**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Resposta de nematoides entomopatogênicos aos voláteis
radiculares de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) sob
herbivoria de ninfas de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera:
Cercopidae)**

Mateus Tonelli

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

**Piracicaba
2014**

Mateus Tonelli
Engenheiro Agrônomo

**Resposta de nematoides entomopatogênicos aos voláteis
radiculares de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) sob
herbivoria de ninfas de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera:
Cercopidae)**

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ MAURÍCIO SIMÕES BENTO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre Ciências. Área de concentração:
Entomologia

Piracicaba
2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Tonelli, Mateus

Resposta de nematoides entomopatogênicos aos voláteis radiculares de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) sob herbivoria de ninfas de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) / Mateus Tonelli. - - Piracicaba, 2014.
49 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Busca hospedeira 2. Semioquímicos 3. Relações tritróficas 4. Cigarrinha-das-raízes
I. Título

CDD 633.61
T664r

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais PAULO e MARLENE, as
minhas irmãs LUIZA e MAÍRA e a minha namorada ANA
CAROLINA.*

AGRADECIMENTOS

A DEUS, acima de tudo, pela oportunidade de viver, pela saúde e por todas as graças concedidas;

A minha FAMÍLIA, pelo carinho, incentivo e compreensão nos momentos difíceis;

Ao Professor JOSÉ MAURÍCIO SIMÕES BENTO, pela orientação, confiança, amizade e convivência;

À professora CRISTIANE NARDI e aos demais professores da UNICENTRO pelo apoio e incentivo no início da minha formação profissional;

A todos os professores do Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao WELITON DIAS DA SILVA pela ajuda no desenvolvimento do trabalho, pelas dicas, cooperação e exemplo de dedicação;

À MARIA FERNANDA GOMES VILLALBA PEÑAFLORES pela participação no desenvolvimento do trabalho, pela paciência e disponibilidade de ajudar sempre que necessário;

A todos do Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico de Campinas, em especial ao pesquisador LUIS GARRIGÓS LEITE pelo fornecimento dos nematoides, pelo treinamento, pela prontidão e disponibilidade em ajudar, cooperação e profissionalismo;

Ao pessoal do CTC (Centro de Tecnologia Canavieira), pela cooperação e fornecimento do material vegetal utilizado nos experimentos;

Aos FUNCIONÁRIOS do departamento de entomologia e acarologia da ESALQ/USP pela prontidão em ajudar sempre que necessário;

Aos colegas de Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos da ESALQ/USP;

A todos os colegas da vila estudantil da pós-graduação pelo convívio durante estes dois anos;

A Capes, FAPESP e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia-Semioquímicos na Agricultura pelo apoio financeiro concedido.

*“Os que se encantam com a prática sem a ciência
são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola,
nunca tendo certeza do seu destino.”*

Leonardo da Vinci

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Aspectos bioecológicos da cigarrinha-das-raízes	17
2.2 Aspectos bioecológicos dos nematoides entomopatogênicos.....	18
2.3 Liberação de voláteis pelas plantas como resposta à herbivoria	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Obtenção das plantas.....	25
3.2 Criação dos insetos	25
3.3 Criação dos nematoides entomopatogênicos.....	27
3.4 Obtenção dos tratamentos	28
3.5 Bioensaio em olfatômetro de seis vias	29
3.6 Metodologia para coleta e contagem dos JIs	30
3.7 Coleta e análise dos voláteis.....	31
3.8 Análise estatística	33
4 RESULTADOS	35
4.1 Resposta olfativa dos nematoides entomopatogênicos aos voláteis radiculares de cana-de-açúcar em olfatômetro de seis vias.....	35
4.1.1 <i>Steinernema carpocapsae</i>	35
4.1.2 <i>Heterorhabditis indica</i>	35
4.2 Voláteis emitidos pelas raízes de cana-de-açúcar	36
5 DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS.....	45

RESUMO

Resposta de nematoides entomopatogênicos aos voláteis radiculares de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) sob herbivoria de ninfas de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae)

As respostas dos nematoides entomopatogênicos, *Steinernema carpocapsae* (Weiser) e *Heterorhabditis indica* (Poinar, Jackson e Klein), aos voláteis emitidos por raízes de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) danificadas ou não danificadas por ninfas da cigarrinha-da-raiz, *Mahanarva fimbriolata* (Stål), foram estudadas em laboratório. Plantas de cana-de-açúcar foram transplantadas para câmaras laterais do olfatômetro de seis vias e submetidas ou não a herbivoria por *M. fimbriolata*. Cerca de 10000 nematoides entomopatogênicos foram liberados na câmara central do olfatômetro e após 24 horas os nematoides foram contabilizados em cada câmara lateral do dispositivo. Raízes de plantas previamente danificadas ou não danificadas por *M. fimbriolata* foram destacadas das plantas, congeladas com nitrogênio líquido e maceradas. O material foi então aerado por 8 horas para a coleta dos voláteis. O perfil dos voláteis dos extratos naturais foi analisado em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS). Os nematoides de ambas as espécies foram atraídos pelos voláteis radiculares de plantas danificadas pela cigarrinha-das-raízes, em contraste com plantas não danificadas e areia umedecida (controle). As análises em GC-MS revelaram que não houve diferença qualitativa no perfil de voláteis radiculares entre os tratamentos. Por outro lado, dos 11 compostos presentes nas raízes não danificadas, di-hidro mircenol e Beta isso metioneno reduziram, significativamente, sua concentração após o ataque de *M. fimbriolata*. Estes resultados sugerem que o recrutamento de nematoides entomopatogênicos neste sistema pode ter sido influenciado pela diminuição da concentração destes dois compostos radiculares nas plantas sob herbivoria.

Palavras-chave: Busca hospedeira; Semioquímicos; Relações tritróficas; Cigarrinha-das-raízes

ABSTRACT

Response of entomopathogenic nematodes to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) root volatiles under herbivory by nymphs of *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae)

The responses of entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* (Weiser) and *Heterorhabditis indica* (Poinar, Jackson e Klein), to volatiles emitted by sugar cane roots damaged or undamaged by *Mahanarva fimbriolata* (Stål) nymphs, were investigated under laboratory conditions. Thus, sugarcane plants damaged or undamaged by *M. fimbriolata* were transplanted to lateral arms of six arm olfactometer. Approximately 10000 entomopathogenic nematodes were released in the central chamber of the olfactometer and after 24 hours, the nematodes were counted in each arm. Roots of previously damaged or undamaged plants were detached, frozen with liquid nitrogen and macerated. The material was then aerated for 8 hours to collect volatiles. The volatiles profile was analyzed by a gas chromatograph-mass spectrometer. Most nematodes of both species moved to plants that had been previously damaged over undamaged plants, and there was no significant difference in the choice of undamaged plant and only moisted sand. The GC-MS analyzes showed no qualitative difference between the root treatments volatiles profile. In both treatments, the same 11 compounds were found. Although, two compounds, dihydro myrcenol and Beta-iso-methionene, showed quantitative difference between treatments, observing greater production in undamaged plants, i.e. herbivory caused reduction in tested sugar cane roots volatiles releasing. These data provide new information about the tritrophic relationships occurring in the soil which, in the future, can be used in order to develop field management for *M. fimbriolata*.

Keywords: Host search; Semiochemicals; Tritrophic relationship; Sugarcane spittlebug

1 INTRODUÇÃO

As plantas podem se defender do ataque de herbívoros por meio de um amplo espectro de defesas físicas e químicas que podem alterar diretamente o comportamento e fisiologia dos herbívoros, ou então, favorecer os seus inimigos naturais. Este favorecimento pode ser via fornecimento de alimentos como nectários e pólen, ou, ainda, pela emissão de voláteis específicos que ajudam os inimigos naturais a localizarem o herbívoro que esteja acometendo algum dano à planta (KARBAN; BALDWIN, 1997; TURLINGS; WÄKERS, 2004).

Os voláteis liberados pelas plantas sob herbivoria são tidos como as principais pistas que os inimigos naturais utilizam para localizar seus hospedeiros, tanto acima como abaixo do solo (DICKE et al., 1990; RASMANN et al., 2005; HARE, 2011). Abaixo do solo, por exemplo, os nematoides entomopatogênicos podem utilizar sinais químicos radiculares induzidos por herbivoria para encontrar seus hospedeiros. Assim, devido ao seu tamanho diminuto e a sua pouca reserva energética, estes nematoides não se deslocam por longas distâncias sem uma pista química confiável.

Não obstante, estudos têm sido realizados no intuito de manipular estes sinais químicos para fins de manejo integrado de pragas em sistemas agrícolas (RASMANN et al., 2005, RASMANN; TURLINGS, 2008, ALI; ALBORN; STELINSKI, 2010). Entretanto, apesar da importância dos voláteis nas interações ecológicas subterrâneas entre planta, praga e inimigo natural, estudos aplicados ao entendimento deste processo ainda são escassos para diversas espécies vegetais, notavelmente a cana-de-açúcar, *Saccharum officinarum* L.

