

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ADRIANO AFFONSO MARISCAL

**“Pistas químicas atraem inimigos naturais de larvas de
Ascia monuste orseis (Lepidoptera: Pieridae)”**

Campinas, 2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ADRIANO AFFONSO MARISCAL

**“Pistas químicas atraem inimigos naturais de larvas de
Ascia monuste orseis (Lepidoptera: Pieridae)”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Adriano Affonso Mariscal
Adriano Affonso Mariscal
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada
ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título
de Mestre em Ecologia

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Trigo

Campinas, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

M339p

Mariscal, Adriano Affonso, 1980-
Pistas químicas atraem inimigos naturais de larvas de
Ascia monuste orseis (Lepidoptera: Pieridae) / Adriano
Affonso Mariscal. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: José Roberto Trigo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Brassicaceae. 2. *Cotesia glomerata*. 3. Pistas
químicas. 4. Interações tritróficas. 5. Braconidae. 6.
Predação (Biologia). I. Trigo, José Roberto, 1956-. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Chemical cues attract natural enemies of *Ascia monuste orseis*
(Lepidoptera: Pieridae) larvae

Palavras-chave em Inglês:

Brassicaceae

Cotesia glomerata

Chemical cues

Tritrophic interactions

Braconidae

Predation (Biology)

Área de concentração: Ecologia

Titulação: Mestre em Biologia Animal

Banca examinadora:

José Roberto Trigo [Orientador]

Gustavo Quevedo Romero

Rodrigo Cogni

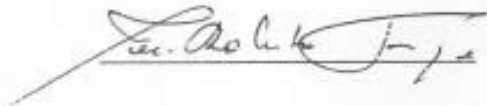
Data da defesa: 01-03-2013

Programa de Pós Graduação: Biologia Animal

Campinas, 01 de Março de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Roberto Trigo Orientador

Handwritten signature of Prof. Dr. José Roberto Trigo in cursive script, written over a horizontal line.

Prof. Dr. Eraldo Rodrigues Lima

Dr. Rodrigo Cogni

Handwritten signature of Dr. Rodrigo Cogni in cursive script, written over a horizontal line.

Prof. Dr. Gustavo Quevedo Romero

Handwritten signature of Prof. Dr. Gustavo Quevedo Romero in cursive script, written over a horizontal line.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. José Roberto Trigo, primeiramente por acreditar em mim e depois por toda paciência e esforço em realizar esse trabalho. Além disso, é sempre uma boa companhia para uma cerveja.

Agradeço à Katherine McLennan Brown Charitable Foundation e à FAPESP pelo financiamento do projeto e à Tigre S/A por fornecer, por doação, parte do material utilizado nas gaiolas usadas nos ensaios.

Agradeço aos colegas de laboratório que participaram da execução desse trabalho. Em especial ao José Carlos Silva (Zé Carlos) por toda ajuda na montagem dos materiais para execução dos ensaios e ajuda no plantio das rúculas.

Agradeço ao Prof. Dr. Fernando Noll (UNESP São José do Rio Preto), pela ajuda na identificação das vespas predadoras e à equipe do Laboratório de estudos de Hymenopteras parasitoides do departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da UFSCAR pela ajuda na identificação das vespas parasitoides.

Agradeço aos integrantes da pré-banca, Profa. Dra. Daniela Rodrigues (UFRJ), Dr. Rodrigo Cogni (Stony Brook, State University of NY) e Prof. Dr. Eraldo Lima (UFV) pelas contribuições na elaboração da versão final da dissertação. Aos integrantes da banca examinadora Prof. Dr. Gustavo Quevedo Romero (Unicamp) e Dr. Rodrigo Cogni pelas contribuições finais ao trabalho. Também agradeço a MSc. Kamila Massuda, Prof. Dr. Alberto Arab, Prof. Dr. Martin Pareja, MSc. Carlos Zanini e MSc. Mariana Stanton por contribuições dadas ao longo do trabalho. Aos colegas Marcelo Vaz Pupo, Bruno Ceva e Marcos Chabes por participarem da criação e desenvolvimento inicial desse projeto ainda durante a graduação.

Também agradeço a minha família. Meus pais Ana Maria de Jesus Affonso e Moacir Mariscal, que me apoiaram desde sempre, não só financeiramente como também

minhas decisões, obrigado. Meus irmãos André Affonso Mariscal e Aurélio Affonso Mariscal, grandes amigos e companheiros, mesmo que a distância, sempre me fazem lembrar de uma infância divertida dentro de casa.

Agradecimento especial às pessoas que fizeram parte e me ajudaram a tomar as decisões que me levaram a chegar onde estou agora: Profa. Dra. Helena Oliveira, minha primeira orientadora na graduação; Prof. Dr. Paulo Oliveira, que por um erro da DAC, pude fazer sua disciplina inspiradora de Ecologia, me permitindo futuramente cursar as disciplinas como a que deu origem ao meu trabalho de mestrado; Paulo Enrique Peixoto (hoje Prof. Dr. Paulo Enrique), que além de ser um bom amigo, usou seu tempo para me ensinar estatística; Prof. Dr. Fernando Martins, um conhecedor sobre tudo e exemplo de cientista e pessoa.

Por fim agradeço a minha namorada Paula Munhoz de Omena, companheira nesses últimos cinco anos. Ficando ao meu lado tanto em situações difíceis (como passar um 31 de dezembro me ajudando com uma introdução) como nas horas felizes (como passar um 31 de Dezembro em uma praia deserta em Paraty). Te amo.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO	1
1. Uso de sinais por inimigos naturais	3
2. Classificação dos tipos de pistas químicas	4
3. Insetos herbívoros em Brassicaceae. Como pistas químicas atraem predadores e parasitoides	5
4. Objetivos	9
MATERIAIS E MÉTODOS	10
1. Área de estudo	10
2. Organismos estudados	10
3. Impacto de vespas predadoras no desempenho de larvas de <i>Ascia monuste</i>	14
4. Comportamento das vespas predadoras em relação aos sinais químicos e visuais de <i>Eruca versicaria</i> e <i>Ascia monuste</i>	18
4.1. Sinais deixados pelo herbívoro atraem vespas predadoras?	20
4.2. O papel dos sinais químicos na atração das vespas predadoras	23
4.3. Sinais químicos que atraem predadores também atraem parasitoides? Bioensaios com olfatômetro em Y	24
5. Identificação de compostos voláteis de folhas danificadas e intactas de <i>Eruca vesicaria</i> e de fezes de <i>Ascia monuste</i>	31
RESULTADOS	35
1. Desempenho de larvas de <i>Ascia monuste</i> na presença e ausência de vespas predadoras	35

2. Sinais deixados pelas larvas atraem vespas predadoras?	38
3. Sinais químicos que atraem vespas predadoras também atraem vespas parasitoides?	46
5. Identificação de compostos voláteis de folhas danificadas e intactas de <i>Eruca vesicaria</i> e de fezes de <i>Ascia monuste</i>	47
DISCUSSÃO	50
1. Impacto de vespas predadoras no desempenho de larvas de <i>Ascia monuste</i>	50
2. Sinais químicos deixados pelas larvas atraem vespas predadoras?	52
3. Sinais químicos que atraem vespas predadoras também atraem vespas parasitoides?	55
4. Diferenças entre sinais químicos utilizados por vespas predadoras e parasitoides	56
CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

RESUMO

A grande diversidade de insetos fitófagos gera uma forte pressão de herbivoria em plantas, as quais respondem através de diversas formas de defesas. Essas defesas podem ser diretas ou indiretas. As defesas indiretas ou bióticas envolvem a interação com o terceiro nível trófico, isto é, inimigos naturais dos herbívoros, como predadores e parasitoides. Esses inimigos naturais usam diversas pistas para encontrar suas presas. Dentre estas, encontram-se pistas visuais e pistas químicas emitidas tanto pela planta quando atacada, como pelo próprio herbívoro quando se alimenta da planta. Nesse trabalho, nós investigamos quais são os sinais químicos usados por vespas predadoras e parasitoides para encontrar larvas da borboleta *Ascia monuste orseis* (Pieridade: Pierinae) quando hospede de folhas de *Eruca vesicaria sativa* (Brassicaceae). Testamos os sinais químicos emitidos por folhas intactas, folhas atacadas pelo herbívoro e fezes do herbívoro. Verificamos que vespas predadoras forrageiam significativamente mais quando os sinais químicos são produzidos pelas fezes das larvas de *A. monuste* enquanto a vespa parasitoide *Cotesia glomerata* (Hymenoptera: Braconidae) são significativamente mais atraídas pelos sinais químicos produzidos pelas folhas atacadas pelo herbívoro. Os principais compostos voláteis emitidos pelas folhas atacadas pelo herbívoro e pelas fezes são os derivados de glicosinolatos: 4-tiometil-butil-isotiocianato e 5-tiometil pentanonitrila, respectivamente.

Esses resultados podem ser interpretados à luz da teoria da detectabilidade-confiabilidade de sinais químicos usados por inimigos naturais. Vespas predadoras devem procurar sinais confiáveis que indiquem a presença do herbívoro. Esses sinais seriam fornecidos pelas fezes. Entretanto a vespa parasitoide estudada busca um habitat para o desenvolvimento de sua prole, representado pela planta hospedeira onde as larvas com seus ovos vão desenvolver.

Palavras-chave: *Brassicaceae*, *Cotesia glomerata*, pistas químicas, interação tritrófica, vespas parasitoides, vespas predadoras, Vespidae, 4-tiometil-butil-isotiocianato, 5-tiometil pentanonitrila.

ABSTRACT

The great diversity of phytophagous insects generates strong pressure of herbivory on plants, which have evolved various defensive strategies. These defenses can be direct or indirect. The indirect defenses involve interaction with the third trophic level, i.e., natural enemies of herbivores, such as predators and parasitoids. These natural enemies use various cues to find their prey. Among these, there are visual cues and chemical cues issued either by the plant when attacked, or by the herbivorous when feeding on the plant. In this paper we investigate what are the chemical signals used by predatory wasps and parasitoids to find the butterfly larvae *Ascia monuste orseis* (Pieridae: Pierinae) on the leaves of the host plant *Eruca vesicaria sativa* (Brassicaceae). We tested the chemical signals emitted by intact leaves, leaves attacked by the herbivore and herbivore feces. We found that significantly more predatory wasps forage when chemical signals are produced by feces of larvae of *A. monuste*, while wasp parasitoid *Cotesia glomerata* (Hymenoptera: Braconidae) are significantly more attracted by chemical signals produced by the leaves attacked by the herbivore. The major volatile compounds emitted by the leaves attacked by herbivore and feces are derivatives of glucosinolates 4-thiomethyl-butyl-isothiocyanate and 5-thiomethyl pentanenitrile respectively.

These results can be interpreted by the theory of reliability-detectability of chemical signals for natural enemies. Predatory wasps should seek reliable signals that indicate the presence of the herbivore. These signs would be provided through feces. But the wasp parasitoid search habitat for the development of their offspring, represented by host plant where the larvae will develop their eggs.

Key-words: *Brassicaceae*, *Cotesia glomerata*, chemical cues, tritrophic interaction, parasitoid wasps, predatory wasps, Vespidae, 4-thiomethyl-butyl-isothiocyanate, 5-thiomethyl pentanenitrile.

INTRODUÇÃO

A classe Insecta é um dos grupos taxonômicos mais diversos no planeta, com mais de um milhão de espécies descritas, sendo que cerca da metade das espécies apresenta o hábito herbívoro (Schaller 2008). Deste modo, a pressão de herbivoria em comunidades naturais deve ser intensa, levando a uma redução no crescimento e na reprodução de plantas individuais (Coley 1983, Crawley 1989). Nesse contexto, a persistência das plantas face à pressão de herbivoria, se deu por meio da evolução de uma diversidade de mecanismos de defesas, incluindo entre essas, defesas químicas e mecânicas (Agrawal 2007, Schaller 2008). Esses mecanismos de defesa podem ser constitutivos, se estão presente independente do ataque de herbívoros (Wittstock & Gershenson 2002) ou induzidos, quando são ativados após o consumo de partes das plantas pelos herbívoros (Agrawal 1999). Além disso, esses mecanismos podem ser classificados em diretos, caso haja um efeito negativo na escolha da planta hospedeira e/ou no sucesso reprodutivo dos herbívoros, ou indiretos (=bióticos), se os herbívoros são afetados negativamente pela associação das plantas com outros organismos (Price *et al.* 1980, Schaller 2008, Heil 2008).

Diversos mecanismos envolvidos em defesas diretas de plantas podem afetar negativamente o desempenho dos herbívoros. Por exemplo, as plantas podem apresentar características morfológicas, tais como dureza foliar e presença de tricomas não glandulares e/ou substâncias do metabolismo secundário, como alcaloides, terpenos e compostos fenólicos, que afetam negativamente o crescimento e a sobrevivência dos herbívoros (Moran & Hamilton 1980, Coley 1983, Ågren & Schemske 1993). Dureza foliar e quantidade de fibras estão negativamente associadas à herbivoria, pois fibras dificultam a digestão e apresentam componentes de baixo valor nutricional, como por exemplo, a celulose (Coley 1983, Wright *et al.* 2004, Schoonhoven *et al.* 2005). Os tricomas não

glandulares, por sua vez, podem atuar como estruturas que limitam o contato ou a mobilidade de herbívoros na superfície foliar (Dalín *et al.* 2008). Características morfológicas e químicas de defesa são combinadas em tricomas glandulares, que além de atuarem como uma barreira física, apresentam substâncias como terpenos, alcaloides e compostos fenólicos, que podem ser tóxicos, repelentes ou adesivos (Duffey 1986, Becerra *et al.* 2001).

As características morfológicas e químicas das plantas também podem atuar por meio da mediação das interações indiretas entre plantas e inimigos naturais do terceiro nível trófico (predadores e parasitoides), reduzindo então a pressão de herbivoria (Price *et al.* 1980, Dicke *et al.* 1990, Heil 2008). Exemplos clássicos dessas defesas indiretas envolvem o mutualismo obrigatório entre formigas e plantas mirmecófitas (Janzen 1966, Davidson & McKey 1993). Essas plantas possuem estruturas morfológicas especializadas, conhecidas como domáceas, que são utilizadas por formigas como local para abrigo e estabelecimento de colônias (Bruna *et al.* 2008). As formigas residentes, por sua vez, defendem suas plantas hospedeiras contra o ataque dos herbívoros (Fonseca 1994). A detecção das plantas hospedeiras pelas formigas pode ocorrer mediante estímulos mecânicos provocados pelos herbívoros sobre as plantas ou pela detecção de voláteis emitidos pelas folhas danificadas (Bruna *et al.* 2004). Diversos outros predadores, como aves (Van Bael *et al.* 2003), besouros (Royer & Boivin 1999), ácaros (Dicke & Sabelis 1987), aranhas (Morais-Filho & Romero 2010) e vespas predadoras (Richter 2000) utilizam características morfológicas ou químicas das plantas para o encontro de suas presas, reduzindo a ação dos insetos herbívoros.

Os mecanismos de defesas indiretas mediados por vespas predadoras e parasitoides têm sido bem investigados em sistemas agrícolas (Lewis & Martin 1990, Smith 1996). O

uso de vespas parasitoides no controle de pragas agrícolas é bem conhecido em culturas de poáceas como o milho (*Zea mays*) e a cana de açúcar (*Saccharum* spp.) (Smith 1996), enquanto que a presença de vespas predadoras tem sido associada à diminuição de danos causados por herbívoros em culturas de café (Gravena 1983) e de brassicáceas (Gould & Jeanne 1984, Picanço *et al.* 2010). Nas culturas de brassicáceas, os efeitos negativos de vespas predadoras sobre herbívoros são encontrados principalmente sobre larvas de lepidópteros. As vespas podem preda as larvas reduzindo a densidade das populações desses herbívoros ou alterar o comportamento de forrageio das larvas (Stamp & Bowers 1988). Sob o risco de predação, as larvas podem alterar o comportamento e, como resultado, reduzem sua sobrevivência, devido a fatores como redução na alimentação, exposição a condições climáticas adversas e utilização de refúgios em locais com condições abióticas, como temperatura, inadequada para o desenvolvimento (Stamp & Bowers 1988). Esses efeitos indiretos também podem contribuir para o decréscimo das populações de lagartas pragas de culturas (Stamp & Bowers 1988). Desse modo, vespas predadoras e parasitoides podem ter um papel fundamental tanto no manejo de pragas quanto na redução da herbivoria em sistemas naturais.

1. Uso de sinais por inimigos naturais

De maneira geral, esses inimigos naturais de herbívoros usam sinais deixados por estes ou por suas plantas hospedeiras, para detectar o seu recurso alimentar (e.g. Rains *et al.* 2004). Sinais ambientais são de crucial importância aos predadores e parasitoides que vivem em habitats heterogêneos e dependem da detecção e captura de presas para a sobrevivência e sucesso reprodutivo (Heinrich 1984, Unsicker *et al.* 2009). As vespas sociais, por exemplo, buscam diversos tipos de recursos que são utilizados tanto para a

alimentação (por exemplo, água, carboidratos e proteínas), quanto para a construção de ninhos (por exemplo, água e fibras vegetais) e pistas ambientais são importantes para o encontro desses recursos (Richter 2000). Vespas predadoras e parasitoides utilizam dois tipos básicos de pistas ambientais, as visuais e as químicas (Richter 2000, Fischer *et al.* 2001). Dentre as pistas visuais existem as emitidas por folhas consumidas pelos herbívoros (Heinrich 1984, Cornelius 1993), bem como o sinal visual da própria presa (Turlings *et al.* 1993, Richter 2000). As pistas químicas abrangem os voláteis emitidos pelas folhas que sofreram dano pelo herbívoro (Cornelius 1993, Turlings *et al.* 1995), pela cutícula dos insetos herbívoros (Roux *et al.* 2007), pelas pegadas dos herbívoros (Rostás & Wölfling 2009) e por sinais químicos provenientes das fezes dos herbívoros (Jones *et al.* 2002, Weiss 2003). Alguns autores reportaram que as fezes têm um importante papel na atração de inimigos naturais de herbívoros, podendo atrair parasitoides especialistas (Eller *et al.* 1988) e generalistas (Agelopoulos *et al.* 1995), e uma gama de outros predadores como besouros (Royer & Boivin 1999), nematóides entomopatogênicos (Grewal *et al.* 1994) e formigas (Müller & Hilker 1999).

