

**ANGELA MARIA PALACIO CORTÉS**

**Feromônio sexual, ADN mitocondrial e expressão das proteínas ligantes do feromônio de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) e avanços na identificação do feromônio sexual de *Diatraea indiginella* Dyar & Heinrich, (Lepidoptera: Crambidae)**

**CURITIBA**

**2010**

**ANGELA MARIA PALACIO CORTÉS**

**Feromônio sexual, ADN mitocondrial e expressão das proteínas ligantes do feromônio de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) e avanços na identificação do feromônio sexual de *Diatraea indiginella* Dyar & Heinrich, (Lepidoptera: Crambidae)**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Entomologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Paulo H. G. Zarbin

**CURITIBA**

**2010**

Dedico esta tese a minha filha Manuela,  
companheira amorosa e incondicional, e a  
meus pais Alvaro e Myrian, por todo o  
carinho e apoio.

“Liberdade não significa ausência de qualquer restrição; liberdade significa possuir uma convicção inabalável de superar qualquer limite. Isto é a verdadeira liberdade!”

*Daisaku Ikeda*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao professor Paulo H. G. Zarbin, pela orientação, ensinamentos e pela oportunidade de desenvolver este trabalho no grupo de pesquisa de feromônios.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia pelas oportunidades oferecidas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

Aos professores Antonio M. Iaia, Andres Gonzales, Edmilson J. Marques, João Carlos Bepalhok, Alexandre F. Barrigosi, Djalma Euzébio Simões Bento, Luiz Carlos de Almeida, Mauricio S. Bento, Luis A. Gómez e à servidora Neide Graciano pelo envio de espécimes.

Ao professor Fernando L. Cônsoli, da Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz – USP, e ao professor Stênio P. Fragoso, do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz Paraná, pelas oportunidades e cooperação.

Ao professor Walter Leal, da Universidade da Califórnia – Davis, pelos anticorpos cedidos para a realização deste trabalho.

Aos companheiros do Laboratório de Semioquímicos por toda a ajuda, companheirismo e convivência alegre e harmoniosa ao longo dos últimos quatro anos.

À minha família, especialmente minhas irmãs Catalina e Paula, pelo apoio e carinho constantes.

Aos amigos da família Hayashi, por todo o apoio, acolhida e carinho.

Ao Marco, pelo carinho, compreensão, apoio e incentivo.

Ao INCT Semioquímicos na Agricultura pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

## ÍNDICE

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
Introdução geral.....	4
Objetivos.....	12
Capítulo 1.....	13
Variação do feromônio sexual e do ADN mitocondrial de <i>Diatraea saccharalis</i> (Lepidoptera: Crambidae) em função da localidade geográfica.....	13
1 Introdução.....	14
1 Introdução.....	14
2 Material e métodos.....	16
2.1 Coleta de insetos para análise molecular.....	16
2.2 Extração de ADN.....	16
2.3 Sequenciamento e clonagem.....	17
2.4 Alinhamento das sequências.....	18
2.5 Rede de haplótipos e análises filogenéticas.....	18
2.6 Criação dos insetos e extração do feromônio.....	19
2.7 Análise dos extratos contendo o feromônio sexual.....	21
3 Resultados.....	24
4 Discussão.....	31
Capítulo 2.....	35
Re-identificação do feromônio sexual de <i>Diatraea saccharalis</i> (Lepidoptera: Crambidae).....	35
1 Introdução.....	36
2 Material e métodos.....	37
2.1 Insetos.....	37
2.2 Extração do feromônio.....	37
2.3 Análise dos extratos contendo o feromônio sexual.....	38
3 Resultados.....	40
4 Discussão.....	45
Capítulo 3.....	47
Expressão das proteínas ligantes de feromônio de <i>Diatraea saccharalis</i> (Lepidoptera: Crambidae).....	47
1 Introdução.....	49
2 Material e métodos.....	54
2.1 Insetos.....	54
2.2 Extração da proteína total.....	55
2.3 Detecção imunológica.....	55
3 Resultados.....	58
4 Discussão.....	61
Capítulo 4.....	64
Comportamento de chamamento e avanços na identificação do feromônio sexual de <i>Diatraea indiginella</i> Dyar & Heinrich, (Lepidoptera: Crambidae).....	64
1 Introdução.....	66
2 Material e métodos.....	67
2.1 Insetos.....	67
2.2 Comportamento de chamamento.....	68

2.3 Extração do feromônio.....	68
2.4 Análise dos extratos contendo o feromônio sexual .....	69
2.5 Bioensaio em olfatômetro .....	71
3 Resultados .....	73
4 Discussão .....	78
Bibliografia .....	84

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** (A-B) Fotografias de *Diatraea saccharalis*, A: adulto e B: larvas; (C-D) fotografias de *D. indigenella* C: adultos em acasalamento e D: larva (Fonte: arquivo do Laboratório de Semioquímicos-UFPR e arquivo pessoal de Y. Gutierrez)..... 5
- Figura 1.1** Fotografias da criação em laboratório de *D. saccharalis*. A e B: gaiolas; C: posturas; D: larvas em dieta; E: pupas (Fonte: arquivo do Laboratório de Semioquímicos-UFPR)..... 20
- Figura 1.2** Fotografias da extração do feromônio de *D. saccharalis*. A: fêmea em posição de chamamento; B: fêmea sendo preparada para excisão da glândula; C: glândula produtora de feromônio; D: corte da glândula produtora de feromônio; E: frasco cônico contendo glândulas e o solvente de extração; F: frasco de armazenamento do extrato (Fonte: arquivo do Laboratório de Semioquímicos-UFPR). ..... 21
- Figura 1.3** Cromatógrafo em fase gasosa acoplado a eletroanténografo (GC-EAD). No destaque antena fixada entre dois eletrodos (Fonte: arquivo do Laboratório de Semioquímicos-UFPR)..... 23
- Figura 1.4** Rede de haplótipos baseada em 25 sequências de citocromo oxidase II de espécimes de *D. saccharalis* procedentes da Colômbia: Valle del Cauca; Uruguai: Artigas; e Brasil: Goiás (GO); Mato Grosso (MT); Paraná (PR); Pernambuco (PE); e São Paulo (SP). Foram incluídas sequências de Lange *et al.* (2004), do Brasil (a mesma dos haplótipos mais comuns); Jamaica; México; EUA: Flórida e Texas; e Venezuela. Haplótipo mais comum representado na forma do quadrado de maior tamanho com n=9, círculos maiores com n=3, e menores com n=1..... 27
- Figura 1.5** Filograma de consenso de modelo Bayesiano misto resultante da análise de haplótipos COII de *D. saccharalis*. As sequências foram particionadas de acordo com a posição do códon e os parâmetros do modelo foram estimados independentemente baseados em HKY+I, F81, e HKY+G, respectivamente. As porcentagens associadas a cada clado referem-se à probabilidade posterior Bayesiana / *bootstrap* parcimônia quando superior a 50%..... 28
- Figura 1.6** Eletroanténograma de uma antena de macho de *D. saccharalis* e cromatograma (GC-EAD) estimulado por um extrato de glândulas (N=32) de fêmeas virgens com 2 a 3 dias de emergência..... 29
- Figura 1.7** Concentração média dos dois principais componentes, (Z,E)-9,11-hexadecadienal e (Z)-11-hexadecenal, do feromônio sexual obtidos de glândulas de fêmeas virgens de *D. saccharalis* com 2 a 3 dias de emergência de acordo com a procedência geográfica. SP: São Paulo, (N=33); PR: Paraná, (N=35); PE: Pernambuco, (n=28); MT: Mato Grosso, (N=37); Col: Colômbia, (n=28). Barras com diferentes letras indicam diferenças significativas (teste de Tukey,  $p < 0,05$ )..... 30
- Figura 1.8** Razão entre as concentrações dos dois principais componentes, (Z,E)-9,11-hexadecadienal e (Z)-11-hexadecenal, do feromônio sexual obtido de glândulas de fêmeas virgens de *D. saccharalis* com 2 a 3 dias de emergência de acordo com a procedência geográfica. SP: São Paulo, (N=33); PR: Paraná, (N=35); PE: Pernambuco, (n=28); MT: Mato Grosso, (N=37); Col: Colômbia, (n=28). Barras com diferentes letras indicam diferenças significativas (teste de Tukey,  $p < 0,05$ )..... 31
- Figura 2.1** Cromatograma em fase gasosa e eletroanténograma (GC-EAD) usando antena de macho de *D. saccharalis* estimulada com extrato do feromônio sexual obtido de 103 fêmeas virgens com 2 a 3 dias de idade e concentrado para 1 IE..... 40



<b>Figura 2.2</b> Espectro de massas do composto (Z,E)-9,11-hexadecadienal presente no extrato do feromônio sexual de <i>D. saccharalis</i> . .....	41
<b>Figura 2.3</b> Espectro de massas do composto (Z)-11-hexadecenal presente no extrato do feromônio sexual de <i>D. saccharalis</i> .....	41
<b>Figura 2.4</b> Análise comparativa dos padrões (Z)-11-hexadecenal e (E)-11-hexadecenal, analisados em GC-EAD com uma coluna DB-5 (30 x 0,25 mm; 0,25 µm) para identificar a resposta da antena de macho de <i>D. saccharalis</i> . .....	42
<b>Figura 2.5</b> Espectro de massas do composto (Z)-9-hexadecenal presente no extrato do feromônio sexual de <i>D. saccharalis</i> .....	43
<b>Figura 2.6</b> Análise comparativa dos padrões (Z)-9-hexadecenal e (E)-9-hexadecenal, analisados em GC-EAD com uma coluna DB-5 (30 x 0,25 mm; 0,25 µm) para identificar a resposta da antena de macho de <i>D. saccharalis</i> . .....	43
<b>Figura 2.7</b> Espectro de massas do composto hexadecanal presente no extrato do feromônio sexual de <i>D. saccharalis</i> . .....	44
<b>Figura 2.8</b> Cromatogramas referentes à co-injeção do extrato concentrado para 1 IE de 90 glândulas de fêmeas virgens de <i>D. saccharalis</i> com os padrões (Z,E)-9,11-hexadecadienal, hexadecanal, (Z)-11-hexadecenal e (Z)-9-hexadecenal, analisados em coluna DB-5 (30 x 0,25 mm; 0,25 µm).....	45
<b>Figura 3.1</b> Fotografia da cuba de eletroforese vertical (Fonte: arquivo do Laboratório de Semioquímicos-UFPR).....	56
<b>Figura 3.2</b> Fotografias; A: sistema de transferência da membrana, B: membrana corada com solução Ponceau (Fonte: arquivo do Laboratório de Semioquímicos-UFPR).....	57
<b>Figura 3.3</b> Fotografia da membrana em processo de incubação com anticorpos primários (Fonte: arquivo do Laboratório de Semioquímicos-UFPR).....	57
<b>Figura 3.4</b> Quantidade média de proteína total das antenas e pernas de <i>D. saccharalis</i> coletadas na fotofase contínua e na escotofase em fotoregime 12:12 h. Barras com diferentes letras indicam diferenças significativas (teste de Tukey, p < 0,05). .....	59
<b>Figura 3.5</b> Gel de poliacrilamida 15% corado com coomassie-blue, mostrando o perfil eletroforético das proteínas extraídas de antenas e pernas de <i>D. saccharalis</i> , após separação por SDS-PAGE. As amostras foram extraídas de insetos submetidos a condições de fotofase contínua e escotofase de fotoregime 12:12 h. <b>AFE</b> : antenas de fêmeas da escotofase; <b>PFE</b> : pernas de fêmeas de escotofase; <b>AFF</b> : antenas de fêmeas de fotofase contínua; <b>PFF</b> : pernas de fêmeas de fotofase contínua; <b>AME</b> : antenas de machos da escotofase; <b>PME</b> : pernas de machos de escotofase; <b>AMF</b> : antenas de machos de fotofase contínua; <b>PMF</b> : pernas de machos de fotofase contínua. ....	60
<b>Figura 3.6</b> Western blot do extrato cru de proteína de antenas e pernas de machos e fêmeas de <i>D. saccharalis</i> em condições de fotofase contínua e escotofase do fotoregime 12:12 h após SDS-PAGE (15%), empregando o anticorpo anti-PBP1 na diluição (1:1.500). <b>AFE</b> : antenas de fêmeas da escotofase; <b>PFE</b> : pernas de fêmeas de escotofase; <b>AFF</b> : antenas de fêmeas de fotofase contínua; <b>PFF</b> : pernas de fêmeas de fotofase contínua; <b>AME</b> : antenas de machos da escotofase; <b>PME</b> : pernas de machos de escotofase; <b>AMF</b> : antenas de machos de fotofase contínua; <b>PMF</b> : pernas de machos de fotofase contínua.....	61
<b>Figura 4.1</b> Larvas de <i>Diatraea indigenella</i> se alimentando de milho (Fonte: arquivo do Laboratório de Semioquímicos-UFPR). .....	68

<b>Figura 4.2</b> Fêmeas de <i>Diatraea indigenella</i> em observação durante experimento de avaliação do comportamento de chamamento (Fonte: arquivo do Laboratório de Semioquímicos-UFPR).....	69
<b>Figura 4.3</b> Fotografia do olfatômetro de vidro de dupla escolha do tipo Y (Fonte: arquivo do Laboratório de Semioquímicos-UFPR). .....	72
<b>Figura 4.4</b> Duração média do chamamento em minutos de 30 fêmeas de <i>D. indigenella</i> durante sete escotofases. Letras diferentes indicam diferença significativa (Teste de Tukey, $p < 0,05$ ).....	74
<b>Figura 4.5</b> Número de vezes, expressos em porcentagem, de exposição da glândula produtora de feromônio de 30 fêmeas virgens de <i>D. indigenella</i> durante sete escotofases. Percentual de fêmeas que expuseram sua glândula uma vez (▨); duas vezes (■); três vezes (▩) e que não apresentaram exposição da glândula (■).....	74
<b>Figura 4.6 A:</b> Padrão temporal de chamamento exibido por 30 fêmeas de <i>D. indigenella</i> durante uma escotofase completa. <b>B:</b> Concentração média em $\text{ng glândula}^{-1}$ do Z9,E11-16:Ald, componente majoritário do feromônio sexual de <i>D. indigenella</i> , durante uma escotofase completa ( $n=4$ ). Letras diferentes indicam diferença significativa (Teste de Tukey, $p < 0,05$ ). .....	76
<b>Figura 4.7 A:</b> GC-EAD de uma antena de macho <i>D. indigenella</i> estimulada com um extrato de feromônio obtido de 13 glândulas de fêmeas virgens, entre dois e três dias após a emergência. <b>1</b> e <b>2</b> são os componentes minoritários e <b>3</b> é o componente majoritário Z9,E11-16:Ald. <b>B:</b> Espectro de massa do componente majoritário presente no extrato do feromônio sexual de <i>D. indigenella</i> . .....	77
<b>Figura 4.8</b> Preferência de machos de <i>D. indigenella</i> ao extrato do feromônio sexual obtido de fêmeas virgens e ao componente majoritário Z9,E11-16:Ald em bioensaio utilizando olfatômetro do tipo Y. Foram avaliados o extrato e o padrão sintético do componente majoritário <i>versus</i> o hexano, como controle, e o extrato <i>versus</i> o padrão sintético em três experimentos independentes empregando 35 machos cada um. Letras maiúsculas indicam diferença significativa (teste $X^2$ , $p < 0,05$ ).....	78

## RESUMO

Os principais componentes do feromônio sexual de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794), a broca da cana, (*Z,E*)-9,11-hexadecadienal e (*Z*)-11-hexadecenal, foram identificados e quantificados em quatro populações do Brasil e uma população da Colômbia utilizando GC-EAD, GC-MS e GC. Três razões distintas entre os compostos foram observadas; 9:1, 6:1 e 3:1. O componente majoritário, (*Z,E*)-9,11-hexadecadienal, apresentou concentração que variou de 6,8 a 21,9 ng glândula<sup>-1</sup>. No caso do (*Z*)-11-hexadecenal, a concentração variou de 1,7 a 6,5 ng glândula<sup>-1</sup>. Vinte e cinco sequências do citocromo oxidase II de *D. saccharalis* foram analisadas, apresentando variação intra-específica baixa, sendo representadas por onze haplótipos. O mais frequente foi representado pelos espécimes dos estados brasileiros de São Paulo, Paraná e Pernambuco. Os espécimes colombianos apresentaram a maior divergência genética. Os valores de variabilidade genética entre os espécimes foram coincidentes com aqueles obtidos nas análises dos extratos do feromônio sexual. Estes resultados evidenciam uma variação na composição do feromônio e uma co-variação nos haplótipos das populações de *D. saccharalis* estudadas.