No Brasil, a cana-de-açúcar é a principal matéria-prima para fabricação de etanol e açúcar, gerando divisas de grande impacto sobre a balança comercial do país. Dentre os problemas fitossanitários desta cultura, a cigarrinha-das-raízes, *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae), é uma das mais importantes (PINTO; BOTELHO; DE OLIVEIRA, 2009). As ninfas deste hemíptero causam severas perdas sobre a produção desta cultura por meio da sucção da seiva (DINARDO-MIRANDA et al., 2004). Recentemente, os prejuízos causados por esta praga, vêm aumentando consideravelmente, devido à substituição da colheita manual pela colheita mecanizada que dispensa a queimada prévia da palhada da cana (DINARDO-MIRANDA et al., 1999; DINARDO-MIRANDA et al., 2004). Neste

cenário a praga encontra condições ideais para sua reprodução por um período maior do ano.

Apesar da importância econômica da cana-de-açúcar, e das diversas pragas que comprometem a sua produção, como é o caso da cigarrinha-das-raízes, nenhum estudo ainda foi feito para entender as relações tróficas subterrâneas entre esta cultura-praga-inimigo natural. Estes estudos podem fornecer informações valiosas sobre os mecanismos utilizados pelos inimigos naturais do solo para localização de seu hospedeiro, considerando que a especificidade de determinados compostos voláteis liberados pelas plantas após a indução, pode ser causada por vários fatores como tipo de alimento, constituintes salivares e extensão do dano causado pelo herbívoro. Além disso, diferentes espécies de plantas produzem diferentes misturas de voláteis radiculares sob herbivoria, e esta produção diferencial está amplamente correlacionada com a atração de nematoides (RASMANN; TURLINGS, 2008).

O uso atual de estratégias de manejo para algumas pragas de solo envolve a rotação de culturas e o emprego de inseticidas, mas algumas espécies de insetos têm apresentado resistência a ambos os métodos. Ademais, os inseticidas de solo que ainda são efetivos oferecem riscos ao meio ambiente e a saúde humana (ALI; ALBORN; STELINSKI, 2010).

Diante disso, neste trabalho avaliou-se a resposta dos nematoides entomopatogênicos *Steinernema carpocapsae* (Weiser) (Rhabditida: Steinernematidae) e *Heterorhabditis indica* (Poinar, Jackson e Klein) (Rhabditida: Heterorhabditidae) aos voláteis radiculares emitidos por plantas de cana-de-açúcar sob herbivoria de ninfas da cigarrinha-das-raízes, *M. fimbriolata*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos bioecológicos da cigarrinha-das-raízes

A cigarrinha-das-raízes, *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae), foi primeiramente descrita por Stål em 1854 como pertencente ao gênero *Monecphora* (GUAGLIUMI, 1970). Em 1968 a espécie foi transferida para o gênero a qual pertence hoje, por Fennah, que levou em consideração as características morfológicas da genitália dos machos.

Esta espécie possui metamorfose incompleta (hemimetábolos) passando pelos estágios de ovo, ninfa e adulto (TERÁN, 1987). As ninfas recém-eclodidas medem cerca de 1 mm e, após quatro ecdises, atingem 10 mm quando então sofrem a última ecdise e passam para o estágio adulto (AZZI; DODSON, 1971; MENDONÇA; BARBOSA; MARQUES, 1996).

As ninfas atacam preferencialmente as raízes das plantas hospedeiras, principalmente cana-de-açúcar, causando o efeito denominado como “desordem fisiológica”, impedindo o fluxo de água e nutrientes, necrosando as raízes e favorecendo a entrada de fungos patogênicos.

Nos locais onde a ninfa se desenvolve é comum a presença de uma densa espuma secretada pelas suas glândulas localizadas no sétimo e oitavo urômeros, chamadas glândulas de ‘Batelli’ (FEWKES, 1969). A quantidade de espuma secretada é dependente da sucção de seiva feita, e geralmente, é maior com o passar dos instares (FREIRE; SOUTO; MARQUES, 1968). Com isso, a ausência de umidade no ambiente pode comprometer o desenvolvimento do inseto. Por esta razão, o período de maior ocorrência destes insetos se dá nos meses quentes e úmidos do ano, enquanto que nos meses secos e frios, tanto as ninfas como os adultos são raramente encontrados, permanecendo neste período somente ovos em diapausa, na base das plantas (BOTELHO et al., 1976).

Os adultos de *M. fimbriolata* vivem na parte aérea da planta e se alimentam sugando a seiva das folhas, preferencialmente apicais, e partes verdes do colmo. Medem aproximadamente 11 a 12 mm de comprimento e 5 mm de largura, sendo os machos geralmente maiores que as fêmeas (GUAGLIUMI, 1972). Além disso, os machos são avermelhados com as tégminas orladas de preto e com uma faixa

longitudinal da mesma cor, enquanto que as fêmeas apresentam tégminas marrom-avermelhadas (MARICONI, 1963).

O acasalamento geralmente ocorre logo após a emergência do adulto, independente da hora do dia (FREIRE; SOUTO; MARQUES, 1968). A postura, geralmente é feita nas estações úmidas, três a quatro dias após a fecundação. Os ovos são depositados próximos às raízes das plantas, podendo ser em touceiras, no solo perto do colmo e, principalmente, nas bainhas secas (GUAGLIUMI, 1972; FREIRE; SOUTO; MARQUES, 1968).

Cada fêmea coloca em média de 50 a 70 ovos durante, aproximadamente, 10 dias (FREIRE; SOUTO; MARQUES, 1968). Após o período de incubação, que leva 18 ± 3 dias, as ninfas eclodem e logo em seguida se deslocam às raízes das plantas para iniciar a sucção de seiva, permanecendo ali ao redor de 35 ± 3 dias, que compreende todo o período ninfal (MENDONÇA; BARBOSA; MARQUES, 1996). Assim, podem ocorrer de três a quatro gerações do inseto durante o período chuvoso no sudeste brasileiro.

Com a expansão das áreas de colheita de cana-de-açúcar sem queima prévia, este inseto vem se tornando uma praga de grande importância, uma vez que a palhada remanescente na área forma um microclima ideal para o seu desenvolvimento (DINARDO-MIRANDA et al., 2004).

2.2 Aspectos bioecológicos dos nematoides entomopatogênicos

Os nematoides são organismos não segmentados, também chamados de vermes cilíndricos e pertencentes ao Filo Nemata, um dos grupos mais numerosos do planeta (DOLINSKI, 2006). Alguns nematoides apresentam a capacidade de provocar a morte de insetos, e por isso são chamados de entomopatogênicos. As principais espécies com capacidade entomopatogênica são encontradas nos gêneros *Steinernema*, *Neosteinernema* e *Heterorhabditis* (HOMINICK; REID; BOHAN, 1996; ADAMS; NGUYEN, 2002).

O ciclo de vida dos nematoides entomopatogênicos inclui os estágios de ovo, juvenil e adulto, sendo que a fase juvenil é composta por quatro subfases chamadas de J1, J2, J3 ou Juvenil Infectivo (JI) e J4. Os Juvenis Infectivos (JIs) são de vida livre e o único estágio capaz de sobreviver sem alimento até encontrar um hospedeiro (DOLINSKI, 2006).

No solo, os JIs buscam encontrar o hospedeiro para penetra-lo e alcançar a hemocele, a partir de aberturas do corpo (boca, espiráculos, poro anal e genital) e cutícula. A penetração cuticular é feita pelas espécies do gênero *Heterorhabditis*, devido a presença de um dente rígido localizado frontalmente na sua extremidade anterior (KAYA; GAUGLER, 1993; DOLINSKI, 2006).

No interior do tubo digestivo dos nematoides entomopatogênicos encontram-se bactérias simbióticas que permanecem com metabolismo e crescimento controlado até que um inseto hospedeiro seja encontrado. Existe uma grande especificidade na simbiose entre a bactéria e o nematoide, sendo que nos nematoides do gênero *Heterorhabditis* encontram-se apenas bactérias do gênero *Photorhabdus* e nos nematoides do gênero *Steinernema* apenas bactérias do gênero *Xenorhabdus* (DOWDS; PETERS, 2002).

Assim que o nematoide consegue alcançar a hemocele do inseto, os JIs liberam as bactérias neles contidas, iniciando uma infecção que, dentro de 24 a 48 horas, pode levar a morte do inseto (CHICHE; ENSIGN, 2003).

No interior do inseto os nematoides se alimentam, desenvolvem, acasalam e reproduzem por múltiplas gerações, antes que o juvenil infectivo rompa o cadáver do hospedeiro e chegue ao ambiente (KAYA; BEDDING; AKHURST, 1993).

