



UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

PAULO DAVID MARTINS PEREIRA

**INFLUÊNCIA DE COMPOSTOS VOLÁTEIS HERBÍVORO-INDUZIDOS DE CANA-
DE-AÇUCAR, NO COMPORTAMENTO DE BUSCA DO PARASITOIDE *Cotesia*
flavipes (HYMENOPTERA: BRACONIDAE)**

Universidade Federal de Alagoas

**Campus A. C. Simões
Tabuleiro do Martins
57072-970 - Maceió-AL**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA

PAULO DAVID MARTINS PEREIRA

INFLUÊNCIA DE COMPOSTOS VOLÁTEIS HERBÍVORO-INDUZIDOS DE
CANA-DE-AÇUCAR, NO COMPORTAMENTO DE BUSCA DO PARASITOIDE
Cotesia flavipes Cameron (HYMENOPTERA: BRACONIDAE)

Maceió - AL
2013

PAULO DAVID MARTINS PEREIRA

**INFLUÊNCIA DE COMPOSTOS VOLÁTEIS HERBIVORO-INDUZIDOS DE CANA-
DE-AÇUCAR, NO COMPORTAMENTO DE BUSCA DO PARASITÓIDE *Cotesia*
flavipes (HYMENOPTERA: BRACONIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, para fins de obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora **Prof^ª. Dr^ª. Ruth Rufino do Nascimento.**

**Maceió – AL
2013**

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos

P436i Pereira, Paulo David Martins.
Influência de compostos voláteis herbívoro-induzidos de cana-de-açúcar, no comportamento de busca do parasitoide *Cotesia flavides* (Hymenoptera: Braconidae) / Paulo David Martins Pereira. – 2013.
62 f. : il.

Orientadora: Ruth Rufino do Nascimento.
Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2013.

Bibliografia: f. 50-62.

1. Parasitismo. 2. Compostos orgânicos voláteis. 3. Broca-da-cana.
4. Controle de pragas. I. Título.

CDU: 543.2:632.936



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone/Fax: (82) 3214-1144
email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de **Paulo David Martins Pereira**, intitulada: **“Influência de Compostos Voláteis Herbívoro-Induzidos de Cana-de-Açúcar, no Comportamento de Busca do Parasitóide *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae)”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 07 de junho de 2013, às 09:00, na Sala de reuniões do PPGQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Ruth Rufino do Nascimento

Prof.^a Dr.^a Ruth Rufino do Nascimento
Orientador (PPGQB/IQB/UFAL)

João Gomes da Costa

Prof. Dr. João Gomes da Costa
PPGQB/EMBRAPA

Roseane Cristina Prêdes Trindade

Prof.^a Dr.^a Roseane Cristina Prêdes Trindade
CECA/UFAL

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Luiz Martins Pereira e Ivonete de Moraes Pereira, que me criaram com muito amor, pela educação que me deram, sendo eles um exemplo de honestidade e integridade, estando ao meu lado apoiando e incentivando em todos os momentos da minha vida;

A minha esposa, Edilânia Serafim e minha filha Paula Letícia que sempre me deram apoio para continuar e nunca desistir diante das dificuldades, incentivando e acreditando em mim, pelo seu carinho e amor;

AGRADECIMENTOS

A Deus pela proteção, força e coragem nas horas de dificuldades, ajudando-me a chegar ao fim dessa jornada;

Aos meus pais e meus irmãos Daniel Tarciso, Noélia Mirna, Cesar Augusto, Fernando Vital, Manuel Messias e Luiz Martins, que tornaram minha vida mais alegre e feliz;

Ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado;

A minha Orientadora Prof^a. Dr^a. Ruth Rufino do Nascimento, pela disponibilidade, oportunidade e pela grande contribuição na minha especialização profissional;

A Prof^a. Dr^a. Adriana de Lima Mendonça, pela amizade, disponibilidade, paciência e participação na revisão do texto;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo;

Aos professores da área de Química e Biotecnologia do Curso de Pós-Graduação, em especial aos das disciplinas cursadas, pela dedicação, paciência e sabedoria com que transmitiram os seus conhecimentos e experiência ao longo desses anos de convivência;

Aos amigos do laboratório de Ecologia Química da UFAL, Alana Mendonça, Auridete Correia, Carla Melo, Claudinete Santos, Diogo Sales, Jessica Lima, Joubert Gonçalves, Luana Ferreira, Rafael Augusto, Rafael Farias, Regivaldo Melo, Rita de Cassia, pelo companheirismo e pela ajuda nos experimentos;

Aos colegas de curso de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da UFAL, pela amizade, convívio e contribuição na realização dos trabalhos no decorrer do curso;

Aos amigos de turma, em especial Adilsom Sabino, Alberto Magno, Andersom e Jésus Costa, pela amizade e contribuições oferecidas e pelas horas de alegria que compartilhamos;

Ao Instituto Federal de Ciência, Educação e Tecnologia de Alagoas (IFAL), por ter me concedido o direito de fazer o mestrado;

A Usina Cachoeira de Meirim S/A, por disponibilizar variedades de cana-de-açúcar e o substrato para brotação das plantas;

Aos funcionários do Instituto de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da UFAL;

E a todas as pessoas, que direta ou indiretamente contribuíram com minha vida acadêmica e/ou com a realização deste trabalho.

RESUMO

A *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae), comumente denominada broca pequena da cana-de-açúcar, representa um dos principais problemas entomológicos para esta cultura. Atualmente, o seu controle é feito através da liberação massal do parasitoide *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) o qual, através de pistas olfativas, localiza e leva à morte lagartas da praga. Sabe-se que tais pistas olfativas estão relacionadas a odores emitidos pelo complexo planta-hospedeiro, apesar disto, existem poucas informações a respeito desta espécie principalmente em relação ao comportamento de busca envolvendo as variedades susceptíveis ou resistentes à praga e a natureza destes compostos orgânicos voláteis (COVs). Desta forma, esse trabalho teve como objetivo geral, investigar a influência de diferentes variedades de plantas de cana-de-açúcar no comportamento de busca de *C. flavipes* por *D. flavipennella*, levando em consideração os compostos voláteis emitidos por plantas sadias, plantas infestadas por herbivoria e plantas induzidas a resistência. Para tanto, as lagartas de *D. flavipennella* foram criadas com dieta artificial e, posteriormente utilizadas nos experimentos conduzidos no Laboratório de Ecologia Química, da Universidade Federal de Alagoas. O parasitoide *C. flavipes* foi fornecido pela usina Triunfo (AL). Variedades de cana-de-açúcar SP791011, RB92579 e RB867515 foram obtidas da Usina Cachoeira do Meirim (AL) e, através da técnica de aeração, os compostos voláteis emitidos pelas mesmas foram coletados nas seguintes condições: plantas sadias, infestadas por *D. flavipennella* e induzidos a resistência pelo composto *cis*-jasmona. A indução e infestação foi realizada sob condições de laboratório. Os extratos obtidos foram submetidos a bioensaios em olfatosmetro “Y” com fêmeas de *C. flavipes*. Para cada tratamento foram realizados 10 repetições, e em cada bioensaio foram utilizadas 10 fêmeas de *C. flavipes*. Os dados obtidos foram analisados pelos testes não paramétricos de *Kruskal-Wallis*, *Nemenyi* e *Mann-Whitney* ($p < 0,05$). Os resultados demonstraram que não existe preferência de *C. flavipes* entre as variedades de cana de açúcar estudadas, mas existe diferença significativa na atração de *C. flavipes* por canas induzidas e infestadas em detrimento às canas sadias. Análises Químicas por CG-EM evidenciaram diferenças qualitativas e quantitativas na composição química de plantas de cana-de-açúcar, devendo sua identificação ser ainda elucidada.

Palavras-chave: Parasitismo, COVs, Broca-da-Cana

ABSTRACT

Diatraea flavipennella (Lepidoptera: Crambidae), known as the sugarcane borer, represents one of the main entomological problems of this culture. Currently, its control is achieved by means of the massal releasing of females of the parasitoid *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae), which, using olfactive clues, locates *D. flavipennella* larvae and parasitize them. Upon emergence of the parasitoid, the larvae of the sugarcane borer die. The olfactive clues used by *C. flavipes* females are related to odours released by the complex plant-host. However, information related to this species regarding the parasitoid searching behavior involving susceptible and resistant varieties of cane sugar plants and the nature of the Volatile Organic Compounds (VOCs) released by them is not available. Therefore, this project aims to investigate the influence of different varieties of sugarcane plants in the searching behavior of *C. flavipes* for larvae of *D. flavipennella*, considering the Volatile Organic Compounds (VOCs) released by: healthy sugarcane plants, sugarcane plants damaged by herbivory and induced resistant sugarcane plants. For that, larvae of *D. flavipennella* were reared using artificial diet and as soon as they reached the third instar, they were used in the experiments carried out in the Laboratório de Ecologia Química, Universidade Federal de Alagoas. Cocoons of *C. flavipes* and the varieties of sugarcane plants SP791011, RB92579 and RB867515 were provided by two sugarcane factories: Triunfo and Cachoeira do Meirim, state of Alagoas, Brazil. The Volatile Organic Compounds (VOCs) were collected by means of dynamic headspace from healthy plants, plants damaged by *D. flavipennella* larvae and induced resistant sugarcane plants treated with *cis*-jasmona under laboratory conditions. The obtained extracts were submitted to bioassays using a Y-shape olfactometer and *C. flavipes* females. For each treatment were used 10 replicates and on each bioassay 10 females of *C. flavipes* were used. Data from bioassays were submitted to the following non-parametric statistic tests: *Kruskal-Wallis*, *Nemenyi e Mann-Whitney* ($p < 0,05$). The results demonstrated that *C. flavipes* females do not show any preference among the sugarcane varieties tested. However, they revealed that *C. flavipes* females are more attracted to plants damaged by *D. flavipennella* larvae and induced resistant sugarcane plants treated with *cis*-jasmona than healthy sugarcane plants. Chemical analyses of the sugar cane plant demonstrated quantitative and qualitative differences of the chemical composition and future identification will there concluded.

Key-words: Parasitism, VOCs, sugarcane borer

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Danos provocados por lagartas de <i>Diatraea</i> spp. em plantas de cana-de-açúcar, onde: A: danos provocados por lagarta jovens; B: danos no interior do colmo; C: Sintoma: “Coração morto”	20
Figura 2 -	Ciclo de vida do parasitoide <i>Cotesia flavipes</i>	22
Figura 3 -	Dispersão do parasitoide <i>Cotesia flavipes</i>	22
Figura 4 -	Oxidação e descarboxilação do ácido <i>cis</i> -jasmônico	29
Figura 5 -	Esquema dos principais componentes de um cromatógrafo gasoso	35
Figura 6 -	Esquema de um espectrômetro de massa (EM)	37
Figura 7 -	Diagrama básico de um sistema CG x CG	38
Figura 8 -	Sistema de aeração de plantas de cana-de-açúcar sadias, induzidas por <i>cis</i> -jasmona e infestadas por lagartas de <i>Diatraea flavipennella</i>	42
Figura 9 -	Sistema de aeração de plantas de cana-de-açúcar sadias, induzidas por <i>cis</i> -jasmona e infestadas por lagartas de <i>Diatraea flavipennella</i> para a variedade SP791011	42
Figura 10 -	Olfatômetro em “Y” com fluxo de ar e sem opção de escolha.	43
Figura 11 -	Fêmeas do parasitóide <i>C. flavipes</i> na câmara “A” do olfatômetro atraídas pelo papel de filtro impregnado com extrato de cana-de-açúcar sadia, infestada pela <i>D. flavipennella</i> ou induzida por <i>cis</i> -jasmona	43
Figura 12 -	Passagem entre as câmaras “A” e “B” do olfatômetro	44
Figura 13 -	Atratividade de fêmeas de <i>C. flavipes</i> para os diferentes estados de cana-de-açúcar em relação à variedade SP791011*	48
Figura 14 -	Atratividade de fêmeas de <i>C. flavipes</i> para os diferentes estados de cana-de-açúcar em relação a variedade RB92579*	48
Figura 15 -	Atratividade de fêmeas de <i>C. flavipes</i> para os diferentes estados de cana-de-açúcar em relação a variedade RB867515*.	49
Figura 16 -	Cromatogramas representativos dos extratos de plantas de cana-de-açúcar onde: (A) plantas sadias, (B) plantas infestadas e (C) plantas	50

induzidas.

Figura 17 - Cromatogramas representativos dos compostos identificados por 53 CGxCG-TOF-EM em extratos de plantas de cana-de-açúcar.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Comparativo de área, produtividade e produção de cana-de-açúcar nas regiões do Brasil.	18
Tabela 2-	Comparativo de área, produtividade e produção entre os maiores estados produtores regionais de cana-de-açúcar no Brasil	18
Tabela 3-	Valores médios para o número de fêmeas de <i>C. flavipes</i> atraídas em relação aos extratos das três variedades e estados de canas utilizados	47
Tabela 4 -	Compostos identificados em extratos de plantas de cana-de-açúcar	52

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior
CG – EM	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
COVs	Compostos Orgânicos Voláteis
DP	Desvio Padrão
GLVs	Green Leaf Volatiles
MS	Matéria Seca
MWm	Megawatts médios
PLANALSUCAR	Programa Nacional de Melhoramento de Cana-de-açúcar
HPLC	High Performance Liquid Chromatograph
CG-DIC	Cromatografia Gasosa-Detector de Ionização em Chama
HIPVs	Voláteis de plantas herbívoros induzidos
CG – EAG	Cromatografia Gasosa Acoplada a Eletroantenografia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REVISÃO LITERÁRIA	17
3.1	Cana-de-açúcar	17
3.1.1	<i>Diatraea spp</i> : Características, importância econômica e danos	18
3.1.2	Controle biológico utilizando parasitoide de larvas <i>Cotesia flavipes</i>	21
3.2	Semioquímicos interação inseto-plantas	23
3.2.1	Indução a resistência de plantas	25
3.2.2	Compostos voláteis emitidos por plantas induzidas por herbivoria	29
3.3	Técnicas de extração e identificação de semioquímicos	31
3.3.1	Técnicas de extração de semioquímicos	32
3.3.2	Bioensaios comportamentais (olfatometria)	33
3.3.3	Técnicas de Isolamento e identificação de semioquímicos	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	Obtenções dos insetos	39
4.1.1	Lagartas de <i>Diatraea flavipennella</i>	39
4.1.2	<i>Cotesia flavipes</i>	39
4.2	Obtenções de plantas de cana-de-açúcar	39
4.3	Indução de plantas de cana-de-açúcar por cis-jasmona	40
4.4	Infestação de plantas de cana-de-açúcar	40
4.5	Obtenções de compostos voláteis de plantas de cana-de-açúcar sadia, infestadas por <i>Diatraea flavipennella</i> e induzidas a resistência por cis-jasmona.	40
4.6	Bioensaios comportamentais utilizando olfatômetro	43
4.7	Análises Químicas por Cromatografia Gasosa Unidimensional acoplada a Espectrometria de Massa	44
4.8	Análises Químicas por Cromatografia Gasosa Bidimensional acoplada a Detector Time-of-Flight de Espectrometria de Massas.	45
4.9	Análises estatísticas	45
5	RESULTADOS	47
5.1	Resposta olfativa de <i>C. flavipes</i> por diferentes variedades de cana-de-açúcar, infestadas por <i>D. flavipennella</i> e induzidas a resistência por cis-jasmona.	47
5.2	Análises químicas dos extratos de plantas de cana-de-açúcar sadia, infestadas e induzidas por cis-jasmona	49

6	DISCUSSÃO	54
	CONCLUSÕES	60
	PERSPECTIVAS	61
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) tem como origem o sudeste da Ásia e o norte da África. É uma gramínea cultivada em regiões tropicais e subtropicais em diversos países do mundo e destaca-se entre as demais devido a sua múltipla utilidade, podendo ser empregada *in natura*, sob a forma de forragem, para alimentação animal ou como matéria-prima para a fabricação de rapadura, cachaça, açúcar e álcool. A espécie se caracteriza pela maior produção de matéria seca (MS) e energia por unidade de área e, até mesmo seu resíduo (bagaço) pode ser utilizado como biomassa para geração de energia elétrica (CARLIN, 2005).

De acordo com Goes e Marra (2008), vem ocorrendo, ao longo dos anos, um aumento significativo na área cultivada com a cultura de cana-de-açúcar no Brasil, sendo este fato decorrente da necessidade de substituição da matriz energética predominante por outra de menor impacto ambiental. Neste contexto, a produção de biocombustível, como o etanol, torna a cana-de-açúcar uma cultura cada vez mais importante no cenário nacional e mundial em razão da necessidade de se encontrar novas formas de energia renovável.

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar, respondendo por 25% da produção mundial, seguido pela Índia e Austrália. De acordo com o terceiro levantamento da safra 2012/2013 de cana-de-açúcar, realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento-CONAB entre os dias 05 e 16 de novembro de 2012, a produtividade média brasileira está estimada em 69.846 kg/ha, 4,2% maior que na safra 2011/12, que foi de 67.060 kg/ha (CONAB, 2012).

Empresas e institutos de pesquisas vêm assegurando por muito tempo o desenvolvimento e a incorporação de novas variedades de cana-de-açúcar obtidas por meio de programas de melhoramento genético, buscando elevar a produtividade e qualidade de biomassa de cana por hectare. No entanto, a ocorrência de pragas nos canaviais limita à produção sucroalcooleira, reduzindo essa produtividade e podendo comprometer o cultivo da cana-de-açúcar, seja pela diminuição de biomassa disponível para moagem, ou pela redução do teor de sacarose (MENDONÇA, 1996).

Dentre os principais problemas entomológicos desta cultura, o complexo de espécies pertencentes ao gênero *Diatraea* tem causado sérios prejuízos econômicos (MENDONÇA, 1996). No Brasil, as espécies *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS, 1974) e *Diatraea flavipennella* (BOX, 1931) (Lepidoptera: Crambidae), estão presentes em todas as regiões canavieiras. A espécie *D. saccharalis*, também conhecida como broca do colmo ou da cana, é

praga de grande interesse agrícola, por apresentar ocorrência generalizada por todo o país, enquanto *D. flavipennella* é restrita, principalmente, aos estados de Alagoas, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte (GUAGLIUMI, 1972/73; MENDONÇA, 1996a; FREITAS et al., 2007).

Nenhum tipo de controle químico tem sido eficaz para *Diatraea* spp. Atualmente, uma combinação de uma série de táticas (Manejo Integrado) é utilizada, incluindo a remoção manual de lagartas, a introdução de variedades de cana-de-açúcar geneticamente modificadas e o controle biológico (BAKER et al., 1992; ARENCIBIA et al., 1997; SETAMOU; BERNAL; LAGASP, 2002).

O fator chave para evitar o crescimento populacional de brocas da cana, tais como *D. sacharallis* e *D. flavipennella*, é a eliminação dos ovos e lagartas desse inseto com o uso de inimigos naturais (NAKANO et al., 2002). O parasitoide de lagartas *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera: Braconidae) vem sendo utilizado com sucesso e eficácia em programas de controle biológico (FREITAS, 2005).

As fêmeas dos parasitoides, como é o caso de *C. flavipes*, tem de procurar os hospedeiros onde depositarão seus ovos. Esta procura é guiada por Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) que são, na maioria das vezes, produzidos pelas plantas após indução por alimentação de um inseto herbívoro. Tais compostos são derivados de processos bioquímicos complexos e parecem ser comuns em várias espécies de plantas (TURLINGS et al., 2002). Essa produção e liberação de COVs são promovidas em boa parte por substâncias encontradas na secreção oral de insetos herbívoros, como por exemplo, a N-(17-hidroxilinoil)-L-Glutamina (volicitina) que foi isolada de secreção oral de lagartas de *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) conhecida como lagarta do cartucho.