2. Classificação dos tipos de pistas químicas

As pistas químicas, emitidas pelas plantas, fezes e herbívoros, utilizadas por predadores e parasitoides são denominados infoquímicos (Dicke & Sabelis 1988). Os infoquímicos são definidos como compostos que, em um contexto natural, transmitem informações dentro de uma interação entre dois indivíduos, causando no receptor do sinal respostas fisiológicas ou comportamentais que são adaptativas para um ou ambos os indivíduos (Dicke & Sabelis 1988). Dentro do contexto das interações tritróficas envolvendo planta-herbívoro-inimigo natural, os infoquímicos são transmitidos e recebidos

por indivíduos de espécies distintas e são conhecidos como aleloquímicos. Quando emitidos e recebidos por indivíduos de uma mesma espécie, infoquímicos são denominados feromônios (Dicke & Sabelis 1988). Dentro dos aleloquímicos, a classificação é dada pela relação de custo-benefício existente entre emissor e receptor. Quando o emissor do sinal é favorecido e o receptor é desfavorecido, o aleloquímico recebe o nome de alomônio. De modo contrário, se o indivíduo que emite o sinal é prejudicado pela emissão desse sinal e o receptor é favorecido, então esse aleloquímico é denominado cairomônio. No caso de benefício mútuo entre emissor e receptor do sinal, o aleloquímico é chamado de sinomônio (Dicke & Sabelis 1988).

Dentro da classificação de Dicke & Sabelis (1988), os compostos voláteis emitidos pelas fezes e que atraem inimigos naturais são, dentro desse contexto, denominados cairomônios, dado que o herbívoro emissor é prejudicado ao eliminar suas fezes e atrair os inimigos naturais que utilizam as pistas químicas liberadas por essas. Contrariamente, os voláteis emitidos pelas folhas ao serem consumidas pelos herbívoros, atraem os inimigos naturais desses e são chamados de sinomônios, uma vez que a planta emissora ganha em termos de aptidão ao atrair os predadores dos herbívoros e os predadores se beneficiam desse sinal químico para encontrar suas presas.

3. Insetos herbívoros em Brassicaceae. Como pistas químicas atraem predadores e parasitoides

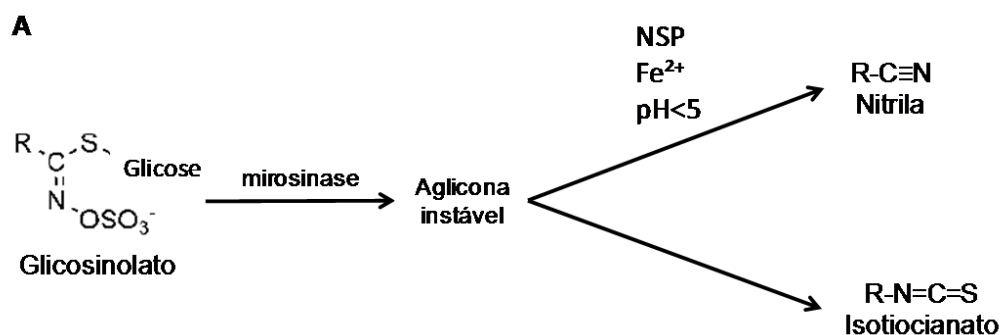
A rúcula *Eruca vesicaria sativa* [(Miller) Thell, Brassicaceae] (daqui por diante *E. vesicaria*), planta tida como original da região mediterrânea, mas distribuída e cultivada pelo mundo todo (Warwick 2006), contém compostos do metabolismo secundário, contendo enxofre e nitrogênio, conhecidos como glicosinolatos (GSLs) (Figura 1A) (Fahey

et al. 2001, Hopkins *et al.* 2009). As brassicáceas têm como herbívoros mais comuns as larvas polífagas da mariposa *Trichoplusia ni* [(Hübner, 1802) Noctuidae)], as oligófagas de *Plutella xylostella* [(Linnaeus, 1785) Yponomeutidae)], além do pulgão oligófago *Brevicoryne brassicae* [(Linnaeus, 1758) Hemiptera: Aphididae)] e larvas oligófagas de borboletas Pieridae (Born & Lima 2005). Dentro de Pieridae, as espécies *Pieris rapae* (Linnaeus, 1758) e *Pieris brassicae* (Linnaeus, 1758) são considerados os principais insetos pragas de cultura na Eurásia e, a espécie *Pieris napi* na América do Norte. No Brasil, lagartas da borboleta *Ascia monuste orseis* [(Godart, 1818) Pieridae: Pierinae] (daqui por diante *A. monuste*) são consideradas uma importante praga em culturas de Brassicaceae (Liu, 2005).

Os GSLs em plantas apresentam efeitos diferentes em herbívoros generalistas e especialistas. Eles são repelentes ou deterrentes para generalistas, mas são estimulantes de alimentação para alguns especialistas, podendo inclusive serem sequestrados por esses (Hopkins *et al.* 2009). Os GSLs, quando intactos, são considerados biologicamente inativos na atração de herbívoros especialistas ou parasitoides que se alimentam desses herbívoros. Entretanto seus produtos de degradação podem servir como atraentes de oviposição para herbívoros especialistas, tal como *A. monuste* (Fahey *et al.* 2001). Esses compostos também podem ser utilizados por parasitoides como pistas químicas da presença dos herbívoros (Wittstock *et al.* 2004, Hopkins *et al.* 2009).

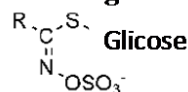
Quando o tecido foliar de uma brassicácea sofre algum dano, os GSLs entram em contato com a enzima mirosinase que catalisa uma reação de degradação, hidrolisando os GSLs e gerando diversos produtos (Hopkins *et al.* 2009). Um dos produtos mais comuns dessa reação são os isotiocianatos, os quais são voláteis (Figura 1A) (Cole 1976). Outras vias de degradação podem ocorrer na presença de outras enzimas e em condições

específicas. Por exemplo, quando há a presença de uma enzima específica para formação de nitrila (NSP – Nitrile-Specific Protein) na presença do íon ferro (Fe^{2+}) e pH ácido ($\text{pH} < 5$), ocorre a formação de nitrilas (Figura 1A). Essa enzima é encontrada no trato digestivo de larvas de *P. rapae*, e funciona como via de detoxificação de GSLs, evitando a formação de isotiocianatos, que são tóxicos para essas larvas (Wittisock *et al.* 2004). A ocorrência dessa reação pode ser verificada pela presença de nitrilas nas fezes de larvas que se alimentam das folhas de brassicáceas (Wittisock *et al.* 2004). Os tipos de isotiocianatos e nitrilas formadas dependem do grupo radical presente na molécula de GSL (Figura 1B) (Wittisock *et al.* 2004, Kissen & Bones 2009).

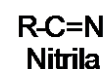
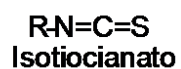


B

Estrutura geral dos GSL



Produtos da Hidrólise



Nome do Glicosinolato	Grupo R	Nome do Isotiocianato	Nome da Nitrila
3-metiltiopropil-GSL		3-metiltiopropil-ITC	4-metiltiobutil-NIT
4-metiltiobutil-GSL		4-metiltiobutil-ITC	5-metiltiopentil-NIT
5-metiltiopentil-GSL		5-metiltiopentil-ITC	6-metiltiohexil-NIT
6-metiltiohexil-GSL		6-metiltiohexil-ITC	7-metiltioheptil-NIT
7-metiltioheptil-GSL		7-metiltioheptil-ITC	8-metiltiooctil-NIT
8-metiltiooctil-GSL		8-metiltiooctil-ITC	9-metiltiononil-NIT

Figura 1. Esquema simplificado da hidrólise enzimática de glucosinolatos (GSLs). (A) A enzima mirosinase atua no GSL e forma um composto intermediário instável, que se rearranja espontaneamente formando um isotiocianato (ITC). Na presença da NSP (Nitrile-Specific Protein) em meio ácido (pH < 5) e íons ferro (Fe²⁺) ocorre a formação de nitrilas (NIT). (B) Isotiocianatos e nitrilas apresentam o radical (R) presente na molécula do GSL (adaptado de Kissen & Bones 2009).

4. Objetivos

Dentro desse contexto, o foco deste trabalho foi investigar o papel da sinalização química das fezes de *A. monuste* e das folhas de *E. vesicária* na atração de vespas predadoras e vespas parasitoides para seus locais de forrageio. O uso de extratos químicos de fezes e de folhas comidas primeiramente nos permitiu desvincular os sinais químicos dos visuais e nos permitiu entender melhor o quanto cada sinal é importante para o forrageio de vespas predadoras e parasitoides.

Inicialmente, examinamos se vespas predadoras apresentam um impacto negativo no desempenho das larvas de *A. monuste*, medido a sobrevivência e ganho de massa relativo das larvas. Posteriormente, verificamos se as vespas predadoras forrageiam utilizando sinais químicos emitidos pelo herbívoro e pela planta hospedeira. Finalmente testamos se os sinais químicos detectados pelas vespas predadoras são semelhantes aos detectados pela vespa parasitoide de *A. monuste*, *Cotesia glomerata* (Linnaeus) (Braconidae). Além disso, identificamos os compostos voláteis presentes nas folhas de *E. vesicaria* e nas fezes de *A. monuste*, os quais possivelmente podem ser os responsáveis pela atração de vespas predadoras e parasitoides.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Área de estudo

Todos os experimentos de campo foram conduzidos em uma área experimental de aproximadamente 1500m² localizada próximo ao Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, cidade de Campinas (22°54'S 47°03'O), São Paulo. O clima é classificado como tropical de altitude (Cwa) segundo a classificação de Köppen. A localidade em questão contém uma pequena mata com vegetação variando de árvores altas e pequenos arbustos no sub-bosque, seguida de uma área com ausência de vegetação com altura superior a dois metros, apenas com arbustos e gramíneas. Os experimentos de campo foram realizados no período de setembro a abril (nos anos de 2008 a 2011), cujos meses apresentam maior atividade de vespas predadoras (Mariscal, AA & Trigo, JR, observações pessoais). Todos os resultados são apresentados como média ± erro padrão.

2. Organismos estudados

Eruca vesicaria é natural da região mediterrânea entre Europa, Norte da África e Ásia. Foi introduzida no Brasil para fins alimentícios e só cresce em condições de cultivo, sem o qual não estabelece população. *Ascia monuste* é uma espécie Neotropical, ocorrendo desde sul dos Estados Unidos até a América Sul; os adultos utilizam principalmente plantas da ordem Brassicales, pertencentes às famílias Brassicaceae, Capparidaceae e Tropaeolaceae como hospedeira para oviposição (De Vries 1987, p. 98). As vespas predadoras estudadas são nativas do Brasil podendo ocorrer também em diversas regiões das Américas. Em geral, são, quando em comportamento de forrageio, oportunistas

generalistas, ou seja, se aproveitando de qualquer oportunidade de recurso do ambiente. Quando obtém sucesso em sua busca por recursos tendem a repetir o local de forrageio e também suas fontes de alimentos (para revisão ver Richter, 2000). A vespa *Cotesia glomerata* é um endoparasitoide cujas lavas apresentam hábito gregário, atacando diversas espécies da subfamília Pierinae que também se utilizam de plantas contendo GSL (Hopkins *et al.* 2009); ela coloca seus ovos em seus hospedeiros preferencialmente quando suas larvas estão no 1º instar (para revisão ver Laing & Levin, 1982).

Os indivíduos de *E. vesicaria*, variedade ‘Cultivada’, foram obtidos com o plantio direto de sementes adquiridas comercialmente (TopSeed, Agristar do Brasil Ltda., Petrópolis, RJ) ou através de mudas prontas obtidas de produtores locais. As sementes foram plantadas individualmente em vasos de 1 L contendo 2/3 de substrato para hortaliças PlantMax Hortaliças HT (Eucatex S.A., Paulínia, SP) e 1/3 de condicionador de solo SoloMax (Eucatex S.A., Paulínia, SP) e fertilizada de acordo com Minami & Tessarioli-Neto (1998). As mudas foram plantadas no mesmo substrato e fertilizadas como acima, e foram desbastadas após duas semanas de plantio para que restasse apenas uma planta por vaso.

As larvas de *A. monuste* foram obtidas inicialmente na região do Campus da Universidade Estadual de Campinas em suas plantas hospedeiras as brassicáceas *E. vesicaria* e *Brassica oleracea* e mantidas em laboratório de acordo com Shima & Gobbi (1981). As pupas foram transferidas para uma casa de vegetação (6,60 x 4,40 x 3,30 m, com temperatura e fotoperíodo naturais) com plantas de *E. vesicaria* e *B. oleracea* para fins de obtenção de uma população estoque para os experimentos. As larvas de 1º instar que eclodiram nas plantas dentro da casa de vegetação foram transferidas para gaiolas de madeira e tela de mosquiteiro (26 x 26 x 26 cm, Figura 2) e mantidas em laboratório (25 ±

3°C, fotoperíodo natural). Para evitar qualquer efeito materno nas larvas, somente as larvas que se alimentaram de *E. vesicaria* foram usadas nos experimentos. Para determinar o instar das larvas utilizadas nos experimentos foi usada tinta guache não tóxica (Maripel Indústria e Comercio Ltda., Diadema, SP) aplicada como um ponto com um pincel fino no dorso das larvas. A cada mudança de estágio, quando a larva realizava a ecdise, ela perdia essa marca e uma nova marca de tinta era feita. Dessa forma era visualizado quando a larva realizava a ecdise.



Figura 2. Gaiola de madeira telada usada para criação de larvas com larvas de *Ascia monuste* se alimentando de folhas de couve.

Adultos das vespas parasitoides *C. glomerata* foram obtidas de pupas que saíram de larvas de 5º instar de *A. monuste*, as quais foram coletadas em *B. oleraceae* na área experimental. As pupas foram colocadas dentro de placas de Petri com nove centímetros de diâmetro (Pirex - USA) até que os adultos emergissem (Figura 3). Após emergirem, um pedaço de algodão embebido em uma solução de água e mel de abelha (10% v/v aproximado) foi oferecido às vespas para alimentação e hidratação. Os adultos recém-emergidos de *C. glomerata* foram mantidos nas placas de Petri para que machos e fêmeas pudessem acasalar. Após dois dias, larvas de 1º e 2º instar de *A. monuste*, que eram mantidas em folhas de *B. oleraceae*, foram oferecidas como substrato para oviposição das fêmeas de *C. glomerata*, obtendo-se assim uma nova geração de vespas parasitoides.



Figura 3. Criação de vespas parasitoides *Cotesia glomerata* em placa de Petri. (A) Exúvias pupais; (B) Algodão embebido em solução de água e mel de abelha.

As vespas predadoras foram coletadas com auxílio de uma rede entomológica e identificadas com auxílio do Professor Fernando Noll do Laboratório de Vespas Sociais da Universidade Estadual Paulista (UNESP) campus São José do Rio Preto. A vespa parasitoide *C. glomerata* foi identificada com auxílio de especialistas do Laboratório de Estudos de Hymenoptera Parasitoides do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva sediado na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

3. Impacto de vespas predadoras no desempenho de larvas de *Ascia monuste*

Duzentas larvas de 3º instar de *A. monuste* foram colocadas em 40 plantas de *E. vesicaria* (cinco larvas por planta). Essas plantas, com idade entre seis e nove semanas e com oito a doze folhas expandidas, eram mantidas em vasos de 1 L, como acima. As plantas foram separadas em dois tratamentos (20 plantas / tratamento). No primeiro tratamento as vespas tinham acesso às plantas e a gaiola de exclusão era usada para excluir apenas visitação de aves. No segundo tratamento, as plantas eram protegidas da visitação de vespas por meio de uma gaiola de exclusão. As gaiolas de exclusão foram montadas com canos de PVC 3/4 (Tigre SA, Rio Claro, SP) com dimensões de 1,0 x 0,5 x 0,5 m. As gaiolas usadas para excluir aves e vespas foram cercadas com tela de mosquiteiro (Figura 4A). A gaiola usada para excluir aves e permitir o acesso de vespas foi cercada com tela de galinheiro com trama com abertura de 2,5 cm (Figura 4B). O acesso de formigas e outros predadores caminchantes foram impedidos pela aplicação de graxa de automóvel em uma estaca de madeira que isola os vasos do solo (Figura 4). As estacas com medidas de 15cm x 15cm de espessura por 60cm de altura foram fixadas no solo de forma que aproximadamente 40 cm de altura ficassem para fora do solo. No topo da estaca uma plataforma de madeira com 25cm x 25cm foi fixada para que os vasos pudessem ser

colocados. Nenhum tratamento foi aplicado para exclusão de aranhas, devido a nossas observações feitas anteriormente durante um ano constatar a ausência de predação por aranhas às larvas de *A. monuste* nessas condições. Os dois tratamentos foram lançados usando-se um desenho experimental com aleatorização dentro dos blocos (Gotelli & Ellison 2004), isto é, os dez blocos, que consistiam dos pares de tratamentos foram aleatorizados na área de estudos. Cada um dos 10 blocos continha os dois tratamentos que distavam 1,5m entre si e cada bloco eram distantes entre 5m a 20m de outro bloco (pontos 01, 03, 04, 06, 08, 10, 13, 15, 17 e 18 na Figura 5). Um grupo foi lançado em 09/12/2009 e a sobrevivência em percentagem e o ganho relativo de massa das larvas na presença e ausência de vespas foram medidas após 3 dias. Outro grupo foi lançado no dia 18/12/2009 e o mesmo procedimento foi seguido. . As larvas foram obtidas de uma mesma postura para cada um dos dois grupos de três dias, para que no início do ensaio as larvas dos dois períodos tivessem a mesma idade. As condições climáticas quando o experimento foi lançado era estável, com sol todos os dias ou com sol entre nuvens e ao menos dois dias sem chuva antes do início do experimento. A massa das larvas foi obtida em uma balança com precisão de 1,0 mg (Mettler Toledo, Suíça. 10 mg a 101 g). O ganho relativo de massa relativo foi calculado como descrito abaixo.

$$\text{Ganho relativo de massa} = \frac{\text{Massa final da larva} - \text{Massa inicial da larva}}{\text{Massa inicial da larva}} \times 100$$

A percentagem de sobrevivência foi transformada em arco seno \sqrt{p} . Tanto a percentagem de sobrevivência quanto o ganho relativo de massa foram analisados com uma ANOVA, onde o fator bloco é o par experimental com e sem vespas e o outro fator é o

impacto das vespas (dois níveis: com e sem vespas) (Gotelli & Ellison 2004). Não analisamos a interações entre bloco e impacto das vespas. O fator tempo (dois níveis: os dois diferentes dias em que os ensaios foram feitos) não foi considerado, já que análises estatísticas preliminares mostraram que os dois diferentes dias não apresentavam diferenças significativas em relação às variáveis estudadas.



