

Metodologia para estudos de semioquímicos e a sua aplicação no manejo de pragas. A influência de voláteis de soja no comportamento do parasitóide *Telenomus podisi*.

Introdução

A produção brasileira de soja ultrapassou os 50 milhões toneladas em 2002, com uma área estimada em 18 milhões de hectares (CONAB, 2003), sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial.

Entre as principais pragas desta cultura destaca-se o complexo de percevejos da soja (Hemiptera: Pentatomidae), que representa as pragas-chave desde a floração até o amadurecimento dos grãos (Schaefer & Panizzi, 2000). Na região Centro-oeste o percevejo *Euschistus heros* (Figura 1) é a principal espécie deste complexo (Panizzi & Slansky, 1985). Na atualidade, a técnica de controle mais utilizada para o manejo destes percevejos é o uso de inseticidas. No entanto, uma série de problemas relacionados à contaminação do solo, água e ar, e à saúde humana surgiu com o uso excessivo dos pesticidas sintéticos, o que provocou a procura por técnicas menos agressivas para o controle de insetos.

Um método que pode ser usado para auxiliar nos programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) é o uso de semioquímicos. Os semioquímicos (feromônios, cairomônios, alomônios e sinomônios) podem ser usados em armadilhas no campo com o intuito de confundir, atrair, ou repelir os insetos das culturas ou evitar que eles encontrem o parceiro para acasalamento (Lima e Della Lucia, 2001).

Uma outra alternativa no uso de semioquímicos é a associação ao controle biológico, especialmente com insetos parasitóides e predadores. Durante o comportamento de busca e seleção de hospedeiros os insetos entomófagos utilizam sinais de diferentes naturezas, entre eles vários semioquímicos produzidos por plantas hospedeiras, insetos filófagos e até materiais inertes (Godfray, 1994). A utilização destes semioquímicos pode auxiliar para manipular o comportamento de agentes de controle biológico aumentando a eficiência do controle de pragas.

Os feromônios apresentam vantagens quando, comparados aos pesticidas sintéticos, pois são específicos, não tóxicos, usados em pequenas quantidades e biodegradáveis.

O laboratório de Bioecologia e Semioquímicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia vem trabalhando nos últimos anos em Ecologia Química Aplicada, principalmente com o desenvolvimento de metodologias de extração e aplicação de semioquímicos de insetos e voláteis de plantas para o controle de insetos-praga com ênfase no complexo de percevejos pragas da soja. As primeiras espécies estudadas, *Nezara viridula* e *Euschistus heros*, tiveram os feromônios sexuais identificados e avaliados em campo (Baker et al. 1987, Borges et al. 1987, Borges 1995, Aldrich et al. 1994, Borges & Aldrich 1994a, Borges et al. 1998 a, 1998b, Zhang et al. 2003).

Nos últimos anos a ecologia química de outros membros do complexo de pragas da soja como *Thyanta perditor*, *Edessa meditabunda*, *Piezodorus guildinii* (Borges et al. 1999, Zarkin et al. 2000), entre outros, está sendo estudada. Além destes, respondendo a demanda de outras unidades da Embrapa, a ecologia química de insetos praga da cultura do arroz tais como o percevejo-do-colmo do arroz, *Tibraca limbrativentris* e o lepidóptero *Elasmopalpus lignosellus* também estão sendo estudadas no laboratório.

Brasília, DF
Dezembro, 2003

Autores

**Maria Carolina Blassioli
Moraes**

Química, doutorado, Embrapa
Recursos Genéticos e
Biotecnologia

**Leandro Marinho P.
de Sousa**

Eng. Agrônomo, graduando, UnB,
Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia

Raul Laumann

Biólogo, doutorado, Embrapa
Recursos Genéticos e
Biotecnologia

Miguel Borges

Biólogo, doutorado, Embrapa
Recursos Genéticos e
Biotecnologia

Outra linha de pesquisa desenvolvida no laboratório de Bioecologia e Semioquímicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia é o estudo da interação praga-inimigo natural (Borges & Aldrich 1994b, 2001, Borges 1998). Plantas sofrendo o ataque de insetos sugadores ou mastigadores liberam uma série de compostos voláteis específicos capaz de atrair parasitóides. Esses voláteis funcionam como uma defesa indireta da planta e podem ser usados para manipular o comportamento de insetos benéficos, como os parasitóides de ovos de percevejos (Dicke, 1994). Este é o caso estudado no nosso laboratório da interação entre o percevejo *Euschistus heros*, a soja e o parasitóide de ovos *Telenomus podisi* (Figura 2). Esses voláteis fazem parte da defesa indireta da planta e não são liberados quando a planta está saudável ou sofre danos mecânicos.