Karban e Baldwin (1997) classificam as defesas das plantas contra herbívoros em dois tipos: defesas constitutivas, que estão presentes na planta antes de o problema ter se apresentado, e defesas induzidas, que são produzidas ou translocadas somente diante de um dano ou situação de estresse. As defesas induzidas são aquelas que aparecem depois que as plantas são atacadas pelos herbívoros e têm sido objeto de estudos recentes, porque apresentam impacto significativo nos níveis de herbivoria, não só momentaneamente, mas podendo se estender a até vários anos após a sua indução. Price et al. (1980) ressaltam a importância do terceiro nível trófico, relacionando predadores, parasitoides e patógenos, e sua influência nas interações entre as plantas e os herbívoros que as consomem.

Há substâncias que ativam o sistema de defesa indireta de plantas, como é o caso específico da *cis*-jasmona, composto que oferece uma oportunidade para ativar este mecanismo sem influenciar indevidamente outros importantes processos fisiológicos e de rendimento da planta (BIRKETT et al., 2000). A jasmona é um composto orgânico natural extraído da parte volátil do óleo de flores de jasmim e pode existir em dois isômeros com diferentes formas de geometria, *cis* e *trans*-jasmona. O extrato natural contém apenas a forma *cis*, enquanto o material sintético é muitas vezes uma mistura contendo as duas formas, com predominância da forma *cis*. Ambas as formas têm propriedades químicas e odores semelhantes. A jasmona é produzida nas plantas pelo metabolismo de jasmonato, a partir de ácido linolênico pela via octadecanoide e pode atuar tanto como um atrativo ou repelente para diversos insetos (KOCH, T.; BANDEMER, K; BOLAND, W., 1997).

Sabe-se que *C. flavipes* é o inimigo natural mais abundante nas áreas infestadas por *Diatraea* spp. no estado de Alagoas. As fêmeas deste parasitoide reconhecem e aceitam as lagartas de *D. flavipennella* como hospedeiro (FREITAS, 2005). Entretanto, ainda se desconhece a capacidade das plantas de cana-de-açúcar em promover a atração de fêmeas acasaladas deste parasitoide, bem como os compostos envolvidos na interação parasitoide-cana-de-açúcar.

Desta forma, este estudo propõe investigar e identificar os compostos voláteis produzidos por três variedades de cana-de-açúcar sadias, submetidas a infestações por lagartas de *D. flavipennella* e tratadas pelo indutor de resistência *cis*-jasmona no comportamento de busca do parasitoide *C. flavipes*.

2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair os constituintes voláteis liberados por três variedades de plantas de cana-de-açúcar sadias, infestadas por *D.flavipennella* e induzidas a resistência por *cis*-jasmona, pelo emprego da técnica de headspace dinâmico, a aeração;
- Comparar, através de bioensaios de olfatometria, a atração do parasitóide *Cotesia flavipes* para os extratos de três variedades de plantas de cana-de-açúcar sadias, infestadas por *Diatraea flavipennella* e induzidas a resistência por *cis*-jasmona;
- Identificar qualitativamente e quantitativamente, pelo emprego de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM), as estruturas dos compostos voláteis produzidos plantas de cana-de-açúcar sadias, infestadas por *D. flavipennella* e induzidas a resistência por *cis*-jasmona.
- Identificar qualitativamente e quantitativamente, pelo emprego de Cromatografia Gasosa bidimensional acoplada à Espectrometria de Massas com detector *time-of-flight* (CGxCG-TOF-EM), as estruturas dos compostos voláteis produzidos plantas de cana-de-açúcar, de uma mesma variedade, sadias, infestadas por *D. flavipennella* e induzidas a resistência por *cis*-jasmona.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum L.*) é originária da Nova Guiné e, com a descoberta do Brasil, foi trazida para a América. É uma cultura de grande importância para o Brasil, uma vez que gera cerca de 500.000 empregos diretos e 3,5 milhões de empregos indiretos, servindo como matéria prima de uma enorme variedade de produtos, que inclui alimentos, rações animais, papel, biocombustíveis e eletricidade (UNICA, 2009).

O Brasil foi o primeiro país do mundo a produzir em grande escala um combustível renovável alternativo ao petróleo a partir da cana-de-açúcar. Ele é o maior produtor desta cultura e maior produtor e exportador de açúcar do mundo. A receita bruta anual dos setores de açúcar e etanol gira em torno de US\$ 20 bilhões. Na média, 54% deste valor foram gerados pelas vendas de álcool etílico, 44% pela venda de açúcar e os 2% restantes pela bioeletricidade vendida no mercado interno. A bioeletricidade é o mais importante novo produto do setor sucroenergético, a qual é produzida através da queima do bagaço, resíduo seco e fibroso do processamento da cana. As estimativas sugerem que até 2015 a geração deste produto possa aumentar dos atuais 1.800 Megawatts médios (MWm), o que corresponde a apenas 3% das necessidades do Brasil, para 11.500 MWm, ou seja, 15% da demanda de energia elétrica do País (UNICA, 2009).

A cana-de-açúcar é uma gramínea bastante versátil, cujo potencial, variado e complexo, ainda pode ser muito explorado. Acredita-se que, em dez anos, a cana-de-açúcar possa duplicar a produtividade, com ganhos de 15 a 25% atribuídos a melhoria dos agroquímicos (melhor controle de insetos, ervas daninhas e fungos), 10 a 20% com germoplasma, melhorias no plantio, colheita e em processos, 20 a 50% com biotecnologia, modificação genética, etc. (UNICA, 2011).

Fazendo-se um comparativo de área, produtividade e produção de cana-de-açúcar entre as regiões e os estados brasileiros (Tabelas 1 e 2), observa-se que a região sudeste apresenta a maior área plantada de cana com destaque para o Estado de São Paulo seguida da região Centro-Oeste, destacando-se o Estado de Goiás como maior produtor e da Região Nordeste, sendo Alagoas o maior Estado produtor (CONAB, 2012).

Tabela 1- Comparativo de área, produtividade e produção de cana-de-açúcar nas regiões do Brasil.

Região/UF	Área (1000 ha)	Produtividade (kg/ha)	Produção (1000 ton.)
	Safra 2012/2013	Safra 2012/2013	Safra 2012/2013
Norte	41,9	73.837	3.100
Nordeste	1.113,510	50.825	56.593,9
Centro-oeste	1.504,110	70.645	106.257,5
Sudeste	5.248,540	73.906	387.897,4
Sul	612,390	67.404	41.277,4
Brasil	8.356,100	69.846	595.126,60

Fonte: CONAB – 3º levantamento: Dezembro de 2012

Tabela 2- Comparativo de área, produtividade e produção entre os maiores estados produtores regionais de cana-de-açúcar no Brasil.

Estado	Área (1000 ha)	Produtividade (kg/ha)	Produção (1000 ton.)
	Safra 2012/2013	Safra 2012/2013	Safra 2012/2013
Pará	23,570	78.310	1.845,8
Alagoas	445,70	53.000	23.622,6
Goiás	725,410	73.200	53.136,60
São Paulo	4.419,460	74.714	330.195,50
Paraná	610,830	67.522	41.244,50

Fonte: CONAB – 3º levantamento: Dezembro de 2012

Apesar de sua importância, a cultura da cana-de-açúcar tem sua produtividade comprometida por sofrer ataque de muitos insetos-praga, dentre eles os lepidópteros pertencentes ao complexo *Diatraea* spp. que são responsáveis por diversos danos (DINARDO-MIRANDA, L. L.; FRACASSO, J. V.; PERECIN, D.; 2011; GALLO et al. 2002).

3.1.1 *Diatraea* spp: Características, importância econômica e danos.

Há alguns anos, com os avanços dos estudos filogenéticos baseados em técnicas moleculares, houve uma mudança e reorganização da árvore filogenética do gênero *Diatraea* definindo-o na ordem Lepidoptera, família Crambidae e subfamília Crambinae (PARRA et al., 1999; LANGE et al., 2004).

Existem aproximadamente 21 espécies do gênero *Diatraea* ocorrendo em cana-de-açúcar no continente americano, entretanto nem todas as espécies causam danos a esta cultura, deste total, apenas duas espécies são consideradas como insetos praga no Brasil, a saber:

D.saccharalis com ocorrência em todo o país (CHARPENTIER et al., 1967; LONG; HENSLEY, 1972; BOTELHO; MACEDO, 2002; ROSSI; FOWLER, 2002) e *D. flavipennella* tendo sido registrada no Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e nos estados do Norte e Nordeste (PINTO; GARCIA; BOTELHO, 2006). Em levantamento populacional realizado em canaviais de Alagoas, Freitas et al. (2007), verificaram a predominância de *D. flavipennella* acima de 97%, em relação a *D. saccharalis*, demonstrando assim sua importância para o Estado.

A cana-de-açúcar sofre o ataque da broca, *Diatraea spp*, durante todo seu desenvolvimento. Sua incidência é menor quando a cana-de-açúcar é jovem e não apresenta entrenós formados, aumentando os danos com o crescimento da planta. No entanto, esse comportamento pode variar em função da época do ano e principalmente da variedade de cana (MARUCCI, 2008). Segundo registro do Programa Nacional de Melhoramento de Cana-de-açúcar (PLANALSUCAR), *D.flavipennella* causa danos mais severos à cultura no período de altas temperaturas e menor precipitação, aumentando sua população a partir do mês de setembro e diminuindo nos meses de temperatura mais baixa de maio a agosto (PINTO, 2012).

Os danos ocasionados por *Diatraea spp*. podem ser classificados em diretos e indiretos. Os danos diretos decorrem de alimentação do inseto caracterizando-se pela perda de peso correspondente à abertura das galerias, morte da gema apical (coração morto), encurtamento do entrenó, quebra da cana, enraizamento aéreo e germinação das gemas laterais (FIG. 1). Os danos indiretos, considerados mais importantes, são causados por microrganismos que invadem o entrenó através do orifício aberto na casca pela lagarta. Os principais microrganismos são os fungos *Fusarium moniliforme* (Sheldon) e *Colletotrichum falcatum*, (Went) ocasionando, respectivamente, a podridão-de-fusarium e a podridão-vermelha.

Figura 1 - Danos provocados por lagartas de *Diatraea* spp. em plantas de cana-de-açúcar, onde: A: danos provocados por lagartas jovens; B: danos no interior do colmo; C: Sintoma: “Coração morto”, D: danos causados por fungos.



Fonte: Mendonça, 1996

Os fungos, *F. monilliforme* e *C. falcatum* invertem a sacarose armazenada na planta, provocando perdas pelo consumo de energia no metabolismo de inversão e pelo fato dos açúcares resultantes desse desdobramento não se cristalizarem no processo industrial. Entretanto, quando a matéria-prima se destina à produção de álcool, o problema é mais grave, pois os microrganismos que penetram no entrenó aberto contaminam o caldo e concorrem com as leveduras na fermentação alcoólica (BOTELHO; MACEDO 2002; GALLO et al., 2002).

As perdas decorrentes destes danos podem chegar a 35 Kg de açúcar/ha, e a 30 litros de álcool/ha com apenas 1% de colmos broqueados (PINTO, 2012). Cada 1% de intensidade de infestação corresponde a 0,77% de queda na produção da cana. Estudos feitos por Precetti, A.A.C.; Teran, F.O.; Sanchez, A.G. (1988), mostraram que para cada 1% de intensidade de infestação, os índices médios de perdas de açúcar foram de 0,370 Kg/t cana e de álcool 0,165l/t cana. A broca da cana-de-açúcar provoca um decréscimo entre 10 e 20% de sacarose e apenas a podridão vermelha gera prejuízo na ordem de US\$ 100 milhões por ano apenas no estado de São Paulo, considerando-se uma infestação de 10% dos colmos (GITHAY et al., 2006).

3.1.2 Controle biológico utilizando o parasitoide de larvas *Cotesia flavipes*

O manejo integrado da broca da cana-de-açúcar vem sendo realizado, utilizando-se principalmente o controle biológico, com parasitoides multiplicados em laboratório e liberados no campo. Os parasitoides larvais da broca são os mais usados como métodos de controle no Brasil e no mundo (PINTO; GARCIA; BOTELHO, 2006).

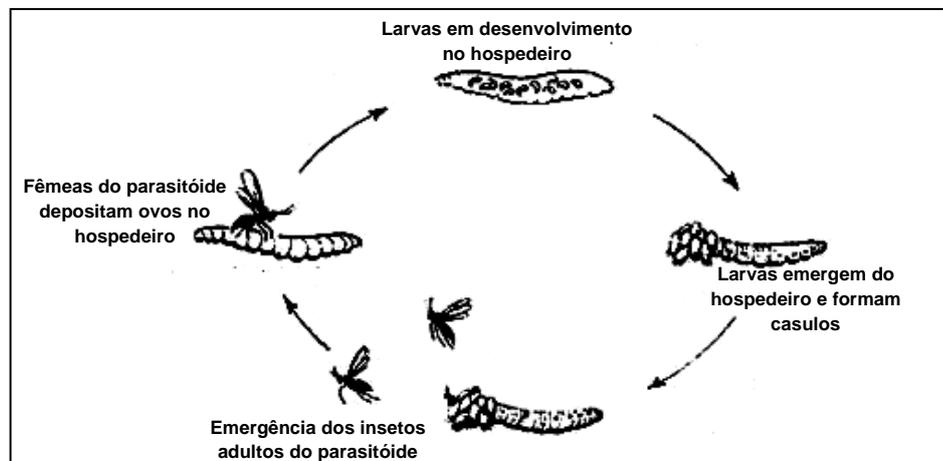
Em abril de 1974, o parasitoide *C. flavipes*, proveniente de Trinidad, foi introduzido em Alagoas, iniciando-se então a participação desse parasitoide no Programa Nacional de Controle Biológico de *Diatraea spp*, no Brasil, desenvolvido pelo IAA/PLANALSUCAR (MENDONÇA FILHO; COSTA; RISCO, 1977). Nessa mesma década, *C. flavipes* foi introduzida nos estados de PE, PB, RN, SE, BA e RJ para controlar *D. saccharalis* e *D. flavipennella* e em SP para controlar *D. saccharalis* (MENDONÇA FILHO *et al.*, 1976; RISCO, 1976; RISCADO; LIMA FILHO, 1976; SOUZA; SILVA, 1976; MACEDO *et al.*, 1977; PEREIRA *et al.*, 1977; RISCADO *et al.*, 1977).

A espécie *C. flavipes* é um parasitoide de larvas, gregário, que tem um desenvolvimento holometabólico, com ciclo de vida que pode variar de 16-25 dias, dependendo da temperatura e idade do hospedeiro, sendo que o período de parasitismo tem uma duração de 3-6 dias (larvas). O período de ovo a pupa varia de 11-18 dias (BENNET, 1977).

O parasitismo se inicia por uma picada da vespa, que deposita em média 40 ovos em cada lagarta da praga. Dentro de três dias, desses ovos eclodem larvas, que se alimentam do conteúdo interno da lagarta, que por sua vez, morre exaurida, sem conseguir completar seu ciclo de vida. No último estágio larval, migram para fora do corpo do hospedeiro, tecem casulos de seda onde empupam formando uma “massa” branca (casulos aglomerados) de onde emergem os adultos (PINTO; GARCIA; BOTELHO, 2006). Os adultos são pequenas vespas com comprimento ao redor de 2 a 3 mm, de coloração preta que logo após o nascimento, acasalam-se (BOTELHO; MACEDO, 2002) e vivem por, aproximadamente, sete dias a 25°C, se alimentados (FIG. 2).

Desde a sua introdução no Brasil, as porcentagens de controle com este parasitoide, vêm apresentando um aumento significativo com parasitismo médio para *D. saccharalis* em canaviais do estado de São Paulo de aproximadamente 30% e no Nordeste para *Diatraea spp* de aproximadamente 26% (PLANALSUCAR, 1983; BOTELHO; MACEDO 2002).

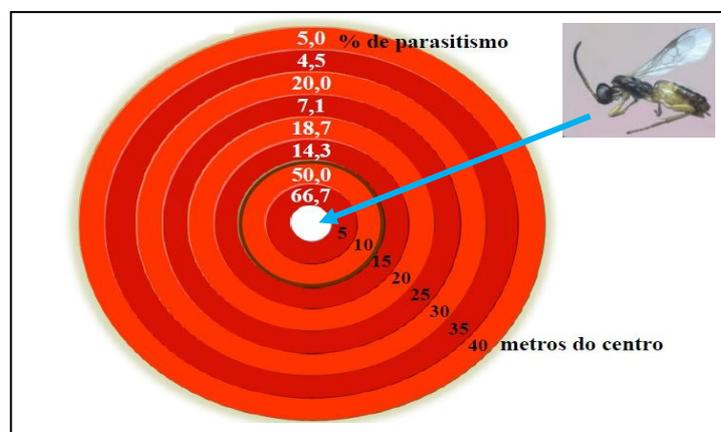
Figura 2 - Ciclo de vida do parasitoide *Cotesia flavipes*



Fonte: FREITAS, 2001

Segundo Botelho e Macedo (2002), a temperatura exerce forte influência na capacidade de busca e na sobrevivência de *C. flavipes*, devendo-se evitar, na liberação, as horas mais quentes do dia. Em determinadas regiões e épocas, a liberação no final da tarde garante melhores condições de sobrevivência do inseto do que pela manhã. Hoje se sabe que, apesar de *C. flavipes* chegar até 40 metros de distância, seu parasitismo é efetivo até 18 metros (POMARI et al., 2008), o que exige, pelo menos, 8 pontos de liberação por hectare cultivado de cana-de-açúcar. A figura 3 ilustra a área de dispersão deste parasitoide, após um dia do ponto de liberação, em plantações de cana-de-açúcar (PINTO, 2012) mostrando que o parasitismo diminui com a distância do ponto de liberação.

Figura 3 – Dispersão do parasitoide *Cotesia flavipes*



Fonte: Pinto, 2012

Estudos demonstraram que o controle biológico de *Diatraea* spp, por meio de sistemáticas liberações de *C. flavipes*, de acordo com metodologia do IAA/PLANALSUCAR, era um sucesso com real contribuição na redução da intensidade de infestação da praga, a despeito de fatores desfavoráveis a esta, como expansão da área cultivada e plantio de variedades mais suscetíveis (MACEDO; BOTELHO, 1986). Na década de 90, o “Annual Report 1991/92 da Copersucar” citava que, 17 laboratórios de usinas cooperadas havia liberados 943 milhões de adultos de *C. flavipes*, representando 76,8% do contingente de parasitoides liberados, e que a porcentagem de intensidade de infestação da praga, em canaviais de 26 usinas cooperadas, tinha sido reduzida de uma média superior a 9% em 1980 para 3,17% em 1991 (COPERSUCAR, 1992).

O sucesso do controle biológico aliado à área de dispersão deste parasitoide reforça a hipótese da atuação de sinais químicos que podem atuar a longa distância na localização do seu hospedeiro. Por este motivo é válido elucidar o mecanismo de sinalização envolvido nesse processo, bem como os tipos de interações nele envolvidas.

3.2. Semioquímicos e interações inseto-planta

Os animais, em particular os insetos, exercem relações ecológicas com o meio ambiente e com os outros organismos de várias maneiras, sendo a comunicação por meio de compostos químicos voláteis uma das mais importantes. Tal sistema é parte integrante do comportamento animal, definida como um processo que envolve a transmissão de sinais entre organismos. Em algumas situações, confere vantagens apenas para o organismo emissor e seu grupo; em outras, apenas para os organismos receptores ou ambos (DO NASCIMENTO; SANT’ANA, 2001).