Em *Heterorhabditis*, após a entrada, o JI se desenvolve em uma fêmea hermafrodita com capacidade de se autofertilizar. Ela retém os ovos no seu interior até que as larvas eclodam e rompam os tecidos da mãe, que acaba morrendo. Fora da mãe, os juvenis de segunda geração se alimentam e se desenvolvem em adultos de ambos os sexos que se reproduzem, de modo que esse ciclo de macho e fêmea se repete até que se esgotem as reservas do inseto. Quando acabam as reservas do hospedeiro, os juvenis de primeiro estágio (J1) passam para o estágio J2 e sucessivamente ao estágio JI, quando então são liberados ao meio externo a procura de um novo hospedeiro (POINAR, 1990).

No caso de *Steinernema*, a penetração ocorre pela boca, espiráculos ou ânus do inseto. Dentro do inseto os JIs se desenvolvem em machos e fêmeas adultos de primeira geração, possibilitando a ocorrência da cópula. Inicialmente, os ovos fertilizados são postos e, mais tarde, alguns são retidos no interior do abdômen da fêmea até a eclosão dos J1, quando rompem a parede do corpo da mãe e atingem também o inseto, onde vão se alimentar. Alguns J1 mudam para o estágio J2 e posteriormente vão se transformar em JI. Outros J1 vão completar o ciclo de

desenvolvimento, passando por J2, J3, J4 e adultos de segunda geração. Estes adultos copulam e novos ovos e juvenis são liberados. Assim como em *Heterorhabditis*, quando os recursos alimentares se esgotam, estes ciclos de reprodução cessam e os JIs migram para o ambiente, onde permanecem até encontrarem outro inseto e reiniciar o ciclo (NGUYEN; SMART, 1992).

Quanto à estratégia utilizada para infectar os insetos, os JIs são agrupados em três categorias: emboscadores, cruzadores e intermediários (LEWIS, 2002). De uma maneira geral os nematoides do gênero *Heterorhabditis* são do tipo cruzador, ou seja, se arrastam pelo solo a procura do hospedeiro. Já os *Steinernema* são tanto cruzadores como emboscadores.

Até recentemente acreditava-se que o direcionamento desses nematoides até o hospedeiro era favorecido principalmente por pistas como produtos de excreção, níveis de gás carbônico (CO₂) e gradiente de temperatura (DOLINSKI, 2006). Entretanto, trabalhos recentes indicam que o comportamento dos nematoides entomopatogênicos é coordenado e definido a partir da integração de muitos estímulos externos, como luz, temperatura, compostos químicos, umidade, entre outros (JONES, 2002).

Os nematoides captam estes estímulos por meio de dois órgãos sensitivos, ou seja, os órgãos cuticulares e órgãos internos. Os órgãos cuticulares são responsáveis por detectar estímulos químicos, mecânicos e térmicos, enquanto que os órgãos internos são responsáveis pela detecção de estímulos mecânicos e luminosos (JONES, 2002). Devido à complexidade e abundância dos compostos químicos presentes no solo se comparados com estímulos físicos, a quimiotaxia é sem dúvidas a mais importante fonte de estímulos (RASMANN et al., 2012).

Outro aspecto importante é a eficiência dos nematoides entomopatogênicos em provocar a morte do hospedeiro. Leite et al. (2005) observaram que ninfas de *M. fimbriolata* apresentam uma elevada suscetibilidade ao ataque de diferentes espécies de *Heterorhabditis* e *Steinernema* em laboratório. Por exemplo, *Heterorhabditis indica* (Poinar, Jackson e Klein) pode causar 100% mortalidade de insetos hospedeiros cinco dias após a aplicação do isolado.

Devido ao potencial do uso de nematoides entomopatogênicos para o manejo integrado de pragas no campo, é de extrema importância que a espécie de nematoide utilizada seja compatível com o agroecossistema da área, visando diminuir os riscos de desequilíbrios e aumentar a efetividade do controle.

2.3 Liberação de voláteis pelas plantas como resposta à herbivoria

Durante o processo evolutivo as plantas desenvolveram diferentes mecanismos de defesas contra os herbívoros, sendo estes divididos em dois grupos: i) defesas diretas – produção e liberação de toxinas; e ii) defesas indiretas – fornecimento de alimento e abrigo, ou emissão de voláteis que aumentam a eficiência do inimigo natural para localizar o hospedeiro (COLEY; BRYANT; CHAPIN, 1985; AGRAWAL, 1998). Alguns autores sugerem ainda que as defesas indiretas são as principais responsáveis pela manutenção das plantas no planeta (SABELIS; JANSSEN; BRUIN, 1999).

As primeiras evidências sobre a ocorrência da defesa indireta em plantas foram obtidas de estudos feitos na parte aérea, onde ocorrem maiores danos pelos herbívoros e prejuízos à planta (DICKE et al., 1990; TURLINGS et al., 1995; SABELIS; JANSSEN; BRUIN, 1999). Porém, mesmo que no solo exista uma menor pressão de ataque sobre a planta, em alguns casos qualquer dano ocasionado nas raízes pode comprometer o desenvolvimento de toda a planta (van TOL et al., 2001).

As primeiras investigações sobre as defesas indiretas na parte subterrânea apontavam o CO₂ como único a mediar as interações tritróficas no solo (BRANSON, 1982). Neste caso, como todas as plantas liberam CO₂ pelo processo de respiração celular, a detecção deste gás pelos inimigos naturais seria dose-dependente, restringindo-se a capacidade de detectar diferenças na concentração deste composto (JOHNSON; GREGORY, 2006). Contudo, hoje já se sabe que existem outros elementos que participam destas interações, com destaque para as pistas olfativas que medeiam a busca hospedeira de organismos do solo.

Os voláteis de indução, ou seja, aqueles produzidos pela planta após o ataque de herbívoros são representados pelos voláteis de folhas verdes, monoterpenos, sesquiterpenos, homoterpenos e terpenoides, que são atrativos aos parasitoides, quando liberados pela parte aérea (HOBALLAH; TURLINGS, 2005) e aos nematoides entomopatogênicos, quando liberados pelas raízes (van TOL et al., 2001; BOFF; van TOL; SMITS, 2001; BERTIN et al., 2003; RASMANN et al., 2005; RASMANN; TURLINGS, 2008; DEGENHARDT et al., 2009).

Dentre os inimigos naturais presentes no solo com capacidade de movimentação, os nematoides entomopatogênicos são grandes aliados das plantas. Um dos primeiros trabalhos mostrando que as plantas apresentam a capacidade de

proteger suas raízes alertando tais organismos foi desenvolvido por van Tol et al. (2001). Neste trabalho, foi observado que plantas de *Thuja occidentalis* (L.) liberavam compostos sob o ataque do coleoptero *Otiorhynchus sulcatus* (F.) que atraíam o nematoide *Heterorhabditis megidis* (Poinar, Jackson e Klein).

Trabalhos seguintes comprovaram a ocorrência de tais interações com diferentes plantas, herbívoros e inimigos naturais. Rasmann et al. (2005) verificaram que as plantas de milho (*Zea mays* L.) ('Delprin') liberavam o sesquiterpeno (*E*)- β -cariofileno sob o ataque de larvas de *Diabrotica virgifera virgifera* (LeConte) e que era atrativo a JIs de *H. megidis*. A partir disso, outros trabalhos têm apontado este sesquiterpeno como o mediador mais importante das interações tritróficas da comunidade edáfica (RASMANN; TURLINGS, 2007; RASMANN; TURLINGS, 2008; HILTPOLD et al., 2010; ROBERT et al., 2012). Por outro lado, as raízes de citros ('Citrumelo Swingle') emitem os sesquiterpenos pre-geijerene e gieijerene, quando atacadas por larvas de *Diaprepes abbreviatus* (L.), sendo tais compostos os responsáveis pela atração de nematoides entomopatogênicos (ALI; ALBORN; STALINSKI, 2010).

Em outra vertente, existem trabalhos que mostram que as plantas podem reduzir a quantidade de voláteis produzidos quando atacadas por certos insetos, o que acaba diminuindo a eficiência do recrutamento de inimigos naturais (TURLINGS et al., 1998; PEÑAFLORES et al., 2011; SCHWARTZBERG; BÖRÖCZKY; TUMLINSON, 2011). Um bom exemplo disso ocorre no feijão-de-corda, *Vigna unguiculata* (L.), que não produz voláteis radiculares de indução (terpenoides) sob herbivoria de *Diabrotica balteata* (LeConte), resultando em baixa atração de nematoides entomopatogênicos.

Contudo, a quantidade de voláteis emitidos por indução não é sempre um bom indicador da atração de parasitoides ou nematoides entomopatogênicos. Por exemplo, raízes de milho da variedade da "Pactol" infestadas por larvas de *D. v. virgifera* não emitem (*E*)- β -cariofileno, mas mostraram ser atrativas para o nematoide entomopatogênico *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) em bioensaios olfatométricos, indicando que este nematoide pode usar outros sinais químicos para localizar seu hospedeiro. Estes sinais químicos poderiam vir da planta e/ou do próprio hospedeiro, uma vez que raízes de plantas não danificadas por herbivoria mostraram ser repelentes a *H. bacteriophora*. Isto poderia implicar que o nematoide usa uma única e altamente potencial estratégia para localizar seu hospedeiro

(HILTPOLD et al., 2010).

