

PRISCILA STRAPASSON

PERCEPÇÃO QUÍMICA DE *Grapholita molesta* (BUSCK) (LEPIDOPTERA:
TORTRICIDAE) A SUBSTÂNCIAS ALIMENTARES E VOLÁTEIS DE MAÇÃ:
RESPOSTA QUIMIOTÁXICA, ELETROFISIOLÓGICA E MONITORAMENTO EM
POMARES DE MACIEIRA COM CONFUSÃO SEXUAL

CURITIBA
2012

PRISCILA STRAPASSON

PERCEPÇÃO QUÍMICA DE *Grapholita molesta* (BUSCK) (LEPIDOPTERA:
TORTRICIDAE) A SUBSTÂNCIAS ALIMENTARES E VOLÁTEIS DE MAÇÃ:
RESPOSTA QUIMIOTÁXICA, ELETROFISIOLÓGICA E MONITORAMENTO EM
POMARES DE MACIEIRA COM CONFUSÃO SEXUAL

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Lino Bittencourt Monteiro

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Gorgatti Zarbin

CURITIBA
2012

DEDICO

*Aos meus pais, Augusto e Lourdes, pelo amor e apoio incondicional.
Ao meu marido, Diego, parceiro no amor e na vida.*

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”.
(Chico Xavier)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e força nos momentos de dificuldade.

A Universidade Federal do Paraná e ao curso de Pós-graduação de Entomologia, pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Lino B. Monteiro, pela oportunidade concedida.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Paulo H. G. Zarbin, pela colaboração e por ceder a estrutura do seu laboratório para a realização dos experimentos.

Aos meus pais pelo carinho e dedicação.

Aos meus irmãos, Peter e Paola, pela amizade e incentivo.

Ao meu marido Diego pelo amor e companheirismo.

Aos colegas dos laboratórios de Manejo Integrado de Pragas e Semioquímicos, por toda a ajuda nos experimentos, criação de insetos e pelos inúmeros momentos de alegria.

Às minhas amigas Adelita, Camila, Franciele e Mariane pelo incentivo e ajuda, das atividades acadêmicas aos desabafos da vida.

Ao pesquisador e amigo Wilson Reis Filho, por ser exemplo e inspiração para minha formação profissional.

Ao Eder D. B. Silva, pela ajuda com as análises estatísticas.

À Ana Cristina Pellegrino, pela ajuda com os *abstracts*.

Às empresas Pomalapa e Boutin, em especial aos monitores Neraldo e Rodrigo, e ao supervisor, Sr. Evaldo, pela cessão das áreas de estudo e frutos para a coleta de voláteis e por toda a ajuda na avaliação dos experimentos.

Desde já peço desculpas pelo esquecimento, pois muitas foram as pessoas que me ajudaram a chegar até aqui. A vocês, todo o meu carinho e agradecimento!!!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13

CAPÍTULO I: MONITORAMENTO DE MARIPOSA-ORIENTAL (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) COM ATRATIVOS ALIMENTARES EM POMARES DE MACIEIRA COM E SEM CONFUSÃO SEXUAL, NO PERÍODO DE ENTRESSAFRA.....16

RESUMO.....	17
ABSTRACT.....	18
INTRODUÇÃO.....	18
MATERIAL E MÉTODOS.....	19
RESULTADOS.....	21
DISCUSSÃO.....	22
REFERÊNCIAS.....	23

CAPÍTULO II: RESPOSTAS ELETROFISIOLÓGICAS E COMPORTAMENTAIS DE MARIPOSA-ORIENTAL (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) AOS VOLÁTEIS DE MAÇÃ ‘GALA’ E ‘EVA’ EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO.....30

RESUMO.....	31
ABSTRACT.....	32
INTRODUÇÃO.....	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
RESULTADOS.....	36
DISCUSSÃO.....	38
REFERÊNCIAS.....	40

CAPÍTULO III: EFEITO DE VOLÁTEIS DE MAÇÃ E FEROMÔNIO SEXUAL SINTÉTICO NA ATRAÇÃO DE MACHOS DE MARIPOSA-ORIENTAL.....50

RESUMO.....	51
ABSTRACT.....	51
INTRODUÇÃO.....	52
MATERIAL E MÉTODOS.....	53
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
REFERÊNCIAS.....	55

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.1 - CONTRASTE ENTRE MÉDIAS DE CAPTURA DE *Grapholita molesta* COM ATRATIVOS ALIMENTARES E FEROMÔNIO EM ÁREAS COM E SEM CONFUSÃO SEXUAL EM POMAR DE MACIEIRA “GALA”.....27
- TABELA 1.2 - CONTRASTE ENTRE MÉDIAS DE CAPTURA DE *Grapholita molesta* COM ATRATIVOS ALIMENTARES E FEROMÔNIO EM ÁREAS COM E SEM CONFUSÃO SEXUAL EM POMAR DE MACIEIRA “GALA”27
- TABELA 1.3 - SOMATÓRIO DE ADULTOS DE *Grapholita molesta* CAPTURADOS COM ATRATIVOS ALIMENTARES E FEROMÔNIO EM ÁREAS COM E SEM CONFUSÃO SEXUAL EM POMAR DE MACIEIRA “GALA”.....28
- TABELA 2.1 - QUANTIDADE MÉDIA ($M \pm EPM$) DOS COMPOSTOS PRESENTES NOS EXTRATOS DE ‘EVA’ E ‘GALA’ EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO, ANALISADOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA.....47
- TABELA 2.2 - COMPOSTOS PRESENTES EM EXTRATOS DE MAÇÃ ELETROFISIOLOGICAMENTE ATIVOS PARA *Grapholita molesta*..... 48
- TABELA 2.3 - RESPOSTAS DE FÊMEAS ACASALADAS E MACHOS VIRGENS DE *Grapholita molesta* EM OLFATÔMETRO EM “Y” PARA COMPOSTOS PRESENTES EM EXTRATOS DE ‘EVA’ E ‘GALA’ EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO.....48
- TABELA 3.1 - RESPOSTAS DE MACHOS VIRGENS DE *Grapholita molesta* EM OLFATÔMETRO EM “Y” PARA FEROMÔNIO SEXUAL SINTÉTICO E EXTRATO DE MAÇÃ ‘GALA’ MADURA56

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.1 - CAPTURAS MÉDIAS DE ADULTOS DE *Grapholita molesta* COM DIFERENTES ATRATIVOS ALIMENTARES E FEROMÔNIO EM ÁREAS COM CONFUSÃO SEXUAL (PORTO A, LAPA A) E SEM CONFUSÃO SEXUAL (PORTO B, LAPA B) (PORTO AMAZONAS, DE 05/06/2009 A 30/10/2009; LAPA, DE 16/02/2011 A 15/09/2011).....28
- FIGURA 1.2 - CAPTURAS MÉDIAS DE ADULTOS DE *Grapholita molesta* EM ARMADILHAS COM ATRATIVO ALIMENTAR VINHO E FEROMÔNIO EM ÁREA COM CONFUSÃO SEXUAL (PARANÁ, DE 05/06/2009 A 30/10/2009).....29
- FIGURA 1.3 - CAPTURAS MÉDIAS DE ADULTOS DE *Grapholita molesta* (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) EM ARMADILHAS COM ATRATIVO ALIMENTAR VINHO E FEROMÔNIO EM ÁREA COM CONFUSÃO SEXUAL (PARANÁ, DE 16/02/2011 A 15/09/2011).....29
- FIGURA 2.1 - FRUTOS DE MAÇÃ COLHIDOS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO. A) 'EVA' IMATURO; B) 'EVA' EM PROCESSO DE MATURAÇÃO; C) 'EVA' EM MATURAÇÃO FISIOLÓGICA; D) 'GALA' IMATURO; E) 'GALA' EM PROCESSO DE MATURAÇÃO; F) 'GALA' EM MATURAÇÃO FISIOLÓGICA.....42
- FIGURA 2.2 - SISTEMA DE AERAÇÃO UTILIZADO PARA A COLETA DE VOLÁTEIS DE MAÇÃ.....43
- FIGURA 2.3 - RESPOSTAS ELETROFISIOLÓGICAS DE *Grapholita molesta* AOS COMPOSTOS PRESENTES NOS EXTRATOS DE 'EVA' EM ESTÁGIO PROCESSO DE MATURAÇÃO (N=7). A) FÊMEAS ACASALADAS; B) FÊMEAS VIRGENS E C) MACHO VIRGEM. EAD- SINAL DA ANTENA; GC- LINHA DO GC..... 44
- FIGURA 2.4 - RESPOSTAS ELETROFISIOLÓGICAS DE *Grapholita molesta* AOS COMPOSTOS PRESENTES NOS EXTRATOS DE 'EVA' EM MATURAÇÃO FISIOLÓGICA (N= 7). A) FÊMEAS ACASALADAS; B) FÊMEAS VIRGENS E C) MACHO VIRGEM. EAD- SINAL DA ANTENA; GC- LINHA DO GC.....45
- FIGURA 2.5 - RESPOSTAS ELETROFISIOLÓGICAS DE *Grapholita molesta* AOS COMPOSTOS PRESENTES NOS EXTRATOS DE 'GALA' EM ESTÁGIO MATURAÇÃO FISIOLÓGICA (N=7). A) FÊMEAS ACASALADAS; B) FÊMEAS VIRGENS E C) MACHO. EAD- SINAL DA ANTENA; GC- LINHA DO GC.....46

Percepção química de *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) a substâncias alimentares e voláteis de maçã: resposta quimiotóxica, eletrofisiológica e monitoramento em pomares de macieira com confusão sexual.

RESUMO

O monitoramento é uma etapa fundamental do Manejo Integrado de Pragas e tem a finalidade de verificar a presença de um inseto e sua intensidade, fornecendo subsídios para tomada de decisões para aplicação de uma medida de controle. *Grapholita molesta* (Busck, 1916), é uma importante praga de fruteiras de clima temperado e a eficiência do monitoramento desta espécie, realizado com armadilhas a base de feromônio, é prejudicada em áreas onde se utiliza a técnica de confusão sexual como controle, devido à similaridade dos feromônios envolvidos. O objetivo deste trabalho foi identificar novos compostos atrativos para *G. molesta*, visando sua utilização no monitoramento deste tortricídeo em pomares com confusão sexual. Atrativos alimentares foram testados em campo para a captura de mariposas, utilizando armadilhas do tipo McPhail iscadas com suco e vinho de uva em pomares de maçã. Também foram realizados experimentos em laboratório para identificar os voláteis emitidos por frutos de ‘Eva’ e ‘Gala’ em diferentes estágios de desenvolvimento, através da coleta dos voláteis por *headspace* e análise em cromatografia gasosa, assim como a resposta eletrofisiológica e comportamental de *G. molesta* a estes compostos. Por fim, o efeito da interação entre os voláteis liberados por maçã madura e feromônio sintético foi avaliado para a captura de machos de *G. molesta* em experimentos de campo. Verificou-se que o vinho foi o atrativo mais eficiente para a captura de *G. molesta* em pomares com confusão sexual, superando as capturas com feromônio sintético. Além disso, atrativos alimentares capturaram fêmeas copuladas, o que pode explicar a ocorrência de danos mesmo quando há baixas capturas em armadilhas com feromônio durante a eficiência da formulação de confusão sexual. Em relação à avaliação de resposta de *G. molesta* aos voláteis de maçã em diferentes estágios de maturação, não foram detectadas repostas eletrofisiológicas da mariposa-oriental aos voláteis emitidos em estágio imaturo de ambas cultivares. Adultos responderam eletrofisiologicamente a dois compostos de ‘Eva’ em estágio de processo de maturação: hexanoato de isoamila e α -farneseno. Dentre os voláteis liberados em estágio de maturação fisiológica, doze elicitaram respostas em adultos. Fêmeas virgens não responderam aos voláteis em olfatômetro e fêmeas acasaladas foram atraídas por voláteis liberados por frutos em estágio de maturação fisiológica, o que sugere uma maior sensibilidade de fêmeas acasaladas, estimuladas pela necessidade de localizar sítios de oviposição. Machos também foram atraídos por voláteis de frutos em estágio de processo de maturação e em maturação fisiológica, possivelmente estes utilizam o odor como pista química em busca de parceiras para o acasalamento. Quanto ao efeito de voláteis de maçã madura e feromônio sintético, não foi observado incremento na atração de adultos em bioensaios em olfatômetro “Y” e nas capturas de machos em campo.

Palavras-chave: caimônios, mariposa-oriental, armadilha, olfatômetro “Y”.

Chemical perception of *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) of food substances and apple volatiles: chemotactical, eletrofosiological response and monitoring in apple orchards with mating disruption.

ABSTRACT

Monitoring is a key step in Integrated Pest Management and is intended to verify insect presence in a crop and its intensity, supporting decision making for implementing a control measure. *Grapholita molesta* (Busck, 1916) is an important pest of temperate climate fruit crops and the efficiency of its monitoring, carried out with pheromone traps, is impaired in areas where mating disruption technique is used as a control method due to the similarity of the pheromones involved. The objective of this study was to identify new attractive compounds to *G. molesta*, aiming their use in monitoring this tortricid in areas where mating disruption technique is used. Food attractants were tested in the field to capture moths using McPhail traps baited with grape juice and wine in apple orchards. Experiments were also conducted in laboratory to identify the volatiles emitted by fruits of the varieties 'Eva' and 'Gala' at different stages of development. The collection of volatiles was made by *headspace* and the analysis by gas chromatography. It was tested the behavioral and electrophysiological response of *G. molesta* these compounds. Finally, the interaction effect of mature apple volatiles and synthetic pheromone was evaluated for *G. molesta* male capture in field experiments. It was found that the wine was the most efficient attractive for capturing *G. molesta* in orchards with mating disruption, exceeding captures with synthetic pheromone alone. Moreover, food baits captured mated females, which may explain the occurrence of fruit damage even when there are low rates of captures in pheromone traps in areas treated with mating disruption. Regarding the response of *G. molesta* to apple volatile at different stages of maturation, it was not detected any electrophysiological response of the oriental fruit moth to volatiles emitted by immature stages of both apple varieties. Adults responded electrophysiologically to two compounds of maturing 'Eva': isoamyl hexanoate and α -farnesene. From the volatiles released by maturing fruits, twelve elicited responses in adults. Virgin females did not respond to volatiles in the olfactometer and mated females were attracted to volatiles released by maturing fruits, which suggests a greater sensitivity of mated females stimulated by the need to locate oviposition sites. Males were also attracted to volatiles of maturing and mature fruits, possibly driven by the search for mating partners. As for the effect of mature apple volatiles and synthetic pheromone, there was no increase in the attraction of adults in olfactometer bioassays and of males in field captures.

Key-words: kairomone, oriental fruit moth, trap, olfactometer “Y”.

1. Introdução Geral

A produção de maçãs no Brasil teve um aumento de mais de 6.000% nas últimas três décadas. De importador, o país passou não apenas a abastecer todo o mercado interno, como também a exportar 15% de sua colheita (Ferreira, 2009).

Grapholita molesta (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae), é uma das principais pragas da macieira. Possui hábito alimentar broqueador, danificando os frutos ao penetrar pelo cálice e construir galerias em direção à semente (Salles, 2001). A mariposa oriental, assim chamada por ser originária do continente asiático (Gonzales, 2003), é de hábito crepuscular, e a atividade de adultos é dependente da temperatura, sendo que o voo só ocorre em temperaturas acima de 16°C. Ocorre durante todo o ano, iniciando os ataques em pessegueiro (*Prunus persica*), em meados de agosto e migrando para a macieira (*Malus domestica*) após a colheita dos pêssegos (Hickel, 1993). Em macieira, os danos ocorrem a partir do crescimento dos frutos, mas os maiores prejuízos são observados no final do crescimento e na maturação dos mesmos (Lorenzato, 1988). Mariposa-oriental pode se dispersar facilmente por 1 a 2 km (Gonzales, 2003), possibilitando que áreas de cultivo infestadas e sem um controle eficiente da praga atuem como fonte de infestação para pomares localizados na mesma região ou em regiões próximas (Grasseli, 2009).

