Hoffmann-Campo, C. B. & Borges, M. 2008.** Response of the parasitoid *Telenomus podisi* to induced volatiles from soybean damaged by stink bug herbivory and oviposition. *Journal of Plant Interactions*, **3**, 1742–1756.
- Muratori, F., Ralec, A. L., Lognay, G. & Hance, T. 2006.** Epicuticular factors involved in host recognition for the aphid parasitoid *Aphidius rhopalosiphii*. *Journal Chemical Ecology*, **32**, 579-593.

- Nordlund, D. A. Strand, M. R., Lewis, W. J. & Vinson, S. B.** 1987. Role of kairomones from host accessory gland secretion in host recognition by *Telenomus remus* and *Trichogramma pretiosum*, with partial characterization. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **44**, 37–44.
- Nufio, C. R. & Papaj, D. R.** 2001. Host marking behavior in phytophagous insects and parasitoids. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **99**, 273–293.
- Ode, P. J.** 2006. Plant chemistry and natural enemy fitness: effects on herbivore and natural enemy fitness. *Annual Review of Entomology*, **51**, 163–185.
- Osorio, D. & Vorobyev, M.** 2008. A review of the evolution of animal colour vision and visual communication signals. *Vision Research*, **48**, 2042–2051.
- Orr, D. B.** 1998. Scelionid wasps as biological control agents: a review. *Florida Entomological*, **71**, 506–528.
- Pacheco, D. J. P. & Corrêa-Ferreira, B. S.** 1998. Reproductive potential and longevity of the parasitoid *Telenomus podisi* Ashmead in eggs of different stink bugs species. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, **27**, 585–591.
- Pacheco, D. J. P. & Corrêa-Ferreira, B. S.** 2000. Parasitismo de *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Scelionidae) em Populações de Percevejos Pragas da Soja. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, **29**, 295–302.
- Panizzi, A. R. & Slanski Junior, F.** 1985. Review of phytophagous pentatomids (Hemiptera: Pentatomidae) associated with soybean in Americas. *Florida Entomological*, **68**, 184–214.
- Paramasivan, A., Paul, A. V. N. & Dureja, P.** 2004. Kairomones of *Chilo partellus* (Swinhoe) and their impact on the egg parasitoid *Trichogramma chilonis* Ishii. *Indian journal of Entomology*, **66**, 78–84.

- Peitsch, D., Fietz, A., Hertel, H., de Souza, J., Ventura, D. F. & Menzel, R.** 1992. The spectral input systems of hymenopteran insects and their receptor-based colour vision. *Journal of Comparative Physiology A*, **170**, 23–40.
- Pires, C. S. S., Sujii, E. R., Borges, M., Schmidt, F., Zarbin, P. H. G., Azevedo, V. C. R., Lacerda, A. L. & Pantaleão, D.** 2001. Ação cairomonal de componentes do feromônio de alarme do percevejo verde pequeno da soja, *Piezodorus guildinii*, sobre o parasitóide de ovos *Telenomus podisi*. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, **19**, Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.
- Potting, R. P. J., Poppy, G. M. & Schuler, T. H.** 1999. The role of volatiles from cruciferous plants and pre-flight experience in the foraging behaviour of the specialist parasitoid *Cotesia plutellae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **93**, 87–95.
- Powell, W., Pennacchio, F., Poppy, G. M. & Tremblay, E.** 1998. Strategies Involved in the Location of Hosts by the Parasitoid *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Biological Control*, **11**, 104–112.
- Powell, W. A. & Pickett, J. A.** 2003. Manipulation of parasitoids for aphid pest management: progress and prospects. *Pest Management Science*. **59**, 149–155.
- R Development Core Team.** 2009. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing.
- Rosi, M. C., Isidoro, N., Colazza S. & Bin, F.** 2001. Source of the host marking pheromone in the egg parasitoid *Trissolcus basalis* (Hymenoptera: Scelionidae). *Journal of Insect Physiology*, **47**, 989–995.
- Rostás, M. & Wölfling, M.** 2009. Caterpillar Footprints as Host Location Kairomones for *Cotesia marginiventris*: Persistence and Chemical Nature. *Journal of Chemical Ecology*, **35**, 20–27.
- Rousse, P., Chiroleu, F., Domerg, C. & Quilici, S.** 2007. Naive *Fopius arisanus* females respond mainly to achromatic cues. *Biological Control*, **43**, 41–48.

