

SCHEILA RIBEIRO MESSA ZALESKI

***PISSODES CASTANEUS* (DE GEER) (COLEOPTERA, CURCULIONIDAE):
BIOECOLOGIA, FEROMÔNIO SEXUAL, VARIABILIDADE GENÉTICA E
ASPECTOS DO MONITORAMENTO E CONTROLE**

Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração em Entomologia da Universidade Federal do Paraná-UFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Sonia M. N. Lazzari

Co-orientadores: Dr. Edson Tadeu Iede

Prof. Dr. Francisco de Assis Marques

CURITIBA

2009

AGRADEÇO,

A Deus, por me dar saúde e força na caminhada do dia-a-dia.

Dedico,

Ao meu marido, Darci, pela compreensão e incentivo;

Aos meus pais, Rose e Edison, pelo apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

À orientadora, Profa. Dra. Sonia M. N. Lazzari, pelo apoio e estímulo durante o desenvolvimento desta pesquisa;

Aos co-orientadores, Dr. Edson Tadeu Iede (pesquisador da Embrapa Florestas) e ao Prof. Dr. Francisco de Assis Marques (professor do Departamento de Química da UFPR), pelos ensinamentos e apoio durante toda a pesquisa;

Ao Prof. Dr. Germano H. Rosado-Neto, pela colaboração na confirmação da espécie e na sexagem dos insetos;

Ao Prof. Dr. Wittko Francke, da Universidade de Hamburgo, pela colaboração na identificação dos compostos feromonais;

Aos pesquisadores da Embrapa Florestas, Edílson Batista de Oliveira, pela colaboração nas análises estatísticas e à Dra. Susete do Rocio Chiarelo Penteadó pela amizade e apoio na elaboração das tabelas de vida;

À pesquisadora Dra. Tiziana Panzavolta da Università degli Studi di Firenze, Firenze, Itália, pelo envio de amostras para caracterização molecular;

Aos professores e técnicos do Departamento de Zoologia da UFPR e do Departamento de Bioquímica da UFPR, em especial à Paula e ao Valter;

À amiga pesquisadora da Turfal, Maria Sílvia P. Leite, pela colaboração nos ensaios com fungos;

Aos colegas e amigos do curso de Pós-graduação em Entomologia, especialmente à Crisleide, pela grande ajuda nos ensaios com AFLP e à Joelma, pela amizade;

Aos amigos e pesquisadores do Laboratório de Entomologia da Embrapa Florestas, em especial ao Ivan, pela colaboração nos experimentos de campo;

Aos amigos do Laboratório de Ecologia Química e Síntese de Produtos Naturais, Gustavo e Celso;

Ao Programa de Pós-graduação em Entomologia da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade para a realização do Doutorado;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa;

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Florestas, pelo apoio no desenvolvimento dos trabalhos de campo e laboratório;

Às empresas Midwestvaco–Rigesa e Reflorestadores Unidos S.A., pelo apoio no desenvolvimento do trabalho de campo e suporte financeiro;

E a todos os que contribuíram de alguma forma para a realização desta pesquisa.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I - Parâmetros biológicos e tabelas de vida de fertilidade de <i>Pissodes castaneus</i> em <i>Pinus</i> spp.	7
RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1. Aspectos biológicos de <i>P. castaneus</i> e elaboração de tabelas de vida de fertilidade	13
2.2. Determinação do número de instares de <i>P. castaneus</i>	14
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
3.1. Parâmetros biológicos de adultos de <i>P. castaneus</i>	15
3.2. Tabelas de vida de fertilidade de <i>P. castaneus</i>	18
3.3. Determinação do número de instares de <i>P. castaneus</i>	21
4. CONCLUSÕES	24
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
CAPÍTULO II - Feromônio sexual de <i>Pissodes castaneus</i>: isolamento, identificação e respostas comportamentais	28
RESUMO	29
ABSTRACT	30
1. INTRODUÇÃO	31
2. MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1. Criação dos insetos	35
2.2. Coleta dos voláteis dos insetos	35
2.3. Bioensaios em olfatômetro	35
2.4. Análises químicas	36
2.5. Condições das análises	37

2.6. Análises estatísticas	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.1. Análise dos extratos das aerações	37
3.2. Bioensaios em olfatômetro em Y	39
3.3. Identificação estrutural dos compostos do extrato de machos	40
3.4. Determinação da estereoquímica absoluta do grandisal e grandisol	42
4. CONCLUSÕES	46
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	46
CAPÍTULO III - Caracterização da estrutura genética de <i>Pissodes castaneus</i> utilizando a técnica PCR-AFLP	49
RESUMO	50
ABSTRACT	51
1. INTRODUÇÃO	52
2. MATERIAL E MÉTODOS	53
2.1. Coleta de amostras de <i>P. castaneus</i>	53
2.2. Extração e quantificação do DNA genômico	54
2.3. Técnica de AFLP	55
2.4. Análise dos dados	55
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4. CONCLUSÕES	61
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	61
CAPÍTULO IV - Monitoramento de <i>Pissodes castaneus</i> e de seus inimigos naturais em plantios de <i>Pinus taeda</i> no Sul do Brasil	63
RESUMO	64
ABSTRACT	65
1. INTRODUÇÃO	66
2. MATERIAL E MÉTODOS	68
2.1. Caracterização das áreas experimentais	68
2.2. Avaliação da ocorrência e flutuação de <i>P. castaneus</i> com toretes-armadilha	69
2.3. Permanência dos toretes-armadilha no campo	71

2.4. Análise estatística e dados meteorológicos	72
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
3.1. Flutuação populacional de <i>P. castaneus</i> em Cambará do Sul, RS	72
3.2. Flutuação populacional de <i>P. castaneus</i> em Três Barras, SC	75
3.3. Permanência das armadilhas de <i>P. castaneus</i> em plantio de Pinus para monitoramento de <i>P. castaneus</i>	79
3.4. Inimigos naturais de <i>P. castaneus</i>	88
4. CONCLUSÕES	91
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	92
CAPÍTULO V - Eficiência de diferentes isolados de fungos entomopatogênicos no controle de <i>Pissodes castaneus</i>	94
RESUMO	95
ABSTRACT	96
1. INTRODUÇÃO	97
2. MATERIAL E MÉTODOS	98
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
4. CONCLUSÕES	103
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	103
CONSIDERAÇÕES FINAIS	105
ANEXO	109

RESUMO

O gorgulho-da-casca-do-pinus, *Pissodes castaneus* (De Geer, 1775) (Coleoptera, Curculionidae), é uma importante praga florestal que foi registrada no Brasil em 2001 e já se encontra distribuída nos três estados da Região Sul, causando grande preocupação ao setor florestal. Este trabalho teve como objetivos: avaliar o desempenho reprodutivo de *P. castaneus* em duas espécies de *Pinus*; isolar, identificar e avaliar a atividade comportamental de feromônios de *P. castaneus*; determinar a estrutura genética das populações do gorgulho usando PCR-AFLP; determinar a ocorrência e a flutuação sazonal do inseto e de seus inimigos naturais; avaliar metodologia para o monitoramento do inseto e selecionar isolados de fungos patogênicos ao gorgulho. Os insetos foram capturados com toretes-armadilhas em Cambará do Sul, RS e Três Barras, SC, para os diversos estudos em laboratório. Constatou-se a ocorrência de quatro instares larvais, determinados pela largura da cápsula cefálica. A população do RS apresentou desempenho biológico satisfatório em ambos os hospedeiros, *Pinus taeda* e *Pinus elliottii*, refletidos nos parâmetros biológicos, nos dados da tabela de vida de fertilidade e nos indicadores de desempenho. A população de *P. castaneus* de SC criada em *P. taeda* apresentou os melhores valores para diversos indicadores biológicos: maior fertilidade específica (m_x), com maior capacidade inata de aumentar em número (r_m) e maior fator de multiplicação diário da população a cada dia (λ), combinados com o menor tempo necessário para a população duplicar em número (TD), condizentes com o desempenho de espécies-praga potencial. Em contraste, a mesma população de SC, criada, porém, em *P. elliottii*, apresentou o pior desempenho para todos os parâmetros. Ficou demonstrado que a comunicação entre os co-específicos de *P. castaneus* é mediada por feromônios sexuais produzidos pelos machos, identificados como (1R,2S)-grandisal e (1R,2S)-grandisol, em excesso enantiomérico superior a 95%, não foi verificado efeito sinérgico com os voláteis da planta hospedeira. As quatro combinações de iniciadores AFLP geraram um total de 367 fragmentos de DNA 100% polimórficos; revelaram baixas similaridades genéticas (0,11 entre os dois grupos mais distantes) e distâncias genéticas de 0,13 a 0,44, que são indícios da ocorrência de diversos eventos fundadores, com linhagens heterogêneas; a diferenciação genética de pelo menos uma das populações de SC foi condizente com um evento fundador independente. A população de *P. castaneus* de Cambará do Sul, RS apresentou quase o dobro de insetos de Três Barras, SC; sendo que na primeira o pico de emergência dos adultos ocorreu em outubro (96%), enquanto que na segunda houve pelo menos dois picos de emergência, em janeiro (48%) e

fevereiro (29%). A ocorrência de larvas, em Três Barras, correlacionou-se significativamente com fatores climáticos, mas não as de Cambará do Sul. Foram registradas epizootias naturais do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* em adultos de *P. castaneus*; sendo que nos testes com isolados dos fungos foram obtidas mortalidades em torno de 74%, com TL_{50} entre 9,2 e 33 dias. Houve diferença significativa para local e período (mês), e para a interação local x tempo x período da instalação dos toretes-armadilha, com o dobro de insetos coletados e distribuição em diversos meses do ano em Cambará do Sul, quando comparado com Três Barras. Não se observou diferença significativa na captura de insetos com relação ao tempo de permanência das armadilhas no campo (30, 60 e 90 dias). Os resultados indicam que a melhor metodologia para monitoramento do gorgulho-da-casca-do-pinus com os toretes-armadilha é fazer a instalação e retirada das mesmas em intervalos de até 60 dias, para evitar reinfestação a partir dos toretes, se deixados por mais tempo. Em função da ocorrência de *P. castaneus* nas áreas amostradas e de seu desempenho biológico satisfatório nas duas espécies de Pinus mais plantadas na região sul, torna-se necessário o monitoramento constante e a busca por medidas eficientes para seu controle.

ABSTRACT

The banded pine weevil, *Pissodes castaneus* (De Geer, 1775) (Coleoptera, Curculionidae) is a forest pest recorded in Brazil since 2001, which is already distributed in the three states of the Southern Region, causing great concern to the forestry sector. This study aimed to evaluate the reproductive performance of *P. castaneus* on two species of *Pinus*; to isolate, identify and evaluate the behavioral activity of the insect pheromones; to determine the genetic structure of populations of this weevil using PCR-AFLP; to determine its occurrence, seasonal fluctuation and natural enemies; to evaluate methodology for monitoring and to test the potential control of *P. castaneus* by entomopathogenic fungi. The insects were caught with log-traps in Cambará do Sul, RS and Três Barras, SC, and brought to the laboratory for the studies. It was detected the occurrence of four larval instars determined by the head capsule width. The weevil population from RS presented a satisfactory biological performance on both, *P. taeda* and *P. elliottii*, reflected in the biological parameters, fertility table, and the performance indicators. The population of *P. castaneus* from SC on *P. taeda* presented the best values for several biological indicators: high specific fertility (m_x), intrinsic rate of increase (r_m) and finite rate of population increase (λ) combined with the shortest time required for the population to double its number (TD), consistent with the performance of a potential pest species. In contrast, the same population from SC, now reared on *P. elliottii*, presented the poorest performance for all parameters. It was demonstrated that communication between co-specifics of *P. castaneus* is mediated by sex pheromones produced by males, identified as (1R,2S)-grandisal and (1R,2S)-grandisol in enantiomeric excess exceeding 95%; no synergistic effect with the host plant volatiles was observed. The four combinations of AFLP primers generated a total of 367 DNA fragments 100% polymorphic; it was revealed low genetic similarity (0.11 between the two most distant groups) and genetic distances ranging from 0.13 to 0.44, which are evidence of various founder events. At least one population (from SC) showed genetic differentiation consistent with an independent founding event. The population of *P. castaneus* in Cambará do Sul almost doubled that from Três Barras; with the adults from the former emerging mostly in October (96%), while the last presented at least two peaks of emergence, in January (48%) and February (29%). The occurrence of larvae from Três Barras was significantly correlated with climatic factors, but not those from Cambará do Sul. Natural epizooties of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on adults of *P. castaneus* were detected. Tests with fungus isolates resulted in mortalities

around 74%, with LT_{50} between 9.2 and 33 days. Significant differences for place and period (month) and for interaction site x time x period of installation of log-traps were observed. However, there were no significant differences in the capture of insects in relation to the permanence time of the traps in the field (30, 60 and 90 days). The best methodology for monitoring the banded pine weevil was to install and remove the log-traps in intervals up to 60 days in order to prevent reinfestation with weevils from traps if they were left longer. Due to the presence of *P. castaneus* in the surveyed areas and to its satisfactory biological performance on the two most common species of *Pinus* planted in the south of Brazil, it is necessary continuous monitoring and search for efficient control measures.

INTRODUÇÃO GERAL

Os plantios de *Pinus* spp., no Brasil, ocupam uma área de 1,8 milhões de ha (SBS 2009) em extensas áreas contínuas e geralmente em plantios com base genética restrita, sendo *Pinus taeda* L., a espécie mais plantada nas regiões Sul e Sudeste do país.

Após um longo período livre de pragas, em 1988 foi registrada a presença da vespa-da-madeira, *Sirex noctilio* (F., 1793) (Hymenoptera, Siricidae) (Iede *et al.* 1988), colocando em risco os plantios de pínus do país, decorrente da baixa resistência ambiental, alimento abundante e ausência de agentes de controle, favorecendo a praga e provocando perdas econômicas. Outra praga introduzida foram os afídeos (Hemiptera, Aphididae) *Cinara atlantica* (Wilson, 1919) (Lazzari & Zonta-de-Carvalho 2000) e *Cinara pinivora* (Wilson, 1919) (Iede *et al.* 1998), que ocorrem desde 1996 e estão amplamente distribuídos nas regiões produtoras de *Pinus* spp.

Mais recentemente, em 2001, foi detectado o gorgulho-da-casca-do-pinus, *Pissodes castaneus* (De Geer, 1775) (Coleoptera, Curculionidae), no município de São José dos Ausentes, RS. No mesmo ano já foi detectado em Curitiba, SC e em Pinhão, PR (Iede *et al.* 2004), sendo que esses registros foram feitos em plantios jovens de *P. taeda* (2 a 6 anos). Atualmente esta espécie encontra-se distribuída nos três estados da Região Sul, causando preocupação ao setor florestal.

Os danos relacionados ao ataque de pragas em plantios de pínus no Brasil ocorrem, geralmente, associados a outros fatores de estresse, que debilitam a planta, porém, na maioria dos casos, esta consegue se recuperar (Penteado *et al.* 2000). No caso do ataque de *P. castaneus* pode ocorrer a morte da árvore, requerendo a adoção de medidas preventivas, particularmente quanto ao monitoramento e manejo adequado dos plantios (Iede *et al.* 2004).

O gorgulho-da-casca-do-pinus, *P. castaneus* foi confundido, por muitos anos com outras espécies de *Pissodes* Germar, 1817 na Europa, sendo que *Pissodes notatus* (Fabricius, 1787), citado por Alauzet (1977) na França, por Plata-Negrache & Prendes-Ayala (1979), na Espanha, e por outros autores, trata-se de *P. castaneus*. Hopkins (1911), estudando o gênero *Pissodes*, já havia definido que o nome válido, pela prioridade, era *Pissodes castaneus* (De Geer, 1775) e que *Pissodes notatus* (Fabricius, 1787) era sinônimo de *P. castaneus*.

Os adultos possuem de 6 a 9 mm de comprimento, corpo com forma oblonga, de coloração marrom-avermelhado, a cabeça se prolonga em um rostro e as antenas são

geniculadas. Os élitros apresentam quatro manchas transversais amareladas que são unidas por uma faixa longitudinal esbranquiçada. Para realizar a postura as fêmeas fazem pequenos orifícios com a mandíbula de 2 a 2,5 mm de profundidade na casca do pínus e depositam seus ovos isoladamente, mas podem, eventualmente, ovipositar dois ou três ovos num mesmo orifício (Plata-Negrache & Prendes-Ayala 1979). Os ovos são brancos quando recém-ovipositados, mas tornam-se amarelados conforme avança o processo de maturação; são de forma ovóide com dimensões de 0,5 x 1,0 mm. As larvas são ápodas, brancas e encurvadas sobre a parte ventral, com aspecto típico das larvas de curculionídeos; apresentam cápsula cefálica de coloração castanha clara e mandíbulas fortes; no último ínstar podem alcançar 10 mm de comprimento. As pupas são livres, vivem protegidas por fibras de madeiras que a larva vai acumulando durante a construção da câmara pupal (Greze *et al.* 2000).

O gorgulho-da-casca-do-pínus apresenta ampla distribuição geográfica, com registros na Europa (Alemanha, Áustria, Bélgica, Dinamarca, Espanha, Ilhas Canárias, Finlândia, França, Grécia, Holanda, Hungria, Itália, Noruega, Polônia, Portugal, Romênia, Suíça), no Norte da África (Argélia) (Greze *et al.* 2000) e na América do Sul (Argentina e Uruguai) (Abgrall *et al.* 2000) e mais recentemente no Brasil. Seus hospedeiros são coníferas da família Pinaceae: *Abies* spp., *Pinus* spp. (*P. contorta*, *P. pinaster*, *P. halepensis*, *P. taeda*, *P. nigra*, *P. sylvestris*, *P. elliottii*, *P. canariensis*, *P. pinea* e *P. radiata*) e *Pseudotsuga menziesii* (Greze *et al.* 2000).

Os danos causados por *P. castaneus* podem ser de dois tipos: o primeiro e de menor importância, corresponde ao dano provocado pelo adulto ao alimentar-se das gemas e ramos jovens, deixando pequenos orifícios de saída com visíveis exsudações de resina e abundante serragem embaixo da casca. O segundo, e principal dano, é ocasionado pelas larvas em seu processo de alimentação, construindo galerias e anelando ramos e troncos em árvores jovens e adultas (Greze *et al.* 2000). As árvores atacadas apresentam acículas mortas ou com coloração amarelada ou avermelhada nos ramos mais altos; partes da casca tendem a soltar-se devido à seca do tronco e morte progressiva da árvore, do ápice para a base (Servicio de Protección de la Naturaleza 1999).

Os métodos de controle de *P. castaneus* podem ser químicos, biológicos ou culturais, contribuindo para a redução do ataque e dano da praga, contudo, nem sempre são viáveis em termos econômicos ou ambientais. O controle biológico apresenta grande potencial em plantios florestais, mas para a América do Sul, não se tem

informações quanto aos agentes potenciais e sua efetividade no controle. Na França, ocorrem várias espécies de himenópteros parasitóides, sendo que os principais pertencem à família Braconidae, Chalcididae e Ichneumonidae, que são parasitóides de ovos e larvas de *P. castaneus* e a taxa de parasitismo pode variar de 20 a 30% (Alauzet 1990).

O controle químico, na região de origem, é realizado esporadicamente, com aplicações aéreas com inseticidas (Cobo & Ruiz 1990). Apesar de o inseto ser vulnerável a vários produtos químicos, há dificuldades para a realização dos tratamentos, pois quando as temperaturas são muito altas os adultos buscam proteção, entrando em estivação no solo ou entre as ranhuras da casca (Romanik & Cadahia 1981). Este tipo de controle é efetivo apenas em curto prazo devido ao elevado custo (Iede *et al.* 2004).

O controle cultural pode ser feito com toretes-armadilha, possibilitando a detecção precoce e o monitoramento da praga. Também, recomenda-se a utilização de medidas preventivas, como a escolha de sítios com boas condições para prevenir estresse nas árvores; restos de poda e desbastes devem ser recolhidos e destruídos pelo fogo ou com picadores, para evitar a proliferação do inseto (Cobos & Ruiz 1990; Servicio de Proteccion de la Naturaleza 1999; Iede *et al.* 2004).

Os insetos utilizam substâncias químicas para mediar atividades comportamentais, como na seleção de plantas hospedeiras, na escolha de locais para oviposição, na corte e no acasalamento e na organização das atividades sociais (Vilela & Della Lucia 2001). Os feromônios são substâncias mediadoras de interações entre indivíduos da mesma espécie que provocam uma reação comportamental ou uma resposta fisiológica (Birch & Haynes 1983) e tem sido utilizado no monitoramento e controle de pragas florestais.

O controle microbiano com fungos entomopatogênicos pode ser uma alternativa viável para o controle de *P. castaneus*, como tem sido demonstrado para *Pissodes strobi* (Peck, 1817), usando o fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Trudel *et al.* 2007) e *Lecanicillium* spp. (Zimm.) Viègas (Kope *et al.* 2008), mas não há estudos no Brasil sobre a eficácia de agentes patogênicos para este gorgulho.

Os estudos da variabilidade genética das populações de insetos de interesse econômico também contribuem para o melhor conhecimento das populações das pragas. Uma das técnicas que pode ser utilizada para esta finalidade é a dos marcadores moleculares AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Vos *et al.* 1995). Há

ainda trabalhos com o gênero *Pissodes* usando RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Lewis *et al.* 2000, 2001), além da descrição dos padrões genéticos de populações através do sequenciamento do DNA mitocondrial da região do Citocromo Oxidase I (COI) (Zhang *et al.* 2007).

Considerando que *P. castaneus* representa uma ameaça à atividade florestal com *Pinus* na região Sul do Brasil, e também devido à falta de informações sobre esta praga, foi proposta a presente pesquisa. Esta tese foi formulada sobre a hipótese de que *P. castaneus*, sendo uma espécie introduzida recentemente no ecossistema florestal, apresenta características biológicas, comportamentais e uma estrutura genética condizentes com as de uma praga potencial, requerendo monitoramento e controle adequados para minimizar sua dispersão e prejuízos. Com esta idéia em mente, foram delineados estudos em laboratório abordando aspectos da biologia de *P. castaneus* em relação a suas plantas hospedeiras (Capítulo I); isolamento e identificação de feromônios envolvidos em seu comportamento (Capítulo II); determinação da estrutura genética das populações (capítulo III); passando para estudos de campo para avaliar sua ocorrência, flutuação e metodologia para seu monitoramento (Capítulo IV); e finalizando com a prospecção de fungos entomopatogênicos como agentes potenciais para o controle biológico de *P. castaneus* (Capítulo V).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abgrall, J. F.; V. Villén Gonzáles & J. F. Porcile. 2000. Biología y control del gorgojo de los pinos (II parte): desde todas las frentes. **Chile forestal** **25**: 9-13.
- Alauzet, C. 1977. Cycle biologique de *Pissodes notatus* (Coleptera, Curculionidae) dans la region toulousaine (France). **Canadian Entomology** **109**: 597-603.
- Alauzet, C. 1990. Population dynamics of the pine pest *Pissodes notatus* F. (Col., Curculionidae). II. The role of parasitism. **Entomophaga** **35**: 119-126.
- Birch, M. C. & K. F. Haynes. 1983. Insect pheromones. **Studies on Biology** **147**: 61.
- Cobos, C. & R. Ruiz. 1990. Problemas fitossanitários de la espécie *Pinus radiata* D. Don em Espana, com especial referencia al País Vasco. **Boletín de Sanidad Vegetal** **16**: 37-53.
- Grez, O. R.; L. F. Fontecilla; R. A. Nunez; C. R. A. Nunez; F. G. Kirwood & G. H. Torres. 2000. **Manual de plagas cuarentenárias potencialmente daninas para o**

- Chile com especial énfasis em plantaciones de pino y eucalipto.** Chile, Controladora de Plagas Forestales S.A., 84 p.
- Iede, E. T.; S. R. C. Penteadó & E. Schaitza. 1998. Programa nacional de controle a vespa-da-madeira no Brasil. p. 43–51. *In: Training in the control of *Sirex noctilio* by the use of natural enemies.* Morgantown, USDA Forest Service.
- Iede, E. T.; W. Reis Filho & S. R. C. Penteadó. 2004. Ocorrência de *Pissodes castaneus* (De Geer) (Coleoptera, Curculionidae) em *Pinus*, na Região Sul do Brasil. **Comunicado Técnico 114**, Curitiba, Embrapa Florestas, 6 p.
- Iede, E. T.; Lazzari, S. M. N.; Penteadó, S. R. C.; Zonta-de-Carvalho, R.C. & Trentini, R. F. R. 1998. Ocorrência de *Cinara pinivora* (Homoptera, Aphididae, Lachninae) em reflorestamentos de *Pinus* spp. no Sul do Brasil. *In: Congresso Brasileiro de Zoologia.* Recife, PE. **Anais.** p.141.
- Kope, H. H.; R. I. Alfaro & R. Lavallée. 2008. Effects of temperatura and water activity on *Lecanicillium* spp. conidia germination and growth, and mycosis of *Pissodes strobi*. **Biocontrol 53:** 489-500.
- Lazzari, S. M. N & R. C. Zonta-de-Carvalho. 2000. Aphids (Hemiptera, Aphididae, Lachninae, Cinarini) on *Pinus* spp. and *Cupressus* sp. in Southern Brazil. *In: International Congresso of Entomology, XXI.* Foz do Iguaçu, PR. **Anais.** p. 493.
- Lewis, K. G.; Y. A. El-Kassaby; R. I. Alfaro & S. Barnes. 2000. Population genetic structure of *Pissodes strobi* (Coleoptera: Curculionidae) in British Columbia, Canada. **Annals of Entomological Society of America 93:** 807-818.
- Lewis, K. G.; K. Ritland; Y. A. El-Kassaby; J. A. Mclean; J. Glaubitz & J. E. Carlson. 2001. Randomly amplified polymorphic DNA reveals fine-scale genetic structure in *Pissodes strobi* (Coleoptera: Curculionidae). **Canadian Entomology 133:** 229-238.
- Penteadó, S. R. C.; R. F. Trentini; E. T. Iede & W. Reis Filho. 2000. Ocorrência, distribuição danos e controle de pulgões do gênero *Cinara* em *Pinus* spp. no Brasil. **Floresta 30:** 55-64.
- Plata-Negrache, P. & C. Prendes-Ayala. 1979. Contribución al conocimiento de la bioecología de *Pissodes notatus* F., en las poblaciones de pinos de Canarias. **Boletín de la Estacion Central de Ecología 8:** 33-47.
- Romanik, N. & D. Cadahia. 1981. **Plagas de insectos de las masas forestales españolas.** 2. ed. Madrid: Ministerio da Agricultura, Pesca e Alimentación. 252 p.

Servicio de Protección de la Naturaleza. 1999. Gorgojo perforador de los pinos, *Pissodes castaneus* De Geer. Gobierno de Aragon. Departamento de agricultura y Medio Ambiente. **Informações Técnicas.**

Sociedade Brasileira de Silvicultura. [Home Page] Disponível em <http://www.sbs.org.br>
Acesso em: 08 jun. 2009.

Trudel, R.; R. Lavalley; C. Guertin; C. Cote; S. I. Todorova; R. Alfaro & H. Kope. 2007. Potencial of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) for controlling the white pine weevil, *Pissodes strobi* (Col., Curculionidae). **Journal of Applied Entomology 131: 90-97.**

Vilela, E. F. & T. M. C. Della Lucia. 2001. **Feromônios de insetos: Biologia, química e emprego no manejo de pragas.** 2ª edição. Viçosa, Editora Holos, xix + 206 p.

Vos, P.; R. Hogers; M. Bleeker; M. Reijans; T. Van de Lee; M. Hornes; A. Frijters; J. Pot; J. Peleman; M. Kuiper & M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research 21: 4407-4414.**

Capítulo I

Parâmetros biológicos e tabelas de vida de fertilidade de *Pissodes castaneus* em *Pinus* spp.

PARÂMETROS BIOLÓGICOS E TABELAS DE VIDA DE FERTILIDADE DE *Pissodes castaneus* EM *Pinus* spp.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivos: avaliar e comparar o desempenho reprodutivo de duas populações de *P. castaneus* em *Pinus taeda* L. e *Pinus elliottii* Engelm.; elaborar tabelas de vida de fertilidade para determinar os parâmetros de crescimento populacional e o número de instares de *P. castaneus*. Os insetos foram capturados com toretes-armadilhas infestados no campo, provenientes de Cambará do Sul, RS e Três Barras, SC, os quais foram transportados ao laboratório para os estudos da biologia. Foram utilizados quatro tratamentos: População de *P. castaneus* proveniente do RS criada em *P. taeda* e em *P.elliottii*; população de *P. castaneus* proveniente de SC, criada em *P. taeda* e em *P. elliottii*. Para cada tratamento foram 20 repetições, com um casal de *P. castaneus* sobre um ramo de pinus recém-cortado por recipiente, com avaliação semanal. As larvas de *P. castaneus* passaram por quatro ínstares, determinados pela largura da cápsula cefálica. A população de *P. castaneus* do RS apresentou desempenho biológico satisfatório em ambos os hospedeiros, *P. taeda* e *P. elliottii*, refletidos nos parâmetros biológicos, nos dados da tabela de vida de fertilidade e nos indicadores de desempenho. A população de *P. castaneus* de SC, criada em *P. taeda* apresentou valores superiores para diversos indicadores biológicos, destacando-se: a maior capacidade inata de aumentar em número (r_m), que traduz seu potencial biótico elevado; maior razão finita de aumento populacional (λ) que é o fator de multiplicação diário da população; o maior número de ovos colocados no tempo de vida da fêmea (m_x); além do menor tempo necessário para a população duplicar em número (TD), condizentes com o desempenho de uma espécie-praga potencial. Em contraste, a mesma população de SC, criada, porém, em *P. elliottii*, apresentou desempenho biológico pobre para todos os parâmetros, indicando que esta associação inseto-planta hospedeira não favoreceu o inseto, mas representa uma informação importante para fundamentar o manejo do inseto.

BIOLOGICAL PARAMETERS AND FERTILITY LIFE TABLES OF *Pissodes castaneus* ON *Pinus* spp.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate and compare the reproductive performance of two populations of *P. castaneus* on *Pinus taeda* L. and *Pinus elliottii* Engelm.; to construct fertility tables and to determine the parameters of population growth and the number of instars of *P. castaneus*. The insects were captured with log-traps in the field in Cambará do Sul, RS and Três Barras, SC, and brought to the laboratory for the biological studies. The experiment consisted of four treatments: *P. castaneus* population from RS reared on *P. taeda* and on *P. elliottii*; *P. castaneus* population from SC reared on *P. taeda* and on *P. elliottii*. For each treatment there were 20 replicates with one couple of *P. castaneus* placed on a newly-cut pine branch in a pot evaluated weekly. The larvae of *P. castaneus* passed through four instars determined by the head capsule width. The population of *P. castaneus* from RS presented a satisfactory biological performance on both hosts, *P. taeda* and *P. elliottii*, reflected in the biological parameters, on the data of the fertility table and the performance indexes. The population of *P. castaneus* from SC on *P. taeda* presented better values for various biological indexes, including: the highest intrinsic rate of increase (r_m), which reflects its high biotic potential; higher finite rate of population increase (λ), which is the daily multiplication factor; higher fecundity (m_x), and the shortest time required for the population to double its number (TD), all consistent with the performance of a potential pest species. In contrast, the same population from SC, but reared on *P. elliottii*, presented the poorest performance for all parameters, indicating that this insect-host plant interaction does not favor the insect, but represents an useful information for insect management.

1. INTRODUÇÃO

O gorgulho-da-casca-do-pinus, *Pissodes castaneus* (De Geer, 1775) (= *Pissodes notatus* F., 1787) (Coleoptera, Curculionidae) é uma importante praga do *Pinus* amplamente distribuída na Europa, Norte da África (Grez *et al.* 2000), América do Sul (Abgrall *et al.* 2000) e mais recentemente, em 2001, foi registrada no Brasil (Iede *et al.* 2004).

Alauzet (1977) avaliou parâmetros biológicos de *Pissodes notatus* (Fabricius, 1787), na França; e demonstrou que a maior emergência de adultos de *P. notatus* (= *P. castaneus*) ocorre durante os meses de julho e agosto, para duas populações francesas, cuja variação foi atribuída a características evolutivas das mesmas. A primeira população completou seu desenvolvimento de ovo a adulto, em 11 a 12 meses, a partir de posturas realizadas após meados de julho (máximo de ovos depositados em setembro); as larvas se desenvolveram até o terceiro ínstar e entraram em hibernação durante o inverno; na primavera seguinte, completou o desenvolvimento, emergindo entre meados de junho e julho. A segunda população resultou de posturas feitas entre fevereiro e julho por adultos hibernantes, com o maior número de ovos colocados durante abril e maio; a progênie completou seu ciclo de ovo a adulto em um período notavelmente curto, de apenas 2 a 3 meses, com adultos emergindo de meados de julho até o final de agosto. A diferença observada para a duração do desenvolvimento destes insetos, de 2 a 12 meses, provavelmente resultam da taxa de desenvolvimento influenciada pela temperatura. Nas condições de temperatura dessa região da França, os indivíduos completam seu desenvolvimento sob a casca do pinus, aproximadamente, todos ao mesmo tempo; sendo assim, a emergência dos adultos concentra-se em julho e agosto.

De acordo com Plata-Negrache & Prendes-Ayala (1979), *P. castaneus* apresenta um ciclo biológico complexo na sua região de origem, mais especificamente na Espanha, onde os adultos podem sobreviver por até 20 meses. Ao atingir a maturidade sexual, a fêmea pode ovipositar até o final da vida. As posturas são realizadas em períodos bem definidos, o primeiro começa em maio e vai até meados de julho (primavera início do verão no Hemisfério Norte) e o segundo vai desde o final de agosto até outubro (final do verão e início do inverno no Hemisfério Norte). Segundo estes autores, em climas mais quentes, o primeiro período de oviposição pode adiantar e o segundo retardar, ocorrendo o contrário nas partes continentais, altas e frias. A

influência de fatores climáticos é marcante no ciclo deste inseto, sendo que em áreas de clima mais quente, como na zona litorânea, estes insetos podem ter duas gerações por ano; enquanto que em regiões mais frias, *P. castaneus* pode apresentar uma geração a cada dois anos.