O controle desta praga tem sido realizado com inseticidas, principalmente fosforados, acarretando em riscos à saúde de aplicadores, contaminação de frutos e do ambiente. Soma-se a isso as fortes restrições impostas por países importadores com relação à presença de resíduos nos frutos. Por este motivo, vem sendo desenvolvidas novas tecnologias para o seu monitoramento e controle, buscando a redução dos custos de produção e dos impactos ambientais (Cardé e Minks, 1995).

A identificação e síntese do seu feromônio sexual proporcionaram a utilização no monitoramento da espécie (Phillips, 1973). Entretanto, após a adoção da confusão sexual como estratégia de controle, o monitoramento com feromônio passou a indicar apenas a eficiência da técnica de confusão sexual. Os componentes das duas formulações são similares e, com isso, o feromônio para monitoramento não cumpre o seu papel de captura (Rice e Kirsch, 1990). Além disso, a ação exclusiva do feromônio de monitoramento sobre machos deixa de contabilizar fêmeas no pomar (Howel, 1991).

Pelos menos há três décadas, as armadilhas abastecidas com iscas alimentares ou sexuais vêm sendo utilizadas na captura de insetos. O monitoramento usando armadilhas

abastecidas com substâncias alimentares vem sendo realizado principalmente para moscas-das-frutas, uma das principais pragas da fruticultura mundial. Na região sul do Brasil, o suco de uva a 25% é o atrativo recomendado como padrão para a captura desta espécie em pomares de maçã (Kovaleski e Ribeiro, 2002; Kovaleski, 2004). Quanto à utilização de atrativos alimentares para o monitoramento de lepidópteros, existem estudos anteriores à utilização do feromônio sexual para monitoramento e controle das espécies, que não previam o impasse da utilização concomitante das duas formulações. Os ingredientes utilizados, embora variados, incluíam substâncias ricas em açúcar, como frutas e bebidas alcoólicas (Landolt, 1995). Melaço e xarope de açúcar foram avaliados juntamente com inseticidas obtendo sucesso para atrair e matar *G. molesta* (Frost, 1926; 1928) e *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) (Eyer, 1931; Hern e Dorn, 2004).

Os cairomônios têm sido investigados como alternativa para o manejo comportamental de pragas (Fernández et al., 2010; Knight e Light, 2005; Il'ichev et al., 2004), pois estas substâncias químicas além de indicar a presença do alimento, induzem, entre outras ações, a alimentação e a oviposição (Nation, 2002). Um dos casos de maior sucesso do uso de cairomônios é a utilização do chamado “éster de pêra” (etil (E, Z) -2,4 decadienoato), identificado a partir de pêras ‘Bartlett’ maduras, no monitoramento de *C. pomonella* em pomares com confusão sexual na América do Sul e do Norte (Knight et al., 2005) e Europa (Ioriatti et al., 2003).

A interação planta-inseto é influenciada pelos estágios fenológicos das plantas hospedeiras, devido a alterações qualitativas e quantitativas dos voláteis emitidos no decorrer do seu desenvolvimento (Vallat e Dorn, 2005). Estas variações indicam mudanças fisiológicas na planta, refletindo na adequação do inseto ao hospedeiro. Muitas espécies de insetos polípagos atacam seus hospedeiros em estágios específicos, utilizando-se dos voláteis emitidos nesta fase para localizá-los (Bruce et al., 2005). Assim, surge a possibilidade de identificar o estágio fenológico da cultura mais suscetível à praga através da composição dos voláteis liberados em cada fase (Bruce et al., 2005).

Tendo em vista a problemática relacionada ao monitoramento de *G. molesta* em pomares de maçã usando a técnica de confusão sexual como controle deste inseto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atratividade de substâncias alimentares e voláteis liberados pela maçã à mariposa-oriental, visando complementar o monitoramento com feromônio. Assim, a presente dissertação foi dividida em três capítulos. No primeiro capítulo foram avaliados

diferentes atrativos alimentares para o monitoramento de *G. molesta* em pomares de macieira, na entressafra, manejados com a técnica de confusão sexual. No segundo capítulo foram realizados testes em laboratório para avaliar o perfil dos voláteis liberados por frutos de ‘Eva’ e ‘Gala’ assim como a resposta eletrofisiológica e comportamental de *G. molesta* a estes voláteis. Por fim, o terceiro capítulo abordou o efeito entre cairomônios liberados pela maçã e o feromônio sexual sintético na captura de machos de *G. molesta*.

2. Referências bibliográficas

BRUCE, T. J. A.; WADHAMS, L. J. e WOODCOCK, C. M. 2005. Insect host location: a volatile situation. **Trends Plant Sci.**, v. 10, p. 269-227.

CARDÉ, R. e MINKS. A. K. 1995. Control of moths by mating disruption: successes and constraints. **Annu Rev Entomol.**, V. 40, p. 559-585.

EYER, J.R., 1931. A four year study of codling moth baits in New Mexico. **J. Econ. Entomol.**, v. 24, p. 988–1001.

FERREIRA, P. **Yes, nós temos maçãs.** 2009. Disponível em < www.finep.gov.br/imprensa/revista/edicao5/inovacao_em_pauta_5_pag43a47_macas.pdf >. Acesso em: 04 ago. 2011.

FERNÁNDEZ D.E.; CICHON, L.; GARRIDO, S.; RIBES-DASI, M. e AVILLA, J. 2010. Comparison of lures loaded with codlemone and pear ester for capturing codling moths, *Cydia pomonella*, in apple and pear orchards using mating disruption. **J. Insect Sci.**, v.10 p.139.

FROST, S.W., 1926. Bait pails as a possible control for the oriental fruit moth. **J. Econ. Entomol.**, v.19, p. 441–450.

FROST, S.W., 1928. Continued studies of baits for oriental fruit moth. **J. Econ. Entomol.**, v. 21, p. 339–348.

GONZALEZ, H. R. 2003. Las polillas de la fruta in Chile. (Lepidoptera: Tortricidae, Pyralidae). Santiago, Chile. Universidade de Chile. **Serie Ciências Agronômicas**. N. 9. Outubro. 188 p.

GRASSELLI, V. 2009. Estratégias de controle de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) em pomares de pessegueiro. **Monografia (Especialização em fitossanidade) Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 40 p.

HERN, A. e DORN, S. 2004. A female-specific attractant for the codling moth, *Cydia pomonella*, from apple fruit volatiles. **Naturwissenschaften**, v. 91, p. 77–80.

HICKEL, E.R. 1993. **Pragas do pessegueiro e da ameixeira e seu controle no Estado de Santa Catarina**. Florianópolis: EPAGRI, 45p.

HOWELL, J. F. 1991. Reproductive biology. In: Van Der Geest LPS, Evenhuis HH, editors. **Tortricid pests. Their biology, natural enemies and control**, p. 257-174. Elsevier.

IL'ICHEV, A.L.; WILLIAMS, D.G. e MILNER, A.D. 2004. Mating disruption barriers in pome fruit for improved control of oriental fruit moth *Grapholita molesta* Busck (Lep., Tortricidae) in stone fruit under mating disruption. **J. Appl. Entomol.**, v. 128 p. 126–132.

IORIATTI C.; DE CRISTOFARO A.; MOLINARI F.; PASQUALINI E., SCHMIDT S. e ESPINHA I., 2003.- The plant volatile attractant (2E, 4Z)-2,4-ethyl-decadienoate for Codling Moth monitoring. **Boll. Zoo. Agrar. Bachic.**, Ser. II, 35 v. 2, p. 127-135.

KNIGHT, A.L.; HILTON, R. e LIGHT, D.M. 2005. Monitoring codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in apple with blends of ethyl (E,Z)-2,4-decadienoate and codlemone. **Environ. Entomol.**, 34 v.3, p. 598-603.

KNIGHT, A.L. e LIGHT, D.M. 2005. Seasonal flight patterns of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) monitored with pear ester and codlemone-baited traps in sex pheromone-treated apple orchards. **Environ. Entomol.**, 34 v.5, p. 1028-1035.

KOVALESKI, A. 2004. Pragas. In: KOVALESKI, A. (ed.). **Maçã: Fitossanidade**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. 85 p. (Frutas do Brasil, 38).

KOVALESKI, A. e RIBEIRO, L. G. 2002. **Manejo de pragas na produção integrada de maçã**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. (Circular Técnica, 34)

LANDOLT, P.J. 1995. Attraction of *Mocis latipes* (Lepidoptera: Noctuidae) to sweet baits in traps. **Fla. Entomol.**, v. 78, p. 523–530.

LORENZATO, D. **Lepidópteros nocivos em frutíferas rosáceas no Sul do Brasil**. Porto Alegre: IPAGRO Informa: 1988 p. 71-78.

NATION, J. L. 2002. Nutrition. In J.L. Nation. **Insect physiology and biochemistry**. CRC Press: New York. p.65-87.

PHILLIPS, J. H. H. 1973. Monitoring for oriental fruit moth with synthetic sex pheromone. **Environ. Entomol.**, v. 2, n. 6, p. 1039-1042.

RICE, R. E. e KIRSCH, P. 1990. Mating disruption of the Oriental fruit moth in the United States. In: **Behavior-modifying Chemicals for Pest Management: Applications of Pheromones and Other Attractants**. Ed. by Ridgeway R L, Silverstein R M, Inscoc M N, Marcel Dekker, New York, p. 193–211.

SALLES, L.A. Mariposa oriental, *Grapholita molesta* (Lepidoptera:Tortricidae). In: VILELLA, E.F. et al (Ed.). 2001. **Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos. p. 42-45.

VALLAT, A. e DORN, S. 2005. Changes in volatile emissions from apple trees and associated response of adult female codling moths over the fruit growing season. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 4083-4090.

**CAPÍTULO I: MONITORAMENTO DE MARIPOSA-ORIENTAL (LEPIDOPTERA:
TORTRICIDAE) COM ATRATIVOS ALIMENTARES EM POMARES DE
MACIEIRA COM E SEM CONFUSÃO SEXUAL, NO PERÍODO DE ENTRESSAFRA**

Monitoramento de mariposa-oriental (Lepidoptera: Tortricidae) com atrativos alimentares em pomares de macieira com e sem confusão sexual, no período de entressafra

Atrativos alimentares para o monitoramento de mariposa-oriental em pomares de maçã com confusão sexual

Oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) monitoring with food baits in apple orchard with mating disruption, in off-season

Food baits for monitoring the oriental fruit moth in apple orchards with mating disruption

P. Strapasson¹; L. B. Monteiro²; E. D. B. Silva²

¹*Universidade Federal do Paraná, Departamento de Zoologia, CP 19020, CEP 81531-980 Curitiba, PR, Brasil. E-mail: pri_strapasson@yahoo.com.br*

²*Universidade Federal do Paraná, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Rua dos Funcionários, 1540 CEP 80035-050 Curitiba, PR, Brasil. E-mail: lbmonteiro@terra.com.br; ederdbs@gmail.com*

**artigo a ser submetido ao Journal of Applied Entomology*

Resumo

Mariposa oriental, *Grapholita molesta*, é uma importante praga na fruticultura de clima temperado. O monitoramento com feromônio serve para tomada de decisão sobre a utilização de um método de controle, entretanto, em pomares com confusão sexual, tem aparecido danos em frutos mesmo sem a presença de adultos em armadilhas com feromônio. O objetivo deste trabalho foi testar atrativos alimentares para monitoramento de *G. molesta* em pomares com confusão sexual. O trabalho foi desenvolvido em dois pomares de macieira 'Gala', localizados em Porto Amazonas-PR e Lapa-PR. Foram testados dois atrativos alimentares: suco de uva (Pérgola®, RS) e vinho (Campo Largo®, PR). Os atrativos foram colocados em armadilhas do tipo McPhail, que foram instaladas em macieiras a 1,8 m de altura. A troca dos mesmos foi realizada a cada sete dias. Armadilhas do tipo Delta com feromônio sexual sintético para *G. molesta* foram usadas como atrativo de referência, sendo os septos substituídos a cada 45 dias. Em cada pomar foram selecionadas duas parcelas, uma com confusão sexual e a outra sem, sendo esta uma parcela de referência. Os insetos foram coletados das armadilhas semanalmente, contados e sexados. No pomar Porto, as capturas com vinho na parcela com confusão sexual foram maiores em relação ao atrativo de referência. Não houve diferença entre as concentrações de suco, independente da presença ou não de confusão sexual. No pomar Lapa não houve diferença dentre os atrativos alimentares, entretanto, o tratamento vinho capturou mais insetos que o feromônio. A razão sexual dos insetos capturados nos atrativos alimentares em parcelas com e sem confusão sexual foi de 0,52, não havendo influência dos atrativos na captura de ambos os sexos. Do total de fêmeas capturadas nas parcelas com confusão sexual, 41% apresentaram espermatóforos na bolsa

copuladora, indicando a presença de fêmeas copuladas mesmo em parcela com confusão sexual.

Palavras-chave: feromônio, *Grapholia molesta*, interrupção do acasalamento, MIP.

Abstract

The oriental fruit moth *Grapholita molesta* is an important pest in temperate climate fruit crops. Pheromone monitoring is useful in decision making on the use of a control method, however, in orchards with mating disruption there is fruit damage even without the presence of adults in pheromone traps. The objective of this study was to test food baits for monitoring *G. molesta* in orchards with mating disruption. The study was conducted in two 'Gala' apple orchards, located in Porto Amazonas, PR and Lapa, PR. We tested two food baits: grape juice (Pérgola®, RS) and wine (Campo Largo®, PR). The baits were placed in McPhail traps and installed in apple trees 1.8m high. The traps were replaced every seven days. Delta traps containing *G. molesta* pheromone were used as control and were replaced every 45 days. In each orchard we selected two plots, one with mating disruption and another without, the last acting as control. The insects were collected from traps weekly, counted and sexed. In the Porto Amazonas orchard, wine traps were more attractive in the plot with mating disruption when compared to the control. There was no significant difference between juice concentrations, regardless of presence or absence of mating disruption. In the Lapa orchard there was no difference among food baits, however, wine traps captured more insects than the control. The sex ratio of captured insects in plots with mating disruption and without was 0.52, showing no influence in sex attraction. Of the total females captured in the plots with mating disruption, 41% had spermatophores in their copulatory bursa, indicating the presence of mated females in mating disruption plots.

Keywords: pheromone, *Grapholita molesta*, mating disruption, IPM.

1. Introdução

O monitoramento de artrópodos é uma etapa fundamental do manejo integrado, tendo a finalidade de estimar a densidade populacional de uma praga e a sua distribuição em um determinado local. Esta estimativa fornece subsídios para tomada de decisão para aplicação de uma medida de controle, ao contrário da aplicação de inseticidas pré-definida por calendário (Bento 2000).

Mariposa-oriental, *Grapholita molesta* Busck 1916 (Lepidoptera: Tortricidae), é uma praga mundial de pêssigo, *Prunus persica* (L.) (Rothschild e Vickers 1991) e adaptou-se à cultura da macieira (Il'ichev et al. 2004; Kovanci et al. 2004). A identificação do feromônio sexual proporcionou a síntese de uma formulação sintética que é utilizada para o monitoramento da espécie (Phillips 1973).

O feromônio utilizado no monitoramento de *G. molesta* em pomares que utilizam a técnica de confusão sexual se limita a indicar a eficiência da técnica de controle, pois os componentes das duas formulações são similares (Rice e Kirsch 1990). A ocorrência de danos em alguns pomares de maçã com confusão sexual no Sul do Brasil (L.B.M comunicação pessoal) indica que este método de monitoramento não está sendo eficiente.

Atrativos alimentares são utilizados para o monitoramento de insetos, incluindo substâncias ricas em açúcar (Landolt 1995). Na região Sul do Brasil, o monitoramento de moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha* é realizado com sucos de uva e hidrolisado de proteína (Kovaleski e Ribeiro 2002; Kovaleski 2004). Melaço e xarope de açúcar com inseticidas obtiveram sucesso quando utilizados na técnica de atrai e mata para *G. molesta* (Frost 1926; 1928) e *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) (Eyer 1931; Hern e Dorn 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de diferentes atrativos alimentares na captura de *G. molesta* em pomares de macieira com confusão sexual no período de entressafra.

