

VANUSA RODRIGUES HORAS

***“Crociosema aporema (Walsingham, 1914) (LEPIDOPTERA:
TORTRICIDAE): RESPOSTA OLFATIVA AOS VOLÁTEIS DA
SOJA E COMPORTAMENTO DE ACASALAMENTO”***

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

Curitiba
2009

VANUSA RODRIGUES HORAS
Bióloga

**“*Crociosema aporema* (Walsingham, 1914) (LEPIDOPTERA:
TORTRICIDAE): RESPOSTA OLFATIVA AOS VOLÁTEIS DA
SOJA E COMPORTAMENTO DE ACASALAMENTO”**

Orientador:
Prof. Dr. Paulo Henrique G. Zarbin

Curitiba
2009

VANUSA RODRIGUES HORAS

"*Crociosema aporema* (Walsingham, 1914) (LEPIDOPTERA:
TORTRICIDAE): RESPOSTA OLFATIVA AOS VOLÁTEIS DA SOJA E
COMPORTAMENTO DE ACASALAMENTO"

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de "Mestre em Ciências Biológicas", no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



Prof. Dr. Paulo Henrique Gorgatti Zarbin (Orientador)
(UFPR)



Prof. Dr. Andrés González Ritzel
(Universidad de la Republica - Uruguay)



Profa. Dra. Cibele Stramare Ribeiro-Costa
(UFPR)

Curitiba, 05 de fevereiro de 2009.

OFEREÇO

**Aos meus pais Francisco Pereira Horas e Alda Líria Rodrigues Horas
por sempre estarem ao meu lado mesmo a distância**

DEDICO

**Ao meu esposo, Sérgio Horas, à minha filha, Isabella Horas
pelo amor e apoio incondicional**

AGRADEÇO

**À Deus por iluminar meu caminho e me dar forças
para seguir sempre em frente**

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela concessão da bolsa de estudos;

A Universidade Federal do Paraná (**UFPR**), pela oportunidade de realização do curso de Mestrado em Ciências Biológicas/Entomologia;

Ao meu **Orientador** Prof. Paulo Henrique G. Zarbin, pela oportunidade e pela grande contribuição na minha especialização profissional;

Aos **professores** Andrés González Ritzel, Cibele Stramare Ribeiro-Costa, por aceitarem participar da banca examinadora da minha defesa de dissertação.

Ao **grupo Semioquímicos**, Mauro, Angela, Irineu, Diogo, Carla pela amizade, e em especial a Bianca, Marcy e Miryan pelo apoio;

A **Fazenda Experimental Gralha Azul** pertencente à Pontifícia Universidade Católica do Paraná, localizada no Município de Fazenda Rio Grande, PR., por permitir a coleta dos insetos para realização dos experimentos;

Agradeço aos **Mestres** pela dedicação, paciência e sabedoria com que transmitiram os seus conhecimentos e experiência ao longo desses anos de convivência, especialmente a prof^a Mirna Martins Casagrande pela amizade;

A **Patrik** Luiz Pastori e **Alex** Sandro Poltronieri pela amizade e valiosa contribuição na formulação da dieta artificial, desejo a vocês “sucesso”!

Aos **colegas** do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/Entomologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), pela amizade, convívio e companheirismo na realização dos trabalhos no decorrer do curso;

Aos **funcionários da biblioteca** de Ciências Biológicas, com especial agradecimento a bibliotecária Telma, pelo auxílio na busca de algumas referências bibliográficas enquanto estava de licença maternidade;

E a todas as **peçoas**, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
Resumo	vi
Abstract	vii
Introdução	01
Revisão de Literatura	04
Referências	13

CAPÍTULO I

Resposta olfativa de *Crociosema aporema* (Walsingham, 1914)

(Lepidoptera: Tortricidae) aos voláteis da soja	20
Resumo.....	20
Introdução.....	21
Material e Métodos.....	24
Resultados e Discussão.....	35
Conclusões.....	41
Referências.....	42

CAPÍTULO II

Comportamento de acasalamento de *Crociosema aporema*

(Walsingham, 1914) (Lepidoptera: Tortricidae)	50
Resumo.....	50
Introdução.....	51
Material e Métodos.....	53
Resultados e Discussão.....	55
Conclusões.....	65
Considerações Finais.....	66
Referências.....	68

**“*Crocidosema aporema* (Walsingham, 1914) (LEPIDOPTERA:
TORTRICIDAE): RESPOSTA OLFATIVA AOS VOLÁTEIS DA
SOJA E COMPORTAMENTO DE ACASALAMENTO”**

RESUMO - Na presente pesquisa investigou-se a resposta olfativa de adultos de *C. aporema* (Walsingham, 1914) (Lepidoptera: Tortricidae) aos voláteis da soja e o seu comportamento de acasalamento. Foi desenvolvida uma metodologia de criação da mariposa em condições de laboratório, utilizando-se dieta artificial. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Semioquímicos do Departamento de Química, na Universidade Federal do Paraná. No estudo da resposta olfativa de *C. aporema* utilizou-se um olfatômetro em “Y”, e foi verificada a atratividade de fêmeas virgens aos voláteis de diferentes estágios fenológicos da soja: brotos, folhas, vagens e planta inteira. A fonte de odor mais atrativa foi então testada com machos virgens e fêmeas acasaladas. Os resultados demonstraram respostas significativas de fêmeas virgens aos voláteis emitidos pelas diferentes partes da planta quando comparados ao controle ($P < 0.0001$), tendo preferência por voláteis de vagem. Tanto machos virgens ($P = 0.002$) como fêmeas acasaladas ($P = 0.0001$) foram atraídos para voláteis de vagem. O comportamento de acasalamento de *C. aporema* foi realizado por observação direta e demonstrou que as fêmeas apresentam uma postura de chamamento, sendo responsável pela atração sexual. O macho, após ser estimulado pelo feromônio sexual, aproxima-se da fêmea e realiza a corte. O horário de acasalamento concentra-se entre quatro a seis horas após o início da escotofase. A cópula ocorreu com maior frequência entre adultos de dois a sete dias de idade, com uma duração média de 80 min, e a maioria das fêmeas (88%) acasalou uma única vez.

**“*Crocidosema aporema* (Walsingham, 1914) (LEPIDOPTERA:
TORTRICIDAE): OLFACTORY RESPONSE TOWARDS
SOYBEAN VOLATILES AND MATING BEHAVIOUR”**

ABSTRACT – This research aimed to study the olfactory response of *C. aporema* (Walsingham, 1914) (Lepidoptera: Tortricidae) adults to soybean volatiles and its mating behavior. A laboratory rearing methodology was developed for this moth, using an artificial diet. The study was done at the Laboratório de Semioquímicos at the Departamento de Química, University Federal of Paraná. The study of the olfactory response of *C. aporema* adults was done using a “Y”-olfactometer, in which the attractiveness of virgin females was tested towards different soybean phenological stages: buds, leaves, pods and the whole plant. The most attractive source was then used for bioassays with virgin males and mated females. The results showed a significant response of virgin females to volatiles emitted by different parts of the plant compared to the control ($P < 0.0001$), with a strongest preference for the volatiles from the pods. Both virgin males ($P = 0.002$) and mated females ($P = 0.0001$) were attracted to the volatiles from the pods. The *C. aporema* mating behavior was studied by direct observation, and it was found that females present a calling position and are responsible for sexual attraction. The male approaches the female after being stimulated by the sex pheromone and copulates. Mating occurs between four to six hours onset the begin of the scotophase, between adults from 2 to 7 days old. With a mean duration of 80 min of copulation, and the majority of females (88%) mating only once.

INTRODUÇÃO

Em 2000, o Brasil foi o segundo maior produtor mundial de soja (*Glycine max*), sendo os Estados do Paraná e o do Mato Grosso os maiores produtores, responsáveis por cerca de 24,5% e 21,8%, da produção nacional, respectivamente. O Estado de São Paulo a cada ano vem aumentando sua área plantada, contribuindo atualmente com 4,5% da produção da referida leguminosa (Agrianual, 2000). Esta cultura esta sujeita ao ataque de diversos insetos desde a germinação até a colheita (Hoffmann-Campo *et al.*, 2000).

Dentre as principais espécies de insetos que ocorrem em soja, *Crociosema aporema* (Walsingham, 1914) (Lepidoptera: Tortricidae), popularmente conhecida como “broca das axilas” ou “broca dos ponteiros” vem preocupando agricultores das regiões Sul e Sudoeste do Estado do Paraná, por ter marcante preferência por regiões de clima frio (Iede & Foerster, 1982).

É na soja que este inseto vem assumindo uma importância crescente como praga, tanto pelas suas infestações como pelo seu difícil controle. As lagartas atacam os brotos e folíolos novos, tecendo teias que os mantêm enrolados e neles se alimentando, impedindo seu desenvolvimento normal. Os folíolos que, durante o desenvolvimento inicial, sofreram o ataque dessa lagarta, mostram-se deformados e enrugados, assemelhando-se a danos de origem mecânica, como aqueles causados por granizo e fortes ventos (Lourenção & Miranda, 1983).

Quando há morte dos ponteiros nos estádios iniciais de desenvolvimento da planta, ocorre redução em sua altura, o que prejudica a colheita mecânica, principalmente em

cultivares de ciclo precoce. Essa lagarta pode também atacar hastes, flores e vagens (Lourenção & Miranda, 1983).

A forma de controle mais utilizada para impedir o ataque desta praga, tem sido o controle químico, através de inseticidas a partir de 25% - 30% de plantas com ponteiros atacados (EMBRAPA/CNPSO, 2008). Devido a isto, as aplicações de agrotóxicos vêm aumentando, causando poluição ao meio ambiente, onerando o custo de produção e diminuindo os inimigos naturais.

A melhoria da qualidade do processo produtivo, com conseqüente diminuição dos custos de produção e da poluição agrícola exige, atualmente, o desenvolvimento de novas técnicas de manejo das pragas que atacam esta cultura.

Devido à necessidade de emprego de técnicas menos agressivas ao meio ambiente e ao homem, a utilização de semioquímicos apresenta potencial para ser desenvolvida e adicionada ao manejo integrado desta praga, uma vez que, são substâncias que atuam apenas sobre o comportamento dos organismos.

Os semioquímicos estão sendo utilizados no monitoramento e controle de diversos lepidóptero praga. Dentre os semioquímicos, os feromônios já são utilizados e comercializados mundialmente para o monitoramento, coleta massal e confundimento (interrupção de acasalamento) dos insetos. Assim, feromônios dos insetos, semioquímicos de plantas, ou ambos combinados, foram utilizados com sucesso no monitoramento de alguns Tortricidae (Hendry *et al.*, 1975; Unelius *et al.*, 1996; Leal *et al.* 2001; Light *et al.*, 2001).

A broca-das-axilas é um inseto promissor para ser controlado por meio da utilização de semioquímicos, pois apresentam hábito endofítico. Como já observado por Jutsum & Gordon (1989), o emprego de semioquímicos como agente de controle de pragas é

especialmente promissor para espécies que se alimentam no interior de órgãos da planta, os quais geralmente são de difícil controle pelos inseticidas convencionais.

Assim, o manejo integrado visando minimizar os impactos das pragas da soja através do uso de semioquímicos, constitui uma demanda de pesquisa que permitirá melhorias significativas na qualidade ambiental, traduzindo-se na otimização dos recursos naturais, na redução dos custos de produção, na melhoria da qualidade de vida dos produtores e consumidores, na qualidade e competitividade dos produtos e na sustentabilidade da atividade.

Portanto, este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar a resposta de *C. aporema* aos semioquímicos da planta hospedeira ou do próprio inseto, susceptíveis de serem utilizados no manejo desta praga.

REVISÃO DE LITERATURA

Semioquímicos

Os insetos são os seres vivos que mais utilizam os odores para desempenhar suas funções vitais (localização de presas, defesa e agressividade, seleção de plantas hospedeiras, escolha dos locais para oviposição, corte e acasalamento) (Tegoni *et al.*, 2004). Durante o comportamento de busca e seleção de hospedeiros os insetos entomófagos utilizam sinais de diferente natureza, entre eles vários semioquímicos produzidos pelas plantas hospedeiras, insetos fitófagos e até materiais inertes (Godfray, 1994).

O conhecimento sobre o papel dos odores na interação entre insetos avançou a partir da década de 60, principalmente pelos trabalhos com semioquímicos em lepidópteros (Rochat, 1987).

As substâncias químicas usadas na comunicação, em geral, são denominadas semioquímicos, o que significa “sinais químicos”, podendo ser estes aleloquímicos ou feromônios, dependendo da ação que provoquem. Os aleloquímicos são de ação interespecíficas e os feromônios são substâncias químicas de ação intraespecífica.

Os feromônios são compostos químicos produzidos em glândulas especializadas e quando liberados pelo organismo induzem respostas tais como orientação, comportamento pré-copulatório e acasalamento em outro indivíduo da mesma espécie (Roelofs & Carde, 1977).

Nos diferentes sistemas de acasalamento mediados por feromônios, o sexo emissor é mais sedentário do que o outro que responde.