Análises dos extratos de feromônio sexual de fêmeas de *D. saccharalis* obtidos de fêmeas virgens 2 ou 3 dias de idade evidenciaram a presença de quatro componentes EAD - ativos. Os componentes do feromônio sexual de *D. saccharalis* foram identificados via GC-MS e co-injeção com padrões sintéticos. Dois novos componentes minoritários, hexadecanal e (*Z*)-9-hexadecenal, foram identificados. Também foram descritos neste estudo o (*Z,E*)-9,11-hexadecadienal e o (*Z*)-11-hexadecenal. A razão apresentada entre os quatro componentes, (*Z,E*)-9,11-hexadecadienal, hexadecanal, (*Z*)-11-hexadecenal e (*Z*)-9-hexadecenal, foi de 17:1,4:1:1, respectivamente.

Neste trabalho também foram avaliadas as expressões das proteínas ligantes de feromônio, PBP, presentes em machos e fêmeas de *D. saccharalis* expostos a diferentes condições de luz; fotofase contínua e fotoregime de 12h de fotofase e 12 h de escotofase. Também foi avaliado o padrão de expressão das PBPs em ambos os sexos. Os extratos de proteína total dos tecidos foram analisados empregando eletroforese em SDS-PAGE, mostrando uma separação uniforme das subunidades de proteína. A expressão da proteína imunorreativa *Bmori*PBP foi negativa nas pernas de ambos os sexos. Por outro lado, a expressão foi positiva nas antenas de machos e fêmeas. Os machos apresentaram duas bandas expressas com massas molares de aproximadamente 15 kDa e 18 kDa, cada uma delas. Para as fêmeas, no entanto, uma única banda foi observada, com massa molar aparente de 15 kDa. O presente estudo confirmou a independência da expressão das PBP para a *D. saccharalis*, em relação às condições de fotoperíodo.

Finalmente, aspectos como início, duração e padrão temporal de chamamento, e número de vezes de exposição da glândula produtora de feromônio de *Diatraea indigenella* Dyar & Heinrich, 1927 (Lepidoptera: Crambidae) foram observados durante sete escotofases. O comportamento de chamamento ocorreu desde a emergência das fêmeas com um decréscimo no número de vezes que a glândula era exposta e na duração após a sexta escotofase. A maior porcentagem de fêmeas chamando se deu seis horas após o início da escotofase. O principal componente do feromônio sexual foi identificado a partir de extratos obtidos de fêmeas virgens utilizando GC-EAD, GC-MS e bioensaios em olfátômetro. O componente majoritário foi identificado como (*Z,E*)-9,11-hexadecadienal (*Z9,E11-16:Ald*). Foram ainda observados dois componentes minoritários ativos frente a antenas de machos. A concentração do (*Z9,E11-16:Ald*) variou de 2,53 to 13,7 ng glândula<sup>-1</sup>, sendo o maior valor detectado na sexta hora da escotofase. Embora os tempos de retenção dos dois compostos minoritários presentes no extrato tenham sido estimados pelas respostas

observadas no EAD, as suas estruturas químicas não foram confirmadas devido às baixas concentrações nos extratos. Bioensaios empregando olfatômetro mostraram que os extratos obtidos das glândulas e o componente majoritário atraíram 86% e 68% dos machos, respectivamente, quando testados individualmente contra hexano. Porém, uma atração significativa (77%) foi observada quando os extratos de glândula foram avaliados *versus* o padrão sintético do componente majoritário.

## ABSTRACT

(9Z,11E)-hexadecadienal and (Z11)-hexadecenal, both the main sex pheromone components of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794), were identified and quantified from four Brazilian and one Colombian populations using GC-EAD, GC-MS and GC analyses. Three different ratios were observed, 9:1, 6:1, and 3:1. The pheromone concentration for the major component, (9Z,11E)-hexadecadienal, varied from 6.8 ng/gland to 21.9 ng/gland and from 1.7 ng/gland to 6.5 to the minor component, (Z11)-hexadecenal. The twenty-five *D. saccharalis* cytochrome oxidase II sequences that were analyzed showed low intra-specific variation and represented only eleven haplotypes, with the most frequent being the one represented by specimens from São Paulo, Paraná, and Pernambuco states. Specimens from Colombia showed the highest genetic divergence from the others haplotypes studied. Data on the genetic variability among specimens, more than their geographic proximity, were in agreement with data obtained from analyses of the pheromone extracts. Our data demonstrated a variation in pheromone composition and a covariation in haplotypes of the *D. saccharalis* populations studied.

Analyses of extracts of the sex pheromone of the same insect obtained from virgin females 2 or 3 days after their emergence indicated the presence of four biologically active components. There were also identified two minor components, hexadecanal and (Z)-9-hexadecenal by using GC-EAD and GC-MS. Two already known compounds, (Z,E)-9,11-hexadecadienal and (Z)-11-hexadecenal were also identified in this study. The ratio among the compounds was 17:1.4:1:1, respectively. The components of the sex pheromone of *D. saccharalis* were verified by the co-injection of the pheromone extracts with authentic standards.

The expression of pheromone binding proteins, PBPs, was also investigated. They were evaluated from males and females of *D. saccharalis* that were exposed to different light conditions; continuous photophase and a photoregime of 12h photophase and 12 h scotophase. The pattern of expression of the PBPs in males and females was also investigated. Total protein extracts from the tissues were analyzed by electrophoresis in SDS-PAGE. The BmoriPBP immunoreactive protein expression was negative in the legs of both sexes. On the other hand, the expression was positive as far as the males and females antennae were concerned. Males presented two bands with apparent molar masses of about 15 kDa and 18kDa, each of them. However, only one band was observed in females, with an apparent molar mass of 15 kDa. The expression of PBPs regarded to the photoperiod conditions was confirmed in this study.

Finally, behavioral aspects such as calling start time and length and calling bouts were evaluated, subsequently the main sex pheromone component of *Diatraea indigenella* Dyar & Heinrich, 1927 (Lepidoptera: Crambidae) was identified from extract of female glands, using GC-EAD, GC-MS analysis and olfactometer bioassays. Calling behavior was observed soon after the emergence of the females, with a decrease in calling bouts and length after the sixth scotophase. The highest percentage of calling females was verified passed six hours after the lights were off. Male response in the olfactometer showed that gland extracts attracted 71% of the individuals. No difference in attractivity was observed when a standard was tested against the control (hexane). EAD responses showed more than one active component with the major sex pheromone component being the (Z,E)-9,11-hexadecadienal. This component concentration varied from 2.53 ng gland<sup>-1</sup> to 13.7 ng gland<sup>-1</sup>. The highest concentration was detected at the sixth hour of the scotophase.

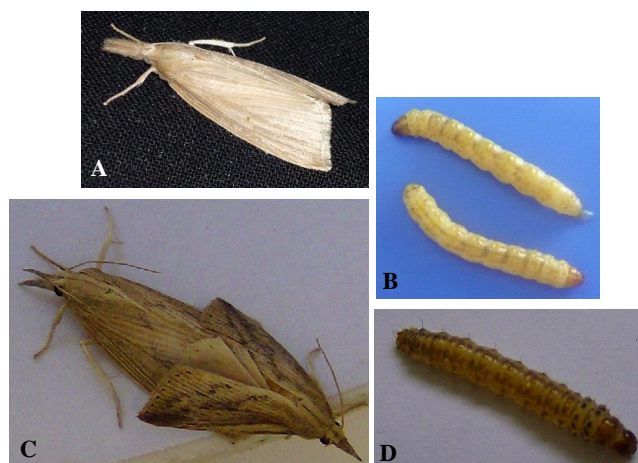
## Introdução geral

A broca da cana de açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) é uma espécie nativa do hemisfério ocidental (Capinera, 2001) distribuída desde o sul dos Estados Unidos, às Antilhas, e da América Central até a Argentina (Capinera, 2001; Long and Hensley, 1972). No Brasil, a espécie se distribui amplamente em as regiões produtoras de cana de açúcar (Botelho et al., 1999; Guevara and Wiendl, 1980). Outra espécie pertencente a este gênero é a *Diatraea indigenella*, Dyar & Heinrich 1927 com ocorrência restrita às regiões produtoras de cana de açúcar da Colômbia e região norte do Brasil (Box, 1956; Leslie, 2007).

O ciclo biológico de *D. saccharalis* pode variar entre 40 e 70 dias dependendo das condições climáticas. Os ovos são depositados pelas fêmeas nas faces adaxial e abaxial das folhas, em massas com disposição imbricada, contendo entre 10 e 37 ovos, podendo ser encontradas massas contendo até 50 ovos. O total de ovos que a fêmea pode ovipositar durante seu ciclo de vida pode variar entre 300 e 600 (Dossi et al., 2009; Hayward, 1943; Lima-Filho and Lima, 2001). Os ovos possuem formato achatado; com coloração inicial é branca, tornando-se amarelos com o desenvolvimento embrionário e próximo à eclosão adquirem cor marrom escuro, quando é possível visualizar a cápsula cefálica. A duração desta fase varia em função da temperatura podendo ser de uma a duas semanas (Botelho and Macedo, 2002). As larvas são do tipo eruciforme, possuem três pares de pernas torácicas, quatro pares de falsas pernas abdominais e um par de falsas pernas anais; a coloração inicial das larvas é amarelada, com manchas ou pontuações marrons sobre o corpo e a cápsula cefálica é marrom. No desenvolvimento apresenta de três a seis ecdises, com comprimento máximo variando entre 20 e 33 mm. A fase larval pode demorar entre 20 e 40 dias (Gallo et al., 2002). As pupas são de tipo obtecta, podem ter cerca de 17 mm de comprimento e 4 mm

de largura, são de coloração inicial marrom clara e com o desenvolvimento adquirem coloração mais escura, até a emergência do adulto. Esta fase pode ter uma duração de 9 a 14 dias (Wille, 1952). Os adultos possuem asas anteriores com coloração amarelo-palha com desenhos pardos e asas posteriores de cor esbranquiçada, sendo que a coloração nas asas dos machos é mais escura (Figura 1); envergadura alar entre 25 e 32 mm e o tempo de vida médio dos adultos é de 4 dias (Gallo et al., 2002).

O ciclo biológico de *D. indigenella*, Dyar & Heinrich, 1927 é semelhante ao ciclo de *D. saccharalis* sendo que a duração média na fase de ovo varia de 8 a 10 dias, a fase de larva de 25 a 40 dias (Figura 1), de 9 a 12 dias para a fase de pupa e o período médio para a fase adulta é de 4 dias (Cenicña, 1988; Pastrana et al., 1993)



**Figura 1.** (A-B) Fotografias de *Diatraea saccharalis*, A: adulto e B: larvas; (C-D) fotografias de *D. indigenella* C: adultos em acasalamento e D: larva (Fonte: arquivo do Laboratório de Semioquímicos-UFPR e arquivo pessoal de Y. Gutierrez).

A diferença morfológica das genitálias dos machos destas duas espécies é o tegume amplo com relação ao uncu e ao gnato, tegum amplo com lobos arredondados e longos em *D. saccharalis* enquanto tegume estreito com relação ao uncu e gnato, e os lóbulos do

tegume com forma estreita ou em ponta são características da *D. indigenella* (Goyes et al., 2008).

Os hospedeiros preferenciais para ambas espécies ovipositarem são gramíneas tais como a cana de açúcar, principalmente (Cueva et al., 1980; Gallo et al., 1988; Lange et al., 2004; Peairs and Saunders, 1980); também podem estar presentes em milho (Moré et al., 2003; Serra and Trumper, 2006), sorgo (Bortoli et al., 2005; Sharma, 1993; Waquil et al., 2001) e arroz (Ferreira, 1998; Ferreira et al., 2001).

A fase larval deste complexo de brocas do colmo é o período de maior preocupação pelos hábitos alimentares que apresentam. Após a eclosão, as larvas alimentam-se do parênquima das folhas, se deslocam para a bainha e penetram nos colmos abrindo galerias (Gallo et al., 1988; Peairs and Saunders, 1980). Na cana de açúcar, por exemplo, o ataque pode causar brotações laterais, enraizamento aéreo, perda de peso, afinamento e quebra do colmo, atrofia de entrenós, ressecamento dos ponteiros (que é conhecido como coração morto) e morte da planta (Gómez and Lastra, 1995; Parra, 1993). Por outro lado, os orifícios deixados pelas larvas permitem a colonização de fungos como *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium moniliforme*, os quais induzem a produção de substâncias de defesa na planta a partir da conversão da sacarose, resultando em perdas do teor de sólidos solúveis do suco (Brix) e a redução do rendimento do álcool. As perdas podem chegar a 35 kg de açúcar ha<sup>-1</sup>, e a 30 litros de álcool ha<sup>-1</sup> com apenas 1% de colmos broqueados (Gallo et al., 2002; Macedo and Botelho, 1988; Orlando-Filho et al., 1994).

A presença simultânea de todas as fases de desenvolvimento durante o ano todo e a localização das larvas e pupas no interior dos talos das plantas fazem com que seu controle pelos métodos tradicionais seja ineficiente (Gómez and Lastra, 1995; William and Metcalfe Jr., 1969), tendo-se que recorrer a outros métodos, como por exemplo o controle biológico.



No Brasil o controle das populações de *D. saccharalis* é realizado mediante a liberação de parasitóides de ovos, *Trichogramma galloi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e parasitóides de larvas *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) (Botelho et al., 1999; Botelho, 1992; Macedo, 2000). Na Colômbia são usadas as espécies *Trichogramma exiguum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e *Telenomus* sp. (Hymenoptera: Scecilionidae) como parasitóides de ovos, *Metagonistylum minaense* Towns, 1927 e *Paratheresia claripalpis* Wulp, 1896 (Diptera: Tachinidae) como parasitóides de larvas para realizar o controle destas brocas (Goméz and Lastra, 1995). No entanto, o controle das populações de *D. indigenella* através dos parasitóides apresenta baixos índices com relação ao parasitismo obtido em *D. saccharalis* fazendo com que a intensidade do dano causado por esta espécie seja maior (Goméz and Lastra, 1995).