Os insetos são os seres vivos que mais utilizam os odores para desempenhar suas funções vitais: localização de presas, defesa e agressividade, seleção de plantas hospedeiras, escolha de locais para oviposição, corte e acasalamento, na organização social e outros comportamentos (TEGONI; CAMPANACCI; CABBILLAU, 2004). Durante o comportamento de busca e seleção de hospedeiro os insetos entomófagos utilizam sinais de diferentes naturezas, dentre os quais se encontram vários semioquímicos produzidos pelas plantas hospedeiras, insetos fitófagos e até materiais inertes (GODFRAY, 1994).

Os semioquímicos são substâncias químicas emitidas por plantas, animais e outros organismos, que induzem respostas comportamentais ou fisiológicas intra-e/ ou interespecíficas nos indivíduos envolvidos. Podendo estes ser classificados como aleloquímicos ou feromônios, dependendo da ação que provoquem. Os aleloquímicos são semioquímicos produzidos pelos indivíduos de uma espécie que modificam o comportamento dos indivíduos de uma espécie diferente (efeito interespecífico). Isto inclui os alomônios (beneficia a espécie que emite), os sinomônios (beneficia as duas espécies, a que emite e a que recebe) e os cairomônios (a espécie beneficiada é a receptora), por exemplo, os parasitoides. Os feromônios são compostos químicos produzidos em glândulas especializadas e quando liberados pelo organismo induzem respostas comportamentais específicas, tais como orientação, comportamento pré-copulatório e acasalamento em outro indivíduo da mesma espécie correspondendo a um efeito intraespecífico (ROELOFS; CARDÉ, 1977).

A relação entre insetos e plantas é possível uma vez que, os insetos são responsáveis por atividades benéficas às plantas, como por exemplo, a polinização ou a defesa contra insetos herbívoros através das interações tritróficas. Por sua vez, as plantas fornecem abrigo e sítios de alimentação e oviposição, sendo os insetos os principais responsáveis pela grande dispersão das plantas nos diversos ambientes (MELLO; SILVA-FILHO, 2002).

Na maioria dos estudos, as estratégias de defesa das plantas contra herbívoros têm sido apresentadas como interações entre apenas dois níveis tróficos; o envolvimento do terceiro nível começou a ser investigado somente na década de 80 (PRICE et al., 1980). Até então, acreditava-se que algumas substâncias químicas das plantas, denominadas secundárias, eram tóxicas para os herbívoros, mas não era conhecido o benefício que a sua liberação trazia para as plantas.

Posteriormente, alguns estudos demonstraram que a função de sinalização pode ter superado em importância a função tóxica como mecanismo de defesa das plantas (TURLINGS, et al. 1991). Esses compostos químicos são considerados secundários não por sua qualidade ou quantidade inferior, mas por não serem essenciais à fisiologia normal de crescimento e reprodução das plantas (METCALF; METCALF, 1992).

As fêmeas adultas de parasitoides procuram seus alvos muitas vezes utilizando-se de semioquímicos emitidos a partir do micro-habitat do hospedeiro, transportados pelo ar. Estes semioquímicos são percebidos pelos receptores sensoriais dos insetos e podem funcionar como atraente, repelente, arrastante ou fagoestimulante.

Plantas, herbívoros e organismos do terceiro nível trófico estão interconectados por relações complexas e sutis, que ainda estão por ser totalmente compreendidas (WHITMAN, 1991 *apud* MOREIRA, 2003). Quando lagartas se alimentam de folhas verdes, provocam a liberação de substâncias voláteis em diferentes combinações. As fêmeas de parasitoides utilizam-se desses odores para se orientarem em direção a lagarta hospedeira e possuem propensão altamente refinada e inata para responder a esses odores em concentrações extremamente baixas e na forma de diferentes misturas (EIRAS; MAFRA NETO, 2001).

Estudos de sistemas com três níveis tróficos são essenciais, a fim de descobrir como as plantas sustentam a ação de inimigos naturais, em combinação ou não com resistência de planta a hospedeiros e como isso pode ser manipulado para benefício desses inimigos (VISON, 1975; LEWIS et al.; VET; DICKE, 1992). Segundo Lara (1991), características físicas, morfológicas e químicas das plantas podem alterar o comportamento dos insetos e também interferir na sua biologia, reduzindo sua adaptação e conferindo proteção às plantas.

3.2.1 Indução a resistência de plantas

Apesar de seu ciclo de vida completo, as plantas são desafiadas por diferentes estresses bióticos e abióticos. Como organismos susceptíveis, não possuem a chance de escapar do ataque de organismos heterotróficos, de modo que, exploram outras estratégias para se defenderem. Diversas estratégias são baseadas na imensa diversidade da química de plantas, p.ex., a habilidade de sintetizar mais de 200.000 mil compostos, conhecidos como metabólitos especializados, envolvidos na resposta para mudanças ecológicas particulares (PICHERSKY; LEWINSOHN, 2011). Além de microrganismos patogênicos, elas também se defendem contra insetos herbívoros e outros artrópodes. Estes podem ser especialistas em alimentar-se somente de um número limitado de espécies de plantas, de apenas um hospedeiro ou generalistas, que se alimentam de diversas espécies (MITHOFER; BOLAND, 2012).

Pelo fato de coexistirem por pelo menos 350 milhões de anos, as plantas têm desenvolvido, com sucesso, mecanismos de defesa contra insetos. Em princípio duas amplas categorias de defesa de plantas podem ser distinguidas: (a) sempre presentes (constitutivas) e (b) induzidas, as quais podem ser eliciadas especificamente por certos agressores (GATEHOUSE, 2002).

Na defesa induzida, o mecanismo indireto atua via atração dos organismos a partir de um nível trófico adicional, p. ex., de inimigos que atacam os herbívoros. A liberação de certos

compostos orgânicos voláteis (COVs), a qual consiste principalmente de terpenoides, derivados de ácidos graxos e alguns compostos aromáticos, por plantas infestadas por herbívoros, p. ex., podem atrair parasitoides, em particular, ou outros predadores que se alimentam de insetos. Muitos COVs são produzidos “sob demanda” após alterações mecânicas ou biológicas, e sua composição depende do tipo de dano, tal como ferimento, deposição de ovos e alimentação do herbívoro (MITHOFER; BOLAND, 2012).

Para discriminar de maneira eficiente o nível do dano causado pelo herbívoro, as plantas são capazes de reconhecê-los com alto grau de sofisticação em combinação com sinalização intracelular e conversão destes sinais em respostas bioquímicas, fisiológicas e celulares apropriadas (MAFFEI; MITHÖFER; BOLAND, 2007). A emissão de compostos voláteis herbívoro-induzidos foi demonstrada para diferentes espécies de plantas, incluindo milho *Zea mays* L. (Família: Poaceae) algodão *Gossypium hirsutum* L. (Malvaceae); leguminosa *Lotus japonicus* L. (Família: Fabaceae); Tabaco *Nicotiana attenuata* (Torrey) (Família: Solanaceae) e alfafa *Medicago truncatula* (Gaertn.) (Família: Fabaceae) (VAN POECKE; DICKE, 2004).

Muitas características das plantas podem variar, em resposta ao dano causado pelos insetos (CORTESERO; LEWIS, 2000). A resposta das plantas a herbivoria pode ser totalmente complexa e envolver características que permitem as plantas se defender, tolerar ou não ser atacada por herbívoros (RAUSHER, 1992). Os Compostos COVs liberados são resultado da injúria sofrida pelas plantas atacadas por herbívoros (STEINBERG; DICKE; VET, 1993; AGRAWAL et al., 2002). Tais compostos são conhecidos por produzirem uma extensa gama de respostas no comportamento dos insetos, tais como: sequestro de composto de plantas por insetos, promover à produção ou liberação de feromônios de insetos, acentuarem a resposta do inseto ao feromônio (efeito sinérgico), e podem apresentar efeitos repelentes e atrativos aos insetos fitófagos (herbívoros) e entomófagos (parasitas e predadores) (VET; DICKE, 1992; DICKE et al., 1999).

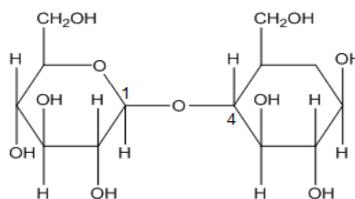
Os compostos voláteis liberados pelas folhas verdes (*Green Leaf Volatiles*-GLVs) são produzidos quando as folhas são danificadas, independente do agente causador da injúria. A mistura de compostos voláteis comumente liberados é constituída por alcoóis, aldeídos e ésteres contendo seis átomos de carbono em sua cadeia, os quais são produzidos através da oxidação derivada de ácidos graxos. Em contraste, as plantas infestadas por insetos herbívoros liberam compostos que não são produzidos em resposta a injúria artificial, tais como os

terpenoides, os quais geralmente são liberados tanto pelo tecido danificado como por folhas não danificadas (DICKE et al., 1990; TURLINGS et al., 1991; DE MORAES et al., 1998). Isto sugere uma reação específica associada com a alimentação do inseto, pois a planta tem a capacidade de diferenciar entre a injúria provocada por um herbívoro e a injúria artificial (PARE; TUMLINSON, 1999).

Os compostos voláteis emitidos por plantas são conhecidos como atrativos aos inimigos naturais (STEINBERG; DICKE; VET; 1993; AGRAWAL et al.; 2002). As pistas químicas produzidas por herbívoros são informações confiáveis da presença dos mesmos, porém são pouco detectáveis a longas distâncias. Por sua vez, os compostos voláteis emitidos pelas plantas fornecem pistas de longo alcance e provavelmente indicam a presença de herbívoros (VET; DICKE, 1992). Esses mesmos autores, determinaram que inimigos naturais, todavia, podem combinar essas duas características vantajosas: confiabilidade e detectabilidade da informação na busca por seus hospedeiros. Quando plantas são infestadas por herbívoros liberam compostos voláteis e produzem informações confiáveis sobre a presença deles, sendo também, mais fácil sua detecção a longa distância.

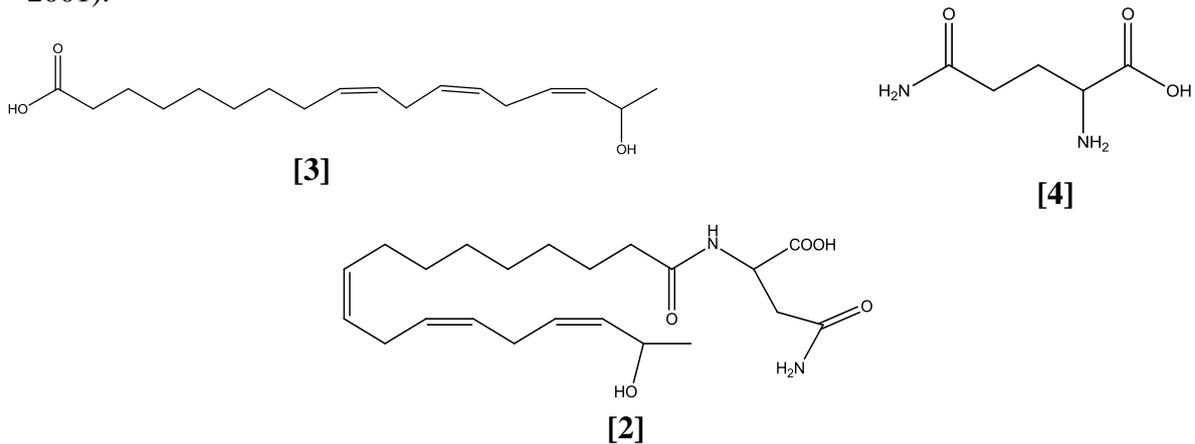
Muitos parasitoides utilizam os compostos voláteis de plantas sadias apenas para localizar o habitat e possível micro habitat de seus hospedeiros (ELZEN; WILLIAMS; VINSON, 1983; NGI-SONG et al., 1996). Naturalmente, esses parasitoides apresentam vantagens distintas daqueles parasitoides que reconhecem o sinal químico emitido por plantas infestadas por seus hospedeiros (DE MORAES; MESCHER; TUMLISSON, 2001).

A especificidade do sinal que induz a liberação dos compostos voláteis depende do tipo de dano que o herbívoro causa na planta e da resposta da planta diante da presença de sinalizadores, conhecidos como elicitores, os quais são encontrados no regurgito de insetos herbívoros. Diferentes tipos de elicitores já foram identificados, a saber: β -glucosidase [1] em *Pieris rapae* L. (Lepidoptera: Pieridae) (MATTIACI; DICKE; POSTHUMUS, 1995) e os derivados de ácidos graxos, como é o caso da volicitina isolada em lagartas de *S. exigua* (ALBORN et al., 1997; TURLINGS et al., 2000).

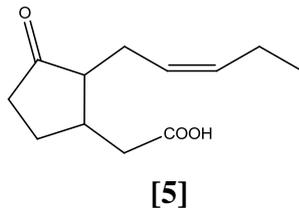


[1]

Existem relatos de que a volicitina [2] parece ser um produto da conjugação do ácido 17-hidroxi-linolênico [3], derivado da planta, com a glutamina [4] derivada de lagartas, em uma reação que ocorre provavelmente na cavidade oral das lagartas. Outros conjugados de ácido-graxos e aminoácidos foram detectados em regurgito de larvas de *Manduca sexta* L. (Lepidoptera: Sphingidae) e serviram como estimulante da liberação de compostos voláteis induzidos por herbivoria em plantas de tabaco (BALDWIN et al., 2001; HALITSCHKE et al., 2001).



Após a reação destes elicitores com o ácido linolênico, obtido das plantas, ocorre a formação do ácido jasmônico [5] o qual é um componente regulatório principal na sequência de reações que provoca a síntese e liberação de COVs pelas plantas.

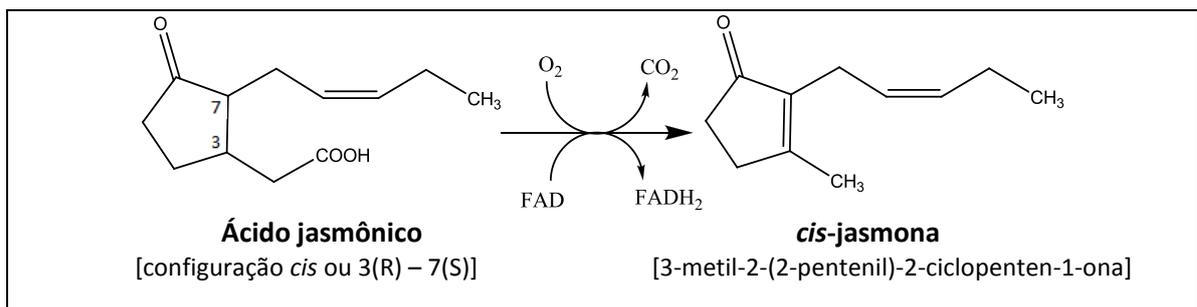


Sticher, Mauch - Mani e Metraux (1997) consideram ainda um pouco controversas as evidências experimentais de que o ácido jasmônico, e seus derivados podem atuar como sinais bioquímicos de indução de resistência sistemática em plantas submetidas à herbivoria. Entretanto, a frequência com que eles ocorrem em tecidos vegetais, aliada à sua conhecida mobilidade nos tecidos e entre plantas (análogos voláteis) podem apontar na direção de uma função sinalizadora (FARMER; RYAN, 1990).

O jasmonato de metila se acumula nas células dos tecidos lesados por ação dos insetos herbívoros, estando envolvido nos mecanismos de cicatrização e recuperação dos tecidos das plantas. Aparentemente, os derivados voláteis do ácido jasmônico estão

envolvidos na atração de insetos relacionados com a polinização das flores. Além disso, o ácido jasmônico participa da floração, frutificação e amadurecimento do fruto (WASTERACK, 2007). Sua ligação com os mecanismos de defesa das plantas aos agentes exógenos como os insetos está relacionada à sua transformação em jasmolona. Nesse sentido, a oxidação do núcleo da ciclopentanona entre os carbonos 3 e 7 do ácido jasmônico induz a sua descarboxilação formando a *cis*-jasmona como metabólito intermediário. A Figura 4 resume a reação de formação da *cis*-jasmona.

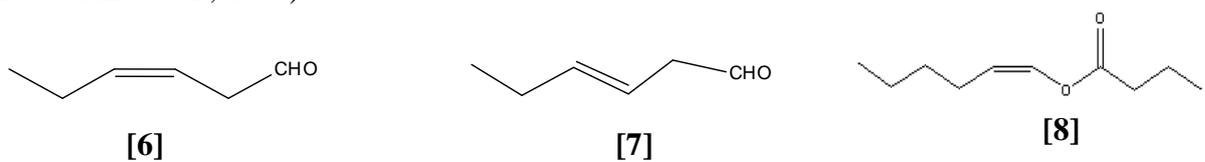
Figura 4 - Oxidação e descarboxilação do ácido *cis*-jasmônico



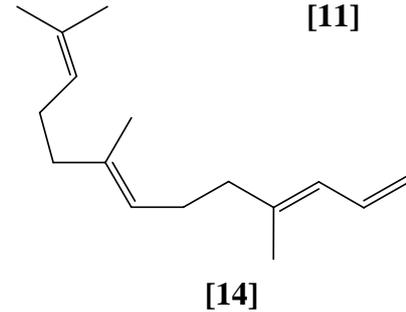
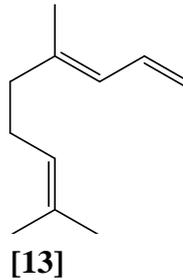
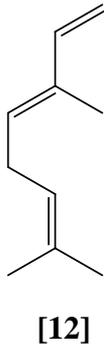
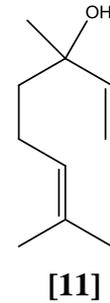
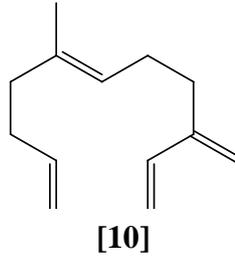
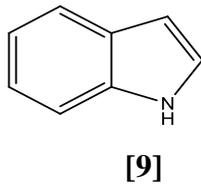
Fonte: RODRIGUES, 2010

3.2.2 Compostos voláteis emitidos por plantas induzidas por herbivoria

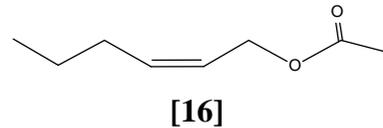
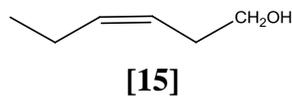
Os compostos voláteis liberados pelas plantas após ataque de um herbívoro consistem de substâncias liberadas imediatamente após o dano e de compostos voláteis sintetizados *de novo*. Muitos dos quais são liberados rapidamente e surgem da via metabólica da lipoxigenase incluindo o (*Z*)-3-hexenal [6], (*E*)-3-hexenal [7] e os isômeros do butirato de hexenila [8] (LOUGRIN et al., 1995).



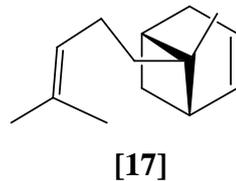
Compostos como indol [9] e diversos mono, homo e sesquiterpenos, como é o caso de (*E,E*)- β -farneseno [10], linalol [11], (*E*)- β -ocimeno [12], (*E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno [13], e (*E,E*)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno [14], são sintetizados *de novo* em diferentes períodos de alimentação pelo insetos herbívoros (PARÉ; TUMLINSON, 1997).



Em plantas de milho, por exemplo, os compostos voláteis liberados nas 2 ou 3 primeiras horas imediatamente após o ataque são (*Z*)-3-hexenal [6], (*E*)-3-hexenal [7], (*Z*)-3-hexenol [15] e o acetato de (*Z*)-3-hexenila [16].