Figura 4. Gaiolas de exclusão construídas com PVC e tela de mosquiteiro. A gaiola A exclui vespas, formigas e pássaros. A gaiola B permite a entrada de vespas, mas exclui aves e formigas. A estaca de madeira foi tratada com graxa de automóvel (aproximadamente no local da seta) para evitar o acesso de formigas em ambos os tratamentos.

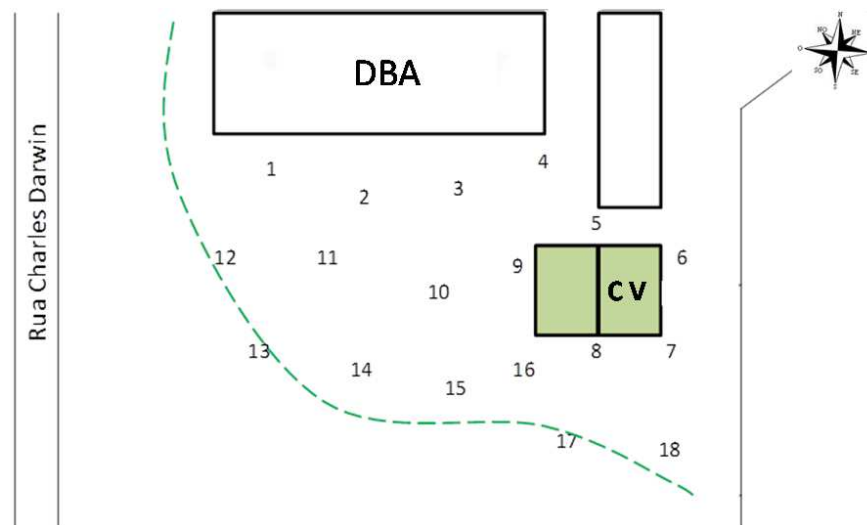


Figura 5. Esquema da área experimental utilizada para os experimentos. Cada número indica um ponto utilizado para os experimentos de escolha de sinal. A linha tracejada verde indica o limite entre a vegetação mais densa (externa aos locais de experimentação) em relação àquela menos densa (interna aos locais de experimentação). Escala aproximada: 1:600 cm. CV: Casa de Vegetação; DBA: Departamento de Biologia Animal, Prédio P Novo.

4. Comportamento das vespas predadoras em relação aos sinais químicos e visuais de *Eruca vesicaria* e *Ascia monuste*

Para determinar qual era o horário do dia de maior atividade das vespas para realizarmos os ensaios envolvendo comportamento das vespas em relação aos sinais químicos e visuais, sete vasos contendo plantas de *B. oleraceae* com uma larva de *A. monuste* cada, foram dispostos aleatoriamente na área experimental sobre estacas de madeira, como explicado acima, para evitar o acesso de formigas, mas sem as gaiolas de exclusão. No dia 25/03/2009, foi feita uma contagem das larvas nas plantas. O período de contagem foi das 6 às 18 horas, com intervalos de contagem de uma hora. Durante esse período, foram feitas observações de 15 minutos a cada hora, constatando-se que a remoção ocorreu somente por ação das vespas, confirmada pela presença de vestígios de predação por vespas.

As larvas de *A. monuste* apresentaram comportamentos de defesa contra inimigos naturais. O comportamento defensivo mais observado foi o regurgito: a larva se contorce e tenta acertar o agressor com o regurgito. Invariavelmente, como foi verificado durante quatro anos de observação do comportamento de predação das vespas e de defesa das larvas (A.A. Mariscal, observação pessoal), esta estratégia não é eficiente contra as vespas predadoras, que continuam a atacar as larvas com as mandíbulas (Figuras 6A e 6B). Ao atacar as larvas, as vespas retiram o conteúdo estomacal e o deixam nas folhas (Figuras 6B, 6C e 6D). Desta forma, conteúdo estomacal das larvas e os sinais de regurgito nas folhas são evidências do ataque das vespas predadoras às larvas de *A. monuste* (Figura 6C e 6D). Nas poucas observações de ataques de formigas, em particular *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae), as larvas se contorciam e caíam da folha, não deixando evidências do ataque por formigas da mesma forma que o ataque por vespas deixavam.



Figura 6. Etapas e vestígios de predação de larvas de *A. monuste* por vespas predadoras em *Brassica oleraceae*: (A) Ataque de vespa predadora (*Polistes canadensis*) e comportamento de defesa da larva de 4º instar regurgitando em direção à cabeça da vespa; (B) Início da retirada do conteúdo estomacal da larva; (C) Rastro de regurgito e conteúdo estomacal da larva deixado na folha (seta); (D) Sinais de predação por vespas: parte do conteúdo estomacal da larva (seta) e rastro de regurgito.

A atividade predatória das vespas teve relação com o horário do dia após o nascer do sol (Figura 7A), assim como com a temperatura (Figura 7B). A atividade teve início a partir das 8:00 h, 3 horas após o nascer do sol, chegando ao pico no período das 11:00 às 14:00 h (6 a 9 horas após o nascer do sol) e mantendo-se até o período das 15:00-16:00 h (10-11 horas após o nascer do sol). A partir deste ponto, a atividade das vespas diminuiu (Figura 7A). A partir desse resultado, escolhemos o período de 9:30 h às 15:30 h para realizarmos os experimentos de observação.

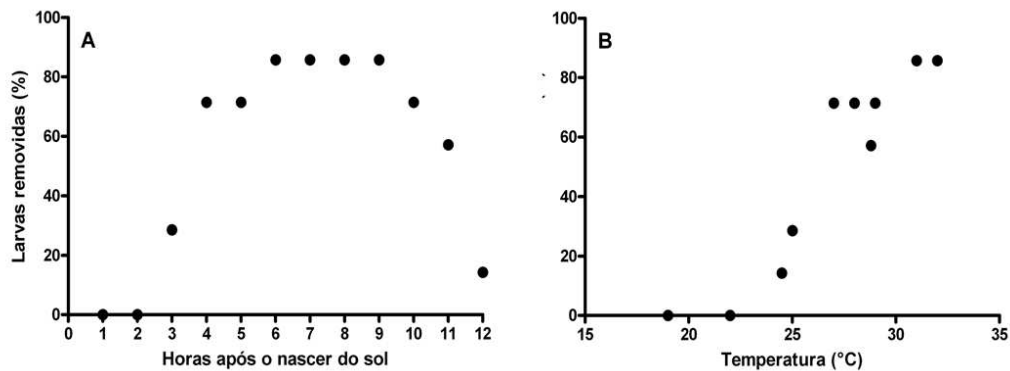


Figura 7. Remoção de larvas de *A. monuste* por vespas predadoras em função da hora do dia (A) e temperatura do ar (B).

4.1. Sinais deixados pelo herbívoro atraem vespas predadoras?

Para testar se os sinais deixados por larvas de *A. monuste* interferem no comportamento de forrageio de vespas predadoras foi observado o comportamento de forrageio das mesmas em três tratamentos descritos abaixo. Esses três tratamentos foram agrupados e dispostos de forma que formassem um triângulo equilátero com seus vértices distantes 1,5 m um do outro.

(1) Plantas intactas. Plantas de *E. vesicaria* sadias sem sinais de herbivoria.

(2) Plantas danificadas. Plantas de *E. vesicaria* que sofreram danos por 15 larvas de 3º instar de *A. monuste* por 36 horas. As fezes das larvas foram removidas para que somente a herbivoria nas folhas permanecesse como um sinal potencial às vespas. A herbivoria das plantas pelas larvas por 36 horas gerava uma perda de aproximadamente 50% das folhas. As larvas foram alocadas nas folhas de forma que todas as folhas sofressem herbivoria. O tempo transcorrido entre a retirada das larvas e os experimentos variou de zero a 3 horas.

(3) Fezes. A quantidade de fezes produzidas pelas 15 larvas do tratamento anterior (300 mg) foi colocada de forma aleatória sob as folhas das plantas de *E. vesicaria* sadias de forma a imitar o padrão gerado pelas larvas em um sistema natural. As fezes foram mantidas congeladas e colocadas nas plantas no momento do experimento.

Contrariamente ao tratamento 1, o qual atuou como um controle, nos tratamentos 2 e 3 os sinais eram tanto visuais quanto químicos. Em nenhum dos tratamentos havia larvas de *A. monuste* para que não houvesse o sinal da larva, além de evitar a presença de recurso alimentar para as vespas, eliminando assim, a possibilidade de aprendizado associativo entre a planta então visitada e uma recompensa (recurso) e a geração de pseudoréplicas nos números de visitas devido a uma só vespa visitar uma dada planta repetidamente

Com auxílio de um gravador de voz digital foi registrado o comportamento das vespas em um grupo por um período de 45 minutos em um total de 18 grupos divididos em três dias consecutivos (30/03/2009; 31/03/2009 e 01/04/2009), com condições climáticas similares (tempo estável com sol em todos os dias e ao menos dois dias sem chuva antes do início do ensaio) e em 18 locais diferentes da área experimental (Figura 5). A divisão em 3 dias consecutivos foi devido a impossibilidade de se realizar observações nos 18 grupos em um mesmo dia. Após os 45 minutos, novas plantas com os três tratamentos foram usadas para o grupo seguinte. É sabida a capacidade de vespas predadoras em aprender com experiências passadas de forrageio bem sucedido e assim melhorar seu desempenho de busca e captura de presas e também em associar características do ambiente com os locais de forrageio que já obtiveram sucesso em encontrar recursos (O'Donnell & Jeanne 1992, Richter 2000), porém não é conhecido na literatura que as vespas podem aprender a evitar locais de forrageio se encontrarem pistas de recursos sem a presença da presa. Como forma de prevenir um possível efeito de aprendizado espacial das vespas em relação aos pontos de

observação onde haviam sinais de presa sem a presa, nenhum local foi utilizado mais de uma vez e nunca o próximo grupo era disposto em um ponto distante menos de três metros ao ponto de observação anterior.

Para os três tratamentos acima, as variáveis comportamentais medidas foram:

(1) Aproximação: número de vespas que sobrevoaram próximo (aproximadamente 10cm) à planta.

(2) Pouso: Número de vespas que pousaram na superfície das plantas.

(3) Forrageio: número de vespas que realizaram pouso seguido do comportamento de antenamento e busca na superfície da planta, incluindo sobrevoos para mudança de folha.

(4) Tempo total de forrageio (em segundos): somatório dos tempos que cada vespa utilizava para realizar o comportamento de forrageio.

(5) Tempo de forrageio por vespa (em segundos): tempo total de forrageio dividido pelo total de eventos de forrageio.

Para as análises, os dados foram transformados em $\sqrt{x} + 1$ devido à grande ocorrência de zeros nas observações (Zar 1999). Como as variáveis comportamentais das vespas eram dependentes, elas foram comparadas entre os tratamentos usando-se uma MANOVA de um fator com aleatorização dentro dos blocos, onde os blocos consistiam do conjunto dos três tratamentos, o fator foi o tratamento aplicado (três níveis: plantas intactas, plantas danificadas e fezes) (Gotelli & Ellison 2004). Assumimos que os três períodos (dias) eram homogêneos em termos de condições climáticas e abundância de vespas, dessa forma não comparamos os períodos nas análises estatísticas. Assumimos também que cada vespa era um indivíduo diferente por evento. Quando um bloco apresentava valor zero em todos os tratamentos e todas as variáveis, ele foi excluído da análise devido à incerteza de

afirmar que esses valores foram devido à falta de estímulo ou se as vespas simplesmente não visitaram o local onde o bloco se encontrava. Como teste *a posteriori* para comparar as diferenças significativas dentro de cada variável, uma ANOVA de um fator com teste de LSD foram usados.

4.2. O papel dos sinais químicos na atração das vespas predadoras

Para comparar a diferença entre os sinais químicos das folhas herbivoradas de *E. vesicaria* e das fezes de *A. monuste* que se alimentaram de folhas de *E. vesicaria*, na atração de vespas predadoras, observamos o comportamento de forrageio das vespas predadoras frente a três tratamentos. O experimento foi conduzido de 22 a 24 de abril de 2011. A escolha dos volumes, quantidades e tempos foram determinados através de observações e testes realizados em condições de laboratório que permitiram chegar a volumes aproximados de fezes utilizadas durante os ensaios. Encontramos que 15 larvas de 3º instar se alimentando por 36 horas em plantas produziam em média 300 mg de fezes. O tempo foi determinado pelo dano causado pelas larvas, após 36 horas, em condições de laboratório (12:12 horas claro:escuro, 25 ± 2 °C e $60 \pm 10\%$ UR): aproximadamente 50% das folhas comidas. O número de larvas foi um número arbitrário já que em campo a quantidade de ovos de *A. monuste* em suas plantas hospedeiras pode variar de cinco a cerca de 40 ovos por oviposição (AA Mariscal & JR Trigo, observações pessoais).

(1) Extrato de fezes. Extrato diclorometânico de 300 mg de fezes de *A. monuste*. O extrato foi preparado pela extração das fezes em diclorometano (Chenco Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda., Campinas, SP) (1:10 massa:volume) em ultrassom por 10 minutos. A mistura resultante foi filtrada a vácuo e o resíduo de água removido com tratamento com sulfato de sódio anidro (LabSynth, Diadema, SP). O extrato foi seco em

rotaevaporador a temperatura ambiente e recuperado com 2,4 mL de diclorometano, representando 18 amostras de extrato de fezes com 150 µL cada. Esse volume foi aplicado homogeneamente em discos de papel filtro de 3 cm de diâmetro que foram colados, um por planta, na face abaxial de uma folha de plantas intactas de *E. vesicaria*, como acima. As folhas escolhidas para a fixação do papel filtro foram de tamanho similar e na posição média da planta para todos os tratamentos. A idade das plantas variou de 6 a 9 semanas, nessa idade as plantas continham de 8 a 12 folhas expandidas.

(2) Extrato de folhas. Extrato diclorometânico de 3,4 g de folhas danificadas de *E. vesicaria* que correspondem ao peso fresco de uma planta média de *E. vesicaria*. Essas folhas sofreram danos por 5 larvas de 3º instar de *A. monuste* até aproximadamente 50% da massa foliar ser consumida. O extrato foi preparado macerando as folhas em diclorometano (1:10 massa:volume) em N₂ líquido. O restante do procedimento foi o mesmo descrito acima para extratos de folhas.

(3) Controle. Dezoito discos de papel filtro de 3 cm de diâmetro onde foram aplicados 150 µL de diclorometano em cada um deles. Os papeis filtro foram colados, um por planta, na face abaxial de uma folha de plantas intactas de *E. vesicaria*.

Este experimento foi realizado e analisado conforme o experimento descrito no item acima (3.1. Sinais deixados pelo herbívoro atraem vespas predadoras?).

4.3. Sinais químicos que atraem predadores também atraem parasitoides?

Bioensaios com olfatômetro em Y

Os sinais químicos das folhas de *E. vesicaria* atacadas por larvas de *A. monuste* e as fezes dessas, os quais atraem vespas predadoras, também poderiam atrair parasitoides como a vespa *C. glomerata*? Para responder a essa pergunta realizamos experimentos de dupla

escolha em um olfatômetro em Y de vidro transparente usando os mesmos sinais químicos utilizados acima nos bioensaios com as vespas predadoras.

O tubo olfatômetro em Y com abertura de 1,5 cm de diâmetro e braços com 12,5 cm foi montado em uma bancada cercada por isopor branco e papel adesivo de mesma cor. Por sua vez, o conjunto foi iluminado com duas lâmpadas fluorescentes brancas de 80 Watts de forma que se formasse um ambiente homogêneo, sem interferências visuais, com temperatura média de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar $60 \pm 10\%$ (Figura 8A).

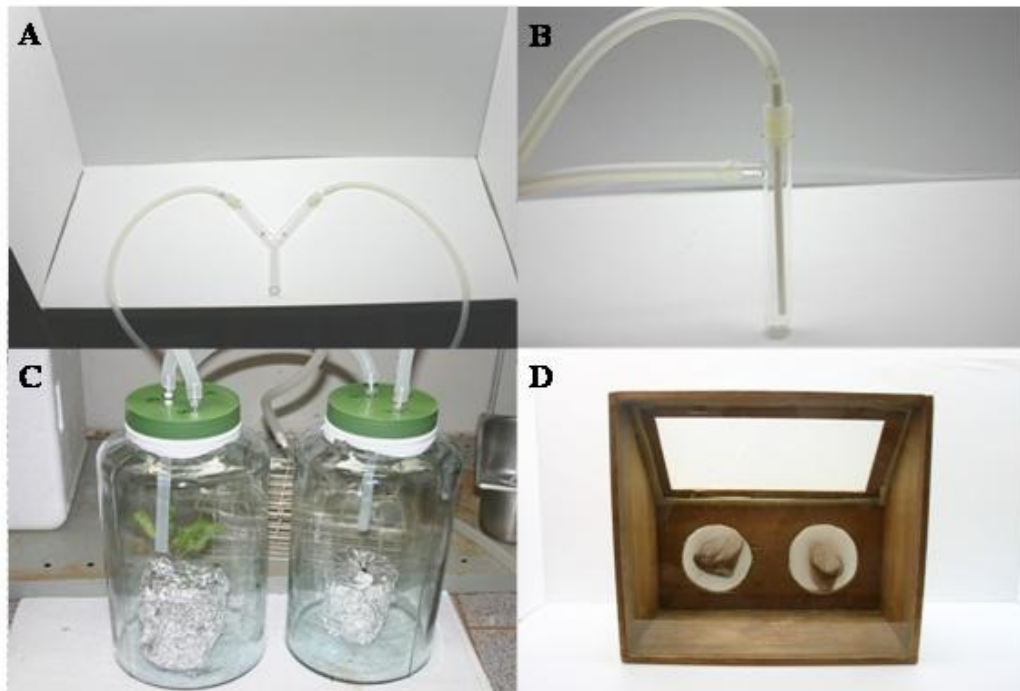


Figura 8. Sistema do ofatômetro em Y: (A) bancada cercada por isopor e adesivo branco com o tubo olfatômetro em Y; (B) tubo de ensaio modificado onde foram colocadas as fontes de odor; (C) frasco de vidro onde foram colocados os vasos contendo *Eruca vesicaria*; (D) gaiola de manipulação com abertura para mãos protegidas por meia de nylon e paredes de vidro sem corrente de vento.