2. Material e métodos

Descrição da área e delineamento experimental. O trabalho foi desenvolvido em pomares de macieira ‘Gala’ localizados em Porto Amazonas (Porto) e Lapa, Paraná. O pomar Porto foi implantado em 2000, com condução das macieiras no espaçamento 4,5 x 1,5 metros, com área total de 100 ha. Um bloco de 17 ha de macieiras foi selecionado em função da abundância da praga neste local, sendo dividido em duas parcelas de 7,0 e 10,0 ha, respectivamente, denominadas de Porto A e Porto B. O pomar Lapa foi implantado em 1987, com espaçamento de 4,0 x 1,5 metros entre plantas e área total de 50 ha. Foi selecionado um bloco 8,5 ha, com presença regular da praga, dividido em duas parcelas de 4,0 e 4,5 ha, respectivamente denominadas de Lapa A e Lapa B. Em ambos os pomares, a distância mínima entre as duas parcelas foi de 500 metros. O delineamento experimental dos tratamentos foi em blocos ao acaso com quatro repetições, sendo que cada linha de macieiras constituía um bloco, separados entre si por 15 metros e com bordadura entre blocos de 12 metros.

Estratégia fitossanitária. Foi utilizada a formulação de confusão sexual Biolita® (Biocontrole Ltda., São Paulo, Brasil) para o controle de *G. molesta*, em difusores de polipropileno (9x12cm), com 4,10 g de uma mistura de 90:6: 1 de (Z)-8-acetato de dodecenila

(89,93%); (*E*)-8- acetato de dodecenila (6,01%); (*Z*)-8-Dodecen-1-ol (1,01%) e compostos inertes (3,05%). O difusor da formulação contém álcool laurílico pertencente ao grupo químico dos ésteres alifáticos e que apresenta a seguinte formulação: $C_{14}H_{26}O_2$, $C_{14}H_{26}O_2$, $C_{12}H_{24}O$. Os difusores foram instalados na parte mais alta das macieiras, na densidade de 20 difusores/ha (20 x 25 m), que foram trocados a cada 105 dias. No período de 05/06/2009 a 30/10/2009 a formulação de confusão sexual foi instalada na parcela Porto A, enquanto que, na parcela Porto B o manejo foi convencional com uma aplicação de inseticida em final de setembro. No Pomar da Lapa, foram instalados difusores da formulação de confusão sexual na parcela Lapa A, enquanto que Lapa B permaneceu sem feromônio de 16/02/2011 a 15/09/2011. A eficiência da técnica de confusão sexual foi avaliada por meio do índice de interrupção do acasalamento (IIA), sendo $IIA = (C-T/C) * 100$, onde C é a média de machos de *G. molesta* capturados por armadilha no tratamento com confusão sexual e T, o número de capturas no tratamento convencional (Molinari et al. 2000). O experimento foi realizado em um período que não havia frutos em ambos os pomares, de modo a evitar a influência dos tratamentos fitossanitários sobre a flutuação de *G. molesta*.

Tratamentos. O monitoramento de *G. molesta* foi realizado com três atrativos alimentares: i) vinho a 25% marca Campo Largo® (Vinícola Campo Largo, Campo Largo, PR); ii) suco de uva a 25% e iii) suco de uva 33%, marca Pérgola® (Vinícola Campestre, Campestre da Serra, RS). Os atrativos alimentares foram colocados em armadilhas do tipo McPhail, que foram instaladas em macieiras a 1,7 m de altura. A contagem de adultos ocorreu em intervalos de sete dias, sendo os atrativos alimentares trocados no momento da coleta. O feromônio para *G. molesta* Biografolita® (BioControle), colocado em armadilhas do tipo Delta, foi usado como referência; os septos com feromônio foram substituídos a cada 45 dias. As mariposas-orientais coletadas nas armadilhas com atrativos alimentares foram armazenadas em frascos contendo álcool a 75% e foram levadas ao laboratório para realização de sexagem sob microscópio estereoscópico. As fêmeas tiveram seu status de cópula identificado pela observação da presença de espermátóforos na bolsa copuladora (Dustan 1964). As fêmeas copuladas apresentaram a bolsa copuladora com aspecto translúcido, inflado e endurecido, devido à presença do espermátóforo, enquanto que em fêmeas não copuladas era achatada e de aparência opaca (Morais et al. 2009).

Análise estatística. Os dados foram analisados considerando a metodologia de Modelos Lineares Generalizados Mistos (GLMMs). Para os dados de contagem de indivíduos

considerou-se a variável distribuída como Poisson ($Y \sim P(\lambda)$) onde $\lambda \geq 0$, com preditor linear, $\eta = \alpha + \beta_i + \delta_j + \tau_k$, onde α é a media geral, β_i é o efeito de i-énésimo bloco, δ_j é o efeito da j-énésima interação aninhada de atrativos dentro de confusão, e τ_k é o efeito aleatório da interação Confusão sexual x data de coleta, com link foi utilizado o logaritmo neperiano. Para as análises de proporção de sexos e fecundidade de fêmeas, consideraram-se os dados com distribuição binomial, ($Y \sim \text{Bin}(n,p)$), com o preditor linear, $\eta = \alpha + \delta_i + \tau_j$, onde α é o efeito da media geral, δ_j é o efeito i-énésimo atrativos aninhado na confusão sexual e τ_j é o efeito aleatório da j-énésima data de coleta, como link foi utilizado o logit. A inferência Bayesiana via MCMC foi realizada em ambos os modelos, com o software R (R Development Core Team (2011)) utilizando o pacote MCMCglmm (Hadfield 2010).

3. Resultados

Pomar Porto - O Índice de Interrupção do Acasalamento (IIA) na parcela Porto A foi de 85%, demonstrando que a técnica de confusão sexual foi eficiente na parcela onde foram testados os atrativos alimentares. Dentre os atrativos alimentares, o vinho capturou o maior número de adultos de *G. molesta* em ambas as parcelas do pomar Porto (Tabela 1.1). Quando comparado com o feromônio, as capturas com vinho foram maiores na parcela com confusão sexual ($p < 0,001$), enquanto que o feromônio capturou mais na parcela sem a formulação ($p < 0,001$) (Figura 1.1). Não houve diferença entre as concentrações de suco, independente da presença ou não de confusão sexual.

As armadilhas com vinho na parcela com confusão sexual capturam em média 5,2 insetos a mais do que feromônio (Figura 1.2), entretanto, em determinadas datas (19/08/09 e 03/09/09) ocorreram picos populacionais, com capturas de até 25 insetos a mais em relação ao feromônio. As capturas com feromônio nas parcelas de confusão sexual foram, em média, 21,9 vezes menores do que nas parcelas sem confusão sexual.

A flutuação populacional de *G. molesta* foi maior no pomar de Porto Amazonas em 2009/10. O total de capturados foi de 8.146 insetos (Tabela 1.3), incluindo as capturas com atrativos alimentar e feromônio, em parcela sem e com confusão sexual.

Pomar Lapa - O IIA na parcela Lapa A foi de 79,0%. Nesta parcela, não houve diferença dentre os atrativos alimentares. O tratamento vinho capturou mais insetos que o feromônio ($p= 0.017$) (Tabela 1.2). Na parcela Lapa B, o tratamento vinho foi mais eficiente na captura

em relação ao suco 33% ($p= 0.051$), enquanto o feromônio capturou mais adultos que todos os atrativos alimentares (Figura 1.1).

Armadilhas com vinho, instaladas nas parcelas com confusão sexual, capturaram em média 1,4 insetos a mais em relação ao feromônio (Figura 1.3). O feromônio foi 9,2 vezes mais eficiente em parcelas sem confusão sexual em relação aquela com confusão sexual.

No pomar Lapa, em 2010/2011, o número total de insetos capturados foi de 2.567, somando as capturas com atrativos alimentares e feromônio, em parcela sem e com confusão sexual.

Razão sexual - A razão sexual dos insetos capturados nos atrativos alimentares em parcelas com e sem confusão sexual ($n= 4327$) foi de 0,52, não havendo influência dos atrativos na captura de ambos os sexos. Do total de fêmeas capturadas em ambas as parcelas com confusão sexual ($n= 177$), 41% apresentaram espermatóforos na bolsa copuladora, indicando que ocorreu o acasalamento. Nas parcelas sem confusão sexual em ambos os pomares, a porcentagem de fêmeas copuladas foi de 64%.

4. Discussão

O presente estudo explorou a possibilidade da utilização de atrativos alimentares para o monitoramento de mariposa-oriental em parcelas de confusão sexual, visto que há relatos de que as armadilhas de feromônio perderam eficiência em alguns pomares (Rice e Kirsch 1990). Nos dois pomares de estudo, as armadilhas com feromônio capturaram mais machos nas parcelas sem confusão sexual do que em parcelas com confusão sexual, em concordância com os estudos de Cardé e Minks (1995) e Yang et al. (2004). Nas parcelas com confusão sexual, o tratamento com vinho se mostrou mais eficiente em relação ao feromônio na captura de mariposa-oriental. Durante o processo fermentativo do vinho há a formação de compostos, como ésteres e monoterpenos, característicos dos aromas dos frutos (Hemingway et al. 1999; Rosier et al. 1995), o que pode não ocorrer com o suco de uva, devido ao tempo que os atrativos permanecem no pomar (sete dias). A presença de aminoácidos estimula a alimentação dos insetos (Potts 1999; Garcia-Ramirez et al. 2004).

Os atrativos alimentares atraem machos e fêmeas, sendo que 41% de fêmeas capturadas nas parcelas com confusão sexual estavam copuladas. Embora a população de *G. molesta* seja três vezes menor na parcela de confusão em relação à sem confusão, a presença

de fêmeas copuladas pode proporcionar o surgimento de uma nova geração e causar danos em frutos. Essa situação, aliada ao fato que há diminuição de aplicações de inseticidas em parcelas de confusão sexual, pode ser o responsável pelos insucessos da técnica em determinados pomares e anos (L.B.M., comunicação pessoal, Rice e Kirsch 1990). Além disso, as diferenças de captura de *G. molesta* entre vinho e feromônio chegaram a 25 insetos em certas datas de monitoramento, isto representa o nível de dano econômico de *G. molesta* no Brasil (Salles, 1991). Podemos supor que o pomar estaria vulnerável aos riscos de danos em frutos se o experimento tivesse sido realizado no verão, pois as condições abióticas são favoráveis e aceleram o ciclo de vida da praga. Além disso, a presença de frutos, liberando odores, influencia o acasalamento e a oviposição (Masante-Roca et al. 2002; Ansebo et al. 2004; Bruce et al. 2005).

Este trabalho demonstrou que armadilhas com atrativos alimentares podem ser utilizadas no monitoramento de mariposa-oriental em parcelas usando confusão sexual, complementando o monitoramento com feromônio sintético.

5. Referências

Ansebo L, Coracini M D, Bengtsson M, Liblikas I, Ramírez M, Borg-Karlson A K, Tasin M, Witzgall P, 2004. Antennal and behavioural response of codling moth *Cydia pomonella* to plant volatiles. J. Appl. Entomol. 128, 488-493.

Bento M J, 2000. Controle de insetos por comportamento: Feromônios. In: Bases e técnicas do manejo de insetos. Ed. by Guedes, J C, Costa I D, Castiglioni E, Pallotti, Santa Maria, 85-98.

Bruce T J A, Wadhams L J, Woodcock C M, 2005. Insect host location: a volatile situation. Trends Plant Sci. 10, 269 – 27.

Cardé R, Minks A K, 1995. Control of moths by mating disruption: successes and constraints. Annu Rev Entomol. 40, 559-585.

- Dustan G G, 1964, Mating behaviour of the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Olethreutidae). *Can Entomol.* 96, 1087-1093.
- Eyer J R, 1931. A four year study of codling moth baits in New Mexico. *J. Econ. Entomol.* 24, 988–1001.
- Frost S W, 1926. Bait pails as a possible control for the oriental fruit moth. *J. Econ. Entomol.* 19, 441–450.
- Frost S W, 1928. Continued studies of baits for oriental fruit moth. *J. Econ. Entomol.* 21, 339–348.
- Garcia-Ramirez M J, Cibrián-Tovar J, Arzufi-Barrera R, López Collado J, Soto-Hernandez M, 2004. Preferência de *Anastrepha ludens* (Lowe) (Diptera: Tephritidae) por volatiles de frutos verdes o amarillos de mango y naranja. *Agrociencia.* 38, 423-430.
- Hadfield J D, 2010. MCMC Methods for Multi-Response Generalized Linear Mixed Models: The MCMCglmm R Package. *J Stat Softw.* 33(2), 1-22.
- Hemingway K M, Alston M J, Chappell C G, Taylor J A, 1999. Carbohydrate-flavour conjugates in wine. *Carbohydr Polym.* 38, 283–286.
- Hern A, Dorn S, 2004. A female-specific attractant for the codling moth, *Cydia pomonella*, from apple fruit volatiles. *Naturwissenschaften.* 91, 77–80.
- Il'ichev AL, Williams D G, Milner A D, 2004. Mating disruption barriers in pome fruit for improved control of oriental fruit moth *Grapholita molesta* Busck (Lep., Tortricidae) in stone fruit under mating disruption. *J. Appl. Entomol.* 128, 126–132.
- Kovaleski A, 2004. Pragás. In: Maçã: Fitossanidade. Ed by Kovaleski A, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, 85.

Kovaleski A, Ribeiro L G, 2002. Manejo de pragas na produção integrada de maçã. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. (Circular Técnica, 34).

Kovanci O B, Walgenbach J F, Kennedy G G, Borchert D, 2004. Evaluation of extended-season mating disruption of the Oriental fruit moth *Grapholita molesta* (Busck) (Lep., Tortricidae) in apples. J. Appl. Entomol. 128, 664-669.

Landolt P J, 1995. Attraction of *Mocis latipes* (Lepidoptera: Noctuidae) to sweet baits in traps. Fla. Entomol. 78, 523-530.

Masante-Roca I, Gadenne C, Anton S, 2002. Plant odour processing in the antennal lobe of male and female grapevine moths, *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). J. Insect Physiol. 48, 1111-1121.

Molinari F, Gravedi P, Rama F, Reggiori F, Dalpane M, Galassi T. 2000. L'uso dei feromoni secondo il método del 'disorientamento' nella difesa des pesco da *Cydia molesta* e *Anarsia lineatella*. Atti delle Giornate Fitopatologiche 1, 341-348.

Morais R M, Redaelli L R, Sant'ana J, 2009. Anatomia comparada dos órgãos internos de reprodução de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae). Biotemas. 22, 59-67.

Phillips J H H, 1973. Monitoring for oriental fruit moth with synthetic sex pheromone. Environ Entomol. 2, 1039-1042.

Potts L, 1999. Feeding stimulants and semiochemicals as pest management tools. URL http://www.colostate.edu/Depts/Entomology/courses/en507/papers_1999/potts.htm>.

R development core team 2011. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

Rice R E, Kirsch P, 1990. Mating disruption of the Oriental fruit moth in the United States. In: Behavior-modifying Chemicals for Pest Management: Applications of Pheromones and Other Attractants. Ed. by Ridgeway R L, Silverstein R M, Inscoc M N, Marcel Dekker, New York, 193–211.

Rosier J P, Nora I, Branco E S, Nascimento A, 1995. Diminuição da eficiência de sucos de uva e vinagres na captura de Tephritídeos. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 15, Caxambu, Resumos. Lavras: SEB/ESAL. 607.

Rotschild, G L H, Vickers, R A, 1991. Biology, ecology and control of the Oriental fruit moth. In: Tortricid pests: their biology, natural enemies and control. Ed. By Van Der Geest L P S, Evenhuis H H, Elsevier, New York, 389–412.

Salles, L A B. 1991. Grafolita (*Grapholita molesta*): bioecologia e controle. EMBRAPA CNPFT (Documentos, 42), Pelotas, 13.

Yang Z, Bengtsson M, Witzgall P, 2004. Host plant volatiles synergize response to sex pheromone in codling moth, *Cydia pomonella*. J. Chem. Ecol. 30, 619-629.

TABELA 1.1- Contraste entre médias de captura de *Grapholita molesta* com atrativos alimentares e feromônio em parcelas com e sem confusão sexual em pomar de macieira ‘Gala’.