Algumas horas após esse ataque, compostos sintetizados lentamente pela indução, começam a ser liberados e continuam a ser emitidos durante horas (TURLINGS et al., 1998), constituindo-se majoritariamente de terpenóides, onde os mais comuns são: (*E,E*)-beta-farneseno [10], linalol [11], (*E*)-beta-ocimeno [12] e (*E*)-alpha-bergamoteno [17].



Tais misturas podem variar quantitativamente e/ou qualitativamente dependendo do genótipo, espécie e estágio de desenvolvimento do inseto herbívoro, além de fatores abióticos (TURLINGS; TUMLINSON; LEWIS, 1990; TURLINGS et al, 2002; HOBALLAH; TAMO; TURLINGS, 2002).

Geralmente, após 24 horas da indução, não são mais detectadas quantidades significativas de compostos voláteis (TUMLINSON; TURLINGS; LEWIS, 1992). Além disso, a intensidade luminosa é um fator determinante na emissão destes compostos, pois na ausência de luz, nenhum composto é detectado mesmo em plantas que sofreram indução (TURLINGS et al., 1995), indicando que a produção de compostos voláteis está relacionada com a atividade fotossintética da planta.

3.3 Técnicas de extração e identificação de semioquímicos

A primeira identificação química de um feromônio sexual, o bombicol, liberado por machos do bicho-da-seda, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) foi resultado de mais de 20 anos de pesquisa. Após esta descoberta um expressivo número de pesquisadores tem contribuído para a elucidação de estruturas de compostos presentes nos semioquímicos de insetos e plantas.

As pesquisas relacionadas à identificação de semioquímicos exigem conhecimentos interdisciplinares e a participação de profissionais de diversas áreas da ciência (ZARBIN, 2001). A integração dos profissionais, aliados aos recursos tecnológicos disponíveis e que vêm sendo aprimorados ao longo do tempo, possibilita a identificação de compostos presentes em pequenas quantidades em uma determinada amostra ou extrato.

A escolha de técnicas adequadas para a obtenção dos extratos a serem analisados é um fator de grande importância no desenvolvimento dos trabalhos. Isto é essencial, uma vez que grande parte dos semioquímicos é uma mistura de constituintes químicos liberados em quantidades muito pequenas, variando entre 10^{-9} a 10^{-12} gramas (JONES; OLDHAM, 1999). Geralmente, estas misturas são constituídas de dois a sete compostos químicos, podendo chegar a uma composição acima de 30 compostos, sendo que um deles ou mais, pode ser caracterizado como componente principal (LIMA; DELLA LÚCIA, 2001).

3.3.1 Técnicas de extração de semioquímicos

As principais técnicas empregadas na extração de compostos liberados por insetos e plantas são a extração por solvente e o *head space* dinâmico ou aeração (ZARBIN, 2001), ambas bastante eficientes. A extração por solvente é amplamente empregada na obtenção de extratos de glândulas ou de parte do corpo do inseto. No primeiro caso, é necessário que a glândula da qual se deseja obter o extrato seja extirpada do corpo do inseto e posteriormente transferida para um recipiente contendo o solvente, geralmente de baixa polaridade como hexano ou diclorometano. Alguns autores fizeram uso de tal técnica, principalmente em estudos com himenópteros (SILVA, 1999; DO NASCIMENTO et al., 1999; MENDONÇA et al., 2004.), lepidópteros (REBOUÇAS et al., 1999; FERRARA et al., 2001), e dípteros (LIMA et al., 2001; GONÇALVES, 2005). A extração a partir de seções do corpo do inseto é mais empregada quando o inseto em questão possui tamanho reduzido, e neste caso, outros compostos que não façam parte do elenco da secreção presente na glândula exócrina podem ser detectados no momento da identificação de seus constituintes.

A aeração também é um método comumente empregado para a obtenção de compostos voláteis de plantas e insetos, onde todos os compostos liberados pela planta ou pelo inseto são coletados em adsorventes de polímeros especiais como Porapak Q (Copolímero estireno-divinilbenzeno), Tenax (Polióxido de difenileno), Super Q (Copolímero de *p*-divinilbenzeno-vinilbenzeno), sílica gel (Polímero de ácido silícico), carvão ativado e outros, e a dessorção é realizada utilizando-se solventes orgânicos como diclorometano, hexano e éter, com alto grau de pureza. A preferência por tais solventes se deve a volatilidade dos mesmos, o que possibilita a evaporação sem que os materiais coletados sejam expostos à alta temperatura.

Os sistemas de aeração utilizados geralmente são de vidro, sendo adaptado na entrada do sistema, um tubo de vidro contendo carvão ativado, para que o ar seja pré-filtrado. Durante um período de 24 horas, com um fluxo de ar constante, ajustado com auxílio de fluxômetro, os compostos voláteis são arrastados até a extremidade oposta, e, então, adsorvidos no polímero contido no tubo de saída. Após o tempo adequado (24 h), o fluxo de ar é interrompido e o tubo coletor é desconectado do sistema (ZARBIN, 2001). O processo de dessorção dos compostos voláteis consiste em utilizar uma pequena quantidade de solvente orgânico (~ 2,5 mL), na simples lavagem do polímero contido no tubo coletor.

3.3.2 Bioensaios comportamentais (olfatometria)

Uma vez isolados os possíveis componentes semioquímicos, é necessário determinar quais são os componentes responsáveis pela atividade comportamental do inseto.

Geralmente a atividade biológica não é comprovada através de métodos químicos. Experimentos que investigam o papel destas substâncias em um contexto biológico, ecológico e/ou evolutivo são chamados de bioensaios.

Os bioensaios comportamentais têm por objetivo quantificar e qualificar a resposta motora do inseto frente a uma fonte de estímulo. A resposta é quantificada pelo número de insetos testados que respondem a um determinado odor e qualificada pelas atividades comportamentais relacionadas a essa percepção.

Testes demonstrando a atividade comportamental dos componentes químicos são essenciais para a compreensão de sua função e dos mecanismos comportamentais do inseto diante do estímulo químico, permitindo avaliar a viabilidade do uso destes semioquímicos no controle biológico (LAUMANN et al., 2005). Os testes comportamentais ou etológicos podem ser realizados em laboratório, no campo e em condições seminaturais ou gaiolas de campo, que consistem em armações teladas, normalmente, metálicas instaladas em ambientes abertos, em condições muito próximas as do meio ambiente (GONÇALVES, 2001).

Normalmente o processo simples de percepção se inicia com a “antenação” (movimento de antenas eretas em forma de “V”), elevação do pronoto e vibração de asas. Dependendo da bioatividade do estímulo, o inseto pode apresentar um comportamento de busca, que é observado através de vôo, ou da caminhada, em direção à fonte de odor. O tipo de direcionamento do inseto dentro do equipamento utilizado (movimento direcionado ou aleatório), bem como o tempo dispendido para chegar à fonte atrativa, são informações relevantes no momento da avaliação do experimento.

Existe uma grande variedade de bioensaios que podem ser realizados para medir as respostas comportamentais de insetos frente a determinado estímulo. A escolha do sistema mais adequado dependerá da biologia e do comportamento do inseto em estudo, bem como das características da amostra a ser testada. Os bioensaios mais comumente realizados em laboratórios utilizam três tipos básicos de equipamento: as arenas, os túneis de vento e os olfatômetros.

As arenas são caixas transparentes de acrílico ou de vidro, onde no seu interior um grupo de insetos é exposto ao estímulo testado e ao controle, introduzidos na arena em discos

de papel de filtro impregnados com as substâncias (tratamentos). Como não há passagem de fluxo de ar no interior das arenas, os insetos apenas manifestam respostas a curta distância. A arena não pode ter um tamanho muito reduzido nem o tempo do bioensaio pode ser muito longo, pois com o passar do tempo em um ambiente fechado, as substâncias voláteis se encontram bem distribuídas e podem provocar a saturação dos sítios de respostas aos estímulos químicos localizados nas antenas dos insetos. Mesmo assim as arenas são bastante utilizadas pela facilidade de construção e utilização (HOWSE; JONES; STEVENS, 1998).

O túnel de vento pode ser definido como um meio ambiente artificial, com controle de velocidade de vento, temperatura, umidade e luz, onde estudos de orientação podem ser realizados por meio da observação direta ou gravados. É o aparelho mais adequado para estudar o comportamento dos insetos a longo e curta distância da fonte de odor. Compreende um ambiente, onde uma série de variáveis bióticas e abióticas, que seria impossível de serem controladas em ambientes naturais, pode ser controlada e manipulada, tais como: direção, turbulência, força do vento, posição do estímulo químico, temperatura, umidade, luminosidade, estímulos visuais e sonoros, quantidade e qualidade de insetos (EIRAS; MAFRA NETO, 2001).

Os olfatômetros podem apresentar uma grande variedade de aparelhos que podem ser adaptados em função das espécies de insetos a serem testados ou mesmo desenvolvidos a fim de responder a novas questões específicas. São conhecidos vários tipos: olfatômetros em “Y”, olfatômetros de quatro braços, olfatômetros vertical, olfatômetros de dupla ou múltipla escolha e olfatômetro discriminante (EIRAS; MAFRA NETO, 2001). Neste trabalho o olfatômetro em “Y” sem opção de escolha, foi o aparato utilizado nos bioensaios.

3.3.3 Técnicas de isolamento e identificação de semioquímicos

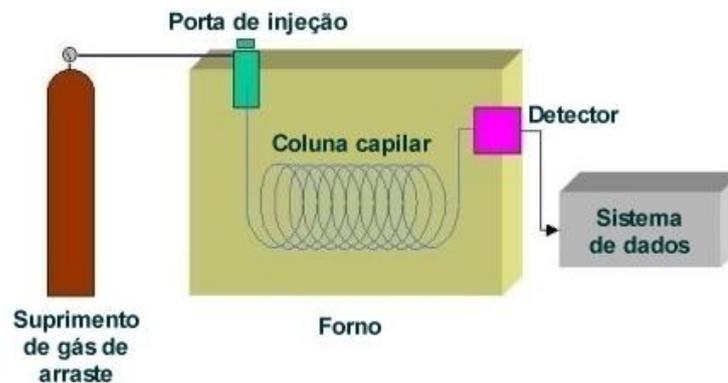
Para a extração e a identificação dos semioquímicos presentes em extratos obtidos de plantas e insetos, existem diversas técnicas, com destaque para o uso da Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas, podendo ser unidimensional (CG-EM) ou bidimensional (CG-CG-TOF-EM).

Na cromatografia gasosa unidimensional (CG) podem-se obter informações sobre o número de componentes da amostra, suas concentrações relativas, seus pesos moleculares e graus de polaridade. Por sua vez, a identificação dos compostos voláteis extraídos de insetos e plantas é feito através da espectrometria de massas (EM) que fornece informações,

características das substâncias, auxiliando na identificação da maioria dos compostos voláteis através dos fragmentos gerados na ionização (LANÇAS, 1993).

A cromatografia gasosa desenvolveu-se a partir da cromatografia líquida em meados da década de 60, produzindo importantes mudanças na química analítica e em muitas áreas de pesquisa e desenvolvimento. Subseqüentemente, com o surgimento das colunas capilares, conseguiu-se um aumento na capacidade de separação de compostos complexos, como perfumes, resíduos ambientais, etc. A chave para uma boa separação em CG é o uso da fase estacionária mais apropriada, uma ótima velocidade da fase móvel na coluna e uma ótima temperatura da coluna. Os componentes fundamentais (FIG. 5) de um sistema cromatográfico são: o injetor, o forno e o detector (LANÇAS, 1993).

Figura 5 - Esquema dos principais componentes de um cromatógrafo gasoso.



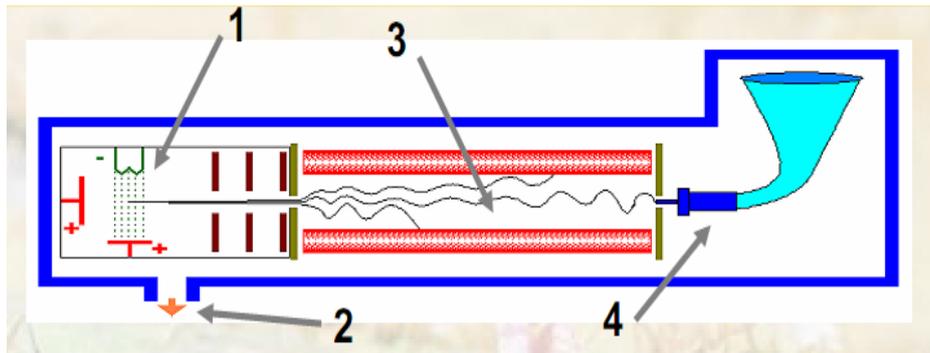
Fonte: SANTOS, 2003)

A etapa de elucidação estrutural começa após se conhecer qual o composto a ser estudado. Desta forma, o primeiro espectro a ser realizado normalmente é o espectro de massas. Apenas uma pequena quantidade de material é requerida para a análise, sendo que as informações obtidas são fundamentais para a determinação estrutural da molécula (ZARBIN; FERREIRA; LEAL, 1999).

Na identificação de semiquímicos, os métodos comumente empregados para ionizar e fragmentar os compostos são os de ionização química (IQ) e de impacto eletrônico (IE), sendo este último o método utilizado neste trabalho (FIG. 6). Na câmara de Ionização os elétrons gerados por um filamento aquecido bombardeiam a amostra. Os fragmentos ionizados (carga

+1) são repelidos pelo eletrodo positivo e conduzidos ao separador magnético. Na saída, todo o interior do EM deve estar sob alto vácuo (natm). O separador magnético deixa apenas os íons positivos atravessarem esta área do equipamento e, um detector que possui uma válvula fotomultiplicadora ou um fotodiodo gera um sinal elétrico proporcional ao número de íons que incide sobre o elemento (ZARBIN; FERREIRA; LEAL, 1999).

Figura 6- Esquema de um espectrômetro de massa (EM)



Descrição: 1- Câmara de Ionização; 2- Saída de Vácuo; 3- Separador Magnético; 4-Detector

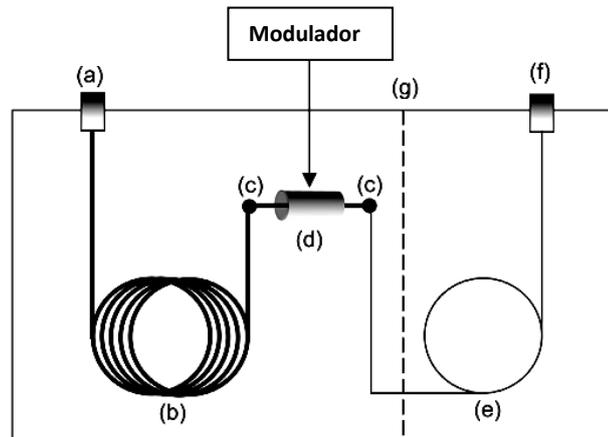
Fonte: MENDONÇA, 2009)

A Cromatografia bidimensional acoplada a Espectrometria de Massas com detector Time-of-flight (CG×CG/TOF-EM) é uma técnica analítica avançada, que oferece uma solução para o problema da co-eluição, presente na Cromatografia Gasosa unidimensional e que fornece uma alta sensibilidade e seletividade (DIMANDJA, 2004).

Na Cromatografia Gasosa Bidimensional (CG×CG) (FIG. 7), o equipamento possui colunas de polaridades diferentes, conectados por uma interface com uma câmara criogênica integrada. A câmara criogênica condensa repetidamente os compostos eluídos da coluna principal e libera todo o efluente de primeira dimensão periodicamente como pulsos curtos para a coluna secundária. Esta coluna é operada em condições de alta velocidade. Parâmetros como a duração e a frequência de ambos, pulsos de condensação e injeção são variáveis e necessitam da afinação precisa do instrumento de acordo com os requisitos da análise (DIMANDJA, 2004).

A Cromatografia Gasosa Bidimensional (CG × CG) produz picos muito estreitos (abaixo de 50 ms dependendo da frequência da modulação criogênica) deste modo, um detector TOF com uma elevada capacidade de aquisição de dados (até 500 espectros por segundo) é imprescindível. A natureza pulsante da fonte de ionização do TOF-EM reforça ainda mais o sistema de precisão, evitando o desvio espectral comum em um modo contínuo de ionização. Assim, o CG x CG com detecção TOF-EM funciona com uma elevada precisão independente do intervalo de concentração (KALINOVÁ et al., 2006).

Figura 7- Diagrama básico de um sistema CG x CG



Descrição: (a) injetor, (b) coluna primária, (c) conectores de coluna, d) interface CG×CG, (e) coluna secundária, (f) detector e (g) divisão opcional para um forno secundário.

Fonte: DMANDJA, 2004

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenções dos insetos

4.1.1 Lagartas de *Diatraea flavipennella*

As lagartas de *D. flavipennella* utilizadas nesse experimento foram provenientes de criação estabelecida no Laboratório de Ecologia Química, do Instituto de Química e Biotecnologia, da Universidade Federal de Alagoas (LEQ-IQB-UFAL) e, mantidas em dieta artificial descrita por Freitas et al. (2007). A criação de *D. flavipennella* foi feita a partir de posturas provenientes de criação massal do LEQ-IQB-UFAL. Folhas de papel vegetal foram usadas como substrato para oviposição. Essas folhas contendo as massas de ovos de fêmeas foram submetidas a um processo de esterilização externa dos ovos, consistindo na imersão em soluções de formol a 3%, sulfato de cobre a 1% e água destilada, durante 5 minutos. Posteriormente as posturas foram secas com papel-toalha e colocadas em tubos contendo a dieta de alimentação que consiste basicamente de farelo de soja, germe de trigo, açúcar, solução vitamínica, sais de Wesson, ácido ascórbico, água e anticontaminantes (ARAÚJO et al., 1985), para alimentação das lagartas recém-emergidas. Após 20 dias, as mesmas foram transferidas para placas de Petri contendo tabletes de dieta de realimentação, mantidas em condições de laboratório, temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR de $70 \pm 10\%$, onde permaneceram até atingir a fase de pupa.

4.1.2 *Cotesia flavipes*

Massas de casulos do parasitoide *C. flavipes*, criados sobre *D. saccharalis*, foram fornecidos pelo laboratório de controle biológico da Usina Triunfo Agroindustrial S/A, Boca da Mata-AL-Brasil ($09^\circ 38' 27,6''\text{S}$; $36^\circ 13' 12,0''\text{W}$).

4.2 Obtenções de plantas de cana-de-açúcar

Os colmos das variedades de cana-de-açúcar SP791011 (suscetível), RB867515 (resistente) e RB92579 (resistente) (MESQUITA, 2011) foram fornecidos pela Usina Cachoeira de Meirim S/A, Maceió, Alagoas, Brasil ($09^\circ 25' 44,3''\text{S}$; $35^\circ 44' 16,8''\text{W}$). O substrato estéril Maxplant[®] foi utilizado para as plantas cultivadas. Após o plantio em sacos plástico de 3L, 90 plantas sendo 30 de cada variedade devidamente identificadas permaneceram protegidas com tela anti-afídica de dimensões 2,0m X 2,0m X 2,50m, em

condições seminaturais ($29\pm 3.1^{\circ}\text{C}$, $80\pm 10\%$ U.R). As plantas foram regadas a cada dois dias com 500 mL de água cada, até que as plantas de cana-de-açúcar alcançassem a idade de 30 dias com altura variando entre 30 a 40 cm.

4.3 Indução de plantas de cana-de-açúcar por *cis*-jasmona

Um total de 30 plantas, 10 de cada variedade de cana-de-açúcar SP791011, RB92579 e RB867515, foi tratado com solução de *cis*-jasmona. Na preparação da solução, utilizou-se 100 μL de tween 20 na concentração de 0,1%, 100 mL de água e 500 μL de *cis*-jasmona (Aldrich com 90% i.a.). A área de estudo no laboratório em que as plantas, uma de cada variedade, foram utilizadas para indução com a solução de *cis*-jasmona foi de 1m², estando postas separadas uma das outras por 25 cm. Uma planta de cada variedade foi borrifada com 5 ml de solução, totalizando 15 mL por tratamento. Foram feitas dez repetições e o tempo de indução foi de 24 horas.