- Salerno, G., Conti, E., Peri, E., Colazza, S. & Bin, F.** 2006. Kairomone involvement in the host specificity of the egg parasitoid *Trissolcus basalus* (Hymenoptera: Scelionidae). *European Journal of Entomology*, **103**, 311–318.
- Schmidt, J. M., Cardé, R. T. & Vet, L. E. M.** 1993. Host recognition by *Pimpla instigator* F. (Hymenoptera: Ichneumonidae): Preferences and learned responses. *Journal of Insect Behavior*, **6**, 1–11.
- Schoonhoven, L. M., van Loon, J. J. A. & Dicke, M.** 2008. *Insect-Plant Biology*. 2nd ed. Oxford: University Press.
- Segura, D. F., Viscarret, M. M., Paladino, L. Z. C., Ovruski, S. M. & Cladera, J. L.** 2007. Role of visual information and learning in habitat selection by a generalist parasitoid foraging for concealed hosts. *Animal Behaviour*, **74**, 131–142.
- Southwood, T. R. E.** 1956. The structure of the eggs of the terrestrial Heteroptera and its relationship to the classification of the group. *The Transactions of the royal entomological society of London*, **108**, 163–221.
- Siekmann, G., Tenhumberg, B. & Keller, M. A.** 2001. Feeding and survival in parasitic wasps: sugar concentration and timing matter. *Oikos*, **95**, 425–430.
- Silva, C. C., Laumann, R. A., Moraes, M. C. B. & Borges, M.** 2007. Otimização da técnica de criação de *Euschistus heros* para a multiplicação do parasitóide de ovos, *Telenomus podisi*. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, **195**, Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.
- Sirot, E., & Bernstein, C.** 1996. Time sharing between host searching and food searching in parasitoids: state-dependant optimal strategies. *Behavioral Ecology*, **7**, 189–194.

- Steidle, J. L. M. & Van Loon, J. J. A.** 2002. Chemoecology of parasitoid and predator oviposition behaviour. In: *Chemoecology of insect eggs and egg deposition* (Ed. Steidle, J. L. M. & Van Loon, J. J. A.), pp 291–317. Berlin, Alemanha: Blackweel Publishing.
- Stelinski, L. L., Rodriguez-Saona, C. & Meyer, W. L.** 2009. Recognition of foreign oviposition-marking pheromone in a multi-trophic context. *Naturwissenschaften*, **96**, 585–592.
- Stephens, D. W.** 1993. Learning and behavioral ecology: incomplete information and environmental predictability. In: *Insect Learning: Ecological and Evolutionary Perspectives* (Ed. by D. R. Papaj & A. C. Lewis), pp. 195–218. New York: Chapman & Hall.
- Stireman, J. O., III.** 2002. Learning in the generalist tachinid parasitoid *Exorista mella* Walker (Diptera: Tachinidae). *Journal of Insect Behavior*, **15**, 689–706.
- Strand, M. R. & Vinson, S. B.** 1983a. Host acceptance behavior of *Telenomus heliothidis* (Hymenoptera: Scelionidae) toward *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America*, **76**, 781–785.
- Strand, M. R. & Vinson, S. B.** 1983b. Analysis of an egg recognition kairomone of *Telenomus heliothidis* (Hymenoptera: Scelionidae): isolation and host function. *Journal of Chemical Ecology*, **9**, 423–432.
- Sujii, E. R., Costa, M. L. M., Pires, C. S., Colazza, S. & Borges, M.** 2002. Inter and intra-guild interactions in egg parasitoid species of the soybean stink bug complex. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **37**, 1541–1549.
- Tenhumberg, B., Sieckmann, G. & Keller, M. A.** 2006. Optimal time allocation in parasitic wasps searching for hosts and food. *Oikos*, **113**, 121–131.
- Tooker, J. F. & De Moraes, C. M.** 2007. Jasmonate, salicylate, and benzoate in insect eggs. *Journal of Chemical Ecology*, **33**, 331–343.