Vários estudos realizados com feromônios de insetos têm reconhecido que essas substâncias são as chaves para o sistema de comunicação intra-específica. Em estudos mais recentes sobre as interações entre feromônios de insetos e semioquímicos (moléculas que levam sinais de um organismo para outro) da planta hospedeira apresentaram resultados importantes para a compreensão de algumas interações envolvendo a comunicação interespecífica. Tais interações são manifestadas como efeito das plantas hospedeiras na fisiologia e comportamento dos insetos, refletindo diferentes tipos de estratégias para aperfeiçoar a alimentação, acasalamento e reprodução (Landolt & Phillips, 1997).

As plantas hospedeiras têm um papel importante na origem do feromônio sexual de alguns insetos fitófagos, por meio da aquisição de químicos bioativos e requerem precursores químicos de feromônio via consumo, absorção ou inalação de material da planta hospedeira. Os voláteis da planta hospedeira podem induzir a produção ou liberação de feromônios em certos insetos e também podem ter um efeito inibitório ou repelente, interrompendo a resposta dos insetos aos seus próprios feromônios. Em outros casos, compostos derivados da planta hospedeira, após um ataque de herbívoro, podem atrair predadores, servindo como um mecanismo de defesa para a planta (Reddy & Guerrero, 2004).

A localização de uma planta hospedeira é fundamental para um inseto fitófago (herbívoro) de forma a satisfazer as suas necessidades nutricionais e para encontrar locais adequados para oviposição (Bruce *et al.*, 2005).

A arquitetura da planta pode também influenciar na atração que as plantas exercem sobre os insetos. A largura e o comprimento das folhas, bem como a quantidade de

ramificações, influenciam o microclima formado na planta, o qual por sua vez, influencia a vida dos insetos herbívoros.

A cultura da Soja

Histórico

A soja que hoje cultivamos é muito diferente dos seus ancestrais, que eram plantas rasteiras que se desenvolviam na costa leste da Ásia, principalmente ao longo do rio Yangtse, na China. Sua evolução começou com o aparecimento de plantas oriundas de cruzamentos naturais entre duas espécies de soja selvagem que foram domesticadas e melhoradas por cientistas da antiga China.

As primeiras citações do grão aparecem no período entre 2883 e 2838 AC, quando a soja era considerada um grão sagrado, ao lado do arroz, do trigo, da cevada e do milho. Um dos primeiros registros do grão está no livro “Pen Ts’ao Kong Mu”, que descrevia as plantas da China ao imperador Sheng-Nung. Para alguns autores, as referências à soja são ainda mais antigas, remetendo ao livro “Livro de Odes”, publicado em chinês arcaico e, também, à inscrições em bronze. Até aproximadamente 1894, término da guerra entre a China e o Japão, a produção de soja ficou restrita à China. Apesar de ser conhecida e consumida pela civilização oriental a milhares de anos, só foi introduzida na Europa no final do século XV, como curiosidade, nos jardins botânicos da Inglaterra, França e Alemanha (EMBRAPA/CNPSO, 2008).

No Brasil, a soja foi introduzida na Bahia por Gustavo D’Utra, em 1882, com sementes trazidas dos Estados Unidos (Costa, 1996). Dez anos mais tarde, novas variedades foram introduzidas e testadas no Estado de São Paulo (Dall’Agnol, 2004).

Entretanto, os primeiros relatos do seu cultivo comercial datam de 1924, no Rio Grande do Sul. O ano de 1936 marcou o início da expansão da cultura no Estado e, em 1941, a soja aparecia pela primeira vez nas estatísticas agrícolas oficiais. A partir da segunda metade da década de 60 a área plantada com a cultura aumentou consideravelmente, fato que se deveu, em grande parte, ao imediato aproveitamento da infraestrutura utilizada no cultivo do trigo, que permanecia ociosa no período de estação quente, e à boa adaptação dos cultivares originários do sul dos Estados Unidos (Embrapa, 1981; Costa, 1996). No início dos anos 70, o Paraná tornou-se grande produtor e a partir de 1980 ocorreu a expansão para a região Centro-Oeste do país, caracterizada por condições edáficas e climáticas privilegiadas.

Importância econômica

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja. Na safra 2006/07, a cultura ocupou uma área de 20,687 milhões de hectares, o que totalizou uma produção de 58,4 milhões de toneladas. Os Estados Unidos, maior produtor mundial do grão, responderam pela produção de 88,77 milhões de toneladas de soja. A produtividade média da soja brasileira é de 2823 Kg por hectares, chegando a alcançar cerca de 3000 Kg/há no Estado de Mato Grosso, o maior produtor brasileiro de soja (EMBRAPA/CNPSO, 2008).

A soja pelas suas qualidades nutricionais, facilidade de adaptação, a quase todas as regiões do globo, alta produção e facilidade de cultivo, podem ser consideradas como um dos alimentos para a população do futuro (Bellaver & Snizer, 1999).

Características Botânicas

A soja cultivada é classificada como *Glycine max* (L.) Merrill e, de acordo com Joly (1975), pertence ao grupo das Fanerógamas, divisão Angiospermae, classe Dicotyledoneae, ordem Rosales, família Leguminosae, subfamília Fabaceae, cuja denominação antiga era Papilionoideae e ao gênero *Glycine*.

O embrião é formado por dois cotilédones, uma plúmula e um eixo hipocótilo-radícula. A plúmula é constituída de duas folhas primárias bem desenvolvidas. O seu sistema radicular consta de uma raiz principal e de grande número de raízes secundárias distribuídas em quatro fileiras, separadas de cerca de 90° uma da outra, ao longo da raiz principal.

Uma característica da espécie é a simbiose que pode estabelecer com a bactéria nitrificadora *Rhizobium japonicum* (Kirchner) Buchanan, os nódulos resultantes dessa simbiose após três semanas aptas a cumprirem sua finalidade: proporcionar a planta o nitrogênio necessário ao seu crescimento e desenvolvimento.

A soja é uma planta que apresenta um caule normal ou fasciado. As folhas são alternadas, de pecíolos longos e compostas de três folíolos grandes, geralmente ovais. As flores são típicas das Papilionáceas. Apresenta cálice tubular, persistente, de 5 lobos desiguais.

A corola é composta de 5 pétalas, o androceu tem 10 estames e o gineceu é formado de pistilo único, com um a quatro óvulo no ovário (um a quatro grãos por vagem). A cor da flor pode ser branca ou tonalidade de violeta. Os frutos, do tipo vagem, são achatados, curtos, de cor marrom, amarelo-palha ou preta, a cor é função da presença de caroteno, de xantofila, de antocianina e da cor dos pelos que cobrem a vagem. O

número de grãos por vagem varia de 1 a 4, mas em geral, encontram-se vagens com 2 ou 3 grãos, e encerram de duas a cinco sementes (Vernetti & Gastal, 1979)

Crociosema aporema

A broca das axilas, *Crociosema aporema* (Walsingham, 1914) (Lepidoptera: Tortricidae), é um Tortricidae oligófago, mais amplamente distribuído na América do Sul. Sendo considerada uma das espécies mais importantes que atacam a cultura de soja.

A distribuição desta espécie é bastante ampla, compreendendo o Sul dos Estados Unidos da América do Norte, México, Guatemala, Costa Rica, Peru, Chile, Uruguai e Argentina. No Brasil foi registrado pela primeira vez por Biezanko (1961), no Rio Grande do Sul, e no Paraná por Corrêa (1975).

As regiões de clima ameno, como as regiões sul e sudoeste do Paraná, e os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul são as preferidas do inseto.

As lagartas de *C. aporema* são citadas atacando somente plantas da família Leguminosae, – Fabaceae tais como: soja (*Glycine Max*), ervilha (*Pisum sativum*), trevo-vermelho (*Trifolium polymorphym*), fava (*Vicia faba*), amendoim (*Arachis hypogaea*), feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e alfafa (*Medicago sativa*) (Iede e Foerster, 1982).

Crociosema aporema foi descrita primeiramente por Walsingham em 1914 como *Eocosma aporema*, a partir de material procedente da Costa Rica, sendo que Heinrich (1931)

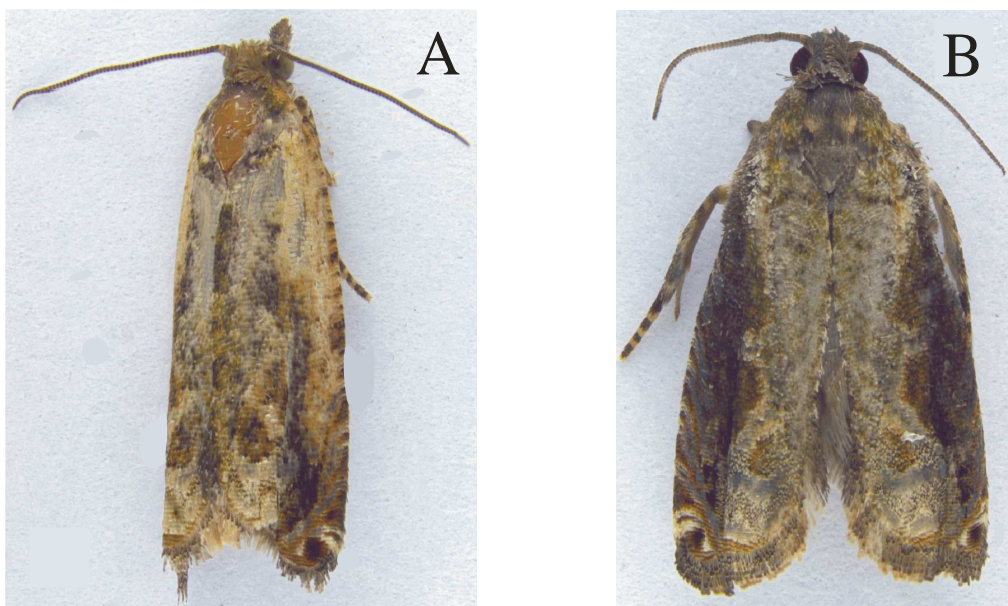


Figura 1 - Adultos de *Crocidosema aporema*. A – Fêmea. B – Macho.

descreveu-a novamente como *Epinotia opposita*; Clarke (1954) colocou-as em sinonímia, estabelecendo sua denominação *Epinotia aporema*; finalmente Powell *et al.* (1995) transferiu-o para o gênero *Crocidosema*.

Aspectos biológicos de *Crocidosema aporema*

Os adultos da broca das axilas são microlepidópteros de aproximadamente 10 mm de comprimento, o macho é lateralmente escuro e dorsalmente mais claro, e a fêmea acontece o contrário: lateralmente o primeiro par de asas apresenta uma coloração castanho-acinzentado e dorsalmente é cinza-escuro, principalmente em direção ao tórax (Alzugaray, 2003; Morey, 1972).

Cerca de dois dias depois da cópula das mariposas, inicia a oviposição. A postura é feita de forma isolada. Os ovos são depositados nas folhas da soja, especialmente nas

brotações novas. Os ovos são ovalados, de cor amarelo-pálida, e mede entre 0,59 x 0,35 e 0,47 x 0,31mm, com cinco dias a duração do período embrionário.

As lagartas medem (1-2 mm) e são ágeis, com uma atração muito grande pela luz. Já nessa fase pode ser observada a tendência de broquear a planta. Conforme se desenvolve, essa característica é mais marcante. Possui cinco instares larvais, sendo que as larvas mais jovens apresentam coloração branca e cápsula cefálica preta, enquanto no último instar assume coloração rosada, com a cápsula cefálica marrom.

O estágio larval passa por cinco instares e a duração de 14 a 20 dias (Morey, 1972; Gazzoni, 2000). A lagarta após seu desenvolvimento, deixa-se cair no solo, enterrando-se de 1 a 2 cm de profundidade para pupar (Caballero,1972).

Morey (1972) descreveu a fase de pupa que mede entre 6,2 x 1,8 e 7,8 x 2,2 mm, seu estágio dura em média 14 e 15 dias. A parte anterior da pupa é cilíndrica, enquanto a posterior é bem afilada. Ao longo do corpo encontram-se faixas de pilosidade, que são mais espessas na parte anterior do corpo, e mais raras no final do abdômen. Os machos apresentam o 7º segmento abdominal livre, enquanto que nas fêmeas está soldado aos últimos segmentos.

Durante o período de atividade (setembro a abril), a população desenvolve seis a sete gerações amplamente sobrepostas (Pereyra *et al.*, 1991).

Sintomas de ataque e danos

O dano de *C. aporema* é facilmente identificado, mesmo após o seu desaparecimento do campo. A postura é realizada nos brotos novos superiores da soja e as lagartas ao emergirem iniciam o ataque dos brotos ou ponteiros da soja, formando um cartucho unindo os folíolos com fios de seda, permanecendo no seu interior, retardando a abertura do broto (Guedes *et al.*, 2000; Gazzoni, 2000).

Quando ataca pecíolos, ramos ou caule, cava uma galeria descendente, penetrando no caule ou pecíolo através da axila dos brotos terminais, se alimentando destes brotos e causando desta forma o desenvolvimento anormal ou a morte da planta (Caballero, 1972; Carvalho *et al.*, 1982; Guedes *et al.*, 2000).