4.4 Infestação de plantas de cana-de-açúcar

Plantas de cana-de-açúcar de cada variedade, acima citadas, foram infestadas com uma lagarta de *D. flavipennella* do 3º instar e mantidas em sala climatizada ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$, $70\pm 10\%$ U.R.) durante 24 horas até sua utilização para a coleta de compostos voláteis.

4.5 Obtenção de compostos voláteis de plantas de cana-de-açúcar sadias, infestadas por *Diatraea flavipennella* e induzidas a resistência por *cis*-jasmona.

Plantas de cana-de-açúcar foram submetidas a dois diferentes sistemas de aeração. Para o primeiro sistema, dez plantas com sintomas de infestações, dez plantas sadias e dez plantas induzidas por *cis*-jasmona, totalizando 30 plantas/variedade, foram utilizadas nas aerações. Para o segundo sistema, o mesmo número de plantas foi utilizado considerando apenas a variedade SP791011 nos três estados (infestadas, induzidas e sadias).

No intervalo pós-infestação e pós-indução, as plantas foram mantidas separadas por tratamento em salas fechadas diferentes com distância de aproximadamente 3 metros entre si. Os vasos contendo as plantas foram isolados do substrato com papel alumínio até a altura do caule, evitando assim a contaminação com compostos voláteis provenientes do mesmo.

Para o primeiro sistema de aeração (FIG. 8), os compostos voláteis foram extraídos utilizando-se uma modificação de metodologia descrita por Stewart Jones & Poppy (2006), onde as plantas da mesma idade, com os aspectos sadia, infestada e induzida, foram tratadas

isoladamente nas aerações. Toda parte área das plantas foram inseridas na câmara de aeração delimitada por sacos de poliéster apropriados para uso em micro-ondas, fixando-os às plantas no caule com fita de politetrafluoretilenona (teflon[®]) na altura de 2 cm acima do solo (Figura 9). O ar injetado na câmara foi purificado através de um tubo (filtro) de carvão ativado colocado na entrada do sistema e o fluxo de ar produzido por uma bomba de aquário, com fluxos de 500 mL/min foi dividido para três câmaras de maneira que se mantivesse aproximadamente 170 mL/min por planta. Os constituintes voláteis liberados pelas plantas foram coletados por adsorção durante a passagem do fluxo através de tubos contendo carvão ativado situado na saída de ar do sistema.

O segundo sistema de aeração (FIG. 9) consistiu de 3 compartimentos de vidro (50cm de altura x 15cm) sendo 1 para cada tratamento (1-planta sadia, 2-planta infestada, 3-planta induzida). O vaso contendo cada planta foi introduzido no interior de cada compartimento e a parte relativa ao substrato foi coberta com papel alumínio, além do isolamento do caule com fita de politetrafluoretilenona (Teflon[®]) a partir do substrato. Um fluxo de ar positivo de 4L/min foi subdividido para os 3 compartimentos cuja entrada de ar continha um tubo com carvão ativado/cada. Os constituintes voláteis liberados pelas plantas foram coletados por adsorção durante a passagem do fluxo através de tubos contendo Tenax[®] colocados na saída do compartimento, o qual estava acoplado a uma bomba de vácuo com mesmo fluxo de entrada. Este sistema de aeração contendo compartimento sem planta também foi realizado nas mesmas condições e serviu como tratamento branco.

Para os dois sistemas, as aerações foram contínuas durante 24h. Ao final deste tempo, os tubos foram lavados com 3 mL de hexano grau espectroscópico HPLC (solvente) e o extrato resultante subdividido em três frações iguais, sendo transferidos para ampolas. Estas ampolas foram vedadas com auxílio de maçarico e alocadas em freezer a -10°C para uso posterior nos bioensaios com olfatômetro e análises químicas.

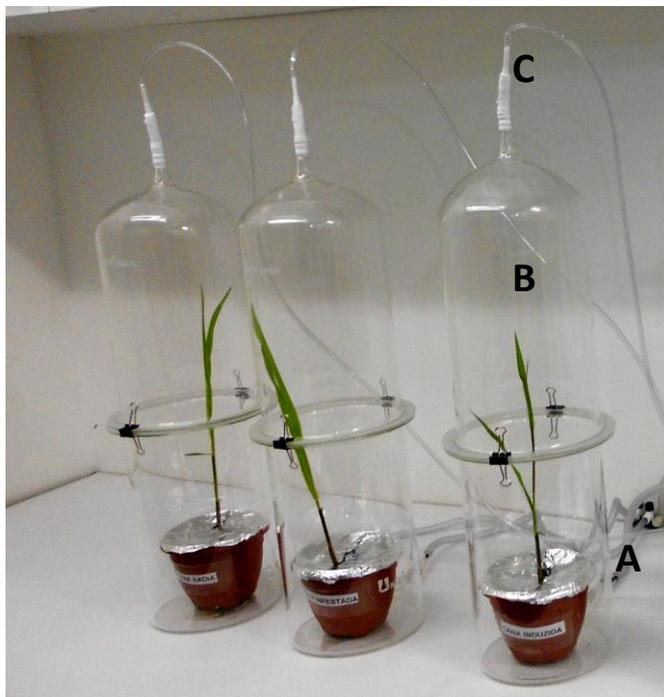
Figura 8 - Sistema de aeração de plantas de cana-de-açúcar sadias, induzidas por *cis*-jasmona e infestadas por lagartas de *Diatraea flavipennella* para diferentes variedades.



Descrição: (A) aponta a vedação do sistema de aeração, (B) o tubo de entrada, (C) o tubo de saída do sistema contendo carvão ativado, (D) a bomba de aquário e (E) a câmara de aeração em funcionamento.

Fonte: Foto do autor

Figura 9 - Sistema de aeração de plantas de cana-de-açúcar sadias, induzidas por *cis*-jasmona e infestadas por lagartas de *Diatraea flavipennella* para a variedade SP791011



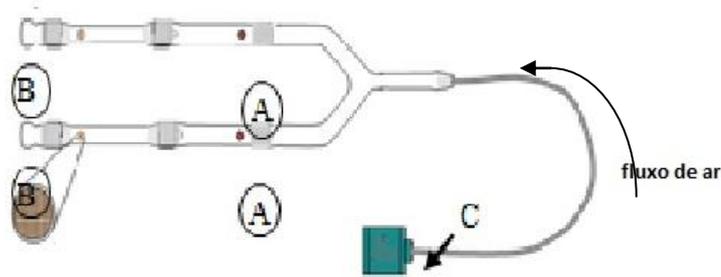
Descrição: (A) Entrada de ar contendo tubo com carvão ativado, (B) compartimento de vidro contendo a planta e (C) saída de ar contendo tubo com adsorvente tenax®.

Fonte: Foto do autor

4.6 Bioensaios comportamentais utilizando olfatômetro

Os bioensaios foram realizados com olfatômetro em “Y”, com um fluxo de ar constante de 500 mL/min e sem opção de escolha (FIG. 10), em condições de laboratório, com temperatura $24 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar média de $70 \pm 10\%$.

Figura 10 - Olfatômetro em “Y” com fluxo de ar e sem opção de escolha

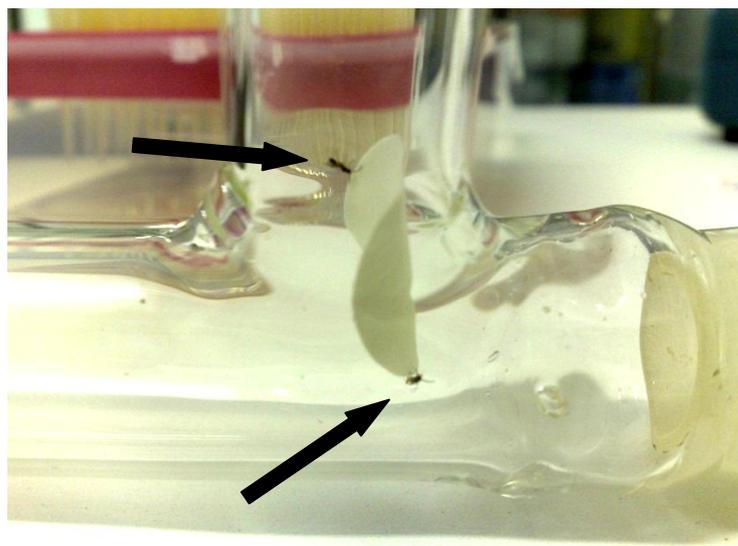


Descrição: (A) câmara de extratos; (B) câmara de liberação de insetos (C) Bomba de aquário.

Fonte: Adaptado de MESQUITA et al., 2010

Em cada um dos braços do olfatômetro em “Y”, nas câmaras de extrato “A” (FIG. 11) foram feitas comparações introduzindo discos de papel de filtro embebidos com 10 μL dos extratos em estudo, como também com solvente (hexano) e com papel de filtro branco.

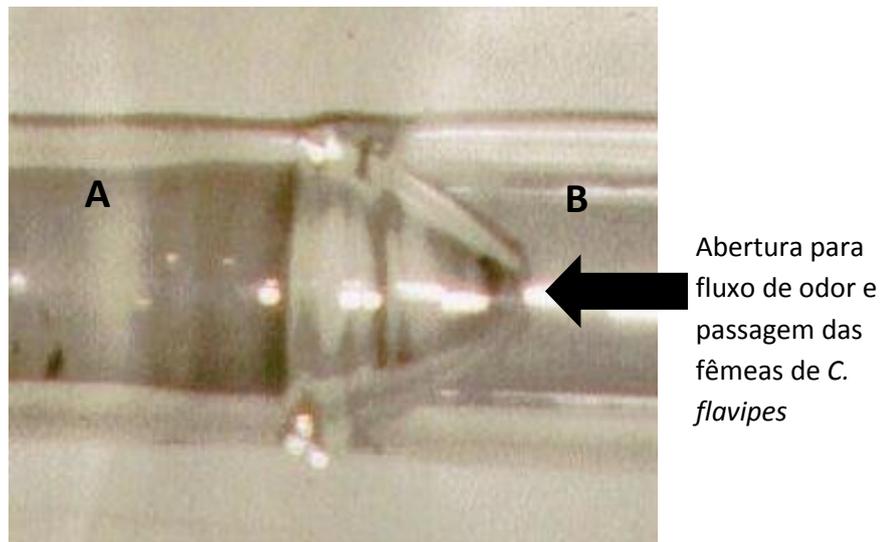
Figura 11 - Fêmeas do parasitoide *C. flavipes* na câmara “A” do olfatômetro atraídas pelo papel de filtro impregnado com extrato de cana-de-açúcar sadia, infestada pela *D. flavipennella* ou induzidas a resistência por *cis*-jasmona.



Fonte: Foto do próprio autor

As câmaras foram limpas com solução alcoólica (70%) e os papéis de filtro foram substituídos após cada repetição, seguido da inversão nas posições dos tratamentos entre os braços do olfatômetro para evitar qualquer efeito de habituação. Foram realizadas comparações entre plantas sadias *versus* plantas infestadas, plantas sadias *versus* plantas induzidas e plantas infestadas *versus* plantas induzidas. Fêmeas do parasitoide *C. flavipes* eram liberadas na câmara de insetos “B” com o auxílio de um tubo de vidro esmerilhado que se encaixava no final do equipamento de olfatometria. Entre as câmaras “A” e “B” do equipamento existia uma estreita passagem, por onde passava o fluxo de ar e os insetos, possibilitando quantificar o número de insetos que ultrapassava essa passagem e localizava o papel de filtro (FIG. 12).

Figura 12 - Passagem entre as câmaras “A” e “B” do olfatômetro



Fonte: Foto do próprio autor

Para cada tratamento foram realizadas dez (10) repetições, e em cada bioensaio foram utilizadas 10 fêmeas de *C. flavipes*. Os bioensaios foram conduzidos durante 15 minutos entre as 08h 00min e 12h00min da fotofase. As fêmeas dos parasitoides usadas nestes experimentos estavam com 2 a 3 dias de idade, na fase adulta e foram usadas somente uma vez.

4.7 Análises Químicas por Cromatografia Gasosa Unidimensional acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM). Foram realizadas análises em um Cromatógrafo Gasoso acoplado a um Espectrômetro de Massas, QP2010 Plus, com ionização por impacto

eletrônico de 70eV, utilizando-se coluna RTX-5 (30 m, 0,25 mm de diâmetro do filme; Shimadzu) usando Hélio como gás de arraste. Após a injeção de 1 µL de cada extrato (variedade SP791011, sadias, infestadas e induzidas), as análises foram efetuadas com modo de injeção *splitless* e uma programação da temperatura inicial do forno de 50 °C com uma velocidade de aquecimento de 9 °C/min até 240 °C, com injetor e detector DIC com temperatura de 200 °C e 250 °C, respectivamente. Os compostos foram identificados por comparação das similaridades (>85%) com as bases de dados Wiley 275 e McLafferty & Stauffer (1989), além da co-injeção de padrões de *n*-alcanos para o cálculo do índice de retenção (índice de Kovats).

4.8 Análises Químicas por Cromatografia Gasosa Bidimensional acoplada a Detector Time-of-Flight de Espectrometria de Massas (CGxCG-TOF-EM).

Amostras de 1 µL dos extratos de plantas de cana-de-açúcar (variedade SP791011) nos três estados (sadias, infestadas e induzidas) foram analisadas empregando o seguinte instrumento: LECO Pegasus 4D (LECO Corp., St. Joseph, MI, USA) equipado com um criomodulador *quad-jet* estacionário. Os compostos foram identificados a partir de seus espectros de massas utilizando as bases de dados Wiley 275 e McLafferty & Stauffer (1989) além da co-injeção de padrões de *n*-alcanos para cálculo do índice de retenção (índice de Kovats). As análises quantitativas foram efetuadas considerando as áreas sob os picos correspondentes aos compostos presentes nos cromatogramas, as quais foram expressas em função da concentração de cada componente na mistura.

4.9 Análises estatísticas

O delineamento foi inteiramente casualizado em um esquema fatorial 3^2 (*Fator 1*: Variedades; *Fator 2*: Estado da cana; *Níveis/Fator*: *Fator 1*: Variedades: SP791011, RB867515, RB92579; *Fator 2*: estados: Sadia, infestada e induzida), com n=10 repetições. A variável analisada foi à resposta de atração de fêmeas de *C. flavipes* para a fonte de odor e os dados foram analisados através dos pressupostos paramétricos de normalidade e homogeneidade dos erros das variâncias dos resíduos pelo teste de Levene ($p \leq 0.05$). Além disso, foi aplicado teste F ($P < 0.05$) para verificação de interações. Por terem sido interações significativas os fatores foram desdobrados para aplicação dos testes não-paramétricos de comparação entre tratamentos, a saber: *Kruskal-Wallis*, *Nemenyi* e *Mann-Whitney* ($p \leq 0.05$).

Todas as análises foram conduzidas com auxílio dos Softwares Assistat 7.7Beta® e Bioestat 5.0®.

5 RESULTADOS

5.1 Respostas olfativa de *C. flavipes* por diferentes variedades de cana-de-açúcar, infestadas por *D. flavipennella* e induzidas a resistência por *cis*-jasmona

Em todos os bioensaios, houve a atração de fêmeas de *C. flavipes* para os extratos obtidos a partir de plantas saudáveis, infestadas por *D. flavipennella* e induzidas a resistência por *cis*-jasmona. Na tabela 3 contêm os dados relativos aos valores médios obtidos para o número de *C. flavipes* atraídas em direção aos extratos das três variedades testadas como também aos estados das canas-de-açúcar. Estes resultados demonstram que não há preferência de *C. flavipes* entre as variedades, porém existe diferença significativa na atração por canas-de-açúcar induzidas e infestadas em detrimento às canas saudáveis ($p < 0.05$).

Tabela 3. Valores médios para o número de fêmeas de *C. flavipes* atraídas em relação aos extratos das três variedades e estados de canas utilizados

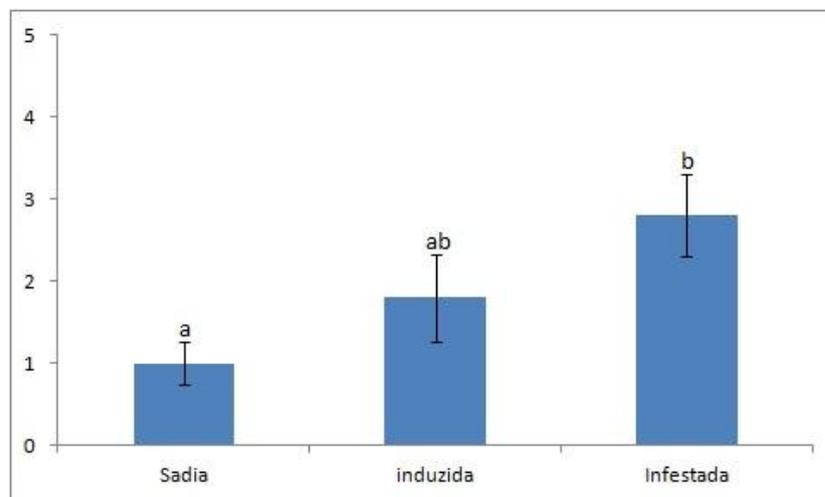
Tratamentos	Média±DP
Variedades (Fator 1)	
RB92579	2,03±1,81 bB
SP791011	1,87±1,41 bB
RB867515	2,07±1,44 bB
Controle	0,0±0,0 aA
Branco	0,0±0,0aAB
Estado da cana (Fator 2)	
Cana sadia	0,73±0,04 aA
Cana infestada	2,70±1,39 bB
Cana induzida	2,53±1,43 bB
Controle	0,0±0,0 aA
Branco	0,0±0,0aA

Letras minúsculas diferentes na coluna, para um mesmo fator, indicam existência de diferença significativa entre os tratamentos pelos testes de Kruskal-Wallis e Nemenyi ($p < 0,05$).

Letras maiúsculas diferentes na coluna, para um mesmo fator, indicam existência de diferença significativa para o controle e os demais pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$). Pediu para Rever **foi revisto**

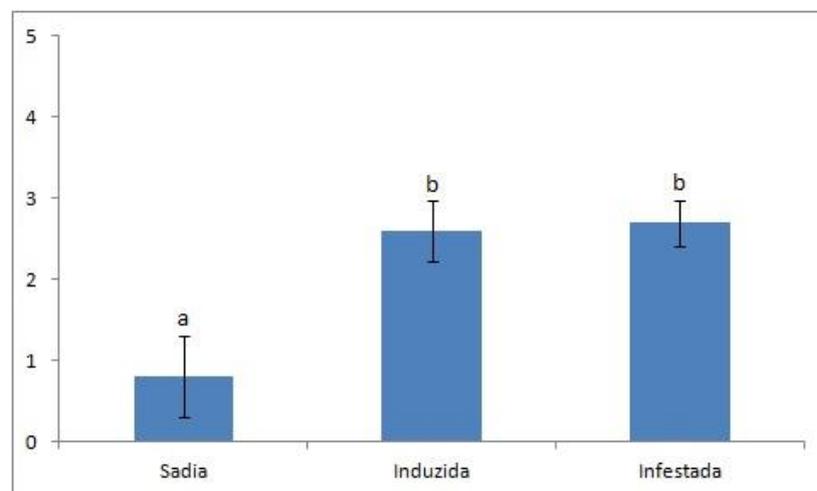
Uma vez que as interações foram significativas, o desdobramento dos fatores (figuras 13, 14 e 15) mostra a diferença significativa de resposta, dentro de uma mesma variedade, (fator 1) em relação aos estados da cana (fator 2) para o comportamento de busca de *C. flavipes*. O valor médio de fêmeas de *C. flavipes* que buscaram as plantas infestadas como também as plantas induzidas, não apresentou diferença entre si e foi significativamente maior do que o número desses parasitoides que buscaram as plantas saudias para as variedades RB92579 e RB867515 ($p < 0.05$).