Uma bomba de ar foi conectada a um filtro de carvão ativado, o qual foi ligado a um medidor de fluxo (= fluxômetro) para controlar a entrada de fluxo de ar dentro do

olfatômetro. O fluxo de ar que saia do fluxômetro para cada braço do olfatômetro foi de aproximadamente 300 mL/min por braço. Esse fluxo foi dividido em dois para que pudessem entrar no sistema que acondicionava a fonte de odor que era composta por um tubo de ensaio modificado com 15 cm de comprimento e diâmetro de 3,5 cm, (Figura 8B) ou frascos com volume de 5 L (Figura 8C) para comportar os vasos contendo as plantas de *E. vesicaria* ou as fezes de *A. monuste*, que então foram conectados ao olfatômetro (Figura 9).

Todo sistema foi conectado por mangueiras de silicone que foram lavadas antes e depois de cada ensaio com detergente Extran® (Merck Chemicals) e EtOH (Chenco, 99,3%) e posteriormente foram secas em estufa por duas horas em temperatura de 90°C. O olfatômetro em Y e os tubos onde foram colocadas as fontes de odor foram lavados com Extran® e EtOH, como acima, e foram secos a temperatura de 150°C por duas horas. Após cada observação o olfatômetro em Y foi novamente lavado com EtOH e seco em fluxo de N₂ e, após cinco observações lavado com Extran® e EtOH e deixado em estufa à 150°C por cerca de cinco minutos.

A linha de escolha, ou seja, o ponto dos braços do ofatômetro que denota a escolha do parasitoide por um dos odores, foi determinada utilizando-se vapor de gelo seco com o fluxo de ar correndo pelo sistema. Através do fluxo deste vapor, pôde-se verificar em que ponto dos braços do tubo em Y não ocorria mistura dos fluxos de ar vindo do outro braço, representando, portanto o ponto onde o parasitoide é estimulado por apenas um dos estímulos olfativos. No tubo olfatômetro testado com o fluxo de 300 mL/min, a linha de escolha foi fixada em torno dos cinco centímetros depois da junção dos dois braços do Y (Figura 9).

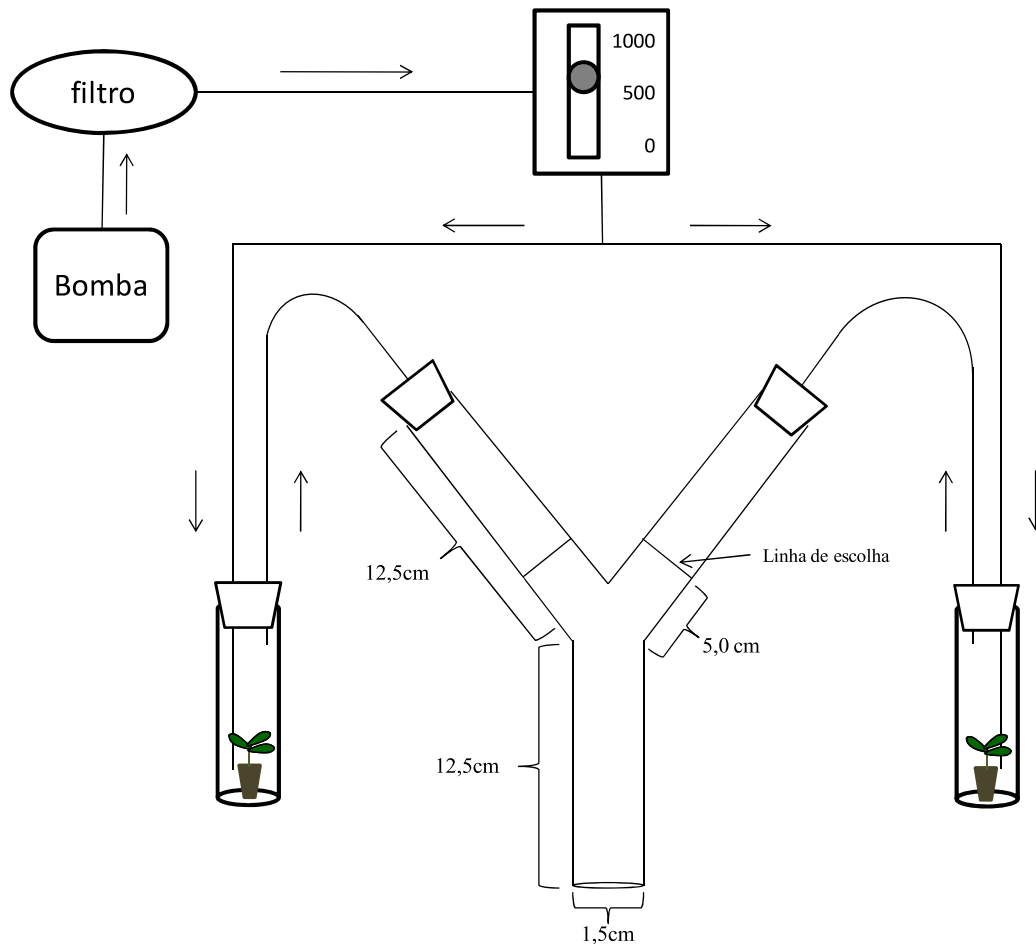


Figura 9. Desenho esquemático do sistema de olfâmetro em Y usado para testar as respostas das vespas parasitoides às fontes de odor. A bomba empurra o ar para dentro de um filtro de carvão ativado que então passa por um fluxômetro que foi ajustado para um fluxo de 600 ml/min que foi dividido em dois e seguiu para dentro do tubo de ensaio modificado ou para o frasco de vidro onde foram colocadas as fontes de odor. Então o fluxo de ar com o odor seguia para o tubo olfâmetro em Y. As setas indicam a direção do fluxo de ar.

Os experimentos de dupla escolha em olfâmetro em Y foram conduzidos com vespas fêmeas com dois dias após a eclosão das pupas para que houvesse tempo suficiente para que essas pudessem acasalar. Tendo em vista que o contexto da escolha do presente experimento é o local para oviposição, foram utilizadas somente vespas fêmeas acasaladas (n = 60 para cada ensaio). Para coletar as vespas para os experimentos, as placas de Petri

contendo as vespas foram colocadas dentro de uma gaiola de manipulação com paredes de vidro e aberturas para as mãos protegidas por tecido de meia de lycra (Figura 8D). Usando-se um tubo de vidro, uma vespa por vez foi capturada e colocada na entrada do olfatômetro em Y com o fluxo de ar. Antes de cada experimento a gaiola de manipulação foi mantida no local do experimento por uma hora para que as vespas se aclimassem às condições do local descritas acima. Foi estipulado o tempo máximo de cinco minutos para que as vespas respondessem aos estímulos químicos no olfatômetro em Y. Após esse tempo, se a vespa não escolhesse nenhum dos lados, ou não ultrapassasse a linha de escolha, considerou-se que não houve resposta. Ao passar pela linha de escolha uma vez, a observação era dada como encerrada. Não foi estipulado um tempo mínimo para a resposta, ou seja, a resposta era considerada válida por mais rápida que fosse. Todos os ensaios onde a vespa escolheu um dos lados foram considerados válidos. Para cada ensaio foram realizadas 60 repetições, sendo que cada vespa era utilizada somente uma vez. A preferência por um dos dois sinais oferecidos foi testada comparando-se o número de vespas que se dirigiam aos estímulos por uma análise de Chi-quadrado de aderência, com valores esperados iguais, e com correção de Yates (Zar, 1999). As vespas que não responderam aos estímulos não eram consideradas para a análise estatística.

Antes de iniciar o teste com as fontes de odor, 40 vespas foram testadas nas mesmas condições acima em fluxo de ar sem nenhuma fonte de odor (ar ambiente filtrado) para verificar se não havia uma tendência das vespas em serem atraídas significativamente para um dos braços do olfatômetro. Das 40 vespas testadas, 8 não responderam, 17 foram para o lado esquerdo, 14 para o lado direito, não ocorrendo preferência significativa por nenhum dos braços (χ^2 com correção de Yates = 0,129, df = 1, P = 0,719).

Para os testes com os estímulos olfativos, utilizamos quantidades reduzidas dos extratos devido ao sistema do olfatômetro ser fechado. Arbitrariamente decidimos por utilizar 10% das quantidades utilizadas nos testes com as vespas predadoras no campo devido ao sistema testado ser fechado. Somente nos ensaios que envolveram comparação entre fezes e as plantas dentro dos frascos de vidros (Figura 8C) é que a quantidade de fezes foi a mesma da utilizada nos ensaios com as vespas predadoras pelo motivo da comparação ser feita com uma planta inteira.

Os seguintes pares de sinais foram comparados usando-se uma análise de Chi-Quadrado, como descrita acima:

1. Fezes de larvas de *A. monuste* (30 mg de fezes frescas, correspondentes a 10% do utilizado no ensaio com as vespas predadoras, ou seja, o equivalente a 15 larvas de 3º instar se alimentando por aproximadamente 4 horas) *versus* controle (ar ambiente). As fezes foram trocadas a cada 10 minutos de fluxo de ar corrente pelo sistema.

2. Plantas de *E. sativa* comidas por 15 larvas de *A. monuste* durante 4 horas *versus* plantas com folhas intactas.

3. Extrato de fezes (extrato diclorometânico de 30mg de fezes de *A. monuste*, equivalente a 10% da massa utilizada para os experimentos com as vespas predadoras) *versus* controle. O extrato foi preparado como acima (ver item 3.2.1), mas com os volumes e massas alterados para esse experimento. O extrato diclorometânico das fezes, em um volume de 20ul, foi aplicado em ¼ de um disco de papel filtro de 3 cm de diâmetro que foram colocados dentro do tubo de ensaio modificado. O papel filtro era trocado a cada dez minutos aproximadamente de fluxo de ar corrente pelo sistema. No controle (apenas diclorometano), em um volume de 20ul, era aplicado em ¼ de papel filtro de um disco de

papel filtro de 3 cm de diâmetro. O papel filtro era trocado a cada dez minutos de fluxo de ar corrente pelo sistema a fim de evitar diferença na sinalização entre os ensaios.

4. Extrato de folhas (extrato diclorometânico de folhas de *E. vesicaria* correspondente a 3,4 gramas de folhas de uma planta de *E. vesicaria*, que corresponde a 10% do peso fresco de uma planta média de *E. vesicaria*) versus controle. O extrato foi preparado como acima (ver item 3.2.2), mas com os volumes e massas alterados para esse experimento. O extrato diclorometânico das folhas foi aplicado, em um volume de 20ul, em ¼ de um disco de papel filtro de 3 cm de diâmetro que foram colocados dentro do tubo de ensaio modificado. O papel filtro foi trocado a cada dez minutos aproximadamente de fluxo de ar corrente pelo sistema. O controle foi preparado da mesma maneira como descrita no item 3 acima.

5. Plantas de *E. vesicaria* danificadas por larvas de *A. monuste* versus fezes de larvas *A. monuste*. As fezes de larvas de *A. monuste* (30 mg de fezes frescas corresponderam a 10% do utilizado no ensaio com as vespas predadoras, ou seja, o equivalente a 15 larvas de 3º instar se alimentando por aproximadamente 4 horas. As fezes foram trocadas a cada 10 minutos de fluxo de ar corrente pelo sistema e a planta foi trocada a cada uma hora de fluxo de ar corrente pelo sistema.

6. Extrato de folhas de *E. vesicaria* que foram danificadas por larvas de *A. monuste* versus extrato das fezes de *A. monuste*. O extrato diclorometânico de folhas de *E. vesicaria* correspondente a 3,4 g de folhas de uma planta de *E. vesicaria*, que corresponde a 10% do peso fresco de uma planta média de *E. vesicaria* foi preparado como acima; o mesmo se aplica ao seu volume. Conforme descrito acima para os demais sinais testados, foram feitas alterações de volume e massa para esse experimento.

5. Identificação de compostos voláteis de folhas danificadas e intactas de *Eruca vesicaria* e de fezes de *Ascia monuste*

Os extratos diclorometânicos de folhas de plantas intactas (não submetidas à ação do herbívoro), plantas atacadas (plantas submetidas à herbivoria por 15 larvas de 3º instar de *A. monuste* por 36h) e fezes de larvas de *A. monuste* que se alimentaram de folhas de *E. vesicaria*, foram obtidos como acima.

Os compostos voláteis dos organismos acima foram coletados por aeração. Todas as coletas foram conduzidas em laboratório à temperatura de 25 ± 3 °C e $70 \pm 10\%$ UR. Para folhas danificadas e intactas, vasos contendo plantas submetidas a esses tratamentos foram transferidos para câmaras fechadas de saco de poliéster (Stewart-Jones & Poppy, 2006) formando um volume aproximado de 3 litros (Figura 10). O extremo inferior de cada câmara de extração de voláteis foi conectado a um fluxo de ar por meio de uma mangueira de silicone, que foi ligado a uma bomba de ar e a um filtro, composto de carvão ativado e lã de vidro que foram previamente lavados com hexano e acetona e mantido em estufa a 120 °C por 2 horas, o qual permitiu a circulação de ar do ambiente dentro da câmara. O fluxo de ar de 0,5 L/min foi medido com o auxílio de um fluxômetro. Os voláteis liberados pelas plantas ou folhas, sob os diferentes tratamentos, foram coletados por 45 minutos em uma pipeta Pasteur de vidro contendo 200 mg de um polímero adsorvente com alta afinidade por compostos orgânicos lipofílicos, tais quais os voláteis orgânicos conhecido como Porapak Q (Polímero de Etilvinilbenzeno – divinilbenzeno) (Millar & Sims, 1998), o qual foi conectado com um bomba de vácuo (Figura 10). A cada utilização do sistema de coleta, o polímero Porapak Q foi condicionado usando-se calor (120°C) durante duas horas sob fluxo de N₂, de acordo com Millar & Sims (1998). Para a coleta de voláteis das fezes, um tubo de vidro de 15 cm de comprimento e 1,0 cm de diâmetro foi utilizado como câmara para o

fluxo de ar na qual, em uma das pontas do tubo, estava conectado um filtro de carvão ativado e lã de vidro, como acima, e na outra ponta do tubo a pipeta Pasteur, contendo 200 mg de polímero adsorvente Porapak Q devidamente condicionada, como acima. A pipeta foi conectada, por uma mangueira de silicone, a uma bomba de vácuo, que foi responsável pelo fluxo de ar no sistema. O fluxo de ar de 0,5 L/min foi medido com o auxílio de um fluxômetro (Figura 11).

Os voláteis emitidos pelas fezes foram coletados por 45 minutos. Os compostos retidos no Porapak Q foram extraídos com 1mL de diclorometano PA (Merck Chemicals), volume que foi reduzido gentilmente, em fluxo de N₂ com uma pipeta Pasteur com sulfato de magnésio anidro, para 100 µL em um vidro transparente de 4 ml com tampa de teflon (Agilent).

Tanto os voláteis dos extratos diclorometânicos, quanto os extratos dos compostos voláteis das folhas e das fezes, foram caracterizados quimicamente por cromatografia gasosa-espectrometria de massas em cromatógrafo HP 6890 acoplado a um detector de massas HP 5973. A coluna cromatográfica usada foi uma HP-5MS capilar (5% fenil, 95% metilsiloxano, 30m x 0,32 um x 0.32 um, Hewlett Packard). O programa de temperatura apresentava uma temperatura inicial de 40°C por 5 min, depois aumentava 3°C/min até 240°C, e 30°C/min até 300°C, perfazendo um total de 73,67 min. A porta de injeção era mantida a 240°C, sem razão de divisão (50ml/min durante 1.50 min). O fluxo de He era de 1,4 ml/min. Os compostos foram identificados por comparação dos padrões de fragmentação usando o programa NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library Version 2.0 2008 (Agilent Technologies) e Geervliet *et al.*(1997) e Fernandes *et al.* (2009).

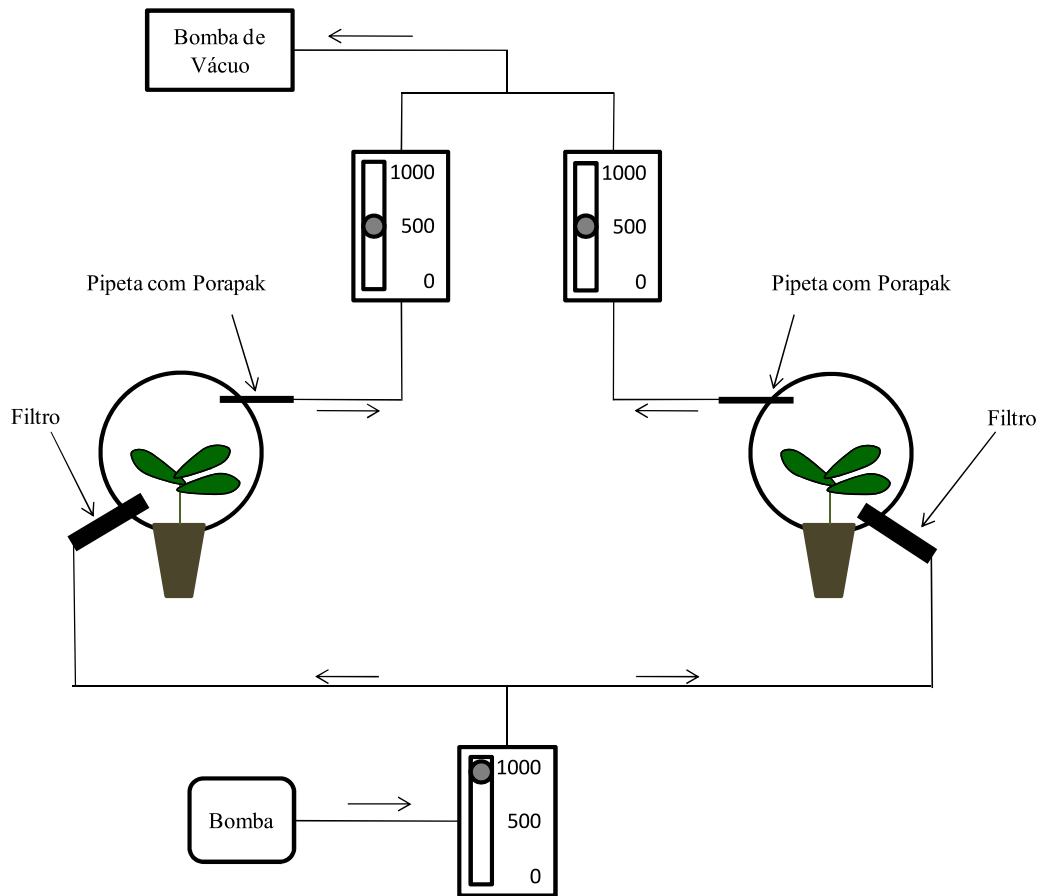


Figura 10. Desenho esquemático do sistema de coleta de voláteis de plantas de *Eruca sativa*. Uma bomba de ar empurra o ar que passa por um fluxômetro que regula o fluxo de ar em 1000 mL/min que é dividido para passar pelos filtros de carvão ativado e entrar no sistema com saco de poliéster e a planta. O ar é puxado para fora do sistema por uma bomba de vácuo que tem o fluxo regulado para 500 mL/min e que puxa o ar através da pipeta Pasteur com o polímero Porapak Q. As setas indicam a direção do fluxo de ar.