		Atrativos			
		Porto A (Com confusão sexual)			
	Feromônio	Suco 25%	Suco 33%	Vinho 25%	
Feromônio	NA	0.550 (0.000)	0.572 (0.000)	1.112 (0.000)	
Suco 25%	-0.550 (0.000)	NA	0.021 (0.888)	0.561 (0.000)	
Suco 33%	-0.573 (0.000)	-0.021 (0.887)	NA	0.541 (0.000)	
Vinho 25%	-1.110 (0.000)	-0.561 (0.000)	-0.540 (0.000)	NA	
		Porto B (Sem confusão sexual)			
Feromônio	NA	-2.480 (0.000)	-2.352 (0.000)	-1.847 (0.000)	
Suco 25%	2.480 (0.000)	NA	0.128 (0.361)	0.634 (0.000)	
Suco 33%	2.352 (0.000)	-0.127 (0.366)	NA	0.505 (0.000)	
Vinho 25%	1.845 (0.000)	-0.634 (0.000)	-0.505 (0.000)	NA	

Valores entre parênteses <0,001 não apresentam diferença estatística usando o software R (R Development Core Team (2011)).

TABELA 1.2- Contraste entre médias de captura de *Grapholita molesta* com atrativos alimentares e feromônio em parcelas com e sem confusão sexual em pomar de macieira ‘Gala’.

		Atrativos			
		Lapa A (Com confusão)			
	Feromônio	Suco 25%	Suco 33%	Vinho 25%	
Feromônio	NA	0.198 (0.490)	0.285 (0.317)	0.665 (0.017)	
Suco 25%	-0.198 (0.486)	NA	0.085 (0.760)	0.464 (0.089)	
Suco 33%	-0.284 (0.318)	-0.083 (0.766)	NA	0.379 (0.161)	
Vinho 25%	-0.664 (0.017)	-0.469 (0.085)	-0.379 (0.161)	NA	
		Lapa B (Sem confusão)			
Feromônio	NA	-0.975 (0.000)	-1.201 (0.000)	-0.675 (0.008)	
Suco 25%	0.976 (0.000)	NA	-0.228 (0.400)	0.299 (0.254)	
Suco 33%	1.200 (0.000)	0.223 (0.409)	NA	0.523 (0.049)	
Vinho 25%	0.677 (0.008)	-0.297 (0.254)	-0.522 (0.051)	NA	

Valores entre parênteses <0,001 não apresentam diferença estatística usando o software R (R Development Core Team (2011)).

TABELA 1.3- Somatório de adultos de *Grapholita molesta* capturados com atrativos alimentares e feromônio em parcelas com e sem confusão sexual em pomar de macieira “Gala”.

Pomar/parcela	Capturas			
	Semanal		Total	
	Alimentar	Feromônio	Alimentar	Feromônio
Lapa A	33	8,6	495	129
Lapa B	49,2	80,3	738	1205
Porto A	46,5	10,3	976	217
Porto B	104,7	226,4	2198	4755

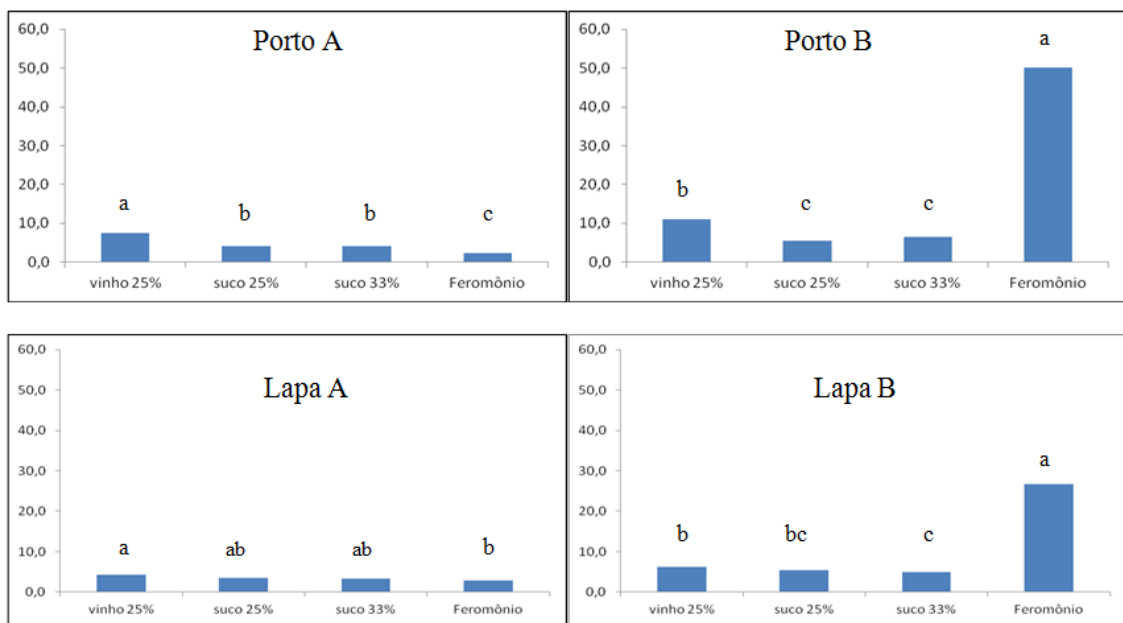


FIGURA 1.1. Capturas médias de adultos de *Grapholita molesta* com diferentes atrativos alimentares (suco de uva e vinho) e feromônio em parcelas com confusão sexual (Porto A, Lapa A) e sem confusão sexual (Porto B, Lapa B) (Porto Amazonas de 05/06/2009 a 30/10/2009; Lapa de 16/02/2011 a 15/09/2011).

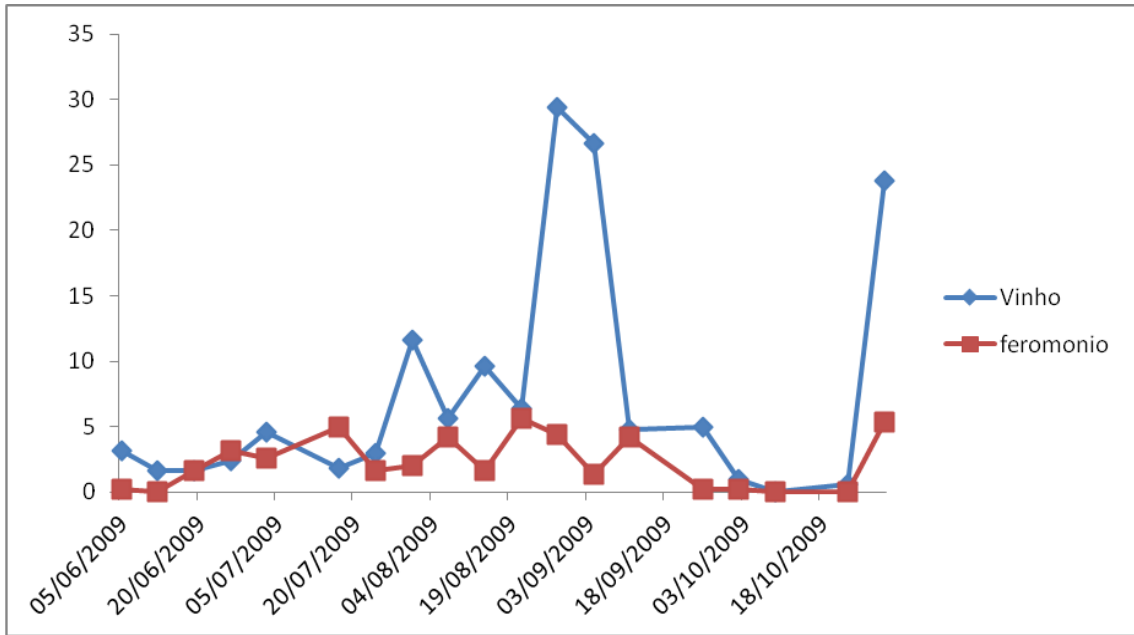


FIGURA 1.2. Capturas médias de adultos de *Grapholita molesta* em armadilhas com atrativo alimentar vinho e feromônio em parcela com confusão sexual (Paraná, de 05/06/2009 a 30/10/2009).

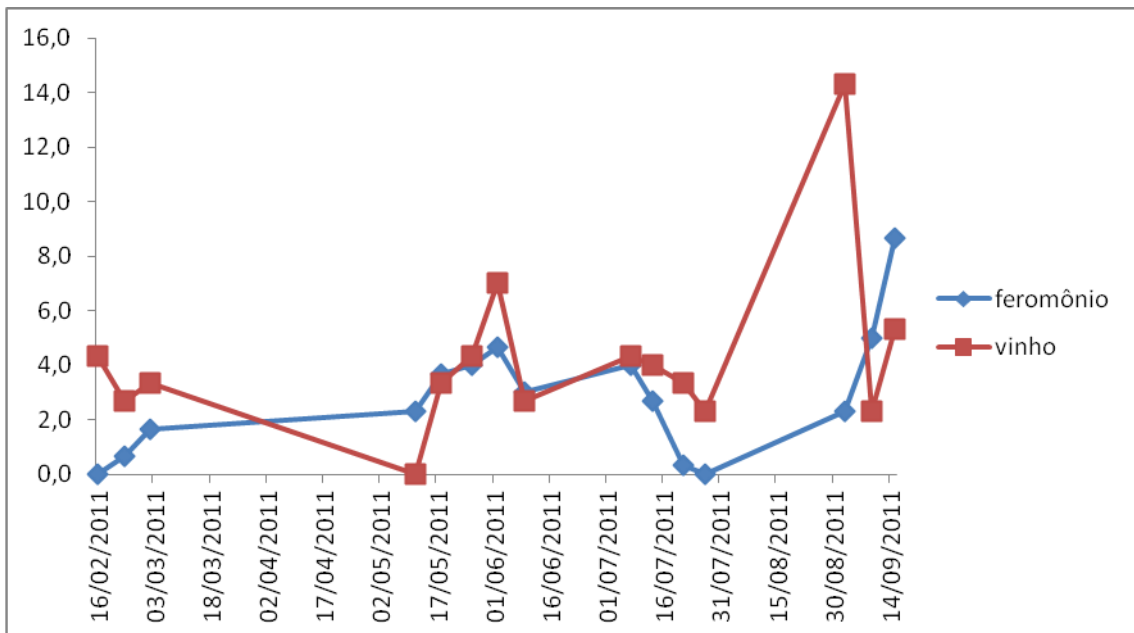


FIGURA 1.3. Capturas médias de adultos de *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) em armadilhas com atrativo alimentar vinho e feromônio em parcela com confusão sexual (Paraná, de 16/02/2011 a 15/09/2011).

**CAPÍTULO II: RESPOSTAS ELETROFISIOLÓGICAS E COMPORTAMENTAIS
DE MARIPOSA-ORIENTAL (LEPIDOPTERA:TORTRICIDAE) AOS VOLÁTEIS DE
MAÇÃ ‘GALA’ E ‘EVA’ EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO**

RESPOSTAS ELETROFISIOLÓGICAS E COMPORTAMENTAIS DE MARIPOSA-ORIENTAL (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) AOS VOLÁTEIS DE MAÇÃ ‘GALA’ E ‘EVA’ EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO

ELECTROPHYSIOLOGICAL AND BEHAVIORAL RESPONSE OF ORIENTAL FRUIT MOTH (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) TO THE APPLE VARIETIES 'GALA' AND 'EVA' VOLATILES IN DIFFERENT STAGES OF DEVELOPMENT

PRISCILA STRAPASSON¹; LINO B. MONTEIRO²; PAULO H.G. ZARBIN³

¹Universidade Federal do Paraná, Departamento de Zoologia, CP 19020, CEP 81531-980 Curitiba, PR, Brasil. E-mail: pri_strapasson@yahoo.com.br

²Universidade Federal do Paraná, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Rua dos Funcionários, 1540 CEP 80035050 Curitiba, PR, Brasil. E-mail: lbmonteiro@terra.com.br

³Universidade Federal do Paraná, Departamento de Química, CP 19081, CEP 81531-990 Curitiba, PR, Brasil. E-mail: pzarbin@ufpr.br

*artigo a ser submetido ao Journal of Chemical Ecology

Resumo-Mariposa-oriental, *Grapholita molesta*, ocorre durante todo o ano, atacando pessegueiro e migrando para a macieira. Há evidências de que mariposas são guiadas por voláteis na localização de hospedeiras e a emissão destes compostos durante o período de maturação dos frutos influencia a orientação destes insetos. O objetivo foi identificar voláteis emitidos por frutos de ‘Eva’ e ‘Gala’ em diferentes estágios de desenvolvimento e a resposta eletrofisiológica e comportamental de *G. molesta* a estes compostos. Voláteis de frutos imaturos, em processo de maturação e em maturação fisiológica das duas cultivares foram extraídos por *headspace* e analisados por cromatografia gasosa. Foram realizados testes em cromatógrafo acoplado a eletroantenograma usando a antena de machos virgens, fêmeas acasaladas e virgens aos voláteis de frutos nos três estágios de desenvolvimento. Testes em olfatômetro “Y” avaliaram a resposta comportamental de adultos estimulados pelos voláteis. Não foram detectadas repostas eletrofisiológicas da mariposa-oriental aos voláteis emitidos em estágio imaturo de ambas cultivares. Adultos responderam eletrofisiologicamente a dois compostos de ‘Eva’ em estágio de processo de maturação: hexanoato de isoamila e α -farneseno. Dentre os voláteis liberados em estágio de maturação fisiológica, doze elicitaram respostas em adultos. Fêmeas virgens não responderam aos voláteis em olfatômetro e fêmeas acasaladas foram atraídas por voláteis liberados por frutos em estágio de maturação fisiológica. Isso pode ocorrer devido a sensibilidade de fêmeas acasaladas, estimuladas pela necessidade de localizar sítios de oviposição. Machos também foram atraídos por voláteis de frutos em estágio de processo de maturação e em maturação fisiológica, possivelmente em busca de parceiras para o acasalamento.

Palavras-chave- Cairomônios; CG-EAD; *Grapholita molesta*; *Malus domestica*; Olfatômetro; Tortricidae.

Abstract- The oriental fruit moth, *Grapholita molesta*, occurs throughout the year, attacking peach trees and migrating to apple trees. There is evidence that moths are guided by volatiles in host-location and the emission of these compounds during fruit maturation influences these insects' orientation. The aim of this work was to identify volatiles emitted by fruits of varieties 'Eva' and 'Gala' at different stages of development and determine *G. molesta* behavioral and electrophysiological response to these compounds. Volatiles from immature, maturing and physiologically mature fruits of both varieties were extracted via *headspace* and analyzed by gas chromatography. To test insects' response to different volatiles, virgin males and virgin and mated females antennae were exposed to volatiles released by the three stages of fruit development and the response was registered by gas chromatography coupled to an electroantennogram. "Y" tube olfactometer bioassays evaluated the behavioral response of adults stimulated by volatiles. The oriental fruit moth did not respond electrophysiologically to volatiles released by immature fruits of both varieties. Adults responded electrophysiologically to two compounds of 'Eva' maturing fruits: isoamyl hexanoate and α -farnesene. Amongst the volatiles released by physiologically mature fruits, twelve compounds elicited a response in adults. Virgin females did not respond to volatiles in olfactometer bioassays and mated females were attracted to volatiles released by physiologically mature fruits. This may be due to mated females' sensitivity, stimulated by the need to locate oviposition sites. Males were also attracted to volatiles of maturing and physiologically mature fruits, possibly acting as partner-location cues.

Key words- Kairomone; CG-EAD; *Grapholita molesta*; *Malus domestica*; Olfactometer, Tortricidae.

INTRODUÇÃO

Lepidópteros herbívoros utilizam voláteis de plantas para identificar a disponibilidade de recursos alimentares, parceiros para o acasalamento e sítios de oviposição (Masante-Roca et al., 2002; Ansebo et al., 2004; Bruce et al., 2005). A escolha do local de postura é essencial para a sobrevivência de larvas de lepidópteros da família Tortricidae, pois as neonatas apresentam pouca mobilidade e teriam dificuldades de completar o ciclo de vida caso não estivessem sobre a planta hospedeira (Renwick e Chew, 1994). Os machos desta família possuem receptores sensoriais nas antenas sensíveis a alguns voláteis específicos de hospedeiros, que são utilizados para aumentar a probabilidade de encontrar parceiras (Ansebo et al., 2004; Ansebo et al., 2005).