Figura 13 - Atratividade de fêmeas de *C. flavipes* para os diferentes estados da cana-de-açúcar em relação à variedade SP791011*



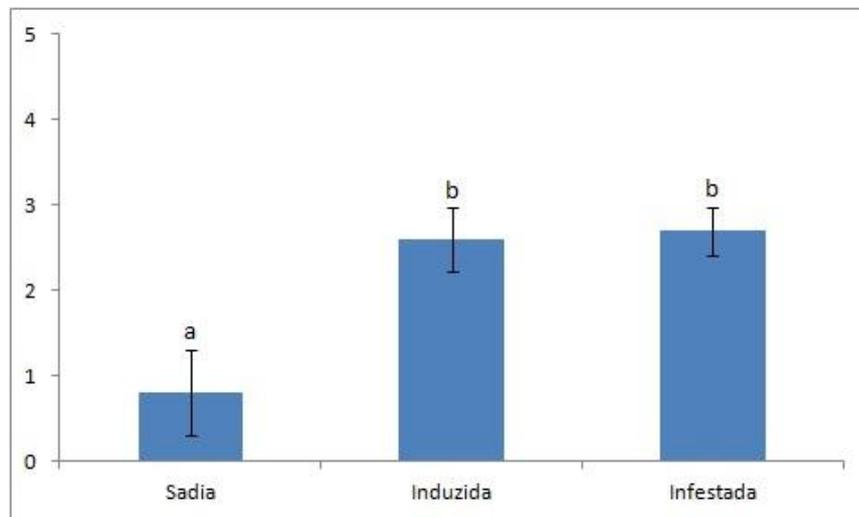
Letras minúsculas diferentes indicam significância pelos testes de Kruskal-Wallis e Nemenyi ($p < 0,05$).

Figura 14 – Atratividade de fêmeas de *C. flavipes* para os diferentes estados da cana-de-açúcar em relação à variedade RB 92579*



Letras minúsculas diferentes indicam significância pelos testes de Kruskal-Wallis e Nemenyi ($p < 0,05$).

Figura 15 – Atratividade de fêmeas de *C. flavipes* para os diferentes estados da cana-de-açúcar em relação à variedade RB867515*.



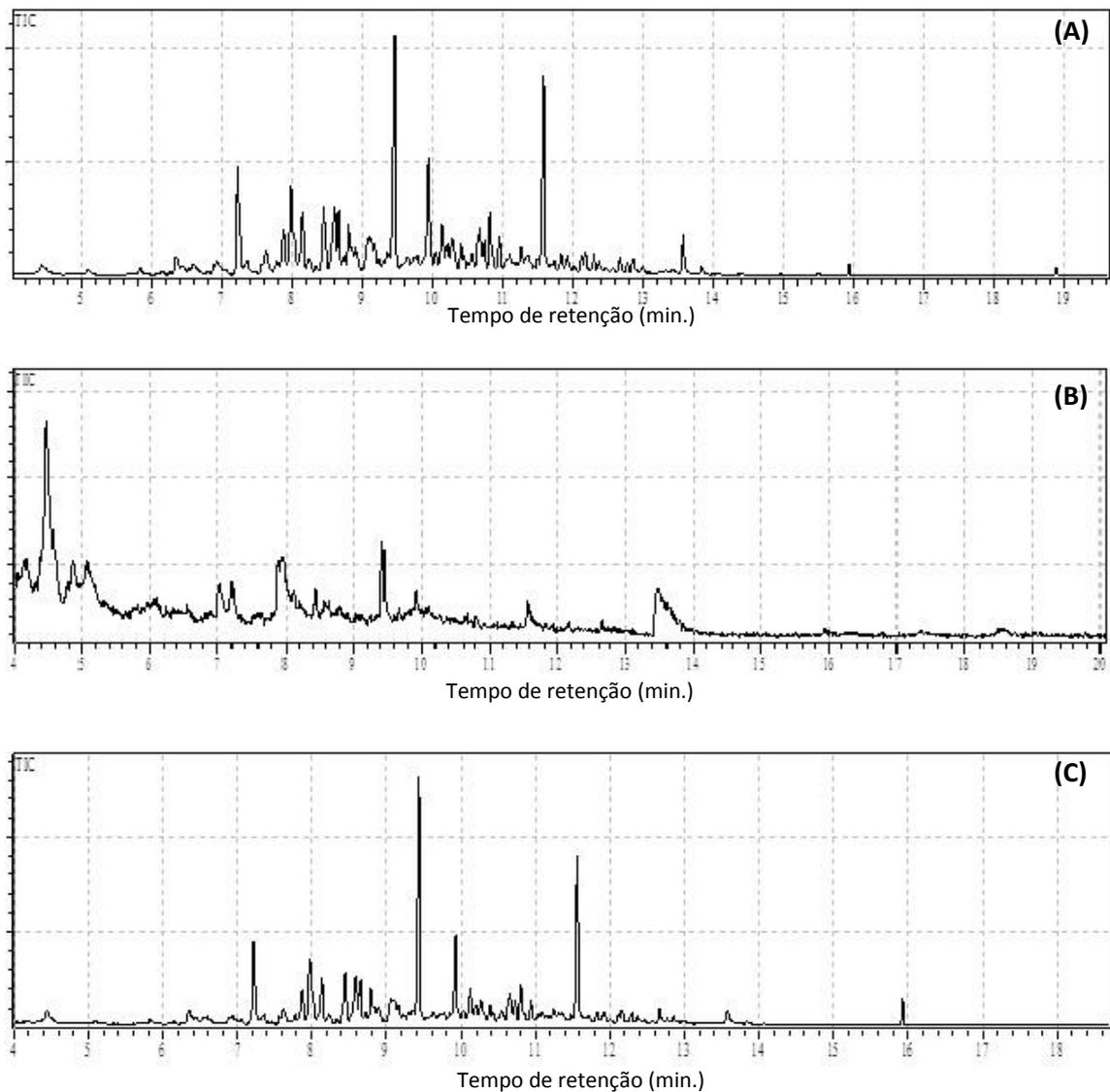
*Letras minúsculas diferentes indicam significância pelos testes de Kruskal-Wallis e Nemenyi ($p < 0,05$).

5.2 Análises químicas dos extratos de plantas de cana-de-açúcar sadia, infestadas e induzidas por *cis*-jasmona

A figura 16 contém os cromatogramas para os extratos obtidos por aeração dos três estados das plantas de cana-de-açúcar para a variedade SP791011. A escolha desta variedade se baseou nos resultados obtidos dos testes de olfatométrica, os quais demonstraram que fêmeas de *C. flavipes* não discriminam entre diferentes variedades de cana-de-açúcar, além de esta ser considerada àquela mais susceptível à praga.

O perfil dos compostos voláteis encontrados nas análises por CG-EM mostraram algumas diferenças qualitativas e quantitativas. Além disso, foram encontrados compostos pertencentes a diferentes classes químicas, incluindo alcoóis e aldeídos, mono, homo e sesquiterpenos, porém, os mesmos foram elucidados posteriormente na análise por CGxCG-TOF-EM.

Figura 16 – Cromatogramas representativos dos extratos de plantas de cana-de-açúcar da variedade SP791011



Descrição: (A) plantas saudáveis, (B) plantas infestadas e (C) plantas induzidas.

O perfil por CGxCG-TOF-EM dos compostos voláteis encontrados nos extratos obtidos por aeração de plantas de cana-de-açúcar saudáveis, infestadas por *D. flavipennella* e induzidas a resistência por *cis*-jasmona está demonstrado na figura 17. Um total 28 picos foram identificados os quais foram comuns aos três (3) tipos de extratos.

Apesar disto, foram encontradas diferenças quantitativas particulares nas concentrações relativas de cada composto (Tabela 4). Os monoterpenos α -pineno, α -mirceno,

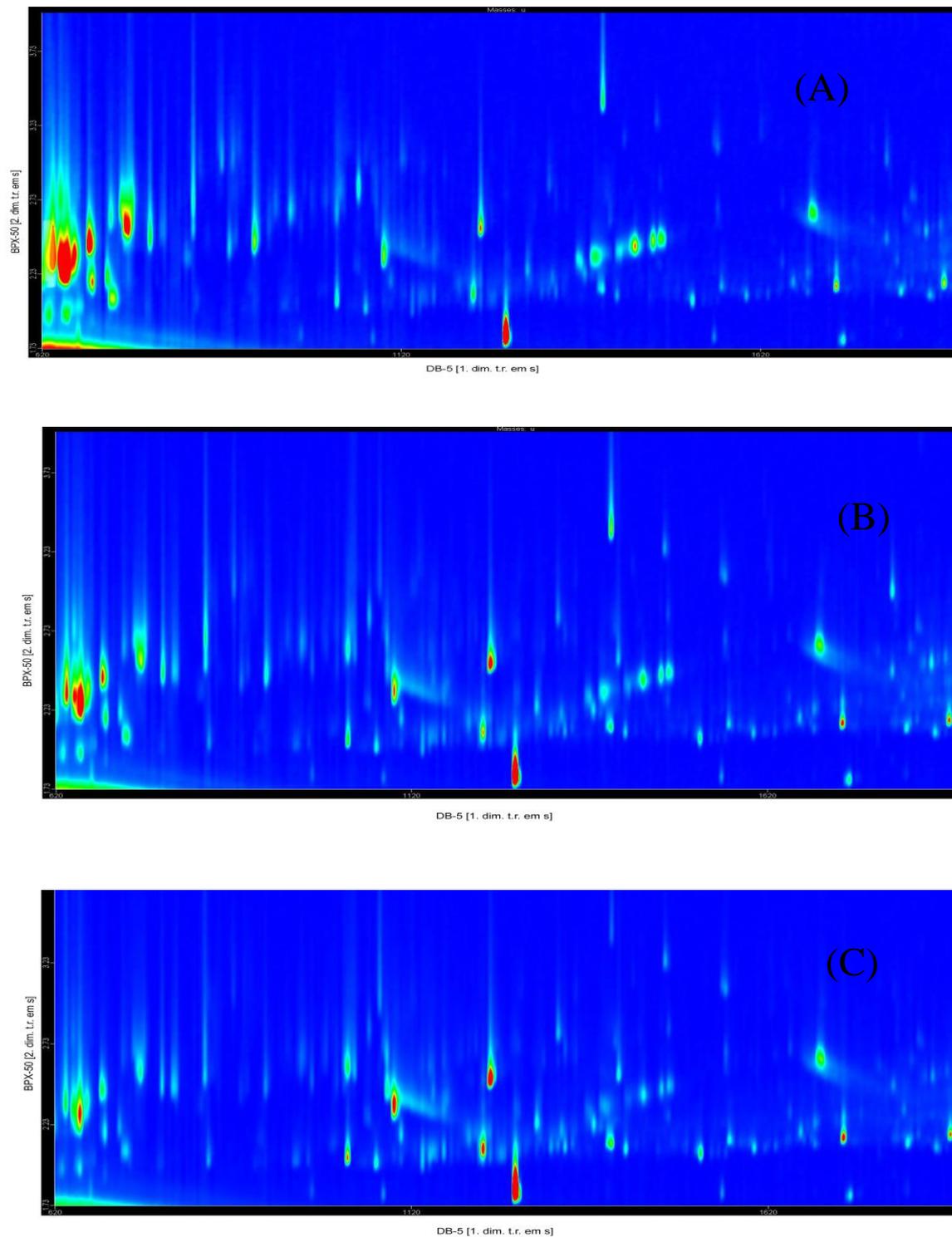
δ -3-careno e linalol, além do nonanal, α -terpineol, decanal e os sesquiterpenos (*E*)-cariofileno e um não identificado foram detectados em maior concentração nas plantas infestadas e induzidas do que nas plantas saudas. Compostos com 6 átomos de carbono também foram detectados nos três extratos, a saber: 3-hexanona, 2-hexanona, (*Z*)-3-hexenal, (*E*)-2-hexenal, 3-hexen-1-ol, (*E*)-3-hexen-1-ol. É importante ressaltar que o limoneno, detectado em maiores quantidades nos três extratos, foi encontrado em maior concentração em plantas infestadas e induzidas, além do sesquiterpeno (*E,E*)- α -farneseno.

Tabela 4: Compostos identificados em extratos de plantas de cana-de-açúcar

No.	Composto	TR [1 ^a D,2 ^a D]	IR	IR ref.	Sadia	Infestada	Induzida
1	3-hexanona	630 , 2.320	790	795	++++	+++++	+++++
2	2-hexanona	635 , 2.350	793	788	+++++	+++	+++
3	1-metil-ciclopentanol	645 , 2.330	798	798	+++	+++	++
4	(<i>E</i>)-2-Hexenal	685 , 2.470	820	838	+++	++	+++
5	(<i>E</i>)-3-Hexen-1-ol	735 , 2.450	847	846	++	++	+++
6	2,4-Hexadien-1-ol	740 , 2.580	850	831	+++	++	++
7	não-identificado	825 , 2.340	895	-	+	+	++
8	α -Pirino	910 , 2.160	940	939	+	+	++
9	β - Pirino	1000 , 2.270	988	983	+	+	+
10	α - Mirceno	1010 , 2.330	993	991	+	+	++
11	δ -3-Careno	1055 , 2.280	1016	1014	+	++	++
12	Limoneno	1095 , 2.340	1037	1035	+++	++++	++++
13	(<i>E</i>)- β -Ocimeno	1150 , 2.460	1065	1060	+	+	+
14	Terpinoleno	1205 , 2.530	1093	1090	+	+	+
15	Linalol	1220 , 2.520	1101	1100	+	++	++
16	Nonanal	1230 , 2.520	1107	1106	+	+++	+++
17	Não-identificado	1335 , 2.710	1167	-	Tr	+	+
18	α - Terpino	1405 , 2.750	1207	1203	+	+	++
19	Decanal	1410 , 2.560	1210	1209	+	+++	++
20	Verbenona	1430 , 3.150	1222	1218	+	+	+
21	Acetato de Linalol	1480 , 2.490	1251	1257	+	+	++
22	Bornil acetato	1560 , 2.680	1298	1291	+	+	+
23	Acetate de α - Terpinila	1650 , 2.710	1354	1354	+	+	+
24	(<i>E</i>)-Cariofileno	1775 , 2.600	1436	1438	+	++	++
25	Geraniol acetato	1800 , 2.790	1453	1458	+	+	+
26	Sesquiterpeno não- identif.	1850 , 2.520	1487	-	+	++	++
27	(<i>E,E</i>)- α -Farneseno	1870 , 2.560	1502	1503	+	Tr	+

IR – índice de retenção experimental, IR ref. – Índice de retenção referencial (Vaničková et al. 2012 and www.pherobase.com), Tr – quantidade traço (<0.04); + < 0; ++ ≤ 1 and ≥ 4 ; +++ ≤ 5 and ≥ 10 ; ++++ ≤ 11 and ≥ 30 ; +++++ > 31 (%)?

Figura 17: Cromatogramas representativos dos compostos identificados por CGxCG-TOF-EM em extratos de plantas de cana-de-açúcar.



Descrição: (A) Plantas sadias, (B) Plantas infestadas por *D. flavipennela* e (C) plantas induzidas a resistência por *cis*-jasmona

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que fêmeas de *C. flavipes* não discriminam entre extratos contendo os compostos voláteis presentes em plantas de cana-de-açúcar pertencentes a diferentes variedades estando saudáveis, infestadas por *D. flavipennella* ou induzidas à resistência por *cis*-jasmona.

Segundo Hare (2002), uma relação puramente aditiva entre a resistência e o controle biológico existe quando a redução na densidade populacional da praga causada pelo inimigo natural é independente daquela causada pela resistência da planta hospedeira. Além disso, a densidade esperada da praga devido à resistência da planta hospedeira e a ação do inimigo natural podem ser vistos simplesmente a partir do efeito combinado de ambos atuando de forma independente. Deste modo, uma relação aditiva impede qualquer interação estatística significativa.

Este mesmo autor definiu que um modelo antagonístico especifica que a redução da densidade da praga devido à resistência da planta e ao inimigo natural é menor do que poderia ser calculado se as interações forem aditivas. Isso é justificado pelo fato de um fator se sobrepor a outro, por exemplo, a resistência da planta hospedeira substituir a mortalidade uma vez causada pelo inimigo natural. Um modelo sinérgico, a redução da população da praga causada pelo inimigo natural é relativamente maior a altos níveis de resistência da planta, sendo uma interação obviamente compatível em estratégias de Manejo Integrado de Pragas.

Alguns parasitoides exibem preferência inata por odores emitidos a partir de determinadas variedades de plantas. Por exemplo, odores emitidos por diferentes variedades de algodão atraíram o parasitoide *Campoletis sonorensis* (Cameron) (Hymenoptera: Ichneumonidae) de diversas maneiras (ELZEN; WILLIAMS; VISON, 1986). Este mesmo parasitoide também foi afetado por diferentes cultivares de milho infestado por *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: noctuidae) (ISENHOOR; WISEMAN; LAYTON, 1989). Apesar disto, alguns estudos demonstraram que muitas das relações são aditivas, como é o caso de *C. flavipes* (MESQUITA et al., 2011), *Cotesia marginiventris* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae) (MCCUTHEON; TURNIPSED, 1981, FARRAR et al., 1994) e *Cardiochiles nigriceps* (Viereck) (Hymenoptera: Braconidae) (FARRAR; BARBOUR; KENNEDY, 1994).

Estudos desenvolvidos por Setamou et al. (2002), compararam a localização e o parasitismo em *D. saccharalis* por *C. flavipes* para plantas de cana-de-açúcar convencionais

e transgênicas sob condições de escolha. Nos experimentos com olfatômetro, fêmeas de *C. flavipes* visitaram todas as fontes de odor disponíveis, porém, desprenderam tempo significativamente maior em zonas de odor correspondente a plantas danificadas por *D. saccharalis*, em relação ao controle (branco). Apesar disso, eles gastaram tempo similar na zona de odor correspondente a plantas de cana-de-açúcar transgênica e convencional. Os resultados deste estudo sugeriram que plantas de cana-de-açúcar transgênicas não afetam significativamente a localização do hospedeiro e o parasitismo em *D. saccharalis* por *C. flavipes*. Estes dados corroboram com os apresentados nesse estudo quando se compara a variedade susceptível (SP791011) as resistentes (RB92579 e RB867515).

Plantas produzem COVs em resposta ao ataque por herbívoros e esses COVs são utilizados por parasitoides do herbívoro como sinal de localização do hospedeiro (GIRLING *et al.*, 2011). No presente estudo, foi evidenciado que a atração de *C. flavipes* para as canas-de-açúcar infestadas e induzidas a resistência por *cis*-jasmona é maior do que para plantas saudáveis. Diversos trabalhos já demonstraram claramente que as plantas são capazes de produzir compostos voláteis direcionados a diversos organismos de forma a otimizar seu mecanismo de defesa (TURLINGS *et al.*, 1998, DE MORAES; MESCHER; TUMLINSON, 2001, ARIMURA *et al.*, 2008) e isto inclui os parasitoides.