Esse hábito resulta no secamento da exterminidade dos ramos ou folhas, podendo causar quebra dos ramos ou do caule, e, pelo orifício de entrada da galeria, podem ocorrer infecções patogênicas. Os brotos podem morrer ou se desenvolver com deformações características, apresentando os folíolos uma superfície rugosa e contornos irregulares, em virtude da ausência de parte da área foliar, consumida pela lagarta.

As lagartas consomem 1-2 cm² do broto, quando este tem 3-4cm². Quando a folha abre totalmente, fica encarquilhada, rugosa, com contornos irregulares, faltando 50% ou mais de sua área folhar. Algumas brotações danificadas podem morrer (Gazzoni, 2000).

Além desses prejuízos pode atacar também flores e as vagens da parte superior da planta, danificando principalmente as variedades tardias (Gallo *et al.*, 2002).

Seus danos podem chegar em até 70% das plantas, afetando assim a produção final dos grãos (Iannone & Parisi, 1978, Foerster *et al.* 1983).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrianual: anuário estatístico da agricultura. 2000.** São Paulo, FNP Consultoria & Comércio, 495-505p.
- Alzugaray, R. 2003.** Insect pests damaging *Lotus corniculatus* L. flowers and seeds in Uruguay. Lotus Newsletter. 33: 11 – 18.
- Bellaver, C. & Snizer, J. P. N. 1999.** Soybean processing and its implications on swine and poultry feeding. Anais do Congresso Brasileiro de Soja. 183 – 199p.
- Biezanko, C. M. 1961.** XIII - Olethreutidae, Tortricidae, Phaloniidae, Aegeriidae, Glyphipterygidae, Yponomeutidae, Gelechiidae, Oecophoridae, Xylorictidae, Lithocolletidae, Cecidoseidae, Ridiashinidae, Acrolophidae, Tineidae e Psychidae da zona Sueste do Rio Grande do Sul. Arquivos de Entomologia, série A, Escola de Agronomia Eliseu Maciel, Pelotas, 16p.
- Bruce, T. J. A. Wadhams, L. J. & Woodcock, C. M. 2005.** Insect host location: a volatile situation. Trends Plant Sci., 10: 269 – 27.

Caballero, C. V. 1972. Reconocimiento, biología y control de las principales plagas que afectan los semilleros de alfalfa y trébol rosado en Chile. Rev. Per. Entomol. 15: 201-214.

Carvalho, S. M. Hohmann, C. L. & Carvalho A. O. R. 1982. Pragas do Feijoeiro no Estado do Paraná Fundação Instituto Agronômico do Paraná, Londrina, PR. IV. Título. V. Série. 41 p.

Clarke, J. F. G. 1954. The correct name for a pest of legumes (Lepidoptera, Olethreutidae). Proc. Entomol. Soc. Wash., 56(6):309-10.

Corrêa, B. S. & Smith, J. G. 1975. Ocorrência e danos de *Epinotia aporema* (Walsingham, 1914) (Lepidoptera: Tortricidae) em soja. An. Soc. Entomol. Bras., Itabuna, 5 (1) :74-78.

Costa, J. A. 1996. Cultura da soja. Porto Alegre: ed. Evangraf., 233 p.

Dall'Agnol, A. 2004. Current status of soybean production and utilization in Brazil. In:World Soybean Research Conference, 7., Foz do Iguassu - PR, February 29 to March 5, Proceedings. Londrina: EMBRAPA, 10-18 p.

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de soja www.cnpso.embrapa.br/index. Acesso em: 31 de julho de 2008.

Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 1981. Programa nacional de pesquisa de soja. Brasília. 115 p.

Foerster, L. A. Iede, E. T. & Santos, B. B. 1983. Efeitos do ataque de *Epinotia aporema* (Walsingham, 1914) (Lepidóptera: Tortricidae) em diferentes períodos de desenvolvimento da soja. An. Soc. Entomol. Bras., 12: 53-59.

Gallo, D. Nakano, O. Neto, S. S. Carvalho, R.P.L. Batista, G.C. Filho, E.B. Parra, J.R.P. Zucchi, R.A. Alves, S.B. Vendramim, J.D. Marchini, L.C. Lopes, J.R.S. & Omoto, C. 2002. Entomologia Agrícola.. Piracicaba, FEALQ, 920p.

Gazzoni, D. L. 2000. O bicho assusta, mas os danos são controláveis. Cultivar. (Pelotas). 14: 14 -15.

Godfray, H. C. J. 1994. Parasitoids, behavioral and evolutionary ecology. Princeton University Press. New Jersey. Princeton. 447 p.

Guedes, J. C. Costa, I. D. & Castiglioni, E. 2000. Bases e técnicas do manejo de insetos. Santa Maria-UFSM/CCR/DFS. 248p.

Heinrich, C. 1931. Notes on and descriptions of some american moths. Proc. US. Nat. Mus. Wash. 79(3): 1-16.

- Hendry, L. B. Wichmann, J. K. & Hindenlang, D. M. 1975.** Evidence for origin of insect sex pheromones: presence in food plants. *Science*. 188: 59-62.
- Hoffmann-Campo, C. B. Moscardi, F. Corrêa-Ferreira, B.S. Oliveira, L.J. Sosa-Gómez, D.R. Panizzi, A.R. Corso, I.C. Gazzoni, D.L. & Oliveira, E. B. 2000.** Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado. EMBRAPA Soja, Circular Técnica, 30.
- Iannone, N. & Parisi, R. 1978.** Incidência del “barredor del brote” *Epinotia aporema* Wals. em el cultivo de soja. Pergamino, Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária.
- Iede, E.T. & Foerster, L.A. 1982.** Biología de *Epinotia aporema* (Walsingham, 1914) (Lepidoptera: Tortricidae) em soja. *An. Soc. Entomol. Bras.*, 11: 13-21.
- Iede, E.T. & Foerster, L.A. 1985.** Influência do alimento na fecundidade, fertilidade e longevidade de *Epinotia aporema* (Wals.) (Lepidoptera: Tortricidae). *An. Soc. Entomol. Bras.*, 14: 141 – 146.
- Joly, A. A. 1975.** Botânica, introdução à taxonomia vegetal. Companhia Editora Nacional. 3352-383.

Jutsum, A. R. & Gordon, R. F. S. 1989. Pheromones: importance to insects and role in pest management. In: Jutsum, A.R., Gordon, R.F.S. (eds.), Insect pheromones in plant protection. New York, John Wiley & Sons. 1-16 p.

Landolt, P. J. & Phillips, T. W. 1997. Host plant influences on sex pheromone behavior of phytophagous insects. *Ann. Rev. Entomol.* 42: 371-391.

Leal, W. S. Bento, J. M. S. Murata, Y. Ono, M. Parra, J. R. P. & Vilela, E. F. 2001. Identification, synthesis, and field evaluation of the sex pheromone of the citrus fruit borer *Ecdytolopha aurantiana* (Lepidóptera: Tortricidae). *J. Chem. Ecol.*, 27(10): 2041-2051.

Light, D. M. Knight, A. L. Henrick, C. A. Rajapaska, D. Lingren, B. Dickens, J. C. Reynolds, K. M. Buttery, R. G. Merrill, G. Roitman, J. & Campbell, B. C. 2001. A pear-derived kairomone with pheromonal potency that attracts male and female codling moth, *Cydia pomonella* (L.). *Naturwissenschaften* . 88: 333–338

Lourenção, A. L. & Miranda, M. A. C. 1983. Resistência de soja a insetos. I. Comportamento de linhagens e cultivares em relação a *Epinotia aporema* (Wals.) (Lepidoptera:Tortricidae). *Bragantia*. 42 :203-209.

Morey, C. S. 1972. Biología y morfología larval de *Epinotia aporema* (Wals.) (Lepidoptera: Olethreutidae). Montevideo, Univ. Rep. Fac. Agron. 123: 4-14.

- Pereyra, P. C. Sánchez, N. E. & Gentile, M. V. 1991.** Distribución de los huevos de *Epinotia aporema* (Lepidoptera: Tortricidae) en la planta de soja. Ecol. Austral. 1:1-5.
- Powell, J. A. Razowski, J. & Brown, R. L. 1995.** Olethreutinae. In Heppner, J. B. (editor). Atlas Neotrop. Lep. Checklist: Part 2. Hyblaeoidea – Pyraloidea – Tortricoidea. 151-157 p.
- Reddy, G. V. P. & Guerrero, A. 2004.** Interactions of insects pheromones and plant semiochemicals. Trends Plant Sci., 9: 253-261.
- Rochat, D. 1987.** Etude de la Communication Chimiques Chez un Coleoptere Curculionidae: *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae). Mariversite Paris VI Institute Nacional Agronomique. Paris-Grignon (Dissertação de Mestrado).
- Roelofs, W. L. & R. T. Cardé. 1977.** Responses of Lepidoptera to synthetic sex pheromone chemicals and their analogues. Ann. Rev. Entomol. 63: 969-974.
- Sant’ana, J. & Stein, K. 2001.** Extração e identificação de substâncias bioativas de insetos. In: Ferreira, J.T.B., Correia, A.G., Vieira, P.C. “Produtos naturais no controle de insetos”. Série textos da Escola de Verão em Química. Editora da UFSCAR, São Carlos. 3: 47-74.

- Tegoni, M. Campanacci, V. & Cambillau, C. 2004.** Structural aspects of sexual attraction and chemical communication in insects. *Trends Biochem Sci.*, 29: 257-264.
- Unelius, C. R. Eiras, A. Witzgall, P. Bengtsson, M. Kovaleski, A. Vilela, E. F. & Borg-Karlson, A. K. 1996.** Identification and synthesis of the sex pheromones of *Phtheochroa cranaodes* (Lepidoptera: Tortricidae). *Tetrahedron Lett.*, 37: 1505-1508.
- Verneti, F. J. & Gastal, M. F. C. 1979.** Descrição botânica da soja Unidade de Execução de Pesquisa de Âmbito Estadual de Pelotas, RS. Série: Circular Técnica - Unidade de Execução de Pesquisa de âmbito. 7: 15p.
- Walsingham, T. G. 1914.** *Biologia Centrali Americana. Lepidoptera Heterocera*, 4: 225-392.

CAPÍTULO 1

Resposta olfativa de *Crociosema aporema* (Lepidoptera: Tortricidae) aos voláteis de soja

RESUMO - A resposta olfativa de *Crociosema aporema* a voláteis da soja foi verificada com olfatômetro em “Y”. Os testes foram realizados em sala climatizada a $25,0 \pm 1,0$ °C, UR: $65,0 \pm 10,0$ %, escotofase de 12h. Foram utilizadas as seguintes fontes de odor: brotos, folhas, vagens e planta inteira versus controle. Estes estímulos foram apresentados individualmente para fêmeas virgens até obter n = min. 27 respostas (escolha do estímulo ou do controle) para cada fonte de odor. A fonte de odor mais atrativa nos bioensaios anteriores foi comparada com o comportamento de machos virgens e fêmeas acasaladas com n = 40. Os resultados demonstraram uma resposta significativa de fêmeas virgens aos voláteis emitidos pelas diferentes partes da planta ($P < 0.0001$) quando comparados ao controle, tendo uma preferência por voláteis de vagem. Os seguintes bioensaios foram realizados com voláteis de vagem. Tanto machos virgens ($P = 0.002$) como fêmeas acasaladas ($P = 0.0001$) foram atraídos para voláteis de vagem. Desta forma, é possível concluir que a atratividade observada em ambos os sexos por voláteis da soja, sugere que *C. aporema* utiliza estímulos químicos na busca da planta hospedeira, tendo um grande potencial para serem utilizados em programas de manejo integrado da broca das axilas.

INTRODUÇÃO

A interação bitrófica (planta-herbívoros) tem sido estudada por vários pesquisadores. Neste tipo de interação as substâncias secundárias liberadas naturalmente pelas plantas são detectadas por herbívoros que as usam como caimônio (Corrêa & Sant'Ana, 2001). As substâncias voláteis emitidas por plantas podem influenciar em quase todos os aspectos da vida dos insetos, tais como: alimentação, comportamento sexual, agregação, oviposição (Sant'ana & Stein, 2001).

No entanto, as substâncias secundárias podem defender as plantas contra herbívoros generalistas. Muitas substâncias secundárias são exploradas durante a seleção do hospedeiro assim como os chamados “sinal estímulo ” pelos herbívoros especialistas que não são negativamente afetados pelas químicas das plantas, podendo ser utilizadas também como sinais para a orientação de inimigos naturais no processo de busca das pragas (Stalder, 1986).

Especificamente, se enfatiza a importância da percepção de determinadas substâncias voláteis provenientes de plantas que servem para orientação dos sítios de oviposição em lepidópteros monófagos e oligófagos (Ramaswamy, 1988; Renwick & Chew, 1994; Heard, 1999).

No início do processo evolucionário, as plantas desenvolveram substâncias secundárias, como um meio de defesa contra os insetos e, no decorrer da evolução, estas substâncias passaram a orientar os insetos na busca da planta hospedeira (Fraenkel, 1959).

Em 1910, um botânico holandês, Verschaffelt, apresentou a primeira descrição sobre a química envolvida em uma interação inseto/planta ao estudar as lagartas e os adultos das borboletas do repolho (Lepidoptera: Pieridae) e as plantas de crucíferas e observou

que estes insetos eram atraídos para estas plantas devido à presença de uma substância característica desta família, a sinigrina.