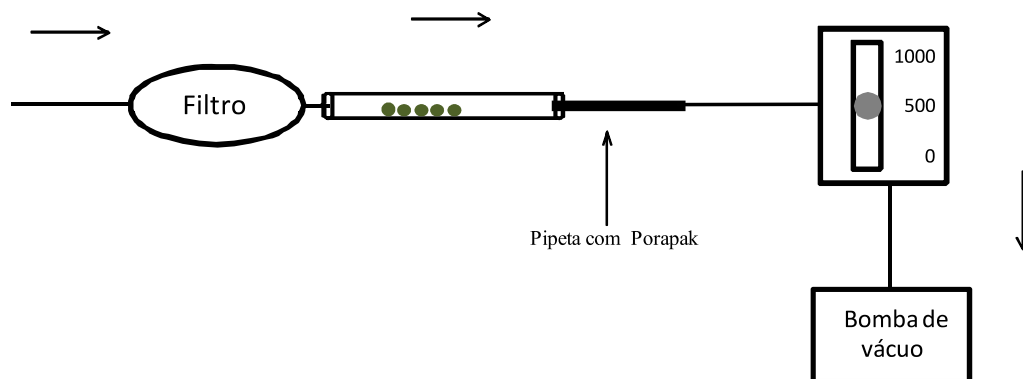


Figura 11. Desenho esquemático do sistema de coleta de voláteis de fezes e extrato de fezes de *Ascia monuste* que se alimentaram de plantas de *Eruca sativa*. Uma bomba de vácuo foi conectada a um fluxômetro com fluxo regulado para 500 mL/min que então foi conectado à pipeta Pasteur com Porapak Q. A pipeta com Porapak Q foi conectada ao tubo contendo a fonte de odor (fezes ou papel filtro embebido com extrato diclorometânico das fezes). O ar que entrou no sistema foi filtrado por um filtro de carvão ativado. As setas indicam a direção do fluxo de ar.

RESULTADOS

1. Desempenho de larvas de *Ascia monuste* na presença e ausência de vespas predadoras

No decorrer de todos os experimentos foram observadas seis espécies de vespas (Vespidae: Polistinae) forrageando em plantas de *E. vesicaria*: *Agelaia pallipes* (Olivier, 1791) (Figura 12 A), *Polybia ignobilis* (Haliday, 1836) (Figura 12 B) e *Polybia paulista* (Ihering, 1896) (Figura 12 C) pertencentes à tribo Epiponini, e *Polistes canadensis* (Linnaeus, 1758) (Figura 12 D) e *Polistes versicolor* (Oliver, 1791) (Figura 12 E) pertencentes à tribo Polistini. Devido à dificuldade de diferenciar as espécies *P. canadensis* e *Polistes lanio lanio* (Fabricius, 1775) da tribo Polistini em campo, julgamos que as duas espécies ocorreram durante os experimentos. Quando coletamos indivíduos para a identificação, apenas indivíduos da *P. canadensis* foram encontrados em campo. Esse fato não exclui a possibilidade da ocorrência concomitante das duas espécies durante os experimentos.

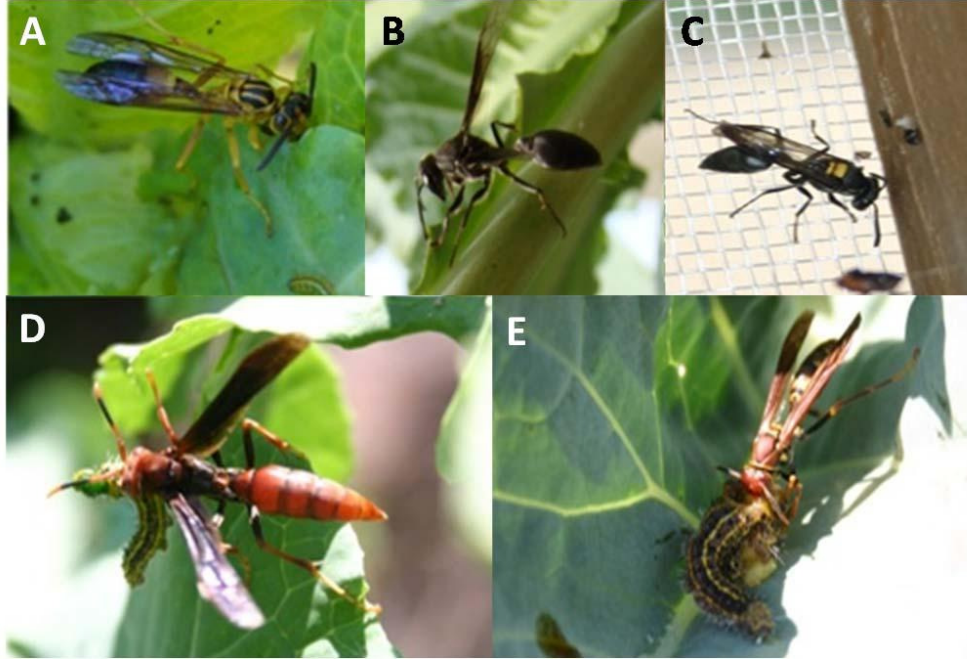


Figura 12. Vespas predadoras observadas durante os experimentos. (A) *Agelaia pallipes*, (B) *Polibya ignobilis*, (C) *Polibya paulista*, (D) *Polistes canadensis* e (E) *Polistes versicolor*. Escala das figuras em centímetros: (A) 1:0,4; (B) 1:0,55; (C) 1:0,35; (D) 1:0,65; (E) 1:1.

As larvas de *A. monuste* em gaiolas expostas à pressão de predação por vespas tiveram uma média de sobrevivência significativamente menor em relação às larvas em gaiolas protegidas de predação por vespas (dados transformados em arcoseno da raiz do dado, ANOVA de um fator com aleatorização dentro dos blocos, $F_{1,29} = 96,495$, $P < 0,001$, Tabela 1, Figura 13A). Em relação ao ganho relativo de massa fresca das larvas, àquelas que foram expostas a pressão de predação por vespas tiveram um ganho relativo de massa significativamente menor, do que àquelas que não foram submetidas a essa pressão (ANOVA de um fator com aleatorização dentro dos blocos, $F_{1,20} = 12,105$, $P = 0,002$, Tabela 1, Figura 13B).

Tabela 1. ANOVA de um fator com aleatorização dentro dos blocos para a sobrevivência (%) (percentagem transformada em arco-seno \sqrt{p}) e ganho de massa (%) de larvas de *Ascia monuste* na presença e ausência de vespas predadoras.

Variável	Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F	P
Sobrevivência	Bloco	0,761	9	0,085	0,629	0,763
	Tratamento	12,981	1	12,981	96,495	<0,001
	Resíduo	3,901	29	0,135		
Ganho de massa	Bloco	280,62	9	31,180	0,362	0,940
	Tratamento	1042,88	1	1042,88	12,105	0,002
	Resíduo	1723,04	20	86,15		

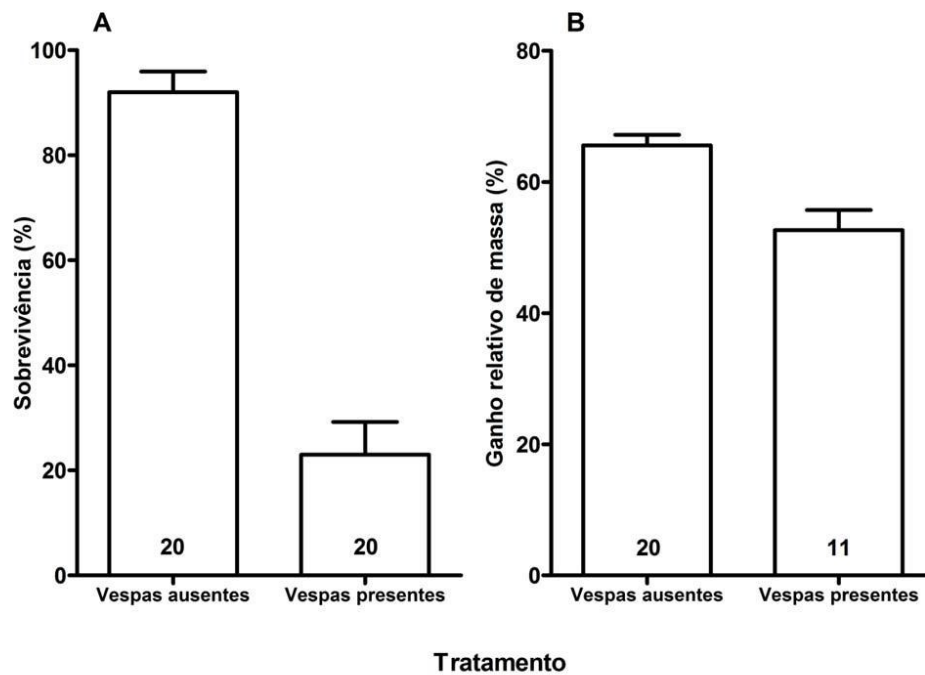


Figura 13. Percentagem de sobrevivência (A) e ganho relativo de massa (B) (média \pm erro padrão) de *Ascia monuste* na presença e na ausência de vespas predadoras. O número dentro de cada barra representa o número de vasos com plantas que, após o experimento, ainda continham larvas.

2 Sinais deixados pelas larvas atraem vespas predadoras?

Vespas apresentaram diferentes comportamentos em relação às sinalizações de *E. vesicaria* com folhas intactas controle, com folhas comidas por larvas de *A. monuste* e fezes de *A. monuste* colocadas sob as folhas de *E. vesicaria* intactas (MANOVA de um fator com aleatorização dentro dos blocos, teste de Wilks, $F_{10,48} = 6.101$, $P < 0,001$, Tabela 2A). O tratamento fezes apresentou um número significativamente maior de aproximações de vespas às plantas que o de plantas comidas, o qual, por sua vez, foi significativamente maior do que plantas intactas (ANOVA de um fator, $F_{2,28} = 30,998$, $P < 0,001$; Tabela 2B, Figura 14A). Vespas pousavam significativamente mais em plantas com fezes do que nos outros dois tratamentos (ANOVA de um fator, $F_{2,28} = 25,814$, $P < 0,001$; Tabela 2B, Figura 14B). Para forrageio, não houve nenhum evento no tratamento plantas intactas e maior ocorrência de eventos de vespas forrageando no tratamento com fezes em relação ao tratamento plantas comidas (ANOVA de um fator, $F_{2,28} = 18,661$, $P < 0,001$; Tabela 2B, Figura 14C). Quando foi comparado o tempo total de forrageio, encontramos um maior tempo de forrageio de vespas no tratamento com fezes em relação ao tratamento de folhas comidas, o qual por sua vez foi maior do que plantas intactas (ANOVA de um fator, $F_{2,28} = 13,652$, $P < 0,001$; Tabela 2B, Figura 15A). O mesmo padrão ocorreu quando testamos a diferença de tempo de forrageio por vespas (ANOVA de um fator, $F_{2,28} = 17,428$, $P < 0,001$; Tabela 2B, Figura 15B).

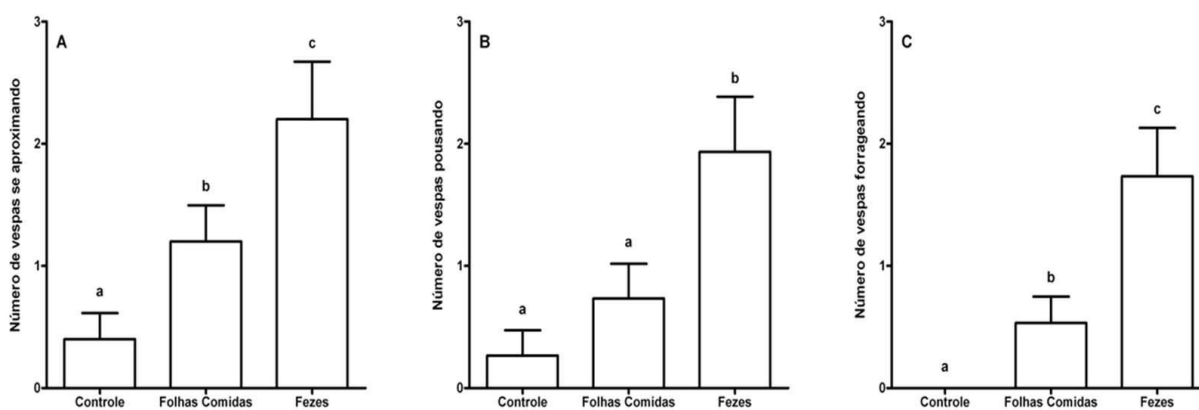


Figura 14. Número de aproximações (A), de pousos (B) e de forrageio (C) (média \pm erro padrão), de vespas predadoras frente às sinalizações de 15 blocos de *Eruca vesicaria* com folhas intactas (Controle), com folhas comidas por larvas de *Ascia monuste* (Folhas comidas) e fezes de *Ascia monuste* colocadas sob as folhas de *Eruca vesicaria* intactas (Fezes). Em cada gráfico, letras diferentes representam diferenças estatísticas (teste *a posteriori* LSD, para as ANOVAs de um fator – ver Tabela 2).

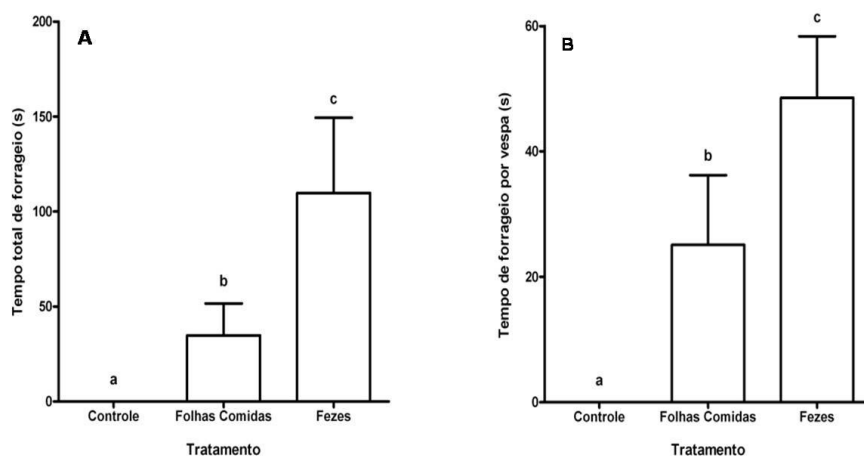


Figura 15. Tempo total de forrageio (A) e tempo médio de forrageio (B) (média \pm erro padrão) de vespas predadoras frente às sinalizações de 15 blocos *Eruca vesicaria* com folhas intactas (controle), com folhas comidas por larvas de *Ascia monuste* (Folhas comidas) e fezes de *Ascia monuste* colocadas sob as folhas de *Eruca vesicaria* intactas (Fezes). Em cada gráfico, letras diferentes representam diferenças estatísticas (teste *a posteriori* LSD, para as ANOVAs de um fator – ver Tabela 2).

Tabela 2. MANOVA de um fator com aleatorização dentro dos blocos (A) e as respectivas ANOVAS *a posteriori* (B), para cinco medidas do comportamento das vespas predadoras frente às sinalizações de *Eruca vesicaria* com folhas intactas (Controle), com folhas danificadas por larvas de *Ascia monuste* (Folhas Comidas) e fezes de *Ascia monuste* colocadas sob as folhas de *Eruca vesicaria* intactas (Fezes). Os dados foram transformados em $\sqrt{x + 1}$.

A. MANOVA						
	Teste	Valor	F	GL do Efeito	GL do Erro	P
Bloco	Wilks	0.051	1.470	70	118.350	0.032
Tratamento	Wilks	0.194	6.101	10	48.000	<0.001

B. ANOVA						
	Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F	P
Número de vespas se aproximando	Bloco	4.205	14	0.300	5.428	<0,001
	Tratamento	3.430	2	1.715	30.998	<0,001
	Resíduo	1.549	28	0.055		
Número de vespas pousando	Bloco	4.008	14	0.286	5.211	<0,001
	Tratamento	2.836	2	1.418	25.814	<0,001
	Resíduo	1.538	28	0.055		
Número de vespas forrageando	Bloco	1.462	14	0.104	1.372	0,230
	Tratamento	2.840	2	1.420	18.661	<0,001
	Resíduo	2.131	28	0.076		
Tempo Total de Forrageio	Bloco	377.299	14	26.950	1.649	0,126
	Tratamento	446.184	2	223.092	13.652	<0,001
	Resíduo	457.563	28	16.342		
Tempo de forrageio por vespa	Bloco	143.045	14	10.217	1.609	0,138
	Tratamento	221.318	2	110.659	17.428	<0,001
	Resíduo	177.789	28	6.350		

Quando comparamos o comportamento das vespas predadoras frente às sinalizações de *E. vesicaria* intactas com papel filtro tratado com diclorometano (controle), *E. vesicaria* intactas com papel filtro tratado com extrato de folhas comidas por larvas de *A. monuste* e *E. vesicaria* com folhas intactas com papel filtro tratado extrato de fezes de *A. monuste*, observamos diferenças significativas entre os tratamentos (MANOVA de um fator, teste de Wilks, $F_{10,52} = 3,335$, $P < 0,002$, Tabela 3A). Em relação ao número de vespas em aproximação, encontramos diferenças marginalmente significativas entre o controle e o extrato de fezes, com um número maior de vespas de aproximando do tratamento extrato de fezes (ANOVA de um fator, $F_{2,30} = 2,811$; $p = 0,076$; Tabela 3B, Figura 16A). Quando analisamos a atividade de pouso, encontramos um maior número de vespas pousando no tratamento de extrato de fezes em relação ao controle, bem como um número de vespas pousando no tratamento extrato de folhas marginalmente maior do que o tratamento folhas comidas (LSD, $P = 0,069$) (ANOVA de um fator, $F_{2,30} = 5,522$; $p = 0,009$; Tabela 3B, Figura 16B). Para o forrageio, o padrão foi similar ao de atividade de pouso, com número de vespas forrageando no tratamento extrato de folhas marginalmente maior do que o tratamento folhas comidas (LSD, $P = 0,066$) (ANOVA de um fator, $F_{2,30} = 5,524$; $p = 0,01$; Tabela 3B, Figura 16C). Quando foi comparado o tempo total de forrageio, encontramos um maior tempo usado pelas vespas para forragear no tratamento com extrato de fezes em relação aos tratamentos com extrato de folhas comidas e controle (ANOVA de um fator, $F_{2,30} = 5,970$; $p = 0,007$; Tabela 3B, Figura 17A). O mesmo padrão foi obtido quando analisamos o tempo de forrageio por vespas (ANOVA de um fator, $F_{2,30} = 7,219$; $p = 0,003$; Tabela 3B, Figura 17B).