Para o estudo da biologia dos insetos é importante determinar o número de instares larvais, que em insetos xilófagos é particularmente difícil, pelo fato de estarem sob a casca ou dentro do tronco e morrerem quando retirados. O número de instares tem sido estudado para muitos insetos e não é constante, podendo variar de 4 a 8, em decorrência de vários fatores: hereditários, forma de criação, temperatura, nutrição, sexo e a planta hospedeira (Gaines & Campbell 1935; Parra & Haddad 1989). Em *P. castaneus* o número de instares larvais pode variar de 4 a 5, na sua região de origem (Carle 1967; Alauzet 1977; Buckzeyeva 1965; Panzavolta 2007).

A medida da largura da cápsula cefálica é um dos métodos mais usados para determinar o número de instares larvais. Dyar (1890) definiu que a cápsula cefálica cresce em progressão geométrica, aumentando em largura a cada muda, numa razão constante para uma dada espécie, em média de 1,4.

A razão de crescimento da população de uma espécie praga é um parâmetro importante para decisões em programas de manejo integrado de pragas (MIP), pois permite fazer previsões sobre futuros aumentos populacionais (Guldmond *et al.* 1998). As tabelas de vida auxiliam tanto na compreensão da dinâmica populacional de uma espécie, como na avaliação do impacto que os inimigos naturais podem ter sobre a população de uma determinada praga (Van Lenteren & Woets 1988; Bellows-Junior *et al.* 1992). As tabelas de vida de idade específica são subdivididas em ecológica e biológica, sendo estas últimas divididas em tabelas de esperança de vida e tabelas de vida de fertilidade (Silveira Neto *et al.* 1976).

Na natureza, um ou vários fatores podem influenciar a razão real de aumento populacional (r) de um inseto; porém, em condições de laboratório, é possível excluir esses fatores e, assim, determinar a taxa intrínseca de aumento (r_m), obtida nas tabelas de vida de fertilidade. Esta taxa é definida como a máxima razão de aumento obtido por uma população de distribuição etária fixa, em qualquer combinação particular de fatores físicos do tempo, em condições ótimas de espaço, alimentação e sem a influência de outros fatores (Andrewartha & Birch 1954).

De acordo com Pedigo & Zeiss (1996), o principal dado que se obtém em uma tabela de vida de fertilidade é a taxa intrínseca de aumento (r_m), sendo este o principal

parâmetro relacionado ao controle biológico de pragas. Krebs (1994) ressalta que o (r_m) não é influenciado somente pela temperatura; contudo, conforme Wyatt & Brown (1977), a intensidade luminosa e a planta hospedeira também afetam este parâmetro.

Segundo Traicevski & Ward (2002), (r_m) é uma medida relativa da qualidade do hospedeiro. Price (1984) acrescenta que (r_m) relaciona-se com a taxa líquida de reprodução (R_0) e o tempo de geração (T), traduzindo o potencial biótico da espécie. Para Birch (1948), quanto maior o valor de (r_m) mais bem sucedida será a espécie, em um determinado ambiente. Assim, se a natalidade for maior que a mortalidade, (r_m) é positivo e ocorre crescimento populacional; se a mortalidade for maior que a natalidade, (r_m) é negativo e a população está diminuindo e se (r_m) é igual a 0, a população está estável. Para Coats (1976), (r_m) é o parâmetro mais importante obtido de uma tabela de vida, pois permite a comparação do potencial de crescimento das espécies, além de facilitar a avaliação do papel de um parasitóide em uma comunidade ou verificar se ele será bem sucedido como agente de controle biológico.

O crescimento de uma população depende do número de fêmeas sobreviventes e de sua produção individual em cada intervalo de tempo, representado pela taxa líquida de reprodução (R_0), que indica o número de vezes que uma espécie consegue aumentar de uma geração para outra (Rabinovich 1978; Southwood 1978). De acordo com Horm (1988), se uma população está estável, (R_0) apresenta um valor igual a 1; se (R_0) é maior que 1, indica um aumento populacional e se (R_0) é menor que 1, indica que a população está decrescendo.

Garcia (2002) reforça a importância da taxa líquida de reprodução (R_0) para avaliar a qualidade da criação de insetos, uma vez que o tempo de duração de uma geração (T), que também está envolvido no cálculo da razão finita de aumento populacional (λ) e no cálculo da capacidade inata de aumentar em número (r_m), pode ser influenciado por variáveis abióticas, enquanto que o (R_0) constitui uma característica inata da população.

Outros dois parâmetros da tabela de vida de fertilidade são: a razão finita de aumento populacional (λ), que é um fator de multiplicação da população a cada dia, diferindo de (r_m) por ser uma taxa finita de aumento populacional e não instantânea e TD, que representa o tempo que uma população leva para duplicar em número (Rabinovich 1978).

Trabalhos sobre tabelas de vida de fertilidade para *P. castaneus* são inexistentes na literatura, e para o gênero, os trabalhos estão voltados para a dinâmica das

populações, sendo um destes desenvolvido por Dixon & Houseweart (1982), para *Pissodes strobi* (Peck, 1817) (Coleoptera, Curculionidae). Foram avaliadas três gerações desta espécie em *Pinus strobus* L. sendo determinados os principais fatores de mortalidade que influenciam a população dos gorgulhos. A população parece ser determinada pela sobrevivência de larvas, pupas e adultos de inverno.

Varley & Grandwell (1970) e Podoler & Rogers (1975) afirmam que é importante determinar a relação dos componentes das submortalidades nos estágios ($K_1 + \dots + K_n$) que mais contribuem para a variação total na mortalidade (K). Os principais fatores de mortalidade nos intervalos de idade foram infertilidades dos ovos, competição intraespecífica larval, predação e parasitismo por inimigos naturais e efeito das condições climáticas nos adultos de inverno, refletindo em pequenos incrementos na infestação da praga a cada ano (1977 $K= 1,86$; 1978 $K= 2,04$ e 1979 $K= 2,06$).

Já Liu *et al.* (2008) construíram tabelas de vida de *Pissodes punctatus* Langor et Zhang em uma floresta de *Pinus armandii* Franchet, na China. Os autores determinaram que o principal fator da mortalidade que afetou a dinâmica das populações foi o fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., seguido por parasitóides; sendo que o segundo ínstar larval e o estágio de pupa foram os mais afetados.

A biologia de *P. castaneus* tem sido estudada nos países da Europa (França, Espanha e Itália), porém, no Brasil, onde o ataque da praga em árvores jovens e adultas tornou-se comum nos plantios de *Pinus*, tem sido pouco investigada. Assim, este trabalho teve como objetivos:

- Avaliar e comparar o desempenho reprodutivo de duas populações de *P. castaneus* em *Pinus taeda* Linnaeus e *Pinus elliottii* Engelman;
- Elaborar tabelas de vida de fertilidade e determinar os parâmetros de crescimento populacional de *P. castaneus*;
- Determinar o número de instares de *P. castaneus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Aspectos biológicos de *P. castaneus* e elaboração das tabelas de vida de fertilidade

O experimento foi conduzido no Laboratório de Entomologia da Embrapa Florestas, em sala climatizada com temperatura média de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de

70±10% e fotofase de 12 horas, com quatro tratamentos e vinte repetições, adotando-se o delineamento inteiramente casualizado.

Os tratamentos foram denominados de: T1 – População do Rio Grande do Sul em *P. taeda*; T2 – População do Rio Grande do Sul em *P. elliottii*; T3 – População de Santa Catarina em *P. taeda* e T4 – População de Santa Catarina em *P. elliottii*. Os insetos utilizados no experimento eram provenientes de toretes-armadilha infestada do campo, em Cambará do Sul, RS e Três Barras, SC. Cada unidade experimental era composta de um casal de *P. castaneus* em um copo plástico transparente com tampa perfurada contendo um ramo de pinus recém-cortado, com 10 cm de comprimento, que era trocado semanalmente e avaliado imediatamente após a troca do alimento, sob lupa, para a contagem dos ovos.

Os parâmetros avaliados foram: períodos pré-reprodutivo, reprodutivo e pós-reprodutivo, número de ovos por fêmea, período de incubação dos ovos e longevidade de machos e fêmeas.

Os dados foram transformados em \sqrt{x} e submetidos ao teste de normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S). Realizou-se análise de variância e teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparação das médias.

Com os dados obtidos, foram elaboradas as tabelas de vida de fertilidade e calculados os parâmetros de crescimento populacional, utilizando o sistema computacional *Tabvida* (Penteado *et al.* 2008) adaptado para insetos holometábolos.

2.2. Determinação do número de instares de *P. castaneus*

Foram instalados três lotes de toretes-armadilha no campo, composto por 20 toretes de pinus com 1 m de comprimento, sendo que o primeiro lote foi mantido por 30 dias no campo, o segundo, por 60 dias e o terceiro, por 90 dias. Ao final de cada um dos períodos no campo, os toretes-armadilha foram retirados, transportados ao laboratório e dissecados para obtenção das formas imaturas. Os imaturos eram fixados em álcool 70% e medidos sob microscópio estereoscópico binocular com o auxílio de uma ocular micrométrica. Os caracteres avaliados foram: largura da cápsula cefálica e comprimento do corpo.

Os dados foram tabulados e analisados graficamente e pela análise de componentes principais (ACP).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Parâmetros biológicos de adultos de *P. castaneus*

Os períodos pré-reprodutivo da população de *P. castaneus* do RS em *P. taeda* e *P. elliottii*, com 5,05 e 5,3 semanas, respectivamente, foram superiores ao obtido para população de SC em *P. elliottii* (3,23 semanas) (Tabela 1). Na população de SC em *P. taeda* foram obtidos valores intermediários. De acordo com Plata-Negrache & Prendes-Ayala (1979), estudando o período pré-reprodutivo ou período de maturação sexual de *Pissodes notatus* Fabricius, 1787 em *Pinus canariensis* C. Smith, na Espanha, observaram que adultos de inverno, ou seja, adultos que alcançaram a maturidade antes do inverno, necessitam de um período de alimentação antes de iniciar a atividade sexual. Estes autores obtiveram um valor médio de sete semanas, muito mais longo do que o período pré-reprodutivo observado para *P. castaneus* nas condições avaliadas, fato que pode estar relacionado às condições climáticas diferentes entre as duas regiões.

A duração do período reprodutivo das fêmeas de *P. castaneus* não diferiu significativamente entre as populações do RS em ambos os hospedeiros e a de SC, em *P. taeda*, com duração média de 8,3; 8,25 e 7,4 semanas, respectivamente (Tabela 1). Apenas a população de SC, em *P. elliottii*, é que apresentou período reprodutivo significativamente inferior aos dos demais tratamentos (1,41 semanas). Esta variável em *P. castaneus* apresentou valores superiores aos encontrados por Plata-Negrache & Prendes-Ayala (1979), que observaram fêmeas de *P. notatus* ovipositando durante apenas quatro semanas, as quais cessam a oviposição e entram novamente em um período exclusivo de alimentação. A diferença de praticamente o dobro do tempo (8 semanas) mostrado neste trabalho em relação aos dados da região de origem (4 semanas) do inseto pode estar relacionado as condições de temperatura das regiões e da ocorrência de estações mais bem definidas na região de origem.

Os períodos pós-reprodutivo das populações de *P. castaneus* do RS em *P. taeda* e *P. elliottii*, com 2,55 e 3,1 semanas, respectivamente, foram superiores ao obtido para população de SC em *P. elliottii* (1,06 semanas), que também foi inferior ao obtido para *P. taeda* nesta mesma população (Tabela 1). Plata-Negrache & Prendes-Ayala (1979) verificaram que o período de alimentação após o período reprodutivo é extremamente variável entre indivíduos de *P. notatus*, podendo ser influenciado por vários fatores, como qualidade do alimento, condições ambientais e a idade dos insetos. Os autores

estimaram um tempo médio de aproximadamente cinco semanas para as fêmeas, portanto, mais longo do que o obtido para *P. castaneus* na presente pesquisa.

A longevidade dos machos foi, na maioria dos tratamentos, semelhante à das fêmeas (Tabela 1). Na população do RS, em *P. taeda*, contudo, a longevidade média dos machos foi superior à dos machos e fêmeas dos demais tratamentos (21,7 semanas), enquanto que a longevidade dos machos da população de SC, em *P. elliottii*, teve o menor valor com relação a todos os demais tratamentos, tanto para machos, quanto para fêmeas. As fêmeas das populações do RS, nos dois hospedeiros e a de SC, em *P. taeda*, apresentaram longevidade média de 16 semanas, diferindo estatisticamente da de SC, em *P. elliottii* (Tabela 1).

A duração média do período de incubação dos ovos não diferiu estatisticamente entre os hospedeiros na população do RS e na de SC em *P. taeda*, com média de 13 dias, aproximadamente; já na população de SC, em *P. elliottii*, a incubação dos ovos prolongou-se por mais de 19 dias (Figura 2). Plata-Negrache & Prendes-Ayala (1979) registraram um período médio de incubação dos ovos de 15 dias, mencionando que a eclosão dos ovos está relacionada a condições ambientais, e que em temperaturas abaixo de 9-10°C não ocorre eclosão dos ovos.

Observou-se que as fêmeas de *P. castaneus* depositam seus ovos dentro de fendas feitas com o aparelho bucal na casca do pinus. O número médio de ovos produzido por fêmea na população do RS não diferiu estatisticamente nos dois hospedeiros, com valores médios de 32,2 ovos e 35,8 ovos por fêmea, em *P. taeda* e *P. elliottii*, respectivamente (Figura 3). Na população de SC em *P. taeda*, o número médio de ovos por fêmea chegou a mais de 48, mas sem diferença estatística com os dois tratamentos anteriores. No entanto, as fêmeas desta mesma população alimentadas com *P. elliottii* produziram apenas 3,6 ovos, valor significativamente inferior àqueles dos demais tratamentos (Figura 3).

É interessante notar o desempenho pobre da população de *P. castaneus* de SC em *P. elliottii* com relação a todos os parâmetros estudados. Mesmo que esta espécie de *Pinus* apresente algum fator físico ou químico de resistência, parece não ter afetado o desempenho da população do RS. Em contraste, o desempenho reprodutivo, com relação à duração média do período reprodutivo, fertilidade e preferência de oviposição da população de SC em *P. taeda* assemelharam-se ao das populações do RS em ambos os hospedeiros.

Tabela 1. Duração média (\pm EP), em semanas, dos parâmetros biológicos de duas populações de *Pissodes castaneus* em *Pinus taeda* e *Pinus elliottii*, em Cambará do Sul, RS e Três Barras, SC, em laboratório (n = 20); $20 \pm 2^\circ\text{C}$; $70 \pm 10\%$ UR; 12 horas de fotofase.

Parâmetros biológicos	População RS		População SC	
	<i>P. taeda</i>	<i>P. elliottii</i>	<i>P. taeda</i>	<i>P. elliottii</i>
Período pré-reprodutivo	5,05 \pm 0,56 a	5,3 \pm 0,19 a	4,15 \pm 0,71 ab	3,23 \pm 1,03 b
Período reprodutivo	8,30 \pm 0,85 a	8,25 \pm 0,83 a	7,40 \pm 1,35 a	1,41 \pm 0,71 b
Período pós-reprodutivo	2,55 \pm 0,32 a	3,1 \pm 0,71 a	3,1 \pm 0,81 a	1,06 \pm 0,44 b
Longevidade (Macho)	21,7 \pm 0,51 a	14,15 \pm 1,52 b	14,85 \pm 2,13 b	8,76 \pm 1,30 b
Longevidade (Fêmea)	16,6 \pm 1,27 a	16,65 \pm 0,77 a	16,2 \pm 1,68 a	9,59 \pm 1,46 b

Médias seguidas da mesma letra, na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

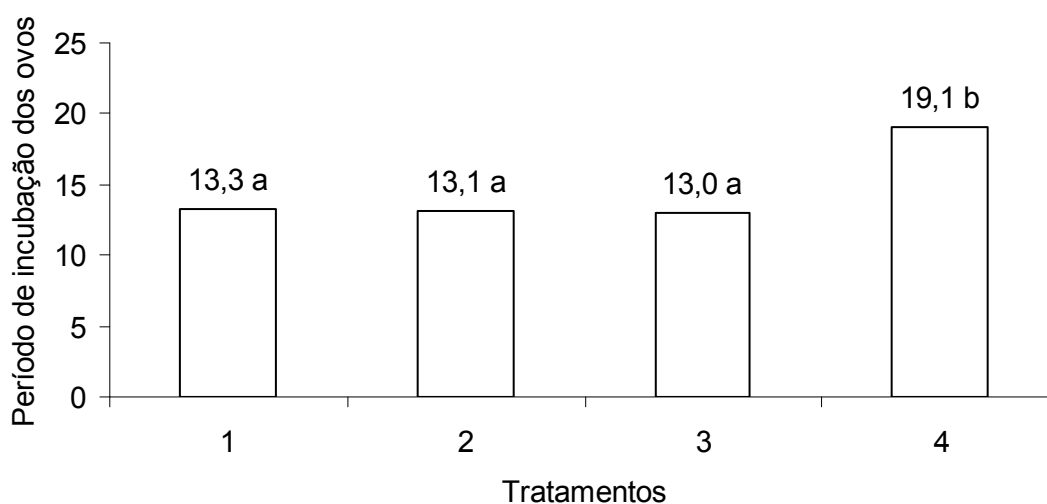


Figura 2. Duração média, em dias, do período de incubação dos ovos de duas populações de *Pissodes castaneus* em *Pinus taeda* e *Pinus elliottii*. Tratamentos: população de Cambará do Sul, RS em (1) *P. taeda* e (2) *P. elliottii*; população de Três Barras, SC em (3) *P. taeda* e (4) *P. elliottii*, em laboratório (n = 20); $20 \pm 2^\circ\text{C}$; $70 \pm 10\%$ UR; 12 horas de fotofase.

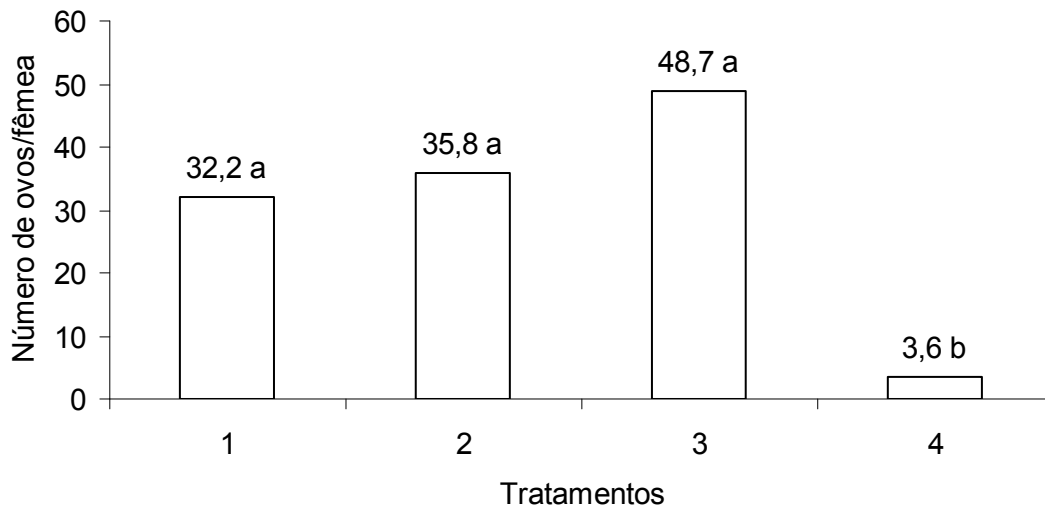


Figura 3. Número médio de ovos obtidos por fêmea de *Pissodes castaneus* em *Pinus taeda* e *Pinus elliottii*. Tratamentos: população de Cambará do Sul, RS em (1) *P. taeda* e (2) *P. elliottii*; população de Três Barras, SC em (3) *P. taeda* e (4) *P. elliottii*, em laboratório (n = 20); 20 ± 2°C; 70 ± 10% UR; 12 horas de fotofase.

3.2. Tabelas de fertilidade de *P. castaneus*

3.2.1. Fertilidade específica (mx)

A maior fertilidade específica (mx), para os insetos da população RS, ocorreu nos intervalos de idade de 13,5 e 7,5, para *P. taeda* (RS-Pt) e *P. elliottii* (RS-Pe), respectivamente, e para os insetos da população de SC, nos intervalos de idade 9,5 e 13,5, para *P. taeda* (SC-Pt) e *P. elliottii* (SC-Pe), respectivamente. Na população de SC, insetos que se desenvolveram sobre *P. taeda* (SC-Pt), apresentaram valores de mx superiores aos demais tratamentos e a produção de ovos variou ao longo do período reprodutivo (Figura 4). Em contraste, os menores valores de mx também foram registrados para a população de SC, porém quando os insetos se desenvolveram em *P. elliottii* (SC-Pe). Esses insetos além de apresentarem uma menor fertilidade específica, apresentaram período reprodutivo e tempo de vida mais curto.

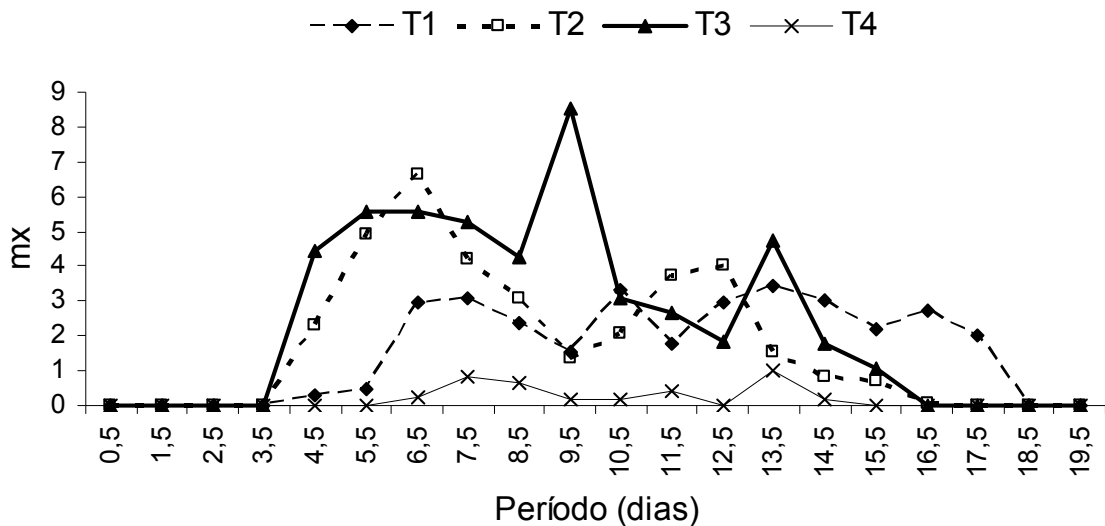


Figura 4. Fertilidade específica (mx) expressa em número médio de ovos por dia, de *Pissodes castaneus* em *Pinus taeda* e *Pinus elliottii*. Tratamentos: população de Cambará do Sul, RS em (1) *P. taeda* e (2) *P. elliottii*; população de Três Barras, SC em (3) *P. taeda* e (4) *P. elliottii*, em laboratório (n = 20); 20 ± 2°C; 70 ± 10% UR; 12 horas de fotofase.

3.2.2. Taxa líquida de reprodução (R_0)

O parâmetro (R_0) indica o número de ovos colocados no tempo de vida de cada fêmea. Os valores de R_0 variaram de 3,65 a 48,75, com o menor valor ocorrendo no T4 (SC-Pe) e o maior no T3 (SC-Pt), ambos na população de SC (Tabela 2). O T3 (SC-Pt), diferiu estatisticamente dos demais tratamentos e de todas as combinações possíveis, somente o T1 (RS-Pt) e o T2 (RS-Pe) não diferiram estatisticamente (Tabela 3).

3.2.3. Intervalo de tempo entre cada geração (T)

A duração média de uma geração (T) indica o período entre o nascimento dos indivíduos de uma geração e da seguinte. Os valores de T variaram de 8,93 a 11,74, com o menor valor ocorrendo no T3 (SC-Pt) e o maior no T1 (RS-Pt) (Tabela 2). Os tratamentos T1 (RS-Pt) e T3 (SC-Pt) com valores de 11,74 e 8,93 apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. As demais combinações de tratamentos não diferiram estatisticamente.

3.2.4. Capacidade inata de aumentar em número (r_m)

Este indicador é definido como a razão máxima de aumento obtido por uma população e relaciona (R_o) e (T), traduzindo o potencial biótico da espécie. Os valores de r_m variaram de 0,12 a 0,43, com o menor valor ocorrendo no T4 (SC-Pe) e o maior no T3 (SC-Pt) (Tabela 2), sem diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 3). Porém, se comparados os tratamentos T3 (SC-Pt) e T4 (SC-Pe), constata-se que no primeiro, a população tem uma capacidade para crescer quase 4 vezes mais que no segundo. Analisando-se a Tabela 3, verifica-se que embora não tenha ocorrido diferença entre esses tratamentos, eles apresentaram o menor nível de significância para este parâmetro (0,2478).

3.2.5. Razão finita de aumento (λ)

Este indicador é um fator de multiplicação da população a cada dia, difere de r_m por ser uma taxa finita de aumento populacional e não instantânea. Os valores de λ variaram de 1,13 a 1,54, com o menor valor ocorrendo no T4 (SC-Pe) e o maior no T3 (SC-Pt) (Tabela 2), sem diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 3).

3.2.6. Tempo necessário para a população duplicar em número de indivíduos (TD)

Os valores de TD variaram de 1,59 a 5,51, com o menor valor ocorrendo no T3 (SC-Pt) e o maior no T4 (SC-Pe) (Tabela 2). Os insetos da população de SC, alimentados com *P. elliotii*, com valor de 5,51, diferiram estatisticamente dos demais tratamentos analisados (Tabela 3).

Tabela 2. Parâmetros de crescimento populacional (\pm EP) de *Pissodes castaneus* em *Pinus taeda* e *Pinus elliotii*. População de Cambará do Sul, RS em *P. taeda* (T1) e em *P. elliotii* (T2); população de Três Barras, SC em *P. taeda* (T3) e em *P. elliotii* (T4), em laboratório ($n = 20$); $20 \pm 2^\circ\text{C}$; $70 \pm 10\%$ UR; 12 horas de fotofase.

Tratamento	R_o	T (dias)	r_m	λ	TD (dias)
T1	$32,20 \pm 3,31$	$11,74 \pm 1,20$	$0,29 \pm 0,03$	$1,34 \pm 0,13$	$2,34 \pm 0,24$
T2	$35,85 \pm 1,85$	$9,72 \pm 0,49$	$0,33 \pm 0,01$	$1,44 \pm 0,07$	$1,88 \pm 0,09$
T3	$48,75 \pm 2,56$	$8,93 \pm 0,45$	$0,43 \pm 0,02$	$1,54 \pm 0,08$	$1,59 \pm 0,08$
T4	$3,65 \pm 0,23$	$10,29 \pm 0,62$	$0,12 \pm 0,01$	$1,13 \pm 0,06$	$5,51 \pm 0,35$

R_o – taxa líquida de reprodução; T – intervalo de tempo entre cada geração; r_m – inata capacidade de aumentar em número; λ – razão finita de aumento; TD – tempo necessário para a população duplicar em número de indivíduos.

Tabela 3. Níveis de significância obtidos para comparação, entre tratamentos, pelo teste t unilateral dos parâmetros das tabelas de vida de fertilidade de *Pissodes castaneus* em *Pinus taeda* e *Pinus elliottii*. População de Cambará do Sul, RS em *P. taeda* (T1) e em *P. elliottii* (T2); população de Três Barras, SC em *P. taeda* (T3) e em *P. elliottii* (T4), em laboratório (n = 20); 20 ± 2°C; 70 ± 10% UR; 12 horas de fotofase.

Tratamentos	R ₀	T (dias)	r _m	λ	TD (dias)
T1 x T2	0,1153	0,1313	0,6841	1,0000	0,4414
T1 x T3	0,0000	0,0205	0,4869	0,5889	0,1404
T1 x T4	0,0000	0,2959	0,3608	0,5494	0,0174
T2 x T3	0,0000	0,4399	0,6757	1,0000	0,5045
T2 x T4	0,0000	0,5575	0,2808	0,4523	0,0111
T3 x T4	0,0000	0,3258	0,2478	0,3807	0,0135

Os gorgulhos da população de SC em *P. taeda* (T3), apresentaram o melhor desempenho reprodutivo comparado aos demais tratamentos. Isto pode ser verificado na análise dos parâmetros de crescimento populacional, que mostraram um maior valor de taxa líquida de reprodução, um menor intervalo de tempo entre cada geração, uma maior capacidade de aumentar em número e um menor tempo para a espécie duplicar em número.

3.3. Determinação do número de instares de *P. castaneus*

Foram coletadas 230 larvas durante o período amostrado (90 dias), das quais foram medidas a largura da cápsula cefálica e comprimento do corpo. Os agrupamentos dos dados foram realizados baseando-se na regra de Dyar (1890), com o valor médio da razão de crescimento próximo ao valor de referência de Dyar de 1,4 (Tabela 4). A largura da cápsula cefálica variou de 0,58 a 1,75 mm e mostrou quatro picos que corresponderiam a quatro instares larvais. A frequência da distribuição de ambas as medidas são mostradas na Figura 5.

Tabela 4. Largura da cápsula cefálica de larvas de *Pissodes castaneus*, com a razão de crescimento para cada ínstar e a razão média de crescimento durante o desenvolvimento larval.

Ínstar	Largura da cápsula cefálica (mm)		Razão de aumento
	Intervalo de variação	Média (\pm EP)	
I	0,58 – 0,75	0,64 \pm 0,07	
II	0,76 – 1,08	0,95 \pm 0,10	1,48
III	1,09 – 1,58	1,32 \pm 0,01	1,39
IV	1,59 – 1,75	1,69 \pm 0,02	1,30
Média da razão de crescimento			1,39

Na Rússia, Bukzeyeva (1965) mediu a cápsula cefálica de larvas de *P. castaneus* criadas sobre toras de pinus (sem especificar a espécie de pinus), artificialmente infestadas e mantidas em ambiente natural, e encontrou cinco instares larvais. Já, Carle (1967) constatou quatro instares larvais, pelo método de distribuição da frequência de cápsulas cefálicas de larvas coletadas em árvores no campo e larvas criadas sobre toras de *Pinus pinaster* na França. Alauzet (1977) também registrou quatro instares larvais na França, mas não descreveu a metodologia usada para determinar o número de instares nem a espécie hospedeira. Panzavolta (2007) determinou o número de instares através da medição de largura e comprimento da cápsula cefálica de larvas coletadas de toras de *P. pinaster*, na Itália, e também observou quatro instares larvais. Assim, a indicação de quatro instares larvais obtidas na presente pesquisa é corroborada pelas observações de Carle (1967), Alauzet (1977) e Panzavolta (2007).

Plata-Negrache & Prendes-Ayala (1979) observaram que as galerias construídas pelas larvas de *P. castaneum* possuem estabilidade térmica e higrométrica independente das flutuações ambientais porque as galerias são ocluídas desde o começo por excrementos que contribuem para a manutenção do micro clima. Deste modo, as condições climáticas do ambiente externo não exercem influência significativa na determinação dos instares de uma região geográfica para outra.

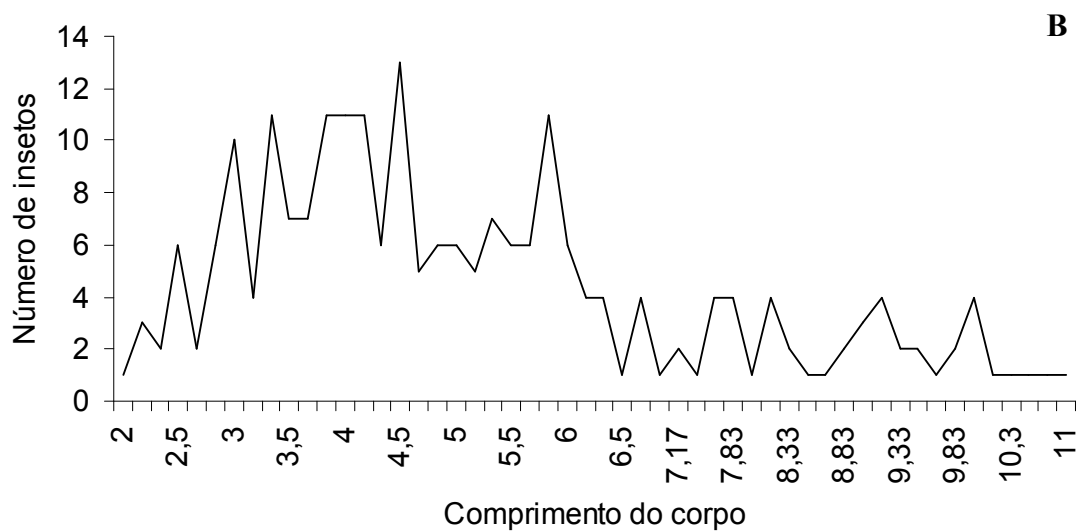
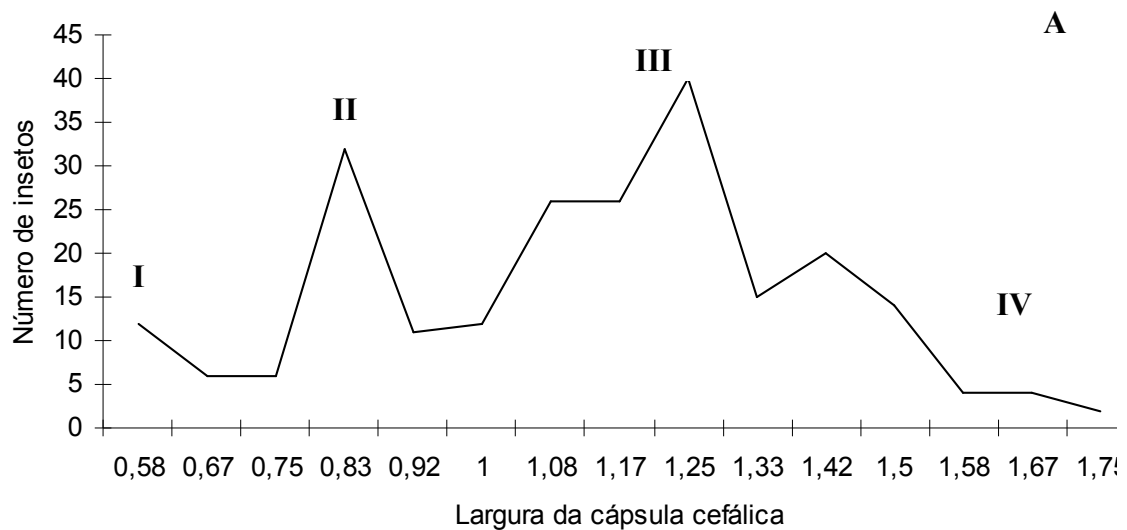


Figura 5. Curva de distribuição de frequências: A) larguras da cápsula cefálica (mm); B) comprimento do corpo (mm) de larvas de *Pissodes castaneus*. Os números romanos indicam os prováveis instares.