Fig.1. Percevejo Marrom da soja, *Euschistus heros*



Fig.2. O parasitóide de ovos *Telenomus podisi*

Os semioquímicos estão presentes nos organismos em níveis de nanogramas ou menores (picogramas). Assim sendo, os métodos de extração e purificação trabalham com quantidades muito pequenas de compostos. Para a obtenção dos voláteis, um dos métodos mais utilizado é a aeração de insetos ou plantas. Na aeração todos os voláteis liberados pelo inseto ou pela planta são coletados em adsorventes sólidos (materiais poliméricos). Há uma série de adsorventes que pode ser utilizada. São usados mais freqüentemente o Super Q (co-polímero de p-devinilbenzeno-vinilbenzeno), Tenax GC (polifenilenóxido na base de 2,6 difenilfenol), Chromosorb, carvão ativado e lã de vidro. A dessorção dos voláteis é realizada utilizando-se solventes orgânicos como hexano, heptano e diclorometano. A Figura 3 mostra o esquema de aeração em câmaras de vidro. O fluxo de ar dentro das câmaras é controlado por fluxômetros e recomenda-se que o ar seja filtrado e umidificado quando necessário.

A identificação dos voláteis extraídos de insetos e plantas é feita através de espectrometria de massas acoplada a cromatografia gasosa (GC-MS). A espectrometria de massas fornece informações, características das substâncias, que auxilia na identificação da maioria dos voláteis através dos fragmentos gerados na ionização. A cromatografia gasosa permite a separação de uma mistura de multicomponentes de um extrato natural. O processo de separação baseia-se nas características físico-químicas dos componentes.

Após a extração e análise cromatográfica a atividade biológica dos voláteis é estudada em bioensaios com os insetos vivos. Para os bioensaios utilizam-se olfátômetros ou arenas onde se cria uma corrente de ar que transporta os voláteis a serem avaliados. Quando o comportamento dos insetos exige são utilizados túneis de vento que permitem o vôo dos insetos enquanto estes seguem um rastro de semioquímicos. O desenho dos olfátômetros, arenas e túneis de vento são muito variáveis dependendo do tamanho e características biológicas de cada espécie estudada. O comportamento dos insetos é registrado por observação direta ou através da utilização de câmaras de vídeo e de softwares específicos

Objetivo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos voláteis liberados pela soja, quando infestada por *Euschistus heros*, no comportamento do parasitóide de ovos de percevejos *Telenomus podisi* e o potencial do uso desses voláteis no manejo do percevejo.

Metodologia

Plantas: Sementes de soja foram plantadas em vasos plásticos de (7.0 cm altura, com diâmetro externo de 9.0 cm na parte superior e 6.0 cm na parte inferior) com solo esterilizado. Os vasos foram colocados em uma câmara climatizada (Lab-line Instruments) a 27 °C, 70 % r.h., 65 ± 10 % UR. e 14:10 L:D fotoperíodo (25.000 Lux). As plantas de soja usadas no experimento estavam no estágio V3 (Fehr et al. 1971).

Insetos: O percevejo, *E. heros*, foi alimentado com sementes de girassol (*Helianthus annuus* (L.)), grãos soja (*Glycine max* (L.) Merrill.), amendoim crú (*Arachis hypogaea* (L.)) e vagem (*Phaseolus vulgaris* (L.)). Recipientes separados foram usados para a criação de adultos e ninfas. Ovos foram coletados diariamente e separados em placas de Petri para eclosão. Para os experimentos machos e fêmeas foram separados depois da muda, antes de atingirem a maturidade sexual (média de 5 dias de idade na fase adulta).

Os parasitóides de ovos, *Telenomus podisi* (Figura 2) usados nestes experimentos foram mantidos em câmaras climatizadas utilizando gaiolas de plásticos (frascos de tecidos de cultura 25 cm² - ICN Biomedicals). Os ovos do hospedeiro foram oferecidos aos parasitóides colados com mel em cartelas de cartolina (4,0 X 0,5 cm), após 24 horas foram removidos e transferidos para tubos de vidro (7.5 x 1.3 cm) para incubação. Antes dos bioensaios os parasitóides adultos foram mantidos em gaiolas plásticas por 48 h. para acasalamento e contato com os ovos do hospedeiro (experiência de oviposição). Tanto o hospedeiro, *E. heros*, como o parasitóide, *T. podisi*, foram criados nas mesmas condições de laboratório 27 °C, 70 % r.h., 65 ± 10 % UR. e 14 h de fotofase.