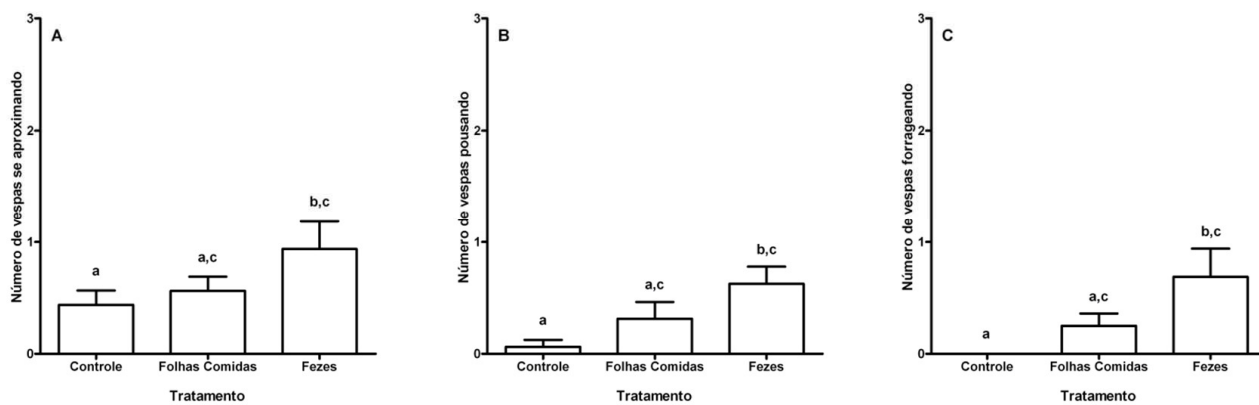


Figura 16. . Número de aproximações (A), de pousos (B) e de forrageio (C) (média \pm erro padrão) de vespas predadoras frente às sinalizações de 16 blocos de *Eruca vesicaria* com folhas intactas com papel filtro tratado com diclorometano (Controle), *Eruca vesicaria* com folhas intactas com papel filtro tratado com extrato de folhas comidas por larvas de *Ascia monuste* (Folhas comidas) e *Eruca vesicaria* com folhas intactas com papel filtro tratado extrato de fezes de *Ascia monuste* (Fezes). Para cada gráfico, letras diferentes representam diferenças estatísticas (teste *a posteriori* LSD, para as ANOVAS de um fator – ver Tabela 3).

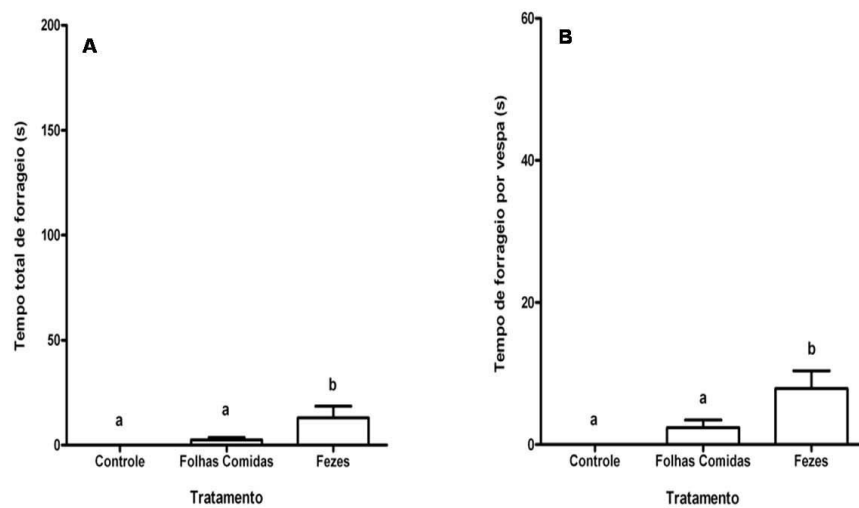


Figura 17. Tempo médio de forrageio (A) e tempo médio de forrageio por vespa (B) (média \pm erro padrão) de vespas predadoras frente às sinalizações de 16 blocos de *Eruca vesicaria* com folhas intactas com papel filtro tratado com clorofórmio (Controle), *Eruca vesicaria* com folhas intactas com papel filtro tratado com extrato de folhas comidas por larvas de *Ascia monuste* (Folhas comidas) e *Eruca vesicaria* com folhas intactas com papel filtro tratado extrato de fezes de *Ascia monuste* (Fezes). Para cada gráfico, letras diferentes representam diferenças estatísticas (teste *a posteriori* LSD, para as ANOVAS de um fator – ver Tabela 3).

Tabela 3. MANOVA de um fator com aleatorização dentro dos blocos (A), e as respectivas ANOVAS *a posteriori* (B), para cinco medidas do comportamento das vespas predadoras frente às sinalizações de *Eruca vesicaria* com folhas intactas com papel filtro tratado com clorofórmio (Controle), *Eruca vesicaria* com folhas intactas com papel filtro tratado com extrato de folhas comidas por larvas de *Ascia monuste* (Folhas comidas) e *Eruca vesicaria* com folhas intactas com papel filtro tratado extrato de fezes de *Ascia monuste* (Fezes). Para as análises os dados foram transformados em $\sqrt{x + 1}$.

A. MANOVA						
	Teste	Valor	F	GL do Efeito	GL do Erro	P
Bloco	Wilks	0.048	1.513	75.000	128.751	0.020
Tratamento	Wilks	0.371	3.335	10.000	52.000	0.002

B. ANOVA						
	Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F	P
Número de vespas se aproximando	Bloco	1.797	15	0.120	2.745	0.009
	Tratamento	0.245	2	0.123	2.811	0.076
	Resíduo	1.309	30	0.044		
Número de vespas pousando	Bloco	0.726	15	0.048	1.289	0.268
	Tratamento	0.415	2	0.207	5.522	0.009
	Resíduo	1.127	30	0.038		
Número de vespas forrageando	Bloco	0.841	15	0.056	1.125	0.378
	Tratamento	0.524	2	0.262	5.254	0.011
	Resíduo	1.496	30	0.050		
Tempo Total de Forrageio	Bloco	40.416	15	2.694	1.150	0.359
	Tratamento	27.979	2	13.990	5.970	0.007
	Resíduo	70.294	30	2.343		
Tempo de forrageio por vespa	Bloco	26.344	15	1.756	1.486	0.173
	Tratamento	17.067	2	8.533	7.219	0.003
	Resíduo	35.463	30	1.182		

3. Sinais químicos que atraem predadores também atraem parasitoides?

As fêmeas de *C. glomerata* apresentaram de 76,7% a 91,6% de respostas aos estímulos olfativos. O que equivale, dentro do total de 60 repetições para cada ensaio, a um total de resposta entre 46 e 55 vespas que responderam aos estímulos.

Quando comparamos os sinais químicos presentes nas folhas de uma planta de *E. vesicaria* que sofreu herbivoria contra uma planta de *E. vesicaria* que não sofreu herbivoria, houve um número significativamente maior de escolhas para a planta que sofreu herbivoria em relação à planta intacta (Figura 18). Para a comparação entre os sinais químicos das folhas que sofreram herbivoria presentes no extrato diclorometânico de folhas comidas contra o controle contendo apenas o diclorometano, houve um número significativamente maior de escolhas para o extrato de folhas que sofreram herbivoria em relação ao controle com diclorometano (Figura 18).

Quando comparadas fezes de *A. monuste* que se alimentaram de *E. vesicaria* contra um controle com nenhuma fonte de odor (ar limpo), não houve diferença significativa na escolha entre as fezes e o controle (Figura 18). Para os sinais químicos das fezes presentes no extrato de fezes contra um controle contendo apenas o diclorometano, houve um número significativamente maior de escolhas para o extrato de fezes em relação ao controle com diclorometano (Figura 18).

Quando foram comparadas fezes de *A. monuste* que se alimentaram de *E. vesicaria*, contra uma planta de *E. vesicaria* que sofreu herbivoria por *A. monuste*, houve um número significativamente maior de escolhas para a planta que sofreu herbivoria em relação às fezes (Figura 18). Na comparação entre os extratos diclorometânico de folhas de *E. vesicaria* que sofreram herbivoria contra o extrato de fezes de *A. monuste* que se alimentaram de *E. vesicaria*, encontramos um número significativamente maior de escolhas

para o extrato das folhas que sofreram herbivoria em relação ao extrato das fezes (Figura 18).

4. Identificação de compostos voláteis de folhas danificadas e intactas de *Eruca vesicaria* e de fezes de *Ascia monuste*

As análises por cromatografia gasosa-espectrometria de massas das aerações de plantas intactas e danificadas de *E. vesicaria*, extrato de folhas comidas de *E. vesicaria*, fezes e extrato de fezes de larvas de *A. monuste* que se alimentaram de folhas de *E. vesicaria* revelaram a presença majoritária de 5-tiometilpentano nitrila, principalmente nas fezes e 4-tiometilbutil isotiocianato, principalmente nas folhas, danificadas ou não. Esses compostos são derivados do glicosinolato glucoerucina, característico de *E. vesicaria* (Figura 19).

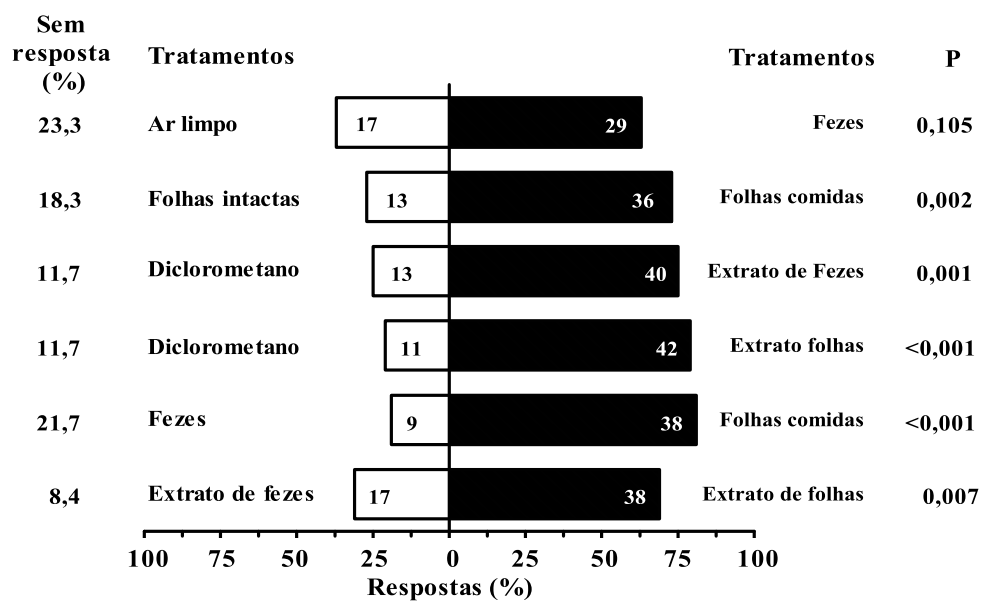


Figura 18. Porcentagem de respostas das fêmeas da vespa parasitóide *C. glomerata* por diferentes fontes de odor dentro de um olfatômetro em Y. Ao lado, as fontes de odor às quais as vespas parasitoides foram expostas. As barras indicam a porcentagem de escolha para cada fonte de odor e dentro das barras o número total de escolhas para cada fonte de odor. A somatória das porcentagens de repostas perfazem 100%. O P representa o resultado do teste de Chi-quadrado de aderência, com valores esperados iguais, e com correção de Yates (Zar, 1999).

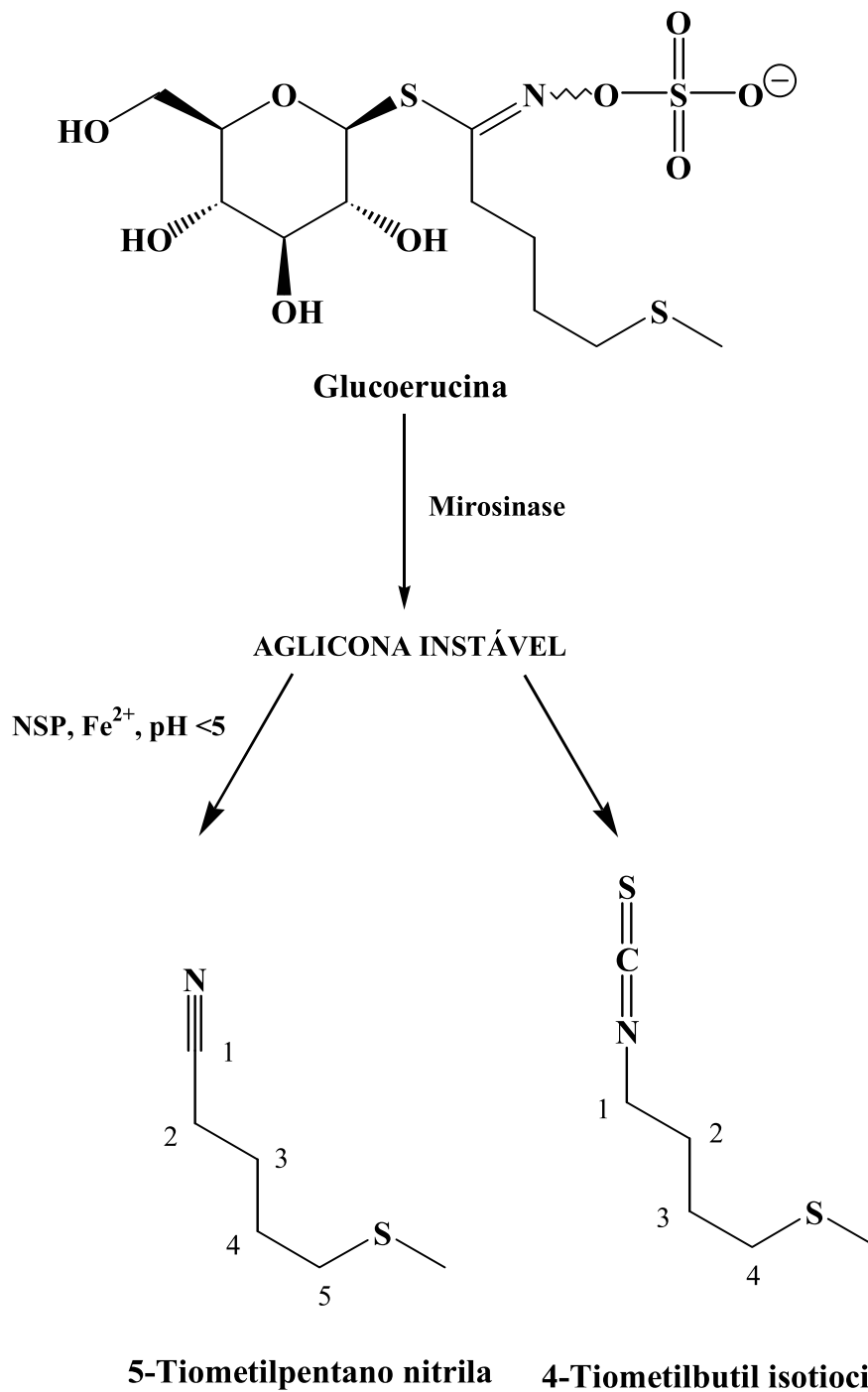


Figura 19. Derivados voláteis da glucoerucina, o principal glicosinolato de folhas de *Eruca vesicaria*.

DISCUSSÃO

1. Impacto de vespas predadoras no desempenho de larvas de *Ascia monuste*

De acordo com os resultados que encontramos nesse trabalho, sugerimos que a ação das vespas predadoras resultou tanto em efeitos diretos como em efeitos indiretos às larvas de *A. monuste*. O efeito direto observado é a diminuição da sobrevivência das larvas expostas à ação das vespas em relação às larvas protegidas da ação das vespas. Os efeitos indiretos, que são os resultados da percepção do herbívoro à presença do predador, que causou uma alteração no comportamento alimentar e de alimentação, foram notados pela diferença de ganho de massa entre os dois grupos de larvas. As larvas que ficaram protegidas da ação das vespas e, portanto, não sofreram pressão de predação, ganharam mais massa do que o grupo de larvas expostas à ação das vespas predadoras.

Os efeitos diretos causados pelas vespas são os efeitos resultantes do ataque direto das vespas às larvas, causando a morte imediata das larvas atacadas. Os efeitos indiretos também podem causar a morte de larvas, mas através de processos diferentes. Um desses processos pode ser a mudança de comportamentos das larvas que, para evitar a predação, passam a se refugiar em locais menos favoráveis e se alimentar de partes menos nutritivas das plantas. Esse comportamento pode aumentar a mortalidade das larvas devido às condições menos favoráveis de sobrevivência e alimentação. Os efeitos indiretos podem ser notados no menor ganho de massa, mesmo que marginal, das larvas que ficaram expostas à ação das vespas, indicando que as larvas passaram por algum processo que, quando comparadas com as larvas protegidas da ação das vespas, reduziu o ganho de massa.