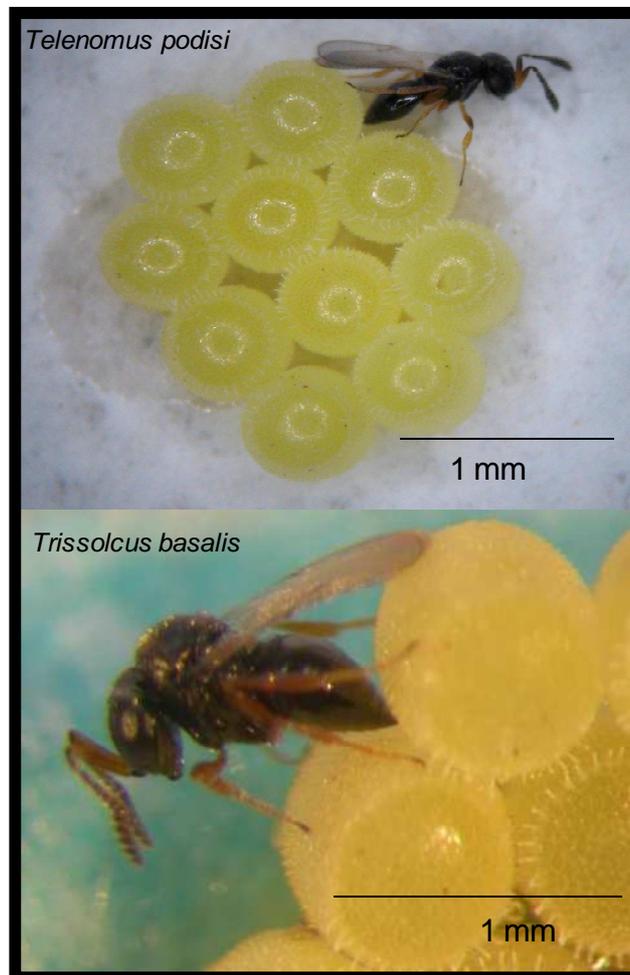
- Turlings, T. C. J., Wäckers, F. L., Vet, L. E. M., Lewis, W. J. & Tumlinson, J. H.** 1993. Learning of host-finding cues by hymenopterous parasitoids. In: *Insect Learning: Ecological and Evolutionary Perspectives* (Ed. by D. R. Papaj & A. C. Lewis), pp. 51–78. New York: Chapman & Hall.
- Vet, L. E. M., & Dicke, M.** 1992. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annual Review of Entomology*, **37**, 141–172.
- Vet, L. E. M., Lewis, W. J. & Cardé, R. T.** 1995. Parasitoid foraging and learning. In: *Chemical ecology of insects 2* (Ed. Cardé, R & Bell, W. J.), pp. 65–101. New York: Chapman & Hall.
- Vet, L. E. M., Lewis, W. J., Papaj, D. R. & van Lenteren, J. C.** 1990. A variable-response model for parasitoid foraging behavior. *Journal of Insect Behavior*, **3**, 471–490.
- Vet, L. E. M., Wäckers, F. L. & Dicke, M.** 1991. How to hunt for hiding hosts: The reliability-detectability problem in foraging parasitoids. *Netherlands Journal of Zoology*, **41**, 202–213.
- Villas-Bôas, G. L., Gazzoni, D. L., Oliveira, M. C. N. de, Pereira, N. P., Roessing, A. C., França Neto, J. B. & Henning, A.** 1990. Efeito de diferentes populações de percevejos sobre o rendimento e seus componentes, características agronômicas e qualidade de sementes de soja. *Boletim Pesquisa*, **1**, Londrina: Centro Nacional de Pesquisa de Soja.
- Vilela, E. F. & Della Lucia, T. M. C.** 2001. *Feromônios de Insetos - Biologia, Química e Aplicação*. Holos Editora, 206 p.
- Vinson, S. B.** 1984. Parasitoid-host relationships. In: *Chemical Ecology of Insects*, (Ed. by Bell, W. J. & Cardé, R. T.) pp. 205–233. London: Chapman and Hall.