As borboletas Pieridae, pragas das crucíferas, usam glucosinolatos da cutícula destas plantas para o seu reconhecimento, na qual realizam suas posturas (Van Loon *et al.*, 1992; Chew & Renwick, 1995).

Em tecidos vegetais, a produção e liberação de voláteis são geralmente associadas a determinados tecidos, órgãos e compartimentos glandulares como pêlos, escamas, cavidades oleosas, óleo ou ductos de resina. Esta compartimentação tem sido bem caracterizada intensamente investigada em planta de famílias com elevado conteúdo de óleos essenciais como Lamiaceae (Werker *et al.*, 1985; Werker, 1993; Voirin & Bayet, 1996; McConkey *et al.*, 2000; Gershenzon *et al.*, 2000; Turner *et al.*, 2000; Gang *et al.*, 2001).

Muitos insetos utilizam compostos aromáticos das plantas hospedeiras como indicadores de locais de agregação (Bell, 1991; Lanier, 1983). A emissão do aroma floral, com adição da cor, forma, estrutura da superfície, néctar, é uma das fundamentais estratégias empregadas pelas plantas para atrair polinizadores garantindo a reprodução. Fragrâncias normalmente são misturas de compostos voláteis, pertencente a classes de isoprenoides, fenilpropanoides, ácidos graxos e derivados, caracteristicamente vapores com baixa pressão e baixa massas moleculares (Knudsen *et al.*, 1993; Dudareva *et al.*, 2000; Pichersky & Gershenzon, 2002).

Estes aromas além de atuar como aleloquímicos, podem sinergicamente aumentar a ação de feromônios (Jaffé *et al.*, 1993).

De acordo com Moraes *et al.*, (2000), alguns compostos voláteis são armazenados nos tecidos vegetais e liberados no momento em que as injúrias ocorrem, outros são induzidos pelo dano causado pelo herbívoro e são, geralmente, liberados não apenas

pelo tecido lesado, mas também pelas folhas não atacadas, podendo ainda, transmitir informações que a longa distância, permita discriminar a espécie de herbívoro muito próximo.

Os insetos são capazes de diferenciar hospedeiros inadequados ao detectar misturas de voláteis normalmente não encontradas nos seus hospedeiros (Gabel & Thiery,1994). Fêmeas grávidas de fitófagos devem escolher criticamente o hospedeiro antes e durante a deposição dos ovos uma vez que as larvas neonatas não podem migrar longas distâncias.

Alguns estudos mostram que somente alguns compostos "chave" são responsáveis por regular a atração a longa distância, e que estes compostos são percebidos por neurônios quimio receptores especializados nas antenas (Anderson *et al.*, 1995; Wibe *et al.*,1997).

Um grande número de compostos voláteis emitidos pelas plantas, é transportado a longas distâncias de sua fonte de produção. Os sistemas receptores olfativo têm evoluído nos insetos fitófagos que lhes permitem perceber alguns destes voláteis das plantas que, eles compilam um odor que atua como uma mensagem química.

Dessa maneira, esse trabalho visou estudar a atratividade dos adultos de *C. aporema* aos voláteis da soja.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo de soja, *Glycine max*

Para a coleta de voláteis de brotos, folhas e vagens foram plantadas individualmente sementes de soja convencional (variedade BRS 232), suscetível ao lepidóptero, em vasos plásticos com 23 cm de largura por 23 cm de comprimento e, com aproximadamente 500g de solo (com húmus, esterco de aves, adubo mineral, pó de carvão e composto orgânico), que foram mantidos em casa-de-vegetação, sob condições naturais, no Departamento de Botânica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) (Fig. 1).

Para coleta de voláteis de plantas inteiras, a soja foi cultivada em vasos menores de 5 cm de diâmetro e 7cm de altura, para facilitar a coleta de voláteis nas câmaras de aeração.

Criação de *Crociosema aporema*

Para a criação de *C. aporema*, foram coletadas inicialmente lagartas de diferentes idades em lavouras de soja localizadas na Fazenda Experimental Gralha Azul pertencente à Pontifícia Universidade Católica do Paraná, no Município de Fazenda Rio Grande, PR. Estas foram mantidas em laboratório, em câmara climatizada a $20^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, fotofase de 12 h e umidade relativa de $70 \pm 10\%$.

As lagartas foram acondicionadas em frascos de polietileno com 7 cm de altura e 4cm de diâmetro, contendo folíolos de soja, sendo substituídos periodicamente. As

pupas foram separadas por sexo segundo Morey (1972), e acondicionadas em gaiolas plásticas com 8,5cm de diâmetro e 10 cm de altura, com extremidade superior e inferior vedadas com placas de petri forradas com papel filtro umedecido e revestido lateralmente com papel sulfite, para servir de substrato para oviposição e facilitar a coleta de ovos. Os adultos foram alimentados com solução de mel a 10% embebido em um pedaço de espuma que foi renovado periodicamente a fim de evitar contaminações.

Os ovos, depositados no papel sulfite e papel filtro, foram recortados com tesoura e transferidos para placas de petri, de 8,5 cm de diâmetro, revestido com papel filtro umedecido.

Após a eclosão, as lagartas foram transferidas com auxílio de um pincel para tubos de vidro com 8 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro com fundo chato, contendo dieta artificial e fechados com um chumaço de algodão hidrófilo até a fase de pupa (Fig.2).

A criação desse inseto em laboratório com dieta artificial (Tab.1), viabilizou o desenvolvimento desse trabalho, mesmo com componentes totalmente diferentes à soja, sendo desnecessário o uso de qualquer outro tipo de fagoestimulante. A metodologia de preparo da dieta e transferência para os tubos foi baseada em Parra (1996).



Figura 1 – Cultivo da soja (*Glycine max*) em casa de vegetação



Figura 2 – Sistema de criação de *C. aporema* em dieta artificial.

Tabela 1 - Composição da dieta artificial utilizada para criação em laboratório de *Crociosema aporema*

Componente	Quantidade
Feijão preto	350,0 g
Levedura	52,0 g
Ácido ascórbico	4,90 g
Ácido sórbico	1,6 g
Nipagin	3,30 g
Tetraciclina	0,008 g
Óleo de soja	1,2 ml
Formoldeído	3,2 ml
Solução vitamínica	1 cápsula
Caraginina	25,0 g
Água	1, 400 l
(*)	Solução vitamínica
Niacinamida	1 mg
Pantotenato de cálcio	1 mg
Tiamina	0,25 mg
Riboflavina	0,5 mg
Piridoxina	0,25 mg
Ácido fólico	0,25 mg
Biotina	0,02 mg
Vitamina B ₁₂	0,002 mg
Inositol	20 mg

Obtenção de insetos virgens de *C. aporema*

Para a realização dos experimentos com fêmeas e machos virgens, as pupas eram provenientes da criação em laboratório. As pupas foram sexadas e individualizadas em copos plásticos de 7 x 8 cm de diâmetro, até a emergência do adulto. A superfície superior dos copos foi revestida com tecido tipo organza, onde era colocada um pedaço de espuma para a alimentação dos adultos com mel a 10%.

Na porção inferior dos copos foram forrados com papel filtro umedecidos diariamente, para manter a umidade no interior dos copos. Estas gaiolas foram mantidas em sala climatizadas a $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, escotofase de 12 h e umidade relativa de $70 \pm 10\%$ até o momento dos bioensaios.

Obtenção de fêmeas acasaladas de *C. aporema*

Colocaram-se machos e fêmeas recém emergidos, alimentados com solução de mel a 10%, em copos plásticos com temperatura, umidade e fotoperíodo citados no item anterior. Cada gaiola recebeu uma fêmea e três machos, sempre dois machos a mais do que o número de fêmea, para que a mesma possa ter opção de escolha.

Os machos foram distinguidos das fêmeas pela diferença no primeiro par de asas com a região lateral sobre o bordo costal, de cor cinza-escuro com manchas castanhas (Fig. 1). No extremo da asa parece uma figura em forma de ocelo com o centro de cor negra; o segundo par de asas é claro com bordo distal cinza, enquanto que na fêmea o primeiro par de asas apresenta uma coloração castanho-acizentado e dorsalmente é cinza-escuro, principalmente em direção ao tórax .

Coleta de voláteis

Para a coleta de voláteis foi utilizado o método da aeração (Zarbin, 2001) de plantas e extração no laboratório. Foram coletados os voláteis da soja usada comercialmente, (variedade BRS 232). Foram feitas coletas dos voláteis de brotos axilares, folhas, vagens e plantas inteiras.

As partes frescas da planta foram retiradas e confinadas em frascos hermeticamente fechados com junta esmerilhada. Uma corrente de ar filtrado com carvão ativado passa no interior do frasco de cima para baixo e posteriormente em um filtro contendo 50 mg de um polímero adsorvente (Super Q) por meio de uma bomba de vácuo. O tubo contendo o carvão ativado e o filtro com Super Q são conectados ao frasco por meio de uma conexão com encaixe esmerilhado. Após o término da extração o filtro com Super Q foi lavado com hexano destilado. Os extratos obtidos foram concentrados em frascos de vidro por meio do gás argônio, e acondicionados em freezer para posteriores uso nos bioensaios.

Planta inteira

Os vasos contendo plantas no estágio vegetativo V5 (planta com 5 nós no caule) segundo a escala de Fehr *et al.* (1971), foram envoltos com papel tipo alumínio e fechados até a altura do caule, evitando assim a contaminação com voláteis provenientes do substrato onde as plantas cresceram (terra adubada) ou de outros organismos (bactérias, fungos, etc.). Os vasos foram colocados em câmara de vidro

adaptada para aeração e os voláteis foram coletados diariamente por um período de 24 horas, usando fotofase de 14 h. Quatro câmeras independentes foram montadas, sendo aeradas simultaneamente conforme Zarbin (2001).

A dessorção dos voláteis foram na proporção de 4 ml de hexano destilado. O excesso de solvente foi concentrado em frascos de vidro por meio do gás argônio até 100 µl, e acondicionado em freezer para posteriores uso nos bioensaios (Fig. 3).

Brotos axilares, folhas e vagens

Os brotos selecionados foram seccionados na base do pecíolo com 1,5 cm de comprimento de nervura central, trifoliolados arranjando-se alternadamente sobre a haste, de maneira dística.

As folhas apresentavam 10 cm de nervura central, coloração verde escuro e as vagens estavam no estágio reprodutivo R6 (enchimento dos grãos) Fehr *et al.* (1971). Os brotos, folhas e vagens foram coletados com auxílio de uma tesoura previamente esterilizada, pesados e imediatamente colocados separadamente nas câmaras de aeração (Fig. 4).

A extração realizou-se num período de duas horas com iluminação e temperatura controlada. Para a concentração dos voláteis utilizou-se 10 µl de hexano para cada 1 g do vegetal fresco.



Figura 3 – Aeração das plantas inteiras



Figura 4 – Aeração dos brotos e folhas

Bioensaios

Para se avaliar a resposta olfativa dos adultos de *C. aporema* aos possíveis compostos voláteis de soja, foi utilizado um olfatômetro do tipo “Y” de dupla escolha (Fig. 5), sendo os bioensaios realizados em laboratório ($25,0 \pm 1,0$ °C, UR: $65,0 \pm 10,0$ % , escotofase de 12 h).

O olfatômetro em “Y” consiste de um tubo de vidro bifurcado, de 4 cm de diâmetro, que opera horizontalmente e a corrente de ar é produzida por uma bomba de ar comprimido ou por sucção a vácuo. O ar que opera no olfatômetro é umidificado e purificado por meio de um filtro de carvão ativo (Eiras & Mafra Neto, 2001).

Os insetos foram acondicionados 1 hora antes do início do experimento para se adaptarem ao ambiente. Os mesmo foram mantidos em tubos plásticos de 3,5 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro vedado na parte superior com filme de PVC. Este procedimento facilitou o manuseio dos insetos, reduzindo o “stress”, que poderia comprometer os resultados.

Nos testes padronizaram-se as dosagens utilizando –se um equivalente a $10 \mu\text{l}$ do extrato, que foram embebidos em tiras de papel de filtro, o qual foram colocado em um dos braços do sistema Y, e eram substituídos a cada bioensaio. Uma fêmea (virgem ou acasalado) e machos , foram introduzidos no braço principal, eram usados somente uma única vez e seu padrão de procura foi observado durante 10 min., com auxílio de uma lanterna de mão revestida com seis camadas de papel celofane vermelha.

Os extratos foram considerados ativos, quando atraísse os insetos em direção à câmara do extrato. O teste em branco desse sistema de bioensaio foi realizado com o hexano destilado. As posições dos braços do olfatômetro foram invertidas entre

tratamento e controle para evitar qualquer efeito tendencioso. A intensidade do fluxo de ar foi regulado através de fluxômetros e mantido em aproximadamente 4l/min.