Uma tentativa para tornar mais eficiente a liberação dos parasitóides tem sido conduzida através do uso do feromônio sexual de *D. saccharalis*, empregando fêmeas virgens em gaiolas, dado que permite determinar a fenologia de vôo das fêmeas e assim estabelecer o melhor momento de liberação dos parasitóides.

O uso de feromônios permite manipular o comportamento reprodutivo entre indivíduos da mesma espécie, regulando diferentes estágios do processo de cópula e assim controlando as populações mediante a captura massal, ou pela confusão sexual, ou ainda para monitorar a presença do inseto em campo (Ferreira and Zarbin, 1998; Karlson and Luscher, 1959; Pallini et al., 2001; Vilela and Lucia, 2001).

As estruturas dos feromônios sexuais nas espécies pertencentes ao gênero *Diatraea*, usualmente são cadeias carbônicas lineares saturadas ou insaturadas, contendo um aldeído como grupo funcional (Davis et al., 1986; Gries et al., 1998; Hedin et al., 1986; Roelofs and Rooney, 2003). Os primeiros estudos do feromônio sexual de *D. saccharalis* foram realizados na década de 1970, quando foram usadas fêmeas virgens e extratos de seus

abdomens para observar a atratividade dos machos (Hammond and Hensley, 1970, 1971; Perez and Long, 1964). Em 1982 foi identificado o principal componente, (*Z,E*)-9,11-hexadecadienal, do feromônio sexual (Carney and Lui, 1982; Svatoš et al., 1999; Svatoš et al., 2001); porém, os resultados de captura de machos em campo foram menores que as respostas obtidas quando eram usadas fêmeas virgens em gaiolas (Almeida et al., 1983; Hammond and Hensley, 1971; Patrick and Hensley, 1970). Finalmente, em 2002 foi observado um segundo componente, (*Z*)-11-hexadecenal, que incrementava a atratividade dos machos em condições de túnel de vento quando era adicionado ao componente majoritário (Batista-Pereira et al., 2002; Kalinová et al., 2005). Não obstante todos estes avanços, as tentativas em campo para capturar machos não têm sido eficientes, o que indica a necessidade de aprofundar os estudos visando a completa identificação dos outros componentes envolvidos no sistema de comunicação químico, no que se refere ao feromônio sexual.

Os feromônios sexuais das mariposas são constituídos de uma mistura de componentes e estas misturas estão fundamentadas não só na combinação de diferentes componentes, mas também na variação da razão entre eles (Ando et al., 2004). Estes aspectos são importantes no sistema de comunicação química das espécies, permitindo, também, seu isolamento reprodutivo (Hansen, 1984; Klun et al., 1973). Em alguns sistemas o componente majoritário é o responsável pelo comportamento a longa distância, enquanto os minoritários são responsáveis pelo comportamento a curta distancia (Mafra-Neto and Cardé, 1995).

Sendo assim, a composição química do feromônio sintético a ser utilizado em campo deve ser a mesma que a produzida pela fêmea para desencadear a sequência padrão de atração e comportamento pré-copulatório nos machos, já que o sistema de comunicação química apresenta elevadas sensibilidade e seletividade (Kaissling, 1987; Linn and Roelofs, 1989).

As respostas mediante a presença de feromônios sexuais também são moduladas pela qualidade e quantidade dos compostos que o macho percebe (Linn et al., 1987). Por outro lado, a produção, emissão e percepção dos feromônios dependem da idade fisiológica das fêmeas e dos machos, assim como da presença de feromônio sexual de coespecíficos que, no mesmo ambiente, podem adiantar ou retardar a produção e emissão de feromônio por fêmeas da mesma espécie (McNeil, 1991). Fatores ambientais tais como temperatura, duração do dia e intensidade luminosa, também afetam o início da produção do feromônio pelas fêmeas (Gerber and Howlader, 1987; Han and Gatehouse, 1991a; Turgeon and McNeil, 1983).

Estudos preliminares demonstraram que adultos de *D. saccharalis* apresentam um comportamento de cópula noturno, diferenciado em ambos os sexos, caracterizado pelo movimento das antenas e asas e pelo posicionamento do abdome nas fêmeas (Novak, 1967). O período de início do chamamento ocorre após a terceira hora da escotofase (Batista-Pereira et al., 2002; Walker, 1965). O feromônio sexual de *D. saccharalis* é produzido por uma glândula dorsal reversível, bilobada, localizada no segmento terminal do abdome das fêmeas (Bjostad, 1987; White et al., 1972). Estas glândulas possuem células secretoras e células da epiderme modificadas, que tipicamente contêm um retículo endoplasmático bem desenvolvido relacionado a o metabolismo de ácidos graxos (Blum, 1985; Percy-Cunningham and MacDonald, 1987).

Informações relacionadas a todos estes comportamentos, incluindo horário de liberação do feromônio, atividade de vôo e acasalamento, são de suma importância para o desenvolvimento da técnica de uso de feromônios sexuais (Lima et al., 1998). Fatores bióticos como idade e biossíntese hormonal, e abióticos, como o fotoperíodo e a temperatura, podem interferir nesse processo influenciando o tempo de chamamento de fêmeas (Mazo-Cancino et al., 2004).

A resposta dos machos ao feromônio sexual é mediada por órgãos olfativos especializados, como as sensilas, localizadas principalmente nas antenas (Field et al., 2000), onde estão presentes proteínas que se ligam aos odores (OBP) e iniciam os sinais de tradução (Breer et al., 1990) ou transformação do estímulo químico em uma resposta bio-elétrica (Schneider, 1970). Esta percepção pode ser avaliada em condições de laboratório e por técnicas eletrofisiológicas como o eletroantenograma (EAG). Esta técnica mede as mudanças de potencial entre a base e a ponta da antena quando exposta a diferentes estímulos químicos (Strausfeld and Hildebrand, 1999; Struble and Heinrich, 1984).

As fêmeas de alguns lepidópteros desenvolveram ao longo do processo evolutivo a capacidade de perceber seu próprio feromônio, provavelmente para reduzir a competição por machos e por fontes de alimento, ou para aumentar a probabilidade de encontrar parceiros. Por exemplo, o aumento do número de fêmeas liberando feromônio sexual em alta densidade populacional pode incrementar a probabilidade de atraírem machos, ou induzirem a dispersão das mesmas quando o nível populacional é alto, havendo competição por machos ou por alimentos (Palaniswamy and Seabrool, 1985).

Em muitos estudos que envolvem estruturas populacionais, relações filogenéticas e vários aspectos biológicos e evolutivos de uma grande variedade de organismos, têm sido empregados genes ou fragmentos da molécula de ADN mitocondrial, dada a grande quantidade de cópias existentes na célula e a facilidade de extração (Avisé et al., 1987). O ADN mitocondrial é considerado um genoma compacto, pois raramente possui sequências repetitivas, pseudogenes e introns. Seu conteúdo gênico é bastante conservado, apresentando herança maternal que é uma característica importante por não esconder as mutações resultantes da recombinação, permitindo avaliar a relação entre grupos bastante relacionados (Avisé et al., 1987; Brower, 1994; Moritz et al., 1987; Wilson et al., 1985). A velocidade evolutiva relativamente alta, especialmente em sítios silenciosos dos genes que codificam a

proteína mitocondrial, facilita a distinção de linhagens (Harrison, 1989; Simon et al., 1994). Também são identificados com facilidade os efeitos de processos aleatórios como deriva genética pela fixação ou perda de haplótipos devido ao tamanho efetivo do ADN mitocondrial, que é apenas um quarto em relação ao tamanho do ADN nuclear (Avise, 1994).

A região do ADN mitocondrial, citocromo oxidase II, tem sido usada para deduzir as relações filogenéticas em insetos da ordem Lepidoptera (Sperling and Hickey, 1994) e para identificar a presença de biotipos, como nas espécies *Lambdina fiscellaria* (Guenée, [1858]) (Lep:Geometridae) (Sperling et al., 1999) e *Eldana saccharina* Walker (Lep: Pyralidae) (King et al., 2002). Em *D. saccharalis*, este gene pode auxiliar na determinação das variações resultantes da ampla distribuição geográfica da espécie, através do alinhamento e análises das sequências obtidas, que podem ser comparadas com a informação proveniente do seu feromônio sexual.

A necessidade de técnicas de controle mais eficientes, que otimizem o custo de produção sendo menos nocivas ao meio ambiente, tem aumentado a investigação do uso de feromônios, para serem incluídos no manejo de pragas de difícil detecção e controle (Borges and Aldrich, 2001; Cardé and Elkinton., 1984). Por serem específicos, os feromônios sexuais permitem detectar a presença da praga nos ecossistemas mesmo em baixas densidades, avaliar a distribuição espacial da população no campo e caracterizar o momento dos picos populacionais, permitindo direcionar as medidas de controle.

Da mesma forma, através do estudo do comportamento de chamamento de *D. indigenella*, juntamente com estudos paralelos sobre a identificação do seu feromônio sexual, será possível complementar o manejo do inseto, com menores impactos ecológicos.

## Objetivos

Considerando-se todos os aspectos mencionados anteriormente em consideração, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de buscar um aprofundamento no conhecimento envolvendo o sistema de comunicação química de *D. saccharalis* e *D. indigenella*, representando um estudo preliminar no aprimoramento de métodos de monitoramento e controle destas espécies.

Desta forma, este trabalho está composto por quatro capítulos, sendo que o objetivo do primeiro capítulo foi avaliar a divergência genética entre distintas populações de *D. saccharalis* procedentes do Brasil, Uruguai e Colômbia, e a variação dos dois principais componentes do feromônio sexual.

O segundo capítulo visou a re-identificação do feromônio sexual de *D. saccharalis* no intuito de verificar a presença de componentes adicionais presentes na mistura feromonal. Esta etapa do trabalho foi desenvolvida na medida que os compostos atualmente identificados não exercem efeito na captura do inseto.

O terceiro capítulo teve a finalidade de estudar a influência do fotoperíodo na expressão das proteínas ligantes do feromônio nas antenas e pernas de machos e fêmeas de *D. saccharalis*.

O último capítulo foi direcionado para o estudo do comportamento de chamamento de *Diatraea indigenella* e avanços na identificação de seu feromônio sexual.

## Capítulo 1

### Variação do feromônio sexual e do ADN mitocondrial de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) em função da localidade geográfica

#### Resumo

Os principais componentes do feromônio sexual da broca da cana, *Diatraea saccharalis*, (*Z,E*)-9,11-hexadecadienal e (*Z*)-11-hexadecenal, foram identificados e quantificados de quatro populações do Brasil e de uma população Colombiana utilizando as técnicas de GC-EAD, GC-MS e GC. Foram observadas três razões diferentes entre os compostos mencionados anteriormente, 9:1, 6:1 e 3:1. A concentração do componente majoritário, (*Z,E*)-9,11-hexadecadienal, variou entre 6,8 e 21,9 ng glândula<sup>-1</sup>. Para o componente minoritário, (*Z*)-11-hexadecenal, a concentração variou de 1,7 e 6,5 ng glândula<sup>-1</sup>. Foram analisadas vinte e cinco sequências do citocromo oxidase II de *D. saccharalis*, as quais apresentaram uma variação intra-específica baixa e foram representadas por onze haplótipos. O haplótipo mais frequente foi representado pelos espécimes dos estados brasileiros de São Paulo, Paraná e Pernambuco. Os espécimes da Colômbia apresentaram a maior divergência genética. Os valores de variabilidade genética entre os espécimes coincidiram com aqueles obtidos nas análises dos extratos do feromônio sexual, mais do que com a proximidade geográfica. Estes resultados evidenciam uma variação na composição do feromônio e uma co-variação nos haplótipos das populações de *D. saccharalis* estudadas.

**Abstract** (*Z,E*)-9,11-hexadecadienal and (*Z*)-11-hexadecenal, the main sex pheromone components of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*, were identified and quantified from four Brazilian and one Colombian populations using GC-EAD, GC-MS and GC analyses. Three different ratios were observed, 9:1, 6:1, and 3:1. The pheromone concentration for the major component, (*Z,E*)-9,11-hexadecadienal, varied from 6.8 ng gland<sup>-1</sup> to 21.9 ng gland<sup>-1</sup> and from 1.7 ng gland<sup>-1</sup> to 6.5 to the minor component, (*Z*)-11-hexadecenal. The twenty-five *D. saccharalis* cytochrome oxidase II sequences that were analyzed showed low intra-specific variation and represented only eleven haplotypes, with the most frequent being the one represented by specimens from São Paulo, Paraná, and Pernambuco states. Specimens from Colombia showed the highest genetic divergence from the others haplotypes studied. Data on the genetic variability among specimens, more than their geographic proximity, were in agreement with data obtained from analyses of the pheromone extracts. Our data demonstrate a variation in pheromone composition and a covariation in haplotypes of the *D. saccharalis* populations studied.

## 1 Introdução

A comunicação sexual na ordem Lepidoptera pode variar drasticamente, especialmente naquelas espécies com ampla distribuição geográfica (Cardé and Haynes, 2004). Esta variação geográfica pode ser explicada pela influência de fatores genéticos aleatórios como a deriva genética, ou ainda pela seleção natural ou sexual (Rice, 1987; Templeton, 1980). Contudo, até o momento os fundamentos evolutivos para esta divergência não são claramente explicados.

Existem diversos exemplos relatando as diferenças na razão existente entre os componentes da mistura feromonal entre populações e mesmo dentro de uma população de uma única espécie. Por exemplo, existem trabalhos que descrevem diferenças em espécies de Crambidae (Huang and Takanashi, 1998; Kawazu et al., 2009; Kawazu et al., 2000; Sorenson, 1992), a qual inclui *Diatraea*. A mistura da composição química do feromônio sexual, a concentração dos componentes e a frequência de emissão da fêmea são de suma importância na resposta do macho.

*D. saccharalis* está presente em diversos países das Américas, alimentando-se de gramíneas de importância agrícola e econômica, onde se inclui a cana de açúcar, *Saccharum officinarum* L. (Cueva et al., 1980; Long and Hensley, 1972). A presença simultânea de todas as fases de desenvolvimento durante o ano todo e a localização das larvas e pupas no interior dos talos são aspectos que dificultam seu controle (Gómez and Lastra, 1995; William and Metcalfe Jr., 1969).

Dois componentes do feromônio sexual de *Diatraea saccharalis*, (*Z,E*)-9,11-hexadecadienal (Svatoš et al., 2001) e (*Z*)-11-hexadecenal (Kalinová et al., 2005) têm sido identificados. Os dois componentes apresentaram atividade na antena, identificada através de análises empregando GC-EAD, além de respostas positivas em túnel de vento



empregando uma razão de 10:1 entre os componentes anteriormente mencionados (Batista-Pereira et al., 2002; Kalinová et al., 2005; Svatoš et al., 2001). No entanto, estes componentes apresentam uma baixa atratividade em campo quando comparados com a atratividade de armadilhas contendo fêmeas virgens (Almeida et al., 1983; Hammond and Hensley, 1971; Patrick and Hensley, 1970), evidenciando a complexidade da composição do feromônio sexual e a importância dos componentes minoritários envolvidos na orientação dos machos.