Algo importante que deve ser levado em consideração nestes tipos de experimentos, é que a determinação dos voláteis presentes nas raízes não necessariamente reflete o que está sendo liberados por elas. Por exemplo, as raízes do algodão produzem grandes quantidades de voláteis de indução por herbivoria de *D. balteata*, mas nenhuma atração de nematoides a estas estruturas foi observada em bioensaios olfatométricos (RASMANN; TURLINGS, 2008). Folhas de algodão armazenam terpenoides em glândulas especiais. Estes compostos são liberados quando os tecidos são danificados (TURLINGS; WACKERS, 2004). As raízes, por outro lado, não possuem estas glândulas, mas algumas quantidades destes terpenoides também podem ser armazenadas no tecido radicular (RASMANN; TURLINGS, 2008).

Neste sentido, para os nematoides entomopatogênicos, a presença de pistas no meio onde vivem, que os direcionem com maior precisão até o hospedeiro são de vital importância, uma vez que seu tamanho é reduzido e a disponibilidade de energia é restrita.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das plantas

Microtoletes de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) da variedade “SP80-1842” foram plantadas em recipientes plásticos (200 mL) contendo substrato orgânico a base de casca de coco (Golden-Mix[®]) e umedecidas diariamente. Em cada recipiente foram adicionados aproximadamente 2,5 g de fertilizante mineral (Osmocote[®] 14-14-14).

Os recipientes contendo os microtoletes foram mantidos em casa de vegetação fechada e livre de insetos herbívoros, sob condições naturais de luz, temperatura e umidade. As plantas utilizadas em todos os experimentos apresentavam 4 folhas abertas, com idade de 24 ± 3 dias.

3.2 Criação dos insetos

Ninfas de *Mahanarva fimbriolata* utilizadas nos experimentos foram provenientes de uma criação mantida no Laboratório de Biologia de Insetos (ESALQ/USP), sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa ($70 \pm 10\%$) e fotoperíodo (14 horas de fotofase), segundo metodologia proposta por Garcia et al. (2007) com algumas adaptações no desenvolvimento das ninfas.

Para tanto, os adultos foram mantidos em gaiolas cilíndricas e transparentes (60 cm de altura x 10 cm de diâmetro), com duas aberturas laterais opostas na parte superior (10 cm de altura x 5 cm de largura), cobertas com uma tela de nylon (1 mm Mesh). As gaiolas apresentavam 2 ganchos de arame nas laterais opostos a uma altura de 10 cm da base, aos quais eram presos elásticos que passavam pela parte inferior de uma placa de Petri que servia para dar sustentação ao conjunto (Figura 1A).

A identificação de machos e fêmeas foi feita segundo o padrão alar e o exame externo da genitália (MENEZES, 1982).

Os adultos foram alimentados com plantas de cana-de-açúcar com idade entre 30 e 60 dias, mantidas em recipientes plásticos (200 mL). Um disco de algodão hidrofílico umedecido com água destilada era colocado na base das plantas de cana cobrindo toda a superfície até atingir a borda do recipiente, sendo este algodão o

substrato para a oviposição das fêmeas.

Para a coleta diária dos ovos, o algodão foi retirado da base da planta e lavado sob água corrente, colocando-o em uma peneira de malha maior (1 mm) localizada logo acima de outra de malha fina (500 Mesh), onde então os ovos ficaram retidos. Os ovos coletados foram tratados em uma solução de sulfato de cobre (CuSO_4) a 1% durante 5 minutos, em seguida lavados novamente com água destilada e finalmente transferidos para placas de Petri (9 cm de diâmetro e 2 cm de altura) forradas com papel filtro umedecido e ali permaneceram até a eclosão das ninfas.

As placas de Petri contendo os ovos foram mantidas em câmaras climatizadas do tipo BOD com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas.

Para o desenvolvimento das ninfas foram utilizadas caixas plásticas (35 cm comprimento x 30 cm de largura x 15 cm altura) de coloração preta, fechadas na parte superior com uma tampa contendo 6 furos (2,5 cm de diâmetro) por onde passavam os colmos das plantas de cana-de-açúcar (Figura 1B).

Em cada caixa foram colocadas 6 plantas de cana-de-açúcar aderida ao substrato proveniente de um recipiente plástico de 500 mL. O recipiente era retirado da planta antes dela ser colocada na caixa e descartado. Assim a planta ficava com suas raízes secundárias expostas para as ninfas nelas se desenvolverem.

As caixas foram mantidas em estantes, cuja porção superior havia lâmpadas para minimizar os efeitos da falta de radiação solar natural.

Ninfas recém-eclodidas eram transferidas, com o auxílio de um pincel, para as raízes secundárias das mudas de cana-de-açúcar em número de 10 ninfas por planta. As plantas eram substituídas a cada 20 dias ou quando apresentavam sinais de debilidade. Neste caso, as ninfas eram transferidas para uma nova planta juntamente com um pouco de espuma por elas produzida, e ali então permaneceram até a emergência dos adultos. Os adultos recém-emergidos foram transferidos para as gaiolas citadas inicialmente e assim continuou-se o ciclo de criação.

Figura 1 – Criação de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) em mudas de cana-de-açúcar mantidas em sala climatizada a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e 14 h de fotofase. (A) Detalhe das gaiolas cilíndricas de plástico contendo mudas de cana-de-açúcar utilizadas para alimentação e oviposição de adultos de *M. fimbriolata*; (B) Espuma produzida por ninfas de *M. fimbriolata* no colo de mudas de cana-de-açúcar. Fotos: Mateus Tonelli

3.3 Criação dos nematoides entomopatogênicos

As espécies de nematoides entomopatogênicos, *Heterorhabditis indica* e *Steinernema carpocapsae* (Weiser), utilizados nos bioensaios, foram fornecidas pelo Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico de Campinas e multiplicadas no Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos (ESALQ/USP), segundo metodologia proposta por Kaya e Stock (1997).

Esta metodologia consiste na infecção, colonização e multiplicação dos nematoides em lagartas de *Galleria mellonella* (L.), quando estas se encontram no último instar larval.

As lagartas foram colocadas em uma placa de Petri (9 cm de diâmetro) forrada com dois papéis de filtro sobre os quais foi aplicado 1,5 mL de uma solução contendo o isolado (Figura 2A). Posteriormente a placa foi mantida em BOD a temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $50 \pm 10\%$ e escotofase de 24 horas. Após 3 a 4 dias, quando as lagartas já apresentavam sintomas de morte pelo ataque dos nematoides, foram transferidas para armadilhas de White para coleta dos JIs (WHITE, 1927) (Figura 2B).

A armadilha de White foi formada por uma placa de Petri (15 cm de diâmetro) em cuja base foi colocada outra placa (9 cm de diâmetro) para a formação de um degrau. Um papel de filtro fez a ligação entre o degrau e a base da placa maior, na qual foi adicionada água destilada para cobrir o fundo e ao mesmo tempo umedecer o papel de filtro. Sobre o papel, foram colocadas as lagartas previamente infectadas

pelos nematoides e após 10 a 15 dias os juvenis infectivos (JIs) se deslocaram do inseto para a água pela ponta do papel. A água da placa de Petri maior, juntamente com os nematoides nela presentes, foram coletados em potes plásticos de 1L e armazenados em BOD (15 ± 1 °C, umidade relativa de $50 \pm 10\%$ e escotofase de 24 h) (Figura 2C).

Figura 2 – Sequência da criação dos nematoides entomopatogênicos utilizados nos bioensaios de olfatometria. (A) Placa de Petri com papel de filtro no qual era aplicada a solução contendo o isolado do nematoide para posterior multiplicação no interior das lagartas de *Galleria mellonella*; (B) Armadilha de White feita com duas placas de Petri formando um degrau por meio do qual os nematoides se dirigiram até a água presente na placa de Petri maior; (C) Detalhe dos isolados mantidos em BOD (15 ± 1 °C, UR $50 \pm 10\%$ e 24 h escotofase). Fotos: Mateus Tonelli

3.4 Obtenção dos tratamentos

As plantas de cana-de-açúcar (Var. “SP80-1842”) utilizadas tanto nos bioensaios comportamentais como na coleta de voláteis foram submetidas, ou não, a herbivoria de ninfas de *Mahanarva fimbriolata*, constituindo assim dois tratamentos: (i) plantas danificadas pela herbivoria radicular, e (ii) plantas não danificadas pela herbivoria radicular.