Esse processo citado acima pode ser explicado pelo mesmo fenômeno observado

por Stamp & Bowers (1988, 1991) em que mostraram os efeitos diretos e indiretos causados por vespas predadoras em larvas de *Hemileuca lucina* (Saturniidae). Quando as larvas de *H. lucina* eram expostas às vespas predadoras, a sobrevivência diminuía devido à efeitos diretos e indiretos. As autoras discutem o fato das vespas forragearem próximas às larvas, o que leva as mesmas a mudarem de comportamento, passando a se alimentar e habitar locais menos nutritivos e mais frios das plantas, fatores que os autores consideram contribuir para a diminuição da sobrevivência das larvas. O mesmo efeito pode estar ocorrendo com as larvas de *A. monuste*. Porém, ao modificarem o comportamento para evitar o predador, o que sugerimos que influencia negativamente no seu desempenho, as larvas de *A. monuste* podem estar escapando da predação, tornando-se então um mecanismo fundamental para sua sobrevivência.

Nesse trabalho não mensuramos se, individualmente, as larvas que estavam expostas às vespas se alimentavam menos ou se deslocavam mais do que em relação às larvas protegidas das vespas. Devido aos resultados de desempenho das larvas, inferimos que esse efeito pode estar ocorrendo nas larvas sob pressão de predação das vespas. Visualmente, as plantas onde estava se alimentado as larvas protegidas das vespas apresentaram maior área de foliar que sofreu herbivoria em relação às plantas com larvas expostas às vespas (dados não apresentados). Porém, não podemos afirmar que esse efeito deve-se a uma maior ou menor alimentação individual de cada larva, mesmo por que o número de larvas foi reduzido no grupo de plantas expostas às vespas, o que, consequentemente, reduziu a herbivoria nesse grupo.

Não houve diferença estatística entre os dois períodos em que foram realizados os ensaios de predação. Os ensaios foram realizados com uma semana de diferença e com os grupos de plantas dispostas em locais diferentes nos dois períodos, o que minimiza, mas

não descarta a possibilidade de ter ocorrido aprendizado das vespas em relação à fonte de proteína oferecida nos experimentos. As vespas predadoras são grandes consumidoras de proteína animal, e a principal fonte de proteína é obtida através da predação de larvas de lepidópteros (Richter 2000). Essas, por serem abundantes em suas comunidades, devem afetar a distribuição e abundância de espécies com que interagem além de terem um papel no fluxo de matéria e energia no ecossistema (Jeanne & Davidson 1984). Desta forma, é esperado que as vespas predadoras causassem alguma diminuição nas populações de lepidópteros e, portanto, indiretamente, tenham um efeito positivo nas plantas hospedeiras desses herbívoros.

2 Sinais químicos deixados pelas larvas atraem vespas predadoras?

As vespas predadoras estudadas utilizam os sinais químicos das fezes e das folhas comidas para localizar suas presas, tal como aproximação, pouso na planta hospedeira e forrageio. Nos ensaios, em todos os vasos que continham tratamentos com a fonte de odor fezes, foram observadas mais vespas efetuando comportamentos relacionados ao forrageio quando comparado aos vasos com tratamento controle e com plantas danificadas ou sinais químicos de plantas danificadas. Adicionalmente, as vespas realizaram mais aproximações e passaram mais tempo forrageando em plantas comidas em relação ao controle com plantas intactas. Houve mais aproximação de vespas nas plantas com o extrato de planta do que nas plantas controle. Em relação aos outros comportamentos, houve atividade somente nas plantas com extrato de folha comida. Estes resultados indicam uma maior atração deste sinal em relação às plantas intactas sem sinais químicos de herbivoria. Porém, quando testamos apenas os sinais químicos das folhas comidas contra os sinais químicos das fezes através dos extratos diclorometânicos, ficou clara a preferência de escolha das vespas

predadoras pelos sinais químicos das fezes, assim como nos experimentos onde eram apresentadas às vespas as fezes contra folhas comidas. Esse maior tempo de forrageio em plantas com sinais de fezes, indica que ao chegar à planta, as vespas devem estar percebendo um sinal que representa a presença de uma presa, portanto um sinal confiável.

As vespas também passaram mais tempo forrageando nas plantas com extrato de folhas comidas, porém, somente em relação ao controle com diclorometano. Esses resultados nos faz inferir que os sinais químicos das folhas comidas têm importância na atração das vespas até as plantas, porém não são sinais que induzem um comportamento de forrageio tão longo quanto que os sinais das fezes induzem. A atração de vespas predadoras por plantas atacadas por herbívoros já foi demonstrada por Richter (1988) e Cornelius (1993), que observaram que vespas sociais são mais atraídas às folhas que sofreram danos por larvas em relação às folhas intactas, tanto pelas pistas visuais como pelas pistas químicas emitidas pelo complexo planta-hospedeiro. Porém, não ficou claro, nesses trabalhos, qual sinal é mais determinante na atração das vespas, se as pistas visuais da presença das fezes e das folhas com sinais de herbivoria ou se as pistas químicas tanto das fezes como das folhas danificadas pelos herbívoros.

Posteriormente, a importância das fezes como pistas químicas e visuais na atração de vespas predadoras foi bem demonstrado em um trabalho com larvas de *Epargyreus clarus* Cramer (Lepidoptera: Hesperiiidae) (Weiss 2003). As larvas de *E. clarus* tem o comportamento de eliminar suas fezes das folhas e dos abrigos que constroem, jogando-as para longe. A autora, ao recolocar as fezes dentro dos abrigos, observou um aumento nas visitas e no tempo médio que vespas predadoras permaneciam nas folhas com fezes. No presente trabalho ao utilizarmos o extrato das fezes, além de confirmar os achados de Weiss (2003), ficou claro que as vespas predadoras utilizam os sinais químicos, independente da

pista visual, das fezes para escolher seu local de forrageio.

Houve uma redução no tempo de forrageio nos ensaios com extratos de fezes e de folhas em relação ao ensaio com fezes e folhas comidas. Isso pode ter ocorrido devido à ausência do sinal visual ou então devido a uma possível perda de compostos olfativos durante a preparação dos extratos. A ausência da referência visual pode também explicar a não ocorrência de comportamentos associados ao forrageio quando foram testados somente os sinais químicos em vasos sem plantas.

Em nosso trabalho, quando houve pistas químicas associadas a pistas visuais (i.e., voláteis foliares associados a folhas injuriadas e voláteis de fezes associados a fezes reais), houve um maior número de ocorrências de todos os comportamentos que assumimos representar atração das vespas pelas pistas. Quando foram apresentados para as vespas somente os sinais químicos em plantas saudáveis, o número de eventos comportamentais relacionados à atração e forrageio diminuiu. Adicionalmente, quando colocamos pistas químicas das fezes em vasos sem plantas, não houve nenhuma atividade de vespas próximas aos vasos. Esse resultado pode ser um indício da importância do conjunto de sinais e pistas para as vespas predadoras interpretarem um sinal como evidência de presença de recurso alimentar.

O uso de pistas visuais por vespas predadoras é associado a reconhecimento de áreas para forrageio (sinalização usada para longas e médias distâncias) enquanto as pistas olfativas são usadas como pistas para determinar onde a vespa deve pousar (sinalização usada em curtas distâncias) (Richter & Jeanne 1985, Moreyra *et al.* 2006). Assim, sem a referência visual de uma planta (área de forrageio), somente o sinal químico não desencadeou o comportamento de forrageio nas vespas naquele local (vaso vazio).

Podemos explicar a preferência pelo uso de pistas químicas oriundas das fezes em

relação às pistas químicas das folhas pela teoria da confiabilidade e detectabilidade (Vet & Dicke 1992). Os sinais químicos das folhas podem ser detectáveis para as vespas, tanto que houve resposta das vespas para esse sinal nesse trabalho, porém não devem ser tão confiáveis quanto às pistas químicas das fezes das larvas. Por serem predadoras generalistas (Richter 2000), as vespas predadoras podem se beneficiar ao usarem sinais de fezes para encontrarem uma gama grande de presas em um ambiente heterogêneo (Weiss 2003). Os voláteis emitidos por folhas danificadas podem refletir não somente danos causados por herbívoros, mas, em alguns casos, por qualquer outro agente do ambiente, como o vento ou outros animais, sendo, portanto, menos confiáveis em relação aos sinais das fezes. As pistas químicas das fezes, além de serem detectáveis, são sinais fiéis e confiáveis da presença de uma presa.

3. Sinais químicos que atraem vespas predadoras também atraem vespas parasitoides?

Ao contrário do encontrado nos ensaios com vespas predadoras, as fêmeas de *C. glomerata* responderam, preferencialmente, aos sinais químicos presentes nas folhas em relação aos sinais das fezes. Os ensaios com olfatômetro mostraram que as vespas parasitoides escolheram os odores relacionados às folhas comidas de *E. vesicaria* em relação aos odores das fezes das larvas de *A. monuste*.

O uso, por vespas parasitoides, de pistas químicas de folhas que sofreram herbivoria por parasitoides para encontrarem seus hospedeiros já é amplamente discutido na literatura (Turlings *et al.* 1991, Mattiacci *et al.* 1994, para revisão ver Vet & Dicke 1992 e Hopkins *et al.* 2009). Estas, através dos voláteis emitidos pelas folhas, podem diferenciar plantas hospedeiras que foram atacadas por diferentes herbívoros, diferenciando hospedeiros de

não hospedeiros, e diferenciar folhas que sofreram danos mecânicos de folhas atacadas por herbívoros, mostrando a alta capacidade dessas vespas em identificarem pistas químicas confiáveis de plantas atacadas por seus hospedeiros herbívoros (Agelopoulos & Keller 1994a).

O papel das fezes de herbívoros na atração de vespas parasitoides também é bem conhecido na literatura. As vespas podem usar os sinais das fezes para diferenciar herbívoros hospedeiros de não hospedeiros (Agelopoulos & Keller 1994b, De Moraes *et al.* 1998) e fase larval (Mattiacci & Dicke 1995, Agelopoulos *et al.* 1995, Para revisão ver Weiss 2006).

4. Diferenças entre sinais químicos utilizados por vespas predadoras e parasitoides

Tanto as vespas predadoras quanto as vespas parasitoides são atraídas por sinais químicos, tanto sinais das fezes como sinais das folhas atacadas. Porém há diferenças entre as vespas predadoras e as fêmeas de *C. glomerata*: enquanto as vespas predadoras se orientam preferencialmente por sinais químicos das fezes, as fêmeas de *C. glomerata* se orientam preferencialmente por sinais químicos das folhas comidas.

Essas diferenças podem ser explicadas pela teoria da confiabilidade e detectabilidade (Louise & Vet 1992) que pode gerar diferenças nas estratégias de forrageio para cada grupo de vespas.

Uma destas diferenças pode ser em relação à importância do habitat para o forrageador. Para as vespas predadoras, as características da planta hospedeira do herbívoro não são importantes, a planta hospedeira não representa um recurso, dessa forma, a sinalização da planta seria menos importante e a sinalização das fezes, que é um sinal

honesto e confiável da presença da presa, tem mais importância para a vespa predadora. O sinal das folhas comidas podem ser detectáveis, porém são menos confiáveis do que os sinais das fezes.

Já as fêmeas de *C. glomerata* têm uma relação mais estreita com as plantas hospedeiras dos herbívoros, a qualidade destas plantas é importante, já que será a planta hospedeira onde o hospedeiro de sua prole se desenvolverá. Em uma revisão sobre a família Braconidae (Matthews 1974), a qual pertence a *C. glomerata*, é sugerido que antes de encontrar seu hospedeiro, as vespas têm que encontrar o habitat do seu hospedeiro. Uma das formas de encontrar o habitat do seu hospedeiro seria seguindo as pistas químicas do habitat do hospedeiro. Essa hipótese reforça a importância das fêmeas de *C. glomerata* identificarem sinais da planta atacada por seu hospedeiro. Logo, o sinal da planta atacada, deve ser um sinal confiável para as vespas parasitoides seguirem.

Um trabalho com uma vespa parasitoide do gênero *Cotesia*, mostrou que estas são mais atraídas por plantas recém-atacadas quando comparadas com plantas atacadas há mais tempo (Agelopoulos & Keller, 1994). Em nosso sistema foram testadas folhas recém-atacadas contra fezes. As fezes podem representar um sinal atraente para a vespa parasitoide, porém, quando deparada com um sinal químico de folhas recém-atacadas, deve haver uma preferência pelo sinal das folhas. Adicionalmente, outra característica do comportamento de forrageio de vespas parasitoides demonstrado por Wölfling & Rostás (2009) pode ajudar a explicar a preferência das fêmeas de *C. glomerata* pelas pistas químicas das folhas em detrimento as pistas químicas das fezes. Os autores mostraram que uma vespa parasitoide do gênero *Cotesia* identifica pistas químicas relativas a pegadas de sua larva hospedeira, uma larva da borboleta do gênero *Spodoptera* (Noctuidae), nas folhas que sofreram herbivoria. Eles sugerem que as vespas seriam atraídas por voláteis foliares

até o local da planta próximo de onde seus hospedeiros estariam se alimentando. Uma vez na folha as vespas seguem as pistas químicas das pegadas das larvas para encontrar o local exato da larva hospedeira. Se o mesmo ocorre com as fêmeas de *C. glomerata*, fica mais claro entender o porquê da preferência pelos sinais químicos das folhas, já que as folhas fornecem uma gama de pistas para a vespa encontrar seu hospedeiro (ver também Rostás & Wölfling 2009).

Podemos sugerir papéis diferentes para as pistas químicas das folhas e das fezes na atração das fêmeas de *C. glomerata*, enquanto as folhas emitem sinais químicos que são importantes em curtas distâncias, os sinais químicos das fezes podem estar desempenhando um papel de adicional na atração a longas distâncias. O uso dos sinais químicos das fezes para atração a longa distância já é sugerido para outras espécies de vespas parasitoides (Lewis & Tumlinson 1988, Eller *et al.* 1988), suportando essa sugestão.

Vespas predadoras são generalistas e oportunistas, podendo até se alimentar de carniças de insetos mortos por outros predadores (Richter, 2000). É esperado que a capacidade de detecção de pistas refinadas e precisas por vespas predadoras seja menor do que quando comparado com vespas parasitoides especialistas em um grupo restrito de hospedeiros, tendo, portanto, evoluído para serem precisos em encontrar seus hospedeiros. Para uma vespa parasitoide, um sinal emitido por uma folha que sofreu herbivoria recentemente e que contenha pistas como voláteis foliares decorrentes da interação com saliva do herbívoro, pistas químicas das pegadas, pistas químicas da ceda produzida pelas larvas, mais as fezes, para uma vespa parasitoide, deve ser um sinal confiável da presença de um hospedeiro. Para uma vespa predadora o sinal de folhas recém-atacadas pode ser pouco detectável ou pode se confundir com o sinal químico de folhas que sofreram danos mecânicos, sendo, portanto pouco confiável.

Já vespas predadoras generalistas e oportunistas, devem buscar no ambiente sinais mais gerais da presença de sua presa, e as fezes representam esse sinal. As vespas predadoras não devem ser atraídas por algum composto específico das fezes, mas sim por compostos gerais, comuns às fezes de muitos herbívoros. Então é esperado que vespas predadoras sejam atraídas por fezes de herbívoros de um modo geral, e foi o que encontramos em ensaios realizados em caráter preliminar na mesma área de estudo deste trabalho. Fezes de *Danaus erippus* Cramer, 1775 (Lepidoptera: Nymphalidae) que se alimentaram de *Asclepias curassavica* L. (Apocynaceae) atraíram vespas predadoras para forragearem em plantas de *A. curassavica* totalmente danificadas e já sem folhas (Daniela Rodrigues, observação pessoal).

CONCLUSÕES

Encontramos em nosso trabalho resultados que mostram o potencial de vespas predadoras em controlar populações de *A. monuste*. Porém temos que ter cuidado para não superestimar a capacidade de vespas predadoras afetarem populações de lepidópteros e em alterar a composição de espécies de uma comunidade. As condições em que foram realizados os ensaios não refletem as condições naturais em que os herbívoros vivem. A predação por diversos predadores, competição e variação na qualidade de recurso para o herbívoro são fatores importantes e podem influenciar o tamanho populacional de uma espécie. Entretanto, ficou evidente a capacidade de vespas predadoras em predação de larvas de *A. monuste* com eficiência.

A capacidade de detectar os sinais químicos e o quanto estes são confiáveis para as vespas predadoras e parasitoides gera diferenças entre o modo de forragear desses dois grupos e é o que determina a diferença entre os resultados encontrados. Para vespas predadoras, os sinais das fezes são mais confiáveis e são detectáveis, funcionando como um bom sinal para que iniciem o comportamento de forrageio. Já para as vespas parasitoides, a relação que têm com a planta hospedeira (local onde o hospedeiro de sua prole se desenvolverá) determina a importância dos sinais emitidos pelas folhas comidas como um sinal confiável para realizarem a busca por hospedeiros.

Entretanto, não conseguimos determinar se as vespas predadoras e a vespa parasitoide estariam usando compostos químicos específicos presentes nas fezes e nas folhas para se guiar ou se estariam usando uma combinação dos compostos. Trabalhos futuros podem desvendar algumas questões não respondidas por esse trabalho, como por exemplo:

1. As vespas predadoras e parasitoides estão respondendo a algum composto específico ou a um conjunto de compostos presentes no sistema folha-herbívoro e nas fezes? Ensaio similares aos executados neste trabalho, porém, comparando os compostos isolados contra compostos combinados, são necessários para concluir se os inimigos naturais da *A. monuste* estariam se referenciando por compostos isolados ou pela combinação dos compostos presentes nas fezes e nas folhas. O uso de eletro-antenograma também deve ser considerado como ferramenta para responder essa questão.

2. Larvas parasitadas têm o comportamento alterado para aumentar a sua sobrevivência frente a predadores e assim garantir a sobrevivência das larvas de parasitoides? Ensaio comparando-se alterações comportamentais, morfológicas e de sobrevivência frente à pressão de predação por vespas, ou mesmo outros predadores, podem ajudar a solucionar essas dúvidas;

3. Vespas predadoras podem ser atraídas por diferentes fezes de diferentes herbívoros? Ensaio comparando a atração de vespas predadoras às plantas com diferentes fezes podem elucidar ainda mais o quanto as fezes podem ser importantes para as vespas durante o forrageio. Se em plantas iguais, mas com fezes diferentes há preferência pela combinação fezes + planta hospedeira contra fezes + planta não hospedeira. Se houver uma preferência pelas fezes alocadas em plantas hospedeiras onde os herbívoros se alimentaram, poderá indicar a importância do conjunto de sinais fezes + plantas para as vespas predadoras. E pelo contrário, se as vespas forragearem igualmente em todas as plantas, indicará uma maior importância das fezes e não do conjunto de sinais.