- Vinson, S.B.** 1985. The Behaviour of Parasitoids. In: *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology* (Ed. Kertut, G.A. and Gilbert, L. I.), pp. 417–469. New York: Pergamon Press.
- Vinson, S.B.** 1998. The general host selection behaviour of parasitoid Hymenoptera and a comparison of initial strategies utilized by larvaphagous and oophagous species. *Biological Control*, **11**, 79–96.
- Vinson, S. B. & Piper, G. L.** 1986. Source and characterization of host recognition kairomones of *Tetrastichus hagenowii*, a parasitoid of cockroach eggs. *Physiological Entomology*, **11**, 459 – 468.
- Wäckers, F. L.** 1994. The effect of food deprivation on the innate visual and olfactory preferences in *Cotesia rubecula*. *Journal of Insect Physiology*, **40**, 641–649.
- Wäckers, F. L. & Lewis, W. J.** 1994. Olfactory and visual learning and their interactive influence on host site location by the parasitoid, *Microplitis croceipes*. *Biological Control*, **4**, 105–112.
- Wäckers, F. L. & Lewis, W. J.** 1999. A comparison of color-, shape- and pattern-learning by the hymenopteran parasitoid *Microplitis croceipes*. *Journal of Comparative Physiology A*, **184**, 387–393.
- Wardle, A. R.** 1990. Learning of host microhabitat colour by *Exeristes roborator* (F.) (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Animal Behaviour*, **39**, 914–923.
- Weber, C. A., Smilanick, J. M., Ehler, L. E. & Zalom, F. G.** 1996. Oviposition behavior and host discrimination in three Scelionid egg parasitoids of stink bugs. *Biological Control*, **6**, 245–252.
- Winkler, K., Wäckers, F. L., Bukovinszky-Kiss, G. & van Lenteren, J. C.** 2006. Nectar resources are vital for *Diadegma semiclausum* fecundity under field conditions. *Basic and Applied Ecology*, **7**, 133–140.

Yong, T. H., Pitcher, S., Gardner, J. & Hoffmann, M. P. 2007. Odor specificity testing in the assessment of efficacy and non-target risk for *Trichogramma ostriniae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Biocontrol Science and Technology*, **17**, 135–153.

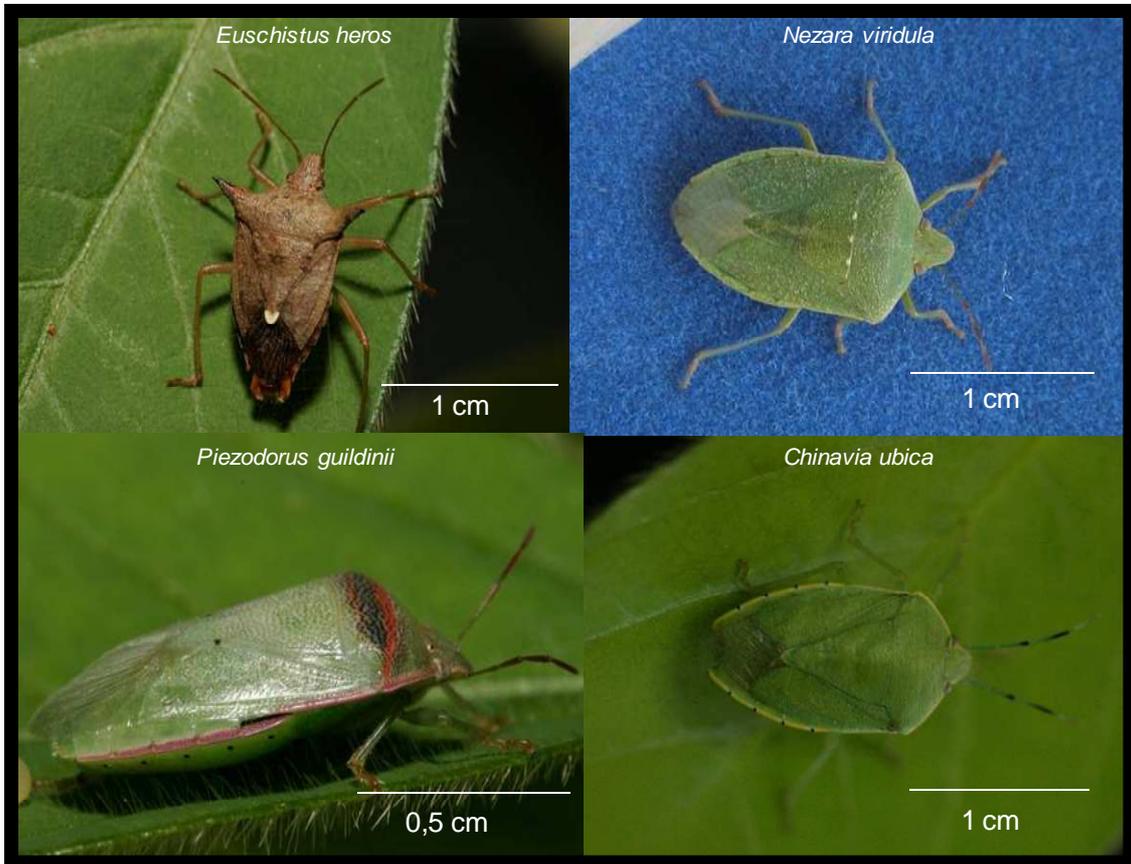
Zuur, A. F., Ieno, E. N., Walker, N. J., Saveliev, A. A. & Smith, G. M. 2009. *Mixed Effect Models and extensions in ecology with R.*, New York: Springer. 574 pp.