Figura 5 – Olfatômetro tipo “Y”, utilizado no estudo da resposta olfativa de *C. aporema*

Determinação do odor responsável pela atração de fêmeas virgens

Estes bioensaios foram realizados com o propósito de se determinar qual o odor (brotos, folhas, vagens e planta inteira) é responsável pela atração das fêmeas. O bioensaio compreendem de quatro tratamentos: a) vinte e sete fêmeas para os voláteis de brotos, b) trinta e cinco fêmeas para voláteis de folhas, c) trinta fêmeas para voláteis vagens e d) cinquenta fêmeas para os voláteis de planta inteira. As fêmeas utilizadas nos bioensaios estavam, com quatro dias de idade conforme descrita anteriormente.

Determinação do odor responsável pela atração de machos virgens e fêmeas acasaladas

Este bioensaio foi realizado com o propósito de confirmar a atratividade de machos virgens e fêmeas acasaladas pelo odor estabelecido no bioensaio anterior. Os machos testados estavam com 2 e 3 dias e as fêmeas acasaladas com 6 dias de idade. O bioensaio constou de dois tratamentos: a) quarenta fêmeas acasaladas para voláteis vagens, e b) quarenta machos virgens para voláteis de vagens.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os bioensaios em olfatômetro foram analisados com um teste binomial. Os insetos que permaneceram no tubo principal do olfatômetro, não foram utilizados para análise estatística.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinação do odor responsável pela atração de fêmeas virgens

As respostas olfativas de fêmeas virgens aos voláteis de soja foram monitorada em olfatômetro em Y, na escotofase (Tabela 2). As fêmeas testadas neste experimento não tiveram contato anterior com a planta-hospedeira, e demonstraram uma resposta significativa aos voláteis emitidos pelas diferentes partes da planta ($P < 0.0001$) quando comparado ao solvente hexano. Além disto, as fêmeas de *C. aporema* quando submetidas aos voláteis de vagem apresentaram uma maior atratividade em relação aos odores de brotos, folhas e planta inteira.

Apesar de que as análises cromatográficas dos extratos coletados de planta de soja nos diferentes estágios fenológicos não tenha sido identificada no presente trabalho. Espera-se que as concentrações dos compostos voláteis na vagem sejam mais altas, em relação as demais partes da planta. Segundo Price, (1984) e Cunningham *et al.*, (2004), as substâncias secundárias das plantas estão concentradas nos órgãos de reprodução (flores e sementes) responsáveis pela existência da planta e, portanto mais importantes do que as partes vegetativas.

Os prováveis compostos químicos do estágio reprodutivo R6, responsáveis pela atração de fêmeas de *C. aporema*, consistem principalmente dos aldeídos (*E*)-2-hexanal, nonanal, (*E*)-2-nonenal, e (*E*)-2-decenal; das cetonas 3-hexanona e 3-octanona; e do álcool 1-hexanol (Boué *et al.*, 2003).

O olfatômetro utilizado para realização dos bioensaios mostrou-se eficiente, pois em ambos os tratamentos as fêmeas virgens demonstraram afinidade pelos odores da soja, resultado similar foi encontrado no estudo de fêmeas de *Cydia molesta*

(Lepidoptera: Tortricidae) atraídas pelos voláteis de sua planta hospedeira em olfatômetro em “Y”, enquanto que todas as tentativas para estudar o comportamento das fêmeas em túnel de vento falharam (Natale *et al.*, 2004).

Como na presente pesquisa, a atratividade de odores de partes da planta hospedeira também foi constatada em outras espécies de Tortricidae de importância econômica tais como em *Adoxophyes orana* (Den Otter *et al.*, 1978), *Adoxophyes orana* (Van Der Pers, 1981), *Epiphyas postvittana* (Suckling *et al.*, 1996), *Rhyacionia frustrana* (Asaro *et al.*, 2004), *Cydia pomonella* (Ansebo *et al.*, 2004), *Lobesia botrana* (Masante-Roca *et al.*, 2007).

Tabela 2 - Resposta olfativa de fêmeas virgens de *C. aporema* em olfatômetro em Y.

		n° de insetos
Tratamentos		♀
Planta inteira vs. Controle	Planta inteira	40*
	Controle	10
	Não responderam	5
	Total	55
Broto vs. Controle	Broto	25*
	Controle	2
	Não responderam	4
	Total	31
Folha vs. Controle	Folha	30*
	Controle	5
	Não responderam	3
	Total	38
Vagem vs. Controle	Vagem	28*
	Controle	2
	Não responderam	0
	Total	30

Controle: Hexano

* $P < 0.05$; teste Binomial

Determinação do odor responsável pela atração de machos virgens e fêmeas acasaladas

Uma vez constatado que as fêmeas virgens de *C. aporema* são atraídas por voláteis da soja. Os testes em olfatômetro (Tabela 3) demonstraram que machos virgens ($P = 0.002$) como fêmeas acasaladas ($P = 0.0001$) foram atraídos para o extrato de vagem que para o controle.

Adultos de *C. aporema* quando estimulados pelos voláteis de soja, deslocaram-se do braço principal do olfatômetro caminhando em direção ao extrato de planta hospedeira tal como observado em *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) (Yan *et al*, 1999; Hern & Dorn, 1999).

Tabela 3 - Resposta olfativa de machos virgens e fêmeas acasaladas de *C. aporema* em olfatômetro em Y.

Tratamentos		n° de insetos	
		♂	♀
Vagem vs. Controle	Vagem	30*	32*
	Controle	10	8
	Não responderam	6	4
	Total	46	44

Controle: Hexano

* $P < 0,05$; teste Binomial

Componentes visuais podem ser importantes na atração de insetos pelas plantas (Dicke & Dijman, 1992). Insetos de hábito diurno têm seu comportamento influenciado não só pela luz, mas, também, pela cor.

Em insetos noturnos como *C. aporema*, em que os sinais visuais dificilmente tem grande importância, o odor é de especial importância na localização da planta hospedeira (Vainstein *et al.*, 2001; Corrêa & Sant'Ana, 2001). A maior atividade noturna destes insetos pode ser uma estratégia para diminuir o risco de predação durante a exploração de um novo hospedeiro ou durante a procura de parceiro sexual.

A liberação de voláteis pela planta poderia estar sinalizando sítios de acasalamento, bem como oviposição e disponibilidade de recursos alimentares. Segundo Corrêa & Sant'Ana (2001), substâncias secundárias liberadas pelas plantas são detectadas por herbívoros que as usam como caimônio, podendo estes, atuar como pistas químicas tanto no comportamento reprodutivo, como na localização e seleção do hospedeiro.

Várias pesquisas têm demonstrado que a localização de plantas hospedeiras pelos insetos fitófagos, pode ser mediada por voláteis de planta (St·Adler, 1974; Strickler & Miller, 1984; Hanula *et al.*, 1985; Metcalf, 1987).

Estudos eletrofisiológicos demonstraram a capacidade de mariposas Tortricidae em detectar e distinguir um grande número de odores associados ao hospedeiro (Den Otter *et al.*, 1978; Van der Pers, 1981; Rtundo & Tremblay, 1993).

Os resultados indicam que os voláteis da soja têm um importante papel na orientação de *C. aporema* da busca da planta hospedeira.

Portanto, os caimônios possuem grande potencial para serem explorados para o controle de insetos, e no caso específico de *C. aporema*, há uma evidência muito forte de que os adultos de ambos os sexos, incluindo fêmeas virgens e acasaladas, são

atraídos pelos voláteis da soja, que eliminam compostos químicos que funcionam como atraentes.

CONCLUSÕES

- a) As respostas significativas dos adultos aos voláteis da soja, indicam que o dispositivo olfatométrico utilizado mostrou-se eficiente para avaliar a resposta olfativa de *C. aporema*;
- b) Fêmeas virgens foram atraídas pelos diferentes estágios fenológicos da soja, tendo maior atratividade pelos voláteis de vagem;
- c) Machos virgens e fêmeas acasaladas tiveram uma maior atratividade pelos voláteis da vagem que para o controle;
- d) A localização da planta hospedeira por *C. aporema* pode ser mediado pelos voláteis emitidos pela planta;
- e) Desta forma, os voláteis da soja têm um grande potencial para serem utilizados em programas de manejo integrado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, P., B. S. Hansson & J. Lofqvist. 1995.** Plant-odour-specific receptor neurons on the antennae of female and male *Spodoptera littoralis*. *Physiol. Entomol.*, 20: 189–198.
- Ansebo, L. Coracini, M. D. A, Bengtsson, M. Liblikas, I. Ramirez ,M. Borg-Karlson, A. K. Tasin, M. & Witzgal, P. 2004.** Antennal and behavioural response of codling moth *Cydia pomonella* to plant volatiles. *J. Appl. Entomol.*, 128: 488-493.
- Asaro, C. Sullivan, B. T. Dalusky & M. J. Berisford, C. W. 2004.** Volatiles associated with preferred and nonpreferred hosts of the nantucket pine tip moth, *Rhyacionia frustrana*. *J. Chem. Ecol.*, 30: 977- 990.
- Bell, J. 1991.** Searching behaviour: The behavioural ecology of finding resources Series. Londres. Chapman and Hall. . *An. Behav.*, 354p.
- Boué, S. M. Shih, B. Y. Carter-Wientjes, C. H. & Cleveland, T. E. 2003.** Identification of volatile compounds in Soybean at various developmental stages using solid phase microextraction. *J. Agr. Food Chem.*, 51: 4873-4876.
- Chew, F.S. Renwick, J. A. A. 1995.** Host plant choice in *Pieris* butterflies. In: Carde, R.T., Bell, W.J. Chapman and Hall, New York .*Chem. Ecol. Insect.*, 2: 214-238.

Corrêa A. G. Sant'ana, J. 2001. Fundamentos da Comunicação Química de Insetos.

In: Ferreira, J.T.B., Correia, A.G., Vieira, P.C. “Produtos naturais no controle de insetos”. Série textos da Escola de Verão em Química, número 3. Editora da UFSCAR, São Carlos. 3: 47-74.

Cunningham, J. P. Moore, C. J. Zalucki M. P. & West. S. A. 2004. Learning, odour preference and flower foraging in moths. *J. Exp. Bio.*, 207: 87–94.

Den Otter, C. J. Schuil, H. A. & Sander-Van Oosten, A. 1978. Reception of host-plant odours and female sex pheromone in *Adoxophyes orana* (Lepidoptera: Tortricidae): Electrophysiology and morphology. *Entomol. Exp. Appl.*, 24: 370–378.

Dicke, M. & H. Dijman. 1992. Induced defence in detached uninfested leaves: Effects on behavior of herbivores and their predators. *Oecologia*. 91:554-560.

Dudareva, N. Piechulla, B. & Pichersky, E. 2000. Biogenesis of floral scents. *Hort. Rev.*, 24: 31–54.

Eiras, A. E. & Mafra Neto, A. 2001. Olfatometria Aplicada ao Estudo do Comportamento de Insetos. In: Vilela, E.F. & Della Lucia, T.M.C. (eds), *Feromônios de insetos: biologia, química e aplicação*. Editora Holos, Ribeirão Preto. 27-40p.

- Fehr, W. R. Caviness, C. E. Burmood, D. T. & Pennington, J. S. 1971.** Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. Crop Sci., 2: 929-931.
- Fraenkel, G. 1959.** The “raison d’etre” of secondary plant substances. Science. 129: 1966-1970.
- Gabel, B. & Thiery, D. 1994.** Nonhost Plant Odor (Tanacetum-Vulgare, Asteracea) Affects The Reproductive-Behavior Of Lobesia-Botrana Den-Et-Schiff (Lepidoptera, Tortricidae). J. Insect Behav., 7: 149–157.
- Gang, D. R. Wang, J. Dudareva, N. Nam, K. H. Simon, J. E. Lewinsohn, E. & Pichersky, E. 2001.** An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. Plant Phys., 125: 539–555.
- Gershenson, J. Mcconkey, J. E. & Croteau, R. B. 2000.** Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. Plant Phys., 122: 205-213.
- Hanula, J. L. Berisford, C. W. & Debarr, G. L. 1985.** Monoterpene oviposition stimulants of *Dioryctria amatella* in volatiles from fusiform rust galls and second-year loblolly pine cones. J. Chem. Ecol., 11:943–952.
- Hern, A., & S. Dorn. 1999.** Sexual dimorphism in the olfactory orientation of adult *Cydia pomonella* in response to alpha farnesene. Entomol. Exp. Appl., 92: 63-72.

- Jaffé, K. Sanchez, P. Cerda, H. Urdaneta, N. Hernandez, J .V., Jaffé, R. Martinez, R. & Miras, B. 1993.** Chemical ecology of the palm weevil *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae): Attraction to host plants and to male produce aggregation pheromone. *J. Chem. Ecol.*, 19(8): 1703-1720.
- Lanier, G.N. 1983.** Integration of visual stimuli host odorants, and pheromone by bark beetles and weevils in locating and colonizing host trees. In: *Herbivorous insect*. New York, Academic Press. 161-171p.
- Masante-Roca, I. Anton, S. Delbac, L. Dufour, M. & Gadenne. C. 2007.** Attraction of the grapevine moth to host and non-host plant parts in the wind tunnel: effects of plant phenology, sex, and mating status. *Entomol. Exp. Appl.*, 122: 239–245.
- Mcconkey, M. E. Gershenson, J. & Croteau, R. B. 2000.** Developmental regulation of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of peppermint. *Plant Phys.*, 122: 215–223.
- Metcalf, R. L. 1987.** Plant volatiles as insect attractants. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, 5: 251–301.
- Moraes, C. M. Lewis, M. J. & Tumlinson, J. H. 2000.** Examining plant parasitoid interactions in Tritrophic Systems. *An. Soc. Entomol. Bras.*, 29 (2): 189-203.