Em um habitat, a qualidade da planta hospedeira bem como a densidade do inseto herbívoro é altamente variável. Parasitoides desenvolveram mecanismos que lhes permitem lidar com estas condições, guiados pelo seu sistema olfativo e baseados nos compostos voláteis emitidos pelas plantas atacadas (VET; DICKE, 1992). Estudos têm mostrado que *C. flavipes* é atraída para plantas de milho, sorgo e uma variedade de gramíneas selvagens infestadas por diversas brocas, incluindo, *Chilo partellus* (Swinhoe) (Lepidoptera: Crambidae), *Chilo orichalcociliellus* (Strand) (Lepidoptera: Crambidae), *Sesamia calamistis* (Hampson) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Busseola fusca* (Fuller) (Lepidoptera: Noctuidae) (NGI-SONG *et al.*, 1996).

Girling *et al.* (2011), investigou a resposta comportamental de *Cotesia vestalis* (Haliday) (Hymenoptera: Braconidae) para COVs, a partir do complexo planta herbívoro, consistindo de plantas de repolho *Brassica oleracea* L. (Família: Brassicaceae) e da lagarta hospedeira do parasitoide, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: peutelledae). Um olfatômetro tipo Y foi utilizado para comparar a resposta dos parasitoides aos COVs produzidos como resultado de diferentes níveis de ataque pela lagarta e níveis equivalentes de danos mecânicos.

Estes autores demonstraram que fêmeas de *C. vestalis* foram capazes de explorar diferenças qualitativas e quantitativas na emissão de compostos voláteis a partir do complexo planta herbívoro em detrimento a plantas sem infestação. Utilizando olfatômetro de seis braços, Turlings; Davison; Tamo (2004), observaram que fêmeas de *C. marginiventris* são atraídas para plantas de milho infestadas por *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae), ressaltando que este parasitoide também consegue discriminar de maneira eficiente diferentes odores, inclusive com variação entre concentrações.

O mecanismo de liberação destes compostos atraentes para os parasitoides, pelas plantas, se dá através da produção de compostos intermediários cuja síntese depende de elicitores presentes na saliva do herbívoro (TURLINGS et al., 2000). Na ausência do elicitador, as mesmas podem ser induzidas a produção destes compostos por substâncias como a *cis-jasmona* (PICKET et al., 2007). Os dados deste estudo reforçam esta hipótese, demonstrando que as plantas podem ser induzidas a resistência independente da presença do inseto herbívoro, sendo atrativa para fêmeas de *C. flavipes* sem diferença significativa para plantas infestadas.

Em experimentos sob túnel de vento, plantas de feijão tratadas com *cis-jasmona* foram altamente atrativas para o parasitoide do afídeo *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae) (BIRKETT et al., 2000). Da mesma forma esta indução também foi atrativa para o afídeo *Sitobion avenae* (Fabricius) (Hemiptera: Aphididae) (BRUCE et al., 2003). Em ambos os casos foi evidenciada a indução de resistência nas plantas testadas, representadas pela atração do parasitoide.

As diferenças qualitativas e quantitativas encontradas nos extratos de plantas de cana-de-açúcar sadias, infestadas e induzidas por *cis-jasmona* demonstradas nas análises químicas do presente estudo evidenciam que o perfil de compostos voláteis emitidos por estas plantas são diferentes, fato este que pode elucidar a diferença no comportamento de busca exibido pelo parasitoide *C. flavipes*, ressaltando a importância destes sinais químicos na localização do seu hospedeiro. Smith et al. (2006), também identificaram a emissão de diferentes compostos voláteis em plantas de cana-de-açúcar infestadas por *Eldana saccharina* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae) em relação a plantas sadias, porém os mesmos também não foram totalmente elucidados.

Plantas saudáveis mantêm o nível base de compostos voláteis que são liberados a partir das folhas e/ou acumulados em locais específicos da mesma. Estas reservas químicas constitutivas incluem frequentemente compostos de cadeia curta, denominados voláteis de folhas verdes ou *Green leaf volatiles (GLVs)* que consistem de uma mistura de alcoóis, aldeídos e ésteres contendo seis átomos de carbonos que são produzidos pela oxidação de lipídios de membrana e liberados quando as folhas sofrem algum tipo de injúria (PARÉ; TUMLINSOM, 1999). Estes compostos, tais como (*Z*)-3-hexenal, (*E*)-3-hexenal e (*Z*)-3-hexen-1-ol, estão presentes constantemente na planta e também podem ser liberados imediatamente em resposta a danos mecânicos ou sob ação da herbivoria (TURLINGS et al., 1990).

Neste estudo foram identificados vários compostos contendo seis átomos de carbono (cetonas, aldeídos e alcoóis) e àqueles acima citados foram encontrados em grandes concentrações para todos os extratos de plantas de cana-de-açúcar (saudáveis, infestadas e induzidas). Estes compostos que vem sendo descritos como GLVs para diversas plantas tais como algodão, repolho, milho e tabaco (MITHÖFER; BOLAND, 2012). Além disso, têm sido atrativos para diversos parasitoides, incluindo *C. vestalis* (KUGIMIYA et al., 2010) que ataca lagartas de *P. xylostella*, e *C. marginiventris* parasitoide de *Heliothis* spp. e *Spodoptera* spp (NGUMBI; CHEN; FADAMIRO, 2009; D'ALESSANDRO et al., 2009). Nesse sentido, para este estudo, fêmeas de *C. flavipes* também foram atraídas para extratos de plantas que emitem estes GLVs.

Por sua vez, as plantas respondem ao dano causado pela alimentação do herbívoro liberando uma variedade de compostos (defesa induzida), a partir do local danificado e, o perfil dos compostos voláteis emitidos, é notadamente diferente daqueles de plantas não danificadas ou danificadas mecanicamente. Alguns destes compostos são comuns para muitas espécies de plantas diferentes, enquanto outros são produtos do metabolismo secundário específico de uma espécie particular de planta (GATEHOUSE, 2002). Tais compostos são denominados voláteis de plantas herbívoro-induzidos ou *herbivore-induced plant volatiles (HIPVs)* e estes incluem alguns acetatos como o acetato de (*Z*)-3-hexenila e vários terpenoides tais como (*E*)- β -farneseno, (*E*)- β -ocimeno, limoneno, linalol e (*E, E*)- α -farneseno (DICKE; BADWIN, 2010).

A atração para estes HIPVs tem sido descrita para várias espécies de parasitoides e apesar de serem atraídos para GLVs, sua intensidade é maior para os primeiros (HEIL, 2008).

Fêmeas de *C. vestalis* são capazes de explorar diferenças quantitativas e qualitativas na emissão de voláteis emitidos a partir do complexo planta-hospedeiro demonstrando preferência por plantas infestadas apesar de não distinguir os níveis de infestação (densidade e idade do hospedeiro) (GIRLING et al., 2011). Recentemente, uma mistura destes HIPVs foi testada através da impregnação em liberadores seguida da distribuição em áreas de cultivo de nabo *Brassica rapa* L. (Família: Brassicaceae) sem infestação e fêmeas deste parasitoide foram atraídas significativamente a partir de distâncias de até 3 metros (UEFUNE et al., 2012). De maneira similar, Mérey et al., (2012) exploraram a liberação destes compostos em áreas de cultivo de milho e obtiveram maior atração e parasitismo por *C. marginiventris* do que em áreas não-tratadas. Ngunbi; Chen; Fadamiro, (2009) realizaram testes eletrofisiológicos por CG-EAD para fêmeas desta espécie e verificaram diferenças significativas de resposta, com maior intensidade para terpenoides como o linalol. No presente estudo, fêmeas de *C. flavipes* foram atraídas significativamente para extratos de plantas infestadas e induzidas. O perfil químico encontrado nestes extratos reforça o fato de que os HIPVs são possivelmente os responsáveis por esta atração, porém testes com soluções sintéticas destes compostos precisam ser desenvolvidos para elucidar esta informação.

O perfil químico encontrado para os extratos de plantas induzidas a resistência por *cis*-jasmona demonstra similaridades com extratos de plantas infestadas por *D. flavipennela*. Sabe-se que compostos químicos sintéticos podem ser usados para induzir a defesa quando aplicados artificialmente em plantas e, tais indutores levam a produção de compostos voláteis que são emitidos em grandes quantidades ativando a proteção contra insetos fitófagos, atraindo seus predadores (BIRKETT et al., 2000). Delaney et al. (2013), investigou plantas de trigo *Triticum aestivum* L. (Família: Poaceae) tratadas com diferentes doses de *cis*-jasmona e identificaram oito compostos que incluem GLVs e HIPVs: (*Z*)-hexenal, (*Z*)-3-hexenol, acetato de (*Z*)-3-hexenila, (*Z*)- β -ocimeno, linalol, β -cariofileno, (*E*)- β -farneseno e indol. Tais compostos também foram identificados neste estudo e tal como para plantas infestadas, podem ser os responsáveis pela maior atração de *C. flavipes*.

O estabelecimento da *cis*-jasmona como potencial ferramenta na ativação de defesa de plantas com potencial para o controle de insetos praga vem sendo estimulado por diversos pesquisadores. Na prática, sugere-se inclusive que podem ser desenvolvidas variedades de plantas, explorando a expressão de genes que estimulem a produção deste composto,

simulando o ataque pelo herbívoro e atraindo os parasitoides (PICKETT et al., 2007). Deste modo, a utilização de compostos voláteis emitidos por plantas sob ação da herbivoria pode auxiliar na redução da população de pragas como *D. flavipennella* para níveis abaixo do dano econômico. Isto pode possibilitar o aumento de parasitoides atraídos, bem como seu tempo de retenção na área. O diferencial do uso de semioquímicos está no fato do mesmo atuar em quantidades extremamente pequenas (picogramas) podendo permanecer no campo por vários meses (BENTO, 2001). O princípio é 100% ecológico, pois são substâncias produzidas e utilizadas pelo próprio inseto ou plantas e dessa forma agem especificamente sem interferir em organismo não alvo (VILELA; DELLA LUCIA, 2001). O uso desta técnica evita a contaminação ambiental e gera benefícios para o agricultor uma vez que não é tóxica (VILELA; MAFRA-NETO, 2001). Além disso, por se tratar de uma praga que atinge cana-de-açúcar, milho, dentre outras gramíneas, países com problemas especificamente relacionados à *Diatraea* spp. podem também fazer uso destes compostos ou do mecanismo de indução a resistência para atração de inimigos naturais.

7 CONCLUSÕES

- Fêmeas de *C. flavipes* são atraídas por compostos voláteis presentes em extratos de plantas de cana-de-açúcar pertencentes a diferentes variedades estando sadias, infestadas por *D. flavipennella* ou induzidas à resistência por *cis*-jasmona;
- Fêmeas de *C. flavipes* são mais atraídas para plantas cana-de-açúcar infestadas e induzidas a resistência por *cis*-jasmona do que sadias;
- Na ausência da praga, plantas de cana-de-açúcar podem ser induzidas a produção de compostos orgânicos voláteis por substâncias como a *cis*-jasmona, na atração do parasitoide *C. flavipes*;
- Planta de cana-de-açúcar diferem em seu perfil químico em relação a extratos de plantas sadias, infestadas por *D. flavipennella* e induzidas a resistência por *cis*-jasmona, com maior concentração de terpenoides para estes últimos.

8 PERSPECTIVAS

- Obtenção de soluções dos compostos sintéticos identificados nos extratos de plantas infestadas por *D. flavipenella* e induzidas a resistência por *cis*-jasmona;
- Realizar análises por Cromatografia Gasosa acoplada a Eletroantenografia (CG-EAG) para fins de identificação dos compostos antenalmente ativos em *C. flavipes*;
- Realizar testes comportamentais com fêmeas de *C. flavipes*, sob condições de laboratório, envolvendo as soluções dos compostos sintéticos ativos por CG-EAG;
- Realizar testes de campo envolvendo as soluções biologicamente ativas dos compostos na atração de fêmeas de *C. flavipes* e, conseqüentemente, no aumento da eficiência do controle biológico de *D. flavipenella*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, A.A. et al. An ecological cost of plant defence: attractiveness of bitter cucumber plants to natural enemies of herbivores. **Ecol Lett.**, v.5, n.8, p. 377-385, 2002.
- ALBORN, H.T. et al. An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. **Science**. v. 276, p. 945-949, 1997.
- ARAÚJO, J.R., et al.. Nova dieta artificial para criação da *Diatraea saccharalis* (Fabr.).**Saccharum APC**, n. 36, p. 45-48, 1985.
- ARENCIBIA, A.R.I., et al. Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack **Molecular Breeding**. v. 3, p. 247-255, 1997.
- ARIMURA, G.; KÖPKE, S.; KUNERT, M.; VOLPE, V.; DAVID, A.; BRAND, P.; DABROWSKA, P.; MAFFEI, M. E.; BOLAND, W. Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves: IV. Diurnal and nocturnal damage differentially initiate plant volatile emission. **Plant physiology**, v. 146, p. 965-973, 2008.
- BAKER, P.S., et al. Overview of biological-control of Lepidoptera in the Caribbean. **Florida Entomol.** v. 75, p. 477-483, 1992.
- BALDWIN, I.T., et al. Merging molecular and ecological approaches in plant-insect interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 351-358, 2001.
- BENNET, F.D. A comparison of the reproductive strategies and certain other biological characteristics of *Apanteles* spp. and the tachinid parasites of *Diatraea saccharalis* (Fabr.). **Proc. Int. Soc. Sugarcane Technol.** v. 1, p. 523-527, 1977.
- BENTO, J.M. Fundamentos do monitoramento, da coleta massal e do confundimento de insetos-praga. In: VILELA, E.F.; DELLA LUCIA, T.M.C. (eds). **Feromônios de Insetos**. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos. p. 135-144, 2001.
- BIRKETT, M.A., et al. New roles for cis-jasmone as an insect semiochemical and in plant defense. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 9329- 9334, 2000.

BOTELHO, P.S.M.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*, p. 409-421. *In*: PARRA, J.R.P., BOTELHO, P.S.M., CORRÊA-FERREIRA, B.S. & BENTO, J.M. (Eds). Controle biológico no Brasil. São Paulo: Manole, 635p. 2002.

BRUCE, T.J.A., et al. *Cis*-Jasmone treatment induces resistance in wheat plants against the grain aphid, *Sitobion avenae* (Fabricius) (Homoptera: Aphididae). **Pest Manage. Sci.** v. 59, p. 1031–1036, 2003.

CARLIN, S.D. **Impacto do tombamento na produtividade de diferentes cultivares de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Campinas, SP: IAC (Instituto Agrônomo de Campinas), 2005.

CHARPENTIER, J.J., et al. Injury and losses caused by sugar cane borer in Louisiana. **Proc. ISSCT**, v.12, p. 1383-7, 1967.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **3º levantamento**: Dezembro, 2012.

COPERSUCAR, Entomology Biological Control of the borer, p. 27-28. *In* **Copersucar, Annual Report 1991/1992**. Piracicaba, Centro de Tecnologia Copersucar – CTC, 1v. 1992.

CORTESERO, A.M.; LEWIS, W.J. Understanding and manipulating plant attributes to enhance. **Biol Contr.** v.17, p. 35-49, 2000.

D’ALESSANDRO, M., et al. Strong attraction of the parasitoid *Cotesia marginiventris* towards minor volatile compound of maize. **J. Chem. Ecol.**, v. 35, p. 999-1008, 2009.

DE MORAES, C.M., et al. Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. **Nature**. v. 393, n. 112, p. 570-573, 1998.

DE MORAES, C.M.; MESCHER, M. C.; TUMLINSON, J.H. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. **Nature**, v. 410, p. 577-580, 2001.

DELANEY, K.J., et al. Synthetic *cis*-jasmona exposure induces wheat and barley volatiles that repel the pest cereal leaf beetle, *Oulema melanopus* L. **J. Chem. Ecol.**, v. 39, p. 620-629, 2013.

DICKE, M., et al. Plant Strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals: Prospects for application in pest control. **Journal of Chemical Ecology**, v. 16, p. 3091-3118, 1990.

DICKE, M., et al. Jasmonic acid and herbivory differentially induced carnivore-attracting plant volatiles in lima bean plants. **J. Chem. Ecol.**, v. 25, n.8, p. 1907-1922, 1999.

DICKE, M.; BALDWIN, T. The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the “cry for help”. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 3, p. 157-175, 2010.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; FRACASSO, J.V.; PERECIN, D. Variabilidade espacial de populações de *Diatraea saccharalis* em canaviais e sugestão de método de amostragem. *Bragantia*. v. 70, n. 3, pp. 577-585, 2011.

DIMANDJA, J.M.D. Comprehensive 2-D GC provides high-performance separations in terms of selectivity, sensitivity, speed, and structure. **Anal. Chem.**, v. 76, p. 167-174, 2004.

DO NASCIMENTO, R.R.; MORGAN, E.D.; KEEGANS, S.J.; BILLEN, J. Comparative study of mandibular gland secretions of workers of ponerine ants. **Journal of Chemical Ecology**. v. 25, n.6, p. 1395-1409, 1999.

DO NASCIMENTO, R.R.; SANT'ANA, A.E.G. Em: **Feromônios de insetos: Biologia, Química e Emprego no Manejo de Pragas**; VILELA, E. F.; DELLA LÚCIA, T.M.C. 2. ed., Ribeirão Preto: Holos Editora, p. 65-71.2001.

EIRAS, A.E.; MAFRA NETO, A. Olfatometria aplicada ao estudo do comportamento de insetos. p. 27-40. In E.F. VILELA & T.M.C. DELLA LUCIA (eds.), **Feromônios de insetos**, 2.ed.,Ribeirão Preto: Holos, 2001, 206p.

ELZEN, G.W.; WILLIAMS, H.J.; VINSON, S.B. Response by the parasitoid *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae) to chemicals (Synomones) in plants: Implications for host habitat location. **Environ. Entomol.** v. 12, p. 1873-1877, 1983.

ELZEN, G.W.; WILLIAMS, H.J.; VINSON, S.B. Wind tunnel flight responses by hymenopterous parasitoid, *Campoletis sonorensis* to cotton cultivars and lines. **Entomol. Exp. Appl.** v. 42, p. 285-289, 1986.

FARMER, E.E.; RYAN, C.A. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plants leaves. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.87, p. 7713-7716, 1990.

FARRAR, R.R.; BARBOUR, J.D.; KENNEDY, G. Field evaluation of insect resistance in a wild tomato and its effects on insect parasitoids. **Entomol. Exp. Appl.** v. 71, p. 211-226, 1994.

FERRARA, F.A.; VILELA, E.F.; JHAM, G.N.; EIRAS, A.E.; PICANÇO, M.C.; ATTYGALLE, A.B.; SVATOS, A. FRIGHETTO, R.T.; MEINWALD, J. Evaluation of the Synthetic Major Component of the Sex Pheromone of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Journal of Chemical Ecology**, USA, v. 27, p. 907-913, 2001.

FREITAS, M.R.T. **Interações intra e interespecíficas do parasitóide *Cotesia flavipes* Cameron, 1981 (Hymenoptera: Braconidae) com os hospedeiros *Diatraea* spp. (Lepidoptera: Crambidae): Combinação para o estudo do controle biológico da broca pequena da cana-de-açúcar.** Tese de doutorado, Maceió-AL: UFAL, 2005.

FREITAS, M.R.T. et al. The biology of *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae) reared under laboratory conditions. **Florida Entomol.** v. 90, p. 309-313, 2007.

GALLO, D., et al. **Entomologia agrícola.** Piracicaba, FEALQ, 920p. 2002.

GATEHOUSE, J.A. Plant resistance towards insect herbivores: A dynamic interaction. **New Phytologist**, v.156, p. 145-169, 2002.

GIRLING, R.D., et al. Parasitoids select plants more heavily infested with their caterpillar hosts: a new approach to aid interpretation of plant head space volatiles. **Proceedings of the Royal Society B.** Published on line, January. p. 1-8, 2011.

GITHAY, P.M., et al. Perspectivas Biotecnológicas de *Bacillus thuringiensis* no controle biológico da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis*. **Documentos 214**, EMBRAPA, Seropédica-RJ. 2006.