Extração e pré-concentração do semioquímicos

Coleta dos voláteis de plantas: Os vasos contendo as plantas foram envoltos com sacos plásticos de polietileno e fechados no caule na altura dos cotilédones evitando, assim, a contaminação com voláteis provenientes do substrato onde as plantas cresceram (terra adubada) ou de outros organismos que ali se encontravam (bactérias, fungos, etc.). Para evitar qualquer dano ao caule este foi envolvido com algodão na região onde o saco plástico é amarrado. As plantas foram então colocadas em container de plástico de 5 L adaptado para a aeração (Figura 4). Na tampa do container dois furos foram feitos para a fixação dos tubos com adsorventes. Os tubos de vidro (8 cm de comprimento e 0.7 cm de diâmetro externo) para coleta dos voláteis foram preenchidos com 60 mg de adsorvente

Super Q (Alltech 80/100 mesh – Alltech Associates, Inc.). Os tubos foram ligados ao sistema de vácuo conectados por tubos de silicone. Ar purificado foi introduzido na câmara de aeração a 1200 mL min.⁻¹.

O experimento foi conduzido utilizando como tratamento plantas de soja e 5 insetos; como controle só plantas de soja. Seis câmaras independentes foram montadas, três para o tratamento e três para o controle, sendo aeradas simultaneamente. Cada aeração foi conduzida por 24 horas e os voláteis coletados diariamente. A dessorção dos voláteis foi conduzida com aproximadamente 2 mL de hexano (solvente). O excesso de solvente foi evaporado sobre N₂ até aproximadamente 50 mL da solução, correspondendo a aproximadamente a 0,1 indivíduo equivalente (IE/mL) de solução a ser analisada/testada.

Os extratos foram analisados por cromatografia gasosa (Perkin Elmer, coluna DB-1, 30 m x 0.25 mm ID, 0.25 mm filme). A coluna foi mantida a 50 °C por 2 minutos e uma rampa de temperatura foi programada, 15 °C/min até 250 °C. Os picos foram analisados qualitativamente comparando o perfil cromatográfico do tratamento em relação ao controle e quantificados baseando-se na área de um padrão interno (acetato de decenila, 300 ng/mL).



Fig.3. Sistema de aeração para coleta de voláteis montado em câmaras de vidro.

Bioensaios

Olfatômetro: O olfatômetro utilizado neste trabalho (Figura 5) foi manufaturado em uma placa de acrílico (20,0 X 19,0 cm) na qual foi feita uma cavidade em forma de “Y” (corpo 9,0 cm; braços 8,0 cm cada, com ângulo de 130 °, d.i. 1,5 cm). Esta placa de acrílico é colocada sobre um vidro translúcido com as mesmas dimensões e na parte de cima é colocado um vidro transparente sendo prensadas usando cliques de papel. O ar conduzido para o interior do

olfatômetro foi filtrado usando carvão ativado e umidificado. O ar fluiu através de duas câmaras tratamento e controle onde estavam os estímulos que alcançaram os braços do olfatômetro. O fluxo foi regulado através de fluxômetros e mantido em aproximadamente 800 mL/min. O olfatômetro foi envolvido por uma cortina preta para evitar influência da luz sobre o comportamento do parasitóide e iluminado por baixo por lâmpadas de infravermelho (comprimento de onda a 950 nm, 108 LEDs).

Coleta de dados: O olfatômetro foi monitorado usando uma câmera de vídeo (Sony SPT M324CE) ajustada a lentes 12.5-75.0 mm /F1.8. As imagens capturadas foram digitalizadas utilizando uma placa de captura de vídeo (PC-Studio PCTV Pinnacle System). E os dados foram registrados e processados utilizando o software X-bug (Colazza *et al.* 1999) (Figura 5). Posteriormente estes dados foram analisados quantificando tempo de permanência em cada área do olfatômetro, velocidade de locomoção e índice de tortuosidade (variando de 0 a 1).