Apesar da identificação incompleta dos componentes do feromônio sexual de *D. saccharalis*, a determinação da relação apropriada dos dois componentes identificados é importante para maximizar a resposta na comunicação química, dado que esta informação estimula um sinal único e exclusivo, e variações desta mistura podem diminuir a habilidade do emissor para atrair o indivíduo do sexo oposto.

O melhor entendimento da influência da variação geográfica na composição do feromônio sexual pode facilitar o desenvolvimento de esquemas eficientes de armadilhas, para melhorar o monitoramento deste inseto de importância econômica, assim como elucidar se esta variação pode representar uma contribuição relevante na divergência das populações e na potencial especiação. Esta informação também pode ser complementada mediante relação filogenética das populações, mostrando a variação da composição feromonal. Em Lepidoptera, as sequências de ADN do gene mitocondrial citocromo oxidase II têm sido empregadas satisfatoriamente para determinar as relações filogenéticas de populações (Sperling and Hickey, 1994), sendo aplicáveis nas reconstruções filogenéticas de populações da broca da cana, *Diatraea saccharalis*.

Considerando todos estes aspectos o objetivo deste estudo foi verificar a variação na razão entre os dois principais componentes do feromônio sexual de diferentes populações de

*D. saccharalis*, assim como analisar a divergência das sequências do gene mitocondrial citocromo oxidase II.

## **2 Material e métodos**

### **2.1 Coleta de insetos para análise molecular**

Foram coletados machos e fêmeas adultos de *D. saccharalis* em Carpina (n=3), Pernambuco (PE); Paranaíba (n=2), Paraná (PR); Piracicaba (n=3), São Paulo (SP); São José de Rio Claro (n=2), Mato Grosso (MT); e Santo Antônio de Goiás (n=3), Goiás (GO), no Brasil; Departamento de Artigas (n=3), no Uruguai e Departamento do Valle de Cauca (n=3), na Colômbia. Os espécimes do estado de Goiás foram coletados de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.), enquanto os demais em plantações de cana de açúcar (*Saccharum* sp.). Os insetos foram mantidos em etanol 100% a -20°C até a realização das análises.

### **2.2 Extração de ADN**

O ADN genômico foi extraído do tórax dos adultos utilizando a metodologia de extração de sal (Sunnucks and Hales, 1996) com digestão da proteinase-K. A genitália dos espécimes estudados foram depositadas como espécimes *voucher* no Museu de Entomologia da Universidade de São Paulo em Piracicaba (SP). A reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar um fragmento de ADN da COII foi realizada com um volume de 25 µL, contendo 1 µL de ADN, 5 µL 5× da solução tampão PCR (10 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 100 mmol L<sup>-1</sup> KCl, 15 mmol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, pH 8,0), 200 µmol L<sup>-1</sup> de cada dNTP (Fermentas), 320 pmol L<sup>-1</sup> de cada iniciador (A-298: 5'ATRGGACATCA ATGATATTGA3'; 1-tLYS: 5'GTAAGAGACCAGTACTRG3'), 0,125 µL da solução Taq polimerase (5 U µL<sup>-1</sup>) (Fermentas), e água do tipo Milli-Q. As amostras foram processadas em um termociclador iCycler (Bio Rad) sob condições iniciais de desnaturação a 94°C por 1 min, seguidas de 35

ciclos a 94°C por 30 s; 50°C por 60 s, 72°C por 60 s, com uma extensão a 72°C por 1 min (Lange et al., 2004). Os produtos de PCR gerados foram confirmados mediante eletroforese em gel de agarose 1,5 % em solução tampão tris-acetato/EDTA (TAE) e posteriormente corados com 0,5  $\mu\text{L mL}^{-1}$  de brometo de etídio. A visualização foi conduzida com imagem UV e sistema de análise (Bio-Imaging Systems). Os produtos de PCR foram purificados pela precipitação com etanol 80% (Davis et al., 1994) antes da realização do sequenciamento. Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Interação em Insetos da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), USP.

### **2.3 Sequenciamento e clonagem**

Os produtos de PCR amplificados foram ligados no vetor pGEM-T Easy vector (Promega) seguindo as especificações do fabricante. As ligações foram introduzidas em células competentes de *Escherichia coli* NEB5a por eletroporação. As células transformadas foram dispersas em placas contendo agar LB, ampicilina (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside (X-Gal) e isopropil tiogalactoside (IPTG) em condições de assepsia. Foram processados simultaneamente controles positivos e negativos. Varreduras das colônias foram feitas pela técnica de palitagem selecionando colônias brancas em meio com LB contendo ampicilina (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). O ADN plasmidial das células de *E. coli* selecionadas foi purificado empregando o método de mini-prep (Sambrook and Russel, 2001). O tamanho dos insertos foi confirmado pela amplificação PCR utilizando os iniciadores do kit de clonagem. Posteriormente foi realizada eletroforese em gel de agarose. Esta etapa também foi conduzida na ESALQ, USP. Os clones foram sequenciados bi-direcionalmente pelo Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH-USP) (<http://genoma.ib.usp.br/>).

## 2.4 Alinhamento das sequências

As sequências foram alinhadas empregando-se o programa CLUSTAL X (Thompson et al., 1997) e editadas visualmente com a ajuda do programa BioEdit v.7.0.9.0 (Hall, 1999). Para melhor compreensão das variações inter e intra-específicas das sequências do COII da *Diatraea saccharalis* foram incluídas no alinhamento sequências anteriormente publicadas por Lange et al. (2004), as quais são procedentes de uma localidade brasileira não identificada (acesso GenBank no. AY320496), Jamaica (acesso GenBank no. AY320498), México (acesso GenBank no. AY320499), Texas, EUA (acesso GenBank no. AY320500), Flórida, EUA (acesso GenBank no. AY320497) e Venezuela (acesso GenBank no. AY320501). Também foram incluídas sequências de COII de espécies relacionadas para enraizar a árvore como por exemplo: *Diatraea busckella* Dyar & Heinrich, 1927 (acesso GenBank no. AY320490), *Diatraea centrella* (Möschler, 1882) (acesso GenBank no. AY320492), *D. grandiosella* Dyar, 1911 (acesso GenBank no. AY320949), *Diatraea rosa* Heinrich, 1931 (acesso GenBank no. AY320495.1) e *Chilo sacchariphagus* Bojer, 1856 (acesso GenBank no. AY320483).

Para inferir a posição da proteína no alinhamento, as sequências de ADN foram traduzidas em sequências de proteínas minimizando os *stop codons* usando Mac Clade v.4.08 (Maddison and Maddison, 2005), segundo a codificação do ADN mitocondrial de *Drosophila.melanogaster* (Meigen, 1830). O alinhamento para as análises filogenéticas excluiu os últimos dois nucleotídeos imediatamente depois do códon de terminação.

## 2.5 Rede de haplótipos e análises filogenéticas

A rede de haplótipos foi construída utilizando o método de Templeton (Templeton et al., 1992) com a ajuda do TCS v.1.18 (Clement et al., 2000), considerando os dados discrepantes como dados perdidos e 95% de limite de conexão.

As análises filogenéticas dos haplótipos únicos foram conduzidas com o objetivo de entender sua história evolutiva. Uma árvore de máxima parcimônia foi construída utilizando algoritmos heurísticos com 10.000 seqüências aleatórias (*random addition sequence* “RAS”) e embaralhamento de ramos (*branch swapping*) a partir da bissecção e reconexão de árvores (*tree bisection-reconnection* “TBR”), empregando o programa PAUP\* 4.0 (Swofford, 2000). As discrepâncias foram consideradas como dados perdidos. Uma topologia de consenso Bayesiana (post-10%-burn-in) foi calculada com base nos resultados de quatro corridas independentes de quatro cadeias de Markov para cinco milhões de gerações amostradas a cada milionésima topologia e considerando níveis prévios usando o programa Bayes v.3.1 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003).

As seqüências foram particionadas de acordo com sua posição no códon e cada partição foi analisada independentemente com um modelo de evolução diferente. Os modelos de evolução molecular foram selecionados baseados na pontuação da topologia de máxima verossimilhança otimizada, calculada com o PhyML v.3.0 (Guindon and Gascuel, 2003), utilizando o critério de informação Bayesiana (BIC: Schwarz, 1978) com jModeltest v.0.1.1 (Posada, 2008). Os modelos escolhidos para cada posição do códon da COII entre os 24 testados foram HKY+I, F81, e HKY+G.

O suporte do clado foi dado com base nas probabilidades Bayesianas posteriores (Alfaro et al., 2003) e as percentagens de *bootstrap* não-paramétricas baseadas em pesquisas de parcimônia heurística (100 RAS com TBR) de topologias geradas de pseudo-réplicas de 10.000 matrizes (Felsenstein, 1981).

## **2.6 Criação dos insetos e extração do feromônio**

As colônias de *D. saccharalis* procedentes dos estados de São Paulo e Paraná foram estabelecidas no Laboratório de Semioquímicos da Universidade Federal do Paraná sob

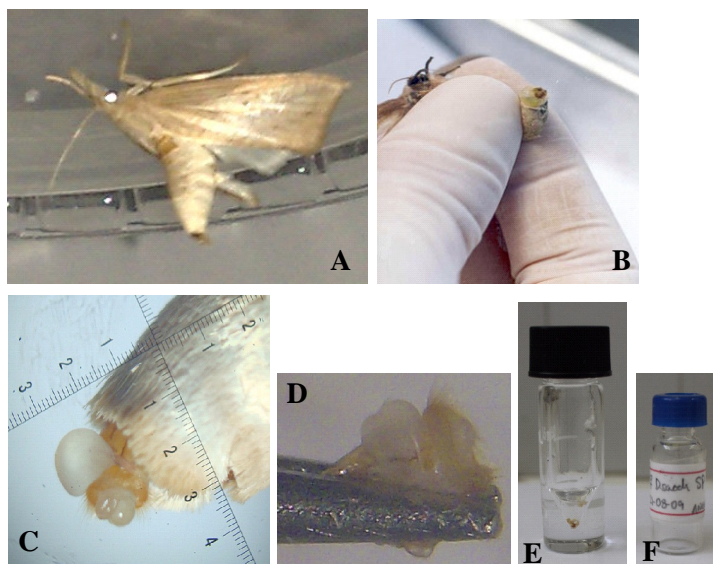
condições de fotoperíodo de 12 horas a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  e 70% de umidade relativa. Os adultos foram mantidos em gaiolas de PVC circulares ( $10 \times 20$  cm) cobertas com organza na parte superior e revestidas internamente com papel sulfite para permitir a oviposição. Uma solução de sacarose 10% foi mantida diariamente. As posturas foram conservadas em placas de petri de 10 cm de diâmetro contendo um algodão umedecido para garantir a umidade até a eclosão das larvas. As larvas foram transferidas para tubos de vidro ( $2,5 \times 8$  cm) contendo dieta artificial a base de soja, açúcar e gérmen de trigo (Parra and Mishfeldt, 1992), como pode ser observado na figura 1.1



**Figura 1.1** Fotografias da criação em laboratório de *D. saccharalis*. A e B: gaiolas; C: posturas; D: larvas em dieta; E: pupas (Fonte: arquivo do Laboratório de Semioquímicos-UFPR).

Os compostos biologicamente ativos foram obtidos da glândula produtora de feromônio de fêmeas virgens com 2 a 4 dias depois da emergência, entre a 5<sup>a</sup> e 7<sup>a</sup> hora de escotofase. As glândulas foram excisadas com pinças e transferidas para frascos cônicos. Foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de hexano destilado para cada glândula durante 20 min, à temperatura ambiente (Berger, 1972). Os extratos foram transferidos para tubos de vidro e armazenados a  $-20^\circ\text{C}$  até a realização das análises (Figura 1.2). Os extratos das glândulas de

feromônio das populações procedentes dos estados de Mato Grosso e Pernambuco foram obtidos de fêmeas virgens de 2 a 4 dias depois de emergidas, de pupas fornecidas de criações da Universidade Federal de Mato Grosso e da Universidade Federal Rural de Pernambuco, as quais empregaram a mesma dieta artificial das populações de São Paulo e Paraná. Os extratos do feromônio sexual dos espécimes da Colômbia foram obtidos de fêmeas fornecidas pelo Centro de Investigação da Cana de Açúcar da Colômbia (Cenicaña), as quais foram alimentadas com dieta artificial baseada em gérmen de trigo e cenoura (Lastra and Gómez, 2006). Os extratos foram obtidos de 33 fêmeas procedentes de São Paulo, 35 do Paraná, 28 de Pernambuco, 37 de Mato Grosso e 28 da Colômbia.



**Figura 1.2** Fotografias da extração do feromônio de *D. saccharalis*. A: fêmea em posição de chamamento; B: fêmea sendo preparada para excisão da glândula; C: glândula produtora de feromônio; D: corte da glândula produtora de feromônio; E: frasco cônico contendo glândulas e o solvente de extração; F: frasco de armazenamento do extrato (Fonte: arquivo do Laboratório de Semioquímicos-UFPR).

## 2.7 Análise dos extratos contendo o feromônio sexual

*Eletroantenograma acoplado a cromatografia em fase gasosa (GC-EAD)*. Os extratos do feromônio sexual de cada população foram analisados utilizando um cromatógrafo em fase

gasosa Shimadzu GC-2010 acoplado a um sistema eletroantegráfico Syntech (Hilversum, Holanda), conforme mostra a figura 1.3. O GC estava equipado com uma coluna DB-5 (30 m × 0,25 mm d.i. e 0,25 µm de espessura de filme; J&W Scientific Inc., EUA). Injetou-se 1 µL de cada extrato empregando o modo *splitless* com a temperatura do injetor a 250°C. A temperatura do forno foi mantida a 100°C por 1 min, aumentada para 270°C em uma velocidade de 10°C min<sup>-1</sup>, sendo mantida nesta temperatura por 7 min. O gás carregador usado foi Hélio e a pressão na coluna foi de 170 kPa. O efluente da coluna foi dividido em uma razão 1:1 com uma parte indo para o detector de ionização em chama (FID), a uma temperatura de 270°C, e a outra parte indo para a linha de transferência aquecida e com uma corrente de ar umidificado (300 mL min<sup>-1</sup>) que ia diretamente para a antena do macho. A antena era fixada entre dois eletrodos de aço inox usando gel condutivo (Signa gel, Parker Labs., EUA). Foram testadas antenas de vinte machos de cada uma das populações brasileiras. As imagens geradas do sistema de eletroantegráfia acoplado ao cromatógrafo em fase gasosa foram visualizadas com o programa Syntech GC-EAD32 (versão 4.6).

*Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS).* Os extratos de cada população foram analisados usando cromatografia em fase gasosa acoplada a um espectrômetro de massa Shimadzu QP-2010 Plus equipado com uma coluna capilar DB-5 (30 m × 0,25 mm d.i. e 0,25 µm de espessura do filme; J&W Scientific Inc., EUA) no modo de impacto de elétrons a 70 eV. A injeção foi feita em modo *splitless* por 1 min a 250°C. O programa de temperaturas da coluna foi: temperatura inicial a 50°C (1 min); incrementando 7°C min<sup>-1</sup> até 250°C, com manutenção da temperatura máxima por 10 min. A linha de transferência operou a 270°C e o gás carregador utilizado foi o Hélio. Os componentes do feromônio sexual que repetidamente estimularam resposta na antena dos machos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção de padrões sintéticos e com a biblioteca do espectrômetro de massas (NIST27 e NIST147).





**Figura 1.3** Cromatógrafo em fase gasosa acoplado a eletroantenoógrafo (GC-EAD). No destaque antena fixada entre dois eletrodos (Fonte: arquivo do Laboratório de Semioquímicos-UFPR).

*Cromatografia em fase gasosa (GC).* As análises no GC foram conduzidas com a mesma configuração empregada nas análises de GC-EAD para realizar a quantificação dos compostos identificados. A concentração e a razão da mistura dos compostos foram determinadas com base nas áreas dos picos observados no GC e a partir de curvas analíticas construídas com padrões autênticos. Uma série de hidrocarbonetos saturados foi co-injetada com os extratos a serem analisados para calcular o Índice de Kovats (KI) dos compostos eletrofisiologicamente ativos. Estas características de retenção foram posteriormente empregadas para comparar a identidade e a atividade frente a antena de compostos autênticos empregando-se padrões sintéticos. Os valores de concentração obtidos para os dois componentes do feromônio sexual foram baseados em análises de 3 grupos de extratos contendo cada um aproximadamente 30 glândulas produtoras do feromônio sexual de fêmeas virgens, em horário de chamamento, para cada população estudada. Estes resultados foram submetidos a análise de variância simples (*one-way ANOVA*) e as médias foram

comparadas empregando o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). As análises foram realizadas com o programa BioEstat 3.0 (Ayres et al., 2003).

*Padrões Químicos:* Decano, dodecano, tetradecano, hexadecano, octadecano, nonadecano, eicosano, docosano e tetracosano foram adquiridos da Aldrich Chemical Company (Milwaukee, Wisconsin, EUA) e os padrões sintéticos (*Z,E*)-9,11-hexadecadienal e (*Z*)-11-hexadecenal da Pherobank (Holanda).

### 3 Resultados

A diversidade genética observada nas sequências do gene mitocondrial COII de *D. saccharalis* e das espécies relacionadas apresentou uma média de 0,042 (d.p.=0,047), enquanto a divergência intra-específica variou de 0,000 a 0,035 (média=0,012; d.p.=0,011), como pode ser observado na tabela 1.1

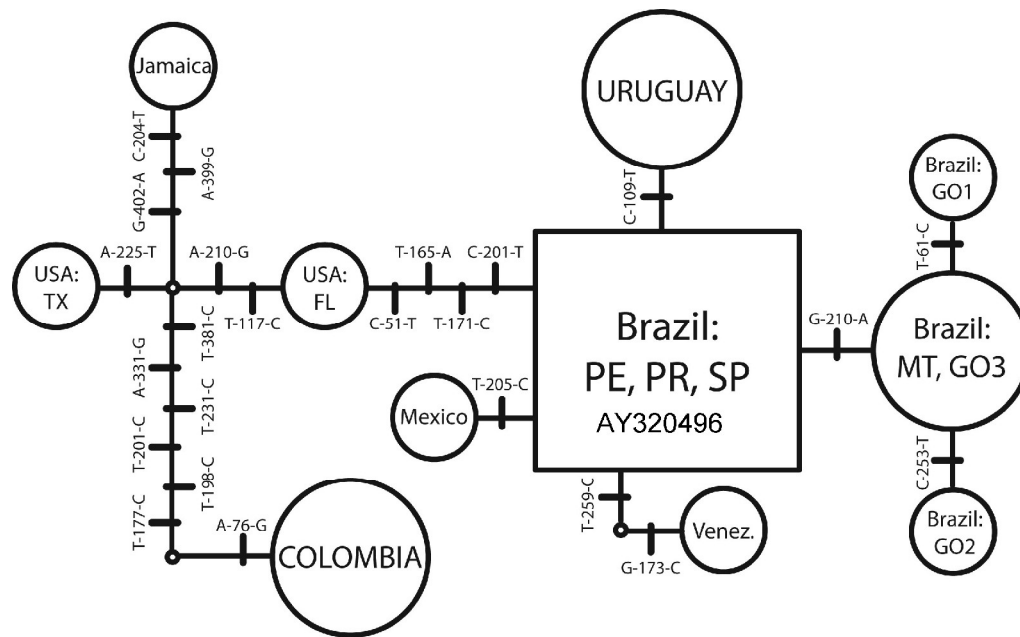
Como resultado da análise das 25 sequências de *D. saccharalis* estudadas, só 11 foram únicas (=haplótipos) como mostra a figura 1.4. Dentre as sete populações geográficas sequenciadas neste trabalho, só os espécimes de Goiás apresentaram variação genética nas suas sequências do COII (média=0,004; d.p.=0,002). Todos os espécimes dos estados de Pernambuco, Paraná e São Paulo foram representados por um haplótipo único, assim como a sequência descrita anteriormente da localidade não identificada do Brasil (Lange et al., 2004). Este haplótipo mais frequente diferiu de uma mutação dos haplótipos do México, Uruguai e um único haplótipo que inclui a sequência de Mato Grosso e uma de Goiás; e separado por duas mutações do haplótipo da Venezuela. O haplótipo que inclui todos os espécimes da Colômbia foi o mais divergente de todos os outros espécimes de *D. saccharalis* estudados (média=0,027; d.p.=0,006) e diferiu do haplótipo mais frequente por

13 mutações, e dos haplótipos da Jamaica e do Texas por 10 e 8 mutações, respectivamente (Figura 1.4).

Das 11 sequências de haplótipos de ADN, só quatro apresentaram variação na composição de aminoácidos quando comparados com o haplótipo mais comum: o haplótipo da Colômbia mudou de isoleucina para valina na posição 26 e de valina para metionina na posição 111; o da Venezuela mudou de serina para triptofano na posição 58, e leucina para fenilalanina na posição 87; uma amostra de Goiás (GO1) mudou de serina para prolina na posição 21, e GO2 de fenilalanina para leucina na posição 85.

**Tabela 1.1** Matriz de distâncias não corrigidas de espécimes de *Diatraea saccharalis* e espécies relacionadas. Os espécimes de 12 a 30 foram aqueles sequenciados neste estudo, tendo sido coletados em CO: Colômbia; GO: Goiás; MT: Mato Grosso; PE: Pernambuco; PR: Paraná; SP: São Paulo e UR: Uruguai.

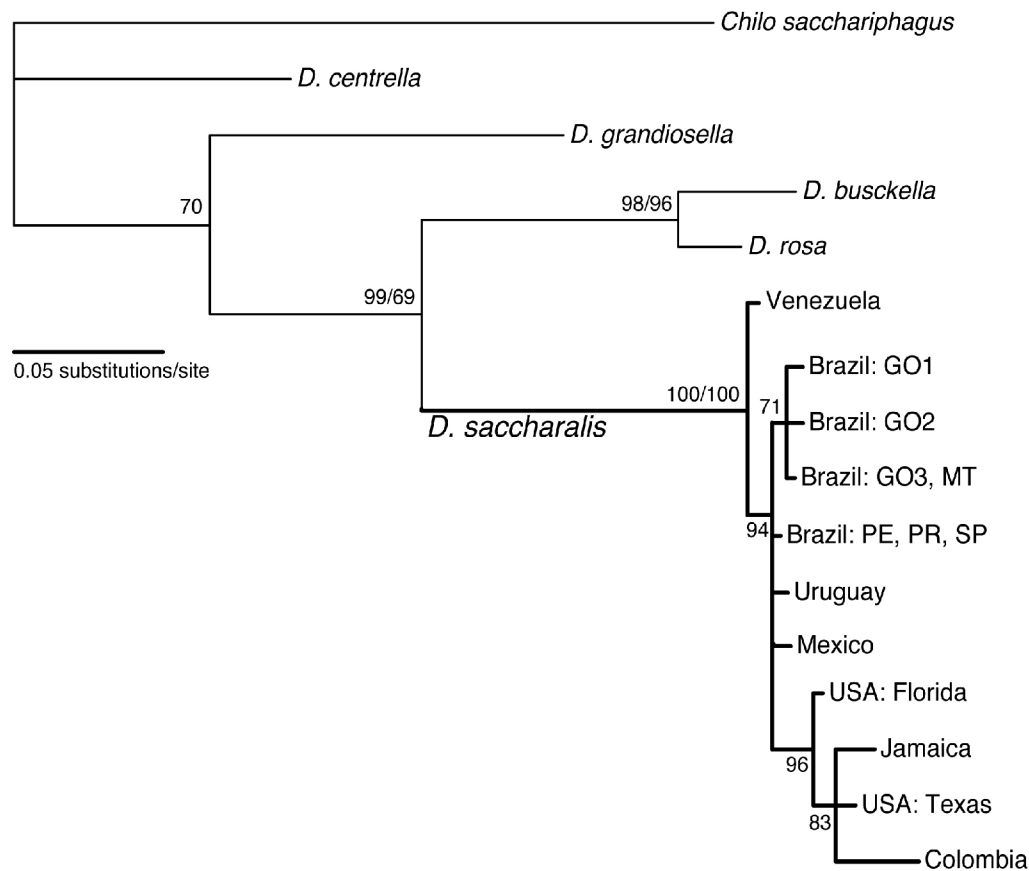
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30		
<b>1</b> <i>C. sacchariphagus</i>	-																															
<b>2</b> <i>D. grandiosella</i>	0,107	-																														
<b>3</b> <i>D. centrella</i>	0,107	0,101	-																													
<b>4</b> <i>D. busckella</i>	0,129	0,082	0,096	-																												
<b>5</b> <i>D. rosa</i>	0,129	0,093	0,101	0,036	-																											
<b>6</b> <b>Brazil</b>	0,141	0,118	0,099	0,102	0,096	-																										
<b>7</b> <b>Jamaica</b>	0,146	0,112	0,107	0,110	0,101	0,024	-																									
<b>8</b> <b>México</b>	0,138	0,115	0,096	0,099	0,093	0,003	0,027	-																								
<b>9</b> <b>Florida</b>	0,141	0,112	0,096	0,102	0,096	0,011	0,014	0,014	-																							
<b>10</b> <b>Texas</b>	0,146	0,112	0,101	0,104	0,093	0,019	0,011	0,022	0,008	-																						
<b>11</b> <b>Venezuela</b>	0,138	0,112	0,099	0,096	0,091	0,005	0,030	0,008	0,016	0,024	-																					
<b>12</b> <b>CO1</b>	0,135	0,112	0,098	0,096	0,087	0,030	0,027	0,032	0,024	0,022	0,035	-																				
<b>13</b> <b>CO2</b>	0,135	0,112	0,098	0,096	0,087	0,030	0,027	0,032	0,024	0,022	0,035	0,000	-																			
<b>14</b> <b>CO3</b>	0,135	0,112	0,098	0,096	0,087	0,030	0,027	0,032	0,024	0,022	0,035	0,000	0,000	-																		
<b>15</b> <b>GO1</b>	0,146	0,120	0,103	0,104	0,095	0,005	0,024	0,008	0,016	0,019	0,011	0,029	0,029	0,029	-																	
<b>16</b> <b>GO2</b>	0,146	0,120	0,103	0,104	0,095	0,005	0,024	0,008	0,016	0,019	0,011	0,029	0,029	0,029	0,005	-																
<b>17</b> <b>GO3</b>	0,143	0,117	0,101	0,101	0,093	0,003	0,022	0,005	0,013	0,016	0,008	0,026	0,026	0,026	0,002	0,002	-															
<b>18</b> <b>MT2</b>	0,143	0,117	0,101	0,101	0,093	0,003	0,022	0,005	0,013	0,016	0,008	0,026	0,026	0,026	0,002	0,002	0,000	-														
<b>19</b> <b>MT3</b>	0,143	0,117	0,101	0,101	0,093	0,003	0,022	0,005	0,013	0,016	0,008	0,026	0,026	0,026	0,002	0,002	0,000	0,000	-													
<b>20</b> <b>PE1</b>	0,140	0,117	0,098	0,101	0,095	0,000	0,025	0,003	0,011	0,019	0,006	0,029	0,029	0,029	0,005	0,005	0,002	0,002	0,002	-												
<b>21</b> <b>PE2</b>	0,140	0,117	0,098	0,101	0,095	0,000	0,025	0,003	0,011	0,019	0,006	0,029	0,029	0,029	0,005	0,005	0,002	0,002	0,002	0,000	-											
<b>22</b> <b>PE7</b>	0,140	0,117	0,098	0,101	0,095	0,000	0,025	0,003	0,011	0,019	0,006	0,029	0,029	0,029	0,005	0,005	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	-										
<b>23</b> <b>PR1</b>	0,140	0,117	0,098	0,101	0,095	0,000	0,025	0,003	0,011	0,019	0,006	0,029	0,029	0,029	0,005	0,005	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,000	-									
<b>24</b> <b>PR2</b>	0,140	0,117	0,098	0,101	0,095	0,000	0,025	0,003	0,011	0,019	0,006	0,029	0,029	0,029	0,005	0,005	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	-								
<b>25</b> <b>SP1</b>	0,140	0,117	0,098	0,101	0,095	0,000	0,025	0,003	0,011	0,019	0,006	0,029	0,029	0,029	0,005	0,005	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-							
<b>26</b> <b>SP2</b>	0,140	0,117	0,098	0,101	0,095	0,000	0,025	0,003	0,011	0,019	0,006	0,029	0,029	0,029	0,005	0,005	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-						
<b>27</b> <b>SP3</b>	0,140	0,117	0,098	0,101	0,095	0,000	0,025	0,003	0,011	0,019	0,006	0,029	0,029	0,029	0,005	0,005	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-					
<b>28</b> <b>UR1</b>	0,143	0,115	0,101	0,098	0,093	0,003	0,027	0,005	0,013	0,022	0,008	0,031	0,031	0,031	0,007	0,007	0,005	0,005	0,005	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	-		
<b>29</b> <b>UR2</b>	0,143	0,115	0,101	0,098	0,093	0,003	0,027	0,005	0,013	0,022	0,008	0,031	0,031	0,031	0,007	0,007	0,005	0,005	0,005	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	-	
<b>30</b> <b>UR3</b>	0,143	0,114	0,101	0,098	0,092	0,003	0,027	0,005	0,013	0,022	0,008	0,032	0,032	0,032	0,007	0,007	0,005	0,005	0,005	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	-



**Figura 1.4** Rede de haplótipos baseada em 25 sequências de citocromo oxidase II de espécimes de *D. saccharalis* procedentes da Colômbia: Valle del Cauca; Uruguai: Artigas; e Brasil: Goiás (GO); Mato Grosso (MT); Paraná (PR); Pernambuco (PE); e São Paulo (SP). Foram incluídas sequências de Lange *et al.* (2004), do Brasil (a mesma dos haplótipos mais comuns); Jamaica; México; EUA: Flórida e Texas; e Venezuela. Haplótipo mais comum representado na forma do quadrado de maior tamanho com n=9, círculos maiores com n=3, e menores com n=1.