A análise de agrupamento consiste em formar classes de indivíduos similares levando-se em conta os caracteres observados. Neste estudo foram avaliados os seguintes caracteres: largura da cápsula cefálica e o comprimento do corpo das larvas, pela análise de componentes principais (ACP), que indicou que o componente 1, ou seja, a largura da cápsula cefálica explicou 99,45% da variação total, indicando que esta variável dispensa a utilização da variável comprimento do corpo na determinação do número de instares de *P. castaneus*, como mostra a Figura 6.

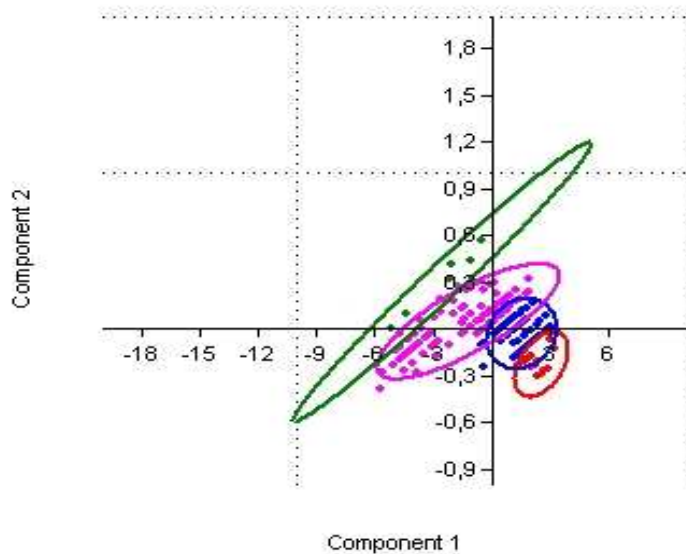


Figura 6. Análise dos componentes principais dos caracteres: largura da cápsula cefálica e comprimento do corpo de larvas de *Pissodes castaneus*.

4. CONCLUSÕES

As larvas de *P. castaneus* passam por quatro instares, que podem ser determinados pela largura da cápsula cefálica.

A população de *P. castaneus* de SC, criada em *P. taeda* apresenta valores superiores para diversos indicadores biológicos, acompanhada de perto pelas populações do RS em *P. taeda* e *P. elliottii*. A população de SC em *P. elliottii* apresenta o pior desempenho biológico para todos os parâmetros avaliados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abgrall, J. F.; V. Villén Gonzáles & J. F. Porcile. 2000. Biología y control del gorgojo de los pinos (II parte): desde todas las frentes. **Chile forestal** **25**: 9-13.
- Alauzet, C. 1977. Cycle biologique de *Pissodes notatus* (Coleoptera, Curculionidae) dans la region toulousaine (France). **Canadian Entomology** **109**: 597-603.

- Andrewartha, H. G. & L. C. Birch. 1954. The innate capacity for increase in numbers, p. 31-54. *In*: Andrewartha, H. G. & L. C. Birch. (Eds.) **The distribution and abundance of animals**. Chicago, University Press, 782 p.
- Bellows Junior, T.S.; R. G. Van Driesche & J. S. Elkinton. 1992. Life-table construction and analysis in the evaluation of natural enemies. **Annual Review of Entomology** **37**: 587-614.
- Birch, L. C. 1948. The intrinsic rate of natural increase of an insect population. **Journal of Animal Ecology** **17**: 15-26.
- Bukzeyeva, O. N. 1965. Duration of generations of the pine weevil, *Pissodes notatus* F. (Coleoptera, Curculionidae) in the Voronezh region. **Entomological Review** **44**: 22-24.
- Carle, P. 1967. Contribution à l'étude biologique de *Pissodes notatus* F. (Coleoptera, Curculionidae). **Rev. Zool. Agric. Appl.** **10-12**: 139-151.
- Coasts, S. A. 1976. Life cycle and behavior of *Muscidifurax zaraptor* (Hymenoptera, Pteromalidae). **Annual Entomological Society of America** **69**: 772-780.
- Dixon, W. N. & M. W. Houseweart. 1982. Life tables of the white pine weevil, *Pissodes strobe*, in Central Maine. **Environmental Entomology** **11**: 555-564.
- Dyar, H. G. 1890. The number of molts of lepidopterous larvae. **Psyche** **5**: 420-422.
- Garcia, J.F. 2002. **Técnica de criação e tabela de vida de *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera, Cercopidae)**. Dissertação de mestrado. Esalq/USP. Piracicaba, 59 p.
- Guldemon, J. A.; W. J. Van Den Brink & E. Den Belder. 1998. Methods of assessing population increase in aphids and the effect of growth stage of the host plant on population growth rates. **Entomologia Experimentalis et Applicata** **86**: 163-173.
- Grez, O. R.; L. F. Fontecilla; R. A. Nunez; C. R. A. Nunez; F. G. Kirwood, & G. H. Torres. 2000. **Manual de plagas cuarentenárias potencialmente daninas para o Chile com especial énfasis em plantaciones de pino y eucalipto**. Chile, Controladora de Plagas Forestales S.A., 84 p.
- Horm, D. J. 1988. **Ecological approach to pest management**. New York, Guilford Press, 285 p.
- Iede, E. T.; W. Reis Filho & S. R. C. Penteado. 2004. Ocorrência de *Pissodes castaneus* (De Geer) (Coleoptera, Curculionidae) em *Pinus*, na Região Sul do Brasil. **Comunicado Técnico 114**, Curitiba, Embrapa Florestas, 6 p.

- Krebs, C. J. 1994. **Ecology: The experimental analysis of distribution and abundance**. New York, Harper & Row, 801 p.
- Liu, Q-H; Y-H. Li & K-L. Xie. 2008. Life tables of natural population of *Pissodes punctatus*. **Kunchong Zhishi** **45**: 750-753.
- Panzavolta, T. 2007. Instar determination for *Pissodes castaneus* (Coleoptera, Curculionidae) using head capsule widths and lengths. **Environmental Entomology** **36**: 1054-1058.
- Parra, J. R. P. & M. L. Haddad. 1989. **Determinação do número de instares de insetos**. Piracicaba, FEALQ/USP, 49 p.
- Pedigo, L. P. & M. R. Zeiss. 1996. Developing a degree-day model for predicting insect development, p. 67-74. *In*: Pedigo, L.P. & M.R. Zeiss. (Eds.). **Analyses in insect ecology and management**. Ames, Iowa State University Press, 168 p.
- Penteado, S. R. C.; Oliveira, E. B. de; Lazzari, S. M. N. 2008. Desenvolvimento de um sistema computacional para cálculo de parâmetros biológicos e de crescimento populacional de afídeos uma versão preliminar. *In*: XXVII Congresso Brasileiro de Zoologia, Curitiba, Paraná, v. 1, p. 592-592. Anais.
- Podoler, H. & D. Rodgers. 1975. A new method for the identification of key factors from life-table data. **Journal Animal Ecology** **44**: 85-114.
- Plata-Negrache, P. & C. Prendes-Ayala. 1979. Contribución al conocimiento de la bioecología de *Pissodes notatus* F., en las poblaciones de pinos de Canarias. **Boletín de la Estacion Central de Ecología** **8**: 33-47.
- Price, P. W. 1984. **Insect Ecology**. New York, John Wiley, (2.ed.). 607 p.
- Rabinovich, J. E. 1978. **Ecología de poblaciones animales**. Washington, Secretaria General de la organización de los Estados Americanos, 114 p.
- Silveira Neto, S.; O. Nakano; D. Bardin & N. Villa Nova. 1976. **Manual de ecologia dos insetos**. São Paulo, Agronômica Ceres, 419 p.
- Sowthwood, T. R. E. 1978. **Ecological methods with particular reference to the study of insect populations**. 2nd ed. London, Chapman & Hall, 524 p.
- Traicevski, V. & S. A. Ward. 2002. Probing behaviour of *Aphis craccivora* Koch on host plants of different nutritional quality. **Ecological Entomology** **27**: 213-219.
- Van Lenteren, J. C. 1986. Parasitoids in the greenhouse: successes with seasonal inoculative release system, p. 342-374. *In*: Waage, J. & D. Greathead. **Insect parasitoids**. London, Academic Press, 389 p.

- Varley, G. C. & G. R. Gradwell. 1970. Recent advances in insect population dynamics. **Annual Review Entomology 15:** 1-24.
- Wyatt, I. J. & S. J. Brown. 1977. The influence of light intensity, day length and temperature on increase rates of four glasshouse aphids. **Journal of Applied Ecology 14:** 391-399.

Capítulo II

Feromônio sexual de *Pissodes castaneus*: isolamento, identificação e respostas comportamentais

FEROMÔNIO SEXUAL DE *Pissodes castaneus*: ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS

RESUMO

Os objetivos desta pesquisa foram isolar, identificar e avaliar a atividade comportamental do feromônio produzido por *P. castaneus*. O estudo consistiu em quatro etapas, sendo a primeira a coleta e criação dos insetos; posteriormente, a coleta dos voláteis, em seguida a realização dos testes comportamentais e finalmente a identificação dos compostos. Os resultados demonstram que a comunicação entre os co-específicos de *P. castaneus* é mediada por feromônios, tendo visto a atração significativa das fêmeas para os voláteis dos machos e a detecção de dois componentes macho-específicos nas análises cromatográficas a partir do 21º dia após a emergência, não presentes nos extratos das fêmeas. Os testes comportamentais efetuados com os insetos e com *P. taeda* demonstram que os compostos atuam como feromônios sexuais e que não há efeito sinérgico na atração quando se combina os compostos exalados pelos machos mais os da planta hospedeira. Os dois compostos produzidos pelos machos de *P. castaneus* são grandisal e grandisol. Através da técnica de cromatografia gasosa em fase estacionária quiral pode-se determinar a estereoquímica absoluta dos compostos que são produzidos em excesso enantiomérico superior a 95%. Esses resultados evidenciam que os voláteis produzidos por *P. castaneus* representam uma alternativa para a aplicação em programas de monitoramento e controle do gorgulho em programas de MIP.

SEX PHEROMONE OF *Pissodes castaneus*: ISOLATION, IDENTIFICATION AND BEHAVIORAL RESPONSES

ABSTRACT

The objective of this research was to isolate, identify and assess the behavioral activity of pheromone produced by *P. castaneus*. The study consisted of four steps, the first being the creation and collection of insects, then the collection of volatiles, then the behavioral tests and identification of compounds. The results show that communication between co-specific of *P. castaneus* is mediated by pheromones, indicated by the significant attraction of females to male volatiles and by detection of two components in the male-specific chromatographic analysis at 21 days after emergence, which were not present in female extracts. The behavioral tests performed with the insect and the host plant, *P. taeda*, show that the compounds act as sex pheromones and that no synergistic effect was observed in the attraction when the compounds exhaled by the male were added to those exhaled by the host plant. The two compounds produced by males of *P. castaneus* are grandisal and grandisol. Through the technique of gas chromatography on chiral stationary phase one can determine the absolute stereochemistry of compounds that are produced in enantiomeric excess exceeding 95%. These results show that the volatiles produced by *P. castaneus* represent a promising alternative for a possible application in monitoring and control of the weevil in IPM program.

1. INTRODUÇÃO

Os insetos estão entre os seres vivos que mais utilizam substâncias químicas para mediar atividades comportamentais, tais como localização de presas, no comportamento de defesa e de agressividade, na seleção de plantas hospedeiras, na escolha de locais para oviposição, na corte e no acasalamento, na organização das atividades sociais, entre outras (Vilela & Della Lucia 2001).

A comunicação química é definida por Klopfer & Hatch (1968) como um processo no qual a informação é trocada entre animais com vantagens mutuamente adaptativas. Lewis & Gower (1980) expandem um pouco mais a definição, mencionando que essa transmissão de sinais entre dois ou mais organismos influencia os comportamentos tanto na produção quanto na recepção do sinal ou sinais.

As substâncias químicas envolvidas na comunicação entre os organismos são denominadas semioquímicos, que significa sinais químicos. O termo semioquímico refere-se não somente às substâncias químicas responsáveis pelo fornecimento de informação como também às toxinas. Dicke & Sabelis (1988) utilizaram o termo infoquímicos para enfatizar a diferença entre essa categoria de substâncias químicas que transportam informações, das toxinas e nutrientes.

Os infoquímicos mediadores de interações entre indivíduos de espécies diferentes que podem atuar em dois ou mais níveis tróficos são chamados aleloquímicos e dividem-se em alomônio, cairomônio, sinomônio e apneumônio. Os cairomônios são pertinentes à biologia de um organismo que, quando em contato com um indivíduo de outra espécie, provoca no receptor uma resposta favorável, mas não no emissor (Dicke & Sabelis 1992). Um exemplo comum na literatura são as substâncias exaladas por plantas e que são reconhecidas por insetos que localizam a planta hospedeira para delas se alimentarem, que possuem, grande potencial para serem exploradas para o controle de insetos.

Os infoquímicos mediadores de interações entre indivíduos da mesma espécie são os feromônios. O termo feromônio (do grego, pherein = carregar e horman = excitar) é definido por Karlson & Luscher (1959) como uma substância química secretada por um indivíduo para o exterior e recebido por um indivíduo da mesma espécie provocando uma reação comportamental específica ou uma resposta fisiológica. Pode ser favorável ao receptor, ao emissor ou a ambos os organismos na interação. Os feromônios são utilizados pelos insetos para localizar alimento, habitat, parceiro de

acasalamento e evitar a predação (Birch & Haynes 1983). Os principais tipos de feromônios são: sexuais, agregação, trilha, marcação de território e de alarme.

O estudo dos infoquímicos tem sido realizado para várias espécies de coleópteros que se alimentam de espécies florestais, como *Hylobius abietis* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera, Curculionidae) e seu hospedeiro *Pinus sylvestris* L. (Pinaceae), onde a atração é mediada por aleloquímicos (monoterpenos) da planta hospedeira mais do que pelo feromônio de agregação (Zagatti *et al.* 1997). *Dendroctonus simplex* LeConte, 1868 (Coleoptera, Scolytidae) tem como hospedeiro *Larix laricina* (Pinaceae), sendo que as fêmeas produzem frontalin, seudenol e seudenone, a alimentação no floema parece estimular a produção de todos os compostos sendo que ambos os sexos respondem à ocorrência natural ou sintética destes. Estudos de campo usando o sedenol mais α -pineno aumentaram a atratividade desta espécie (Seybold *et al.* 2002).

Grandisol é o principal constituinte do feromônio de agregação produzido pelos machos de *Anthonomus grandis* Boheman, 1843 (Coleoptera, Curculionidae), que é a praga mais prejudicial na cultura do algodoeiro (Tumlinson *et al.* 1969). Tem sido encontrado em curculionídeos de importância florestal, como, *Trypodendron signatum* (Fabricius, 1787), *Pityophthorus pityographus* (Ratzeburg, 1837), *Pityogenes bidentatus* Herbst, 1784, *Pityogenes quadridens* (Hartig, 1834), *Pityogenes calcaratus* Wood & Bright, 1992 (Francke *et al.* 1989), *Curculio caryae* (Horn, 1873), *Pissodes strobi* (Peck, 1817) e *Pissodes nemoriensis* Germar (Einhorn *et al.* 1998). Os feromônios de agregação e a sua interação com voláteis da planta hospedeira são os mais comuns em coleobrocas de importância florestal.

Os voláteis da planta hospedeira tem sido estudado para algumas espécies de *Pissodes* (Coleoptera, Curculionidae), para as quais os odores da planta hospedeira atuam como um atraente, isoladamente ou sinergisticamente juntos com o feromônio de agregação (Booth *et al.* 1983; Phillips & Lanier 1986; Bratlli *et al.* 1998).

O uso dos odores para a localização do hospedeiro por *Pissodes castaneus* (De Geer, 1775) ainda não está bem esclarecido (Alauzet 1984), mas na pesquisa de Bichão *et al.* (2003) foi demonstrado que a antena de *Pissodes notatus* (Fabricius, 1787) respondeu a vários compostos produzidos pela planta hospedeira, *Pinus pinaster* Aiton, usando cromatografia gasosa (CG) acoplada ao detector eletroantegráfico. Para *P. pinaster* já foram detectados 90 compostos por cromatografia gasosa. Desses, 22 compostos elicitaram resposta nos neurônios receptores da antena de *P. notatus*. Destes, 13 compostos foram identificados por CG-EM (cromatografia gasosa acoplada à

espectrometria de massa), entre eles α -pineno, camfeno, β -pineno, 3-careno, β -mirceno, limoneno e β -felandreno. A maioria dos compostos para os quais *P. notatus* respondeu são do grupo dos monoterpenos, que ativam um grande número de neurônios receptores da antena, conforme estudos de Wibe & Mustaparta (1996) para *H. abietis*, praga de coníferas, e Barata *et al.* (2002) para *Phoracantha semipunctata* (Fabricius, 1775) (Coleoptera, Cerambycidae), praga de mirtáceas.

Os gorgulhos do gênero *Pissodes* alimentam-se de coníferas da família Pinaceae e suas larvas se desenvolvem embaixo da casca, no floema do seu hospedeiro. A primeira evidência de um feromônio de agregação em *Pissodes* foi registrada por Booth & Lanier (1974). Naquele estudo, machos de *Pissodes approximatus* Hopkins, 1911 confinados sobre o material hospedeiro, foram mais atrativos para ambos os sexos do que a presença de fêmeas sobre o material hospedeiro ou somente o material hospedeiro. Machos de *P. strobi* colocados sobre o mesmo material hospedeiro também atraíram *P. approximatus* que estavam no local. Posteriormente, Booth (1978) demonstrou que machos de *P. strobi* em ramos líderes de *Pinus strobus* L. foram atrativos para seus co-específicos, machos e fêmeas, no campo; contudo, tanto fêmeas alimentando-se de ramos líderes como somente os ramos líderes não foram atrativos.

Booth *et al.* (1983) isolaram dois compostos de cada uma das espécies, *P. strobi* e *P. approximatus*, um monoterpeno álcool, grandisol e seu aldeído correspondente, grandisal, isolados de machos de ambas as espécies. Estes compostos foram encontrados no abdome e intestino posterior. Testes de campo com os compostos sintéticos grandisol e grandisal, juntamente com odores de pinus cortado, agiram sinergisticamente na atração de ambos os sexos de *P. approximatus*. Esta resposta foi semelhante à dos machos de *P. approximatus* alimentando-se sobre o pinus cortado. Machos e fêmeas de *P. strobi* foram mais responsivos para machos engaiolados se alimentando sobre ramos líderes do que sobre ramos líderes isoladamente. A combinação de grandisol, grandisal e ramos líderes foi menos atrativa do que machos sobre líderes, mas mais atrativa do que somente ramos líderes. Através do isolamento dos componentes do feromônio em diferentes épocas do ano, os autores mostraram que machos de ambas as espécies produzem grandisol e grandisal somente quando as fêmeas estão reprodutivamente maduras.

Phillips *et al.* (1984) verificaram que *P. nemorensis*, uma praga de espécies de pinus, utiliza um feromônio de agregação produzido pelo macho que é composto por grandisol e seu aldeído correspondente, grandisal, que foram isolados de extratos de

voláteis de machos e do intestino posterior de machos. Um teste realizado no campo no nordeste da Flórida mostrou que a combinação de grandisol, grandisal e pedaços de *Pinus elliotii* Engelman agiram sinergisticamente na atração de um grande número de machos e fêmeas de *P. nemorensis*, e que estas combinações em pares não foram tão atrativas. Atkinson (1979) demonstrou a atividade dos componentes do feromônio, grandisol e grandisal para *P. nemorensis*, no nordeste da Flórida, mas não foi capaz de comprovar que os machos também seriam atrativos. Na seqüência, Fontaine & Foltz (1982) mostraram que machos de *P. nemorensis* alimentando-se sobre pedaços de *P. elliotii* produziram um feromônio de agregação.

Hibbard & Webster (1993) isolaram e identificaram grandisol e grandisal como componentes do feromônio de agregação para *P. strobi* e *P. nemorensis*. Também determinaram a estereoquímica destes compostos, (1*R*,2*S*)-grandisol e (1*S*,2*R*)-grandisal para *P. nemorensis* e (1*R*,2*S*)-grandisol e (1*R*,2*S*)- grandisal para *P. strobi*. A especificidade do feromônio tem sido demonstrada através da estereoquímica dos compostos bem como da razão entre os estereoisômeros, que pode ser um mecanismo de isolamento de espécies simpátricas. Também foi verificada a presença de feromônio produzido por machos de *Pissodes schwarzi* (Maclaughlan *et al.* 1993), mas a estrutura química correspondente ainda não foi determinada.

A utilização de feromônios tem contribuído para o manejo de pragas agrícolas e florestais, como parte do monitoramento e da associação de métodos químicos e biológicos de controle. Em florestas, as táticas de controle mais importantes empregadas no MIP são o controle silvicultural, o controle biológico, o uso de espécies resistentes e o controle por comportamento com a utilização de feromônios. Através da captura massal, atrativos (iscas) alimentares tratadas com pequenas quantidades de inseticida e do confundimento dos insetos, auxiliando dessa forma o manejo das populações em campo e a minimização no uso de inseticidas (Vité & Francke 1976; Pope *et al.* 1980; Nebeker & Hodges 1983; Vilela & Della Lucia 2001).

O manejo integrado, visando minimizar os impactos das coleobrocas do pínus através do uso de infoquímicos, constitui uma demanda de pesquisa e pode ser uma alternativa viável para o monitoramento e controle do gorgulho-da-casca-do-pínus.

Assim, os objetivos desta pesquisa foram isolar, identificar e avaliar a atividade comportamental do feromônio produzido por *P. castaneus*, visando à obtenção de informações para o seu emprego em programas de MIP de florestas de *Pinus* spp.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Ecologia Química e Síntese de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná-UFPR, Curitiba, PR. A determinação da estereoquímica dos compostos foi feita em colaboração com o Dr. Wittko Francke, do Departamento de Química da Universidade de Hamburgo - Alemanha.

2.1. Criação dos insetos

Os insetos foram coletados em plantios de *Pinus taeda* L. no município de Cambará do Sul, RS. As armadilhas tipo torete foram levadas para o laboratório e armazenadas em gaiolas teladas em sala com temperatura ambiente e fotofase de 12 horas. Os adultos que emergiam eram coletados, diariamente, e acondicionados individualmente em recipientes plásticos transparentes contendo um ramo de pinus recém-cortado de 10 cm de comprimento. Posteriormente, os insetos eram sexados baseado em caracteres morfológicos dos adultos recém-emergidos, como a altura de inserção do rostro e o número de segmentos abdominais que podem ser visualizados sob lupa, sendo sete nas fêmeas e oito nos machos.

2.2. Coleta dos voláteis dos insetos

A extração foi feita pelo processo de aeração utilizando machos e fêmeas virgens oriundos das criações. Machos e fêmeas foram colocados, separadamente, em câmaras de vidro mantidas em ambientes climatizados a 23°C, fotofase de 12 horas e UR em torno de 70%. Os voláteis obtidos foram retidos sobre a resina Super Q em colunas contendo fibra de vidro. Após a obtenção dos extratos, estes foram concentrados em frascos de vidro por meio de fluxo de gás argônio e acondicionados em freezer. Estes extratos foram utilizados para a determinação estrutural dos compostos produzidos por machos e fêmeas através da técnica de CG-EM bem como nos bioensaios efetuados para avaliar a atividade dos compostos.

2.3. Bioensaios em olfatômetro

Foram realizados quatro testes comportamentais (Tabela 1), cada um sendo repetido 40 vezes. O aparelho utilizado foi um olfatômetro em “Y” feito de vidro com 2,5 cm de diâmetro por 40 cm de comprimento, com dois braços de 20 cm de

comprimento cada. O arraste de odores no olfatômetro foi provocado por um compressor. Um filtro de carvão ativado era responsável pela purificação do ar que entrava no sistema. O ar era conduzido até o frasco borbulhador contendo água destilada, para ser umedecido. O fluxo de ar utilizado nos testes foi regulado com um fluxômetro. O olfatômetro era utilizado na posição vertical, com as extremidades dos braços secundários do olfatômetro conectadas a tubos de vidro por onde passava o ar e eram colocados os estímulos olfativos ou ainda, apenas ar puro como controle.

A avaliação de resposta olfativa foi realizada em sala a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. Em cada teste, três indivíduos (machos ou fêmeas) eram colocados, como estímulo, em um dos braços do olfatômetro com a ajuda de uma pinça e um pincel, mantendo o outro braço vazio como controle e, a seguir, soltava-se um indivíduo na extremidade inferior do tubo. Caso este indivíduo se deslocasse até o braço contendo o estímulo, considerava-se o resultado como positivo; se o deslocamento fosse para o braço do controle, o resultado era negativo; se o inseto não se movesse para nenhum dos braços em 20 minutos, esse era considerado não responsivo. A cada inseto testado, as posições do olfatômetro e o olfatômetro eram trocados. Todo material era lavado com sabão neutro, mergulhado no álcool etílico a 70%, e colocado na estufa por 30 minutos para evitar qualquer resíduo de odor.

As combinações utilizadas foram: fêmea vs. macho, fêmea vs. fêmea, macho vs. macho e macho vs. fêmea. O efeito dos compostos exalados pela planta hospedeira sobre os insetos também foi mensurado para avaliar eventual efeito sinérgico entre feromônios e cairomônios. Os ramos de *P. taeda* utilizados como estímulos foram coletados um dia antes da realização dos bioensaios e transportados em caixa térmica até o laboratório, sendo mantidos em geladeira a $10\pm 2^{\circ}\text{C}$ até o início dos testes para reduzir a deterioração do material vegetal. Os insetos utilizados nos testes com estímulos vegetais tiveram sua fonte de alimento retirada 12 horas antes dos bioensaios.

2.4. Análises químicas

As aerações de machos e fêmeas de *P. castaneus* foram realizadas em câmaras de vidro para evitar contaminação.

As análises via cromatografia gasosa foram efetuadas em um cromatógrafo Varian[®] 3800 equipado com coluna capilar aquiral VA-5 (5%-fenil metilsiloxane) e com detector de ionização de chamas (FID).

As análises de fragmentação de massas foram efetuadas em um equipamento Varian® CG/EM/EM Saturn 2000 equipado com coluna capilar CP-Sil 8 low bleed (5%-fenil metilsiloxane).

Os solventes empregados para a preparação dos extratos dos compostos extraídos dos insetos eram de grau pesticida, ou seja, é um solvente de alta pureza e qualidade sem contaminantes, pois o feromônio é utilizado em pequenas quantidades (ng).

2.5. Condições das análises

Para as análises de cromatografia gasosa (CG) e de cromatografia gasosa-espectrometria de massa (CG-EM), 1 mL dos extratos era injetado no cromatógrafo de gás (modelo Varian 3800), equipado com detector de ionização de chamas (FID) e operado no modo *splitless*. Uma coluna capilar VA-5 (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) foi usada no programa de temperatura: 50°C por 1 min com aumento de 5°C min⁻¹ até 180°C e mantido por 25 min adicionais. Os cromatogramas obtidos com os extratos de machos e fêmeas foram avaliados para diferenças sexo-específicas. Os espectros de massa foram registrados num detector capturador de ions Varian Saturn 2000 GC-MS usando o mesmo tipo de coluna capilar VA-5 nas mesmas condições descritas anteriormente.

2.6. Análise estatística

A proporção de respostas ao estímulo e ao controle foi analisada pelo teste de χ^2 ($p < 0,05$) através do programa BioStat versão 3.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise dos extratos das aerações

Os extratos das aerações de machos e fêmeas de *P. castaneus* apresentavam os mesmos compostos, variando apenas a intensidade até o 21º dia. A partir do 21º dia após a emergência dos insetos foi observada a presença de dois compostos nos extratos obtidos pela aeração dos machos, não presentes nos extratos das fêmeas. Estes compostos foram observados em todos os extratos a partir de então, até a morte dos insetos.

Os perfis cromatográficos dos voláteis de insetos machos e fêmeas de *P. castaneus* (Figura 1) mostraram a presença de dois compostos macho-específicos, representados pelos números 1 e 2. A proporção entre os mesmos demonstra que o componente 1, com tempo de retenção (t_R) de 16,42 minutos, é o majoritário, seguido pelo minoritário 2, com t_R de 19,18 minutos. O fato de se ter dois compostos sendo produzidos apenas pelos machos indica que os mesmos podem estar mediando algum tipo de comunicação intraespecífica entre indivíduos desta espécie.

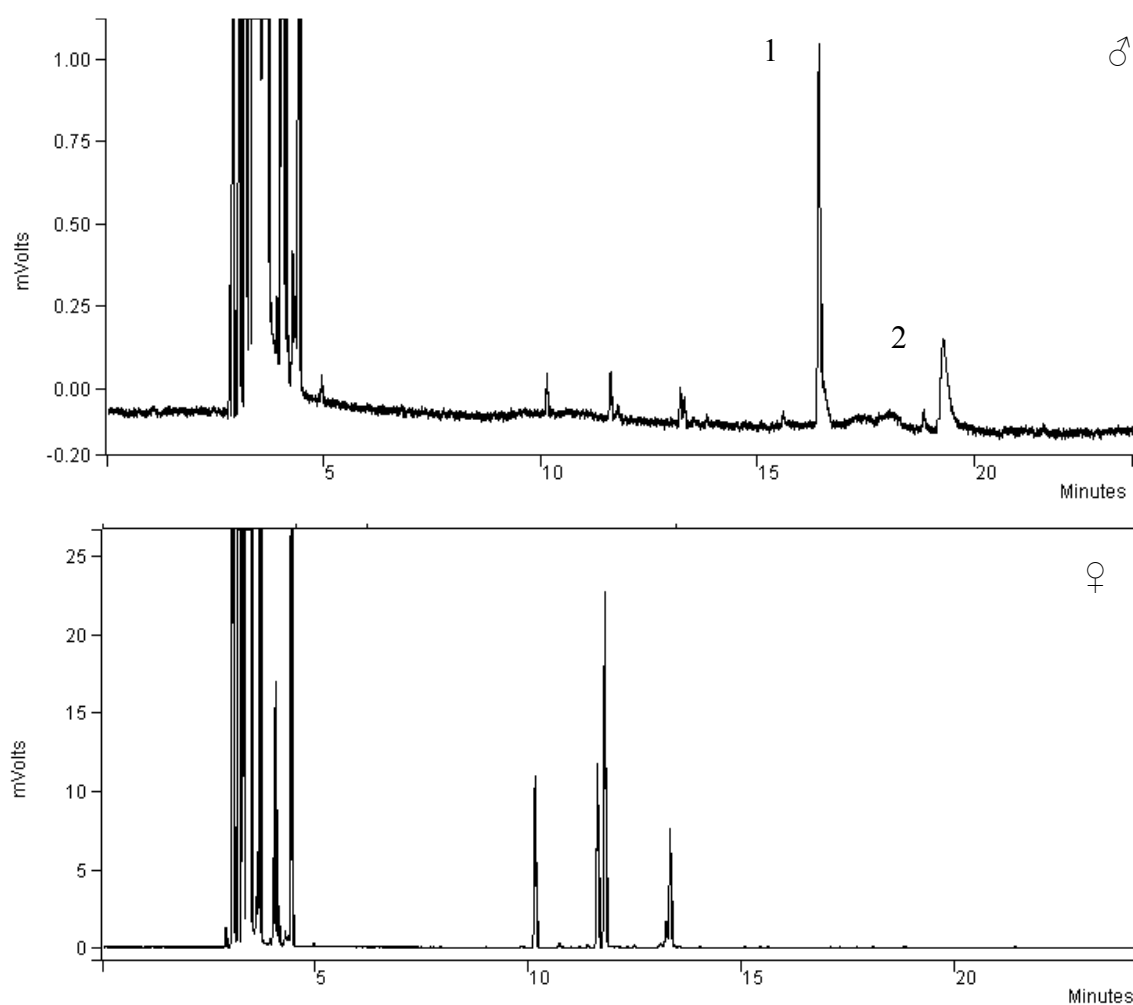


Figura 1. Análise em cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas (CG-FID) de voláteis obtidos de machos (♂) e de fêmeas (♀) de *Pissodes castaneus* mostrando os compostos macho-específicos (1 e 2) envolvidos na comunicação da espécie.

3.2. Bioensaios em olfatômetro em Y

No bioensaio 1, a atratividade de fêmeas para o odor de insetos machos apresentou-se significativamente diferente quando comparada ao tratamento controle ($\chi^2= 4,90$, $p\leq 0,0398$), mostrando que os odores dos insetos machos apresentaram ação biológica sobre o comportamento das fêmeas, mas não mostraram atração significativa sobre os machos ($\chi^2= 0,20$, $p\leq 0,8231$).