GODFRAY, H.C.J. **Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology.** Princeton, Princeton University Press, 1994, 437p.

GOES, T.; MARRA, R. **A expansão da cana-de-açúcar e sua sustentabilidade.** Disponível em <<http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2008>>. Acesso em 09 de setembro de 2008.

GONÇALVES, G.B. **Influência dos constituintes voláteis dos hospedeiros *Averrhoa carambola* L. e *Mangifera indica* L. na composição química das substâncias liberadas por machos de *Anastrepha obliqua* e *Ceratitis capitata* (Díptera: Tephritidae).** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Alagoas, Brasil. 2001. Número de folhas

GONÇALVES, G.B. **Extração e Identificação de Constituintes Voláteis das Secreções de Glândulas Salivares de Machos de *Anastrepha obliqua* e *Ceratitis capitata* (DIPTERA: TEPHRITIDAE) e do seu Hospedeiro.** Tese de doutorado. Universidade Federal de Alagoas, Brasil. 2005.

GUAGLIUMI, P. **Pragas da Cana-de-açúcar (Nordeste do Brasil).** Instituto do Açúcar e do Alcool, Rio de Janeiro, 622p.1972/73.

HALITSCHKE, R., et al. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. III. Fatty acid–amino acid conjugates in herbivore oral secretions are necessary and sufficient for herbivore-specific plant responses. **Plant Physiology**, v.125, p. 711–717, 2001.

HARE, J.D. **Plant genetic variation in tritrophic interactions.** In *Multitrophic Level Interactions*, eds. T. Tscharntke & B. A. Hawkins, pp. 8–43. Cambridge: Cambridge University Press, 2002.

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

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

HOWSE, P.E.; JONES, O.T.; STEVENS, I.D.R. **Insect pheromones and their use in pest management.** London: Chapman e Hall.p. 345, 1998.

ISENHOUR, D.J.; WISEMAN, B.R.; LAYTON, R.C. Enhanced predation by *Orius insidiosus* (Hymenoptera: Anthocoridae) on larvae of *Heliothis zea* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) caused by prey feeding on resistant corn genotypes. **Environmental Entomology**, College Park, v.18, n.3, p.418-422, 1989.

JONES, G.R.E.; OLDHAM, N.J. Pheromone Analysis Using Capillary Gas Chromatographic Techniques. **Journal of chromatography A**, v. 843, p. 200-236, 1999.

KALINOVÁ, B., et al. GC x GC-TOF-MS technique – A new tool in identification of insect pheromones: Analysis of the persimmon bark borer sex pheromone gland. **Talanta.**, v. 69, p. 542-547, 2006.

KARBAN, R.; BALDWIN, I.T. Evidence for chewing insect-specific molecular events distinct from a general wound response in leaves. **Pl. Phys.**, v.115, n.4, p.1299-1305, 1997.

KOCH T.; BANDEMER K.; BOLAND W. "Biosynthesis of *cis*-Jasmone: a pathway for the inactivation and the disposal of the plant stress hormone jasmonic acid to the gas phase". **Helvetica Chimica Acta**, v. 80, n. 3, p. 838–850, 1997.

KUGIMIYA, S., et al. Presentor past Herbivory: A Screening of volatiles released from *Brassica rapa* under Caterpillar attacks as attractants for the solitary parasitoid, *Cotesia vestalis*. **Jorn. Chem. Ecol**, v. 36, p. 620-628, 2010.

LANÇAS, M. F. **Cromatografia em Fase Gasosa**. São Carlos, SP. Acta. 1993, 235p.

LANGE, C.L., et al. Sugarcane moth borers (Lepidoptera: Noctuidae and Pyraloidea): phylogenetics constructed using COII and 16S mitochondrial partial genes. **Bull. Entomological Research**. v. 94, p. 457-569, 2004.

LARA. F.M. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. 2. ed. São Paulo: Ícone, 1991, 336p.

LAUMAN, R.A., et al. Software para análises de comportamento de insetos orientados a estudos de ecologia química. *In: Encontro Brasileiro de Ecologia Química*, 4. ed. Piracicaba, SP. Programação e livro de resumos, p. 155.2005.

LEWIS, L.A., et al. Genetic and molecular analysis of spontaneous respiratory deficient(res-) mutants of *Escherichia coli* K-12. **Microbiol.Immunol.** v. 35, p. 289-301, 1991.

LIMA, E.R.; DELLA LUCIA, T.M.C. Bioquímica dos Feromônios. p. 13-26. *In*: VILELA, E.F.; DELLA LUCIA, T.M.C. (eds.), Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas. Ribeirão Preto, **Holos**, 2001, 206p.

LIMA FILHO, M.; LIMA, J.O.G. Massas de ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Pyralidae) em cana-de-açúcar: número de ovos e porcentagem de parasitismo por *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em condições naturais. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 483-488, 2001.

LONG, W.H.; HENSLEY, S.D. Insect pests of sugar cane. **Annual Review Entomology.** v. 17, n. 1, p. 149-176, 1972.

LOUGHRIN, J.H., et al. Volatiles emitted by different cotton varieties damaged by feeding beet armyworm larvae. **Journal of Chemical Ecology**, v. 21, p. 1217–1227, 1995.

MACEDO, N.; BOTELHO, P.S.M.; MENDES, A.C. Liberação de *Apanteles flavipes* Cam. em São Paulo. *In*: Congresso Brasileiro de Entomologia, 4. ed, 1977, Goiânia. **Resumos...** Goiânia: SEB, 1977.

MACEDO, N.; BOTELHO P. S. M. Aplicação do regulador de crescimento de insetos (IRG) visando o controle de larvas de *Diatraea Saccharalis* (Fabricius, 1794). **Brasil açucareiro**.v. 104, p. 30-35. 1986.

MCLAFFERTY, F.W.; STAUFFER, D.B. **The Wiley/NBS registry of mass spectral data**, New York: John Wiley Sons, Vol I-II. 1989.

MAFFEI, M.E.; MITHÖFER, A.; BOLAND, W. Insects feeding on plants: rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2946–59, 2007.

MARUCCI, R. **Controle biológico da broca-da-cana-de-açúcar**. Artigo Técnico, Rehagro, 2008 Disponível em: <<http://www.rehagro.com.br/siterehagro/publicacao.do.cdnoticia=1247>>. Acesso em: 07 nov. 2012.

MATTIACCI, L.; DICKE, M.; POSTHUMUS, M. A. Induction of parasitoid attracting synomone in brussels-sprouts plants by feeding of *Pieris brassicae* larvae: role of mechanical damage and herbivore elicitor. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, p. 2229–2247, 1994.
Beta-glucosidase: an elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA** v.92, p. 2036–2040, 1995.

MCCUTCHEON, G.S.; S.G. TURNIPSEED. Parasites of lepidopterous larvae in insect resistant and susceptible soybeans in South Carolina. **Environ. Entomol.** v. 10, p. 69-74, 1981.

MELLO, M.O.; SILVA-FILHO, M.C. Plant-insect interaction: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v.14, n.2, p. 71-81, 2002.

MENDONÇA FILHO, A.F.; COSTA, J.M.B.; S.H.B. RISCO, S.H.B. Situação atual do controle da broca da cana-de-açúcar *Diatraea spp.* no Estado de Alagoas, Brasil. In **resumos do 3º Congresso Brasileiro de Entomologia**, Maceió, AL., 1976.

MENDONÇA, A.F. **Pragas da cana-de-açúcar**. Maceió, Insetos & Cia. p. 122-123, 1996.

MENDONÇA, A.F.; RISCO, S.H.; COSTA, J.M.B. Introduction and rearing of *Apanteles flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) in Brazil. **Proc. Int. Soc. Sugarcane Technol** v. 1, p. 703-710, 1977.

MENDONÇA, A.L.; FREITAS, M.R.T.; DO NASCIMENTO, R.R.; SANT'ANA, A.E.G. Behavioural evidence for a female sex pheromone in *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). **Physiological Entomology**, Londres, v. 29, p. 1-5, 2004.

MEREY, G.E.V., et al. Minor effects of two elicitors of insect and pathogen resistance on volatile emissions and parasitism of *Spodoptera frugiperda* in Mexican maize fields. **Biological control**, v. 60, p. 7-15, 2012.

MESQUITA, F.L.T., et al. Influence of *Saccharum officinarum* (Poales: Poaceae) variety on the reproductive behavior of *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae) on the

attraction of the parasitoid *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). **Florida Entomologist**, v. 94, n.3, p. 420-427, 2011.

METCALF, R.L.; METCALF, E.R. **Plant kairomones in insect ecology and control: contemporary topics in entomology**. v.1, London: Chapman & Hall, 1992, 168p.

MITHÖFER, A.; BOLAND, W. Plant Defense against herbivores: Chemical Aspects. **Annu. Rev. Plant. Biol.** v. 63, p. 431-450, 2012.

MOREIRA, L.R. **Interações Ecológicas no Complexo Plantas de Tomate - Artrópodes Herbívoros Mediadas por Odores**. Dissertação de Mestrado. 132p. Programa de Pós-Graduação em Entomologia. Universidade Federal de Viçosa. 2003.

NAKANO, O., et al. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002, 920 p.

NGI-SONG, A.J., et al. Volatile infochemicals used in host and host habitat location by *Cotesia flavipes* (Cameron) and *Cotesia sesamiae* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), larval parasitoids of stemborers on Graminae. **J. Chem. Ecol.** v. 22, p. 307-323, 1996.

NGUMBI, E., CHEN, L.; FADAMIRO, H.Y. Comparative CG-EAD response of a Specialist (*Microplitis croceipes*) and a generalist (*Cotesia marginiventris*) parasitoid to cotton volatiles Induced by two caterpillar species. **J. Chem. Ecol.**, v. 35, p. 1009-1020, 2009.

PARÉ, P.W.; TUMLINSON, J.H. *De novo* biosynthesis of volatiles induced by insect herbivore in cotton plants. **Plant Physiology**, v. 114, p. 1161-1167, 1997.

PARÉ, P.W.; TUMLINSON, J.H. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. **Plant Physiology**, v. 121, p. 325-331, 1999.

PARRA, J.R.P., et al. Efeito da Nutrição e da umidade na fecundidade de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, São Paulo**, v. 28, n. 1, p. 49-57, 1999.

PEREIRA, C.E.F.; LIMA, R.O.R.; VILAS BOAS, A.M. Introdução e adaptação de *Apanteles flavipes* Cam. (Braconidae), parasito de *Diatraea* spp. nos Estados de Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 4, 1977, Goiânia. **Resumos ... Goiânia: SEB, 1977.**

PICHERSKY, E.; LEWINSOHN, E. 2011. Convergent evolution in plant specialized metabolism. **Annu. Rev. Plant Biol.** v. 62, p. 549–66, 2011.

PICKETT, J.A., et al. Developments in aspects of ecological phytochemistry: The role of *cis*-jasmone in inducible defence systems in plants. *Phytochemistry*, v. 68, p. 2937–2945, 2007.

PINTO, A.S. **Inovações tecnológicas no controle de pragas da cana-de-açúcar**. SIMTEC. 2012.

PINTO, A.S.; GARCIA, J.F.; BOTELHO, P.S.M. **Controle biológico de pragas da cana-de-açúcar**, p.65-74. In: PINTO, A.S., NAVA, D.E., ROSSI, M.M. & MALERBO-SOUZA, D.T. (Org.), *Controle biológico de pragas: na prática*. Piracicaba, FEALQ, 2006, 287p.

PLANALSUCAR (Programa Nacional de Melhoramento de Cana-de-Açúcar). **Relatório anual**. Piracicaba, SP:IAA - Instituto do Açúcar e do Alcool. 164p. 1983.

POMARI, A.F., et al. Dispersão de *Cotesia flavipes* em cana-de-açúcar, no município de Bandeirantes-Paraná. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 22., 2008, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: UFU:Embrapa Milho e Sorgo: UFV, 2008. 1 CD-ROM.

PRECETTI, A.A.C.; TÉRAN, F.O.; SANCHEZ, A.G. Alterações nas características tecnológicas de algumas variedades de cana-de-açúcar, devidas ao dano da broca *Diatraea saccharalis*. **Boletim Técnico COPERSUCAR**, São Paulo, v. 40, p. 3, 1988.

PRICE, P.W. et al. Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. **Ann. Rev. of Ecol. And System**, Londres, v.11, n.129, p. 45-65, 1980.

RAUSHER, M.D. **Natural selection and the evolution of plant-insect interactions**, p. 20-88. In: B.D. ROITENBERG & M.B. ISMAN (eds.), *Insect chemical Ecology*. New York: Chapman and Hall. 1992, 336 p.

REBOUÇAS, L.M.C. et al. Composição química da glândula abdominal da fêmea da mariposa *Castnia licus* (Drury) (Lepidoptera:Castniidae): possíveis feromônios e precursores. **Quím. Nova** v. 22, p.645-652. 1999.

RISCADO, G.M.; LIMA FILHO, M. Situação da *Diatraea spp*, nos canaviais de Estado do Rio de Janeiro e Espírito Santo (Programa Nacional de Controle Biológico de *Diatraea spp*. no Brasil). IAA / PLANALSUCAR. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 3, 1976, Maceió. **Resumos...** Maceió: SEB, 1976.

RISCADO, G.M.; LIMA FILHO, M.; BARBOSA, J.T. Complexo de Inimigos naturais de *Diatraea spp*. e sua ação de controle no Rio de Janeiro. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 4, 1977, Goiânia. **Resumos...** Goiânia: SEB, 1977.

RISCO, S.H.B. **Control biológico de la broca de la caña de azúcar *Diatraea spp*. em el Brasil.** Relatório de las pesquisas y resultados obtenidos durante el período enero/abril/76. Alagoas, Planalsucar - Coordenadoria Regional do Nordeste, 1976. 37 p.

ROELOFS, W.L.; CARDÉ, R.T. **Ann. Rev. Entomol.** v.22, p.377-405, 1977.

ROSSI, M.N.; FOWLER, H.G. Manipulation Of Fire Ant Density, *Solenopsis Spp.*, For Short-Term Reduction Of *Diatraea Saccharalis* Larval Densities In Brazil. **Scientia Agricola.** v.59, n.2, p.389-392, 2002.

SETAMOU, M.; BERNAL, J.S.; LAGASP, J.C. Parasitism and Location of Sugarcane Borer (Lepidoptera: Pyralidae) by *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) on Transgenic and Conventional Sugarcane. **Environ. Entomol.** v.31, n. 6, p. 1219-1225, 2002.

SILVA. E.L. **Constituintes voláteis de frutos de *Annona muricata* e *Annona squamosa*: possível papel como atraente de *Bephratelloides pomorum* (Hymenoptera: Eurytomidae) e evidência de glândulas exócrinas em fêmeas desta espécie.** f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia) Universidade Federal de Alagoas. Maceió-AL. 1999.

SMITH, J.M., et al. Response of *Goniozus indicus* (Hymenoptera: Bethyridae) to sugarcane and *Cyperus Papyrus* Volatiles. **Proc. S. Afri. Sug. Technol. Ass.** v. 80, p. 250, 2006.

SOUZA, H.D.; SILVA, M. F. A broca da cana-de-açúcar e seu comportamento na região canavieira da Bahia. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 3, 1976, Maceió. **Resumos ...** Maceió: SEB, 1976.

STEINBERG, S.; DICKE, M.; VET, L. E. M. Relative importance of infochemicals from 1st and 2nd trophic level in long-range host location by the larval parasitoid *Cotesia glomerata*. **Journal of Chemical Ecology** v. 19, p. 47–59, 1993.

STEWART-JONES, A.; POPPY, G.M. Comparison of glass vessels and plastic bags for enclosing living plant parts for headspace analysis. **J. Chem. Ecol.** v. 32, p. 845-864, 2006.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; METRAUX, J.P. Systemic Acquired Resistance. **Annual Review of Phytopathology**. v. 35, p. 235-270, 1997.

TEGONI, M.; CAMPANACCI, V.; CAMBILLAU, C. Structural aspects of sexual attraction and chemical communication in insects. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 29, p. 257-264, 2004.

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

TURLINGS, T.C.J., et al. Larval-damaged plants: Source of volatile synomones that guide the parasitoid *Cotesia marginiventris* to the microhabitat of its hosts. **Entomol. Exp. Appl.** v. 58, p. 75-82, 1991.

TUMLINSON, T.H.; TURLINGS, T.C.J.; LEWIS, W.J. The semiochemical complexes that mediate insect parasitoid foraging. **Agricultural Zoological Review**. v. 5, p. 221-252, 1992.

TURLINGS, T.C.J., et al. How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA** v. 92, p. 4169–4174, 1995.

TURLINGS, T.C.J., et al. Timing of induced volatile emissions in maize seedlings. **Planta**, v. 207, p. 146–152, 1998.

TURLINGS, T.C.J., et al. Volicitin, an elicitor of maize volatiles in oral secretion of *Spodoptera exigua*: isolation and bioactivity. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, p. 189–202, 2000.

TURLINGS, T.C.J., et al. **The chemical ecology of plant–caterpillar–parasitoid interactions.** In *Multitrophic Level Interactions*, eds. T. Tscharntke & B. Hawkins, pp. 148–173. Cambridge: Cambridge University Press. 2002.

TURLINGS, T.C.J.; DAVISON, A.C.; TAMO, C. A six-arm olfactometer permitting simultaneous observation of insect attraction and odour trapping. **Physiological Entomology**, v. 29, p. 45-55, 2004.

UEFUNE, M., et al. Application of synthetic herbivore-induced plant volatiles causes increased parasitism of herbivores in the field. **J. Applied Entomol.**, v. 136, p. 561-567, 2012.

UNICA. União da Indústria de Cana-de-Açúcar. A indústria da cana-de-açúcar: Etanol, açúcar e bioeletricidade. 2009. Disponível em: <http://www.portalunica.com.br>>. Acesso em: 20 nov.2012.

UNICA. União da Indústria de cana-de-açúcar. A indústria de cana-de-açúcar. 2011.

VAN POECKE, R.M.P.; DICKE, M. Indirect defence of plants against herbivores: using *Arabidopsis thaliana* as a model plant. **Plant Biol.**v. 6, p. 387–401, 2004.

VET, L.E.M.; DICKE, M. The ecology of info chemical use by natural enemies of herbivores in a tritrophic context. **Ann. Rev. Entomol.** v. 37, p. 141-172, 1992.

VILELA, E.F.; DELLA LUCIA, T.M.C. **Introdução aos semioquímicos e terminologia.** p. 9-12. In: VILELA, E.F.; DELLA LUCIA, T.M.C. (Eds). *Feromônios de Insetos*. 2. ed. Holos, Ribeirão Preto, SP. 2001.

VILELA, E.F.; MAFRA-NETO, A. **Registro de feromônios comerciais e legislação.** p.151-159. In: VILELA, E.F.; DELLA LUCIA, T.M.C. (Eds). *Feromônios de Insetos*. 2. ed. Holos, Ribeirão Preto, SP. 2001.

VINSON, S.B. **Biochemical coevolution between parasitoids and their hosts.** In: Price, P.W. (ed.). *Evolutionary strategies of parasitic insects and mites*. Plenum press, New York., p. 14-48, 1975.

WASTERACK, C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. **Annals of Botany**, v.100, n.4, p.681-697, 2007.

ZARBIN, P.H.G.; FERREIRA, J.T.B.; LEAL, W.S. Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrutural de feromônios de insetos. **Química Nova**, v. 22, n. 2, 1999.

ZARBIN, P.H.G. **Extração, Isolamento e Identificação de Substâncias Voláteis de Insetos**. In: VILELA, E.F.; DELLA LUCIA, T.M.C. Eds. *Feromônios de Insetos: Biologia, Química e emprego no Manejo de Pragas*, 2ed. Ribeirão Preto: Holos, p.45-50, 2001.