- Natale, D. Mattiacci, L. Hern, A. Pasqualini, E. & Dorn, S. 2004.** Bioassay approaches to observing behavioural responses of adult female *Cydia molesta* to host plant odour. *J. Appl. Entomol.*, 128: 182–187.
- Parra, J. R. P. 1996.** Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. 3. ed., Piracicaba: FEALQ, 137p.
- Pichersky, E. & Gershenzon, J. 2002.** The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr Opin Plant Biol.*, 5: 37–243.
- Price, P. W. 1984.** *Insect Ecology*. New York, Wiley-Interscience,. In: A. R. Panizzi, J. R. P. Parra. *Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas*. (1991). Editora Manole LTDA, São Paulo. 110p.
- Knudsen, J. T. Tollsten, L. & Bergström, M. L. G. 1993.** Floral scents— a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. *Phytochemistry*. 33: 253–280.
- Ramaswamy, S. 1988.** Host finding by moths: sensory modalities and behaviours. *J. Insect Physiol.*, 34 (3): 235-249.
- Renwick, J. & F. Chew. 1994.** Oviposition behavior in Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.*, 39: 377-400.

Hendry, L. B. wickmann, J. K. & hindenlang, D. M. 1975. Evidence for origin of insect sex pheromones: presence in food plants. *Science*. 188: 59-62.

Rotundo, G. and Tremblay, E. 1993. Electroantennographic responses of chestnut moths (Lepidoptera: Tortricidae) and their parasitoid *Ascogaster quadridentatus* Wesmael (Hymenoptera: Braconidae) to volatiles from chestnut (*Castanea sativa* Miller) leaves. *Redia*. 76: 361–373

Sant’ana, J. Kathrin, Stein. 2001. Extração e identificação de substâncias bioativas de insetos. In: Ferreira, J.T.B., Correia, A.G., Vieira, P.C. “Produtos naturais no controle de insetos”. Série textos da Escola de Verão em Química. Editora da UFSCAR, São Carlos. 3: 47-74p.

ST “ADLER, E. 1974. Host plant stimuli affecting oviposition behavior of the eastern spruce budworm. *Entomol. Exp. Appl.*, 17: 176–188.

StaK dler, E. 1986. Oviposition and feeding stimuli in leaf surface waxes. In *Insects and the Plant Surface*. In: Juniper, B.E., Southwood, T.R.E (Eds.), Edward Arnold, London. 105-121p.

Suckling, D. M. Karg, G. Gibb, A. R. & Bradley, S. J. 1996. Electroantennogram and oviposition responses of *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera: Tortricidae) to plant volatiles. *New Zealand J. Crop Hort. Sci.*, 24: 323-333.

- Turner, G. W. J. Gershenzon, & Croteau. R. B. 2000.** Development of peltate glandular trichomes of peppermint. *Plant Physiol.*, 124: 665– 679.
- Vainstein, A. Lewinsohn, E. Pichersky, E. & Weiss, D. 2001.** Floral Fragrance. New Inroads into an Old Commodity. *Plant Physiol.*, 127: 1383–1389.
- Van Der Pers, J. N. C. 1981.** Comparison of electroantennogram response spectra to plant volatiles in seven species of *Yponomeuta* and in the tortricid *Adoxophyes orana*. *Entomol. Exp. Appl.* 30:181–192.
- Van Loon, J. J. A. Blaakmeer, A. Griepink, F. C. Van Beek, T. A. Schoonhoven, L. M. & Groot, A. E. 1992.** Leaf surface compound from *Brassica oleracea* (Cruciferae) induces oviposition by *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae). *Chemoecology.* 3: 39-44.
- Verschaffelt, E. 1910.** The cause determining the selection of food in some herbivorous insects. *Royal Acad. Amsterdam* 13: 536-542., Fraenkel, G. 1959. The “raison of secondary plant substances. *Science.* 129: 1966-1970.
- Voirin, B. & Bayet, C. 1996.** Developmental changes in the monoterpene composition of *Mentha 3 piperita* leaves from individual trichomes. *Phytochemistry.* 43: 573–580.

Werker, E. Ravid, U. & Putievsky, E. 1985. Glandular hairs and their secretions in the vegetative and reproductive organs of *Salvia sclarea* and *S. dominica*. Israel J. Bot., 34: 239–252.

Werker, E. 1993. Functions of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plants of the Lamiaceae a review. Flavour Fragr. J., 8: 249–255.

Wibe, A. BorgKarlson, A. K. Norin, T. & Mustaparta. H. 1997. Identification of plant volatiles activating single receptor neurons in the pine weevil (*Hylobius abietis*). J. Compar. Physiol. A Sens. Neur. and Behav. Physiol., 180: 585–595.

Yan, F. M. Bengtsson & Witzgall. P. 1999. Behavioral response of female codling moths, *Cydia pomonella*, to apple volatiles. J. Chem. Ecol., 25: 1343-1351.

Zarbin, P. H. G. 2001. Extração, Isolamento e Identificação de Substâncias Voláteis de Insetos. In: Vilela, E.F. & Della Lucia, T.M.C. (eds), Feromônios de insetos: biologia, química e aplicação. Editora Holos, Ribeirão Preto. 135-144p.

CAPÍTULO 2

Comportamento de Acasalamento de *Crociosema aporema*

Walsingham, 1914 (Lepidoptera: Tortricidae)

RESUMO - O comportamento de acasalamento de *C. aporema* foi investigado em condições de laboratório. Os adultos virgens utilizados na pesquisa foram adquiridos da criação em laboratório com dieta artificial. O comportamento de acasalamento foi estudado em 22 casais, durante 10 horas da escotofase, durante sete dias consecutivos, após a emergência dos adultos. Determinou-se que o horário de acasalamento de *C. aporema*, concentra-se entre quatro a seis horas da escotofase, de adultos com dois a sete dias de idade e com duração de cópula de 80 min. Embora o duplo acasalamento tenha sido observado, a maioria dos casais acasalam apenas uma única vez. Conclui-se que as fêmeas de *C. aporema* são responsáveis pela atração sexual e que existe um feromônio sexual mediando o acasalamento desta espécie.

INTRODUÇÃO

O comportamento reprodutivo dos insetos pode ser caracterizado de forma geral por três seqüências básicas: o encontro do macho com a fêmea, a corte e o acasalamento (Atkins, 1980).

O papel dos feromônios no comportamento reprodutivo de lepidópteros noturnos está bem estabelecido. Na maioria das espécies, as fêmeas emitem e os machos respondem a uma combinação de substâncias voláteis, denominada feromônio sexual (Roelofs & Cardé 1977; Evans, 1985). Em algumas espécies, um sistema duplo é utilizado, no qual ambos os sexos emitem substâncias químicas causadoras de agregação, possibilitando a cópula, como em *Grapholitha molesta*, a mariposa-oriental (Baker & Cardé, 1979).

De acordo com Shorey (1974), há numerosos exemplos em que a liberação e resposta aos feromônios sexuais são evidentes numa certa hora do dia ou da noite, dependendo do período em que ocorre a atividade de acasalamento dos insetos.

Quanto aos fatores do ambiente, a intensidade de luz, a temperatura e a velocidade do vento, afetam direta ou indiretamente a resposta dos insetos aos feromônios. Segundo Birch (1974), a intensidade de luz é o principal fator do ambiente que governa a resposta dos insetos aos feromônios sexuais.

Informações a respeito do comportamento de lepidópteros praga, incluindo o horário de liberação de feromônio, acasalamento e atividade de vôo, podem ajudar no desenvolvimento de técnicas mais eficientes para atrair, capturar e manipular os adultos, e dessa forma controlá-los (Lingren *et al.*, 1977).

O feromônio sexual para manejo de lepidópteros pragas é promissor, por ser específico, ou seja, atrai unicamente os machos da mesma espécie. Como atrai o adulto, um monitoramento indicaria o momento adequado para o início do controle, evitando

perdas. E, um monitoramento bem conduzido pode reduzir a quantidade final de aplicações de inseticidas, tornando o controle da praga mais racional e econômico, favorecendo, ainda, à preservação de inimigos naturais (Bento *et al.*, 2001).

Neste sentido, o estudo dos vários aspectos da biologia reprodutiva tornam-se essenciais para a escolha de armadilhas iscadas com feromônio sexual. Além disso, os compostos da mistura feromonal devem estar na proporção ideal, condição determinante para a eficácia e especificidade na captura dos machos (Lima *et al.*, 1998).

Portanto, os feromônios sexuais apresentam uma alternativa com melhores perspectivas para otimizar de forma racional o uso dos métodos de controle de lepidópteros, sem causar impactos ao meio ambiente (Corrêa & Sant' Ana , 2001).

Desta forma, o objetivo desta pesquisa foi caracterizar o comportamento de acasalamento dos adultos *C. aporema*, em condições de laboratório e, fornecendo subsídios para identificação do feromônio sexual deste inseto.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Semioquímicos do departamento de química da Universidade Federal do Paraná - PR. Os adultos utilizados nos bioensaios foram adquiridos da criação em laboratório com dieta artificial baseando-se na metodologia de Parra (1996).

Para obtenção de insetos virgens, as pupas foram sexadas (Fig. 1), baseando-se em Morey (1972), e individualizadas em copos plásticos transparentes de 4,5 x 7cm de diâmetro, contendo papel filtro umedecido na região inferior dos copos, para evitar a dessecação das pupas e vedados na porção superior com filme plástico de PVC.

Para o estudo do comportamento de acasalamento em *C. aporema*, os adultos recém-emergidos em laboratório na fotofase, foram agrupados na densidade de 22 casais individualizados em copos plásticos transparentes de 7 x 8 cm de diâmetro, para melhor visualização da seqüência de eventos do acasalamento (Fig. 5). A superfície superior foi revestida com tecido tipo organza, para permitir a troca de ar e impedir a fuga dos adultos. Na porção inferior dos copos foi forrado com papel filtro umedecido diariamente, para manter a umidade no interior dos copos e os adultos alimentados com mel a 10% embebidos em um pedaço de espuma, colocados na parte superior dos copos.

As observações foram realizadas durante as 10 h da escotofase entre o período de 07:00 e 17:00 horas nos sete dias consecutivos após a emergência dos adultos. Todas as observações foram feitas utilizando uma lanterna de mão revestida com seis camadas de papel celofane vermelha (Delisle & Mcneil, 1986).

Os casais foram mantidos em sala climatizada em condições de temperatura a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $69 \pm 5\%$ e um fotoperíodo de 14:10 h (L:E), com iluminação das 17 às 7 horas.

Os principais eventos comportamentais do acasalamento: chamamentos das fêmeas, corte dos machos e cópula, foram diariamente anotados a partir de observação direta e individualmente por casal, durante dez horas da escotofase. Após sete dias consecutivos de observações de cada casal, os mesmos foram separados dos demais. As seqüências de parâmetros registradas para cada casal foram: idade, tempo de início de cópula, duração da primeira cópula, e número de cópulas por casal.

ANÁLISES ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos à Análise de Variância, e as médias, comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5,0% de probabilidade, e utilizou-se o software BioEstat versão 3.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 22 casais estudados em laboratório, foi observado que os acasalamentos de *Crociosema aporema* (Lepidoptera: Tortricidae) ocorrem entre a segunda e a sétima noite após a emergência, no qual os machos se encontraram aptos suficientemente a responder aos feromônios sexuais ($F_{6,140} = 13.082$, $P = 0.2565$) (Tabela 1). Semelhante resultado foi observado em *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae) (Callahan, 1958), *Ecdytolopha aurantiana* (Lepidoptera: Tortricidae) (Bento *et al.*, 2001). Para outros Tortricidae, o acasalamento foi observado na primeira noite após a emergência dos adultos como em *Zeiraphera canadensis* (Turgeon, 1985), e em *Argyrotaenia sphaleropa* (Pinto *et al.*, 2005).

Verificou-se que a maioria das cópulas iniciam entre 4 e 6 horas após o início da escotofase ($F_{9,210} = 4.1369$, $P = 0.0002$) (Fig. 2). O período de início de acasalamento dessa espécie foi semelhante à observada em *A. gemmatalis* (Noctuidae) tendo a maioria das cópulas (66%) nas primeiras quatro horas da escotofase, conforme Greene *et al.*, (1973) e Gregory (1989).

Observou-se que a média de duração das cópulas foi 1h e 20 min \pm 4,10 com um mínimo de 50 min e máximo de 2 horas ($F_{4,105} = 9.0417$, $P < 0.0001$). Resultados similares foram encontrados em *E. aurantiana*, onde foi registrado uma duração média no acasalamento da espécie de 1h 40 min (Bento *et al.*, 2001). Por outro lado, o tempo de cópula pode variar muito entre Tortricidae. Em *Cydia pomonella* (L.) o tempo de cópula foi de 40-60 min (Howell, 1995) e cerca de 29 min, em *G. molesta* (Dustan, 1964), enquanto na *Zeiraphera canadensis* é de 4 h e 30 min (Turgeon *et al.*, 1987).