No bioensaio 2, na avaliação da atratividade dos machos e fêmeas para o odor das fêmeas não houve diferença significativa para ambos os sexos quando comparado com o tratamento controle (macho $\chi^2= 0,40$, $p\leq 0,6353$; fêmea $\chi^2= 1,60$, $p\leq 0,2684$). O odor da fêmea isoladamente mostrou-se inativo sobre o comportamento dos co-específicos da espécie.

No bioensaio 3, a atratividade de machos e fêmeas foi avaliada para os odores de machos adicionados à parte do ramo da árvore hospedeira, resultando que ambos os sexos não apresentaram diferenças significativas na atratividade quando comparados ao controle (fêmeas $\chi^2= 3,60$, $p\leq 0,0820$; machos $\chi^2= 0,40$, $p\leq 0,6353$). Constatou-se que a presença da planta hospedeira associada ao odor dos machos não promoveu uma ação sinérgica na atratividade de ambos os sexos.

Os odores da planta associados aos odores de machos não potencializou a ação das substâncias testadas isoladamente para ambos os sexos. Estes resultados diferem do que foi encontrado para outras espécies, *P. nemorensis* (Phillips *et al.* 1984) e *P. approximatus* (Booth *et al.* 1977; Booth 1983), em que a planta hospedeira apresentou efeito aditivo, potencializando seus feromônios.

No bioensaio 4, a atratividade de machos e fêmeas foi verificada para os odores da parte do ramo da árvore hospedeira, que diferiu significativamente em relação ao controle ($\chi^2= 8,10$, $p\leq 0,0072$), mostrando que a planta hospedeira exerce atividade biológica para ambos os sexos de *P. castaneus*.

O resultado de cada situação avaliada foi considerado significativo quando $P < 0,05$, ou seja, apenas o teste de atração de fêmeas pelos machos e a atratividade de ambos os sexos para a planta hospedeira mostraram-se significativos. Com base nestes resultados, pode-se afirmar que os compostos produzidos pelos machos são feromônios sexuais, atraindo apenas as fêmeas da espécie e que não foi observado nenhum efeito sinérgico entre a atração exercida pelos insetos com a atração exercida pelos compostos exalados pela planta hospedeira.

Tabela 1. Resposta de machos e fêmeas de *Pissodes castaneus* para seus co-específicos em olfatômetro em “Y”, em presença ou não de ramos de *Pinus*

Bioensaio	Tratamentos	Positivo	Negativo	χ^2	p
1	Fêmea vs. Macho	27	13	4,90	0,0398
	Macho vs. Macho	22	18	0,40	0,6353
2	Macho vs. Fêmea	18	22	0,40	0,6353
	Fêmea vs. Fêmea	24	16	1,60	0,2684
3	Fêmea vs. Macho + pinus	26	14	3,60	0,0820
	Macho vs. Macho + pinus	22	18	0,40	0,6353
4	Macho + fêmea vs. pinus	29	11	8,10	0,0072

Os resultados obtidos demonstram que a comunicação entre os co-específicos de *P. castaneus* é mediada pela presença de infoquímicos, mais especificamente, por feromônios sexuais, pois houve atração significativa apenas das fêmeas para os voláteis dos machos e os dois compostos macho-específicos registrados nas análises cromatográficas são os prováveis feromônios da espécie.

3.3. Identificação estrutural dos compostos do extrato de machos

Os dois compostos presentes apenas nos extratos da aeração de machos foram analisados via cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Os espectros de massas dos dois compostos são mostrados na Figura 2.

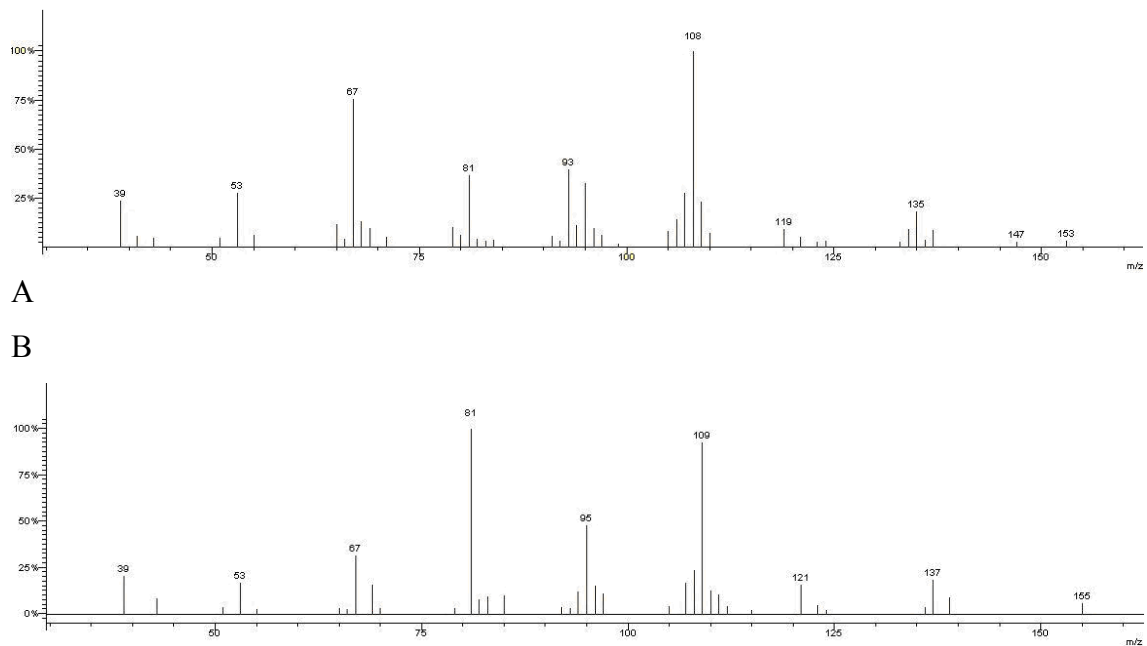


Figura 2. Espectro de fragmentação de massas dos compostos macho-específicos de *Pissodes castaneus*: a) grandisal e b) grandisol.

Pela análise das fragmentações dos dois compostos pode-se verificar a presença de diversos fragmentos comuns a ambos, indicando semelhança estrutural entre eles. Verificou-se que outras espécies do gênero *Pissodes*, *P. approximatus* (Booth *et al.* 1983), *P. strobi* e *P. nemorensis* (Phillips *et al.* 1984; Hibbard & Webster 1993) utilizavam grandisol e grandisal como mensageiros químicos.

As fragmentações dos compostos produzidos por *P. castaneus* estavam em boa concordância com as estruturas do grandisal e grandisol, conforme ilustrado nas Figuras 3 e 4. Assim sendo, os compostos foram identificados como sendo grandisol e grandisal.

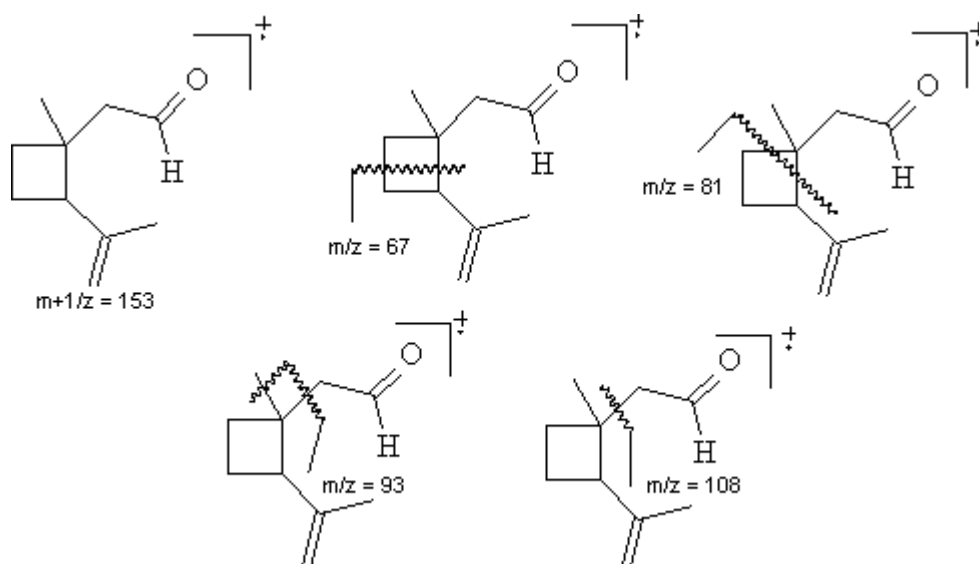


Figura 3. Proposta de fragmentação de massas do grandisal.

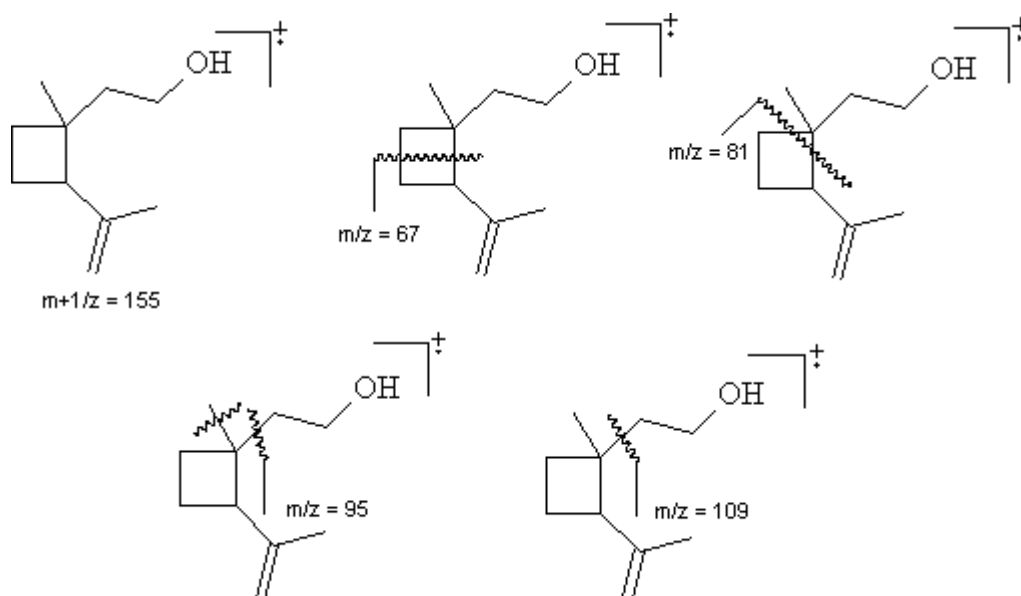


Figura 4. Proposta de fragmentação de massas do grandisol.

3.4. Determinação da estereoquímica absoluta do grandisal e grandisol

As estereoquímicas dos compostos produzidos pelos insetos machos foram determinadas através da técnica de cromatografia gasosa capilar em fase estacionária quiral. Num primeiro momento, uma alíquota do extrato natural foi tratada com hidreto de lítio e alumínio levando à conversão do grandisal em grandisol, conforme observado pelos cromatogramas da Figura 5.

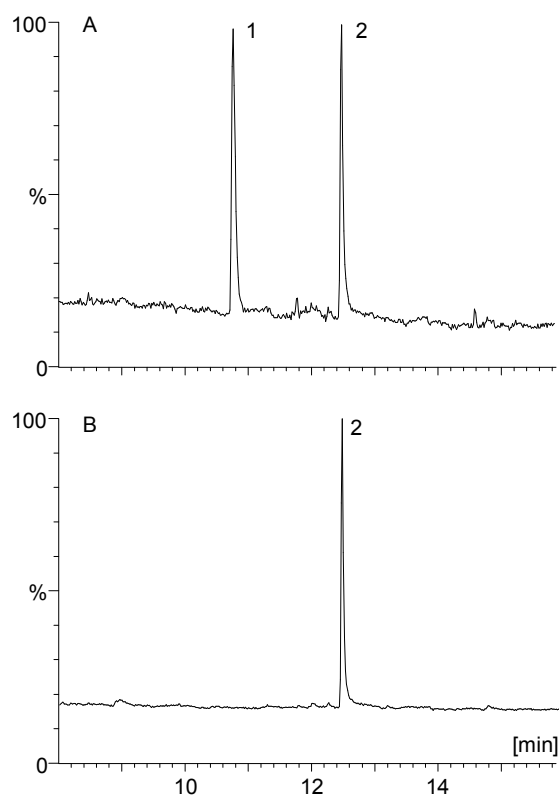


Figura 5. Cromatogramas em coluna aquiral de: a) extrato natural contendo o grandisol (1) e grandisol (2), respectivamente; b) extrato natural tratado com hidreto de lítio e alumínio.

A mistura racêmica contendo os dois enantiômeros do grandisol foi analisada por cromatografia gasosa equipada com coluna capilar quiral, obtendo-se uma boa separação dos mesmos (Figura 6C). Na seqüência, o extrato tratado com hidreto de lítio e alumínio foi analisado nas mesmas condições utilizadas para se analisar a mistura racêmica (Figura 6B), condições também empregadas para se analisar o padrão sintético do (1*R*,2*S*)-grandisol (Figura 6D). A coincidência entre os tempos de retenção do padrão sintético com o produto presente no extrato natural, levou à determinação inequívoca da estereoquímica do feromônio produzido pelo inseto como sendo (1*R*,2*S*)-grandisol.

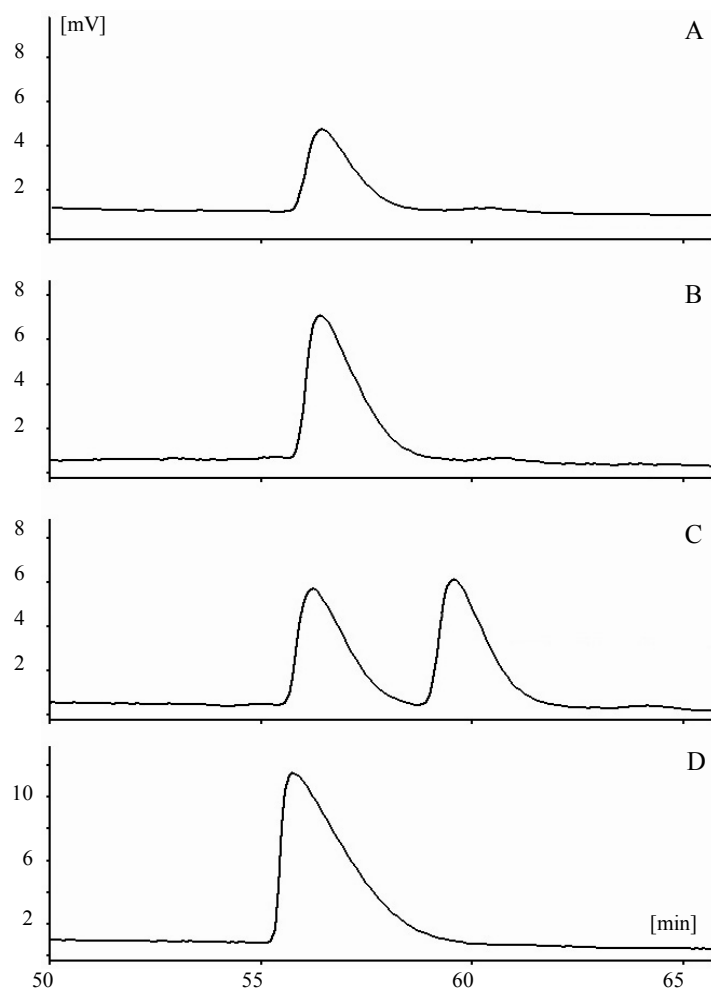


Figura 6. A) cromatograma em coluna quiral do grandisol presente no extrato natural; B) cromatograma em coluna quiral do grandisol preparado pelo tratamento do extrato natural com hidreto de lítio e alumínio; C) cromatograma em coluna quiral da mistura racêmica do grandisol sintético; D) cromatograma do padrão sintético do (1*R*,2*S*)-grandisol.

Esta técnica de análise também possibilitou determinar que o inseto produz, tanto o grandisol como o grandisal, com a mesma estereoquímica e em elevado excesso enantiomérico, uma vez que o excesso enantiomérico do grandisol preparado pelo tratamento do extrato natural com hidreto de lítio e alumínio foi de 95,78%, conforme pode ser visualizado na Figura 7.

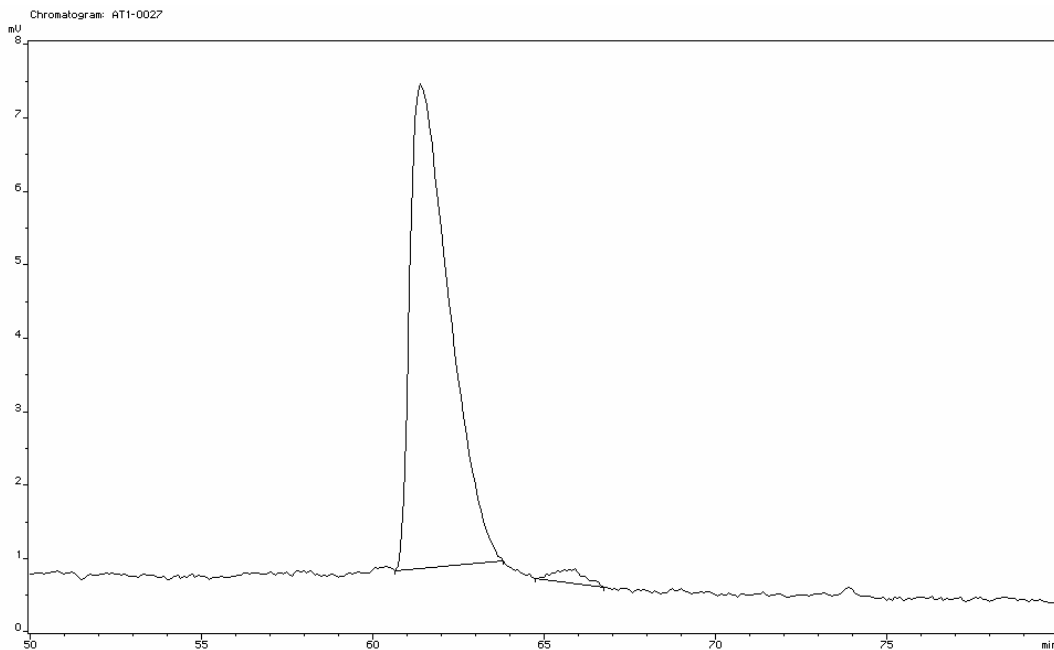


Figura 7. Proporção relativa dos dois enantiômeros do grandisol determinada por cromatografia gasosa em coluna quiral.

A estrutura e a estereoquímica dos compostos produzidos pelos machos de *P. castaneus* são mostradas na Figura 8.

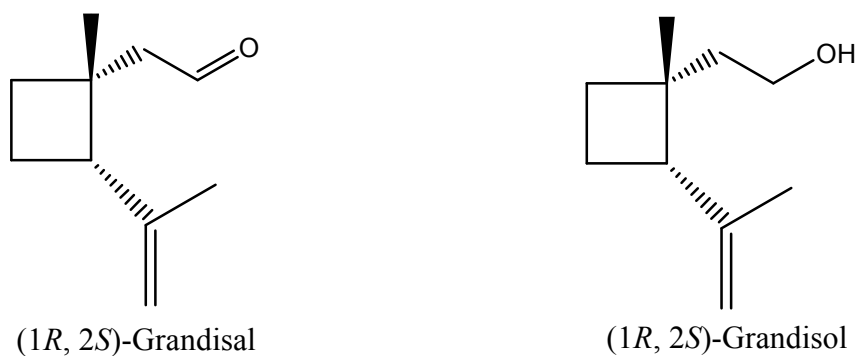


Figura 8. Estruturas do grandisal e grandisol produzidos pelos machos de *Pissodes castaneus*.

Os resultados obtidos são inéditos para esta espécie e aparecem como uma alternativa promissora para uma possível aplicação em programas de monitoramento e controle de *P. castaneus*.

4. CONCLUSÕES

A comunicação entre os co-específicos de *P. castaneus* é mediada por semioquímicos, especificamente por feromônios.

A atração é significativa das fêmeas para os voláteis dos machos.

Os dois componentes macho-específicos detectados nas análises cromatográficas atuam como feromônio sexual, identificados como (1R,2S)-grandisal e (1R,2S)-grandisol.

Não há efeito sinérgico na atração observada entre os compostos exalados pelos machos e os exalados pela planta.

Os dois compostos produzidos possuem a mesma estereoquímica com elevado excesso enantiomérico (>95%).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barata, N.; H. Mustaparta; J. A. Pickett; L. J. Wadhams & J. Araújo. 2002. Encoding of host and non-host plant odours by receptor neurons in the eucalyptus woodborers, *Phoracantha semipunctata* (Coleoptera, Cerambycidae). **Journal of Comparative Physiology** **188**: 121-133.
- Bichão, H.; A. K. Borg-Karlson; J. Araújo & H. Mustaparta. 2003. Identification of plant odours activating receptor neurones in the weevil *Pissodes notatus* F. (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of Comparative Physiology** **189**: 203-212.
- Birch, M. C. & K. F. Haynes. 1983. Insect pheromones. **Studies on Biology** **147**: 61.
- Booth, D. C. & G. N. Lanier. 1974. Evidence of an aggregation pheromone in *Pissodes approximates* and *P. strobi*. **Annals of the Entomological Society of America** **67**: 992-994.
- Booth, D. C.; T. W. Phillips; A. Claesson; R. M. Silverstein; G. N. Lanier & J. R. West. 1983. Aggregation pheromone components of two species of *Pissodes* weevils (Coleoptera: Curculionidae): isolation, identification, and field activity. **Journal of Chemical Ecology** **9**: 1-12.
- Brattli, J. G.; J. Andersen & A. C. Nilssen. 1998. Primary attraction and host tree selection in deciduous and conifer living Coleoptera, Scolytidae, Curculionidae, Cerambycidae and Lymexylidae. **Journal of Applied Entomology** **122**: 345-352.

- Dicke, M. & M. W. Sabelis. 1988. Infochemical terminology: should it be based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds. **Functional Ecology 2**: 131.
- Dicke, M. & M. W. Sabelis. 1992. Cost and benefits of chemical information conveyance proximate and ultimate factors, p. 122-155. *In*: Roitberg, B. D. & M. B. Isman (Eds.). **Insect chemical ecology an evolutionary approach**. New York, Chapman & Hall, x+xp.
- Fontaine, M. S. & J. L. Foltz. 1982. Field studies of a male-released aggregation pheromone in *Pissodes nemorensis*. **Environmental Entomology 11**: 881-883.
- Hibbard, B. E. & F. X. Webster. 1993. Enantiomeric composition of grandisol and grandisal produced by *Pissodes strobi* and *P. nemorensis* and their electroantennogram response to pure enantiomers. **Journal of Chemical Ecology 19**: 2129-2141.
- Karlson, P. & M. Lüscher. 1959. Pheromones, a new term for a class of biologically active substances. **Nature 183**: 55-56.
- Klopfer, P. H. & J. J. Hatch, 1968. Experimental considerations *In*: T.A. Sebeok (ed.). **Animal communication**. Bloomington, University of Indiana Press, x+ xp.
- Lewis, B. & M. Gower. 1980. **Biology of communication**. London, Blackie, 239 p.
- Maclaughlan, L. E.; J. H. Borden & I. Price. 1993. Life history and pheromone response in *Pissodes schwarzi* Hopk. (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of Entomological Society British 90**: 30-35.
- Nebeker, T. E. & J. D. Hodges. 1983. Influence of forestry practices on host susceptibility to bark beetles. **Zeitschrift fur Angewandte Entomologie 96**: 194-208.
- Phillips, T. W.; J. R. West; J. L. Foltz; R. M. Silverstein & G. N. Lanier. 1984. Aggregation pheromone of the deodar weevil, *Pissodes nemorensis* (Coleoptera: Curculionidae): isolation and activity of grandisol and grandisal. **Journal of Chemical Ecology 10**: 1417-1423.
- Phillips, T. W. & G. N. Lanier. 1986. Interspecific activity of semiochemicals among sibling species of *Pissodes* (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of Chemical Ecology 12**: 1587-1601.
- Pope, D. N.; R. N. Coulson; W. S. Fargo; J. A. Gagne & C. L. Kelley. 1980. The allocation process and between-tree survival probabilities in *Dendroctonus frontalis* infestations. **Researches on Population Ecology 22**: 197-210.

- Seybold, S.; E. Vaughan; J. Titze; W. Francke; R. Gries; A. Graves; L. Barkawi; M. Alberts; J. Warren & K. Mori. 2002. The chemical ecology of the eastern larch beetle, *Dendroctonus simplex* in Minnesota. *In: International Society of Chemical Ecology, 19th Annual Meeting University of Hamburgo*, Germany, p. 37.
- Tumlinson, J. H.; D. D. Hardee; R. C. Gueldner; A. C. Thompson; P. A. Hedin & J. P. Minyard. 1969. Sex pheromone produced by male boll weevil: isolation, identification, and synthesis. **Science** **166**: 1010-1012.
- Vilela, E. F. & T. M. C. Della Lucia. 2001. **Feromônios de insetos: Biologia, química e emprego no manejo de pragas**. 2ª edição. Viçosa, Editora Holos, xix + 206 p.
- Vité, J. P. & W. Francke. 1976. The aggregation pheromones of bark beetles: progress and problems. **Naturwissenschaften** **63**: 550-555.
- Zagatti, P.; G. Lemperiere & C. Malosse. 1997. Monoterpenos emitted by the large pine weevil, *Hylobius abietis* (L.) feeding on Scots pine, *Pinus sylvestris* L. **Physiological Entomology** **22**: 394-400.
- Wibe, A. & H. Mustaparta. 1996. Encoding of plant odours by receptor neurons in the pine weevil (*Hylobius abietis*) studied by linked gás chromatography-electrophysiology. **Journal of Comparative physiology** **179**: 331-344.

Capítulo III

Caracterização da estrutura genética de populações de *Pissodes castaneus* utilizando a técnica PCR-AFLP

CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Pissodes castaneus* UTILIZANDO A TÉCNICA PCR-AFLP

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar a estrutura genética das populações de *Pissodes castaneus* procedentes de diferentes áreas de plantio e espécies de *Pinus*, através da técnica PCR-AFLP. Foram selecionadas 20 populações de *P. castaneus*, sendo 19 do Brasil, dos estados do RS, SC e PR, e uma população da cidade de Florença, Itália (região de origem da espécie). As quatro combinações de iniciadores utilizadas geraram um total de 367 fragmentos de DNA, sendo 100% polimórficos, caracterizando um elevado grau de polimorfismo molecular (locus polimórficos) nas populações estudadas. O dendrograma não foi capaz de evidenciar tendências de agrupamento das populações para as localidades de procedência nem para as espécies de *Pinus* hospedeiras. As baixas similaridades genéticas (0,11 entre os dois grupos mais separados) e distâncias genéticas de 0,13 a 0,44, observadas para as amostras das 10 localidades das populações, são indícios de que ocorreram diversos eventos fundadores, ou seja, várias introduções, com linhagens heterogêneas na introdução da espécie, no Brasil. O índice de fixação alélica (F_{st}) foi de 0,3851, considerado alto, e o número de migrantes (N_m) de 0,3991, indicando baixo fluxo gênico entre as populações. Este baixo fluxo corrobora com os resultados da similaridade, pois as populações com baixa similaridade, normalmente, têm um baixo N_m , e conseqüentemente, alto F_{st} . A população de Irani, SC aparece separada de todas as demais no dendrograma, com maior distância genética em relação, principalmente às populações de Cambará do Sul, RS e Bituruna, PR, condizente com um evento fundador independente ou uma fixação alélica tal que evidencia a diferenciação da população. Pelo fato de ocorrerem populações geneticamente heterogêneas com um elevado *pool* de genes estabelecido nas regiões estudadas, é importante considerar que os insetos podem responder diferentemente a estratégias de controle, tanto químicas quanto biológicas ou silviculturais.

CARACTERIZATION OF THE GENETIC STRUCTURE OF *Pissodes castaneus* POPULATIONS USING THE PCR-AFLP TECHNIQUE

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the genetic structure of populations of *Pissodes castaneus* from different areas and species of *Pinus* using the PCR-AFLP technique. Twenty samples, using a single specimen of each, were selected for the analysis, representing 19 populations from Brazil, from the states of RS, SC and PR, and one population of Florence, Italy (region of origin). The four combinations of primers generated a total of 367 fragments of DNA, and 100% polymorphism (polymorphic loci), showing a high degree of molecular polymorphism in the populations studied. The dendrogram was not able to show trends for groups of populations related to places of collection or to the host species. The low genetic similarity (0,11 between the most distant groups) and genetic distances of 0,13 and 0,44 found for the samples from 10 places, may indicate that there were several founding events, or multiple introductions of heterogeneous strains into Brazil. The allelic fixation index (F_{st}) was 0.3851, considered high, and the number of migrants (N_m) was 0.3991, indicating low gene flow among populations. The low gene flow corroborates with the results of the similarity because populations with low similarity, usually present low N_m and consequently high F_{st} . The population of Irani, SC is separated from all other on the dendrogram, with higher genetic distance than the others, especially with Cambará do Sul, RS and Bituruna, PR, what is consistent with an independent founding event or an allelic fixation causing differentiation. The high genetic diversity among populations points out that control strategies might be effective during, at least, a short period of time, because the population are genetically heterogeneous with a high gene pool established in the surveyed areas. Due to the occurrence of genetically heterogeneous populations with a high genetic pool in the surveyed areas, it is important to consider that the insects may respond differently to control strategies, either chemical, biological or silvicultural.

1. INTRODUÇÃO

O gorgulho-da-casca-do-pinus, *Pissodes castaneus* (De Geer, 1775) (Coleoptera, Curculionidae), é uma das principais pragas de *Pinus* (Pinaceae) no Sul do Brasil, causando danos significativos e até morte da árvore (Iede *et al.* 2004). É uma espécie de origem européia, que vem sendo registrada em diversos continentes (Grez *et al.* 2000). Na América do Sul, foi registrada no Uruguai e Argentina (Abgrall *et al.* 2000) e, mais recentemente, em 2001 foi detectada no Rio Grande do Sul e vem se dispersando em áreas de cultivo florestal de Santa Catarina e Paraná (Iede *et al.* 2007).

Um aspecto importante no manejo de pragas é o conhecimento das características biológicas, comportamentais e genotípicas. A estrutura populacional de uma espécie é grandemente dependente das características genéticas da população fundadora, sendo que o isolamento geográfico pode levar à variação genética, morfológica e fisiológica em razão da pressão de seleção causada por fatores bióticos e abióticos, deriva genética e ausência de fluxo gênico (Mayr 1977).

A análise genética de populações tem sido empregada em estudos da variabilidade genética em espécies de insetos de interesse florestal. Estudos com *Pissodes strobi* (Peck, 1817) (Coleoptera: Curculionidae), utilizando marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), indicaram a presença de três grupos de populações geneticamente distintas no Canadá, onde esta espécie é uma importante praga de *Pinus* (Lewis *et al.* 2000, 2001).

Posteriormente, Laffin *et al.* (2004) sequenciaram um fragmento do DNA mitocondrial de *P. strobi*, o gene COI (citocromo oxidase I), de 130 indivíduos de 11 localidades do Canadá. Estes autores demonstraram a existência de quatro populações geneticamente distintas e concluíram que a variação genética existente é dependente do hospedeiro e da origem geográfica das populações avaliadas. A descrição dos padrões genéticos através do sequenciamento do DNA mitocondrial da região do COI utilizada para o gênero *Pissodes* permite apreciar a elevada variação no seu genoma que, por sua vez, pode ter implicações significativas no manejo desta e de outras espécies-praga.

Dentre as técnicas de marcadores moleculares, o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) destaca-se pelo grande número de marcadores gerados por reação, grande poder de detecção da variabilidade genética e maior robustez do ensaio (Vos *et al.* 1995). Apesar de essa técnica detectar apenas um alelo por loco (presença ou ausência), isto é, detectar o gene dominante, ela tem sido utilizada com sucesso em

estudos de diversidade genética e estruturação populacional de insetos (Yan *et al.* 1999; Takami *et al.* 2004).

Estudos realizados por pesquisadores da Embrapa Florestas (dados não publicados) demonstram que tem havido uma dispersão de *P. castaneus* no sentido sul – norte, de aproximadamente 600 km em oito anos, desde o primeiro registro da espécie em Cambará do Sul, RS em 2001, até sua detecção mais recente em Bituruna, no Sul do PR, em 2008 (Iede *et al.* 2007). Estudos que esclarecem tais padrões de dispersão são fundamentais para monitorar o desenvolvimento das populações e definir estratégias para o manejo silvicultural das pragas.

A análise de amostras de populações de *P. castaneus* usando marcadores AFLP foi à técnica escolhida para atingir o objetivo proposto, de determinar a estrutura genética das populações de *P. castaneus* procedentes de diferentes áreas de plantio e espécies de *Pinus* e inferir sobre a validade da proposta desta pesquisa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta de amostras de *P. castaneus*

As coletas de *P. castaneus* foram realizadas nas principais regiões produtoras de *Pinus*, em plantios comerciais e em áreas de regeneração natural da cultura, em 2007 e 2008. Troncos e ramos infestados pelo inseto foram levados para o laboratório e conservados até a emergência dos adultos ou dissecado o tronco, para a retirada de larvas. Os insetos coletados foram acondicionados em tubos criogênicos de 1,5 mL contendo etanol absoluto (Merck®) e armazenados a -18°C.

Para a análise molecular foram selecionadas 20 populações, sendo 19 do Brasil, dos estados do RS, SC e PR, e uma população da cidade de Florença, Itália (Tabela 1). As amostras de Florença foram fornecidas pela pesquisadora Dra. Tiziana Panzavolta, da Università degli Studi di Firenze, Firenze, Itália, sendo que duas amostras eram compostas por indivíduos adultos e outra por larvas obtidas no mesmo local, mas em datas diferentes.

Tabela 1. Procedência das populações de *Pissodes castaneus* analisadas com marcadores AFLP para detecção de variabilidade genética.