Experimentos: Para determinar se os voláteis liberados pela plantas quando danificada por insetos sugadores têm algum efeito no comportamento de procura dos insetos parasitóides foram conduzidos experimentos oferecendo os extratos com os voláteis obtidos do tratamento e controle aos parasitóides no olfatômetro. Os extratos foram embebidos em tiras de papel filtro (1,5 cm comprimento e 0,5 cm de largura) na concentração de 0,5 I.E do extrato e inseridas imediatamente nas câmaras. Os papéis com os extratos foram substituídos a cada dois bioensaios.

As fêmeas dos parasitóides usadas nestes experimentos estavam com 2 a 3 dias na fase adulta e foram usadas somente uma vez. Uma vespa foi introduzida no olfatômetro no extremo oposto a corrente de ar e seu padrão de procura foi registrado durante 15 min. As posições dos braços do olfatômetro foram invertidas entre tratamento e controle para evitar qualquer efeito tendencioso.

Resultados

A análise cromatográfica dos extratos coletados de plantas de soja tratadas com insetos e plantas mantidas sem percevejos mostrou uma diferença qualitativa e quantitativa entre os tratamentos nos 7 dias de aeração (teste Student-Newman-Keuls, $x = 30.485$ $n = 7$, $p < 0,001$) (Figura 6) Os bioensaios com as fêmeas de *T. podisi* mostraram que estas responderam significativamente aos extratos do tratamento em relação aos do controle (Figura 7). A análise do tempo de residência médio mostrou que a fêmea do *T. podisi* permaneceu 25% do tempo total na área do

tratamento e 5 % no controle. Além disto, as fêmeas de *T. podisi* quando submetidas aos voláteis obtidos do tratamento apresentaram um comportamento arretante (maior procura em locais com indícios da presença de seus hospedeiros) que foi verificado com um alto índice de tortuosidade, 0,84 e baixa velocidade linear, 4,5 mm/s.



Fig.4. Sistema de aeração de plantas montado com a soja.

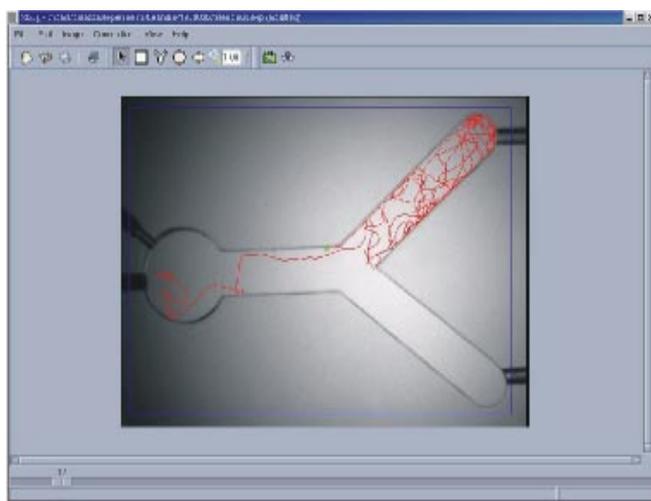


Fig.5. Bioensaio mostrando a atração do parasitóide *T. podisi* ao extrato do tratamento 1 em relação ao tratamento 2.

Conclusões

A mistura de voláteis liberada pela soja quando atacada por *E. heros* apresenta diferenças quantitativas e qualitativas em relação à liberada pela soja não atacada.

Os bioensaios mostraram que os voláteis liberados pela soja danificada influenciam o comportamento de procura do parasitóides *T. podisi*. Desta forma, a defesa indireta das plantas de soja, quando atacadas por *E. heros*, tem um grande potencial para ser utilizada no controle biológico para manipular o comportamento de inimigos naturais.

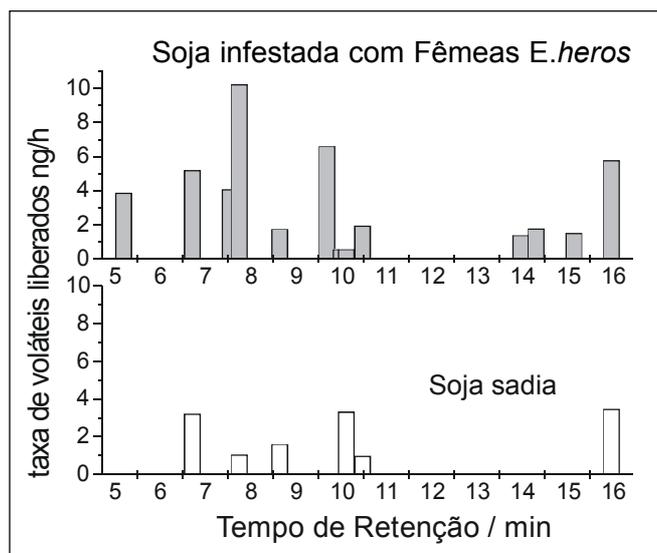


Fig. 6. Comparação qualitativa dos voláteis liberados pela soja infestada com *E. heros* e soja sadia.