A interação planta-inseto é influenciada pelos estágios fenológicos das plantas hospedeiras, devido a alterações qualitativas e quantitativas dos voláteis emitidos no decorrer do seu desenvolvimento (Vallat e Dorn, 2005). Estas variações indicam mudanças fisiológicas na planta, refletindo na adequação do inseto ao hospedeiro. Muitas espécies de insetos

polífagos atacam seus hospedeiros em estágios específicos, utilizando-se dos voláteis emitidos nesta fase para localizá-los (Bruce et al., 2005). Assim, surge a possibilidade de identificar o estágio fenológico da cultura mais suscetível à praga através da composição dos voláteis liberados em cada fase (Bruce et al., 2005).

Mariposa-oriental, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae), é uma das principais pragas de fruteiras de clima temperado no Sul do Brasil (Ribeiro, 1999). Ocorre durante todo o ano, iniciando os ataques em pessegueiro (*Prunus persica*) em meados de agosto e migrando para a macieira (*Malus domestica*) após a colheita dos pêssegos (Hickel, 1993). Os danos em macieira podem ocorrer em todos os estágios de desenvolvimento dos frutos, entretanto maiores prejuízos econômicos são observados em frutos em processo de maturação (L.B.M., observações pessoais). No estado do Paraná, são cultivadas as variedades ‘Gala’ e ‘Eva’. ‘Eva’ apresenta menor exigência de horas de frio para o seu desenvolvimento (Hauagge e Tsuneta, 1999) e produz frutos mais precoces em relação à ‘Gala’. Essa precocidade pode ser um dos fatores responsáveis pela menor porcentagem de danos em ‘Eva’ (L.B.M., dados não publicados), entretanto, os fatores que motivam preferência entre inseto-hospedeiro não foram estudados.

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta eletrofisiológica e comportamental de *G. molesta* aos voláteis de maçã ‘Eva’ e ‘Gala’ em diferentes estágios de desenvolvimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Insetos. Adultos de *G. molesta* foram coletados em Porto Amazonas (PR) e mantidos em garrafas pet para a oviposição. As larvas foram multiplicadas em dieta artificial, de acordo com metodologia descrita por Guennelon *et al.* (1981) e mantidas em sala de criação com temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, 70% umidade relativa e fotoperíodo de 16:8 h (L:E). Para a realização dos bioensaios, as pupas foram sexadas e separadas em placas de Petri para a obtenção de insetos virgens. Os bioensaios foram realizados com insetos virgens com idade de 24 a 48 horas e com fêmeas acasaladas foram realizados após a cópula e o início da oviposição das mesmas.

Coleta de frutos. Considerando que os maiores prejuízos de *G. molesta* são observados em frutos maduros foram definidos três estágios de desenvolvimento (Figura 2.1): i) estágio imaturo - 30 dias antes da data estimada para a colheita; ii) estágio em processo de maturação

- 15 dias antes da data estimada para a colheita e iii) estágio de maturação fisiológica – ponto de colheita. A data estimada de colheita foi calculada pelo histórico de desenvolvimento de frutos da região e pelo estágio de floração. O estágio de maturação foi confirmado pelas análises de açúcar e teor de iodo, realizadas pelo produtor. Os frutos foram coletados em pomar comercial pertencente à empresa Pomalapa (Lapa, PR), sendo que a coleta de ‘Eva’ foi realizada entre 22 de novembro e 22 de dezembro de 2011, enquanto os frutos de ‘Gala’ foram colhidos entre 18 de dezembro de 2011 e 18 de janeiro de 2012. Foram selecionados frutos livres de qualquer injúria (danos mecânicos, por alimentação de insetos, fungos, etc.). Após este processo, os frutos foram levados imediatamente ao Laboratório de Semioquímicos da UFPR para a coleta de voláteis.

Coleta de voláteis de ‘Gala’ e ‘Eva’ em diferentes estágios de desenvolvimento e análise por cromatografia gasosa. A coleta dos voláteis foi feita por meio do processo de aeração (Zarbin *et al.*, 1999). Nesse método foram utilizadas câmaras de vidro (Figura 2.2), onde foram colocados 400 g de maçãs ‘Gala’ ou ‘Eva’. Um fluxo contínuo de ar umidificado e filtrado carregou os voláteis liberados pelos frutos, que ficaram impregnados em colunas de vidro contendo 0,8 g de polímero adsorvente Super Q[®] (80/100 Mesh, Alltech Assoc., IL, USA) (Zarbin *et al.* 2003). Após 24 horas do início da aeração foi realizada a dessorção dos compostos liberados utilizando 400 µl de solvente hexano bidestilado. Após a coleta e extração dos voláteis ocorreram injeções de alíquotas de 1 µl das amostras em cromatógrafo a gás Shimadzu GC-2010 equipados com detector por ionização em chama (FID), controle de pressão eletrônico e operados no modo splitless, contendo coluna capilar DB-5 (0,25µm, Ø 0,25mm x 30m) (J & W Scientific, Folsom, Califórnia, EUA). O método de análise teve a temperatura inicial de 40°C mantida durante 1 minuto, até 250°C mantida por 10 minutos, com uma taxa de aumento de 7°C/min. Após o término das corridas, os cromatogramas obtidos de frutos em diferentes estágios de desenvolvimento foram comparados entre si para a detecção das diferenças entre os compostos liberados em cada estágio.

Eletroantenografia acoplada a cromatografia em fase gasosa (GC-EAD) e identificação de voláteis eletrofisiologicamente ativos. A identificação de compostos eletrofisiologicamente ativos de maçã para *G. molesta* foi realizada em um cromatógrafo em fase gasosa Shimadzu GC-2010 acoplado a um sistema eletroantenográfico Syntech

(Hilversum, Holanda), utilizando a antena de machos virgens, fêmeas virgens e acasaladas de *G. molesta* como detector biológico. As condições de injeção e configuração do equipamento foram semelhantes às citadas para a análise dos extratos. O efluente da coluna foi dividido na razão 1:1, sendo que uma parte foi conduzida para o detector de ionização em chama (FID), e a outra parte para a linha de transferência aquecida, a qual permeou na corrente de ar umidificado (300 mL min^{-1}) em direção à antena do inseto. A antena foi fixada entre dois eletrodos de aço inox usando gel condutivo (Sigma gel, Parker Labs., EUA). As imagens geradas do sistema de eletroantenografia acoplado ao cromatógrafo em fase gasosa foram visualizadas com o programa Syntech GC-EAD32 (versão 4.6).

Os componentes que estimularam resposta das antenas repetidamente foram identificados pela comparação com a biblioteca do espectrômetro de massas (NIST27 e NIST147) e por Índice de Kovats (KI), que foi calculado utilizando-se padrões de hidrocarboneto (C10-C26) na concentração de 100 ppm.

Resposta comportamental em olfatômetro. A resposta comportamental de adultos de *G. molesta* para voláteis de 'Gala' e 'Eva' foi verificada usando olfatômetro do tipo "Y", constituído de um tubo principal e dois tubos laterais de vidro (20 x 3cm). Foi mantido fluxo de ar contínuo de 4 l/min, previamente umidificado e filtrado com carvão ativado. Como fonte de odor foram utilizados pedaços de papel filtro (2 x 2 cm) impregnados com 10 μL de extrato de maçã ou hexano (controle), colocado na base de cada braço do olfatômetro. Machos e fêmeas foram introduzidos individualmente na base do tubo principal do olfatômetro, observando seu comportamento por 10 minutos. A resposta foi registrada quando o inseto caminhou contra o fluxo de ar e tocou o papel filtro que continha a fonte de odor (extrato de maçã ou controle), e como não resposta, quando o inseto não caminhou contra o fluxo de ar e/ou não tocou em nenhuma das fontes de odor durante o tempo de observação. A cada 4 insetos testados, o olfatômetro foi limpo com álcool e um fluxo de ar limpo foi carregado por 5 minutos, sendo a posição dos braços do olfatômetro invertida para evitar qualquer interferência externa.

Foram conduzidos nove experimentos com extratos de maçã 'Eva' e 'Gala': (i) resposta de machos virgens para extrato de frutos imaturos; (ii) resposta de fêmeas virgens para extrato de frutos imaturos; (iii) resposta de fêmeas acasaladas para extrato de frutos imaturos; (iv) resposta de machos virgens para extrato de frutos em processo de maturação;

(v) resposta de fêmeas virgens para extrato de frutos em processo de maturação; (vi) resposta de fêmeas acasaladas para extrato de frutos em processo de maturação; (vii) resposta de machos virgens para extrato de frutos em maturação fisiológica; (viii) resposta de fêmeas virgens para extrato de frutos em maturação fisiológica e (ix) resposta de fêmeas acasaladas para extrato de frutos em maturação fisiológica. Para cada repetição confrontou-se um dos tratamentos *vs* controle (solvente Hexano). Em todos os experimentos foram testados pelo menos 40 insetos considerando cada indivíduo como uma repetição. A fonte de odor foi trocada a cada indivíduo testado. Os experimentos foram realizados durante o início da escotofase, quando os insetos estavam em maior atividade (Dustan, 1964). Cada inseto foi testado apenas uma vez. Os dados da resposta de machos e fêmeas para os diferentes tratamentos em olfatômetro foram analisados utilizando-se o teste Qui-quadrado no programa BioEstat (Ayres et al., 2003). Os insetos que não escolheram nenhum dos braços foram excluídos da análise estatística.

RESULTADOS

Voláteis de ‘Eva’ e ‘Gala’ em diferentes estágios de desenvolvimento. Os compostos detectados em extratos de ‘Eva’ por cromatografia gasosa e suas concentrações são apresentados na Tabela 2.1. No estágio imaturo e em processo de maturação foram detectados, respectivamente, cinco e 17 compostos voláteis e no estágio de maturação fisiológica foram constatados 40 compostos. O número de compostos do extrato de frutos no estágio imaturo aumentou em relação ao estágio de maturação fisiológica, a mesma tendência se repetiu para a concentração destes compostos, exceto o composto de nº 40.

No extrato de frutos ‘Gala’ no estágio de maturação fisiológica foram detectados 13 compostos (Tabela 2.2), mas apenas o composto de nº 40 foi observado em todos os estágios de desenvolvimento.

Ao comparar os extratos de ‘Eva’ e de ‘Gala’, em maturação fisiológica, verifica-se que 26 compostos presentes em ‘Eva’ não foram detectados em ‘Gala’. Entre os compostos comuns às duas cultivares, todos apresentaram concentração superior em ‘Eva’, exceto o composto de nº 1.

Respostas eletrofisiológicas de G. molesta aos voláteis de 'Eva' e 'Gala' em diferentes estágios de desenvolvimento. Houve correlação positiva entre o número de voláteis em estágio de maturação fisiológica e respostas eletrofisiológicas significativas ($r^2= 0,96$ para 'Eva' e $r^2= 0,99$ para 'Gala').

Não foram detectadas respostas eletrofisiológicas de machos virgens e fêmeas (virgens e acasaladas) de *G. molesta* para os extratos de 'Eva' no estágio imaturo (N = 7). Todos os adultos testados responderam eletrofisiologicamente para o composto n° 40 do extrato do estágio processo de maturação, enquanto somente fêmeas virgens responderam para o composto n° 35 (Figura 2.3). A concentração dos compostos que aparecem na linha do cromatógrafo é superior a 2,5 ng/μl.

Obteve-se resposta eletrofisiológica de *G. molesta* para 12 compostos presentes no extrato de 'Eva' no estágio de maturação fisiológica (Figura 2.4). Todos os adultos testados responderam aos mesmos compostos (1,3, 5, 10, 13, 14, 17, 23, 26, 28, 35 e 40) exceto para os compostos n° 1 e 28, que não elicitaram resposta em fêmeas virgens. Os picos presentes na linha do cromatógrafo correspondem aos compostos que apresentam concentração superior a 1,8 ng/μl.

As antenas de *G. molesta* não mostraram sensibilidade quando estimuladas por extratos de 'Gala' no estágio imaturo e em processo de maturação (n=7). Fêmeas virgens e acasaladas e machos virgens responderam eletrofisiologicamente para os mesmos compostos presentes em voláteis de frutos no estágio maturação fisiológica (compostos número 1, 3, 10, 13, 23, 26, 28, 35 e 40), entretanto, fêmeas virgens não responderam para o composto n°28 (Figura 2.5). Os picos mostrados na linha do cromatógrafo correspondem aos compostos com concentração acima de 0,5 ng/μl.

Identificação de voláteis de 'Eva' e 'Gala', em diferentes estágios de desenvolvimento, eletrofisiologicamente ativos para G. molesta. Foram identificados 12 compostos de 'Eva' e 'Gala' que se mostraram eletrofisiologicamente ativos para *G. molesta* (Tabela 2.3). A maioria dos compostos pertence ao grupo químico éster e apenas um ao grupo químico sesquiterpeno. A sequência de hidrocarbonetos utilizada para o cálculo do Índice de Kovats não permitiu a identificação do composto n° 1, entretanto, através da análise do espectro de massas, sugere-se que este seja integrante do grupo éster. Todos os compostos que tiveram atividade para *G. molesta* estavam contidos nos extratos de 'Eva' e 'Gala' obtidos no

estágio de maturação fisiológica, somente os compostos 35 e 40 tiveram atividade no extrato de 'Eva' no estágio processo de maturação (Tabela 2.2).

Os compostos que elicitaram resposta das antenas de *G. molesta* também tiveram aumento de concentração progressiva com a maturação dos frutos. Dentre estes compostos, apenas o 2-metil butanoato de etila, acetato de hexila e α -farneseno foram detectados em todos os estágios de desenvolvimento, ou seja, 12% dos compostos importantes para o reconhecimento do hospedeiro não foram detectados em frutos em processo de maturação e 66,7% destes compostos não foram detectados em frutos imaturos. Para frutos 'Gala', o número de compostos encontrados em todos os estágios de desenvolvimento foi ainda menor, pois apenas o α -farneseno foi encontrado nos três estágios.

Respostas comportamentais em olfatômetro de G. molesta aos voláteis de 'Eva' e 'Gala' em diferentes estágios de desenvolvimento. Não foram obtidas respostas comportamentais de fêmeas virgens de *G. molesta* para extrato de frutos em diferentes estágios de desenvolvimento em olfatômetro (N = 60). Fêmeas acasaladas tiveram respostas significativas quando estimuladas com odores do extrato de 'Eva' no estágio de maturação fisiológica e de 'Gala' no estágio processo de maturação (Tabela 2.3). As respostas de machos virgens estimulados com diferentes odores foram significativas para o extrato do estágio de maturação fisiológica de ambas cultivares. Entre os demais estágios de desenvolvimento, somente o extrato de 'Eva' em processo de maturação atraiu significativamente machos virgens.

DISCUSSÃO

O perfil cromatográfico do extrato de 'Eva' e 'Gala' em estágio imaturo mostrou uma reduzida quantidade de compostos e concentração, em consequência, não houve respostas eletrofisiológicas de machos virgens e fêmeas (acasaladas e virgens). Em contrapartida, houve correlação positiva entre o número de voláteis em estágio de maturação fisiológica e respostas eletrofisiológicas significativas, sugerindo que as mariposas são guiadas por voláteis para a localização de suas plantas hospedeiras (Van Loon, 1996) e a emissão de voláteis por frutos maduros influencia o comportamento dos insetos (Hern e Dorn, 2004). A crescente produção de ésteres do estágio imaturo para a maturação fisiológica é decorrente de processos de

degradação e de síntese de compostos orgânicos (Blanke, 1991). Os ésteres representam de 78 a 92% do perfil volátil e são responsáveis pela mudança no sabor do fruto (Paillard, 1990).

Todas as respostas eletrofisiológicas de *G. molesta* para os compostos de 'Eva' e 'Gala' foram detectadas no estágio de maturação fisiológica, exceção para hexanoato de isoamila e α -farneseno, que também elicitaram resposta quando presentes em estágio de processo de maturação em 'Eva'. O α -farneseno, que esteve presente em todos os estágios de frutos, não estimulou as mariposas-orientais no estágio imaturo, evidenciando que este composto em baixa concentração não elicitava adultos, ao contrário do que acontece para *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) (Valat e Dorn, 2005).

O composto hexanoato de butila elicitou resposta antenal apenas de fêmeas acasaladas de mariposa-oriental, corroborando com os estudos de Natale et al. (2004). Este composto também foi eficiente na atração de fêmeas acasaladas de *C. pomonella* em testes de laboratório, tanto em olfatômetro quanto em túnel de vento (Hern e Dorn, 2004).