Código	Localidade (UF)	Nº de amostras	Data de coleta	Latitude	Longitude
<u>Brasil</u>					
CS (1, 2, 3)	Cambará do Sul (RS)	3	out./07	29°02'52"S	50°08'41"O
CT	Curitibanos (SC)	1	mar./07	27°16'58"S	50°35'04"O
CA	Campo Alegre (SC)	1	out./07	26°11'33"S	49°15'56"O
TB (1, 2, 3, 4, 5)	Três Barras (SC)	5	jun./09	26°06'23"S	50°19'20"O
MV (1, 2)	Major Vieira (SC)	2	jun./09	26°22'04"S	50°19'41"O
IR	Irani (SC)	1	out./08	27°01'29"S	51°54'06"O
QI	Quedas do Iguaçu (PR)	1	out./08	25°26'59"S	52°54'29"O
UV (1, 2)	União da Vitória (PR)	2	mar./out./08	26°13'48"S	51°05'11"O
BT	Bituruna (PR)	1	out./08	26°09'41"S	51°33'09"O
<u>Itália</u>					
IT (1, 2, 3)	Florença	3	1-mai./02 (A)	43°43'09" N	11°09'57"E
			2-abr./08 (L)	43°43'09" N	43°43'09" N

(A) – adulto; (L) – larva

2.2. Extração e quantificação do DNA genômico

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

Foi utilizado apenas um espécime de cada população de *P. castaneus* para a extração do DNA genômico. Na preparação da amostra, foram retirados apenas a cabeça e o tórax do inseto, que foram secos à temperatura ambiente e triturados manualmente com pistilo de polipropileno autoclavado, em tubo de microcentrífuga (1,5 mL) contendo 180 µL do tampão de extração de buffer ATL, seguindo o protocolo do kit Qiagen® para tecido animal (QIAGEN DNeasy® Blood & Tissue Handbook - Spin-Column Protocol). A quantificação do DNA (1 µL) foi realizada em espectrofotômetro no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Florestas. O DNA genômico foi armazenado a -20°C.

2.3. Técnica de AFLP

Para as reações de AFLP foi utilizado o Kit AFLP da *Applied Biosystems*®, seguindo o protocolo cedido pelo laboratório PRI-Lab da Kansas State University, Manhattan, KS adaptado com o protocolo de Beckmann-Cavalcanti *et al.* (2007) e descrito detalhadamente por Lazzarotto (2009). Cada amostra, na concentração de 1 µg de DNA genômico, foi submetida à digestão com enzimas de restrição *EcoRI* e *MseI* e ligação de oligonucleotídeos adaptadores. Em seguida, foi feita a amplificação pré-seletiva, utilizando *primers* pré-seletivos e o *Core Mix* (kit) em termociclador Eppendorf®. Posteriormente, o DNA pré-amplificado foi diluído em 20 µL de TE 0,1x e amplificado utilizando iniciadores com três bases seletivas: Fam (ACT+CAT); Fam (ACT+CTG); Ned (AGC+CTA) e Joe (AGG+CTT).

Para a amplificação seletiva misturou-se 1,5 µL da reação pré-seletiva diluída, 7,5 µL de *Core Mix*¹ e 0,7 µL dos *primers* *EcoRI* e *MseI*, em termociclador para desnaturação, anelamento e extensão.

Após a amplificação dos fragmentos, procedeu-se ao sequenciamento dos mesmos em seqüenciador ABI Prism® 377. Em cada amostra foram combinados 0,5 µL do material amplificado, 0,5 µL do marcador molecular padrão ROX (1000), 0,25 µL de blue dextran/25 mM e 1,25 µL de formamida deionizada (Hi-DiTM), desnaturada a 94°C durante 2' e aplicada em gel de poliacrilamida no seqüenciador.

2.4. Análise dos dados

As amostras foram genotipadas quanto à presença (1) e ausência (0) de cada fragmento, sendo que cada fragmento foi considerado um locus. A partir da matriz determinou-se a porcentagem de polimorfismo gerada por cada combinação.

A análise de similaridade genética foi feita pelo programa NTSYS v.2 (Rohlf 1994), utilizando o coeficiente de similaridade de DICE. A análise de agrupamento foi realizada utilizando o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic Average*) (Sneath & Sokal 1973). O grau de confiabilidade com que o dendrograma representa a matriz de similaridade foi aferido através do coeficiente de correlação cofenética (Sokal & Rohlf 1962), sendo que a significância desta correlação matricial foi testada pelo teste de Mantel (1967).

Os índices de identidade genética e a distância genética foram estimados para cada localidade e a análise de agrupamento foi realizada utilizando-se o algoritmo UPGMA através do programa TFPGA v.2 (Miller 1997).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As quatro combinações de oligonucleotídeos iniciadores utilizadas geraram um total de 367 fragmentos de DNA, sendo 100% polimórficos, caracterizando um elevado grau de polimorfismo molecular nas populações estudadas (Tabela 2). Estes resultados evidenciam a eficiência dos marcadores AFLP na detecção da elevada variabilidade genética presente nas populações de *P. castaneus*, fato que também pode ser constatado por Lewis *et al.* (2000, 2001) em populações de *P. strobi* da América do Norte, utilizando marcadores RAPD.

O número de fragmentos gerados por combinação de oligonucleotídeo iniciador variou de 50 a 131, com uma média de 91 fragmentos (Tabela 2). Dentre as combinações utilizadas, a que apresentou maior número de fragmentos foi a 1, com 131 fragmentos, enquanto que a combinação 3 apresentou um menor número de fragmentos. É interessante notar a uma quantidade relativamente elevada de alelos raros que foram detectados utilizando estas combinações.

Tabela 2. Bandas obtidas para cada combinação de oligonucleotídeos iniciadores utilizada na técnica de AFLP para avaliar a variabilidade genética em populações de *Pissodes castaneus*.

Combinações	Bandas		
	Total	Polimórficas (%)	Alelos raros (%)
1 - Fam (ACT + CAT)	116	116 (100)	62 (53,4)
2 - Fam (ACT + CTG)	131	131 (100)	59 (45,0)
3 - Ned (AGC + CTA)	50	50 (100)	27 (61,4)
4 - Joe (AGG + CTT)	70	70 (100)	43 (54,0)
Total	367		

No dendrograma obtido com base na similaridade genética entre os 20 indivíduos das 10 localidades avaliadas, determinada pelo algoritmo UPGMA, utilizando o coeficiente de Dice, constata-se que os valores de similaridade genética

obtidos foram baixos entre as populações de *P. castaneus* estudadas. No geral, o dendrograma não foi capaz de evidenciar tendências de agrupamento das populações. A formação de dois grupos (Figura 1) não demonstra nenhum padrão de agrupamento para as localidades de procedência nem para as espécies de *Pinus* hospedeiras.

Analisando mais detalhadamente o dendrograma da Figura 1, pode-se verificar a formação de dois grupos com similaridade genética de 0,1100, sendo que o primeiro grupo, formado por 19 amostras, apresentou dois subgrupos com similaridade de 0,1805. O primeiro subgrupo com apenas uma amostra representante da Itália (IT-1), apresentou similaridade de 0,1805. O segundo subgrupo, com similaridade de 0,3433, foi formado por uma subamostra do material da Itália (IT-2), Cambará do Sul (CS), Três Barras (TB), União da Vitória (UV), Bituruna (BT), Curitiba (CT), Major Vieira (MV), Quedas do Iguaçu (QI) e Campo Alegre (CA), com amostras de praticamente todas as localidades, exceto Irani (IR). Aparentemente, não há formação de agrupamento baseado na procedência, no estágio do inseto ou na espécie de *Pinus* hospedeira.

O coeficiente de correlação cofenética (r) foi de 0,9226, indicando a existência de um bom ajuste entre a matriz de similaridade e o dendrograma obtido, de acordo com os critérios de Sneath & Sokal (1973).

As baixas similaridades genéticas e a distância genética relativamente alta constatadas nas amostras das 10 localidades das populações de *P. castaneus* são indícios da ocorrência de um número grande de eventos fundadores, ou seja, várias introduções de insetos no Brasil com linhagens heterogêneas. A reprodução sexuada e a disponibilidade de alimento podem ser alguns dos fatores aos quais se podem atribuir a variabilidade genética das populações *P. castaneus* estudadas.

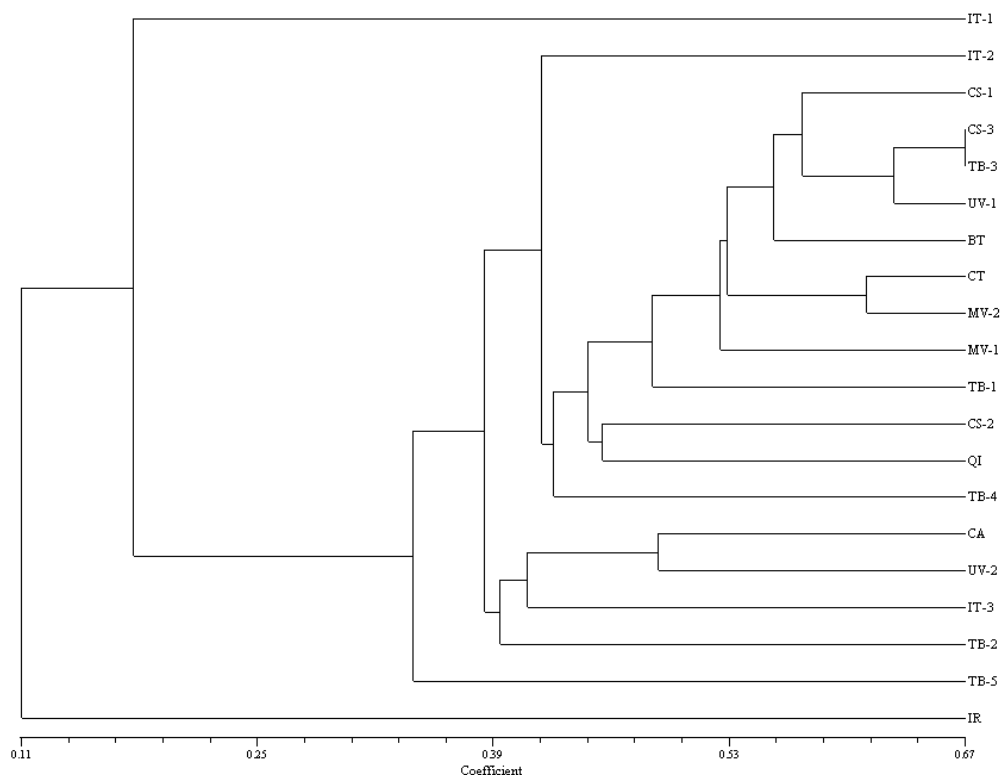


Figura 1. Dendrograma de similaridade genética determinado pelo coeficiente de Dice, utilizando o algoritmo UPGMA, com base em dados de PCR-AFLP, para 20 amostras de *P. castaneus* coletadas em espécies de *Pinus* spp. de 10 localidades. Código das amostras conforme Tabela 1.

A identidade e a distância genética de Nei (1972, 1978) variaram de 0,6392 a 0,8665 e de 0,1303 a 0,4475, respectivamente (ANEXO 3). A média da identidade e da distância genética foram 0,7840 e 0,2457, respectivamente, considerando as 20 amostras das 10 localidades. As menores identidades genéticas e consequentes maiores distâncias genéticas foram 0,6392 e 0,4475 entre Cambará do Sul (CS) e Irani (IR) e 0,6477 e 0,4343 entre Bituruna (BT) e Irani (IR).

Embora uma distância genética relativamente alta tenha sido constatada entre as 20 amostras das 10 localidades estudadas, a análise de agrupamento com base na distância genética de Nei, separou as populações em três agrupamentos (Figura 2), onde Cambará do Sul, Irani e Bituruna, foram às localidades que apresentaram as maiores distâncias genéticas.

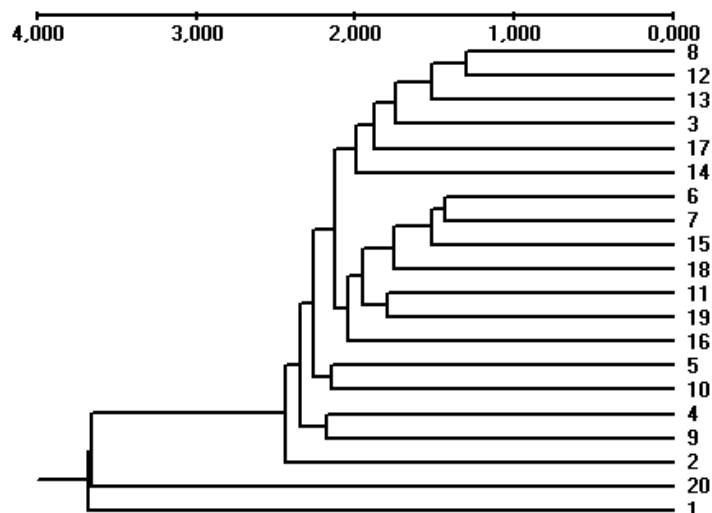


Figura 2. Dendrograma com base na distância genética de Nei entre as amostras das populações de *Pissodes castaneus* de diferentes localidades, pelo critério de agrupamento UPGMA. Legenda: 1- Itália-1; 2- Itália-2; 3-Itália-3; 4- Cambará do Sul-1; 5- Cambará do Sul-2; 6- Cambará do Sul-3; 7- União da Vitória-1; 8- União da Vitória-2; 9- Bituruna; 10- Quedas do Iguaçu; 11- Curitibaanos; 12- Campo Alegre; 13- Três Barras-1; 14- Três Barras-2; 15- Três Barras-3; 16- Três Barras-4; 17- Três Barras-5; 18- Major Vieira-1; 19- Major Vieira-2 e 20- Irani.

O índice de fixação alélica (F_{st}) é o método mais comum para se quantificar a diferenciação genética entre populações, sendo inversamente proporcional ao fluxo gênico, ou seja, quanto menor o F_{st} maior o fluxo gênico entre as populações (Freeland 2007). Neste trabalho o F_{st} foi de 0,3851, considerado um índice de fixação alélica alto e um número de migrantes (N_m) de 0,3991, indicando que as populações de *P. castaneus* estão com um baixo fluxo gênico entre as populações. Se o fluxo gênico é baixo pode contribuir para um isolamento reprodutivo e ao estabelecimento de linhagens evolutivamente independentes (Slatkin 1994).

Esta constatação também foi feita por Zhang *et al.* (2007) para *Pissodes yunnanensis* Langor & Zhang, que obtiveram um índice de fixação alélica de 0,879, com elevado nível de diferenciação entre as populações. Já Conord *et al.* (2006) detectaram o oposto para *Hylobius abietis* L. (Coleoptera, Curculionidae) um baixo índice de fixação alélica (0,07), indicando uma diferenciação genética muito pequena e uma elevada taxa de migração de genes entre as populações desta importante praga de *Pinus* na Europa.

A heterozigose (h) entre as populações foi medida e variou de 0,0718 a 0,1397. As amostras coletadas na Itália mostraram um maior valor, $h = 0,1397$, indicando que existe uma maior diversidade genética na população da região de origem do que nas populações que foram introduzidas no Brasil e que a região de origem da praga continua funcionando como um reservatório do *pool* gênico das populações de *P. castaneus*.

A diversidade genética relativamente alta entre as populações indica um *pool* elevado de genes estabelecido nas regiões estudadas. Como consequência, as respostas das diferentes populações a estratégias de controle, sejam elas químicas, biológicas ou silviculturais podem variar em função da heterogeneidade das populações (Conord *et al.* 2006; Planter 2007). Considera-se, assim, que estas informações sobre a estrutura de populações do gorgulho no Brasil são fundamentais para programas de manejo desta espécie de inseto.

As populações introduzidas no Brasil são originárias do Sul da Europa, e teriam sido introduzidas no país e dispersadas sentido sul-norte, do Rio Grande do Sul para Santa Catarina e Paraná. Apesar dos resultados das análises dos marcadores AFLP, incluindo a similaridade genética baixa e o alto índice de fixação, corroborarem para a aceitação da hipótese, os resultados não são suficientes para comprová-la, mas fornecem indícios consistentes sobre a composição genética das populações de *P. castaneus* estudadas. Aparentemente, as populações brasileiras de *P. castaneus* ainda apresentam uma alta identidade genética com a população do seu local de origem, na Itália. A falta de um padrão para os agrupamentos das populações de *P. castaneus* pode representar um forte indício de que as populações fundadoras estabelecidas nos três estados brasileiros ainda estariam em processo de fixação (elevado polimorfismo e similaridade genética baixa). Este efeito fundador ainda não estaria se expressando em função do processo de dispersão em massa da espécie, ou seja, muitos indivíduos de uma mesma população migrando de uma região para outra, com um baixo fluxo gênico entre as populações (Planter 2007), mas ainda não diferenciado o suficiente para ser evidenciado nos dendrogramas.

O fato da população de Irani (IR) estar separada de todas as outras pode dever-se a uma nova introdução pelo transporte de mudas ou toretes infestados ou condições das áreas de plantio do *Pinus* da região. Contudo, são necessários mais estudos envolvendo uma quantidade maior de amostras para comprovação das causas da diferenciação dessa população de *P. castaneus*.

4. CONCLUSÕES

As populações de *P. castaneus* avaliadas apresentaram alto grau de polimorfismo e baixa similaridade genética.

Não é possível evidenciar tendências de agrupamento das populações, nem por localidade nem por hospedeiro.

A heterozigose é maior na população da região de origem do que nas populações que foram introduzidas no Brasil, a qual continua sendo um reservatório gênico para as populações de *P. castaneus*.

As populações de *P. castaneus* avaliadas apresentam alto índice de fixação alélica e baixo fluxo gênico.

A distância genética relativamente alta da população de Irani, SC pode indicar uma introdução independente da espécie nesta localidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abgrall, J. F.; V. Villén Gonzáles; J. F. Porcile. 2000. Biología y control del gorgojo de los pinos (II parte): desde todas las frentes. **Chile forestal 25**: 9-13.
- Conord, C.; G. Lempérière; P. Taberlet & L. Després. 2006. Genetic structure of the forest pest *Hylobius abietis* on conifer plantations at different spatial scales in Europe. **Heredity 97**: 46-55.
- Grez, O. R.; L. F. Fontecilla; R. A. Nunez; C. R. A. Nunez; F. G. Kirwood & G. H. Torres. 2000. **Manual de plagas cuarentenárias potencialmente daninas para o Chile com especial énfasis em plantaciones de pino y eucalipto**. Chile, Controladora de Plagas Forestales S.A., 84 p.
- Iede, E. T.; W. Reis Filho & S. R. C. Penteado. 2004. Ocorrência de *Pissodes castaneus* (De Geer) (Coleoptera, Curculionidae) em *Pinus*, na Região Sul do Brasil. **Comunicado Técnico 114**, Curitiba, Embrapa Florestas, 6 p.
- Iede, E. T.; Reis Filho, W. R.; S. R.M. Zaleski, & N. Caldato. 2007. Monitoramento e controle de *Pissodes castaneus* em *Pinus* spp. **Circular técnica 130**, Curitiba, Embrapa Florestas, 8 p.

- Laffin, R. D.; D. W. Langor & F. A. H. Sperling. 2004. Population structure and gene flow in the white pine weevil, *Pissodes strobi* (Coleoptera, Curculionidae). **Annals of the Entomological Society of America** **97**: 949-956.
- Lewis, K. G.; Y. A. El-Kassaby; R. I. Alfaro & S. Barnes. 2000. Population genetic structure of *Pissodes strobi* (Coleoptera: Curculionidae) in British Columbia, Canada. **Annals of Entomological Society of America** **93**: 807-818.
- Lewis, K. G.; K. Ritland; Y. A. El-Kassaby; J. A. Mclean; J. Glaubitz & J. E. Carlson. 2001. Randomly amplified polymorphic DNA reveals fine-scale genetic structure in *Pissodes strobi* (Coleoptera: Curculionidae). **Canadian Entomology** **133**: 229-238.
- Mayr, E. 1977. **Populações, espécies e evolução**. São Paulo, Editora USP, 483 p.
- Miller, M. TFGA (Tools for population genetic analyses). Version 1.3: a windows program for analyses of allozyme and molecular population data. Disponível em: <http://iubio.bio.indiana.edu:7780/archive/00000446/>. Acesso em: 2009.
- Planter, E. A. 2007. Flujo génico: Métodos para estimarlo y marcadores moleculares, p. 49-61. *In: Ecología Molecular*, Eguiarte, L. E.; V. Souza, & X. Aguirre (eds.). 608p.
- Rohlf, F. J. 1994. **NTSYS-pc – Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York: State University of New York.
- Slatkin, M. 1994. Gene flow and population structure, p. 3-18. *In: Ecological Genetics*, Princeton University Press.
- Sneath, P. H. & R. R. Sokal. 1973. **Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W.H. Freeman, 573p.
- Takami, Y.; C. Koshio; M. Ishii; H. Fugii; T. Hidaka & I. Shimizu. 2004. Genetic diversity and structure of urban populations of *Pieris* butterflies assessed using amplified fragment length polymorphism. **Molecular Ecology** **13**: 245-258.
- Vos, P.; R. Hogers; M. Bleeker; M. Reijans; T. Van de Lee; M. Hornes; A. Frijters; J. Pot; J. Peleman; M. Kuiper & M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research** **21**: 4407-4414.
- Yan, G.; M. Romero-Severson; M. Walton; D. D. Chadee & D. W. Severson. 1999. Population genetics of the yellow fever mosquito in Trinidad: Comparisons of amplified fragment length polymorphism (AFLP) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. **Molecular Ecology** **8**: 951-963.

Capítulo IV

Monitoramento de *Pissodes castaneus* e de seus inimigos naturais em plantios de *Pinus taeda* no Sul do Brasil

MONITORAMENTO DE *Pissodes castaneus* E DE SEUS INIMIGOS NATURAIS EM PLANTIOS DE *Pinus taeda* NO SUL DO BRASIL

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram: determinar a ocorrência e a flutuação sazonal de *Pissodes castaneus* e de agentes potenciais de controle biológico, em áreas de plantio de *Pinus taeda* e determinar o período e o tempo de permanência de toretes-armadilha no campo para o monitoramento de *P. castaneus*. Os experimentos foram conduzidos em Três Barras, SC e em Cambará do Sul, RS, onde foram instaladas toretes-armadilha que, após ficarem 30 dias no campo, eram levados ao laboratório e armazenados em gaiolas durante um ano, até emergirem todos os adultos. Para determinar a permanência dos toretes-armadilha no campo, cada lote de toretes foi deixado por 30, 60 e 90 dias, repetindo-se durante 12 meses. O maior pico de emergência de adultos de *P. castaneus* da população de Cambará do Sul se deu em outubro (96,2%); enquanto que os insetos de Três Barras emergiram em maior número em janeiro (48,5%) e fevereiro (29,4%). Não se constatou correlação entre os valores dos diferentes estágios de *P. castaneus* de Cambará do Sul com as variáveis climáticas; por outro lado, o número de larvas coletadas em Três Barras correlacionou-se significativamente com a temperatura mínima, precipitação e umidade relativa. Foram registradas epizootias naturais do fungo entomopatogênico *Beauveria. bassiana* em adultos de *P. castaneus*, com infecção em torno de 70% no segundo ano de monitoramento. Houve diferença significativa para local e período e para a interação local x tempo x período de instalação dos toretes-armadilha, com o dobro de insetos coletados e distribuição em diversos meses do ano, em Cambará do Sul, quando comparado a Três Barras. Não se observou diferença significativa na captura de insetos com relação ao tempo de permanência das armadilhas no campo. Os resultados indicam que a melhor metodologia para monitoramento com os toretes-armadilha é fazer a instalação e retirada das mesmas entre 30 e 60 dias nas regiões avaliadas em função da flutuação dos insetos e para evitar reinfestação a partir dos toretes se deixados por mais tempo.

SURVEY OF *Pissodes castaneus* AND ITS NATURAL ENEMIES IN CULTIVATION AREAS OF *Pinus taeda* IN SOUTHERN BRAZIL

ABSTRACT

The objectives of this study were: to determine the occurrence and seasonal fluctuation of *Pissodes castaneus* and biological control agents in areas of *Pinus taeda* and to determine the period for installation and the time to keep the log-traps in the field for *P. castaneus* monitoring. The experiments were conducted in Três Barras, SC and Cambará do Sul, RS, where the traps were installed, and after 30 days they were taken to the laboratory and stored in cages for a year until all the adults emerge. To determine the ideal period of permanence in the field, the traps were installed monthly for 12 months, with each batch left for 30, 60 and 90 days, and then evaluated. The highest peak of adult emergence of *P. castaneus* from Cambará do Sul was in October (96.2%), whereas in Três Barras the insects emerged in greater numbers in January (48.5%) and February (29.4%). There were no correlations between the number of individuals at the different stages of *P. castaneus* in Cambará do Sul with climatic variables. On the other hand, the number of larvae from Três Barras was significantly correlated with minimum temperature, precipitation and relative humidity. Natural epizooties of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* were recorded on adults of *P. castaneus* with infection rate around 70%, indicating that this fungus is a potential control agent of *P. castaneus*. There were significant differences for place, time and some interactions, such as site x time x period for log-traps installation in the field. The number of insects in Cambará do Sul was twice the number in Três Barras. There were significant differences among the months for installation and for insect distribution along the year. There was no significant difference in the capture of insects in relation to permanence time of the traps in the field. The results indicate that the best methodology for insect monitoring with log-traps is the installation and removal of traps between 30 and 60 days based on insect fluctuation data and also to prevent reinfestation from logs kept longer in the field.

1. INTRODUÇÃO

O gorgulho-da-casca-do-pinus, *Pissodes castaneus* (De Geer, 1775) (Coleoptera, Curculionidae) é uma praga florestal recentemente introduzida no Brasil, cujas larvas broqueiam os ponteiros do pínus provocando, entre outros danos, a morte progressiva dos ramos. Foi registrado em 2001, no município de São José dos Ausentes, RS (Iede *et al.* 2004) e, atualmente, encontra-se distribuído nos três estados da Região Sul do Brasil, causando grande preocupação no setor florestal.

Os danos produzidos por *P. castaneus* podem ser de dois tipos, sendo o primeiro, e de menor importância, correspondente ao dano causado pelo adulto ao alimentar-se das gemas e ramos jovens, deixando pequenos orifícios de saída com visíveis exudações de resina e abundante serragem sob a casca. O segundo, e principal dano, é causado pelas larvas em seu processo de alimentação, construindo galerias e anelando ramos e troncos em árvores jovens e adultas (Grez *et al.* 2000). Os sintomas apresentados pelas árvores atacadas são, acículas mortas ou com coloração amarelada ou avermelhada nos ramos mais altos; partes da casca que tendem a soltar-se devido à seca do tronco e a morte da árvore, que ocorre do ápice para a base (Servicio de Protección de la Naturaleza 1999).

Altas infestações por *P. castaneus* podem causar a morte de árvores jovens (até 15 anos) de *Pinus*, em especial daquelas localizadas em solos pobres e rasos, ou em locais afetados por algum fator biótico ou abiótico (seca) desfavorável, que resulte em estresse da planta. Em árvores mais velhas, contudo, pode ser considerado uma praga secundária (Cisternas *et al.* 1993). No Uruguai, este inseto tem causado taxas de mortalidade superiores a 10% das árvores, em diferentes localidades (Grez *et al.* 2000).

No Brasil, verificou-se que *P. castaneus* ataca preferencialmente plantios jovens de pínus; árvores estressadas, em função de fatores bióticos, como o ataque dos pulgões-gigante-do-pinus, *Cinara atlantica* e *Cinara pinivora* (Wilson, 1919) (Hemiptera, Aphididae) ou fatores abióticos, como sítios inadequados, solos rasos e de baixa fertilidade, seca prolongada, ou mesmo solos encharcados; e também em árvores podadas que podem tornar-se predispostas ao ataque (Iede *et al.* 2004).

Apesar de não haver dados publicados sobre a quantificação dos danos por *P. castaneus* no Brasil, pode-se observar uma grande quantidade de árvores jovens mortas como resultado do ataque deste inseto em algumas regiões. Diversos métodos de controle, desde químico, biológico e silvicultural apresentam potencial na redução do

ataque e danos do inseto, usados isoladamente ou combinados; contudo, cada método tem suas limitações e diferentes níveis de eficácia. Em relação ao controle biológico, não se tem qualquer informação, para a América do Sul, quanto aos agentes potenciais e sua efetividade no controle.

Na França, ocorrem várias espécies de himenópteros parasitóides de *P. castaneus*, tais como: *Eubazus semirugosus* (Nees) Haeselbarth (1962) (Braconidae), endoparasitóide de ovos e larvas; *Coeloides abdominalis* Zetterstedt, 1838 (Braconidae) e *Coeloides sordidator* Ratzeburg, 1844 (Braconidae), ectoparasitóides de larvas de 2° e 3° ínstar; *Rhopalicus tutela* (Walker, 1836) (Chalcididae) e *Dolichomitus terebrans* (Ratzeburg, 1844) (Ichneumonidae), com taxas de parasitismo entre 20 e 30%, sendo que *E. semirugosus* e *Coeloides* sp. são as espécies mais freqüentes (Alauzet 1990). Uma espécie de pica-pau também é citada como inimigo natural destes gorgulhos, na Espanha (Romanik & Cadahia 1981).

O controle químico, na região de origem, Europa Ocidental, é realizado esporadicamente, com aplicações aéreas de fenitroion. Apesar de o inseto ser vulnerável a vários produtos químicos, há dificuldades para a realização dos tratamentos, pois quando as temperaturas são muito altas, os adultos buscam proteção, entrando em estivação no solo ou entre as ranhuras da casca (Romanik & Cadahia 1981). Este tipo de controle é efetivo apenas em curto prazo, devido ao elevado custo (Iede *et al.* 2004) e por ser desfavorável ao controle biológico (Mills 1990).

O monitoramento e controle de *P. castaneus* tem sido feito com toretes-armadilha, possibilitando a detecção precoce desta praga. Esta técnica consiste na utilização de toretes de pinus recém-cortados, desramados e empilhados, com o objetivo de atrair os adultos para a cópula e postura, reduzindo a infestação nas árvores sadias da área de plantio. Posteriormente, os toretes devem ser retirados do local e destruídos antes da emergência de uma nova geração de adultos. Complementarmente, é recomendada a utilização de medidas preventivas, como a escolha de sítios com boas condições para o plantio, evitando áreas alagadas ou outras situações que possam causar estresse nas árvores. Além disso, restos de poda e desbastes devem ser recolhidos e destruídos pelo fogo ou com picadores, para evitar a proliferação do inseto (Cobos & Ruiz 1990; Servicio de Proteccion de la Naturaleza 1999; Iede *et al.* 2004).

O estudo dos padrões de ocorrência sazonal e dos fatores que afetam a densidade populacional dos insetos-praga é fundamental para o desenvolvimento de programas de

manejo integrado (Dent 1991), sendo o monitoramento uma ferramenta de MIP essencial para avaliar a ocorrência e flutuação populacional da praga.

Assim, os objetivos deste trabalho foram: avaliar a ocorrência e a flutuação sazonal de *P. castaneus* e de agentes potenciais para seu controle biológico, em plantios comerciais de *P. taeda* e determinar o período ideal e o tempo de permanência de toretes-armadilha no campo para o monitoramento do inseto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Caracterização das áreas experimentais

Os experimentos de flutuação populacional de *P. castaneus* e de seus inimigos naturais e os tratamentos para a avaliação da permanência das armadilhas no campo foram realizados em duas áreas de plantio de *P. taeda*, localizadas nos municípios de Cambará do Sul, no Rio Grande do Sul e Três Barras, em Santa Catarina. O experimento foi repetido em três talhões, nas duas áreas.

Em Cambará do Sul, os experimentos foram realizados em plantio de *P. taeda*, com 1 ano de idade, com densidade de 1.666 plantas/ha, na Empresa Reflorestadores Unidos S.A., cujas coordenadas geográficas são 29°02'52" de latitude Sul e 50°08'41" longitude Oeste, e altitude de 1031 m. Constatou-se nesta área que as plantas estavam estressadas devido ao plantio em sítios ruins, em áreas alagadas e com drenagem deficiente.

Em Três Barras, a área experimental também era de *P. taeda*, com a mesma idade e densidade de árvores da área anterior, localizada na propriedade da Empresa Rigesa - Meadwestvaco, com as coordenadas geográficas 26°07'41" de latitude Sul e 50°19'30" de longitude Oeste, e altitude de 802 m (Figuras 1 e 2). Nas áreas de Três Barras, o plantio encontrava-se em um sítio de plantio adequado para um bom desenvolvimento das plantas.



Figura 1. Área de plantio de *Pinus taeda*, mostrando os toretes-armadilha no centro para coleta e monitoramento de *Pissodes castaneus*, no município de Três Barras, SC.
(Foto: Márcio Diduch, Rigesa - Meadwestvaco).

2.2. Avaliação da ocorrência e flutuação de *P. castaneus* com toretes-armadilha

Os insetos foram coletados em plantios de *P. taeda*, nas duas localidades mencionadas, usando armadilhas tipo torete (toretos-armadilha), instaladas previamente nestes locais para atrair e capturar os adultos para cópula e postura (Figura 2 a, b, c). Este tipo de armadilha consiste na utilização de 20 toretes de pínus recém-cortados, com 1 m de comprimento e 8-10 cm de diâmetro, desramados e empilhados (Figura 2a). Após um período de aproximadamente 30 dias no campo, os lotes de toretes eram transportados para o laboratório da Embrapa Floresta, em Colombo, PR, onde os toretes eram armazenados durante 1 ano em gaiolas teladas (Figura 2d), em sala com temperatura média de 20°C, umidade relativa de 70±10% (medidos com termohigrômetro) e fotofase de 12 h.