As plantas não danificadas foram mantidas sem contato com as ninfas de *M. fimbriolata*, enquanto que as danificadas pela herbivoria radicular foram obtidas inserindo-se 5 ninfas de quarto e quinto instares de *M. fimbriolata* no interior da via lateral do olfatômetro de seis vias, no caso de plantas utilizadas para bioensaio de comportamento (Figura 3A), ou então nos recipientes plásticos (200 mL) quando as plantas foram utilizadas para coleta de voláteis (Figura 3B).

Para ambos os casos, o tempo de dano, ou seja, o tempo que as ninfas ficaram em contato com as raízes das plantas foi de 24 h, e posteriormente, foram retiradas das plantas.

Figura 3 – Ninfas de *Mahanarva fimbriolata* provocando danos em plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* Var. “SP80-1842”) utilizadas nos ensaios de olfatometria e coleta de voláteis. (A) Detalhe das ninfas de *M. fimbriolata* danificando plantas de cana-de-açúcar no interior de um dos tubos laterais do olfatômetro de 6 vias; (B) Ninfas de *M. fimbriolata* provocando danos em plantas de cana utilizadas para coleta de voláteis radiculares. Fotos: Mateus Tonelli

3.5 Bioensaio em olfatômetro de seis vias

Para investigar a hipótese de que os voláteis induzidos pela herbivoria radicular afetam o comportamento de seleção hospedeira dos nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis indica* e *Steinernema carpocapsae*, foram realizados bioensaios em olfatômetros de seis vias, também chamados de olfatômetros de solo (RASMANN; TURLINGS, 2007).

O olfatômetro de seis vias consiste em uma câmara central de vidro com 10 cm de diâmetro, por 8 cm de altura, com 6 aberturas laterais equidistantes. Em cada uma das aberturas foi conectado um tubo lateral (3 cm de diâmetro x 8 cm de altura) contendo um dos tratamentos, totalizando 3 vias com cada um dos tratamentos dentro das diferentes combinações. Neste sistema ocorre a difusão passiva do ar, simulando as condições reais do solo, não necessitando assim a utilização de bombas de fluxo de ar (Figura 4).

Foram testadas as seguintes combinações de tratamentos: i) planta danificada por ninfas de *Mahanarva fimbriolata* vs planta não danificada por ninfas de *M. fimbriolata*, e ii) planta não danificada por ninfas de *M. fimbriolata* vs câmaras contendo apenas areia umedecida (controle).

As plantas utilizadas foram previamente retiradas dos recipientes plásticos, lavadas em água corrente e transferidas para os tubos laterais quando estavam com 4 folhas abertas (24 ± 3 dias). Após a transferências, elas foram mantidas em casa de vegetação por 3 dias prévios ao bioensaio para minimizar qualquer efeito de

estresse pela manipulação do material.

Como substrato utilizou-se uma mistura de areia e pedra na proporção de 2:1 (peso:peso), respectivamente, umedecido com água destilada na proporção de 10% do peso total da mistura.

Um dia antes do início dos bioensaios as plantas foram trazidas da casa de vegetação e mantidas sob luz artificial no interior do laboratório (Figura 4A). Decorridas 24 horas, as vias laterais do olfatômetro foram conectadas à câmara central e inseriram-se ninfas de *M. fimbriolata* (cinco ninfas por plantas) no interior de três vias laterais do olfatômetro para obtenção das plantas danificadas pela herbivoria – tratamento (i), permanecendo três vias com plantas não danificadas – tratamento (ii). No dia seguinte, as ninfas foram retiradas do olfatômetro e liberados cerca de 10000 JIs do nematoide entomopatogênicos (*H. indica* ou *S. carpocapsae*) na câmara central, tendo estes acesso livre para escolha dos tratamentos (Figura 4B).

Um dia depois da liberação as vias laterais foram desconectadas da câmara central, contando o número de JIs presentes em cada um dos tratamentos.

Figura 4 - Olfatômetros de seis vias utilizados nos testes comportamentais de busca hospedeira de nematoides entomopatogênicos. (A) Plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* Var. “SP80-1842”) sob luz artificial 24 horas antes do bioensaio; (B) Detalhe das seis vias do olfatômetro inseridas na câmara central onde os juvenis infectivos (JIs) foram liberados tendo livre escolha aos tratamentos durante 24h. Fotos: Mateus Tonelli

3.6 Metodologia para coleta e contagem do JIs

Para coleta e posterior contagem dos juvenis infectivos (JIs) presentes em cada um dos tratamentos, foi adaptada uma metodologia baseada no método do funil de Baermann modificado. Neste caso, o substrato presente em cada uma das câmaras laterais do olfatômetro foi lavado sobre duas peneiras granulométricas (20

Mesh e 500 Mesh). O conteúdo remanescente na peneira inferior, contendo os JIs, foi transferido cuidadosamente para uma peneira plástica (1 mm abertura; 16,5 diâmetro) previamente coberta com uma folha de papel toalha. Esta foi então inserida no interior de um disco plástico (800 mL; 18,0 cm diâmetro) de coloração preta (Figura 5A). Finalmente, foi adicionada água no fundo do prato e outro semelhante a este foi colocado na parte superior tendo a parte côncava voltada para baixo (Figura 5B). Posteriormente a amostra foi levada para uma BOD (temperatura de 30 ± 2 °C, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e escotofase de 24 horas) e os JIs foram contados no dia seguinte. Esta técnica é baseada no comportamento do nematoide se deslocar à água.

No dia seguinte a água do fundo do prato foi vertida sobre uma peneira (500 Mesh) e os nematoides recolhidos em um Becker, calibrando a solução final para 20 mL. A contagem dos JIs foi feita em um microscópio estereoscópico com o auxílio de uma câmara de McMaster (Figura 5C). Esta câmara é composta de dois campos de contagem (0,15 mL cada campo) que foram preenchidos com a solução contendo os JIs e o valor encontrado nestes campos foi extrapolado para o valor total da amostra (20 mL).

Após o termino da avaliação, todo o substrato foi autoclavado (120 °C, 1 atm, durante 20 minutos) e seco em estufa a 170 °C para o próximo bioensaio.

Figura 5 – Etapas para coleta e contagem dos juvenis infectivos (JIs) após escolha no olfatômetro de seis vias. (A) Areia contendo os nematoides colocada sobre uma peneira com papel de filtro por onde os JIs se movimentavam até alcançar a água. (B) Sistema fechado para diminuir a incidência de luz. (C) Câmara de McMaster sob microscópio estereoscópico para contagem dos JIs. Fotos: Mateus Tonelli

3.7 Coleta e análise dos voláteis

Para determinar os perfis de voláteis liberados pelas raízes das plantas de cana-de-açúcar danificadas ou não pela herbivoria de *Mahanarva fimbriolata*, a porção radicular das plantas foi lavada com água corrente, cortada, envolvidas com

papel alumínio e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido. As raízes foram mantidas em freezer (-30 °C) até o momento das análises (DEGENHARDT et al., 2009).

No momento da coleta dos voláteis, as raízes armazenadas foram retiradas do papel alumínio e 2 g do material foram macerados em um cadinho contendo nitrogênio líquido até obter-se um pó (Figura 6A, B), que foi imediatamente transferido para um recipiente de vidro (500 mL; 8 cm de diâmetro) e fechado com uma tampa de rosca. Esta tampa continha duas aberturas adaptadas, permitindo a entrada e saída de ar. Na abertura de entrada de ar foi acoplada uma coluna com carvão ativado, purificando assim o ar antes de entrar no sistema, e na outra extremidade foi conectada uma coluna de vidro e plástico (7,5 cm x 0,5 cm) contendo 50 mg de polímero adsorvente (Super Q[®] 80/100 Mesh, Alltech Assoc., IL EUA) onde os voláteis liberados ficaram retidos para posterior análise (Figura 6C).

O fluxo de ar no interior da câmara foi gerado por uma bomba de fluxo e regulado por fluxômetros, sendo que todas as conexões foram instaladas com mangueiras de Teflon[®] PTFE. Depois de 8 horas de coleta, as colunas com o adsorvente foram retiradas e os voláteis nelas contidos foram eluidos com 300 µl de Diclorometano. As amostras foram concentradas para 50 µl utilizando-se N₂ gasoso e mantidas em frascos vedados a temperatura de -30 °C para análise em cromatografia gasosa (GC-MS/Shimadzu).

A análise das amostras dos extratos radiculares das raízes de cana-de-açúcar danificadas ou não a herbivoria por *M. fimbriolata* foi realizada injetando-se uma alíquota de 2 µl dos extratos em cromatógrafo gasoso (GC-MS, modelo Varian 4000), contendo coluna capilar DB-5 (J&W Scientific, Folsom, Califórnia, EUA; 30 m x 0,25 mm x 0,25 mm x 0,25 µm). O equipamento foi programado para uma temperatura de 40 °C por 5 minutos, aumentando 5 °C por minuto até 150 °C e mantida por mais 1 minuto, então elevada novamente 20 °C por minuto até atingir 250 °C, temperatura correspondente ao fim da programação.