As análises de parcimônia e o modelo Bayesiano misto das sequências do COII recuperaram um suporte alto para compartilhar a origem dos haplótipos de *D. saccharalis* e a relação de seus grupos irmãos com o clado *D. busckella* + *D. rosa* (Figura 1.5). Porém, a relação entre os haplótipos de *D. saccharalis* foi pobremente resolvida e bem suportada na análise Bayesiana, onde apresentou o haplótipo da Venezuela como grupo irmão dos outros haplótipos, uma origem em comum com os três haplótipos de Goiás e com o clado que contém o haplótipo da Colômbia associado com os haplótipos dos EUA e Jamaica (Figura 1.5). Por outro lado, estes clados bem suportados não foram recuperados nas análises de parcimônia, as quais resultaram em

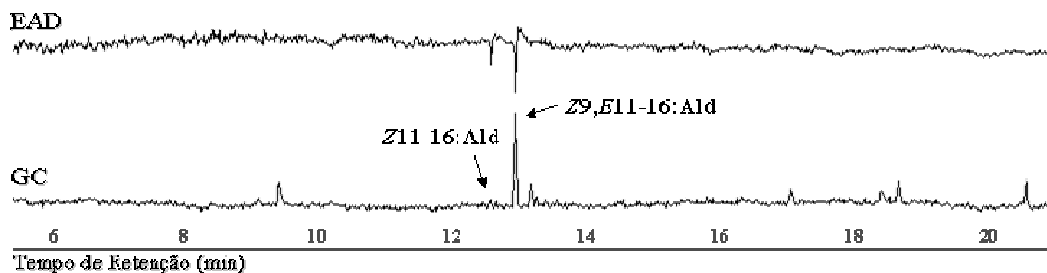
26 árvores mais parcimoniosas (L=138, CI=0,75, RI=0,75), todos os posicionamentos do haplótipo da Colômbia como grupo irmão das outras *D. saccharalis*.



**Figura 1.5** Filograma de consenso de modelo Bayesiano misto resultante da análise de haplótipos COII de *D. saccharalis*. As sequências foram particionadas de acordo com a posição do códon e os parâmetros do modelo foram estimados independentemente baseados em HKY+I, F81, e HKY+G, respectivamente. As porcentagens associadas a cada clado referem-se à probabilidade posterior Bayesiana / *bootstrap* parcimônia quando superior a 50%.

As análises dos extratos obtidos de glândulas de fêmeas virgens de *D. saccharalis* procedentes de São Paulo, Paraná, Pernambuco e Mato Grosso envolvendo a técnica EAD apresentaram dois componentes ativos (Figura 1.6), os quais foram identificados como os dois principais componentes do feromônio sexual, (Z,E)-9,11-hexadecadienal

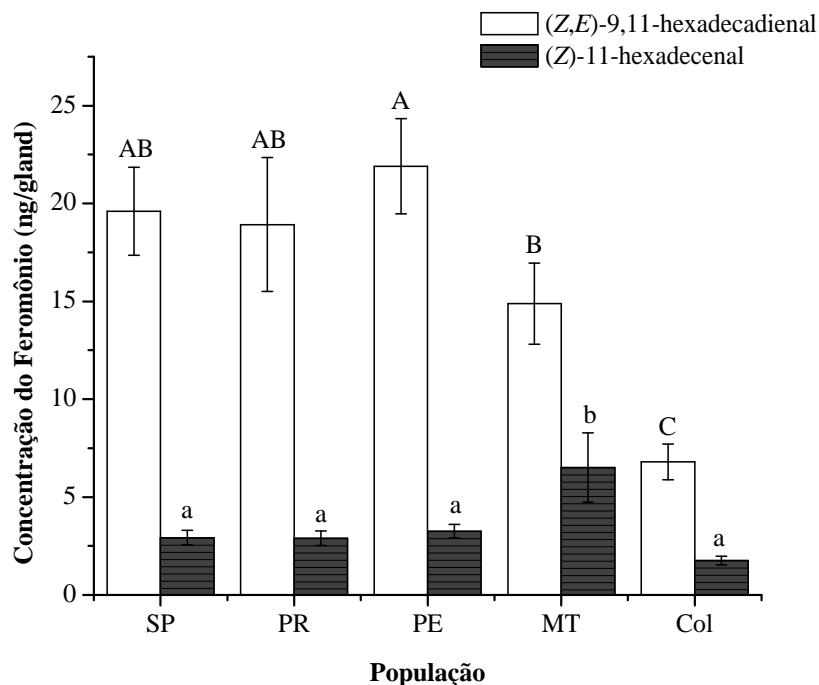
e (Z)-11-hexadecenal. Adicionalmente foram observados outros compostos presentes nos extratos produzindo respostas nas antenas dos machos.



**Figura 1.6** Eletroantenograma de uma antena de macho de *D. saccharalis* e cromatograma (GC-EAD) estimulado por um extrato de glândulas (N=32) de fêmeas virgens com 2 a 3 dias de emergência.

A quantificação dos compostos (Z,E)-9,11-hexadecadienal e (Z)-11-hexadecenal presentes nos extratos obtidos da glândula produtora de feromônio de fêmeas virgens de *D. saccharalis* pode ser observada na figura 1.7. A concentração do composto majoritário, (Z,E)-9,11-hexadecadienal, variou de 6,8 (d.p.=0,91) ng glândula<sup>-1</sup> para a população da Colômbia a 21,9 (d.p.=2,43) ng glândula<sup>-1</sup> para a população de Pernambuco. As concentrações deste composto foram similares para as populações de São Paulo, Paraná e Pernambuco. Igualmente não houve variação significativa na concentração deste composto nas populações de Mato Grosso, São Paulo e Paraná, enquanto a população da Colômbia representou um terceiro grupo, o qual foi estatisticamente diferente dos outros (Figura 1.7). A avaliação do componente minoritário, (Z)-11-hexadecenal, apresentou um padrão diferente; sua concentração variou entre 1,7 (d.p.=0,22) ng glândula<sup>-1</sup> para a população da Colômbia e 6,5 (d.p.=1,77) ng glândula<sup>-1</sup> para a população de Mato Grosso. As populações de São Paulo, Paraná, Pernambuco e Colômbia apresentaram valores estatisticamente similares

e os valores obtidos para a população de Mato Grosso foram significativamente superiores quando comparados aos outros (Figura 1.7).

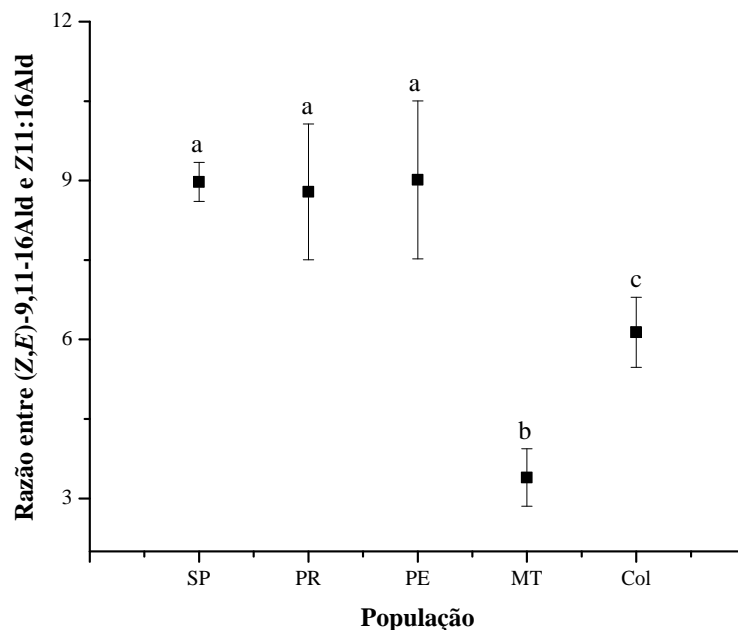


**Figura 1.7** Concentração média dos dois principais componentes, (Z,E)-9,11-hexadecadienal e (Z)-11-hexadecenal, do feromônio sexual obtidos de glândulas de fêmeas virgens de *D. saccharalis* com 2 a 3 dias de emergência de acordo com a procedência geográfica. SP: São Paulo, (N=33); PR: Paraná, (N=35); PE: Pernambuco, (n=28); MT: Mato Grosso, (N=37); Col: Colômbia, (n=28). Barras com diferentes letras indicam diferenças significativas (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

A razão entre as concentrações dos dois principais componentes do feromônio sexual de *D. saccharalis* e sua procedência pode ser observada na figura 1.8. Os valores médios das populações de São Paulo (9,0:1), Paraná (8,7:1) e Pernambuco (9,0:1) foram similares. Já a relação apresentada pela população de Mato Grosso foi de 3,4:1 e para a população da Colômbia de 6,1:1. A relação dos componentes de Mato Grosso e Colômbia diferem estatisticamente quando comparadas entre si e também variam



significativamente dos outros valores obtidos para as populações de São Paulo, Paraná e Pernambuco.



**Figura 1.8** Razão entre as concentrações dos dois principais componentes, (Z,E)-9,11-hexadecadienal e (Z)-11-hexadecenal, do feromônio sexual obtido de glândulas de fêmeas virgens de *D. saccharalis* com 2 a 3 dias de emergência de acordo com a procedência geográfica. SP: São Paulo, (N=33); PR: Paraná, (N=35); PE: Pernambuco, (n=28); MT: Mato Grosso, (N=37); Col: Colômbia, (n=28). Barras com diferentes letras indicam diferenças significativas (teste de Tukey,  $p < 0.05$ ).

#### 4 Discussão

O presente estudo objetivou avaliar as concentrações e a razão existente entre os dois principais componentes do feromônio sexual de diferentes populações geográficas de *D. saccharalis* e sua relação com a variabilidade das sequências de ADN mitocondrial. Os componentes (Z,E)-9,11-hexadecadienal e (Z)-11-hexadecenal foram identificados e quantificados em todos os extratos das populações do Brasil e

Colômbia. Os valores médios para a relação dos componentes dos feromônio obtidos para as populações de São Paulo, Paraná e Pernambuco foram similares àqueles obtidos por Batista-Pereira *et al.* (2002) e Kalinová *et al.* (2005) em populações procedentes do estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Alagoas. Porém, as análises dos extratos do feromônio sexual das populações estudadas apresentaram diferenças na razão e a concentração dos compostos estudados.

Os três diferentes grupos formados quando é considerada a razão entre os dois principais compostos estão de acordo com os agrupamentos ou haplótipos identificados no estudo da variação intra-específica das sequências do COII e não com a proximidade geográfica. Por exemplo, embora os estados de Pernambuco e Paraná estejam distantes por 3.000 km, aproximadamente, as populações estudadas ainda compartilham o mesmo haplótipo e exibem relações entre os componentes do feromônio similares, enquanto as populações que ficam distantes por 1.700 km, aproximadamente, como aquelas dos estados de Mato Grosso e São Paulo, apresentam diferentes haplótipos e uma razão dos componentes feromonais que diferem estatisticamente. Infelizmente, não foi possível estabelecer uma criação com a população procedente do estado de Goiás, sendo interessante estudar futuramente a variação feromonal nesta população, uma vez que esta foi a única população com múltiplos haplótipos.

Se considerarmos as três diferentes relações encontradas nos haplótipos da Colômbia, Mato Grosso e o haplótipo mais freqüente que inclui as populações de São Paulo, Paraná e Pernambuco, pode-se sugerir que *D. saccharalis* exibe uma variação feromonal monomórfica. Esta variação ocorre quando diferentes populações de uma mesma espécie usam os mesmos compostos, mas em razões diferentes (Löfstedt, 1990). Por exemplo, o feromônio de *Ostrinia nubilalis* (Hübner, 1796) (Lepidoptera:Pyralidae)

consiste de uma mistura dos monoenos Z11-14:Ac e E11-14:AC; os machos da América do Norte respondem preferencialmente à razão de 97:3 e os machos da população européia respondem à razão de 3:97 (Klun and Cooperators, 1975). Esta variação foi relatada em outras espécies de Lepidoptera, como *Agrotis segetum* (Denis & Schiffermüller, 1775) (Arn et al., 1983; Hansson et al., 1990) *Hemileuca eglanterina* (Boisduval, 1852) (McElfresh and Millar, 2001), *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1767) (Gemeno et al., 2000) e *Choristoneura rosaceana* (Harris, 1841) (El-Sayed et al., 2003), entre outras.

Quando as quantidades obtidas dos componentes do feromônio foram comparadas com os haplótipos identificados nestas análises, não foi observada uma clara tendência. Por exemplo, a população da Colômbia mostrou a maior divergência genética (3%) a partir do haplótipo mais comum e uma diferença significativa na concentração do componente majoritário do feromônio sexual. Por outro lado, esta população exibiu uma concentração similar para o componente minoritário. A concentração do componente minoritário foi estatisticamente diferente na população de Mato Grosso a qual foi geneticamente muito similar (0,3%) com o haplótipo mais frequente. A concentração do feromônio sexual pode ter sido influenciada por fatores biológicos como o tamanho do adulto e/ou fatores associados ao processo de criação dos mesmos (El-Sayed et al., 2003).

Os mecanismos pelos quais ocorre divergência no sistema de comunicação química, como também sua importância na especiação, são uma área controversa na biologia evolutiva (Lambert et al., 1987; Linn and Roelofs, 1995; Löfstedt, 1991; Löfstedt, 1993; White et al., 1995). Todavia, a mistura de feromônio produzida pelas fêmeas de várias populações e os padrões de detecção e resposta dos machos devem ser

congruentes porque sinais reprodutivos ou comportamentais errôneos dos machos ou das fêmeas poderiam criar uma restrição no sucesso reprodutivo (McElfresh et al., 2001; McElfresh and Millar, 2001). Visto que a mistura do feromônio sexual é importante para obter a atração dos machos, nossos dados evidenciam uma variação na composição feromonal e uma co-variação nos haplótipos das populações de *D. saccharalis* estudadas.

A realização de futuros experimentos em campo utilizando diferentes misturas dos principais componentes do feromônio sexual de *D. saccharalis* poderá permitir uma avaliação da significância biológica da variação populacional e das razões observadas neste estudo para os compostos (*Z,E*)-9,11-hexadecadienal e (*Z*)-11-hexadecenal, considerando a resposta dos machos das diferentes populações geográficas.

## Capítulo 2

### Re-identificação do feromônio sexual de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)

#### Resumo

Análises em GC-EAD dos extratos das glândulas feromonais de *D. saccharalis*, obtidos de fêmeas virgens 2 ou 3 dias após emergência, mostraram a presença de quatro componentes EAD-ativos. Os quatro componentes foram identificados através de GC-MS e co-injeção com padrões sintéticos, como o (Z,E)-9,11-hexadecadienal (Z9,E11-16:Ald), hexadecanal (16:Ald), (Z)-11-hexadecenal (Z11-16:Ald) e (Z)-9-hexadecenal (Z9-16:Ald), encontrados numa razão de 17: 1,4: 1: 1, respectivamente. Os compostos Z9,E11-16:Ald e Z11-16:Ald já foram descritos previamente como ativos para *D. saccharalis*; entretanto, nunca houve relatos sobre a eficiência dos mesmos como atraentes para a espécie. Os dois novos componentes minoritários do feromônio sexual de *D. saccharalis* identificados nesse trabalho, 16:Ald e Z9-16:Ald, deverão ser de grande importância para um aumento na atratividade, haja visto que a completa identificação da mistura feromonal de uma espécie é de fundamental importância para habilitar técnicas que envolvam o sistema de comunicação química de um inseto.