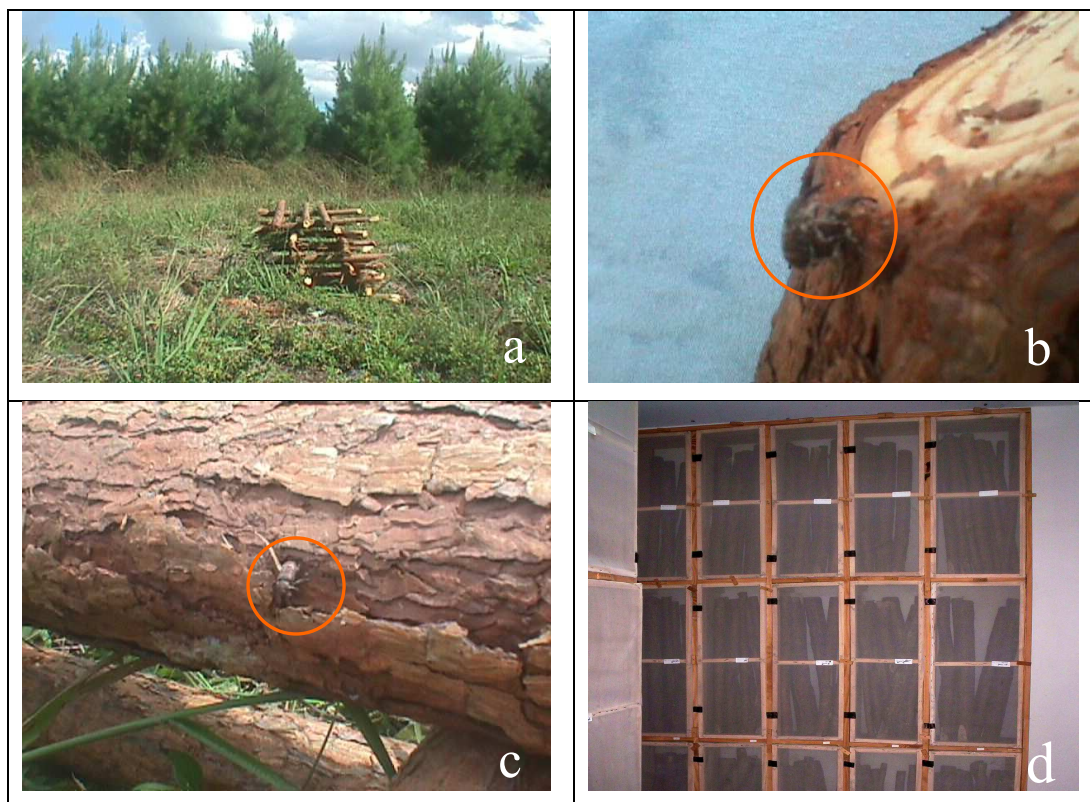


Figura 2. Torete-armadilha utilizados para a coleta e monitoramento de *Pissodes castaneus* em um plantio de *Pinus taeda*, no município de Três Barras, SC.
a) toretes-armadilha; b) acasalamento c) oviposição e d) gaiolas com toretes de pinus.

Em Cambará do Sul, as armadilhas foram instaladas a partir de abril/2005 até março/2006 e os toretes foram coletados no período de maio/2005 a abril/2006. Em Três Barras, a instalação foi em julho/2005 até junho/2007 e as coletas foram realizadas em um período de dois anos, de agosto/2005 a julho/2007. Em cada data de coleta, os lotes de 20 toretes de cada um dos três talhões, que representavam as três repetições, totalizando 60 toretes por mês de cada área, eram transportados para o laboratório. De cada lote de 20 toretes, 17 eram armazenados durante 1 ano e observados semanalmente, para avaliar a emergência dos adultos, e três toretes eram dissecados o mais rápido possível, retirando-se a casca do tronco para avaliar a presença de larvas, pupas e de adultos em estado teneral (imagos não esclerotinizados), que ainda não haviam emergido do tronco. Assim, 9 toretes eram dissecados e 51 armazenados por mês, para cada uma das localidades. Geralmente, as formas imaturas eram descartadas, pois não conseguem completar o desenvolvimento depois de retirada da casca do torete.

A avaliação da presença de inimigos naturais foi concomitante à dos gorgulhos, examinando-se os toretes para verificar a presença de qualquer estágio de possíveis

predadores e parasitóides. Gorgulhos com qualquer sintoma de infecção por entomopatógeno eram isolados e observados para a evolução dos sintomas, como a possível extrusão de fungo para identificação do agente.

2.3. Permanência dos toretes-armadilha no campo

Para a determinação do período e do tempo de permanência dos toretes-armadilha no campo, foi instalado um experimento com delineamento experimental em blocos inteiramente casualizados, constando de 36 tratamentos seguindo um esquema fatorial $12! \times 3! \times 3!$, com as parcelas correspondendo aos meses do ano de instalação das armadilhas (12) e as sub-parcelas (3) aos períodos de permanência das armadilhas no campo (30, 60 e 90 dias), todos em 3 repetições (talhões). Este experimento foi conduzido durante 12 meses, em Cambará do Sul, RS e em Três Barras, SC, no período de julho de 2005 a junho de 2006.

Os tratamentos utilizados foram os seguintes, para cada localidade: T1, T2 e T3: toretes-armadilha instalados em julho/2005 e com permanência no campo por 30, 60 e 90 dias, respectivamente; T4, T5 e T6: toretes-armadilha instalados em agosto/2005 e com permanência no campo por 30, 60 e 90 dias, respectivamente; T7, T8 e T9: toretes-armadilha instalados em setembro/2005 e com permanência no campo por 30, 60 e 90 dias, respectivamente; T10, T11 e T12: toretes-armadilha instalados em outubro/2005 e com permanência no campo por 30, 60 e 90 dias, respectivamente; T13, T14 e T15: toretes-armadilha instalados em novembro/2005 e com permanência no campo por 30, 60 e 90 dias, respectivamente; T16, T17 e T18: toretes-armadilha instalados em dezembro/2005 e com permanência no campo por 30, 60 e 90 dias, respectivamente; T19, T20 e T21: toretes-armadilha instalados em janeiro/2006 e com permanência no campo por 30, 60 e 90 dias, respectivamente; T22, T23 e T24: toretes-armadilha instalados em fevereiro/2006 e com permanência no campo por 30, 60 e 90 dias, respectivamente; T25, T26 e T27: toretes-armadilha instalados em março/2006 e com permanência no campo por 30, 60 e 90 dias, respectivamente; T28, T29 e T30: toretes-armadilha instalados em abril/2006 e com permanência no campo por 30, 60 e 90 dias, respectivamente; T31, T32 e T33: toretes-armadilha instalados em maio/2006 e com permanência no campo por 30, 60 e 90 dias, respectivamente; T34, T35 e T36: toretes-armadilha instalados em junho/2006 e com permanência no campo por 30, 60 e 90 dias, respectivamente.

As avaliações foram mensais para os toretes-armadilha deixados por 30 dias no campo; bimestrais para os deixados por 60 dias; e trimestrais para os deixados por 90 dias. Os toretes eram transportados para o laboratório e armazenados em gaiolas teladas para verificar o número de adultos emergidos, por pelo menos um ano, até que não fossem mais observadas emergências dos insetos.

2.4. Análise estatística e dados meteorológicos

Os gráficos da flutuação populacional foram elaborados com base no número médio mensal de insetos presentes nos toretes avaliados de cada área, na data da coleta para as formas imaturas (9 toretes) e nas datas da emergência para os adultos (51 toretes). Os dados de ocorrência das formas imaturas (larvas e pupas) e de imagos foram correlacionados com dados de temperatura mínima e máxima, precipitação e umidade relativa do ar, das datas das coletas, pelo fato de terem sido avaliados a partir do descascamento de três toretes recém-chegados ao laboratório. No caso dos adultos, como estes foram avaliados a partir dos 17 toretes de cada armadilha, mantidos por até um ano no laboratório, não foi possível correlacionar o número de adultos com os fatores climáticos, pois estava sujeito às condições de laboratório durante seu desenvolvimento. Para as análises de correlação foi usado o programa Statistica v. 5.5.

Os dados do experimento do item 2.3 foram transformados em $\sqrt{x+0.5}$ e submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5%, usando o programa Sanest.

Os dados meteorológicos foram obtidos de uma estação climatológica particular localizada na sede da empresa Rigesa Meadwestvaco, em Três Barras e de uma estação climatológica auxiliar do Instituto Nacional de Meteorologia – INMET, em Cambará do Sul.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Flutuação populacional de *P. castaneus* de Cambará do Sul

Na Figura 3 são apresentados os dados de emergência mensal dos adultos provenientes de 51 toretes de Cambará do Sul. Observa-se que praticamente todos os insetos nesta localidade emergiram entre setembro e novembro e apresentaram seu pico populacional em outubro.

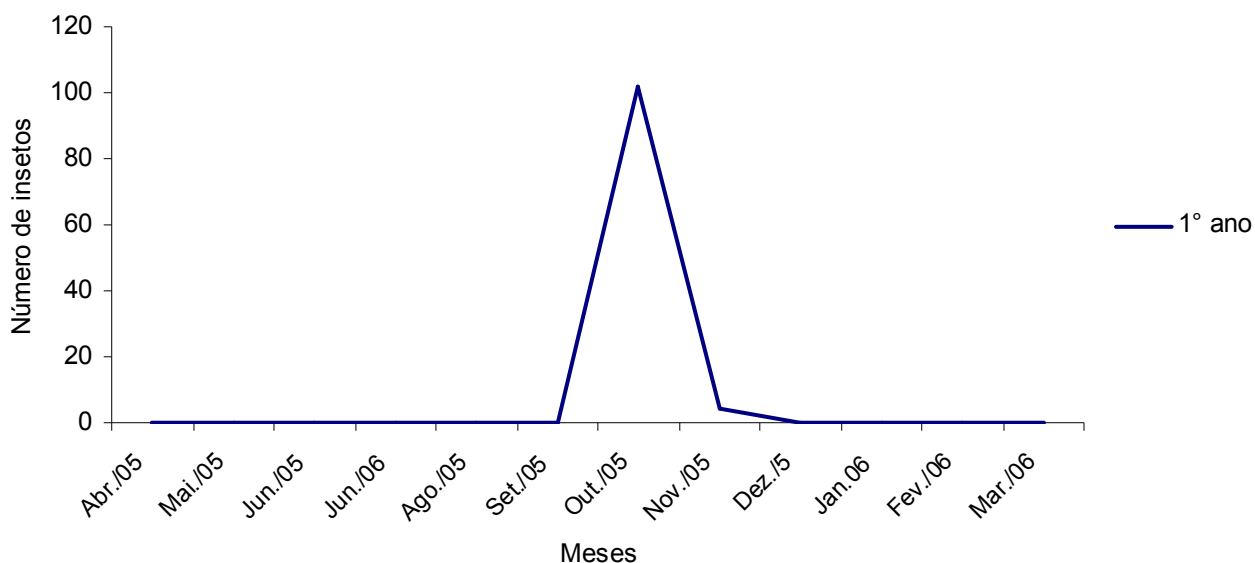


Figura 3. Número médio de adultos de *Pissodes castaneus* que emergiram de três lotes com 17 toretes em um plantio comercial de *Pinus taeda* em Cambará do Sul, RS, no período de abril/2005 a março/2006.

Na Figura 4 é apresentada a ocorrência dos estágios imaturos de *P. castaneus*, registrados mensalmente, nos toretes procedentes de Cambará do Sul. Nota-se que praticamente em todos os meses havia pelo menos um dos estágios ou todos eles concomitantemente, mas em números variáveis, em razão do ciclo biológico longo e da possibilidade de ocorrerem gerações sobrepostas.

O número de larvas presentes nos toretes foi maior nos meses de junho e julho, com 37,2% e 38,6%, respectivamente (Figura 4). Em outubro e novembro as pupas apresentaram os maiores picos de ocorrência, 22,3% e 20,5%, respectivamente. Os imagos estiveram presentes em maior número nos meses de julho e setembro, com 29,8% e 31,9%, respectivamente, e em outubro foi registrado um pico acentuado de emergência (96,2%), seguido de uma queda acentuada no mês de novembro, de apenas 3,7% (Figura 3).

Os picos populacionais de adultos na primavera, das larvas, no inverno e a aparente sobreposição de gerações, observados nesta pesquisa diferem dos resultados de Alauzet (1977), que estudou o ciclo biológico de *P. notatus* na França e verificou que a emergência máxima dos adultos ocorreu durante os meses de julho e agosto (verão no

hemisfério norte). Esta diferença, possivelmente, é decorrente do efeito das temperaturas mais altas encontradas durante todo ano nas regiões estudadas comparadas com as temperaturas do hemisfério. Uma das populações estudadas por Alauzet (1977) completou o desenvolvimento de ovo a adulto em aproximadamente 12 meses. Esta população correspondia aos ovos colocados em meados de julho, sendo que as larvas se desenvolveram até o terceiro ínstar e depois estacionaram durante o inverno, só completando o ciclo na próxima primavera, com os adultos emergindo de meados de junho a meados de julho. O segundo pico correspondia à geração resultante de ovos colocados entre fevereiro e julho, de adultos hibernantes, cuja progênie completou o ciclo de ovo a adulto em apenas 2-3 meses. O autor concluiu que as diferenças observadas na duração do desenvolvimento não se devem à diapausa, mas foram influenciadas pela temperatura.

A flutuação das larvas, pupas e imagos não apresentaram correlação significativa com nenhum dos fatores climáticos avaliados, temperatura mínima e máxima, precipitação e umidade relativa (Tabela 1). Nas regiões de origem, a emergência dos adultos está estritamente ligada às condições de temperatura (Alauzet 1977; Plata-Negrache & Prendes-Ayala 1979).

Tabela 1. Correlações (r) entre o número médio de larvas, pupas e imagos de *Pissodes castaneus* capturados com toretes-armadilha em um plantio comercial de *Pinus taeda* em Cambará do Sul, RS, com os parâmetros climáticos, temperatura, precipitação e umidade relativa do ar, no período de abril/2005 a março/2006.

Estágio	Parâmetros climáticos			
	Temp. mínima (°C)	Temp. máxima (°C)	Precipitação (mm)	Umidade Relativa (%)
Larva	-0,3469 ^{ns}	-0,4084 ^{ns}	-0,4077 ^{ns}	0,0643 ^{ns}
Pupa	-0,0598 ^{ns}	0,0097 ^{ns}	0,2912 ^{ns}	-0,1044 ^{ns}
Imago	0,5208 ^{ns}	0,5294 ^{ns}	-0,2423 ^{ns}	0,2979 ^{ns}

^{ns} não significativo a 5% de probabilidade

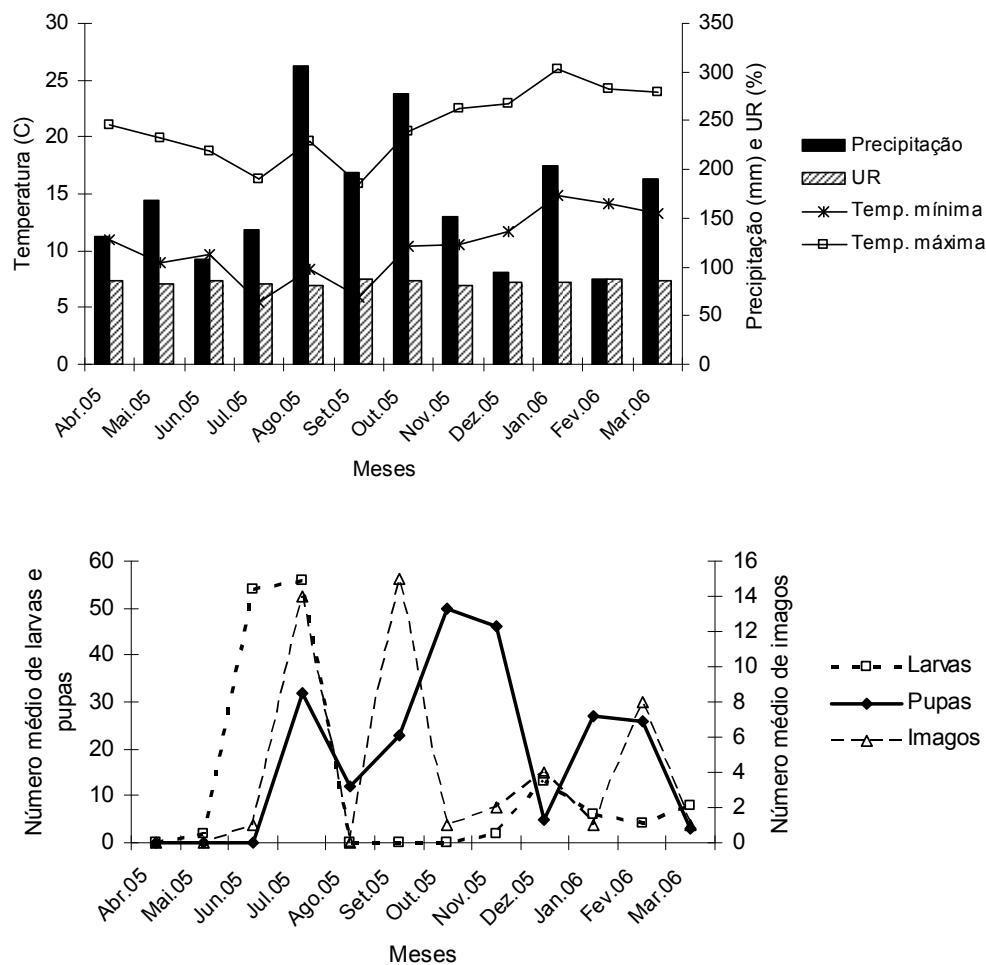


Figura 4. Número médio de larvas, pupas e imagos de *Pissodes castaneus* capturados em 3 lotes de 3 toretes, em um plantio comercial de *Pinus taeda* em Cambará do Sul, RS, relacionado à temperatura, precipitação e umidade relativa do ar, no período de abril/2005 a março/2006.

3.2. Flutuação populacional de *P. castaneus* de Três Barras, SC

A Figura 5 apresenta os dados de emergência mensal dos adultos de 51 toretes trazidos de Três Barras, SC. Observa-se que no primeiro ano os insetos apresentaram dois picos populacionais, um em janeiro/2006 e outro, menos expressivo, em abril/2006, já os insetos que emergiram no segundo ano, tiveram seus picos populacionais em setembro/2006 e abril/2007, e um pico menos expressivo em fevereiro/2007.

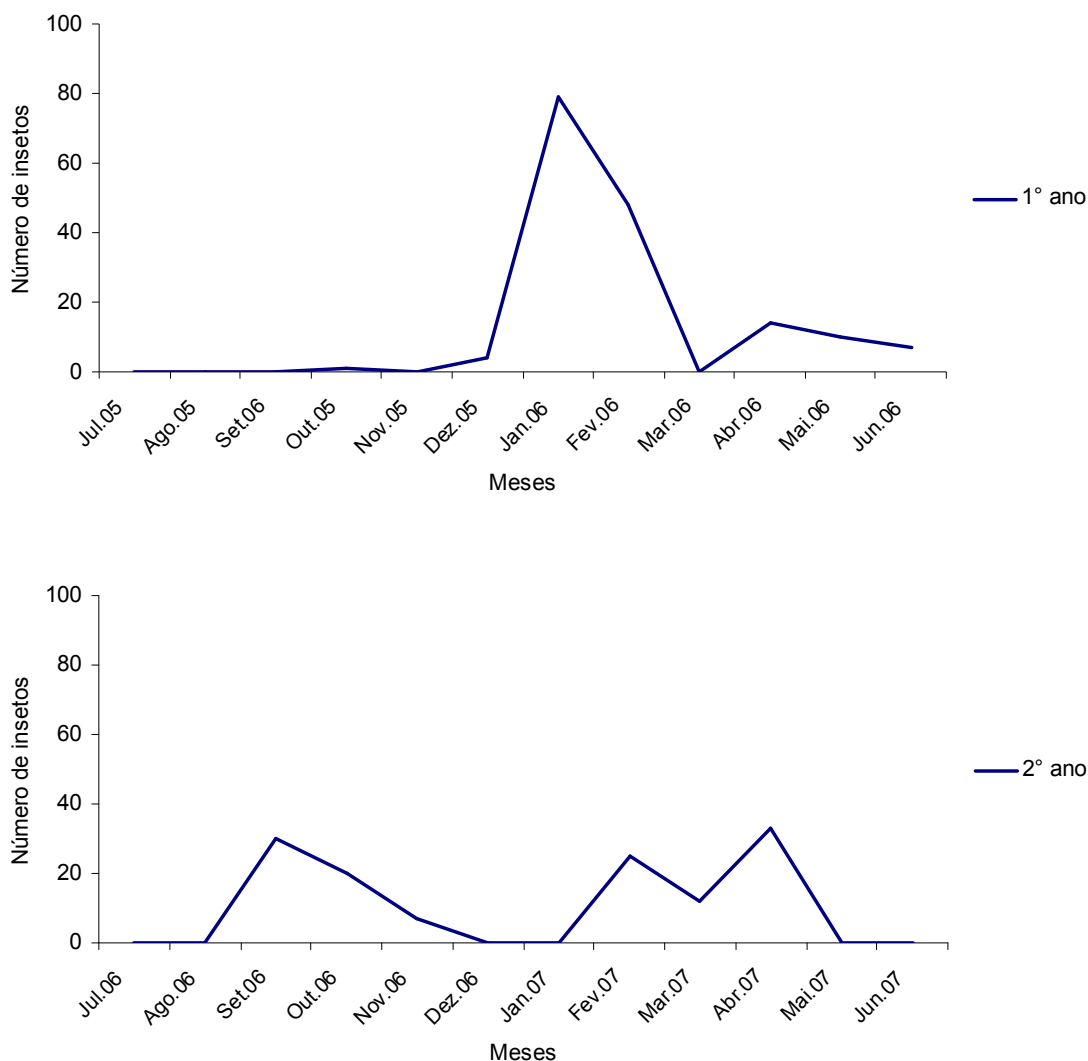


Figura 5. Número médio de adultos de *Pissodes castaneus* que emergiram de três lotes com 17 toretes provenientes de um plantio comercial de *Pinus taeda* em Três Barras, SC: a) primeiro ano de julho/2005 a junho/2006 e b) segundo ano de julho/2006 a junho/2007.

Nesta área, as coletas estenderam-se por dois anos, sendo que nos toretes coletados nos primeiros 12 meses de avaliação, as larvas de *P. castaneus* apresentaram seus picos de ocorrência nos meses de setembro/2005 e outubro/2006, com 21,4% e 21,7%, respectivamente (Figura 6). Muitas destas larvas completaram seu desenvolvimento e encontravam-se no estágio de pupa nas avaliações dos meses de outubro/2005 e janeiro/2006, quando foram registrados os maiores picos populacionais de pupas, com 52,3% e 31,8%, respectivamente. Os adultos apresentaram picos de emergência em janeiro (48,5%) e fevereiro/2006 (29,4%), os quais eram imagos e pupas

na avaliação de outubro/2005, quando foi registrado um grande número de insetos nesta fase (82,3%) (Figura 6).

No segundo ano de avaliação, as larvas apresentaram grande número nos meses de novembro/2006 a janeiro/2007, com os maiores picos de ocorrência em novembro e janeiro, com 26,3% e 26,8%, respectivamente (Figura 7). As pupas apresentaram picos de ocorrência em novembro e dezembro/2006, com 43,0% e 21,5%, respectivamente, resultando em imagos que apresentaram picos de ocorrência em fevereiro/2007, com 83,3%. Os adultos de *P. castaneus* apresentaram picos de emergência em setembro/2006 (23,6%) e abril/2007 (26,0%), correspondendo a duas gerações diferentes (Figura 5).

A flutuação das larvas, pupas, imagos e adultos apresentou correlação significativa com alguns dos fatores climáticos avaliados: temperatura mínima e máxima, precipitação e umidade relativa (Tabela 2). O período de ocorrência das larvas apresentou correlação significativa com a temperatura mínima, precipitação e umidade relativa. Já a flutuação das pupas apresentou correlação com a temperatura mínima, e os imagos, com a umidade relativa. A influência do clima sobre o ciclo deste inseto é muito importante, pois em regiões de climas mais quentes, como na zona litorânea, estes insetos podem ter duas gerações por ano; enquanto em regiões mais frias, *P. castaneus* pode apresentar uma geração a cada dois anos (Plata-Negrache & Prendes-Ayala 1979). Nas áreas de Três Barras, verificou-se que a temperatura máxima foi mais alta do que nas áreas de Cambará do Sul por isso apresentou mais picos populacionais durante o ano.

Tabela 2. Correlações (r) entre o número médio de larvas, pupas e imagos de *Pissodes castaneus* em um plantio comercial de *Pinus taeda* em Três Barras, SC, com os parâmetros climáticos, temperatura, precipitação e umidade relativa do ar, no período de julho/2005 a junho/2007.

Estágio	Parâmetros climáticos			
	Temp. mínima (°C)	Temp. máxima (°C)	Precipitação (mm)	Umidade Relativa (%)
Larvas	0,4341 *	0,2119 ^{ns}	0,4967 *	0,4602 *
Pupas	0,4829 *	0,3243 ^{ns}	0,3961 ^{ns}	0,2983 ^{ns}
Imagos	0,2185 ^{ns}	0,0132 ^{ns}	0,3529 ^{ns}	0,5080 *

* significativo a 5% de probabilidade

^{ns} não significativo a 5% de probabilidade

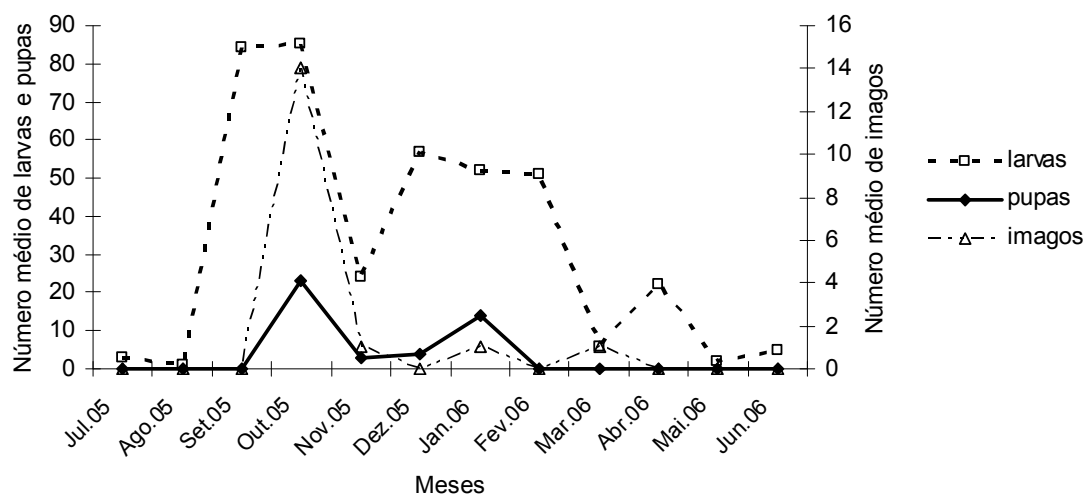
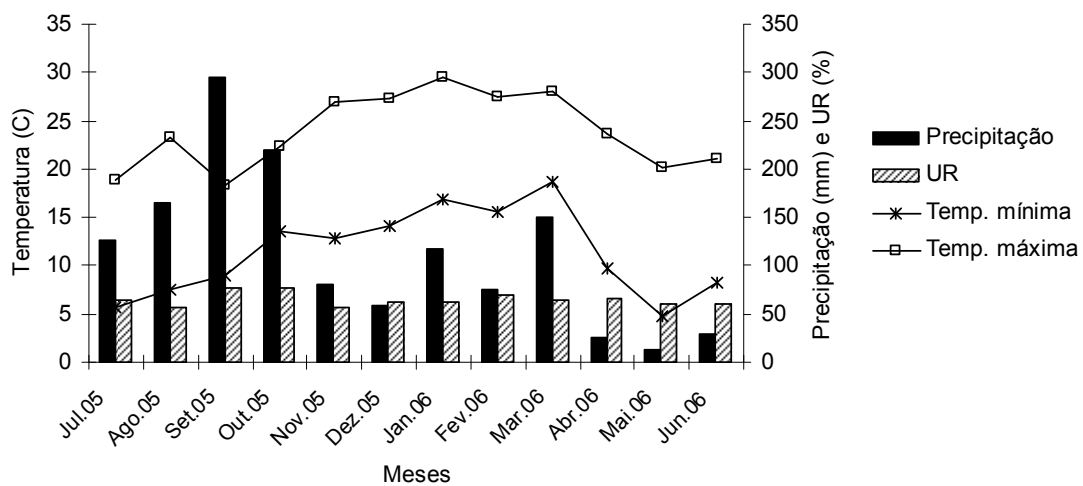


Figura 6. Número médio de larvas, pupas e imagos de *Pissodes castaneus* capturados em 3 lotes de 3 toretes, em um plantio comercial de *Pinus taeda* em Três Barras, SC, relacionado à temperatura, precipitação e umidade relativa do ar, no período de julho/2005 a junho/2006 (primeiro ano).

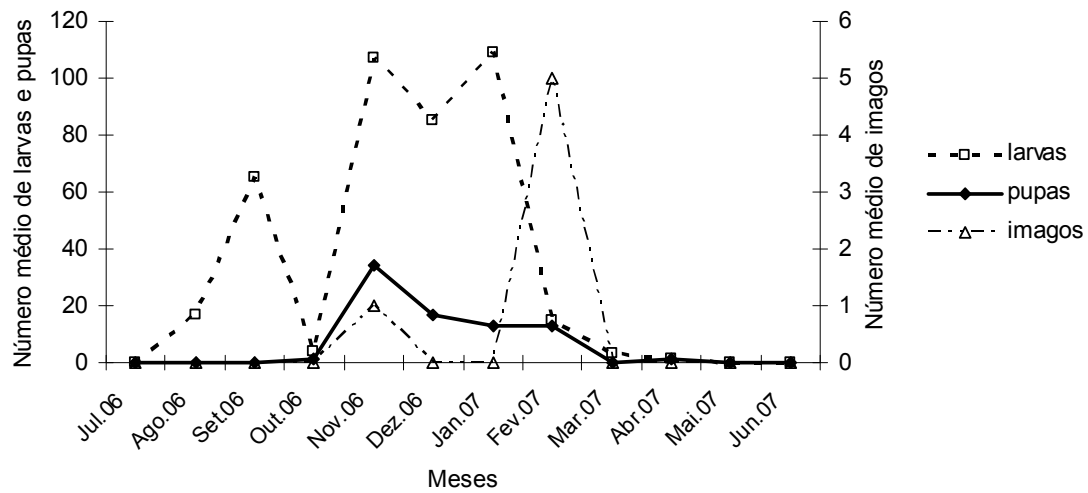
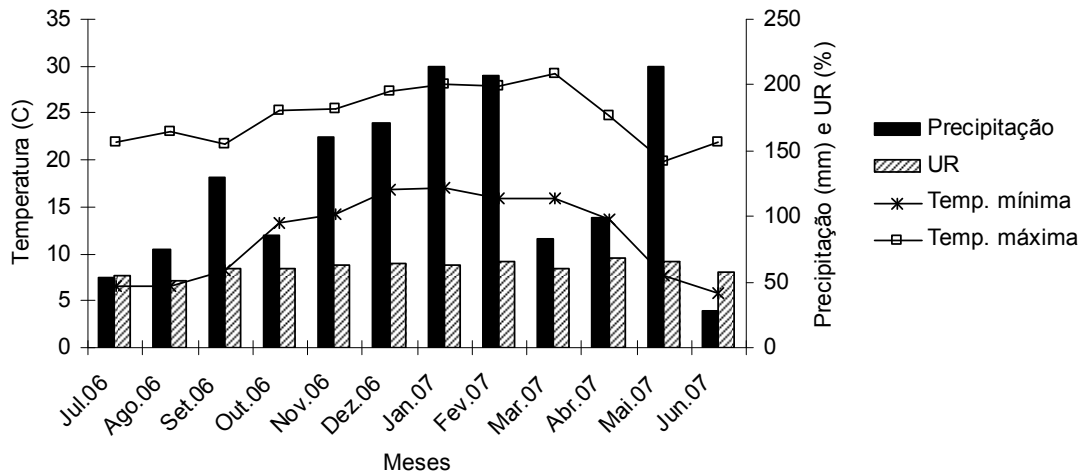


Figura 7. Número médio de larvas, pupas e imagos de *Pissodes castaneus* capturados em 3 lotes de 3 toretes, em um plantio comercial de *Pinus taeda* em Três Barras, SC, relacionado à temperatura, precipitação e umidade relativa do ar, no período de julho/2006 a junho/2007 (segundo ano).

3.3. Permanência dos toretes-armadilha em plantio de pinus para monitoramento de *P. castaneus*

A análise de variância mostrou diferenças significativas para local e período de instalação das armadilhas, bem como para interações entre algumas das variáveis, conforme pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3. Análise de variância para o efeito do local, do tempo de permanência e do período de instalação de toretes-armadilha, no número de adultos de *Pissodes castaneus* emergidos, no período de julho/2005 a junho/2006.

Causas da variação	Graus de liberdade	Quadrados médios	Valor F	Prob.>F
Local	1	790,7993	68,3994	0,00003*
Tempo	2	23,4151	2,0253	0,1736 ^{ns}
Local x tempo	2	0,8150	0,0705	0,9319 ^{ns}
Resíduo (A)	12	11,5614		
Parcelas	17			
Período	11	128,8139	13,6805	0,00001*
Local x período	11	68,6437	7,2902	0,00001*
Tempo x período	22	30,1594	3,2030	0,00007*
Local x tempo x período	22	26,0405	2,7656	0,00032*
Resíduo (B)	132	9,4158		
Total	215			

* significativo a 5% de probabilidade

Comparando o tempo de permanência das armadilhas no plantio entre as localidades (Tabela 4), observa-se que o número médio de adultos de *P. castaneus* emergidos dos toretes-armadilha diferiu estatisticamente entre os dois locais estudados para os três tempos de permanência das armadilhas no campo, sendo que em Cambará do Sul, foi coletado praticamente o dobro do número de insetos em relação a Três Barras.

Tabela 4. Comparação do número médio de adultos de *Pissodes castaneus* emergidos de toretes-armadilha que permaneceram por 30, 60 e 90 dias em um plantio de *Pinus taeda* em Cambará do Sul, RS (CS) e outro em Três Barras, SC (TB), no período de julho/2005 a junho/2006.