Figura 6 – Método utilizado para coleta de voláteis radiculares das plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* Var. “SP80-1842”) danificadas ou não danificadas por ninfas de *Mahanarva fimbriolata*. (A) Maceração da amostra radicular em um cadinho contendo nitrogênio líquido. (B) Detalhe do pó resultante da maceração da amostra radicular que foi posteriormente inserido no interior do pote de vidro. (C) Sistema completo funcionando para coleta dos voláteis liberados pelas raízes nos polímeros adsorventes. Fotos: Mateus Tonelli

3.8 Análise estatística

Dados sobre os bioensaios em olfatômetro de seis vias e sobre área relativa de cada composto foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk (SHAPIRO; WILK, 1968) e a homogeneidade das variâncias foram analisadas pelo teste de Bartlett (BARTLETT, 1937).

Dados dos bioensaios olfatométricos foram posteriormente submetidos a análise por GLM (Modelo Linear Generalizado) de regressão log linear e ajustado para “over-dispersion” (TURKMAN, 2000; CRAWLEY, 2007) modelo quasipoisson, pois os dados não atenderam os critérios de normalidade e homocedasticidade ($P > 5\%$). Os dados referentes a área relativa de cada composto foram transformados por log10 quando não atenderam aos critérios de normalidade. Os dados que atenderam

aos critérios de normalidade e homocedasticidade foram submetidos ao teste t de Student ($P < 5\%$). Já os dados normais que violaram aos critérios de homocedasticidade foram submetidos ao teste t de Welch ($P < 5\%$).

Todas as análises e testes foram realizados no 'software' R versão 3.0.2 (The R Foundation for Statistical Computing, 2013).

4 RESULTADOS

4.1 Resposta olfativa dos nematoides entomopatogênicos aos voláteis radiculares de cana-de-açúcar em olfatômetro de seis vias

4.1.1 *Steinernema carpocapsae*

Os juvenis infectivos (JIs) de *S. carpocapsae* foram atraídos pelos voláteis radiculares de plantas de cana-de-açúcar danificadas por herbivoria de ninfas de *Mahanarva fimbriolata* comparado com as plantas que não foram danificadas (GLM: $n=8$, $F_{(1, 14)} = 6,290$, $P < 0,05$) (Figura 7). Por outro lado, os nematoides não exibiram preferência entre as plantas não danificadas pelas ninfas ou o controle (areia umedecida) (GLM: $n=8$, $F_{(1, 14)} = 0,083$; $P = 0,7766$) (Figura 7).

Figura 7 – Resposta de juvenis infectivos (JIs) de *Steinernema carpocapsae* aos voláteis radiculares de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* Var. “SP80-1842”) danificadas ou não pela herbivoria de ninfas de *Mahanarva fimbriolata*. Danificada = planta atacada pelo inseto; Não danificada = planta não atacada; Controle = areia umedecida. (GLM-quasipoisson, * $P < 0,05$, ns indica que não houve diferença significativa)

4.1.2 *Heterorhabditis indica*

JIs de *H. indica* tiveram uma maior preferência por plantas previamente danificadas por ninfas de *M. fimbriolata* em detrimento as plantas não danificadas pela herbivoria (GLM: $n=8$, $F_{(1, 14)} = 9,210$, $P < 0,01$) (Figura 8). Quanto à escolha entre as plantas não danificadas ou o controle (apenas areia umedecida), não houve diferença (GLM: $n=8$, $F_{(1, 14)} = 0,023$, $P = 0,8819$) (Figura 8).

Figura 8 – Resposta de juvenis infectivos (JIs) de *Heterorhabditis indica* aos voláteis radiculares de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* Var. “SP80-1842”) danificadas ou não pela herbivoria de ninfas de *Mahanarva fimbriolata*. Danificada = planta atacada pelo inseto; Não danificada = planta não atacada; Controle = areia umedecida. (GLM-quasipoisson, $**P < 0,01$; ns indica que não houve diferença significativa)

4.2 Voláteis emitidos pelas raízes de cana-de-açúcar

A análise dos voláteis radiculares de cana-de-açúcar, *S. officinarum* var. “SP80-1842”, revelou que não houve diferença qualitativa entre os tratamentos quanto aos compostos encontrados. Foram encontrados 11 compostos (Figura 9), que consistiram principalmente de terpenos (70%) e álcoois (20%) (Figura 10).

Por outro lado, foi observada uma diferença quantitativa no perfil de voláteis radiculares, sendo que di-hidro mircenol (teste ‘t’ de Welch: $t = 2,4632$, $df = 8,855$, $P = 0,03638$) e Beta iso metioneno (teste “t” de Student: $t = 2,2675$, $df = 16$, $P = 0,0375$) foram encontrados em maior concentração nas raízes de plantas não danificadas pelas ninfas da cigarrinha (Figura 9).

Figura 9 – Boxplot das áreas relativas dos picos dos compostos voláteis de raízes de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* Var. “SP80-1842”) danificadas e não danificadas por herbivoria de *Mahanarva fimbriolata* ($n = 9$ repetições). Linhas grossas horizontais indicam as medianas; caixas mostram 50% dos dados, o limite superior indica 75% dos dados e o limite inferior 25%; os extremos representam valores mínimos e máximos; os pontos representam os valores atípicos. (*) = significativo, e (ns) = não significativo, pelo teste ‘t’ de Student ou teste ‘t’ de Welch ($P < 0,05$)

Figura 10 – Porcentagem da área total dos grupos químicos encontrados nos voláteis radiculares de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* Var. “SP80-1842”) danificadas ou não pela herbivoria de *Mahanarva fimbriolata* (n=9). ns = não significativo ao nível de 5% de probabilidade, de acordo com o teste ‘t’ de Student

5 DISCUSSÃO

Este trabalho traz a primeira evidência de que os nematoides entomopatogênicos *S. carpocapsae* e *H. indica* são atraídos pelos voláteis radiculares de cana-de-açúcar danificadas por ninfas da cigarrinha-das-raízes, *M. fimbriolata*. Atração semelhante também já foi documentada no sistema radicular de milho (RASMANN et al., 2005; RASMANN; TURLINGS, 2008), feijão-de-corda, algodão (RASMANN; TURLINGS, 2008) e citros (ALI; ALBORN; STELINSKI, 2010).

Em milho, o composto (*E*)- β -cariofileno foi identificado como o volátil específico produzido nas raízes, para o recrutamento de nematoides entomopatogênicos, após os danos por *D. v. virgifera* (RASMANN et al., 2005; RASMANN; TURLINGS, 2008). Em raízes de citros, por outro lado, Ali, Alborn e Stelinski (2011) sugeriram que os terpenoides de 12 carbonos, denominados 'geijerenos', foram os responsáveis pelo recrutamento de *Steinernema diaprepesi* (Nguyen e Duncan) após o ataque por *D. abbreviatus*.

No presente trabalho, não foi detectado a produção de nenhum composto exclusivo nos sistemas radiculares de cana-de-açúcar após a herbivoria por *M. fimbriolata*. Contudo, comparativamente as raízes não danificadas, houve uma variação quantitativa no perfil dos voláteis produzidos. Dos 11 compostos presentes nas raízes não danificadas, di-hidro mircenol e Beta iso metioneno reduziram, significativamente, sua concentração após o ataque de *M. fimbriolata*. Isto sugere, que o recrutamento de nematoides entomopatogênicos neste sistema pode ter sido influenciado pela diminuição da concentração destes dois compostos radiculares nas plantas sob herbivoria. Estudos adicionais, porém, precisam ser feitos com a forma sintética destes compostos, alterando sua concentração, para comprovar sua influência sobre o comportamento de *S. carpocapsae* e *H. indica*.

Os dois compostos que apresentaram diferença entre os tratamentos, Di-hidro mircenol e Beta iso metioneno, constituem respectivamente um álcool e um terpeno e diferentemente do que ocorre com os terpenos que são bem descritos na literatura quanto a ação sobre o comportamento de busca hospedeira de organismos de solo e geralmente são produzido e liberados pelas raízes das plantas, pouco se conhece ainda a respeito da influência dos álcoois, principalmente sobre nematoides entomopatogênicos.

Em diversas variedades de milho americanas, acredita-se que a ausência de

(*E*)- β -cariofileno no perfil de voláteis radiculares da maioria das variedades de milho seja a principal causa da falta de sucesso na utilização de nematoides entomopatogênicos no combate de pragas de raízes (RASMANN et al., 2005, RASMANN; TURLINGS, 2008). Isto porque, em campos infestados por larvas de *D. v. virgifera*, contendo plantas transgênicas de milho, modificadas para liberar (*E*)- β -cariofileno, apresentaram menores danos radiculares, com redução de 60% na emergência de besouros adultos, após a liberação de nematoides entomopatogênicos (DEGENHARDT et al., 2009). Da mesma forma, Hiltbold et al. (2010) mostraram que o efeito sinérgico da combinação de espécies adequadas de nematoides entomopatogênicos, com variedades de milho que liberaram (*E*)- β -cariofileno em quantidades ideais, poderia resultar em um controle efetivo de *D. v. virgifera* comparativamente ao uso de inseticidas ou milho *Bt*. Isto demonstra que a emissão de voláteis de plantas pode ser manipulada para aumentar a efetividade dos agentes de controle biológico, favorecendo o uso do manejo integrado de pragas.