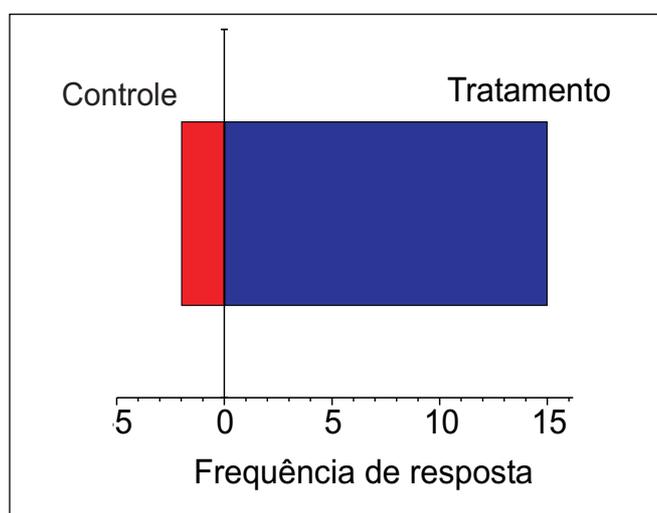


Fig. 7. Resposta das fêmeas do parasitóide *T. podisi* aos voláteis coletados da soja infestadas com *E. heros* (Tratamento) e soja sadia (controle) ($X = 9,94$, $n = 1$, $p = 0,0016$).

Referências Bibliográficas

- ALDRICH, J.R.; OLIVER, J.E.; LUSBY, W.R.; KOCHANSKY, J.P.; BORGES, M.. Identification of male-specific volatiles from Nearctic and Neotropical stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 20, n. 5, p.1103-1111, 1994.
- BAKER, R.; BORGES, M.; COOKE, N.G.; HERBERT, R.H. The identification and synthesis of (Z)-(1'S, 3'R, 4'S)-2-(3', 4'- epoxy-4'-methylcyclohexyl)-6-methylhepta-2,5-diene, the sex heromone of the southern green stinkbug, *Nezara viridula* (L.). **Journal of The Chemical Society-Chemical Communications.**, Cambridge, v. 6, n. 15, p. 414-416, 1987.
- BORGES, M. Attractant pheromone of the southern green stink bug, *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. v. 24, n. 2, p. 215-225, 1995.
- BORGES, M. Feromônio de Heteroptera: uso como caimônios para o manejo e manutenção de populações de parasitóides nativos. Simpósio de Controle Biológico, 1998, Rio de Janeiro, RJ – Brasil, **Anais do VI Siconbiol**, Rio de Janeiro: Conferências e Mesas-Redondas. 277-287 pp.
- BORGES, M.; ALDRICH, J.R. An attractant pheromone for the Nearctic stink bug *Euschistus obscurus* (Heteroptera: Pentatomidae): insight into a Neotropical relative. **Journal of Chemical Ecology**. V. 20, n. 5, p.1095-1102, 1994a.
- BORGES, M.; ALDRICH, J.R. Estudos de semioquímicos para o manejo de Telenominae, insetos benéficos. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 23, n. 3, p.575-577, 1994b.
- BORGES, M.; ALDRICH, J.R. 2001 Feromônio de Heteroptera: oportunidades para o manejo de insetos benéficos. In: Vilela, E.F. & Della Lúcia, T.M.C. (Eds). *Feromônio de Insetos: biologia, química e aplicação*. São Paulo, Holos Editora. P. 93-98.
- BORGES, M.; COSTA, M. L. M.; SUJII, E. R.; CAVALCANTI, M. DAS G.; REDÍGOLO, G. F.; RESCK, I. S.; VILELA, E.F. Semiochemical and physical stimuli involved in host recognition by *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae) toward *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). **Physiological Entomology**, Oxford, v. 24, n.3, p. 227-233, 1999a.
- BORGES, M.; JEPSON, P.C; HOWSE, P.E. Long-range mate location and close-range courtship behaviour of the green stink bug, *Nezara viridula* and its mediation by sex pheromones. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 44, n. 3, p.205-212, 1987.
- BORGES, M.; MORI, K.; COSTA, M. L. M.; SUJII, E.R. Behavioural evidence of methyl-2,6,10-trimethyltridecanoate as a Sex pheromone of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). **Journal of Applied Entomology-Zeitschrift fur Angewandt Entomologie**, Berlin, v.122, n.6, p. 335-338, 1998a.
- BORGES, M.; SCHMIDT, F.V.G.; SUJII, E.R.; MEDEIROS, M.A.; MORI, K.; ZARBIN, P.H.G.; FERREIRA, J.T.B. Field responses of stink bugs to the natural and synthetic pheromone of the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, (Heteroptera: Pentatomidae).