Embora duplo acasalamento foi observado em apenas três casais, a maioria (88%) dos casais estudados realizaram uma única cópula ao longo dos sete dias ($F_{1,42} = 133$, $P < 0.0001$) (Fig. 3). Estudos com *Grapholitha molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) mostraram que ambos machos e fêmeas podem acasalar mais de uma vez. O número máximo registrado foi de 7 acasalamentos por macho e 5 para fêmeas (Dustan, 1964).

De um modo geral, em Lepidoptera, as fêmeas necessitam de uma única cópula para garantir a fertilidade de todos os ovos (Turgeon, 1987; Benz, 1991).

Na maioria dos machos em lepidópteros são capazes de copular várias vezes, fazendo com que os machos compitam intensamente pelo acesso à fêmea. Para maximizar o sucesso nos acasalamentos, alguns machos emergem antes das fêmeas, fenômeno conhecido como protandria (Zonneveld, 1997).

O comportamento de acasalamento de *C. aporema* ocorre durante a escotofase. Estes resultados são similares aos observados em outras espécies como em *Cnephasia jactatana* (Jiménez-Pérez *et al.*, 2002), *Sesamia inferens* (Nagayama *et al.*, 2004), *Herpetogramma phaeopteralis* (Meagher *et al.*, 2007).

Portanto, a variação na porcentagem de acasalamentos, em função da idade de *C. aporema*, pode estar relacionada a elevadas taxas de produção e liberação de feromônio sexual e com maior receptividade e resposta dos machos aos estímulos da fêmea.

Esses resultados permitem determinar o período de emissão de feromônio, fornecendo subsídios que facilitam a coleta de voláteis e subseqüentes identificações do feromônio sexual.

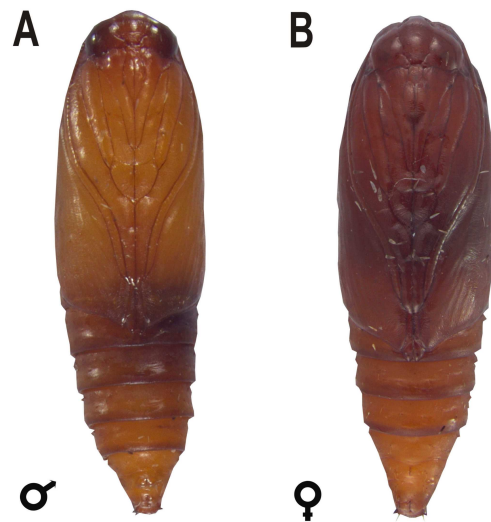


Figura 1 - Vista ventral das pupas de *C. aporema*. (A) macho (B) fêmea

IDADE (dias)	% DE ACASALAMENTOS
1	0,0 ± 0,0
2	09,1 ± 6,1 a
3	22,7 ± 8,9 a
4	18,2 ± 8,2 a
5	18,2 ± 8,2 a
6	22,7 ± 8,9 a
7	09,1 ± 6,1 a

Tabela 1 - Porcentagem de acasalamentos de *C. aporema* em função da idade

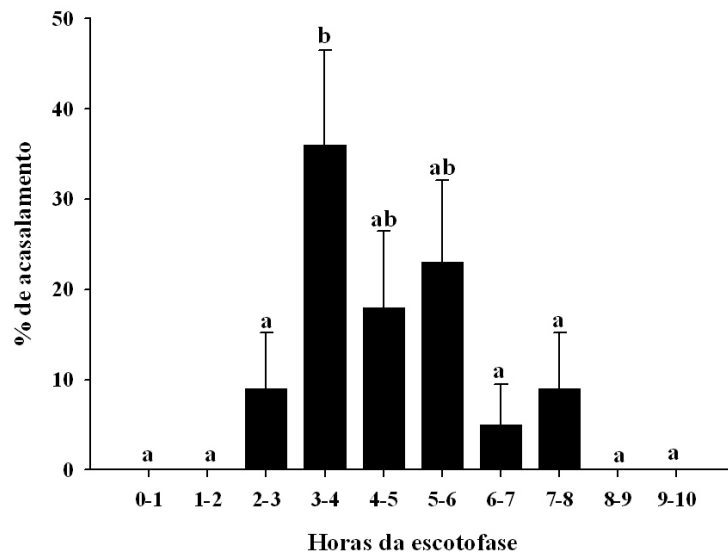


Figura 2 - Tempo de início de cópula durante a escotofase

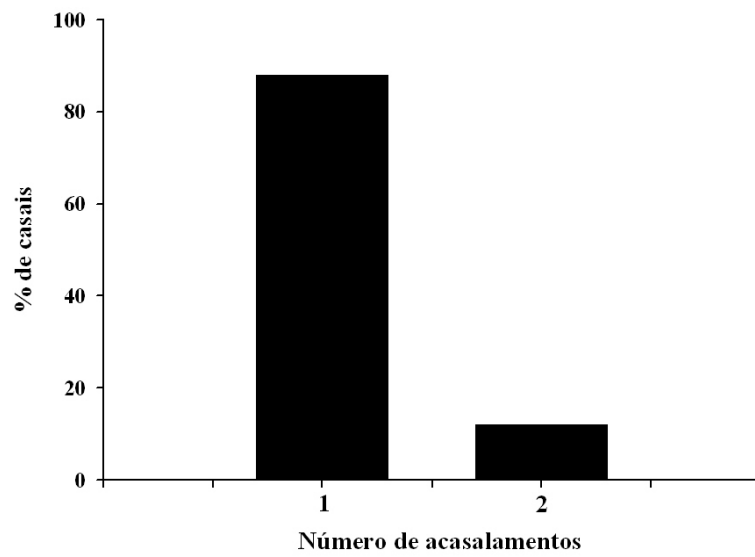


Figura 3 – Número de acasalamentos por casal de *C. aporema*.

Comportamentos de chamamento, corte e cópula.

As fêmeas de *C. aporema* durante o chamamento assumiram postura horizontal ao substrato, permanecendo paradas com as asas levemente elevadas sobre o dorso, e as antenas com posição eretas (Fig. 4). Suas pernas anteriores permaneceram pouco afastadas do corpo, enquanto o final do abdome foi levemente curvado para baixo. Em seguida, a glândula de feromônio, em forma de saco, com aspecto molhado e brilhante, foi exposta e retraída em movimentos contínuos.

Os machos encontravam-se parados quando as observações foram iniciadas e antenas bem elevadas (Fig. 7). Ao ser estimulado pelo feromônio, o macho começou a bater as asas na vertical, e andar em direção à fêmea batendo as asas, em seguida aproximou-se da fêmea tocando-a com suas antenas, enquanto batia as asas e andava ao seu redor. Em resposta ao contato do macho, a fêmea, parada, retraiu a glândula de feromônio, e o macho girou o corpo em sentido contrário a fêmea, em um ângulo de 180°. Após o alinhamento dos insetos, o macho continuou batendo as asas sobre o dorso da fêmea, enquanto seu edeago era exposto no final do abdome.

Em resposta, a fêmea curvou seu abdome em direção ao do macho. Nesse momento, as asas da fêmea repousaram, cobrindo parte do abdome do macho, que, em seguida, introduziu seu aedeago na extremidade do abdome dela, dando início à cópula (Fig. 6 e 8).

Durante o acasalamento, o macho e a fêmea permaneceram parados com antenas para trás, junto ao corpo. Ao final da cópula, que pode durar 1,5 h, macho e fêmea se separaram, às vezes ficando um do lado do outro, em repouso. Similar corte foi observado nos machos de *Platynota stultana* (Lepidoptera: Tortricidae) quando foram expostos a fêmeas virgens, apresentaram um típico comportamento atribuído ao

feromônio sexual, com a elevação das antenas, vôo em direção a fêmea e vibração das asas (Aliniaze & Stafford, 1971) .



Figura 4 - Posição de chamamento da fêmea de *C. aporema*. (A) – Asas levemente elevadas sobre o dorso, (B) – Abdome curvado e as antenas com posição eretas em v.

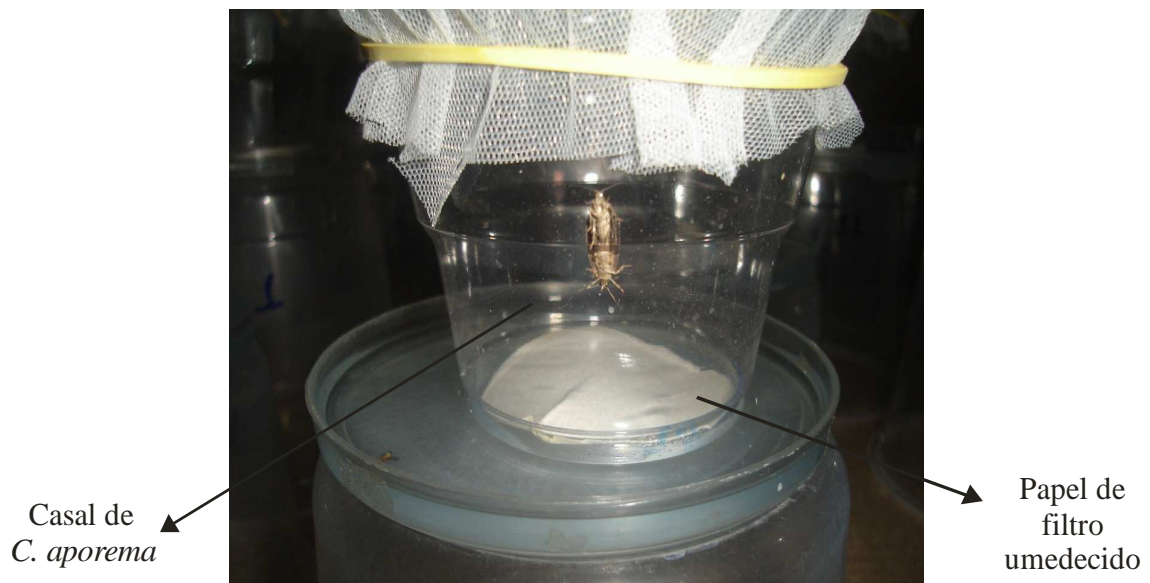


Figura 5 - Copos plásticos com casal de *C. aporema*, durante as observações de acasalamento na escotofase.

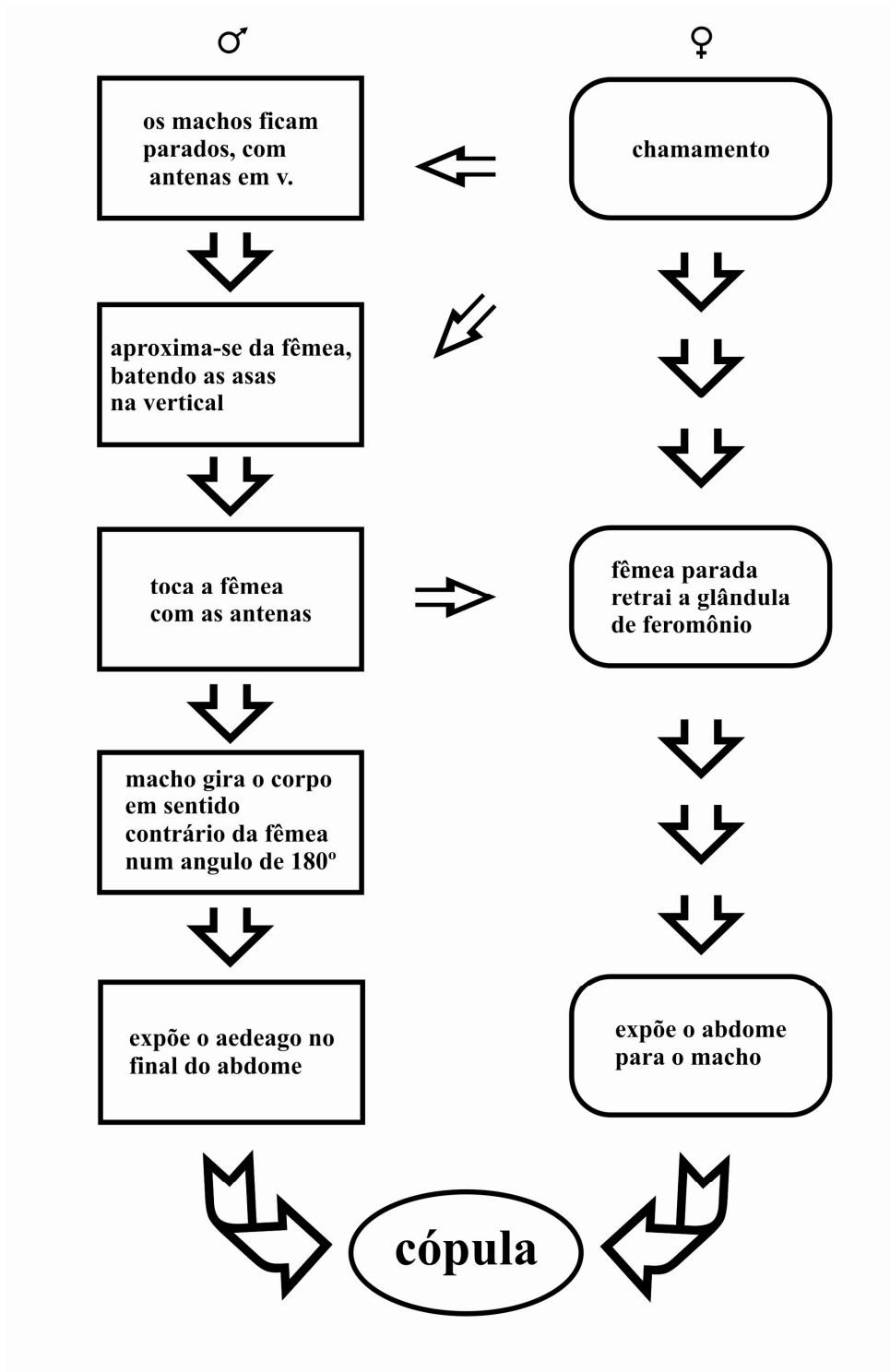


Figura 6 - Seqüência de eventos comportamentais do acasalamento de *C. aporema*.