ANEXO 1: Fotos de parasitóides de ovos parasitando ovos de *Euschistus heros*



Fotos: Raúl Alberto laumann

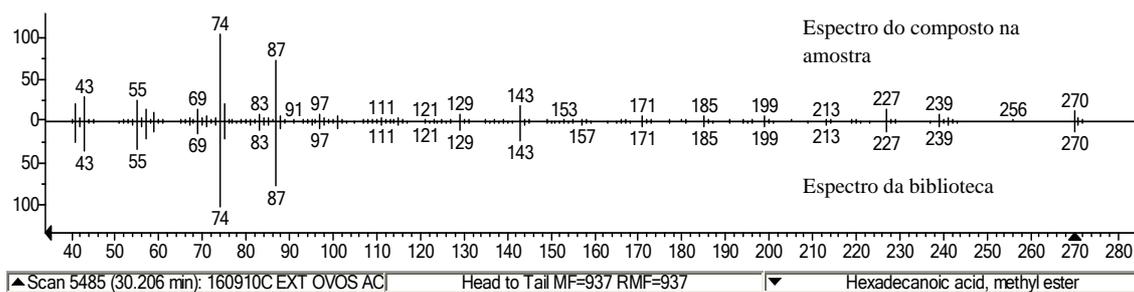
ANEXO 2: Fotos de percevejos pragas da soja



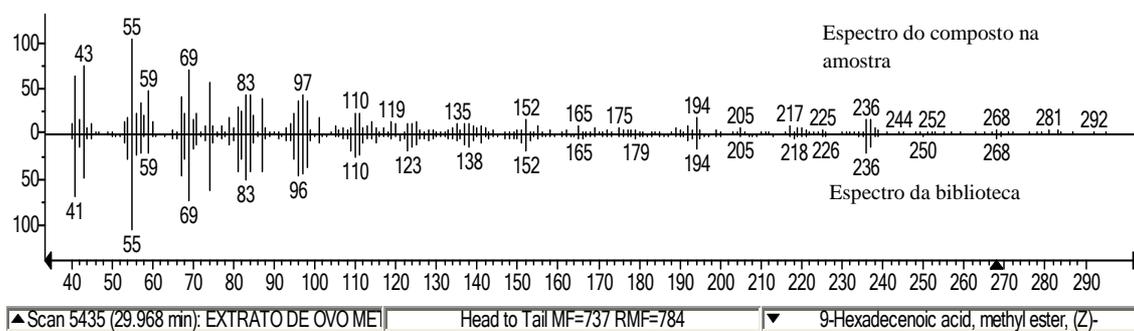
Fotos: Cecília Rodrigues Vieira

ANEXO 3: Índice de Kovats (KI) e espectros de massa dos compostos indentificados de extratos de ovos de *Euschistus heros*