**Abstract** GC-EAD analyses of pheromone gland extracts of *D. saccharalis* obtained from virgin females 2 or 3 days old showed the presence of four EAD-active components. These four components were identified via GC-MS as well as co-injection of synthetic standards, as Z9,E11-16:Ald, 16:Ald, Z11-16:Ald and Z9-16:Ald, with a ratio of 17: 1.4: 1: 1, respectively. The compounds Z9,E11-16:Ald and Z11-16:Ald have already been described as active towards *D. saccharalis*. However, they have never been reported as being attractive to this species. The two new minor components identified in this work, 16:Ald and Z9-16:Ald, will be of great importance in order to enhance the attractiveness of males, taking into account that the complete identification of the pheromonal blend of a species is a key aspect to improve techniques which involve the chemical communication system of a certain insect.

## 1 Introdução

Os feromônios sexuais comumente identificados nas espécies da ordem Lepidoptera apresentam cadeias alifáticas com 12 a 18 átomos de carbono mono, di ou tri insaturados e contêm grupos funcionais como ésteres na forma de acetatos, alcoóis ou aldeídos mono, di ou tri insaturados (Tamaki, 1977, 1985). Os principais componentes nas espécies de *Diatraea* usualmente são aldeídos monoenos ou dienos com cadeia carbônica contendo 16 átomos. Por exemplo, os componentes de *Diatraea considerata* Heinrich, 1931 são os aldeídos (Z)11-hexadecenal, (Z)7-hexadecenal e (Z)13-octadecenal (Gries et al., 1998). A mistura feromonal de *D. grandiosella* Dyar, 1911 está composta pelos aldeídos (Z)11-hexadecenal, (Z)9-hexadecenal e (Z)13-octadecenal (Knutson et al., 1987).

O componente majoritário de *D. saccharalis* presente nos extratos obtidos da glândula produtora de feromônio tem sido identificado constantemente como (Z,E)-9,11-hexadecadienal (Carney and Lui, 1982; Svatos et al., 1999; Svatoš et al., 2001). Este aldeído apresenta baixa atratividade em campo quando comparado com a atratividade de fêmeas virgens colocadas em gaiolas (Almeida et al., 1983; Hammond and Hensley, 1971; Patrick and Hensley, 1970). Análises posteriores relataram a identificação de um componente adicional, (Z11)-hexadecenal, presente no extrato que estimulava atividade na antena e incrementava a atratividade dos machos quando avaliado em conjunto com o componente principal, (Z,E)-9,11-hexadecadienal, em experimentos conduzidos em túnel de vento (Kalinová et al., 2005). Foi observada uma razão entre estes componentes variando de 3:1 a 10:1 (Kalinová et al., 2005; Palacio Cortés et al., 2010).

Nos dias atuais a utilização do feromônio sexual de *D. saccharalis* (Z9,E11-16:Ald e Z11-16:Ald) apresenta resultados totalmente insatisfatórios em experimentos conduzidos em campo, comprovando a importância da função exercida por outros componentes minoritários envolvidos no processo de comunicação química desta espécie. De fato, conforme descrito no primeiro capítulo do presente trabalho, foram observadas respostas adicionais de compostos minoritários EAD-ativos presentes nos extratos do feromônio sexual, além daqueles componentes descritos anteriormente na literatura. Assim, o objetivo desta etapa do trabalho foi re-identificar o feromônio sexual obtido das glândulas de fêmeas virgens de *D. saccharalis*, para que novos testes de campo possam ser realizados posteriormente.

## **2 Material e métodos**

### **2.1 Insetos**

Os insetos foram obtidos de pupas provenientes da criação do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, as quais foram alimentadas com dieta artificial baseada em soja, açúcar e germen de trigo (Parra and Mishfeldt, 1992). As pupas foram sexadas e mantidas separadamente para evitar acasalamento. Os adultos recém emergidos foram individualizados em recipientes plásticos cobertos com organza contendo uma solução de sacarose a 10%.

### **2.2 Extração do feromônio**

Os extratos do feromônio sexual foram obtidos da glândula produtora de feromônio de fêmeas virgens de 2 a 4 dias depois da emergência, entre a 5<sup>a</sup> e 7<sup>a</sup> hora de escotofase. A glândula localizada no final do abdômen foi exposta mediante a pressão

da parte final do abdome, excisada com pinças e transferidas para frascos cônicos. Foram adicionados 10 µL de hexano destilado para cada glândula durante 20 min, à temperatura ambiente (Berger, 1972). Os extratos foram transferidos para tubos de vidro, concentrados para 1 inseto equivalente (IE: uma glândula por µL de hexano) e armazenados a -20°C até a realização das análises.

### **2.3 Análise dos extratos contendo o feromônio sexual**

*Cromatografia em fase gasosa acoplada a eletroantenograma a (GC-EAD).* Os extratos do feromônio sexual foram analisados em cromatógrafo em fase gasosa Shimadzu GC-2010 acoplado a um sistema de eletroantenografia Syntech (Hilversum, The Netherlands). O GC estava equipado com uma coluna DB-5 (30 m x 0,25 mm d.i. e 0,25 µm de espessura de filme; J&W Scientific Inc., EUA). Injetou-se 1 µL do extrato usando o modo *splitless* com a temperatura do injetor a 250°C. A temperatura do forno foi mantida a 100°C por 1 min, logo incrementada a 270°C a uma velocidade de 10°C min<sup>-1</sup>, sendo mantida nesta temperatura por 7 min. O gás carregador usado foi o Hélio e a pressão na coluna de 170 kPa. O efluente da coluna foi dividido (1:1) com uma parte indo para o detector de ionização em chama (FID), com temperatura de 270°C, e a outra parte indo para a linha de transferência aquecida e umidificada com uma corrente de ar (300 mL min<sup>-1</sup>) que vai diretamente para a antena. A antena do macho foi fixada entre dois eletrodos de aço inox usando gel eletro-condutivo (Signa gel, Parker Labs., NJ). As imagens obtidas no sistema de eletroantenografia acoplado ao cromatógrafo em fase gasosa foram visualizadas com o programa Syntech GC-EAD32 (versão 4.6).

*Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS).* Os extratos de feromônio foram analisados empregando cromatografia em fase gasosa acoplada a um espectrômetro de massas Shimadzu QP-2010 Plus, equipado com uma



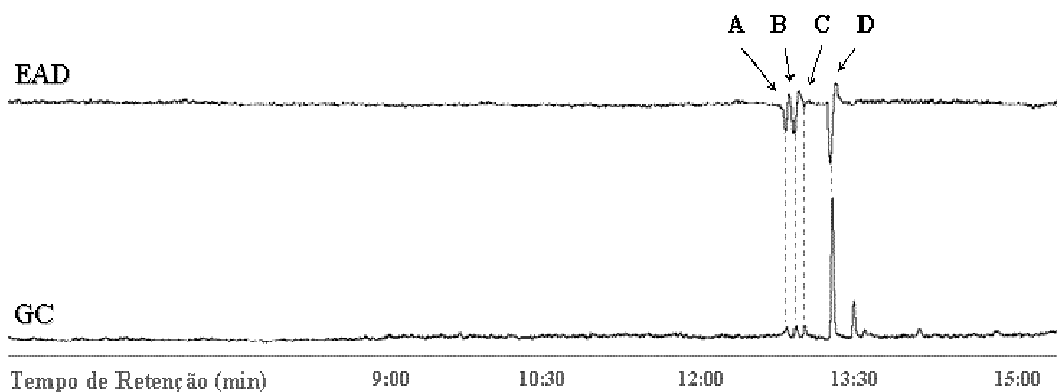
coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm d.i. e 0,25 µm de espessura do filme; J&W Scientific Inc., EUA) no modo de impacto de elétrons a 70 eV. A injeção foi feita em modo *splitless* por 1 min a 250°C. O programa de temperaturas da coluna foi: temperatura inicial a 100°C (1 min); incrementando 7°C min<sup>-1</sup> até 250°C e assim mantida por 10 min. A linha de transferência operou a 270°C. O gás carregador usado foi o Hélio. Os componentes do feromônio sexual que repetidamente estimularam resposta na antena dos machos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção com padrões sintéticos e com a biblioteca do espectrômetro de massas (NIST27 e NIST147).

*Cromatografia em fase gasosa (GC).* Os extratos do feromônio e os padrões sintéticos foram analisados no cromatógrafo em fase gasosa Shimadzu GC-2010 com a mesma configuração empregada nas análises de GC-EAD. Uma série de hidrocarbonetos saturados foi co-injetada com os extratos analisados para se calcular o Índice de Kovats (KI) dos compostos eletrofisiologicamente ativos. Estas características de retenção foram posteriormente empregadas para comparar a identidade e a atividade frente a antena de compostos autênticos empregando-se padrões sintéticos. A relação dos quatro componentes foi calculada com base na análise de três grupos de extratos contendo 130, 122 e 90 glândulas, respectivamente.

*Padrões químicos.* Decano, dodecano, tetradecano, hexadecano, octadecano, nonadecano, eicosano, docosano, tetracosano foram adquiridos da Aldrich Chemical Company (Milwaukee, Wisconsin, USA), os padrões sintéticos (Z,E)-9,11-hexadecadienal, (Z)-11-hexadecenal e (Z)-9-hexadecenal foram da Pherobank (Wageningen, NL). O hexadecanal foi obtido através da hidrogenação partindo do (Z)-11-hexadecenal (Zarbin et al., 2004).

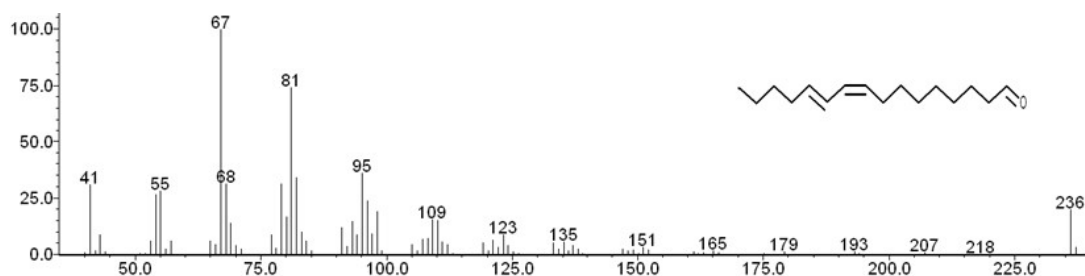
### 3 Resultados

Por meio de análises via GC-EAD dos extratos obtidos de fêmeas virgens de *D. saccharalis* e usando a antena de machos como receptores, foram identificados quatro compostos com atividade fisiológica. A resposta da antena ao estímulo dos compostos presentes no extrato é apresentada na figura 2.1. A identificação das estruturas químicas foi realizada tendo como base o padrão de fragmentação dos compostos biologicamente ativos, o tempo de retenção, o índice de Kovats, assim como as comparações com padrões sintéticos, como descrito a seguir.

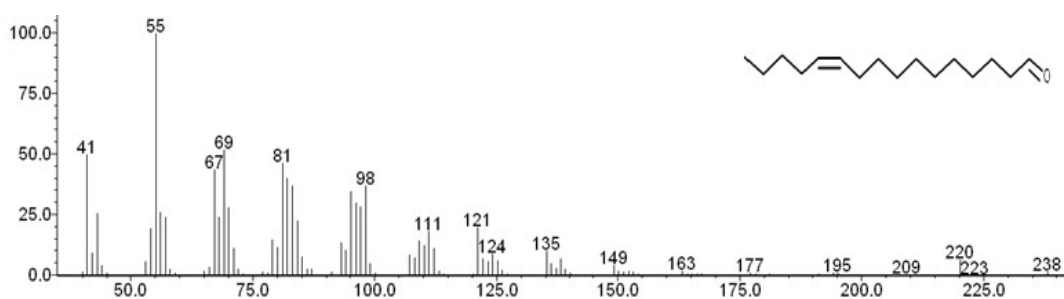


**Figura 2.1** Cromatograma em fase gasosa e eletroantenograma (GC-EAD) usando antena de macho de *D. saccharalis* estimulada com extrato do feromônio sexual obtido de 103 fêmeas virgens com 2 a 3 dias de idade e concentrado para 1 IE.

O espectro de massas correspondente ao composto **D** apresentou pico referente ao íon molecular em  $m/z$  236 (13), e padrão de fragmentação [ $m/z$  (%): 123 (8,1), 109 (13,4), 95 (31,7), (72,3), 81,1 (72,3), 67 (100), 55 (29,4)] (Figura 2.2). Estas características são semelhantes àquelas descritas por Svatoš e colaboradores (2001) quando foi realizada a caracterização química do componente majoritário do feromônio sexual de *D. saccharalis*, o (Z9,E11-16:Ald), hexadecanal. Este composto apresentou características de retenção  $t_R$ :13:26 e KI (DB-5): 1868.

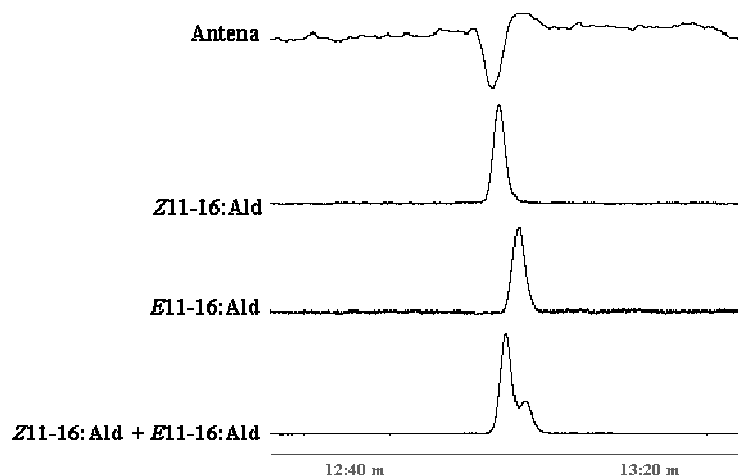


**Figura 2.2** Espectro de massas do composto (Z,E)-9,11-hexadecadienal presente no extrato do feromônio sexual de *D. saccharalis*.