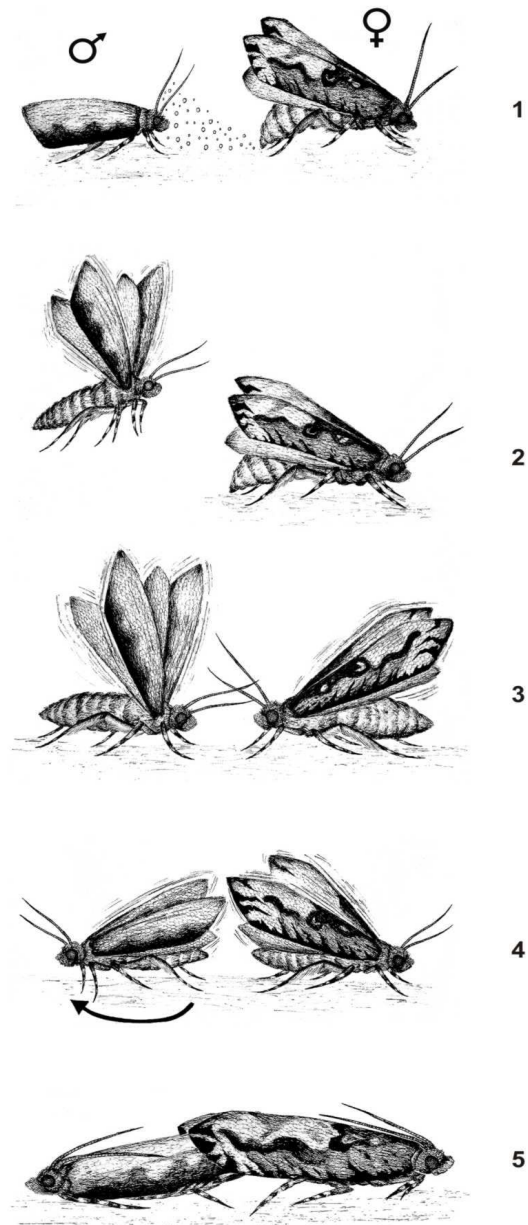


Figura 7 - Etograma do acasalamento de *C. aporema*. **1)** fêmea parada em chamamento, com exposição da glândula de feromônio; **2)** macho com antenas em v e batimentos da asas ; **3)** macho se aproxima da fêmea e a toca com suas antenas ; **4)** macho gira o corpo e expõe seu aedeago; **5)** cópula.



Figura 8 - Cópula de *C. aporema*. I (A) – fêmea, I (B) – macho (asas da fêmea sobre a do macho); II – Visualização das antenas da fêmea (A) e do macho (B) mantidas para atrás, afastadas do corpo.

CONCLUSÕES

- a) Dos 22 casais observados em laboratório de *C. aporema*, não foi observado acasalamento na primeira escotofase;

- b) Os acasalamentos de *C. aporema* ocorrem com casais de dois a sete dias de idade;

- c) O horário em que ocorreu o maior número de acasalamentos de *C. aporema* foi entre quatro e seis horas após o início da escotofase;

- d) A duração média da cópula de *C. aporema* é de $80 \pm 4,10$ minutos;

- e) 88% dos casais copulam apenas uma única vez;

- f) O comportamento de acasalamento ocorre durante a noite, e está fortemente correlacionada com o tempo de emissão de feromônios pelas fêmeas virgens;

- g) A identificação do tempo padrão de emissão do feromônio sexual, irá facilitar a sua coleta e caracterização química, no sentido do desenvolvimento de uma ferramenta muito necessária no desenvolvimento de novos métodos de controle para essa praga.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo químico de substâncias voláteis, aliadas as observações do comportamento do inseto, possibilita um melhor entendimento sobre a comunicação química. A partir desses estudos é possível determinar quais são as substâncias bioativas e quais são os papéis destas nas comunicações intra e interespecíficas. Pesquisas básicas relacionadas a essa comunicação servem de modelo para compreensão dos mecanismos envolvidos nas diversas etapas entre a percepção do sinal químico e a seqüência de comportamentos que iniciam a partir da presença desse sinal.

Os semioquímicos de plantas são conhecidos por produzir uma extensa gama de respostas no comportamento dos insetos. Os voláteis da planta também podem ter efeito inibitório ou repelente que interrompem as respostas dos insetos aos feromônios e atraem predadores e parasitóides para atacar as espécies após o dano de herbivoria. Em muitos casos, os compostos voláteis emitidos pelas folhas como resultado do dano causado pelo inseto permite aos inimigos naturais distinguir entre uma planta infestada ou não, e, portanto, ajudá-los a localizar hospedeiros.

Pode-se também utilizar os semioquímicos combinados a pequenas quantidades de ingredientes ativos feromonais, acrescentando pequenas quantias de voláteis de plantas na atração da praga. O sinergismo entre feromônios de insetos e os odores da planta hospedeira podem aumentar a atração de inimigos naturais. O uso de semioquímicos (feromônios, voláteis de planta), oferece novas estratégias como um valioso método no manejo e controle de pragas.

A continuação destes estudos se faz necessário para que se possa elucidar um melhor entendimento das relações intra e interespecíficas, incluindo: a) As análises dos voláteis químicos produzidos pela soja, responsáveis pela atração de *C. aporema*; b) identificação do feromônio sexual; c) estudo da ação sinérgica do feromônio associado

aos voláteis da soja; d) a relação tritrófica entre a complexo planta de soja, *C. aporema* e inimigo natural.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aliniaze, M. T. & Stafford E. M. 1971.** Evidence of a sex pheromone in the omnivorous leaf roller, *Platynota stultana* (Lepidoptera: Tortricidae): laboratory and field testing of male attraction to virgin females. *Ann. Ent. Soc. Amer.*, 64: 1330-1335.
- Atkins, M. D. 1980.** Introduction to insect Behavior, New York, Macmillan Pub. Co., 102-105p.
- Ayres, M. Ayres, M. Jr. Ayres, D. L. & Santos, A. S. 2003.** BioEstat 3.0 Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Soc. Civ. Mamir., Belém.
- Baker, T. C. & Cardé, R. T. 1979.** Courtship behavior of the oriental fruit moth (*Grapholita molesta*): Experimental analysis and consideration of the role of sexual selection in the evolution of courtship pheromones in the Lepidoptera. *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, 72: 173-188.
- Leal, W. S. Bento, J. M. S. Murata, Y. Ono, M. Parra, M. J. P. & Vilela, E. F. 2001.** Identification, Synthesis, and Field Evaluation of the Sex Pheromone of the Citrus Fruit Borer *Ecdyolopha aurantiana*. *J. Chem. Ecol.*, 27: 1573-1561 .

- Benz, G. 1991.** Physiology and genetics. In: Van Der Geest, L. P. S. & Evenhuis, H. H. (behaviour and diel activity of Citrus Fruit Borer *Ecdytolopha aurantiana*. J. Chem. ed). Tortricid Pests: Their biology, natural enemies and control. Amsterdam: Elsevier. 89-147p.
- Birch, M. C. 1974.** Pheromones. Amsterdam: North-Holland Pub., 495p.
- Callahan, P. S. 1958.** Behaviour of the imago of the corn earworm *Heliothis zea* (Boddie), with special reference to emergence and reproduction. Ann. Entomol. Soc. Am., 51: 271-283.
- Delisle, J. & Mcneil, J. N. 1986.** The effect of photoperiod on calling behavior of virgin females of the true armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Haw.) (Lepidoptera: Noctuidae). J. Insect. Physiol., 32: 199-206.
- Dustan, G. G. 1964.** Mating behaviour of the oriental fruit moth, *Grapholitha molesta* (Busck) (Lepidoptera: Olethreutidae). Can. Entomol., 96:1087–1093.
- Eraldo, R. L. Evaldo, F. Vilela & Germán R. S. 1998.** Avaliação do Comportamento Reprodutivo e do Feromônio Sexual Sintético de *Mocis latipes* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae). An. Soc. Entomol. Bras., 27(1): 9-20.
- Evans, P. D. 1985.** Octopamine, In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, (Kerkut G. A. and Gilbert L. I., eds), Pergamon Press. 1: 499-530.

- Greene, G. L. Reid, J. C. Blount, V. N. & Ridle. T. C. 1973.** Mating and oviposition behavior of the velvetbean carterpillar in soybeans. *Environ. Entomol.*, 2:1113-1115.
- Gregory, B. M. Jr. 1989.** Field observations of mating, oviposition and feeding behavior of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) in a soybean field. *J. Insect Behav.*, 2:761-774.
- Howell, J. F. 1995.** Reproductive biology, p. 157–174, In: L. P. S. van der Geest & H. H. Evenhuis (eds.). *Tortricid Pests: Their Biology, Natural Enemies and Control*, Elsevier, Amesterdam. Vol. 5
- Jean. J. T. 1985.**Life and behavior of spruce budmoth, *Zeiraphera Canadensis* (Lepidoptera:Olethreutidae), in new brunswick. *Can. Entomol.*,117:1239-1247.
- Jiménez-Pérez, A. Wang, Q. & markwick, N. P. 2002.** Adult Activity Patterns Of *Cnephasia Jactatana* Walker (lepidoptera: Tortricidae). *N. Z. Plant Prot.*, 55:374-379.
- Bento, J. M. S. Vilela, E. F. Parra, J. R. P. & Leal, W. S. 2001.** Monitoramento do bicho-furão-dos-citros com feromônio sexual: bases comportamentais para utilização dessa nova estratégia. *Laranja*. 22: 351-366.

- Lima-Filho, M. & Ricardo, G. M. 1988.** Utilização de pupas fêmeas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) em armadilhas de feromônio sexual. Ann. Soc. Entomol. Bras., 1.17: 29-43.
- Lingren, P. D. Grene, G. L. Davis, D. R. Baumhover A. H. & Henneberry. T. J. 1977.** Nocturnal behavior of four lepidopteran pest that attack tobacco and other crops. Ann. Entomol. Soc. Am., 70: 161-16.
- Meagher, R. L. Epsky, N. D. & Cherry, R. 2007.** Mating behavior and female-produced pheromone us in tropical sod webworm (Lepidoptera: Crambidae). Florida Entomol., 90(2): 304-308.
- Morey, C. S. 1972.** Biologia y morfologia larval de *Epinotia aporema* (Wals.) (Lepidoptera: Olethreutidae). Montevideo, Univ. Rep. Fac. Agron., 123: 14p.
- Nagayama, A. Arakaki, N. Kishita, M. & Yamada, Y. 2004.** Emergence and mating behavior of the pink borer, *Sesamia inferens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). Appl. Entomol. Zool., 39 (4): 625–629.
- Pinto, A. P. Sant’Ana, J. & Botton, M. 2005.** Influência da idade da fêmea na performance reprodutiva e longevidade de *Argyrotaenia spheropa* (Lepidoptera, Tortricidae). Iheringia, Sér. Zool., 95(4):435-440
- Roelofs, W. L. & Cardé. R.T. 1977.** Responses of Lepidoptera to synthetic sex pheromones chemicals and their analogues. Ann. Rev. Entomol., 63: 969-974.

- Sant'ana, J. Kathrin Stein. 2001.** Extração e identificação de substâncias bioativas de insetos. In: Ferreira, J.T.B., Correia, A.G., Vieira, P.C. “Produtos naturais no controle de insetos”. Série textos da Escola de Verão em Química. Editora da UFSCAR, São Carlos. 3: 47-74.
- Turgeon, J. J. 1985.** Life cycle and behavior of the spruce budmoth, *Zeiraphera Canadensis* (Lepidoptera:Olethreutidae) in New Brunswick. Can Entomol., 117: 1239-1247.
- Turgeon, J. J. Nelson, N. & Kettela, E. G. 1987.** Reproductive biology of the spruce budmoth, *Zeiraphera canadensis* Mut. & Free.(Lepidoptera: Tortricidae: Olethreutidae), in New Brunswick. Can. Entomol., 119:361–364.
- Zonneveld, C. 1997.** Being big or emerging early? Polyandry and the trade-off between size and emergence in male butterflies. Am. Naturalist., 149(6): 946-965.