Local	Tempo de permanência das armadilhas (dias)		
	30 (n=36)	60 (n=36)	90 (n=36)
CS	169,93 a	172,19 a	149,29 a
TB	89,12 b	84,96 b	67,44 b

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si ao nível de 5%.

Comparando as localidades dentro do período (meses) de instalação das armadilhas (Tabela 5), o número médio de adultos de *P. castaneus* coletados nos períodos de instalação das armadilhas diferiu estatisticamente entre os locais estudados, na maioria dos períodos: julho, agosto, outubro, novembro, dezembro, janeiro, fevereiro, março e abril (Tabela 5). Em Cambará do Sul foi coletado um maior número de insetos em praticamente todos os períodos em que as armadilhas foram instaladas o que pode ser atribuído às condições de sítio encontradas nesta área com drenagem deficiente do solo que deixam as plantas estressadas e mais atrativas e vulneráveis ao ataque do inseto. Somente em setembro e maio não se observou diferença significativa entre o número de insetos coletado nas duas localidades.

Tabela 5. Número médio de adultos de *Pissodes castaneus* emergidos nos períodos (meses) de instalação de toretes-armadilha em um plantio de *Pinus taeda* em Cambará do Sul, RS (CS) e outro em Três Barras, SC (TB), no período de julho/2005 a junho/2006.

Períodos (meses)	Local	
	CS (n=9)	TB (n=9)
Julho	142,42 a	5,56 b
Agosto	147,02 a	28,30 b
Setembro	114,25 a	76,95 a
Outubro	265,08 a	103,46 b
Novembro	265,33 a	132,13 b
Dezembro	207,71 a	112,09 b
Janeiro	274,31 a	100,96 b
Fevereiro	221,95 a	113,55 b
Março	265,75 a	135,51 b
Abril	15,09 b	92,27 a
Maio	71,04 a	79,81 a
Junho	135,92 a	61,24 b

Médias seguidas por letras distintas na linha diferem entre si ao nível de 5%.

Comparando as localidades dentro dos períodos, levando em conta o tempo de permanência das armadilhas (Tabela 6), o número médio de insetos coletados nos toretes-armadilha que permaneceram 30 dias no campo foi superior, diferindo

estatisticamente nos períodos de julho, março, abril e junho com maior número de insetos coletados nos três primeiros meses em Cambará do Sul.

O número médio de insetos coletados nos toretes-armadilha que permaneceram 60 dias no campo (Tabela 6) foram estatisticamente superiores nos períodos de julho, outubro, dezembro, janeiro e fevereiro, com maior número de insetos em Cambará do Sul.

O número médio de insetos nos toretes-armadilha que permaneceram 90 dias no campo (Tabela 6) diferiram estatisticamente nos períodos de julho, agosto, outubro, novembro, janeiro e abril, sendo que somente em abril foi registrado um maior número de insetos, desta vez em Três Barras.

Tabela 6. Número médio de adultos de *Pissodes castaneus* coletados nos períodos (meses) de instalação dos toretes-armadilha comparados entre os tempos que permaneceram (30, 60 e 90 dias) em um plantio de *Pinus taeda* em Cambará do Sul, RS (CS) e outro em Três Barras, SC (TB), no período de julho/2005 a junho/2006.

Local/ Período (meses)	Tempo de permanência das armadilhas (dias)					
	30 (n=3)		60 (n=3)		90 (n=3)	
	CS	TB	CS	TB	CS	TB
Julho	280,05 a	35,14 b	135,26 a	0,00 b	55,19 a	0,00 b
Agosto	148,83 a	60,13 a	134,53 a	57,36 a	158,19 a	0,00 b
Setembro	107,77 a	70,36 a	74,61 a	75,66 a	170,18 a	85,18 a
Outubro	212,58 a	239,46 a	277,59 a	79,66 b	309,85 a	37,26 b
Novembro	308,21 a	187,52 a	297,34 a	241,60 a	197,88 a	27,35 b
Dezembro	172,79 a	111,38 a	210,72 a	63,34 b	242,69 a	175,49 a
Janeiro	286,13 a	209,89 a	286,99 a	93,06 b	250,61 a	35,99 b
Fevereiro	219,45 a	178,86 a	277,17 a	86,58 b	175,06 a	86,24 a
Março	298,81 a	86,46 b	217,91 a	167,89 a	284,16 a	160,42 a
Abril	0,00 b	43,41 a	74,88 a	94,13 a	5,54 b	156,79 a
Mai	91,94 a	22,23 a	60,75 a	104,15 a	62,43 a	140,80 a
Junho	157,56 a	8,69 b	152,76 a	88,88 a	101,27 a	122,41 a

Médias seguidas por letras distintas na linha (dentro de 30, dentro de 60 e dentro de 90) diferem entre si ao nível de 5%.

O número de insetos coletados nos diferentes tempos de permanência dos toretes-armadilha no campo não diferiram estatisticamente dentro dos locais estudados, Cambará do Sul, RS e Três Barras, SC, conforme pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7. Comparação do número médio de adultos de *Pissodes castaneus* emergidos de toretes-armadilha que permaneceram 30, 60 e 90 dias em um plantio de *Pinus taeda* em Cambará do Sul, RS (CS) e outro em Três Barras, SC (TB), no período de julho/2005 a junho/2006.

Tempo (dias)	Local	
	TB (n=36)	CS (n=36)
30	89,12 a	169,93 a
60	84,97 a	172,19 a
90	67,44 a	149,29 a

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si ao nível de 5%.

Analisando-se os tratamentos dentro da localidade de Três Barras (Tabela 8), constata-se que os toretes-armadilha instalados em julho, outubro e janeiro capturaram um maior número de insetos naqueles que permaneceram 30 dias no campo. As armadilhas instaladas nos meses de agosto e novembro, que permaneceram 30 e 60 dias no campo, capturaram 60,1 e 57,4 insetos e 187,5 e 241,6 insetos, respectivamente. Já nas armadilhas instaladas em dezembro e abril, o número de insetos registrado foi superior naquelas que permaneceram 90 dias no campo, com 175,5 e 156,8 insetos, respectivamente. O número de insetos coletados foi superior nos toretes-armadilha que permaneceram 60 e 90 dias no campo, instalados em maio e junho.

Na localidade de Cambará do Sul (Tabela 8), o número de insetos coletados só diferiu estatisticamente nos toretes-armadilha que foram instalados em julho e abril e apresentaram valores superiores, 280 e 74,9 insetos, respectivamente, nas armadilhas de 30 e 60 dias no campo.

Tabela 8. Comparação do número médio de adultos de *Pissodes castaneus* emergidos nos períodos (meses) de instalação de toretes-armadilha que permaneceram 30, 60 e 90 dias em um plantio de *Pinus taeda* em Cambará do Sul, RS (CS) e em Três Barras, SC (TB), no período de julho/2005 a junho/2006.

Local/ Período (meses)	TB (n=3)			CS (n=3)		
	Tempo de permanência das armadilhas (dias)					
	30	60	90	30	60	90
Julho	35,1a	0,0b	0,0b	280,0a	135,3b	55,2b
Agosto	60,1a	57,4a	0,0b	148,8a	134,5a	158,2a
Setembro	70,4a	75,7a	85,2a	107,7a	74,6a	170,2a
Outubro	239,5a	79,6b	37,3b	212,6a	277,6a	309,8a
Novembro	187,5a	241,6a	27,3b	308,2a	297,3a	197,9a
Dezembro	111,4ab	63,3b	175,5a	172,7a	210,7a	242,7a
Janeiro	209,9a	93,1ab	35,9b	286,1a	286,9a	250,6a
Fevereiro	178,9a	86,6a	86,2a	219,4a	277,2a	175,1a
Março	86,5a	167,9a	160,4a	298,8a	217,9a	284,2a
Abril	43,4b	94,1ab	156,8a	0,0b	74,9a	5,5b
Mai	22,2b	104,1a	140,8a	91,9a	60,7a	62,4a
Junho	8,7b	88,8a	122,4a	157,6a	152,8a	101,3a

Médias seguidas por letras distintas na linha (dentro de TB e dentro de CS) diferem entre si ao nível de 5%.

Analisando a localidade de Três Barras, observa-se que os meses de instalação dos toretes-armadilha com o maior número de insetos foram março e novembro, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos apresentando 135,5 e 132,1 insetos, respectivamente. Já para a localidade de Cambará do Sul, as capturas foram maiores nos meses de janeiro, março, novembro e outubro com 274,3, 265,7, 265,3 e 265,1 insetos, respectivamente (Figura 6).

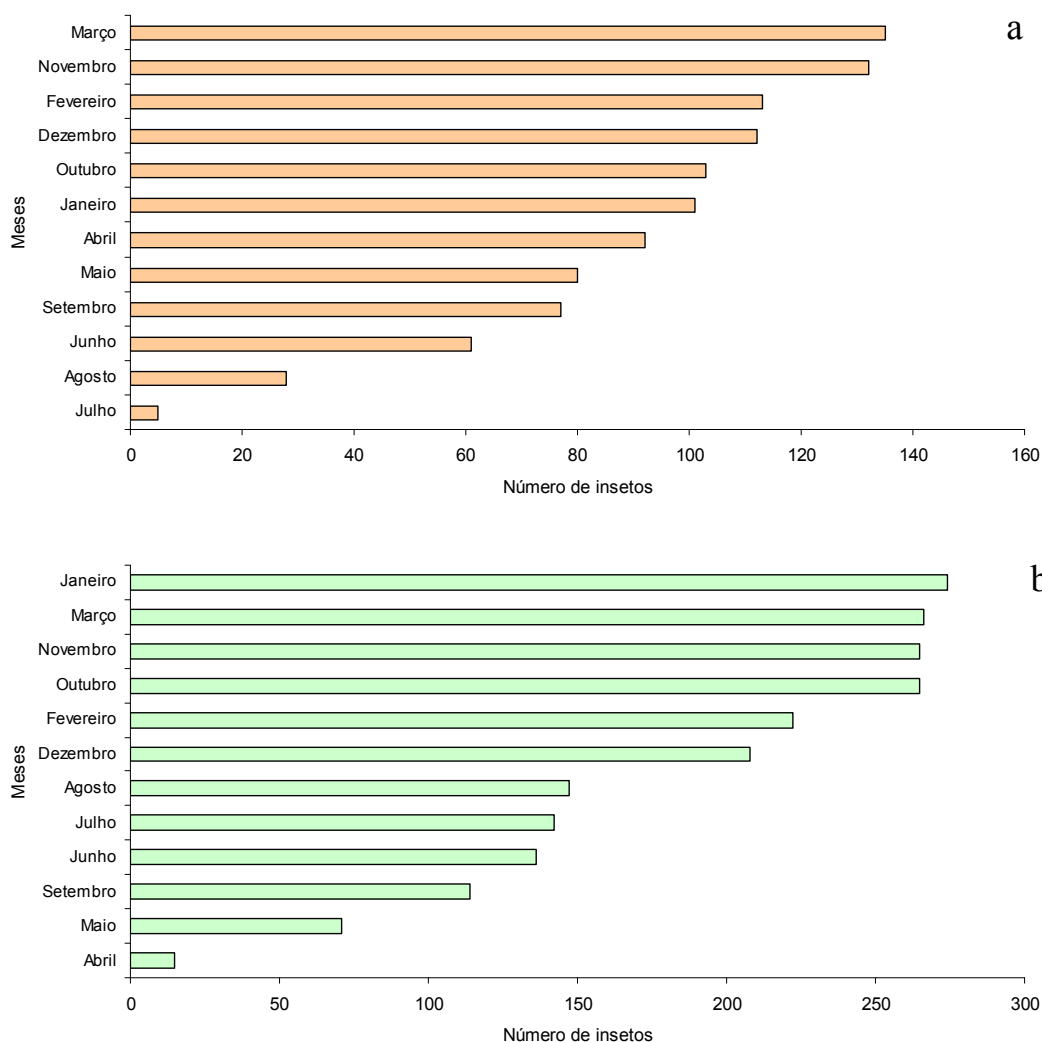


Figura 6. Número médio de adultos de *Pissodes castaneus* coletados nos períodos (meses) de instalação de toretes-armadilha em um plantio de *Pinus taeda*: a) Três Barras e b) Cambará do Sul; no período de julho/2005 a junho/2006.

Considerando somente os tempos de permanência dos toretes-armadilha no campo (Tabela 10), os períodos (meses) de maior captura de insetos foram janeiro e novembro nas armadilhas que permaneceram por 30 dias no plantio, com 246,5 e 244,1 insetos, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Já nos toretes-armadilha que permaneceram 60 dias, o mês de maior captura foi novembro, com 268,7 insetos, que diferiu estatisticamente dos demais tratamentos. Nas armadilhas que permaneceram 90 dias no campo, o maior número de insetos foi registrado em março, com 217,9 insetos.

Tabela 10. Comparação do número médio de adultos de *Pissodes castaneus* emergidos nos períodos (meses) de instalação de toretes-armadilha que permaneceram 30, 60 e 90 dias em um plantio de *Pinus taeda*, no período de julho/2005 a junho/2006. Dados conjuntos de Cambará do Sul e Três Barras.

Tempo de permanência das armadilhas (dias)					
30 (n=6)		60 (n=6)		90 (n=6)	
Período (meses)	n° de insetos	Período (meses)	n° de insetos	Período (meses)	n° de insetos
Janeiro	246,54a	Novembro	268,75a	Março	217,91a
Novembro	244,14a	Março	192,09ab	Dezembro	207,74ab
Outubro	225,82ab	Janeiro	176,76abc	Outubro	140,65abc
Fevereiro	198,64ab	Fevereiro	168,44abcd	Fevereiro	126,78abcd
Março	176,73abc	Outubro	163,72abcd	Setembro	124,05abcd
Dezembro	140,37abcd	Dezembro	126,32bcde	Janeiro	119,26abcd
Julho	128,54bcde	Junho	118,68bcde	Junho	111,59bcd
Agosto	99,57cdef	Agosto	91,92cdef	Maiο	97,71cde
Setembro	88,07def	Abril	84,23def	Novembro	93,23cde
Junho	60,37ef	Maiο	81,01def	Abril	55,74def
Maiο	51,21f	Setembro	75,13ef	Agosto	43,75ef
Abril	12,94g	Julho	37,68f	Julho	16,19f

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si ao nível de 5%.

Considerando os tempos de permanência dos toretes-armadilha somente na localidade de Três Barras (Tabela 11), verifica-se que no mês de outubro foi capturado o maior número médio de insetos (239,5), sendo que o menor número (8,7) foi registrado no mês de junho, quando as armadilhas permaneceram 30 dias no plantio. Já nos toretes que permaneceram por 60 dias, o período de maior coleta foi em novembro, com 241,6 insetos; no mês de julho não foi registrado qualquer inseto. Os toretes com 90 dias de permanência no plantio apresentaram maior número de insetos em dezembro, março, abril e maio e diferiram estatisticamente dos demais tratamentos. Já nos meses de julho e agosto não foram coletados insetos nas armadilhas.

Tabela 11. Comparação do número médio de adultos de *Pissodes castaneus* emergidos nos períodos (meses) de instalação de toretes-armadilha que permaneceram durante 30, 60 e 90 dias em um plantio de *Pinus taeda* em Três Barras, SC (TB), no período de julho/2005 a junho/2006.

Tempo de permanência das armadilhas (dias)					
30 (n=3)		60 (n=3)		90 (n=3)	
Período (meses)	n° de insetos	Período (meses)	N° de insetos	Período (meses)	n° de insetos
Outubro	239,46a	Novembro	241,60a	Dezembro	175,49a
Janeiro	209,89ab	Março	167,89ab	Março	160,42a
Novembro	187,52abc	Maió	104,15b	Abril	156,79a
Fevereiro	178,86abc	Abril	94,13b	Maió	140,80a
Dezembro	111,38abcd	Janeiro	93,06b	Junho	122,41ab
Março	86,46bcde	Junho	88,88b	Fevereiro	86,24abc
Setembro	70,36cdef	Fevereiro	86,58b	Setembro	85,18abc
Agosto	60,13def	Outubro	79,66b	Outubro	37,26bcd
Abril	43,41def	Setembro	75,66b	Janeiro	35,99bcd
Julho	35,14def	Dezembro	63,34b	Novembro	27,35cd
Maió	22,23ef	Agosto	57,37b	Julho	0,00d
Junho	8,69f	Julho	0,00c	Agosto	0,00d

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si ao nível de 5%.

Ao se analisar a localidade de Cambará do Sul (Tabela 12), observa-se que os toretes-armadilha instalados em novembro, março, janeiro e julho capturaram 308,2, 298,8, 286,1 e 280 insetos, respectivamente, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos, com maior número médio de insetos nas armadilhas que permaneceram 30 dias no campo. Já em abril, não foram coletados insetos. Nos toretes-armadilha que permaneceram 60 dias no plantio, as maiores capturas foram nos meses de novembro, janeiro, outubro, fevereiro, março e dezembro, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Já nos meses de abril, setembro e maio, o número de insetos foi menor. Nos toretes-armadilha que permaneceram 90 dias, foram registrados mais insetos nos períodos de outubro, março e janeiro. Em abril deu-se a menor captura, com média de 5,5 insetos.

Tabela 12. Comparação do número médio de adultos de *Pissodes castaneus* emergidos nos períodos (meses) de instalação dos toretes-armadilha que permaneceram durante 30, 60 e 90 dias em um plantio de *Pinus taeda* em Cambará do Sul, RS (CS), no período de julho/2005 a junho/2006.

Tempo de permanência das armadilhas (dias)					
30 (n=3)		60 (n=3)		90 (n=3)	
Período (meses)	n° de insetos	Período (meses)	n° de insetos	Período (meses)	n° de insetos
Novembro	308,21a	Novembro	297,34a	Outubro	309,85a
Março	298,81a	Janeiro	286,99a	Março	284,16a
Janeiro	286,13a	Outubro	277,59a	Janeiro	250,61a
Julho	280,05a	Fevereiro	277,17a	Dezembro	242,69ab
Fevereiro	219,45ab	Março	217,91a	Novembro	197,88ab
Outubro	212,58ab	Dezembro	210,72a	Fevereiro	175,06abc
Dezembro	172,69ab	Junho	152,76ab	Setembro	170,18abc
Junho	157,56ab	Julho	135,26ab	Agosto	158,19abcd
Agosto	148,83ab	Agosto	134,53ab	Junho	101,27bcd
Setembro	107,77b	Abril	74,88b	Maiο	62,43cd
Maiο	91,94b	Setembro	74,61b	Julho	55,19d
Abril	0,00c	Maiο	60,75b	Abril	5,54e

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si ao nível de 5% de significância

Estes resultados do monitoramento do gorgulho-da-casca-do-pinus com toretes-armadilha em áreas de plantios de *Pinus* são fundamentais para se estabelecer os padrões de ocorrência do inseto e para a detecção precoce, possibilitando estabelecer estratégias de manejo, a fim de minimizar sua dispersão e danos.

3.4. Inimigos naturais de *Pissodes castaneus*

Nas duas localidades estudadas, Cambará do Sul, RS e Três Barras, SC, verificou-se a ocorrência de um agente de controle biológico do gorgulho-da-casca-do-pinus, o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycota). Em Cambará do Sul, registrou-se uma taxa elevada de infecção do gorgulho por esse patógeno, de 74,1% (Figura 7).

Em Três Barras, no primeiro ano de avaliação, registrou-se apenas 11,9% de insetos infectados com *B. bassiana* (Figura 8); contudo, a epizootia cresceu no segundo ano, com a infecção atingindo 70,4% (Figura 9), sugerindo que houve estabelecimento de inóculo de *B. bassiana* no solo. Foi observada a extrusão do fungo nos insetos mortos para confirmar que morreram por fungo.

Infecções com *B. bassiana* tem sido registradas para outras espécies de *Pissodes*, no Canadá e EUA, causando epizootias naturais em *P. strobi*, que é uma importante praga de *Pinus* naquelas regiões (Trudel *et al.* 2007).

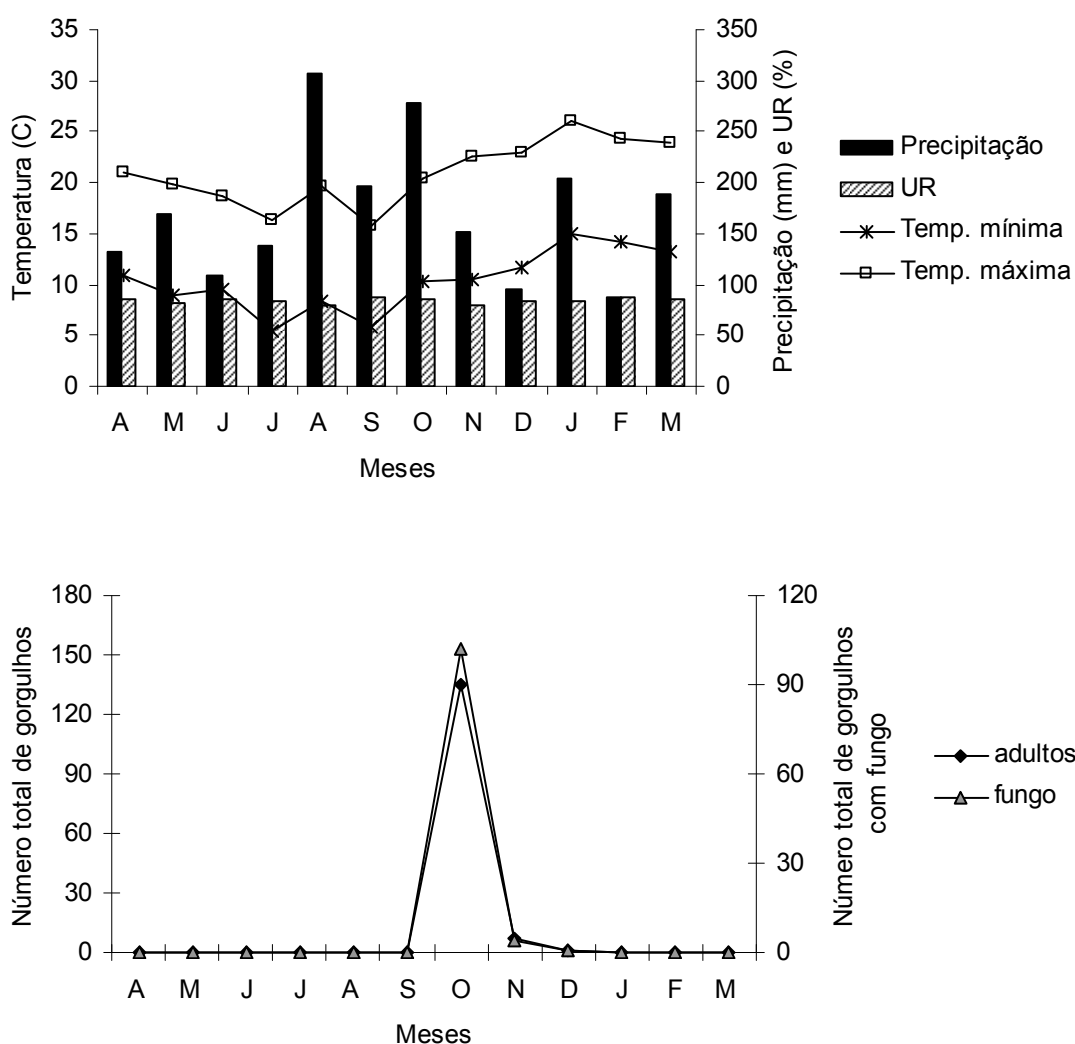


Figura 7. Ocorrência de *Beauveria bassiana* infectando adultos de *Pissodes castaneus* em Cambará do Sul, RS, no período de abril/2005 a março/2006.

Nas duas áreas estudadas pode-se verificar que a ocorrência do fungo está associada a época de ocorrência do inseto e que em alguns meses do ano houve uma

maior proporção de insetos contaminados pelo fungo do que insetos saudios, o que podemos observar em Três Barras nos meses de dezembro e junho, no primeiro ano e nos meses de setembro, outubro e fevereiro, no segundo ano.

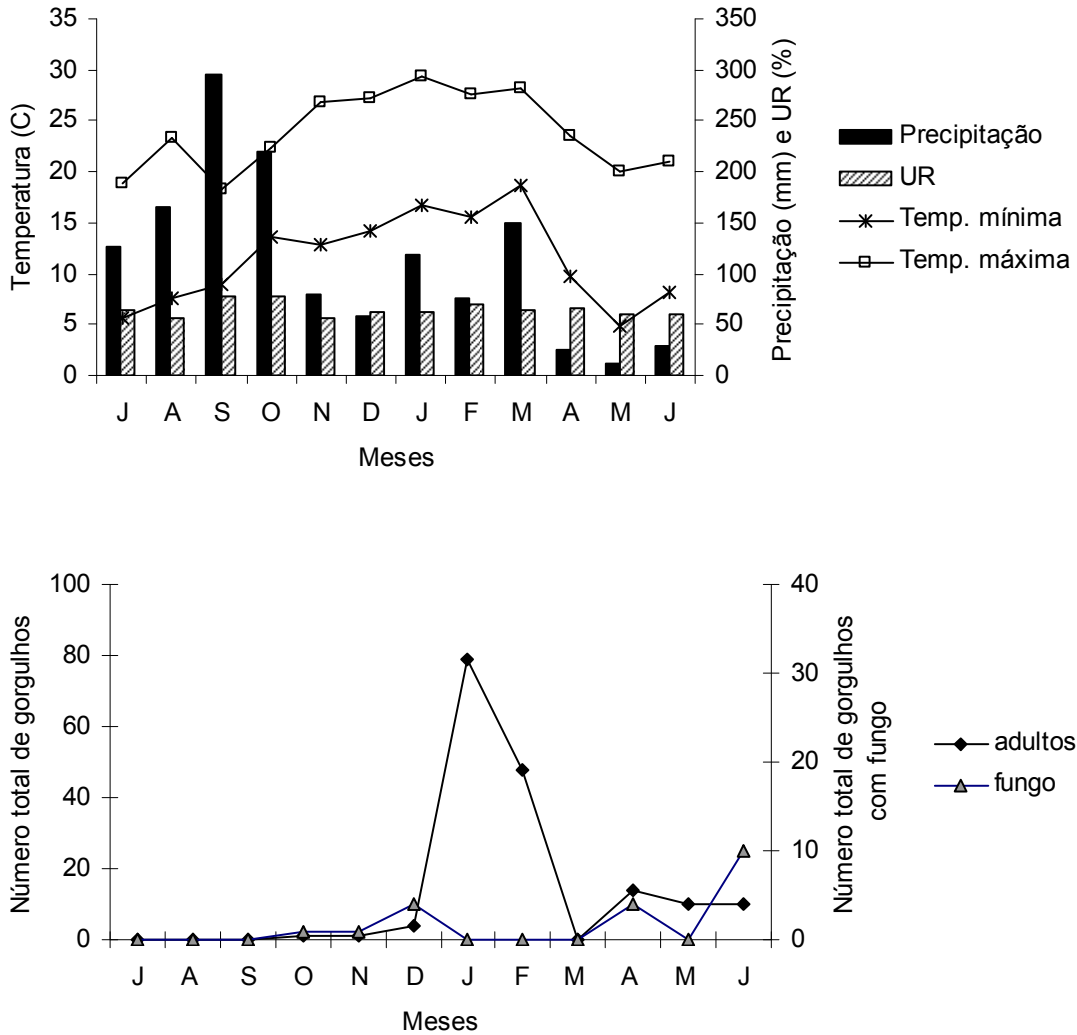


Figura 8. Ocorrência de *Beauveria bassiana* infectando adultos de *Pissodes castaneus* em Três Barras, SC, no período de julho/2005 a junho/2006 (primeiro ano).

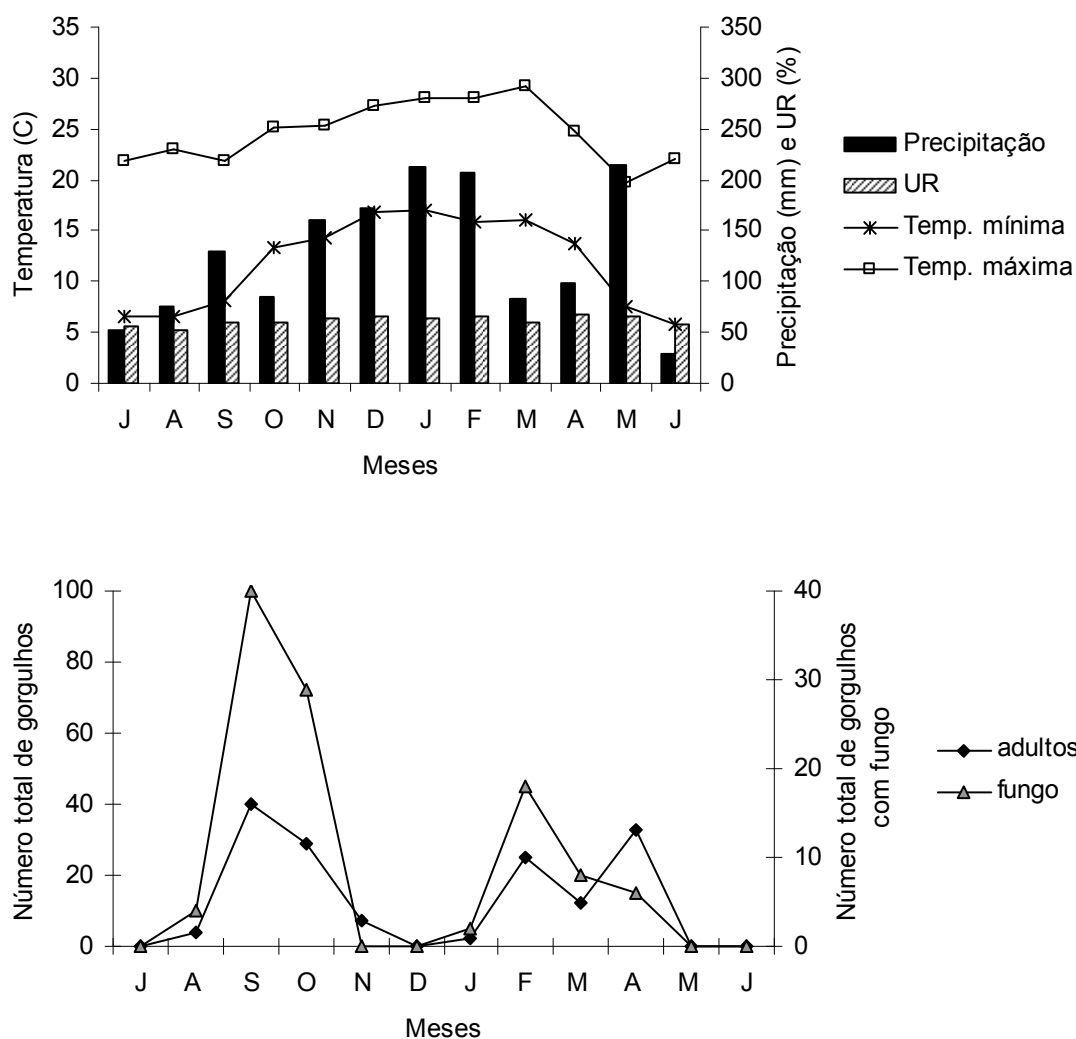


Figura 9. Ocorrência de *Beauveria bassiana* infectando adultos de *Pissodes castaneus* em Três Barras, SC, no período de julho/2006 a junho/2007 (segundo ano).

4. CONCLUSÕES

Em Cambará do Sul, as populações do inseto são mais numerosas e com um padrão de flutuação populacional bem mais definido do que em Três Barras, SC.

Em Cambará do Sul a emergência de adultos concentra-se quase que totalmente no mês de outubro, enquanto que em Três Barras ocorrem diversos picos de emergência ao longo do ano.

A instalação e retirada das armadilhas deve ocorrer entre 30 e 60 dias.

Há grande variação com relação ao mês de instalação, sendo que o melhor período é em outubro a março quando há maior ocorrência dos insetos.

Ocorrem epizootias naturais do fungo entomopatogênico *B. bassiana* em adultos de *P. castaneus*, nas duas áreas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alauzet, C. 1977. Cycle biologique de *Pissodes notatus* (Coleptera, Curculionidae) dans la region toulousaine (France). **Canadian Entomology** **109**: 597-603.
- Alauzet, C. 1990. Population dynamics of the pine pest *Pissodes notatus* F. (Col., Curculionidae). II. The role of parasitism. **Entomophaga** **35**: 119-126.
- Cisternas, M. B.; L. C. Martinez; S. H. Auter; M. E. L. Fuschlocher & C. V. Bannen. 1993. **Manual de reconocimiento de plagas forestales cuarentenárias**. Ministério de Agricultura, Servicio Agrícola y Ganadero, Santiago, Chile, 169 p.
- Cobos, C. & R. Ruiz. 1990. Problemas fitossanitários de la espécie *Pinus radiata* D. Don em Espana, com especial referencia al País Vasco. **Boletín de Sanidad Vegetal** **16**: 37-53.
- Dent, D. 1991. **Insect pest management**. Wallingford, CAB International. 604 p.
- Grez, O. R.; L. F. Fontecilla; R. A. Nunez; C. R. A. Nunez; F. G. Kirwood & G. H. Torres. 2000. **Manual de plagas cuarentenárias potencialmente daninas para o Chile com especial énfasis em plantaciones de pino y eucalipto**. Chile, Controladora de Plagas Forestales S.A., 84 p.
- Iede, E. T.; W. Reis Filho & S. R. C. Penteado. 2004. Ocorrência de *Pissodes castaneus* (De Geer) (Coleoptera, Curculionidae) em *Pinus*, na Região Sul do Brasil. **Comunicado Técnico** **114**: 6.
- Mills, N. J. 1990. Biological control of forest aphid pests in Africa. **Bulletin of Entomological Research** **80**: 31-36.
- Plata-Negrache, P.; Prendes-Ayala, C. 1979. Contribución al conocimiento de la bioecologia de *Pissodes notatus* F., en las poblaciones de pinos de Canarias. **Boletín de la Estacion Central de Ecologia** **8**: 33-47.
- Romanik, N. & D. Cadahia. **Plagas de insectos de las masas forestales españolas**. 2. ed. Madrid: Ministerio da Agricultura, Pesca e Alimentación. 1991. 252 p.