Em cana-de-açúcar, entretanto, o mecanismo de busca utilizado pelos nematoides entomopatogênicos parece estar relacionado à um balanço na emissão dos voláteis radiculares antes e após o ataque por *M. fimbriolata*. E, aparentemente, esta busca independe da estratégia utilizada por estes nematoides, seja ele emboscador, como é o caso de *S. carpocapsae*, ou cruzador, como *H. indica*, segundo a definição de Lewis (2002).

Ali, Alborn e Stelinski (2011) verificaram que os voláteis radiculares emitidos por plantas de citros danificadas por *D. abbreviatus* exerceram atratividade tanto a *S. carpocapsae* quanto *H. indica*, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho para estas duas espécies de nematoides quanto à resposta aos voláteis radiculares de cana-de-açúcar danificadas por *M. fimbriolata*. Sugere-se assim que uma correta caracterização quanto a estratégia e o comportamento de busca hospedeira dos nematoides entomopatogênicos deve levar em consideração as pistas olfativas presentes no ambiente, como os voláteis radiculares.

A ausência de reposta dos nematoides para o tratamento contendo plantas não danificadas versus areia parece ter sido relacionado com a ausência de formação de um gradiente de voláteis, como observado nas plantas danificadas. Isto reforça a hipótese de que apenas o CO₂, liberado pelas raízes das plantas não seja suficiente para exercer uma maior atratividade aos organismos edáficos como

sugerido por trabalhos anteriores (DOANE et al., 1975; BRANSON, 1982; STRNAD; DUNN, 1990).

A restrição na emissão de alguns voláteis nas plantas danificadas de cana-de-açúcar parece ser uma estratégia adaptativa de sobrevivência destas plantas à presença de alguns herbívoros, como no caso das ninfas de *M. fimbriolata*.

O presente trabalho traz informações importantes sobre as interações tritróficas no sistema da cana-de-açúcar, destacando que o recrutamento de nematoides entomopatogênicos para raízes de plantas danificadas por herbivoria de ninfas de *M. fimbriolata* seja promovido por uma diminuição na concentração dos voláteis radiculares di-hidro-mircenol e Beta-iso-metioneno. Estas informações servirão de base para estudos futuros focados no desenvolvimento de técnicas de manejo integrado da cigarrinha-das-raízes utilizando estes nematoides, por meio da seleção de variedades de cana-de-açúcar que produzam um perfil de compostos radiculares semelhantes qualitativamente e quantitativamente aos encontrados em plantas danificadas por ninfas desta praga.

6 CONCLUSÕES

- Os nematoides entomopatogênicos *S. carpocapsae* e *H. indica* são recrutados pelos voláteis radiculares emitidos por plantas de cana-de-açúcar danificadas pela herbivoria de ninfas de *M. fimbriolata*;
- Os voláteis das raízes de plantas de cana-de-açúcar danificadas pela herbivoria de ninfas de *M. fimbriolata* diferem apenas quantitativamente daqueles encontrados em plantas não danificadas;
- Os compostos di-hidro-mircenol e Beta-iso-metioneno apresentam concentrações menores nas raízes de plantas de cana-de-açúcar danificadas pela herbivoria de ninfas de *M. fimbriolata*, em comparação as plantas não danificadas;
- A maioria dos voláteis de raízes de cana-de-açúcar danificadas ou não pela herbivoria de ninfas de *M. fimbriolata* são constituídos por compostos terpênicos.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, B.J.; NGUYEN, K.B. Taxonomy and systemics. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic Nematology**, New York, 2002. p. 1-33.
- AGRAWAL, A.A. Induced responses to herbivory and increased plant performance. **Science**, Washington, v. 279, n. 5354, p. 1201-1202, 1998.
- ALI, J.G.; ALBORN, H.T.; STELINSKI, L.L. Subterranean herbivore induced volatiles released by Citrus roots upon feeding by *Diaprepes abbreviatus* recruit entomopathogenic nematodes. **Journal of Chemical Ecology**, Dordrecht, v. 36, p. 361-368, 2010.
- ALI, J.G.; ALBORN, H.T.; STELINSKI, L.L. Constitutive and induced subterranean plant volatiles attract both entomopathogenic and plant parasitic nematodes. **Journal of Ecology**, Hoboken, v. 99, p. 26-35, 2011.
- AZZI, G.M.; DODSON, A.K. Infestação da cigarrinha-das-raízes em canaviais de Piracicaba-SP (*Mahanarva fimbriolata*). **Brasil açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 77, n.5, p. 36-42, 1971.
- BARTLETT, M.S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society A-Mathematical Physical and Engineering Sciences**, London, v. 160, p. 268-282, 1937.
- BERTIN, C.; YANG, X.; WESTON, L.A. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. **Plant and Soil**, New York, v. 256, p. 67-83, 2003.
- BOFF, M.I.C.; van TOL, R.H.W.M.; SMITS, P.H. Behavioural response of *Heterorhabditis megidis* towards plant roots and insect larvae. **Biocontrol**, Dordrecht, v. 47, p. 67-83, 2001.
- BOTELHO, P.M.S.; MENDES, A.C.; MACEDO, N.; SILVEIRA NETO, S. Atração da cigarrinha da raiz (*Mahanarva fimbriolata*) (Stål, 1854) (Homoptera: Cercopidae), por luzes de diferentes comprimentos de onda. **Brasil açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 3, p. 37-42, 1976.
- BRANSON, T.F. Olfactory response of larva of *Diabrotica virgifera virgifera* to plants roots. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 31, p. 1303-1307, 1982.
- CHICHE, T.A.; ENSIGN, J.C. For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, wick end of a nematode is out?. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 4, p. 1890-1897, 2003.
- COLEY, P.; BRYANT, J.P.; CHAPIN, F.S. Resource availability and plant antiherbivory defense. **Science**, Washington, v. 230, n. 4728, p. 895-899, 1985.
- CRAWLEY, M.J. **The R Book**, West Sussex: John Wiley, 2007, 942p.

DEGEHARDT, J.; HILTPOLD, I.; KÖLLNER, T.G.; FREY, M.; GIERL, A.; GERSHENZON, J.; HIBBARD, B.E.; ELLESIECK, M.R.; TURLINGS, T.C.J. Restoring a maize root signal that attracts insect-killing nematode to control a major pest. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, New York, v. 106, p. 13213-13218, 2009.

DICKE, M.; SABELIS, M.W.; TAKABAYASHI, J.; BRUIN, J.; POSTHUMUS, M.A. Plant strategies of manipulating predator-prey interaction through allelochemicals: prospects for application in pest control. **Journal of Chemical Ecology**, Dordrecht, v. 16, n. 11, p. 3091-3018, 1990.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; FIGUEIREDE, P.; LANDELL, M.G.A.; FERREIRA, J.M.C.; CARVALHO, P.A.M. Danos causados pelas cigarrinhas das raízes (*Mahanarva fimbriolata*) a diversos genótipos de cana-de-açúcar. **Stab**, Piracicaba, v.17, p. 48-52, 1999.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; FERREIRA, J.M.G.; GARCIA, C.A.; COELHO, A.L.; GIL, M.A. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stål)(Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar. **Netotropical Entomology**, Londrina, v. 33, p. 743-749, 2004.

DOANE, J.F.; LEE, Y.W.; KLINGER, J.; WESTCOTT, N.D. The orientation response of *Ctenicera destructor* and other wireworms (Coleoptera: Elateridae) to germinating grain and to carbon dioxide. **Canadian Entomology**, Lanham, v. 9, p. 1233-1252, 1975.

DOLINSKI, C. Tecnologia de produção e formulação de nematoides entomopatogênicos. In: OLIVEIRA FILHOS, E.C.; MONNERAT, R.G. (Ed.). **Fundamentos para regulação de Semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas**, Planaltina, 2006. p. 197-218.

DOWDS, B.C.A.; PETERS, A. Virulence Mechanism. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic Nematology**, New York, 2002. p. 79-98.

FEWKES, D.W. The biology of sugarcane froghoppers. In: WILLIAMS, J.R.; METCALF, J.R.; MUNGOMERY, R.W.; MATHES, R. (Ed.) **Pests of sugarcane**, Amsterdam, 1969. p. 283-307.

FREIRE, A.M.; SOUTO, C.E.R.; MARQUES, E.J. Combate biológico de cana-de-açúcar. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 71, n. 4, p. 41-44, 1968.