O componente de maior expressão no perfil cromatográfico de frutos em maturação fisiológica foi o acetato de hexila, com respostas eletrofisiológicas de todos os adultos a ele. Este composto tem sido descrito como repelente a *C. pomonella* em testes com olfatômetro (Hern e Dorn, 2004), entretanto, o efeito deste composto isolado não foi testado no presente estudo.

Em geral, as antenas reconheceram 12 voláteis por estímulo fisiológico através do eletroantenograma e as mariposas-orientais tiveram um comportamento positivo aos voláteis em olfatômetro no estágio de processo de maturação e maturação fisiológica. A análise destes resultados em conjunto sugere que os voláteis produzidos pelos frutos em via de maturação atraem as mariposas-orientais.

O status de cópula das fêmeas influenciou as respostas comportamentais. Fêmeas virgens de *G. molesta* não foram atraídas por nenhum dos extratos, enquanto que, fêmeas acasaladas foram receptivas aos voláteis. Altafini et al. (2009) observaram uma tendência em que fêmeas acasaladas de *G. molesta* respondem mais aos voláteis de pêsego e maçã do que fêmeas virgens, provavelmente devido a uma maior sensibilidade de fêmeas acasaladas, que utilizam estes voláteis na localização de sítios de oviposição (Valat e Dorn, 2005). Situação semelhante ocorre para *C. pomonella*, onde fêmeas acasaladas demonstraram respostas aos voláteis de maçã maduras (Natale et al, 2004). No caso de machos virgens, a resposta comportamental aos voláteis de 'Eva' e 'Gala' em ambos os estágios de maturação foram

mais intensas (82,7%, Tabela 2.3) em relação às respostas significativas das fêmeas. Isso explica porque machos de tortricídeos voam na copa de macieiras antes mesmo do processo de chamamento das fêmeas (Witzgall et al., 1999), assim como respondem aos mesmos voláteis em túnel de vento (Coracini et al., 2004).

Em pomares no Estado do Paraná, são observados maiores danos em ‘Gala’ do que em ‘Eva’ (L.B.M., comunicação pessoal). Não foi possível evidenciar, através da análise dos voláteis de cada cultivar, a presença de um composto químico que pudesse ser o responsável pela preferência de *G. molesta* por ‘Gala’. O perfil cromatográfico de ‘Eva’ apresentou 27 voláteis que não aparecem em ‘Gala’, apesar disso, estes compostos não elicitaram as mariposas-orientais. A função individual desses compostos é desconhecida, mas é possível que exista uma ação conjunta que influencie na atratividade de *G. molesta*, o que abre possibilidade de novos estudos sobre a importância de compostos secundários assim como a diferença da concentração de compostos atrativos entre cultivares. É provável que o ciclo de vida da praga esteja em sincronia com a fenologia da cultivar ‘Gala’, fazendo com que esta seja mais atacada do que ‘Eva’.

REFERÊNCIAS

- ALTAFINI, D.L., SANT’ANA, J., REDAELLI, L.R. e LORSCHTEITER R. 2009. Influência de fatores endógenos na percepção eletrofisiológica e comportamental de *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) a voláteis de plantas hospedeiras. *Arq. Instit. Biol.*, 76: 651Y658.
- ANSEBO, L., CORACINI, M.D., BENGTSSON, M., LIBLIKAS, I., RAMÍREZ, M., BORG-KARLSON, A.K., TASIN, M. e WITZGALL, P. 2004. Antennal and behavioural response of codling moth *Cydia pomonella* to plant volatiles. *J. Appl. Entomol.*, 128: 488Y493.
- ANSEBO, L., IGNELL, R.L., OFQVIST, J. e HANSSON, B.S. 2005. Responses to sex pheromone and plant odours by olfactory receptor neurons housed in sensilla auricillica of the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Insect Physiol.*, 51: 1066Y1074.
- AYRES, M., AYRES JR. M., AYRES, D.L. e SANTOS A.S. 2003. *BioEstat 3.0 Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Sociedade Civil Mamirauá, Belém.
- BLANKE, M.M. 1991. Respiration of apple and avocado fruits. *Postharv. News Inform.*, 6: 429Y436.
- BRUCE, T. J. A., WADHAMS, L. J. e WOODCOCK, C. M. 2005. Insect host location: a volatile situation. *Trends Plant Sci.*, 10: 269Y227.

- CASADO, D., GEMENO, C., AVILLA, J. e RIBA, M. 2006. Day-night and phenological variation of apple tree volatiles and electroantennogram responses in *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Environ. Entomol.* 35: 258Y267.
- CORACINI, M., BENGTSSON, M., LIBLIKAS, I. e WITZGAL, P. 2004. Attraction of codling moth males to apple volatiles. *Entomol. Exp. Appl.* 110: 1Y10.
- DUSTAN, G. G. 1964. Mating behaviour of the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Olethreutidae). *Can. Entomol.*, 96: 1087Y1093.
- GUENNELON, G., AUDEMARD, H., FREMOND, J.C. e EL IDRISSE AMMARI, M.A. 1981. Progrès réalisés dans l'élevage permanent du Carpocapse (*Laspeyresia pomonella* L.) sur milieu artificiel. *Agronomie* 1: 59Y64.
- HAUAGGE, R. e TSUNETTA, M. 1999. "IAPAR 75- EVA", "IAPAR 76 – ANABELA" e "IAPAR 77 – CARÍCIA" – novas cultivares de macieira com baixa necessidade em frio. *Rev. Bras. Frutic.*, 31: 239Y249.
- HERN, A. e DORN, S. 2004. A female-specific attractant for the codling moth, *Cydia pomonella*, from apple fruit volatiles. *Naturwissenschaften.*, 91:77Y80.
- HICKEL, E.R. 1993. *Pragas do pessegueiro e da ameixeira e seu controle no Estado de Santa Catarina*. Florianópolis: EPAGRI, 45p.
- HORVAT, R.J. e CHAPMAN, G.W. 1990. Comparison of volatile compounds from peach fruit and leaves (cv. Monroe) during maturation. *J. Agric. Food Chem.*, 38: 1442Y1444.
- MASANTE-ROCA, I., GADENNE, C. e ANTON, S. 2002. Plant odour processing in the antennal lobe of male and female grapevine moths, *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Insect Physiol.*, 48: 1111Y1121.
- NATALE, D., MATTIACCI, L., PASQUALINI, E. e DORN, S. 2004. Apple and peach fruit volatiles and the apple constituent, butyl hexanoate attract female oriental fruit moth *Cydia molesta*, in the laboratory. *J. Appl. Ent.*, 128: 22Y27.
- PAILLARD, N. M. M. 1990. The flavour of apples, pears and quinces, pp. 1Y41. In: Morton, L. D., MacLeod, A. J. (eds). *The flavour of fruits*. Amsterdam, The Netherlands, Elsevier Science Publishing Company Inc.
- RENWICK, J.A.A e CHEW, F.S. 1994. Oviposition behavior in Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 377Y400.
- RIBEIRO, L.G. 1999. Principais pragas da macieira, pp. 97Y149. In: BONETTI, J.I.S., RIBEIRO, L.G e KATSURAYAMA, V (eds). *Manual de identificação de doenças e pragas da macieira*. Florianópolis: EPAGRI.

VALLAT, A. e DORN, S., 2005. Changes in volatile emissions from apple trees and associated response of adult female codling moths over the fruit growing season. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 4083Y4090.

VAN LOON, J. J. A. 1996. Chemosensory basis of feeding and oviposition behaviour in herbivorous insects: a glance at the periphery. *Entomol. Exp. Appl.*, 80: 7Y13.

ZARBIN, P. H. G., ARRIGONI, E. B., RECKZIEGEL, A., MOREIRA, J. A., BARALDI, P. T. e VIEIRA, P. C. 2003. Identification of male-specific chiral compound from the sugarcane weevil *Sphenophorus levis*. *J. Chem. Ecol.*, 29: 377Y386

ZARBIN, P.H.; FERREIRA, J.T.B. e LEAL, W. 1999. Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrutural de feromônios de insetos. *Quím. Nova*, 22: 263Y268.

WITZGALL, P., BÄCKMAN, A.C., SVENSSON, M., KOCH, U.T., RAMA, F., EL-SAYED, A., BRAUCHLI, J., ARN, H., BENGTSSON, M. e LÖFQVIST, J. 1999. Behavioral observations of codling moth, *Cydia pomonella*, in orchards permeated with synthetic pheromone. *BioControl*, 44: 211Y237.

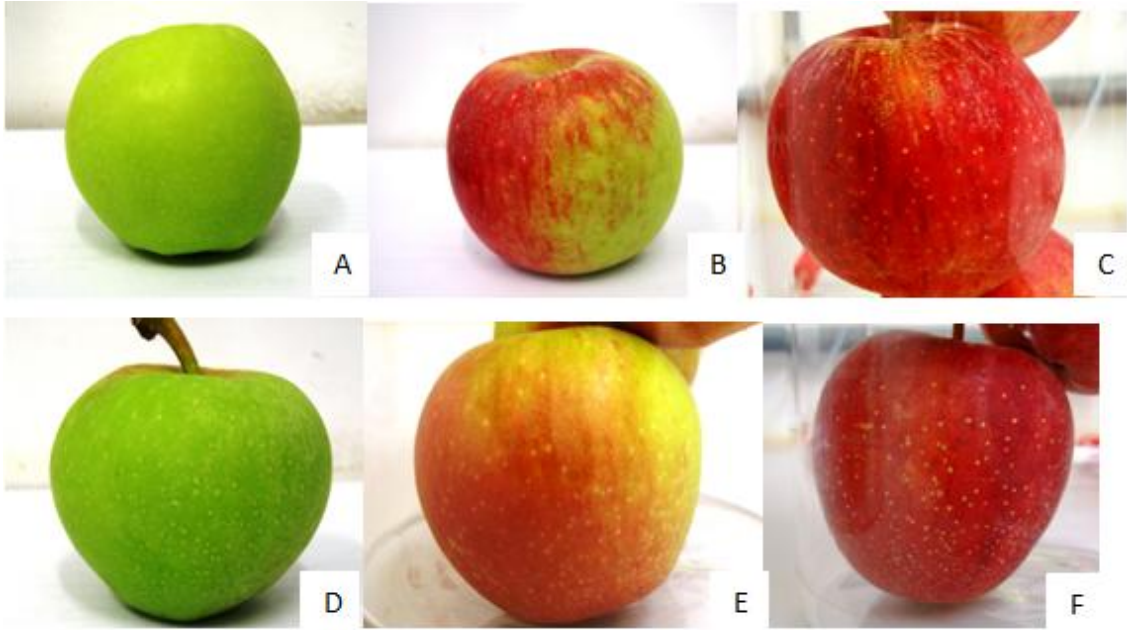


Figura 2.1. Frutos de maçã colhidos em diferentes estágios de desenvolvimento. A) 'Eva' imaturo; B) 'Eva' em processo de maturação; C) 'Eva' em maturação fisiológica; D) 'Gala' imaturo; E) 'Gala' em processo de maturação; F) 'Gala' em maturação fisiológica.

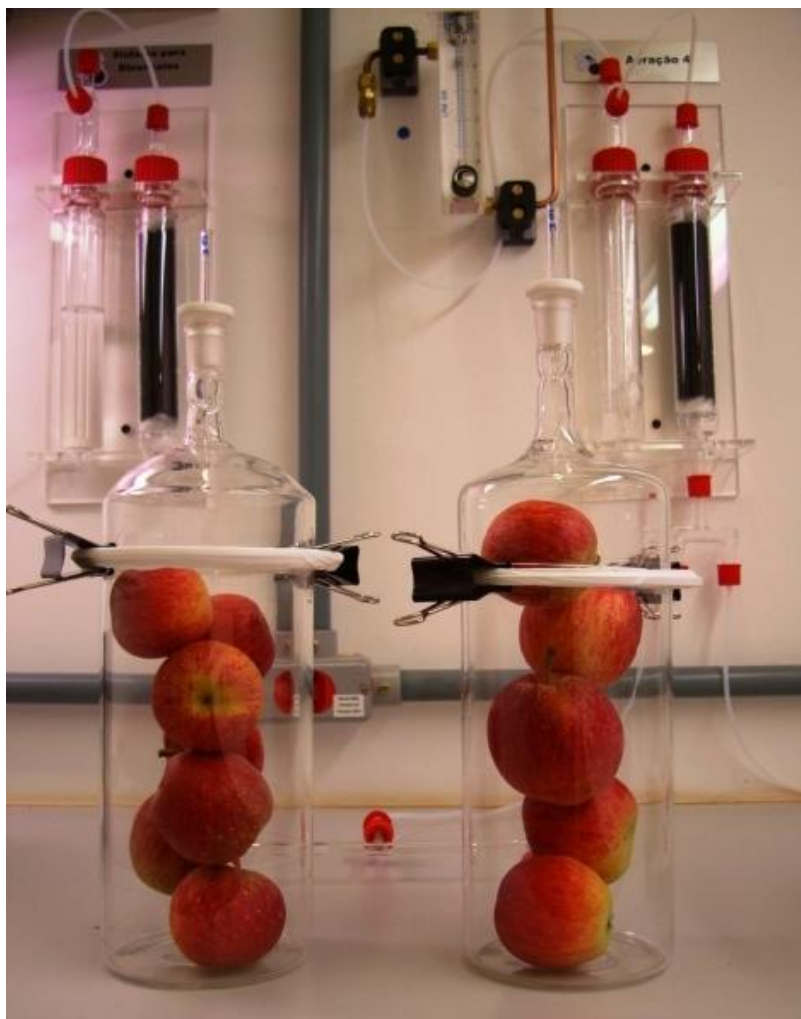


Figura 2.2. Sistema de aeração utilizado para a coleta de voláteis de maçã.

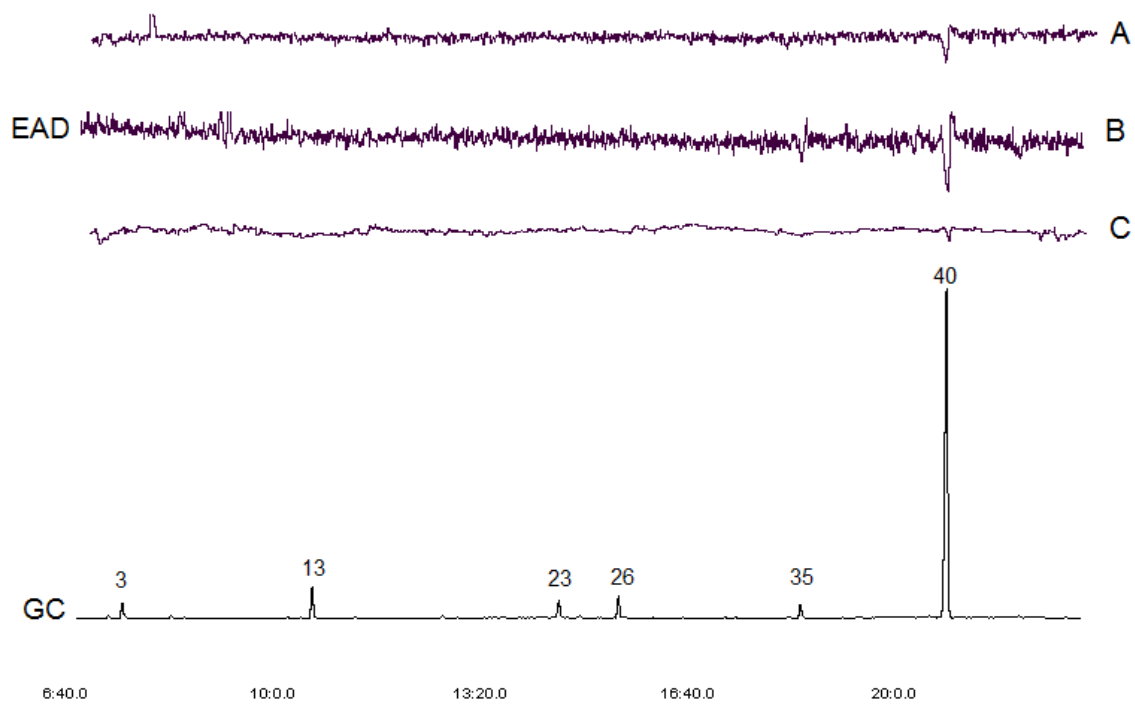


FIGURA 2.3. Respostas eletrofisiológicas de *Grapholita molesta* aos compostos presentes nos extratos de 'Eva' em estágio processo de maturação (N=7). A) Fêmeas acasaladas; B) Fêmeas virgens e C) Macho virgem. EAD- sinal da antena; GC- linha do GC.