Physiological Entomology, Oxford, v. 23, n. 3, p. 202-207, 1998b.

BORGES, M.; ZARBIN, P.H.G.; FERREIRA, J.T.B.; COSTA, M. L. M. Pheromone sharing: blends based on the same compounds for *Euschistus heros* (F.) and *Piezodorus guildinii* (W.) (Heteroptera: Pentatomidae). **Journal Chemical Ecology**, New York, v. 25, n. 3, p. 629- 634, 1999.

COLAZZA, S.; SALERMO, G.; WAJNBERG, E. Volatile and contact chemicals released by *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae) have a kairomonal effect on the egg parasitoid *Trissolcus basalís* (Hymenoptera: Scelionidae). **Biological Control**, Califórnia, v.16, n. 3, p. 310-317, 1999.

CONAB. Sexto levantamento de área, produção e produtividade agosto 2002/2003.. Disponível <<http://www.conab.gov.br/download/safra/safra20022003Lev06.pdf>> Acesso em 22/11/2003.

DICKE, M. Local and systemic production of volatile herbivore-induced terpenoids: their role in plant-carnivore mutualism. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v.143, n 4/5. p.465-472,1994.

FEHR, W.R.; CAVINES, C.E.; BURMOOD, D.T.; PENNINGTON, J.S. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Science**, Madison, v. 11, n. 6, p. 929-931, 1971.

GODFRAY, H.C.J. Parasitoids, Behavioral and evolutionary ecology. Princeton University Press. Princeton, New Jersey. 1994. 447 pp.

LIMA, E.R.; DELLA LUCIA, T.M.C. "Biodinâmica dos Feromônios In:Vilela, E.F., Della Lucia (eds.), Feromônios de Insetos, Biologia, química e emprego no manejo de pragas", São Paulo, Holos Editora, 2001 p. 13-26.

PANIZZI, A. R.; SLANSKY JR., F. Review of

phytophagous pentatomids (Hemiptera: Pentatomidae) associated with soybean in the Americas, **Florida Entomologist**, Florida, v. 68, n. 1 p. 184-207, 1985.

SCHAEFER, C. W.; PANIZZI, A. R. Heteroptera of economic importance, Ed. CRC Press, ed, USA 2000, 421 p.

ZARBIN, P.H.G.; RECKZIEGEL, A.; PLASS, E.; BORGES, M.; FRANCKE, W. Synthesis and biological activity of methyl 2,6,10-trimethyldodecanoate and methyl 2,6,10-trimethyl-tridecanoate: the male-produced sexual pheromones of the stink bugs *Euschistus heros* and *Piezodorus guildinii* (Heteroptera: Pentatomidae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.26, n. 12, p. 2737-2746, 2000.

ZHANG, A.; BORGES, M.; ALDRICH, J.R.; CAMP, M.J. Stimulatory Bug Volatiles for the Neotropical Brown Stink Bug, *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, Paraná, v. 32 n. 4, p. 713-717, 2003.

Circular Técnica , 24

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) -
Brasília, DF. CEP 70.770-900 - Caixa Postal 02372
PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br



1ª edição
1ª impressão (2003): 150 unidades

Comitê de publicações

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias
Secretário-Executivo: Maria José de Oliveira Duarte
Membros: Maurício Machaim Franco

Regina Maria Dechechi G. Carneiro
Luciano Lourenço Nass

Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares Campos Carneiro

Supervisor editorial: Maria José de Oliveira Duarte

Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi

Editoração eletrônica: Giscard Matos de Queiroz

Expediente