Para as plantas, o que seria mais vantajoso, atrair vespas predadoras ou vespas parasitoides? Ensaio com foco no desempenho de plantas que sob pressão de herbivoria são protegidas por vespas predadoras, por vespas parasitoides e ambas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGELOPOULOS, N. A. & KELLER, M. A. 1994a. Plant-natural enemy association in the tritrophic system *Cotesia rubecula* - *Pieris rapae* - Brassicaceae (Cruciferae). II. Preference of *C. rubecula* for landing and searching. *Journal of Chemical Ecology* 20:1735-1748.
- AGELOPOULOS, N. G. & KELLER, M. A. 1994b. Plant natural enemy association in the tritrophic system *Cotesia rubecula*-*Pieris rapae*-Brassicaceae (Cruciferae). III. Collection and identification of plant and frass volatiles. *Journal of Chemical Ecology* 20:1955-1967.
- AGELOPOULOS, N. G., DICKE, M. & POSTHUMUS, M. A. 1995. Role of volatile infochemicals emitted by feces of larvae in host-searching behavior of *Cotesia rubecula* (Hymenoptera: Braconidae): A behavioural and chemical study. *Journal of Chemical Ecology* 21:1789-1811.
- AGRAWAL, A. A. 1999. Induced responses to herbivory in wild radish: Effects on several herbivores and plant fitness. *Ecology* 80:1713-1723.
- AGRAWAL, A. A. 2007. Macroevolution of plant defense strategies. *Trends in Ecology and Evolution* 22:103-109.
- ÅGREN, J. & SCHEMSKE, D. W. 1993. The cost of defense against herbivores: an experimental study of trichome production in *Brassica rapa*. *The American Naturalist* 141:338-350.
- BECERRA, J. X., VENABLE, D. L., EVANS, P. H. & BOWERS, W. S. 2001. Interactions between chemical and mechanical defenses in the plant genus *Bursera* and their implications for herbivores. *American Zoologist* 41:865-876.
- BORN, F. S. & LIMA, I. M. M. 2005. Development stadia of *Anteos menippe* (Hübner) (Lepidoptera, Pieridae) on *Cassia ferruginea* Shrad. (Caesalpinaceae), in laboratory. *Revista Brasileira de Entomologia* 49:522-526.
- BRUNA, E. M, LAPOLA, D. M., & VASCONCELOS, H. L. 2004. Interspecific variation in the defensive responses of obligate plant-ants: experimental tests and consequences for herbivory. *Oecologia* 138:558-565.

- BRUNA, E.M., DARRIGO, M. R., PACHECO, A. M. F. & VASCONCELOS, H. L. 2008. Interspecific variation in the defensive response of ant mutualists to plant volatiles. *Biological Journal of the Linnean Society* 94:241-249.
- COLE, R. A. 1976. Isothiocyanates, nitriles, and thiocyanates as products of autolysis of glucosinolates in Cruciferae. *Phytochemistry* 15:759-762.
- COLEY, P.D. 1983. Herbivory and defensive characteristics of tree species in a lowland tropical forest. *Ecological Monographs* 53:209-233.
- CORNELIUS, M. L. 1993. Influence of caterpillar-feeding damage on the foraging behavior of the paper wasp *Mischocyttarus flavitarsis* (Hymenoptera: Vespidae). *Journal of Insect Behavior* 6:771-781.
- CRAWLEY, M. J. 1989. Insect herbivores and plant population dynamics. *Annual Review of Entomology* 34:531-564.
- DALIN, P., ÅGREN, J., BJÖRKMAN, C., HUTTENEN, P. & KÄRKKÄINEN, K. 2008. Leaf trichome formation and plant resistance to herbivory. pp. 89-105. In SCHALLER, A. (ed.). 2008. *Induced plant resistance to herbivory*. Springer.
- DAVIDSON, D. W. & MCKEY, D. 1993. The evolutionary ecology of ant-plant relationships. *Journal of Hymenoptera Research* 2:13-83.
- DE MORAES, C., LEWIS, W., PARE, P., ALBORN, H., & TUMLINSON, J. 1998. Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature* 393:570-573.
- DE VRIES, P. 1987. *The butterflies of Costa Rica and their natural history*. Papilionodae, Pieridae, Nymphalidae. Princeton University Press, New Jersey.
- DICKE, M. & SABELIS, M. W. 1987. How plants obtain predatory mites as bodyguards. *Netherlands Journal of Zoology* 38:148-165.
- DICKE, M. & SABELIS, M. W. 1988. Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds. *Functional Ecology* 2:131-139.
- DICKE, M., SABELIS, M. W., TAKABAYASHI, J., BRUIN, J. & POSTHUMUS, M. A. 1990. Plant strategies of manipulating predator-prey interaction through allelochemicals: Prospect for application in pest control. *Journal of Chemical Ecology* 16:3091-3118.

- DUFFEY, S. S. 1986. Plant glandular trichomes: their partial role in defence against insects. Em: Juniper, B., Southwood, S. R. (eds.). Insects and the plant surface. Arnold. London. pp. 151-172.
- ELLER, F. J., TUMLINSON, J. H. & LEWIS, W. J. 1988. Beneficial arthropod behavior mediated by airborne semiochemicals: Source of volatiles mediating the host location flight behavior of *Microplitis croceipes* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of *Heliothis zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae). Environmental Entomology 17:745-753.
- FAHEY, J., ZALCMANN, A. & TALALAY, P. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. Phytochemistry 56:5-51.
- FERNANDES, F., PEREIRA, D. M., DE PINHO, P. G., VALENTÃO, P., PEREIRA, J. A., BENTO, A. & ANDRADE, P. B. 2009. Metabolic fate of dietary volatile compounds in *Pieris brassicae*. Microchemical Journal 93:99-109.
- FISCHER, S., SAMIETZ, J., WÄCKERS, F. L. & DORN, S. 2001. Interaction of vibrational and visual cues in parasitoid host location. Journal of Comparative Physiology A 187:785-791.
- FONSECA, C. R. S. 1994. Herbivory and the long-lived leaves of an Amazonian ant-tree. Journal of Ecology 82:833-842.
- GEERVLIT, J. B. F., POSTHUMUS, M. A., VET, L. E. M. & DICKE, M. 1997. Comparative analysis of headspace volatiles from different caterpillar- infested or uninfested food plants of *Pieris* species. Journal of Chemical Ecology 23:2935-2954.
- GOTELLI, N. J. & ELLISON, A. M. 2004. A primer of ecological statistics. Sinauer Associates Sunderland Massachusetts, USA. 479p.
- GOULD, W. P. & JEANNE, R. L. 1984. *Polistes* wasps (Hymenoptera: Vespidae) as control agents for lepidopterous cabbage pests. Environmental. Entomology 13:150-156.
- GRAVENA, S. 1983. Táticas de manejo integrado do bicho mineiro do cafeeiro *Perileucoptera coffeella* (Geurin-Meneville, 1842): I. Dinâmica populacional e inimigos naturais. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil 12:61-71.

- GREWAL, P. S., LEWIS, E. E., GAUGLER, R. & CAMPBELL, J. F. 1994. Host finding behaviour as a predictor of foraging strategy in entomopathogenic nematodes. *Parasitology* 108:207-215.
- HEIL, M. 2008. Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist* 178:41-61.
- HEINRICH, B. 1984. Strategies of thermo- regulation and foraging in two vespid wasps *Dolichovespula maculata* and *Vespula vulgaris*. *Journal of Comparative Physiology* 154:175-180.
- HOPKINS, R. J., VAN DAM, N. M. & VAN LOON, J. J. 2009. Role of glucosinolates in insect-plant relationships and multitrophic interactions. *Annual Review of Entomology* 54:57-83.
- JANZEN, D. H. 1966. Coevolution of mutualism between ants and acacias in Central America. *Evolution* 20:249-275.
- JEANNE, R. L. & DAVIDSON, D. L. 1984. Population regulation in social insects, pp. 559–590. Em C. B., Rabb, R. L. (eds.). *Ecological Entomology*. Huffaker Interscience, New York.
- JONES, M. T., CASTELLANOS, I. & WEISS, M. 2002. Do leaf shelters always protect caterpillars from invertebrate predators? *Ecological Entomology* 27:753-757.
- KISSEN, R. & BONES, A. M. 2009. Nitrile-specifier proteins involved in glucosinolate hydrolysis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 284:12057-12070.
- LAING, J. E. & LEVIN, D. B. 1982. A review of the biology and bibliography of *Apanteles glomeratus* (L.) (Hymenoptera: Braconidae). *Biocontrol News & Information*. 3:7-23.
- LARER, H., BAILEY, W. G., MILLS, P. F., & PANKIW, P. 1982. Pollination activity of *Megachile rotunda* (Hymenoptera: Apoidea). *Environmental Entomology* 11:997-1000.
- LEWIS, W. J. & MARTIN, W. R. 1990. Semiochemicals for use in biological control: status and future. *Journal of Chemical Ecology* 16:3067-3089.
- LEWIS, W. J. & TUMLINSON, J. H. 1988. Host detection by chemically mediated associative learning in a parasitic wasp. *Nature* 331:257–59.

- LIU, T.X. 2005. Biology and life history of *Ascia monuste monuste* (Lepidoptera: Pieridae), a potential pest of cruciferous vegetables. *Annals of the Entomological Society of America* 98:726-731.
- MATTHEWS, R.W. 1974. Biology of Braconidae. *Annual Review of Entomology* 19:15-32.
- MATTIACCI, L. & DICKE, M. 1995. The parasitoid *Cotesia glomerata* (Hymenoptera: Braconidae) discriminates between first and fifth larval instars of its host, *Pieris brassicae*, on the basis of contact cues from frass, silk, and herbivore-damaged leaf tissue. *Journal of Insect Behavior* 8:485-498.
- MATTIACCI, L., DICKE, M. & POSTHUMUS, M. A. 1994. Induction of parasitoid attracting synomone in brussels-sprouts plants by feeding of *Pieris brassicae* larvae: role of mechanical damage and herbivore elicitor. *Journal of Chemical Ecology* 20:2229-2247.
- MILLAR, J. G. & SIMS, J. J. 1998. Preparation, cleanup, and preliminary fractionation of extracts, pp. 2-31. Em MILLAR, J. G. & HAYNES, K. F. (eds). *Methods in Chemical Ecology*. Vol. 1. Chapman and Hall, New York.
- MINAMI, K. & TESSARIOLI-NETO, J. 1998. A cultura da rúcula. Piracicaba: ESALQ, 19p (Série Produtor Rural nº8).
- MORAIS-FILHO, J. C. & ROMERO, G. Q. 2010. Plant glandular trichomes mediate protective mutualism in a spider-plant system. *Ecological Entomology* 35:485-494.
- MORAN, N., & HAMILTON, W. D., 1980. Low nutritive quality as a defense against herbivores. *Journal of Theoretical Biology* 86:247-54.
- MOREYRA, S., D'ADAMO, P. & LOZADA, M. 2006. Odour and visual cues utilised by German yellow jackets (*Vespula germanica*) while relocating protein or carbohydrate resources. *Australian Journal of Zoology* 54:393-397.
- MÜLLER, C. & HILKER, M. 1999. Reactions of the ant *Myrmica rubra* towards tansy-feeding *Cassida* larvae (Coleoptea, Chrysomelidae). *Oecologia* 118:166-172.
- O'DONNELL, S. & JEANNE, R. L. 1992. Forager success increases with experience in *Polybia occidentalis* (Hymenoptera: Vespidae) *Insectes Sociaux*, 39:451-454

- PICANÇO, M. C., ROSADO, J. F., OLIVEIRA, I. SILVA, R. F., GONTIJO, P. C. & SILVA, R. S. 2010. Natural Biological Control of *Ascia monuste* by the Social Wasp *Polybia ignobilis* (Hymenoptera: Vespidae). *Sociobiology* 56:67-76.
- PRICE, P. W., BOUTON, C. E., GROSS, P., MCPHERRON, B. A., THOMPSON, J. N. & WEIS, A. E. 1980. Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11:41-65.
- RAINS, G. C., TOMBERLIN, J. K. & LEWIS, W. J. 2004. Limits of volatile chemical detection of a parasitoid wasp, *Microplitis croceipes*, and an electronic nose: A comparative study. *American Society of Agricultural Engineers* 47:2145-2152.
- RICHTER, M. A. R. & JEANNE, R. L. 1985. Predatory behavior of *Polybia sericea* (Olivier), a tropical social wasp (Hymenoptera: Vespidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 16:165-170.
- RICHTER, M. R. 2000. Social wasp (Hymenoptera: Vespidae) foraging behavior. *Annual Review of Entomology* 45:121-150.
- RICHTER, R. M. 1988. Prey hunting and interactions among social wasp (Hymenoptera: Vespidae) foragers and responses of caterpillars to hunting wasps. PhD Thesis. Cornell University, New York.
- ROSTÁS, M. & WÖLFLING, M. 2009. Caterpillar footprints as host location kairomones for *Cotesia marginiventris*: Persistence and chemical nature. *Journal of Chemical Ecology* 35:20–27.
- WÖLFLING, M. & ROSTÁS, M. 2009. Parasitoids use chemical footprints to track down caterpillars. *Communicative & Integrative Biology* 2:353-355.
- ROUX, O., GERS, C., TENE-GHOMSI, J. N., ARVANITAKIS, L., BORDAT, D. & LEGAL, L. 2007. Chemical characterization of contact semiochemicals for host-recognition and host-acceptance by the specialist parasitoid *Cotesia plutellae* (Kurdjumov). *Chemoecology* 17:13-18.
- ROYER, L. & BOIVIN, G. 1999. Infochemicals mediating the foraging behaviour of *Aleochara bilineata* Gyllenhal adults: sources of attractants. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 90:199-205.

- SATO, Y. 1979. Experimental studies on parasitization by *Apanteles glomeratus*. Factors leading a female to the host. *Physiological Entomology* 4:63-70
- SCHALLER, A. (ed.). 2008. Induced plant resistance to herbivory. pp 1-3. Springer Verlag, New York.
- SCHOONHOVEN, L. M., VAN LOON J. J. A. & DICKE, M. 2005. *Insect-plant biology*, Oxford University Press, Oxford.
- SHIMA, S. N. & GOBBI, N. 1981. Estudos de alguns aspectos da biologia de *Ascia monuste orseis* (Godart,1818) (Lepidoptera, Pieridae) em condições de laboratório e campo. *Revista Brasileira de Entomologia* 25:313-319.
- SMITH, S. M. 1996. Biological Control With *Trichogramma*: Advances, successes, and potential of their use. *Annual Review of Entomology* 41:375-406.
- STAMP, N. E. & BOWERS, M. D. 1988. Direct and indirect effects of predatory wasps (*Polistes* sp.: Vespidae) on gregarious caterpillars (*Hemileuca lucina*: Saturniidae). *Oecologia* 75:619-624.
- STAMP, N. E. & BOWERS, M. D. 1991. Indirect effect on survivorship of caterpillars due to presence of invertebrate predators. *Oecologia* 88:325-330.
- STEWART-JONES, A. & POPPY, G. M. 2006. Comparison of glass vessels and plastic bags for enclosing living plant parts for headspace analysis. *Journal of Chemical Ecology* 32:845-64.
- TURLINGS, T. C. J., J. H. LOUGHRIN, P. J. MCCALL, U. S. R. ROSE, W. J. LEWIS, AND J. H. TUMLINSON. 1995. How caterpillar damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Science* 92:4169-4174.
- TURLINGS, T. C. J., TUMLINSON, J. H., HEATH, R. R., PROVEAUX, A. T. & DOOLITTLE, R. E. 1991. Isolation and identification of allelochemicals that attract the larval parasitoid, *Cotesia marginiventris* (Cresson), to the microhabitat of one of its hosts. *Journal of Chemical Ecology* 17:2235-2251.
- TURLINGS, T. C. J., WACKERS, F. L., VET, L. E. M., LEWIS, W. J. & TUMLINSON, J. H. 1993. Learning of host-finding cues by hymenopterous parasitoids, pp. 51-78, Em Papaj, D. R. & Lewis A. C. (eds.). *Insect Learning*. Chapman & Hall, New York.

- UNSICKER, S. B., KUNERT, G. & GERSHENZON, J. 2009. Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Current Opinion in Plant Biology* 12:479-485.
- VAN BAEL, S. A., BRAUN, J. D. & ROBINSON, S. K. 2003. Birds defend trees from herbivores in a Neotropical forest canopy. *Proceedings of the National Academy of Science* 100:8304-8307.
- VET, L. E. M. & DICKE, M. 1992. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annual Review of Entomology* 37:141-172.
- WARWICK, S. I., GUGEL, R. K. C. GÓMEZ-CAMPO & JAMES, T. 2006. Genetic variation in *Eruca vesicaria* (L.) Cav. *Plant Genetic Resources: Characterization and utilization* 5:142-153.
- WEISS, M. 2003. Good housekeeping: why do shelter-dwelling caterpillars fling their frass? *Ecology Letters* 6:361-370.
- WEISS, M. 2006. Defecation behavior and ecology of insects. *Annual Review of Entomology* 51:635-61.
- WITTSTOCK, U. & GERSHENZON, J. 2002. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*. 5:300-307.
- WITTSTOCK, U., AGERBIRK, N., STAUBER, E., OLSEN, C., HIPPLER, M., MITCHELL-OLDS, T., GERSHENZON, J. & VOGEL, H. 2004. Successful herbivore attack due to metabolic diversion of a plant chemical defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:4859-4864.
- WÖLFLING, M. & ROSTÁS, M. 2009. Parasitoids use chemical footprints to track down caterpillars. *Communicative & Integrative Biology* 2:353-355.

WRIGHT, I. J., REICH, P. B., WESTOBY, M., ACKERLY, D. D., BARUCH Z., F.
BONGERS, CAVENDER-BARES, J., CHAPIN, T., CORNELISSEN, J. H. C.,
DIEMER, M., FLEXAS, J., GARNIER, E., GROOM, P. K., GULIAS J.,
HIKOSAKA K., LAMONT, B. B., LEE, T., LEE, W., LUSK, C., MIDGLEY, J. J.,
NAVAS, M. L., NIINEMENTS, U., OLEKSYN, J., OSADA, N., POORTER, H.,
POOT P., PRIOR, L., PYANKOV, V. I., ROUMET, C., THOMAS, S. C.,
TJOLKER, M. G., VENEKLAAS, E. J. & VILLAR, R.. 2004. The worldwide leaf
economics spectrum. *Nature* 428:821-827.

ZAR, J. H. 1999. *Biostatistical analysis*. 4th ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New
Jersey.