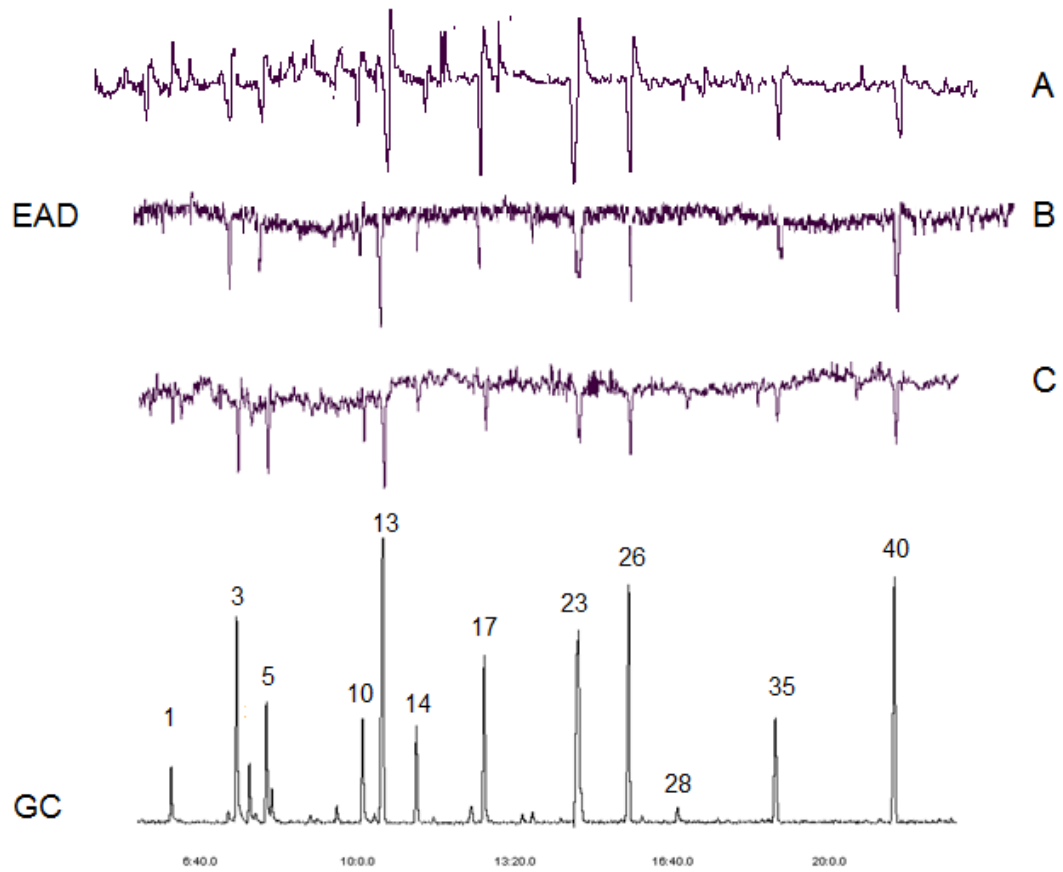


FIGURA 2.4. Respostas eletrofisiológicas de *Grapholita molesta* aos compostos presentes nos extratos de 'Eva' em maturação fisiológica (N= 7). A) Fêmeas acasaladas; B) Fêmeas virgens e C) Macho virgem. EAD- sinal da antena; GC- linha do GC.

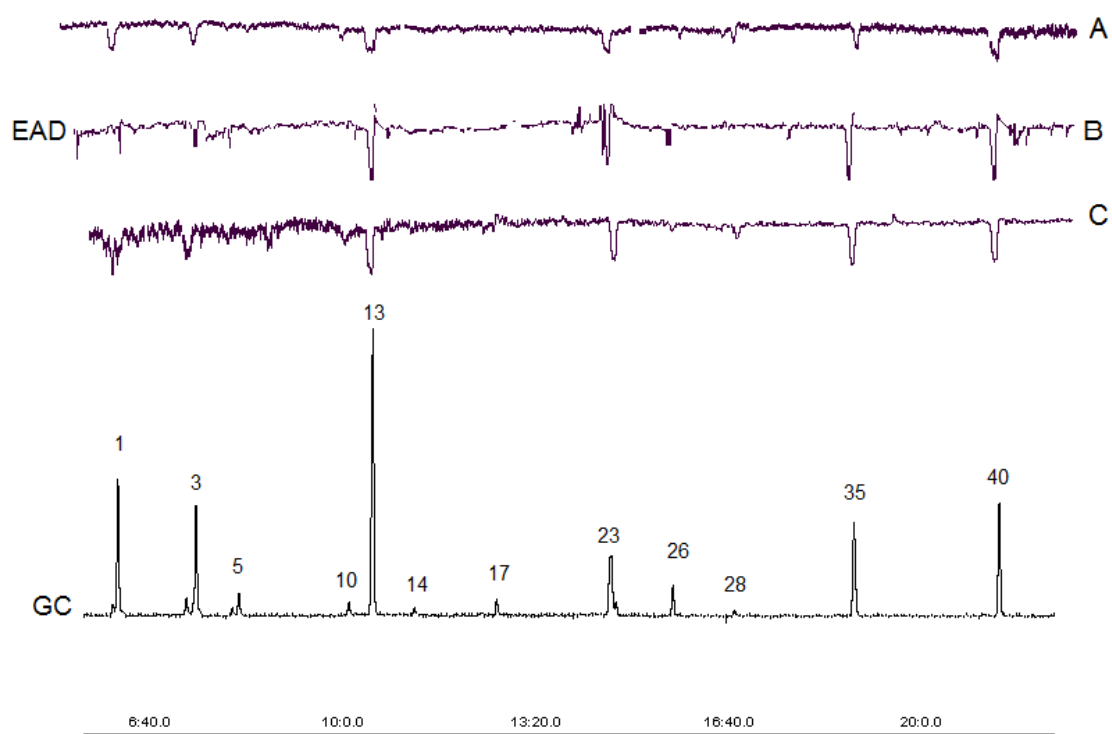


FIGURA 2.5. Respostas eletrofisiológicas de *Grapholita molesta* aos compostos presentes nos extratos de 'Gala' em estágio maturação fisiológica (N=7). A) Fêmeas acasaladas; B) Fêmeas virgens e C) Macho. EAD- sinal da antena; GC- linha do GC.

TABELA 2.1. Compostos presentes nos extratos de maçãs ‘Eva’ e ‘Gala’ em diferentes estágios de desenvolvimento e suas concentrações ($M \pm EPM$), analisados por cromatografia gasosa.

Ordem dos compostos	RT	Cultivar/ Estágio de maturação					
		‘Eva’ \pm EPM (ng/ μ l)			‘Gala’ \pm EPM (ng/ μ l)		
		Imaturo	Processo de maturação	Maturação fisiológica	Imaturo	Processo de maturação	Maturação fisiológica
1	5,9	0,0 \pm 0,0b	1,7 \pm 0,3ab	8,9 \pm 2,9a	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	12,3 \pm 0,9a
2	7,1	0,0 \pm 0,0b	0,1 \pm 0,1b	1,6 \pm 0,5a	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	0,7 \pm 0,1a
3	7,3	0,2 \pm 0,1b	2,6 \pm 0,4b	23,7 \pm 8,7a	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	7,6 \pm 0,2a
4	7,7	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	0,5 \pm 0,1a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a
5	7,9	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	7,8 \pm 1,5a	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	0,5 \pm 0,0a
6	8,0	0,0 \pm 0,0b	0,3 \pm 0,1b	3,3 \pm 0,4a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a
7	8,8	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	0,3 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a
8	9,0	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	0,3 \pm 0,1a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a
9	9,4	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	1,4 \pm 0,3a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a
10	9,9	0,0 \pm 0,0b	0,5 \pm 0,2b	8,9 \pm 1,0a	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	1,4 \pm 0,1a
11	10,0	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	0,3 \pm 0,1a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a
12	10,2	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	0,9 \pm 0,2a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a
13	10,3	0,3 \pm 0,1b	5,9 \pm 0,5b	43,6 \pm 4,6a	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	17,2 \pm 1,2a
14	11,0	0,0 \pm 0,0b	0,1 \pm 0,1b	8,0 \pm 0,1a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,5 \pm 0,0a
15	11,4	0,3 \pm 0,2b	0,1 \pm 0,1b	0,6 \pm 0,1a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a
16	12,2	0,0 \pm 0,0b	0,1 \pm 0,0b	1,4 \pm 0,1a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a
17	12,4	0,0 \pm 0,0b	0,3 \pm 0,1b	15,8 \pm 1,8a	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	1,2 \pm 0,2a
18	12,6	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	0,2 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a
19	13,0	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	0,1 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a
20	13,2	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	0,9 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a
21	13,4	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	1,2 \pm 0,2a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a
22	14,0	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	0,3 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a
23	14,4	0,0 \pm 0,0b	5,1 \pm 0,9b	31,5 \pm 2,0a	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	6,8 \pm 0,2a
24	15,1	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	0,2 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a
25	15,3	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	0,3 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a
26	15,4	0,1 \pm 0,1b	3,4 \pm 0,5b	33,6 \pm 0,6a	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	2,3 \pm 0,5a
27	15,7	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	0,6 \pm 0,1a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a
28	16,4	0,0 \pm 0,0b	0,2 \pm 0,2b	1,8 \pm 0,1a	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	0,5 \pm 0,0a
29	16,5	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	0,2 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a
30	16,7	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	0,2 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a
31	17,2	0,0 \pm 0,0b	0,1 \pm 0,1b	0,8 \pm 0,1a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a
32	17,4	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	0,3 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a
33	18,1	0,0 \pm 0,0b	0,3 \pm 0,1b	0,4 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a
34	18,2	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	0,3 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a
35	18,4	0,0 \pm 0,0b	4,5 \pm 1,2b	19,0 \pm 0,8a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	8,1 \pm 0,4a
36	19,6	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	0,3 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a
37	19,9	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	0,2 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a
38	20,2	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	0,2 \pm 0,1a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a
39	20,5	0,0 \pm 0,0b	0,0 \pm 0,0b	0,1 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a
40	20,8	1,8 \pm 0,8b	75,3 \pm 5,1a	13,7 \pm 0,1b	5,4 \pm 1,3a	0,2 \pm 0,1b	5,2 \pm 1,0a

EPM- erro padrão da média.

RT-tempo de retenção do composto.

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes dentro da mesma cultivar diferem entre si pelo teste de Tukey a 1%.

TABELA 2.2. Compostos presentes em extratos de maçã eletrofisiologicamente ativos para *Grapholita molesta*.

Composto (n°)	Similaridade (%) *	Estágio em que houve resposta		RT	KI
		Eva	Gala		
<i>Grupo Éster</i>					
não identificado (1)	-	MF	MF	5,955	-
2-metil butanoato de etila (3)	95	MF	MF	7,325	851
Valerato de etila (5)	96	MF	MF	7,944	887
Butanoato de butila (10)	97	MF	MF	9,957	979
Acetato de hexila (13)	97	MF	MF	10,370	1009
2-metil butanoato de butila (14)	96	MF	MF	11,078	1028
Propanoato de hexila (17)	95	MF	MF	12,487	1090
Hexanoato de butila (23)	92	MF	MF	14,433	1097
2- metil butanoato de hexila (26)	93	MF	MF	15,454	1143
Hexanoato de pentila (28)	92	MF	MF	16,456	1188
Hexanoato de hexila (35)	95	PM/ MF	MF	18,432	1280
<i>Grupo Sesquiterpeno</i>					
α -farneseno (40)	93	PM/ MF	MF	20,829	1521

PM- processo de maturação

MF-maturação fisiológica

RT- tempo de retenção do composto

KI- índice de Kovats

TABELA 2.3. Porcentagem de respostas de fêmeas acasaladas e machos virgens de *Grapholita molesta* em olfâmetro “Y” para compostos presentes em extratos de ‘Eva’ e ‘Gala’ em diferentes estágios de desenvolvimento.

Fonte de odor	Fêmeas acasaladas				Machos			
	% Resposta				% Resposta			
	N	N	Resposta	Hexano Extrato	N	N	Resposta	Hexano Extrato
<i>‘Eva’</i>								
imaturo x hexano	40	5	60*	40	40	8	50	50
proc. maturação x hexano	40	10	50	50	40	13	15	85*
maturação fisiol. x hexano	40	13	31	69*	45	17	8	92*
<i>‘Gala’</i>								
imaturo x hexano	40	4	50	50	40	6	100*	0
proc. maturação x hexano	40	5	40	60*	40	14	50	50
maturação fisiol. x hexano	40	9	56	44	40	14	29	71*

* Diferença estatística significativa ($p < 0,05$), teste χ^2 .

**CAPÍTULO III: EFEITO DE VOLÁTEIS DE MAÇÃ E FEROMÔNIO SEXUAL
SINTÉTICO NA ATRAÇÃO DE MACHOS DE MARIPOSA-ORIENTAL**

EFEITO DE VOLÁTEIS DE MAÇÃ E FEROMÔNIO SEXUAL SINTÉTICO NA
ATRAÇÃO DE MACHOS DE MARIPOSA-ORIENTAL

EFFECT OF APPLE VOLATILE AND SYNTHETIC SEX PHEROMONE IN THE
ATTRACTION OF ORIENTAL FRUIT MOTH MALES

*artigo a ser submetido à revista Bragantia

RESUMO

Os cairomônios têm sido investigados como alternativa para o manejo comportamental de pragas, pois além de indicar a presença do alimento, induzem, entre outras ações, a alimentação e a oviposição. A associação destes voláteis pode aumentar o poder de atração do feromônio em várias ordens de insetos, incluindo os lepidópteros. A atração de machos de mariposa-oriental, *Grapholita molesta*, aos voláteis de maçã ‘Gala’ madura e feromônio sexual sintético foi avaliada em laboratório, através de bioensaios em olfatômetro “Y” e em testes de campo, com a instalação de armadilhas do tipo Delta. Nas condições testadas, não houve aumento da atração de machos na associação entre feromônio e voláteis de maçã madura. Armadilhas instaladas em campo com extrato de maçã madura capturaram apenas machos. Não houve incremento nas capturas em armadilhas com feromônio sintético e extrato de maçã madura.

Palavras-chave: *Grapholita molesta*, Lepidoptera, Tortricidae, olfatômetro, teste de campo.

ABSTRACT

Kairomones have been investigated as an alternative to pest behavioral management; besides indicating the presence of food, they induce feeding and oviposition, among other actions. The association of these volatiles may increase pheromone attractiveness in several insects' orders, including Lepidoptera. The attraction of oriental fruit moth males, *Grapholita molesta*, to mature ‘Gala’ apple volatiles and synthetic sex pheromone was evaluated in laboratory with “Y” olfactometer bioassays and in the field with Delta traps. Under these conditions, there was no increase in male attraction with the association of pheromone and volatiles from mature apples. Traps installed in the field with mature apple extract captured only males. There was no increase in captures in traps baited with synthetic pheromone and mature apple extract.

Keywords: *Grapholita molesta*, Lepidoptera, Tortricidae, olfactometer, Field test.

1. INTRODUÇÃO

Grapholita molesta (Busck) é um microlepidóptero da família Tortricidae, originário do continente asiático (Gonzalez, 1989) e com distribuição cosmopolita, que tem como principais hospedeiros espécies da família Rosaceae (Rotschild e Vickers, 1991). A identificação e síntese do seu feromônio sexual, composto por (Z)-8 acetato de dodecenila, (E)-8 acetato de dodecenila, e (Z)-8 dodecen-1-ol (Roelofs et al., 1969), possibilitou a utilização no monitoramento da espécie (Phillips, 1973).