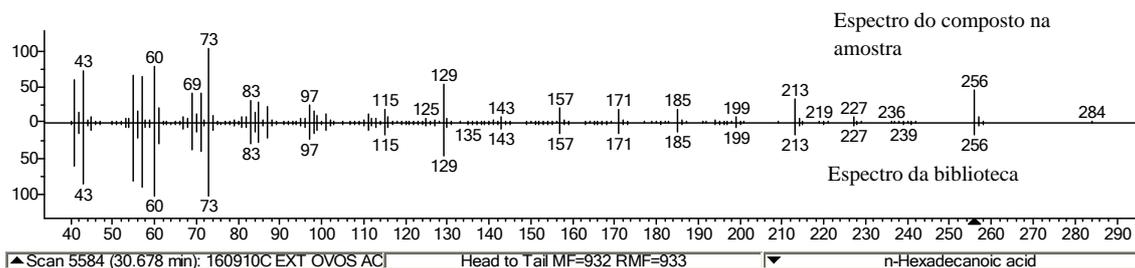
Hexadecanoato de metila KI = 1943



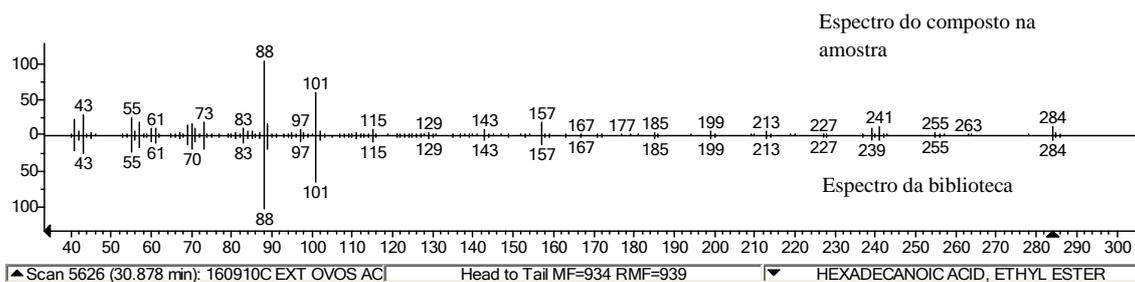
cis - 9 - Hexadecenoato de metila KI = 1956