Servicio de Protección de la Naturaleza. 1999. Gorgojo perforador de los pinos, *Pissodes castaneus* De Geer. Gobierno de Aragon. Departamento de agricultura y Medio Ambiente. **Informações Técnicas.**

STATSOFT, Inc. Statistica for Windows (Computer Program Manual). StatSoft, Inc., Tulsa. 1999. Disponível em: <<http://statsoft.com>>. Acesso em: 15 de março de 2009.

Trudel, R.; R. Lavalley; C. Guertin; C. Cote; S. I. Todorova; R. Alfaro & H. Kope. 2007. Potencial of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) for controlling the white pine weevil, *Pissodes strobi* (Col., Curculionidae). **Journal of Applied Entomology 131**: 90-97.

Zonta, E.P. & A. A. Machado. 1987. SANEST – Sistema de análise estatística para microcomputadores. Pelotas, DMEC/IFM/UFPel, 138 p.

Capítulo V

Eficiência de diferentes isolados de fungos entomopatogênicos no controle de *Pissodes castaneus*

EFICIÊNCIA DE DIFERENTES ISOLADOS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE DE *Pissodes castaneus*

RESUMO

Os fungos entomopatogênicos têm se destacado no controle de pragas em diversas culturas, especialmente de espécies florestais. O objetivo deste trabalho foi selecionar isolados de fungos entomopatogênicos provenientes de diferentes hospedeiros e regiões geográficas, patogênicos ao gorgulho-da-casca-do-pinus, *Pissodes castaneus*. Foram avaliados sete isolados para virulência a adultos em condições de laboratório. A mortalidade dos adultos infectados de *P. castaneus* variou de 10% a pouco mais de 76%, e teve início no 5º dia após a inoculação das suspensões fúngicas, com TL_{50} entre 9,2 e 33 dias. Os isolados mais virulentos foram os de Três Barras, SC (BTB) e de Cambará do Sul, RS (BCS), provenientes de *P. castaneus* infectados, com mortalidades de 73,3% e 76,7%, respectivamente. Estes resultados sugerem que existem inóculos virulentos de *B. bassiana* no solo com potencial para o uso no controle biológico de *P. castaneus* em plantios de *Pinus* spp.

**EFFECTIVENESS OF ISOLATES OF ENTOMOPATOGENIC FUNGUS FOR
THE CONTROL OF *Pissodes castaneus***

ABSTRACT

Many entomopathogenic fungi have been used to control several insect pests in different crops and are especially useful in forest areas. The objective of this study was to survey and test fungus isolates from different hosts and areas that show virulence to the banded pine weevil, *Pissodes castaneus*. Seven isolates were evaluated for virulence to adults under laboratory conditions. The weevil mortality, ranging from 10% to 76%, started at 5 days after inoculation and the LT₅₀'s were between 9.2 and 33 days. The most virulent isolates were those from Três Barras, SC (BTB) and Cambará do Sul, RS (BCS), obtained from infected *P. castaneus*, which caused mortality of 73,3% and 76,7%, respectively. Detection of *B. bassiana* isolates in forest areas suggests that there are virulent inoculums of *B. bassiana* in the soil that can be tested as potential control agent of *P. castaneus* in areas of cultivation of *Pinus*.

1. INTRODUÇÃO

Vários microorganismos entomopatogênicos se destacam no controle de insetos-praga, especialmente os fungos, que podem infectar e matar insetos de diferentes ordens (Alves 1998; McCoy & Tigano-Milani 1992). Os fungos que ocorrem naturalmente infectando os insetos são *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Nomureae rileyi* (Farlow) Samson, *Lecanicillium* (Zimm.) Viègas e *Paecilomyces* (= *Isaria* sp.) Samson (Alves 1998; Shah & Pell 2003).

Estas espécies de fungos possuem grande potencial como agente de controle microbiano, sendo comumente encontrados infectando insetos de importância agrícola, como cupins (Almeida *et al.* 1998), coleópteros (Furlong & Groden 2003), hemípteros (Sosa-Gómez *et al.* 1997), blatódeos (Pachamuchu & Kamble 2000) e pragas de florestas (Leite *et al.* 2000; 2005). Entre as pragas de importância florestal, destaca-se, *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera, Cerambycidae), com duas espécies de fungos entomopatogênicos, *B. bassiana* e *Paecilomyces* sp. obtidos do próprio inseto (Leite *et al.* 2003) e *Cinara atlantica* (Wilson, 1919) (Hemiptera, Aphididae), com isolados de *Lecanicillium lecanii*, também isolados do próprio inseto. Para o gênero *Pissodes*, há relatos da ocorrência e testes de infectividade de *B. bassiana* (Trudel *et al.* 2007) e *Lecanicillium* spp. (Kope *et al.* 2008) em *Pissodes strobi* (Peck, 1817), importante praga de *Pinus* spp. na América do Norte.

Existe um relato de ocorrência de *B. bassiana* em *P. notatus*, na sua região de origem, Espanha (Vago 1966). No Brasil, o fungo *B. bassiana* tem causado epizootias naturais no gorgulho-da-casca-do-pinus nas regiões onde a praga ocorre (dados não publicados). Segundo Alves (1998) e Sousa (1999), a ocorrência natural de fungo é fator determinante na regulação populacional de insetos praga. Sendo assim, a utilização de *B. bassiana* pode representar uma alternativa viável para o controle de *P. castaneus*.

As informações sobre a ação de fungos entomopatogênicos sobre *P. castaneus* ainda são inexistentes na América do Sul, principalmente em áreas onde o inseto foi recentemente introduzido, como é o caso do Brasil. Alguns fungos possuem mecanismos de infecção especializados que podem infectar diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros, inclusive os estágios em que estes não se alimentam, como ovos e pupas (Alves & Lecuona 1998). Os fungos podem penetrar no corpo dos insetos pela ingestão de esporos e também pelos espiráculos e através de membranas

inter-segmentares do exoesqueleto, o que conduz à possibilidade da infecção dos insetos independente de sua atividade alimentar (Hajek & Leger 1994).

Desta forma, este estudo visa a obtenção de informações preliminares para fundamentar os estudos envolvendo o uso desses agentes para o controle biológico do gorgulho-da-casca-do-pinus. O objetivo, portanto, foi selecionar isolados de fungos entomopatogênicos provenientes de diferentes hospedeiros e regiões geográficas, que sejam virulentos ao gorgulho-da-casca-do-pinus e determinar o TL_{50} destes isolados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Entomologia da Embrapa Florestas, Colombo, PR, sob condições controladas de temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa ($70 \pm 10\%$) e fotofase de 12 horas.

Os insetos foram capturados com toretes-armadilha instalados em um plantio de *Pinus taeda* L. em Cambará do Sul, RS, trazidos para o laboratório e colocados em gaiolas, onde foram mantidos até a emergência dos adultos. Quando recém-emergidos, 240 adultos do gorgulho foram selecionados e colocados, dois a dois em cada recipiente plástico transparente de 300 mL com tampa furada, contendo ramos de pinus recém-cortados, e mantidos em sala climatizada até o início dos bioensaios.

Isolados de fungos entomopatogênicos, provenientes de micotecas de diversas instituições (Tabela 1) e duas linhagens de *B. bassiana* isoladas da própria praga-alvo, foram multiplicados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar), e incubados por aproximadamente 15 dias. Foram testados sete isolados de fungos entomopatogênicos que constituíram os tratamentos; a testemunha constou da aplicação de água destilada acrescida de espalhante adesivo (Tween).

As suspensões fúngicas foram preparadas com água destilada, na concentração de $7,0 \times 10^7$ conídios/mL. Cada repetição constou de 30 insetos adultos, com idade média de sete dias, sendo que cada inseto foi submerso na suspensão fúngica por 3 segundos. Após a secagem sobre papel filtro, os insetos foram transferidos para os recipientes de plástico contendo um ramo de pinus (10 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro), que eram trocados diariamente até o término das observações. Para confirmação da patogenicidade do isolado, os insetos mortos foram imersos em uma solução de hipoclorito de sódio 2%, por 3 segundos, e depois em água destilada, e

mantidos em câmara úmida. O percentual de mortalidade dos insetos foi avaliado diariamente durante 50 dias após a aplicação dos patógenos.

Tabela 1. Identificação do isolado, hospedeiro, local de origem e instituição mantenedora dos fungos entomopatogênicos avaliados quanto à virulência a *Pissodes castaneus*.

Código	Espécie de fungo	Hospedeiro	Origem	Instituição
BCS	<i>Beauveria. bassiana</i>	<i>Pissodes castaneus</i> (Coleoptera, Curculionidae)	Cambará do Sul, RS	Embrapa-Florestas
BTB	<i>Beauveria. bassiana</i>	<i>Pissodes castaneus</i> (Coleoptera, Curculionidae)	Três Barras, SC	Embrapa-Florestas
CG716	<i>Beauveria. bassiana</i>	<i>Hedypathes betulinus</i> (Coleoptera, Cerambycidae)	Ivaí, PR	Embrapa- Cenargen
CG544	<i>Beauveria. bassiana</i>	<i>Rhinostomus barbirostris</i> (Coleoptera, Curculionidae)	-	Embrapa-Cenargen
VLJ	<i>Lecanicillium</i> sp.	<i>Cinara atlantica</i> (Hemiptera, Aphididae)	Jacupiranga, SP	Embrapa-Florestas
VLA	<i>Lecanicillium</i> sp.	<i>Cinara atlantica</i> (Hemiptera, Aphididae)	Arapoti, PR	Embrapa-Florestas
CG815	<i>Paecilomyces</i> spp. (= <i>Isaria</i> sp.)	<i>Hedypathes betulinus</i> (Coleoptera, Cerambycidae)	Ivaí-PR	Embrapa-Cenargen

Os dados de porcentagem de mortalidade dos insetos foram utilizados para o cálculo do TL₅₀ (tempo para morte de 50% dos adultos do gorgulho); os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias das porcentagens comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados mais virulentos para o gorgulho-da-casca-do-pinus foram, em ordem decrescente: BCS, BTB e CG716 (Tabela 2), sendo que os dois primeiros foram obtidos de adultos infectados do próprio *P. castaneus* do campo em Cambará do Sul e Três Barras (Tabela 1). Este fato representa um claro indício da presença de inóculos de *B. bassiana* em áreas onde este gorgulho tem provocado dano econômico. Este registro confirma a necessidade de explorar a variabilidade natural e selecionar isolados virulentos dos fungos entomopatogênicos oriundos de gorgulhos e de insetos não-alvos infectados em áreas de plantios de *Pinus* spp. onde os danos do gorgulho são reduzidos. Hajek *et al.* (1990) relatam que o patógeno *Entomophaga maimaiga*, fungo isolado do hospedeiro *Lymantria dispar* (Linnaeus, 1759) (Lepidoptera, Lymantriidae) no Japão, e

introduzido nos EUA em 1910, causou grande epizootia localizada em 1989, porém, no ano seguinte a epizootia aumentou, sendo registrada em pelo menos 10 estados americanos, infectando diversas espécies de insetos-praga.

Por outro lado, os isolados menos virulentos foram, em ordem decrescente: CG544, VLJ, CG815 e VLA. Os valores do TL₅₀ indicaram tendência de redução à medida que aumentava a porcentagem de mortalidade dos adultos de *P. castaneus*.

Tabela 2. Patogenicidade de isolados de fungos entomopatogênicos em relação à mortalidade e TL₅₀ (tempo letal de 50% de insetos) de *Pissodes castaneus*, na concentração de 7,0 x 10⁷ conídios/mL.

Isolado	Mortalidade ⁽¹⁾ ± EP (%)	TL ₅₀ (dias)	χ^2	
			Calculado	P<0,05
BCS	76,7 ± 3,33 a	12,3	10,8	0,0019
BTB	73,3 ± 14,53 a	9,2	8,5	0,0062
CG716	40,0 ± 5,77 ab	14,6	1,2	0,3613
CG544	23,3 ± 3,33 b	33,0	8,5	0,0062
VLJ	16,7 ± 3,33 b	19,8	13,3	0,0005
CG815	16,7 ± 16,67 b	19,2	13,3	0,0005
VLA	10,0 ± 5,77 b	21,6	19,2	0,0000
Controle	3,3 ± 3,33 b	27,0	26,3	0,0000

(1) Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O início da mortalidade dos insetos, nos isolados estudados, ocorreu a partir do 5º dia após a inoculação do fungo, com variação de 5 a 21 dias entre os isolados (Figura 2). As maiores porcentagens de mortalidade ocorreram entre o 5º e o 15º dia, com aproximadamente 61% das mortes por fungo. O resultado obtido por Trudel *et al.* (2007) mostraram que até a terceira semana após a inoculação do fungo já havia ocorrido 73% e 85% de mortalidade para os dois isolados de *B. bassiana* mais virulentos para *P. strobi*. Wright & Chandler (1991) atribuem essas variações às diferenças entre os isolados utilizados, bem como ao método de exposição das suspensões fúngicas em cada experimento. Trudel *et al.* (2007) aplicaram o fungo no ramo e neste trabalho aplicou-se o fungo diretamente no inseto.

Dos quatro insetos mortos no controle, apenas um inseto apresentou as estruturas de fungos entomopatogênicos. Foi observado que a extrusão do fungo no inseto inicia-se

nas articulações do fêmur e da tíbia, membrana cervical e suturas cranianas, recobrando posteriormente todo o corpo do hospedeiro. Esta constatação está de acordo com os registros de Wright & Chandler (1991) e Leite *et al.* (2005).



Figura 1. Adulto de *Pissodes castaneus* infectado pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*.

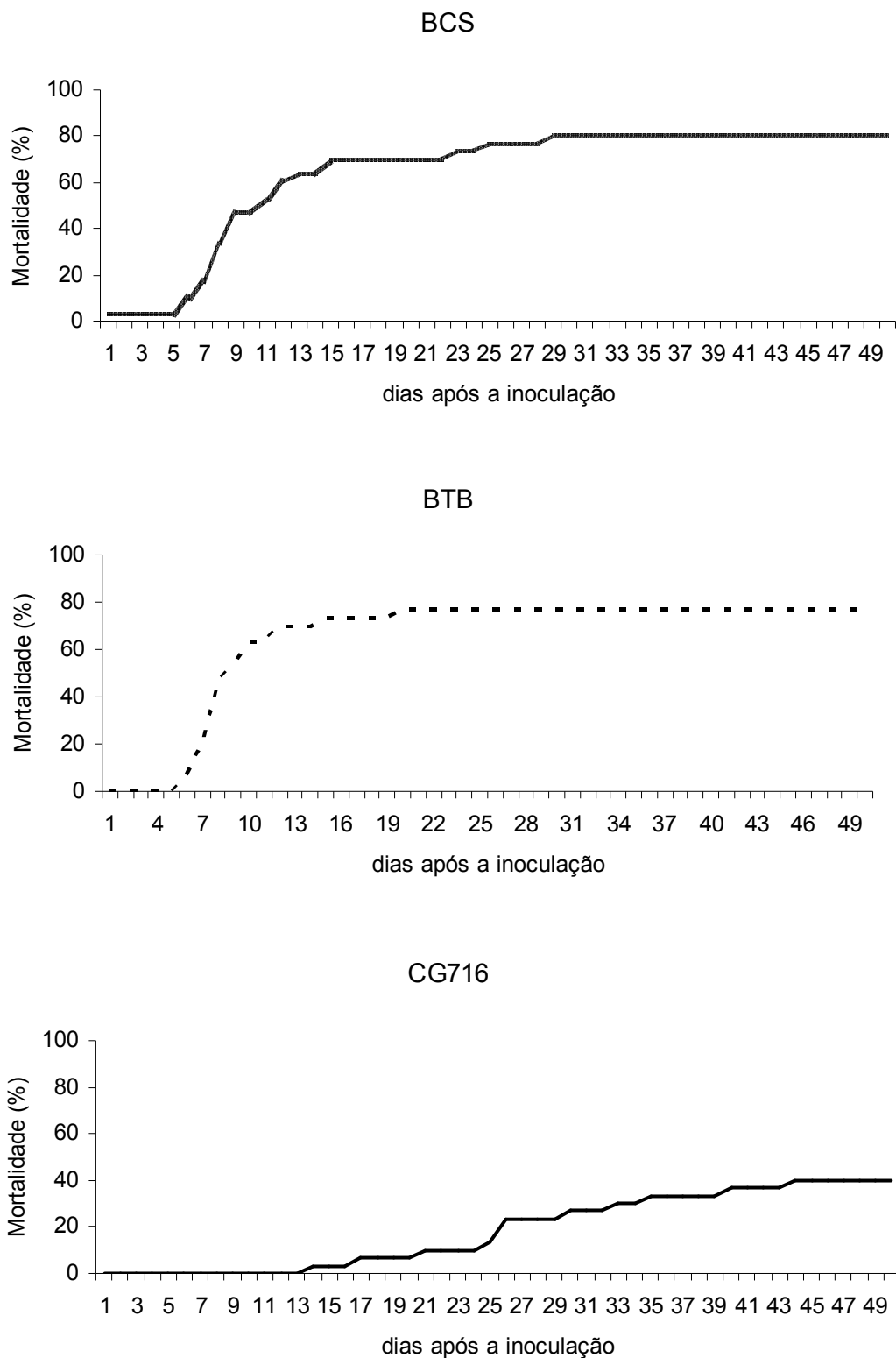


Figura 2. Mortalidade (%) de *Pissodes castaneus* no período de avaliação dos bioensaios pelos isolados de *Beauveria bassiana*: BCS, BTB e CG716.

4. CONCLUSÕES

Os isolados BCS e BTB de *B. bassiana*, isoladas de adultos do próprio inseto coletados em Cambará do Sul e Três Barras apresentam virulência satisfatória e o menor TL₅₀ para o controle de *P. castaneus* na concentração de $7,0 \times 10^7$ conídios/mL.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, J. E. M.; S. B. Alves; A. E. Moino Jr & R. B. Lopes. 1998. Controle do cupim subterrâneo *Heterotermes tenuis* (Hagen) com iscas Termitrap impregnadas com inseticidas e associadas ao fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Anais Da Sociedade Entomológica do Brasil** 27: 639-644.
- Alves, S. B. 1998. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba, SP, FEALQ, 1163p.
- Alves, S. B. & R. E. Lecuona. 1998. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano, p. 97-170. In: S. B. Alves. **Controle microbiano de insetos**. 2ª ed. Piracicaba, SP: FEALQ, 1163 p.
- Furlong, M. J. & E. Groden. 2003. Evaluation of synergistic interactions between the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) pathogen *Beauveria bassiana* and the insecticides, Imidacloprid, and Cyromazine. **Journal of Economic Entomology** 94: 344-356.
- Hajek, A. E.; J. S. Elkinton; B. May; S. R. A. Walsh & L. C. Silver. 1990. Allozyme and restriction fragment length polymorphism analyses confirm *Entomophaga maimaiga* responsible for 1989 epizootics in North American gypsy moth populations. **National Academy of Sciences of the United States of America Proceedings**, Washington, 87: 6979-6982.
- Hajek, A. E. & R. J. S. Leger. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. **Annual Review of Entomology** 39: 293-322.
- Kope, H. H.; R. I. Alfaro & R. Lavallée. 2008. Effects of temperatura and water activity on *Lecanicillium* spp. conidia germination and growth, and mycosis of *Pissodes strobi*. **Biocontrol** 53: 489-500.
- Leite, M. S. P.; C. M. S. Soares; E. T. Iede; S. R. C. Penteado & C. Castellano. 2000. Seleção de linhagens de fungos entomopatogênicos para o controle de *Hedypathes*

- betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae) em laboratório e eficiência da linhagem selecionada em campo. *In: II Congresso Sul-Americano da Erva-Mate e III Reunião Técnica da Erva-mate*. Encantado, Ed. dos Organizadores, p. 314- 317.
- Leite, M. S. P.; S. R. C. Penteadó; S. R. M. Zaleski; J. M. M. Camargo & R. D. Ribeiro. 2005. Seleção de isolados de *Verticillium lecanii* Viégas para o controle de *Cinara atlantica* (Hemiptera, Aphididae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **40**: 1141-1144.
- McCoy, C. W. & M. S. Tigano-Milani. 1992. Use of entomopathogenic fungi in biological control: a world view. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **27**: 87-93.
- Pachamuthu, P. & S. T. Kamble. 2000. In vitro study on combined toxicity of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) strain ESC-1 with sublethal doses of chlorpyrifos, propetamphos and cyfluthrin against german cochroach (Dictyoptera: Blattellidae). **Journal of Economic Entomology** **93**: 60-70.
- Sousa, N. J. 1999. Aspectos biológicos, ecológicos de microorganismos. *In: Memórias seminário: Possibilidades del control biológico en plantaciones forestales de Colômbia – Programa de proteccion forestal*. CONIF – MINAMBIENTE – BIRIF, Santafé de Bogotá, Colômbia.
- Sosa-Gómez, D. R.; D. G. Boucias & J. L. Nation. 1997. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. **Journal of Invertebrate Pathology** **69**: 31-39.
- Shah, P. A. & J. K. Pell. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied Microbiology and Biotechnology** **61**: 413-423.
- Trudel, R.; R. Lavalley; C. Guertin; C. Cote; S. I. Todorova; R. Alfaro & H. Kope. 2007. Potencial of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) for controlling the white pine weevil, *Pissodes strobi* (Col., Curculionidae). **Journal of Applied Entomology** **131**: 90-97.
- Vago, C. 1966. I. Collection de microorganismos associés aux invertébrés de la station de recherches cytopathologiques de Saint-Christol. **Entomophaga** **11**: 153-156.
- Wright, J. E. & L. D. Chandler. 1991. Laboratory evaluation of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* against the boll weevil (Curculionidae, Coleoptera). **Journal of Invertebrate Pathology** **58**: 448-449.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos sobre o gorgulho-da-casca-do-pinus, *Pissodes castaneus* (De Geer, 1775) (Coleoptera, Curculionidae), desenvolvidos nesta tese, representam uma contribuição importante para o conhecimento desta espécie, tanto sob os aspectos da biologia e comportamento, quanto os das populações e manejo de pragas.

Os danos causados pelos adultos e, principalmente, pelas larvas de *P. castaneus* são expressivos e podem levar à morte da árvore, requerendo a adoção de medidas preventivas, particularmente quanto ao monitoramento e manejo adequado dos plantios de *Pinus*. É importante considerar a seleção dos sítios de plantio mais adequados, uma vez que plantas estressadas por seca ou inundação favorecem a infestação pelo inseto.

No caso de pragas florestais, deve ser dada uma atenção especial aos métodos biológicos e silviculturais de controle, devido à possibilidade de ocorrência de resistência do inseto a inseticidas, ao risco ambiental e ao elevado custo do controle químico, por serem áreas extensas e contínuas, além de ser uma medida geralmente incompatível com o controle biológico. Entretanto, podem ser feitas aplicações com inseticidas para a redução dos adultos do gorgulho em talhões com plantas jovens se os níveis populacionais estiverem muito altos ou se for uma área com valor econômico agregado, como os pomares de sementes, por serem plantas com enxertia que requerem um rigoroso controle de pragas.

Com relação ao controle biológico, na prospecção de patógenos foram detectadas epizootias naturais de *Beauveria bassiana* em áreas onde *P. castaneus* está presente. As linhagens BCS e BTB de *B. bassiana*, isoladas de adultos do próprio inseto, em Cambará do Sul e Três Barras, apresentaram virulência satisfatória para o controle do gorgulho. Contudo, um maior número de isolados precisam ser testados e outros bioensaios realizados para selecionar isolados mais virulentos, além de definir as melhores formulações e metodologias de aplicação.

Para a supressão das populações de *P. castaneus*, o ideal é a adoção de um programa de Manejo Integrado de Pragas (MIP), incluindo o monitoramento com toretes-armadilha, associados ou não com semioquímicos, e a combinação de diversas medidas de controle. Uma estratégia envolvendo semioquímicos é a utilização de uma armadilha atrai-mata, onde se utilizaria um torete-armadilha que funcionaria como um cairomônio juntamente com o feromônio específico e a utilização de bioinseticidas a base de fungos entomopatogênicos. Desta forma, o inseto é atraído para o torete-armadilha, pela ação do feromônio sexual e ao caminhar sobre o torete-armadilha se

contaminaria com o fungo, que além de poder levar o inseto à morte, este também poderá disseminar os esporos de fungo e contaminar outros insetos.

Para a obtenção de um feromônio sexual sintético de um determinado inseto são necessárias várias etapas, sendo que no presente trabalho foi possível isolar, identificar e realizar os testes comportamentais com *P. castaneus*, mas não foi feita a síntese. Foi possível verificar que a comunicação entre os co-específicos é mediada por feromônio sexual, produzido pelos machos, atraindo somente fêmeas. Foram detectados dois compostos nos extratos dos machos, o grandisal e o grandisol, sendo identificada e determinada a sua estereoquímica. O potencial deste feromônio é evidente, mas existe necessidade de futuros estudos para investigar o seu uso no monitoramento e controle.

Em uma próxima etapa dos estudos sobre ecologia química de *P. castaneus*, pretende-se determinar a atividade e a proporção dos compostos quirais e racêmicos, determinar a dose de feromônio a ser utilizada no liberador, determinar o tipo de armadilha para captura dos insetos, testando altura, cor, formato e tamanho, determinar o número de armadilhas por área, isolar e determinar a estrutura dos possíveis cairomônios e verificar a eficiência de armadilhas contendo os semioquímicos para o monitoramento e controle populacional deste gorgulho.

No Brasil, não há registros de parasitóides e predadores, mas há relato da ocorrência de nematóides no RS e também na literatura, para outros países. Mas, a implementação de um programa de controle biológico clássico com a introdução de agentes de parasitóides ou predadores da região de origem, não tem sido considerado até o momento, mas poderia ser uma opção no caso de haver intensificação do ataque.

A utilização de marcadores PCR-AFLP é uma técnica robusta e confiável para estudos populacionais. Os resultados obtidos nesta tese fornecem informações básicas sobre a estrutura genética das populações de *P. castaneus*, como sua heterogeneidade, baixo fluxo gênico e outros indicativos de variabilidade genética. Com base nesses resultados pode-se inferir que os insetos podem responder de forma diferenciada a diferentes condições abióticas e também a estratégias de manejo, requerendo um planejamento mais rigoroso de controle. Sugere-se que um número maior de populações e outros marcadores moleculares sejam avaliados para novas inferências e para complementar as informações apresentadas.

Fatores como a distribuição geográfica de *P. castaneus* relacionada com as regiões bioclimáticas e edáficas, além de estresses resultantes do cultivo ou do sítio de plantio que podem estar relacionados com a maior incidência do gorgulho-da-casca-do-

pinus e a intensidade do ataque, são temas que precisam ser investigados em estudos futuros.

Os diversos aspectos biológicos, genéticos e ecológicos que foram esclarecidos neste estudo para *P. castaneus* servem de base para decisões de manejo integrado do inseto, particularmente quanto ao monitoramento e subsídios para o controle biológico.

ANEXOS

ANEXO 1. Identidade genética (acima da diagonal) e distância genética de Nei (abaixo da diagonal), para as amostras das populações de *Pissodes castaneus* de 20 localidades, determinadas por PCR-AFLP. Código das localidades de acordo com a Tabela 1.

Amostras	IT-1	IT-2	IT-3	CS-1	CS-2	CS-3	UV-1	UV-2	BT	QT	CT	CA	TB-1	TB-2	TB-3	TB-4	TB-5	MV-1	MV-2	IR
1	xxxxx	0,6989	0,6903	0,6676	0,7131	0,6676	0,6932	0,7301	0,6761	0,7301	0,6932	0,7330	0,6733	0,6790	0,6903	0,6932	0,7102	0,6761	0,6648	0,6761
2	0,3583	xxxxx	0,7926	0,7756	0,7813	0,7642	0,8182	0,7926	0,7557	0,7813	0,7727	0,8068	0,7756	0,7585	0,8097	0,8011	0,7557	0,8068	0,7784	0,6818
3	0,3706	0,2324	xxxxx	0,7557	0,7670	0,7727	0,8040	0,8580	0,7528	0,7841	0,7983	0,8381	0,8239	0,8068	0,8182	0,8210	0,7983	0,8381	0,7813	0,7244
4	0,4040	0,2542	0,2801	xxxxx	0,7841	0,8182	0,8324	0,7784	0,8040	0,7898	0,7869	0,7983	0,7898	0,7727	0,8068	0,7813	0,7415	0,8097	0,7869	0,6392
5	0,3382	0,2469	0,2652	0,2432	xxxxx	0,8068	0,8267	0,8068	0,7869	0,8068	0,7869	0,8097	0,8125	0,7898	0,8068	0,7983	0,7813	0,7813	0,7926	0,6847
6	0,4040	0,2689	0,2578	0,2007	0,2147	xxxxx	0,8665	0,8068	0,8494	0,7898	0,8153	0,8324	0,8295	0,7841	0,8580	0,8097	0,7813	0,8210	0,8210	0,6619
7	0,3665	0,2007	0,2182	0,1835	0,1903	0,1433	xxxxx	0,8267	0,8239	0,8210	0,8125	0,8295	0,8324	0,8097	0,8608	0,8239	0,7727	0,8580	0,8295	0,6761
8	0,3146	0,2324	0,1532	0,2505	0,2147	0,2147	0,1903	xxxxx	0,7926	0,8239	0,8040	0,8778	0,8636	0,8352	0,8352	0,8210	0,8438	0,8324	0,7926	0,7472
9	0,3914	0,2801	0,2839	0,2182	0,2396	0,1632	0,1938	0,2324	xxxxx	0,7813	0,7841	0,8011	0,8153	0,7699	0,8040	0,7784	0,7670	0,7955	0,7955	0,6477
10	0,3146	0,2469	0,2432	0,2360	0,2147	0,2360	0,1972	0,1938	0,2469	xxxxx	0,7926	0,8324	0,8011	0,7727	0,7841	0,7869	0,7926	0,8153	0,7699	0,6903
11	0,3665	0,2578	0,2253	0,2396	0,2396	0,2041	0,2076	0,2182	0,2432	0,2324	xxxxx	0,8239	0,8153	0,7642	0,8040	0,8182	0,7841	0,8182	0,8352	0,6875
12	0,3107	0,2147	0,1767	0,2253	0,2111	0,1835	0,1869	0,1303	0,2217	0,1835	0,1938	xxxxx	0,8551	0,8324	0,8438	0,8295	0,8466	0,8182	0,8125	0,7500
13	0,3956	0,2542	0,1938	0,2360	0,2076	0,1869	0,1835	0,1466	0,2041	0,2217	0,2041	0,1565	xxxxx	0,8295	0,8466	0,8267	0,8267	0,8438	0,8267	0,7131
14	0,3872	0,2764	0,2147	0,2578	0,2360	0,2432	0,2111	0,1801	0,2615	0,2578	0,2689	0,1835	0,1869	xxxxx	0,7955	0,7869	0,7926	0,8040	0,7699	0,6790
15	0,3706	0,2111	0,2007	0,2147	0,2147	0,1532	0,1499	0,1801	0,2182	0,2432	0,2182	0,1699	0,1665	0,2288	xxxxx	0,8097	0,7983	0,8381	0,8551	0,7074
16	0,3665	0,2217	0,1972	0,2469	0,2253	0,2111	0,1938	0,1972	0,2505	0,2396	0,2007	0,1869	0,1903	0,2396	0,2111	xxxxx	0,7841	0,8182	0,8125	0,7273
17	0,3422	0,2801	0,2253	0,2991	0,2469	0,2469	0,2578	0,1699	0,2652	0,2324	0,2432	0,1665	0,1903	0,2324	0,2253	0,2432	xxxxx	0,7841	0,7841	0,7216
18	0,3914	0,2147	0,1767	0,2111	0,2469	0,1972	0,1532	0,1835	0,2288	0,2041	0,2007	0,2007	0,1699	0,2182	0,1767	0,2007	0,2432	xxxxx	0,8239	0,6932
19	0,4083	0,2505	0,2469	0,2396	0,2324	0,1972	0,1869	0,2324	0,2288	0,2615	0,1801	0,2007	0,1903	0,2615	0,1565	0,2076	0,2432	0,1938	xxxxx	0,6648
20	0,3914	0,3830	0,3224	0,4475	0,3788	0,4126	0,3914	0,2915	0,4343	0,3706	0,3747	0,2877	0,3382	0,3872	0,3462	0,3185	0,3263	0,3665	0,4083	xxxxx

ANEXO 2. Períodos (meses) de instalação de toretes-armadilha com as maiores capturas (número médio) de adultos de *Pissodes castaneus* em plantio de *Pinus taeda* em Cambará do Sul, RS (CS) e Três Barras, SC (TB), no período de julho/2005 a junho/2006.

Local					
TB + CS (n=18)		TB (n=9)		CS (n=9)	
Período (meses)	n° de insetos	Período (meses)	n° de insetos	Período (meses)	n° de insetos
Março	195,21a	Março	135,51a	Janeiro	274,31a
Novembro	193,00a	Novembro	132,13a	Março	265,75a
Janeiro	177,06a	Fevereiro	113,55ab	Novembro	265,33a
Outubro	174,97a	Dezembro	112,09ab	Outubro	265,08a
Fevereiro	163,27a	Outubro	103,46ab	Fevereiro	221,95ab
Dezembro	156,26a	Janeiro	100,96ab	Dezembro	207,71abc
Junho	94,93b	Abril	92,27ab	Agosto	147,02bcd
Setembro	94,68b	Maiο	79,81ab	Julho	142,42bcd
Agosto	76,17bc	Setembro	76,95ab	Junho	135,92cd
Maiο	75,36bc	Junho	61,24bc	Setembro	114,25de
Julho	51,46c	Agosto	28,30c	Maiο	71,04e
Abril	45,61c	Julho	5,56d	Abril	15,09f

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si ao nível de 5%.