A descoberta de novos compostos para complementar a ação do feromônio e também atrair fêmeas tem sido relatada nos últimos anos. Os caimônios têm sido investigados como alternativa para o manejo comportamental de pragas (Fernández et al., 2010; Knight e Luz, 2005; Il'ichev, 2004), pois estas substâncias químicas além de indicar a presença do alimento, induzem, entre outras ações, a alimentação e a oviposição (Nation, 2002). Um dos casos de maior sucesso do uso de caimônios é a utilização do chamado “éster de pêra” (etil (E, Z) - 2,4 decadienoato), identificado a partir de pêras ‘Bartlett’ maduras, no monitoramento de *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) em pomares com confusão sexual na América do Sul e do Norte (Knight et al., 2005) e Europa (Ioriatti et al., 2003).

Os voláteis de planta provocam uma resposta positiva sobre o comportamento dos insetos em resposta a feromônios sexuais liberados em associação com a planta hospedeira. Este efeito pode resultar em sinergismo, no qual a resposta à mistura de produtos voláteis de feromônios e da planta é maior do que as respostas aos componentes individuais. Estudos sobre a resposta ao sinergismo entre feromônios e os odores da planta hospedeira foram realizados para várias ordens de insetos, incluindo mariposas (Dickens et al., 1990; 1993a, b; Reddy e Guerrero, 2000; Deng et al., 2004), besouros (Zhang e Schlyter, 2003), e moscas (Landolt et al., 1992). No caso de mariposas, onde há liberação do feromônio sexual pelas fêmeas, uma das possíveis razões para uma atração adicional de machos na presença de voláteis de planta seria a maior probabilidade de que fêmeas acasaladas estejam próximas dos locais de oviposição, facilitando o encontro de parceiros para o acasalamento (Landolt e Philips, 1997).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da interação entre voláteis de maçã e feromônio sexual sintético na atração de machos de *G. molesta*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de voláteis de maçãs - A coleta dos voláteis de maçãs foi feita pelo processo de aeração (Zarbin et al., 1999). Foram utilizadas câmaras de vidro, onde foram colocados 400 g de maçãs 'Gala'. Um fluxo contínuo de ar umidificado e filtrado carregou os voláteis liberados pelos frutos, que ficaram impregnados em colunas de vidro contendo 0,8 g de polímero adsorvente Super Q[®] (80/100 Mesh, Alltech Assoc., IL, USA) (Zarbin et al., 2003). Após 24 horas do início da aeração foi realizada a dessorção dos compostos liberados utilizando 400 µl de solvente hexano bidestilado.

Impregnação de voláteis em septos de borracha – O extrato de maçã foi impregnado em septos de borracha. Cada septo recebeu 600µl de extrato. Após a volatilização do hexano, os septos foram envoltos em papel alumínio e levados a campo.

Insetos - Adultos de *G. molesta* foram coletados em Porto Amazonas (PR) e mantidos em garrafas pet para a oviposição. As larvas foram multiplicadas em dieta artificial, de acordo com metodologia descrita por Guennelon et al. (1981) e mantidas em sala de criação com temperatura de 25±1°C, 70% umidade relativa e fotoperíodo de 16:8 h (L:E). Para a realização dos bioensaios, as pupas foram sexadas e separadas em placas de Petri para a obtenção de machos virgens.

Bioensaio em olfatômetro- A resposta comportamental de machos adultos de *G. molesta* foi verificada usando olfatômetro "Y", constituído de um tubo principal e dois tubos laterais de vidro (20 x 3 cm). Foi mantido fluxo de ar contínuo de 4 l/min, previamente umidificado e filtrado com carvão ativado. Machos foram introduzidos individualmente na base do tubo principal do olfatômetro, observando seu comportamento por 10 minutos. A resposta foi registrada quando o inseto caminhou contra o fluxo de ar em direção a fonte de odor e como

não resposta quando o inseto não caminhou contra o fluxo de ar durante o tempo de observação. A cada quatro insetos testados, o olfatômetro foi limpo com álcool e um fluxo de ar limpo foi carregado por 5 minutos, sendo a posição dos braços do olfatômetro invertida para evitar qualquer interferência externa.

Foram conduzidos três experimentos: (i) resposta de machos virgens para feromônio comercial; (ii) resposta de machos virgens para extrato de maçã ‘Gala’ madura e (iii) resposta de machos virgens para feromônio comercial associado ao extrato de maçã ‘Gala’ madura. Para cada repetição confrontou-se um dos tratamentos *vs* controle (solvente Hexano). Em todos os experimentos foram testados pelo menos 30 insetos, considerando cada indivíduo como uma repetição. A fonte de odor foi trocada a cada indivíduo testado. Os experimentos foram realizados durante o início da escotofase, quando os insetos estavam em maior atividade (Dustan, 1964), utilizando luz vermelha (70 w). Cada inseto foi testado apenas uma vez. Os dados da resposta para os diferentes tratamentos em olfatômetro foram analisados utilizando-se o teste Qui-quadrado no programa BioEstat (Ayres et al. 2003). Os insetos que não escolheram nenhum dos braços foram excluídos da análise estatística.

Teste de campo – O estudo foi conduzido em pomar comercial de maçã ‘Condessa’, localizado no município de Lapa (PR). O pomar foi implantado em 1997, com condução das macieiras no espaçamento 4,5 x 1,5 metros, com área total de três ha. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com três tratamentos, sendo i) feromônio sexual sintético Biographolita® (Biocontrole), ii) extrato de maçã ‘Gala’ madura e iii) feromônio sexual sintético Biographolita® + extrato de maçã ‘Gala’ madura. Os septos contendo os tratamentos foram colocados em armadilhas do tipo Delta com piso colante no fundo, colocadas a 1,8 m de altura em ramos de macieiras e separadas 50 m entre si. O monitoramento das armadilhas foi realizado semanalmente, entre os dias 15/08/2011 e 09/09/2011. O efeito dos atrativos na captura de adultos de *G. molesta* foi analisado através do teste F ao nível de ($P \leq 0,05$) e a comparação de médias pelo teste de Fisher – LSD (Least Significant Difference), utilizando-se o software STATGRAPHICS Centurion XVI. Os dados que não apresentaram normalidade pelo teste Shapiro-Wilk foram transformados em $\sqrt{x+1}$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teste de laboratório- Não houve um número significativo de respostas para os odores testados (Tabela 1). Dentre as respostas obtidas, observou-se que não houve efeito aditivo na atração de machos com a associação entre voláteis de maçã madura e o feromônio. Os resultados deste estudo são contraditórios aos resultados encontrados por Light et al. (1993) para *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae) e Reddy e Guerrero (2000) para *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae), em que houve sinergismo entre feromônio e voláteis de planta. É importante ressaltar que estes bioensaios foram realizados em túnel de vento, o que poderia melhorar as respostas de insetos que são bons voadores, como o caso de *G. molesta*. Varela et al. (2011) testaram doses subótimas de feromônio e houve aumento da resposta de machos de *G. molesta* na associação de feromônio aos voláteis de maçã. Entretanto, quando os voláteis de planta foram testados sozinhos, os insetos não responderam a este estímulo. No presente estudo, a dose de feromônio testada foi a comercial. Isto sugere que, uma vez atingido o limiar de resposta com a dose ótima de feromônio, a presença dos voláteis de planta não modifica a resposta dos insetos.

Teste de campo- Houve diferença significativa entre as capturas de *G. molesta* com feromônio e extrato de maçã (Figura 1), sendo que o feromônio sintético capturou o maior número de indivíduos. Apenas machos foram atraídos pelas armadilhas com voláteis de maçã madura, em conformidade com o estudo de Coracini et al. (2004). Não houve incremento nas capturas em armadilhas com os dois atrativos associados, indicando que não ocorreu sinergismo entre os dois atrativos.

4. REFERÊNCIAS

CORACINI, M.; BENGTSSON, M.; LIBLIKAS, I. e WITZGALL, P. Attraction of codling moth males to apple volatiles. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 110, p. 1–10, 2004.

DENG, J. Y.; WEI, H. Y.; HUANG, Y. P. e DU, J. W. Enhancement of attraction to sex pheromone of *Spodoptera exigua* by volatile compounds produced by host plants. **Journal of Chemical Ecology**, v. 30, p. 2037 – 2045, 2004.

DICKENS, J. C. ; JANG, E. B. ; LIGHT, D. M. e ALFORD, A. R. Enhancement of insect pheromone responses by green leaf volatiles. **Naturwissenschaften**, v.77 p. 29 – 31, 1990.

DICKENS, J. C. ; SMITH, J.W. e LIGHT, D.M. Green leaf volatiles enhance sex attractant pheromone of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Lep.: Noctuidae). **Chemoecology**, v. 4, p.175 – 177, 1993a.

DICKENS, J. C. ; VISSER, J. H. e VAN DER PERS, J. M. C. Detection and deactivation of pheromone and plant odor components by the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 39: p.503 – 516, 1993b.

DUSTAN, G.G. Mating behaviour of the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Olethreutidae). **Canadian Entomologist**, v. 96, p. 1087-1093, 1964.

FERNÁNDEZ, D. E. ; CICHON, L. ; GARRIDO, S. ; RIBES-DASI, M. e AVILLA, J. Comparison of lures loaded with codlemone and pear ester for capturing codling moths, *Cydia pomonella*, in apple and pear orchards using mating disruption. **Journal of Insect Science**, v.10: 139-, 2010.

GONZALEZ, R. H. **Fenologia de la grapholita o polilia oriental del durazno**. Aconex 12 p.5-12, 1989.

GUENNELON, G.; AUDEMARD, H.; FREMOND, J.C. e EL IDRISSE AMMARI, M.A. Progrès réalisés dans l'élevage permanent du Carpocapse (*Laspeyresia pomonella* L.) sur milieu artificiel. **Agronomie**, v. 1, p. 59-64, 1981.

IL'ICHEV, A. L.; WILLIAMS, D. G. e MILNER, A. D. Mating disruption barriers in pome fruit for improved control of oriental fruit moth *Grapholita molesta* Busck (Lep., Tortricidae) in stone fruit under mating disruption. **Journal Applied Entomology**, v. 128, p. 126–132, 2004.

IORIATTI, C.; DE CRISTOFARO, A.; MOLINARI, F.; PASQUALINI, E.; SCHMIDT, S. e ESPINHA I. The plant volatile attractant (2E, 4Z)-2,4-ethyl-decadienoate for Codling Moth monitoring. **Bollettino di Zoologia agraria e di Bachicoltura**, Ser. II, 35 v. 2, p. 127-135, 2003.

KNIGHT, A.L.; HILTON, R. e LIGHT, D.M. Monitoring codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in apple with blends of ethyl (E,Z)-2,4-decadienoate and codlemone. **Environmental Entomology**, 34 v.3, p. 598-603, 2005.

LANDOLT, P. J. e PHILLIPS, T. W. Host plant influences on sex pheromone behavior of phytophagous insects. **Annual Review Entomology**, v.42, p.371-391, 1997.

LANDOLT, P. J.; REED, H. C. e HEATH, R. R. Attraction of female papaya fruit fly (Diptera: Tephritidae) to male pheromone and host fruit. **Environmental Entomology**, v. 21, p.1154 – 1159, 1992.

LIGHT, D. M.; FLATH, R. A.; BUTTERY, R. G.; ZALOM, F. G.; RICE, R. E.; DICKENS, J. C. e JANG, E. B. Host-plant green-leaf volatiles synergize the synthetic sex pheromones of the corn earworm and codling moth (Lepidoptera). **Chemoecology**, v.4, p. 145-152, 1993.

NATION, J. L. Nutrition.. In J.L. Nation. **Insect physiology and biochemistry**. CRC Press: New York. p.65-87. 2002.

PHILLIPS, J. H. H. Monitoring for oriental fruit moth with synthetic sex pheromone. **Environmental Entomology**, v. 2, p.1039-1042, 1973.

REDDY, G. V. P. e GUERRERO, A. Behavioral responses of the diamond-back moth, *Plutella xylostella*, to green leaf volatiles of *Brassica oleracea* subsp. *capitata*. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 48 p. 6025 – 6029, 2000.

ROELOFS, W.L.; COMEAU, A. e SELLE, R. Sex pheromone of the oriental fruit moth. **Nature**, v. 224, p.723, 1969.

ROTSCHILD, G. L. H. e VICKERS, R. A. Biology, ecology and control of the Oriental fruit moth. In: Tortricid pests: their biology, natural enemies and control. Ed:Van Der Geest L P S, Evenhuis H H, Elsevier, New York, 1991, p.389–412.

VARELA, N.; AVILLA, J.; ANTON, S. e GEMENO, C. Synergism of pheromone and host-plant volatile blends in the attraction of *Grapholita molesta* males. **Entomologia Experimentalis et applicata**, v. 141, p.114–122, 2011.

ZARBIN, P. H. G.; ARRIGONI, E. B.; RECKZIEGEL, A.; MOREIRA, J. A.; BARALDI, P. T. e VIEIRA, P. C. Identification of male-specific chiral compound from the sugarcane weevil *Sphenophorus levis*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, p.377-386, 2003.

ZARBIN, P.H.; FERREIRA, J.T.B. e LEAL, W. Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrutural de feromônios de insetos. **Química Nova**, v. 22, p.263-268, 1999.

ZHANG, Q. H. ; SCHLYTER, F. Redundancy, synergism, and active inhibitory range of non-host volatiles in reducing pheromone attraction in European spruce bark beetle *Ips typographus*. **Oikos**, v. 101, p. 299 – 310, 2003.

TABELA 1. Respostas de machos virgens de *Grapholita molesta* em olfatômetro em “Y” para feromônio sexual sintético e extrato de maçã ‘Gala’ madura.

Odor	resposta		
	extrato	controle	sem resposta
Feromônio	3	3	24
Maçã	2	4	24
Maçã + Fero	2	2	26

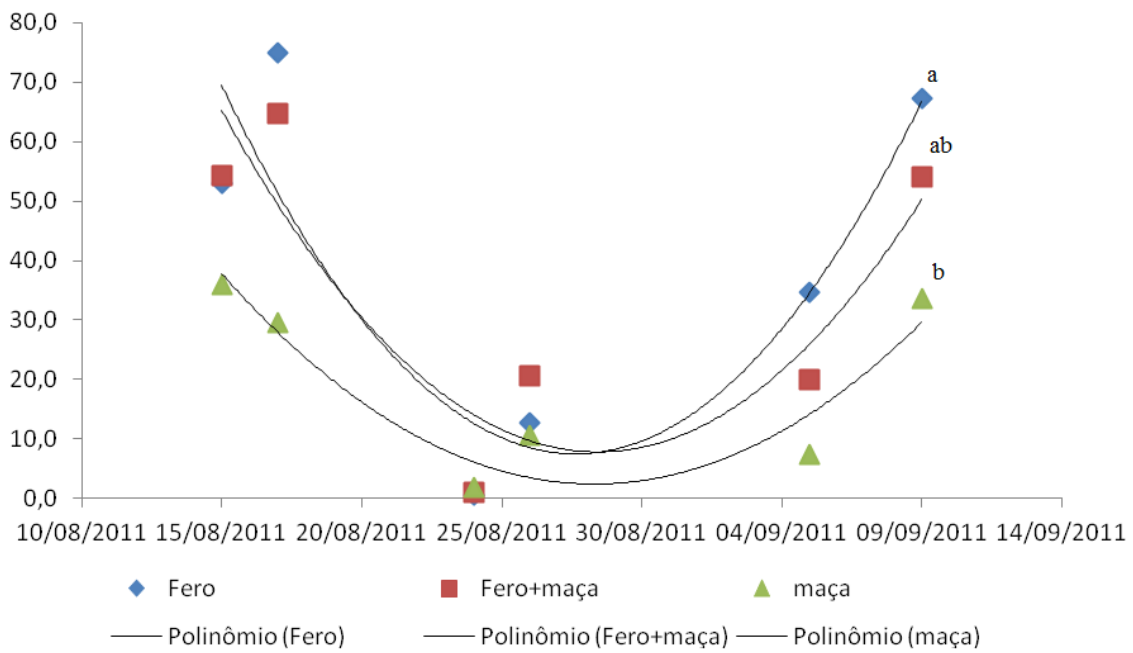


FIGURA 1. Capturas médias de *Grapholita molesta* com feromônio sintético, voláteis de maçã e voláteis de maçã com o feromônio sintético em pomar comercial de maçã ‘Condessa’ (Lapa, 2011).