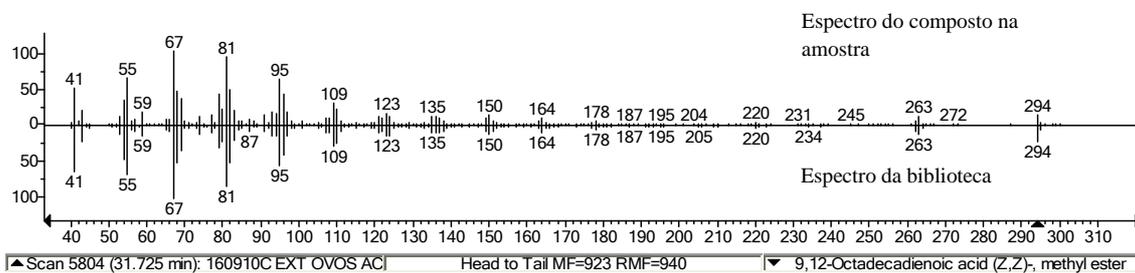
Ácido hexadecanóico KI = 1979



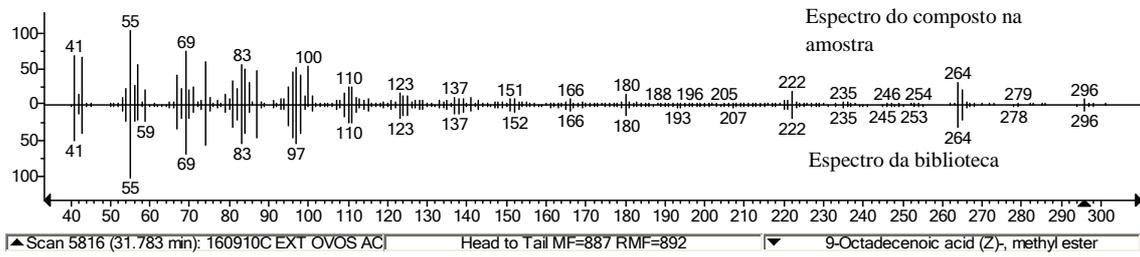
Hexadecanoato de etila KI = 1999



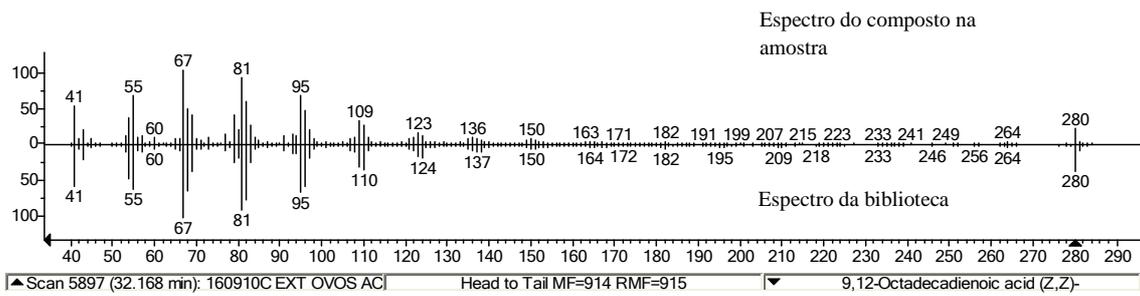
Z,Z - 9,12 - Octadienoato de metila (Linoleato de metila) KI = 2099



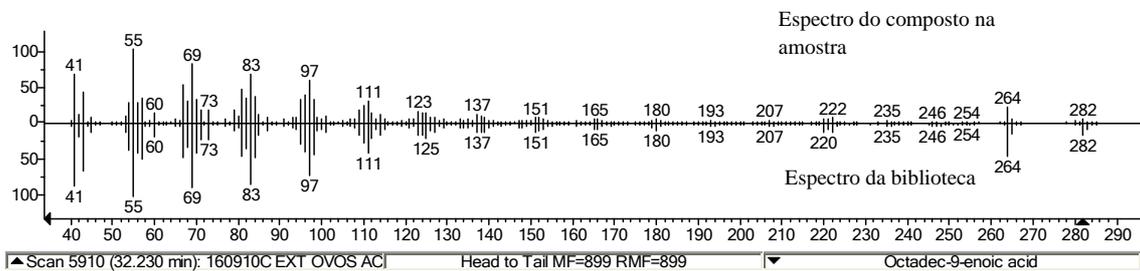
cis - 9 - Octadecenoato de metila KI = 2115



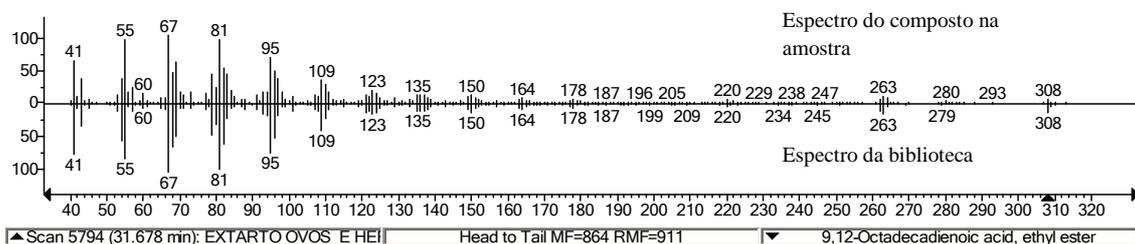
Z,Z - 9,12 - Ácido octadienóico (Ácido linoleico) KI = 2165



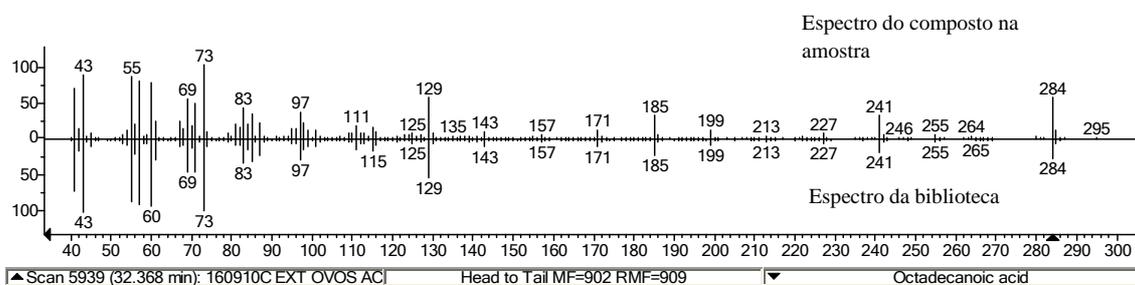
cis -9-Octadecenóico KI = 2178



Z,Z - 9,12 - Octadienoato de etila (Linoleato de etila) K = 2188



Ácido octadecanóico KI = 2198



Octadecanoato de etila KI = 2206