GARCIA, J.F.; BOTELHO, P.S.M.; PARRA, J.R.P. Laboratory rearing technique of *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, p. 73-76, 2003.

GUAGLIUMI, P. As cigarrinhas dos canaviais (Hom. Cercopidae) no Brasil. VI. Contribuição: a nova nomenclatura e a distribuição das espécies mais importantes. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 76, n. 1, p. 75-89, 1970.

GUAGLIUMI, P. Sugestões para o combate de cigarrinhas da cana no nordeste do

Brasil. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 1, p. 48-55, 1972.

HARE J.D. Ecological role of volatiles produced by plants in response to damage by herbivorous insects. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 56, p. 161-180, 2011.

HILTPOLD, I.; BARONI, M.; TOEPFER, S.; KUHLMANN, U.; TURLINGS, T.C.J. Selective breeding of entomopathogenic nematodes for enhanced attraction to a root signal did not reduce their establishment or persistence after field release. **The Journal of Experimental Biology**, London, v. 10, n.11, p. 2417-2423, 2010.

HOBALLAH, M.E.; TURLINGS, T.C.J. The role of fresh versus old leaf damage in the attraction of parasitic wasps to herbivore-induced maize volatiles. **Journal of Chemical Ecology**, Dordrecht, v. 31, p. 2003-2018, 2005.

HOMINICK, W.M.; REID, A.P.; BOHAN, D.A. Entomopathogenic nematodes: biodiversity, geographical distribution and deconvolution on biological diversity. **Biocontrol Science and Technology**, London, v. 6, n.3, p. 317-331, 1996.

JONES, J. Nematode sense organs. In: LEE, D.L. **The Biology of Nematodes**, New York, 2002. p. 369-387.

JOHNSON, S.N.; GREGORY, P.J. Chemically mediated host-plant location and selection by root-feeding insects. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 1-13, 2006.

JOHNSON, S.N.; NIELSEN, U.N. Foraging in dark chemically mediated host plant location by belowground insect herbivores. **Journal of Chemical Ecology**, Dordrecht, v.38, n. 6, p. 604-614, 2012.

KALOSHIAN, I.; WALLING, L.L. Hemipterans as Plant Pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 491-521, 2005.

KARBAN, R.; BALDWIN, I.T. **Induced response to herbivory**. Chicago: The University of Chicago Press, 1997. 319p.

KAYA, H.K.; BEDDING, R.A.; AKHURST, R.J. An overview of insect-parasitic and Entomopathogenic nematodes. In:_____. **Nematodes and the biological control of insects pests**, Davis, 1993, p. 1-10.

KAYA, H.K.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 38, p. 181-205, 1993.

KAYA, H.K.; STOCK, S.P. Techniques in insect nematology. In: LACEY, L.A. **Manual of Techniques in Insect Pathology**, London, p. 281-324, 1997.

LEITE, L.G.; MACHADO, L.A.; GOULART, R.M.; TAVARES, F.M.; BATISTA FILHO, L.A. Screening of Entomopathogenic nematodes (Nemata: Rhabditida) and the efficiency of *Heterothabditis* sp. against the sugar cane root spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae). **Neotropical Entomology**, Londrina,

v. 34, n. 5, p. 785-790, 2005.

LEWIS, E.E. Behavioural ecology. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic Nematology**, New York, 2002, p. 205-223.

MARICONI, F.A.M. **Inseticidas e seu emprego no combate às pragas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1963. 607p.

MENDONÇA, A.F.; BARBOSA, G.F.S.; MARQUES, J.E. As cigarrinhas da cana-de-açúcar (Hemiptera: Cercopidae) no Brasil. In: MENDONÇA, A.F. (Ed.). **Pragas da cana-de-açúcar**, Maceió, 1996. p. 171-192.

MENEZES, M. **As cigarrinhas-das-pastagens (Homoptera: Cercopidae) na região sul da Bahia, Brasil**: Identificação, distribuição geográfica e plantas hospedeiras. Cruzeiro: Centro de Pesquisas do Cacau, 1982. 48p. (Boletim Técnico CEPLAC).

NGUYEN, K.B.; SMART, G.C. Life cycle of *Steinernema scapterisci*. **Journal of Nematology**, Loundonville, v. 24, n. 1, p. 160-169, 1992.

PEÑAFLO, M.F.G.V.; ERB, M.; ROBERT, C.A.M.; MIRANDA, L.A.; WERNEBURG, A.G.; DOSSI, F.C.A.; TURLINGS, T.C.J.; BENTO, J.M.S. Oviposition by a moth suppress constitutive and herbivore-induced plant volatiles in maize. **Planta**, Berlin, v. 234, n. 1, p. 207-215, 2011.

PINTO, A.S.; BOTELHO, P.S.M.; DE OLIVEIRA, H.N. **Guia ilustrado de pragas e insetos benéficos da cana-de-açúcar**. Piracicaba, 2009. 160p.

POINAR, G.O. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. (Ed.). **Entomopathogenic nematodes in biological control**, Boca Raton, 1990, p. 23-61.

RASMANN, S.; ALI, J.G.; HELDER, J.; van der PUTTEN, W.H. Ecology and evolution of soil nematode chemotaxis. **Journal of Chemical Ecology**, Dordrecht, v. 38, n. 6, p. 615-628, 2012.

RASMANN, S.; KÖLLNER, T.G.; DEGENHART, J.; HILTPOLD, I.; TOEPFER, S.; KUHLMANN, U.; GERSHENZON, J.; TURLINGS, T.C.J. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect damaged maize root. **Nature**, London, v. 434, p. 732-737, 2005.

RASMANN, S.; TURLINGS, T.C.J. First insights into specificity of belowground tritrophic interactions. **Oikos**, Copenhagen, v. 117, n. 3, 362-369, 2008.

RASMANN, S.; TURLINGS, T.C.J. Simultaneous feeding by aboveground and belowground herbivores attenuates plant-mediated attraction of their respective natural enemies. **Ecology Letters**, Oxford, v. 10, n. 10, p. 926-936, 2007.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R 3.0.2**. Vienna, 2013. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 10 dez. 2013

ROBERT, C.A.M.; ERB, M.; DUPLOYER, M.; ZWAHLEN, C.; DOYEN, G.R.; TURLINGS, T.C.J. Herbivory-induced plant volatiles mediate host selection by a root herbivore. **New Phytologist**, Cambridge, v. 194, n. 4, p. 1061-1069, 2012.

SABELIS, M.W.; JANSSEN, A.; BRUIN, J. Interactions between arthropod predators and plants: a conspiracy against herbivorous arthropod? In: BRUIN, L.P.S.; van der GEEST, J.; SABELIS, M.W. (Ed.). **Ecology and Evolutions of Acary**, Dordrecht, 1999. p. 207-230.

SCHWARTZBERG, E.G.; BÖRÖCZKY, K.; TUMLINSON, J.H. Pea Aphids, *Acyrthosiphon pisum*, suppress induced plant volatiles in broad bean, *Vicia faba*. **Journal of Chemical Ecology**, Dordrecht, v. 37, n. 10, p. 1055-1062, 2011.

SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, Oxford, v. 52, p. 591-611, 1968.

STRNAD, S.P.; DUNN, P.E. Host search behaviour of neonate western rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). **Journal of Insect Physiology**, Columbus, v. 36, n. 3, p. 201-205, 1990.

TERÁN, F.O. Pragas da cana-de-açúcar. In: PARANHOS, S.B. (Ed.). **Cana-de-açúcar cultivo e utilização**, Campinas, v.2, p. 601-698, 1987.

TURKMAN, M.A.A. **Modelos lineares generalizados**: da teoria à prática. Universidade de Lisboa, Lisboa, 2000.151p.

TURLINGS, T.C.J.; LENGWILER, U.B.; BERNASCINI, M.L.; WECHSLER, D. Timing of induced volatiles emission in maize seedlings. **Planta**, Berlin, v. 207, p. 146-152, 1998.

TURLINGS, T.C.J.; LOUGHRIN, J.H.; McCALL, P.J.; RÖSE, U.S.R.; LEWIS, W.J.; TUMLINSON, J.H. How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v. 92, n. 10, p. 4169-4174, 1995.

TURLINGS, T.C.J.; WÄKERS, F. Recruitment of predator and parasitoids by herbivore-injured plants. In: CARDÉ, R.T.; MILLAR, J.G.(Ed.). **Advances in insect chemical ecology**, Cambridge, 2004. p. 21-74.

van TOL, R.W.H.M.; van der SOMMEN, T.C.; BOFF, M.I.C.; van BEZOOIJEN, J.; SABELIS, M.W.; SMITS, P.H. Plants protect their roots by alerting the enemies of grubs. **Ecology Letters**, Oxford, v. 4, n. 4, p. 292-294, 2001.

WHITE, G.F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. **Science**, Washington, v. 66, n. 1709, p. 302-303, 1927.