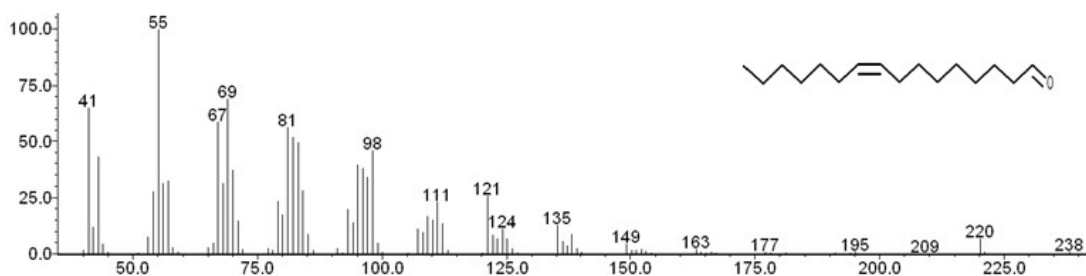
**Figura 2.3** Espectro de massas do composto (Z)-11-hexadecenal presente no extrato do feromônio sexual de *D. saccharalis*.

O composto **B**, identificado como (Z)-11-hexadecenal, apresentou  $t_R$ : 13,03; KI (DB-5): 1846 e espectro de massa com características  $m/z$  (%): 238 ( $M^+$ , 3), 220 (8), 135 (7,5), 121 (15), 98 (29), 81 (42), 69 (50), 55 (100), 41 (59), conforme mostra a Figura 2.3. Devido à possibilidade de isomeria geométrica deste componente, foi realizada uma co-injeção de seu isômero (E)-11-hexadecenal, confirmada com a resposta da antena (Figura 2.4).

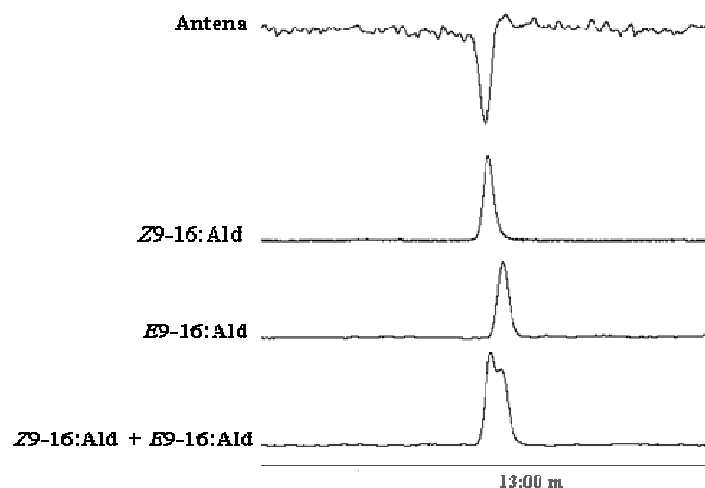


**Figura 2.4** Análise comparativa dos padrões (*Z*)-11-hexadecenal e (*E*)-11-hexadecenal, analisados em GC-EAD com uma coluna DB-5 (30 x 0,25 mm; 0,25  $\mu$ m) para identificar a resposta da antena de macho de *D. saccharalis*.

O composto **A** apresentou  $t_R$ : 12,56; KI (DB-5): 1800 e um espectro de massas com características  $m/z$  (%): 238 ( $M^+$ , 3), 220 (8), 135 (7,5), 121 (15), 98 (29), 81 (42), 69 (50), 55 (100), 41 (59), de acordo com o que é apresentado na figura 2.5. Em função do padrão de fragmentação e comparação com os espectros fornecidos pela biblioteca do CG-MS, foi sugerido que o composto seria o hexadecenal, com uma dupla ligação na posição nove. Para confirmar o isômero que apresenta atividade na antena, foi necessário realizar uma análise comparativa no GC-EAD com o (*Z*)-9-hexadecenal e o (*E*)-9-hexadecenal (Figura 2.6). Os resultados mostraram que o isômero *Z* é o responsável pela atividade biológica na espécie e o tempo de retenção deste isômero é igual ao tempo de retenção do extrato.

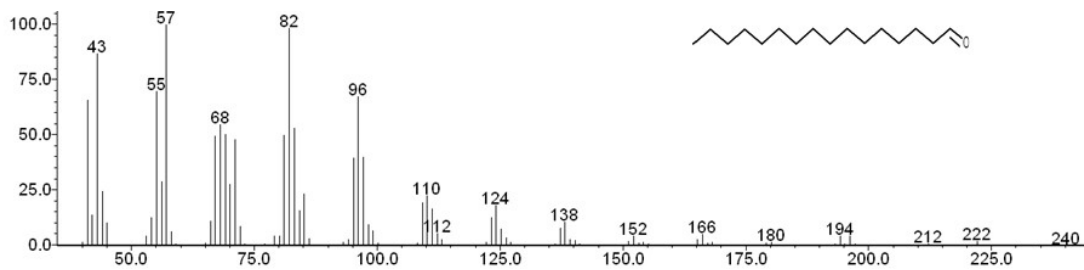


**Figura 2.5** Espectro de massas do composto (*Z*)-9-hexadecenal presente no extrato do feromônio sexual de *D. saccharalis*.



**Figura 2.6** Análise comparativa dos padrões (*Z*)-9-hexadecenal e (*E*)-9-hexadecenal, analisados em GC-EAD com uma coluna DB-5 (30 x 0,25 mm; 0,25  $\mu$ m) para identificar a resposta da antena de macho de *D. saccharalis*.

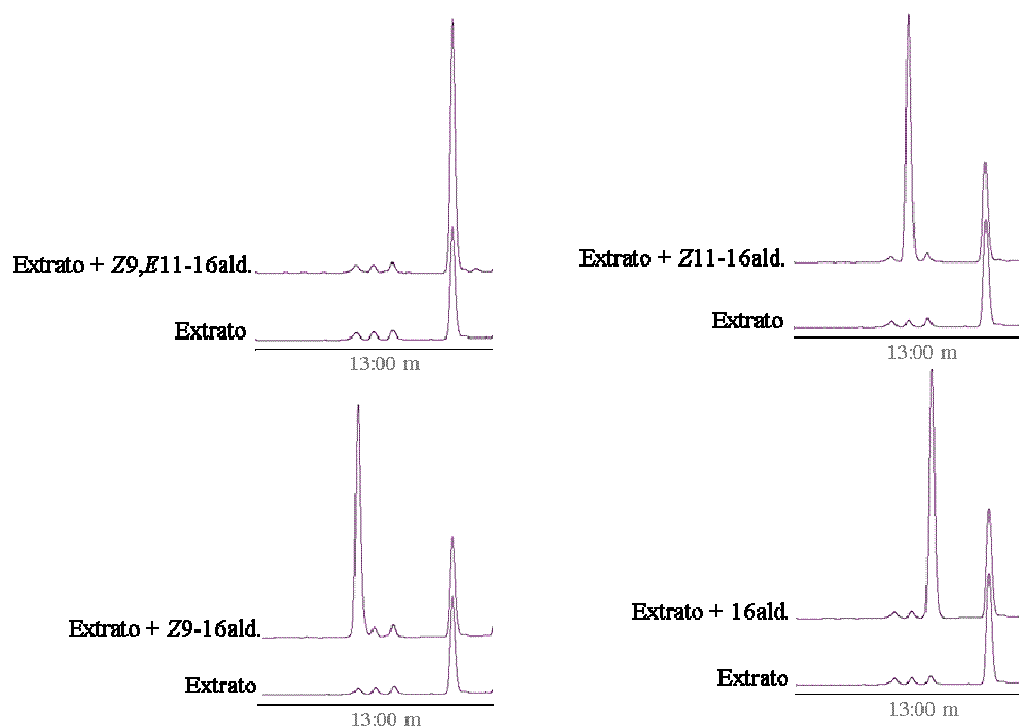
O composto **C** apresentou  $t_R$ : 13,07; KI (DB-5): 1850 e espectro de massa com características:  $m/z$  (%): 240 ( $M^+$ , 18), 194 (4), 138 (10), 124 (18), 110 (22), 96 (68), 82 (98), 68 (54), 57(100), 43 (87) (Figura 2.7), que o caracteriza como um aldeído. Tendo em vista estes padrões de fragmentação e as características dos outros componentes do feromônio previamente identificados, presumiu-se que este composto era o hexadecanal.



**Figura 2.7** Espectro de massas do composto hexadecanal presente no extrato do feromônio sexual de *D. saccharalis*.

A razão entre os quatro componentes ativos identificados nos extratos do feromônio sexual de *D. saccharalis*, (*Z,E*)-9,11-hexadecadienal, hexadecanal, (*Z*)-11-hexadecenal e (*Z*)-9-hexadecenal foi de 17:1,4:1:1, respectivamente.

Finalmente, a autenticidade dos quatro componentes presentes no feromônio sexual de *D. saccharalis* foi comprovada mediante a co-injeção do extrato de feromônio sexual com os respectivos padrões sintéticos, segundo o que é mostrado na figura 2.8



**Figura 2.8** Cromatogramas referentes à co-injeção do extrato concentrado para 1 IE de 90 glândulas de fêmeas virgens de *D. saccharalis* com os padrões (*Z,E*)-9,11-hexadecadienal, hexadecanal, (*Z*)-11-hexadecenal e (*Z*)-9-hexadecenal, analisados em coluna DB-5 (30 x 0,25 mm; 0,25  $\mu$ m).

#### 4 Discussão

As análises químicas dos extratos de feromônio sexual de fêmeas de *Diatraea saccharalis* mostraram a presença de quatro compostos com atividade biológica, (*Z,E*)-9,11-hexadecadienal, (*Z*)-9-hexadecenal, (*Z*)-11-hexadecenal e hexadecanal.

(*Z*)-11-hexadecenal é um dos componentes mais comumente identificados nas glândulas produtoras de feromônio na ordem Lepidoptera, sendo produzido singularmente ou em combinação com outros componentes (Cork and Lobos, 2003; El-Sayed, 2006; Gibb et al., 2007; Kawazu et al., 2007; Shimizu and Kuwahara, 2009;

Wakamura et al., 2001). Em *D. saccharalis*, este composto está presente em menor proporção, assim como em *D. grandiosella* (Hedin et al., 1986), enquanto que em *D. considerata* é um componente majoritário (Gries et al., 1998).

De maneira semelhante, o (Z)-9-hexadecenal faz parte da mistura feromonal de espécies próximas a *Diatraea saccharalis*, como *Diatraea grandiosella* Dyar, 1911, onde é o componente majoritário da mistura feromonal (Hedin et al., 1986). Este composto também foi identificado em espécies tais como *Parapediasia teterrella* (Zincken, 1821) (Lepidoptera: Crambidae) (Clark and Haynes, 1990) e *Scirpophaga incertulas* Walker, 1863 (Lepidoptera: Pyralidae) (Cork et al., 1985; Cork et al., 1996), entre outras. Da mesma forma, o componente hexadecanal também foi descrito em espécies da família Crambidae, como *Conogethes punctiferalis* (Guenée, 1854) (Liu et al., 1994), *Diaphania hyalinata* (Linnaeus, 1767) (Raina et al., 1986) e *Agathodes ostentalis* (Geyer, 1837) (Wakamura and Arakaki, 2004), entre outras.

A identificação dos compostos (Z9)-hexadecenal e hexadecanal como componentes ativos do extrato do feromônio sexual de *D. saccharalis* é de importância para futuros ajustes em técnicas que envolvam o sistema de comunicação química desta espécie. Paralelo a isto, se faz necessário complementar estes resultados com bioensaios em laboratório e/ou campo para estabelecer a melhor proporção entre os quatro compostos visando incrementar a atratividade de machos co-específicos.



## Capítulo 3

### Expressão das proteínas ligantes de feromônio de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)

#### Resumo

No presente trabalho foram avaliadas as expressões das proteínas ligantes de feromônio, PBP, presentes em machos e fêmeas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) expostos a diferentes condições de luz; fotofase contínua e fotoregime de 12h de fotofase e 12 h de escotofase. Também o padrão de expressão das PBP foi avaliado nos diferentes sexos. As maiores quantidades de proteína total foram obtidas nas pernas das fêmeas,  $7,7 \pm 1,8 \mu\text{g}$ , e machos,  $6,8 \pm 0,9 \mu\text{g}$ , coletados na escotofase. As quantidades de proteína total das pernas de fêmeas e machos que permaneceram sob luz contínua foram  $4,4 \pm 1,4 \mu\text{g}$  e  $3,9 \pm 1,0 \mu\text{g}$ , respectivamente. Estas quantidades foram estatisticamente semelhantes àquelas obtidas para as antenas de machos e fêmeas nas condições de fotoperíodo. Os extratos de proteína total dos tecidos foram analisados empregando eletroforese em SDS-PAGE, evidenciando uma separação uniforme das subunidades de proteína, com uma banda de cerca de 15 kDa, correspondente ao tamanho das PBP. A expressão da proteína imunorreativa BmoriPBP foi negativa nas pernas de ambos os sexos. Ao contrário, a expressão foi positiva nas antenas de machos e fêmeas. Os machos apresentaram duas bandas expressas com massas molares de aproximadamente 15 kDa e 18 kDa, cada uma delas. Para as fêmeas, no entanto, uma única banda foi observada, com massa molar aparente de 15 kDa. O presente estudo confirmou a independência da expressão das PBP, para a *D. saccharalis*, em relação às condições de fotoperíodo. Nos machos, a maior expressão das PBP nas antenas pode ter relação com o comportamento de acasalamento apresentado durante a escotofase, maximizando o monitoramento do feromônio liberado pelas fêmeas.

**Abstract** - The expression of pheromone binding proteins, PBPs, was investigated in this work. PBPs were evaluated from males and females of *D. saccharalis* that were exposed to different light conditions; continuous photophase and a photoregime of 12h photophase and 12 h scotophase. The pattern of expression of the PBPs in males and females was also studied. The greater amount of proteins was obtained from the legs of the females,  $7.7 \pm 1.8 \mu\text{g}$ , as well as from the males,  $6.8 \pm 1.8 \mu\text{g}$ , both of them collected during the scotophase. The amount of total protein from legs of females and males that were kept under continuous light were  $4.4 \pm 1.4 \mu\text{g}$  and  $3.9 \pm 1.0 \mu\text{g}$ , respectively. These amounts were statistically equivalent to those ones obtained from males and females antennae under the photoperiod. Total protein extracts from the tissues were analyzed by electrophoresis in SDS-PAGE showing a uniform separation of the subunits of the protein, presenting one band of 15 kDa corresponding to the size of the PBPs. The BmoriPBP immunoreactive protein expression was negative in the legs of both sexes. By the other hand, the expression was positive as far as the males and females antennae were concerned. Males presented two bands with apparent molar masses of about 15 kDa and 18kDa, each of them. However, for the females only one band was observed,

with an apparent molar mass of 15 kDa. The independency of PBPs expression with respect to the photoperiod conditions was confirmed in this study.

## **1 Introdução**

A comunicação química participa em diversos processos da vida dos animais, como aqueles envolvidos na localização do alimento, seleção de parceiros e reconhecimento intra e interespecífico, regulação de comportamentos, entre outros. Para que o reconhecimento dos compostos químicos presentes no ambiente seja traduzido na linguagem do sistema nervoso e produza um impulso elétrico que será transmitido aos centros cerebrais, o inseto deve ter a capacidade de perceber estes compostos, converter a informação codificada na estrutura e determinar a concentração da molécula de odor para produzir uma resposta comportamental na intensidade adequada (Breer and Krieger, 2003; Vogt, 2003).

Na ordem Lepidoptera, o processo de reconhecimento dos feromônios sexuais, os quais geralmente são compostos de cadeias não ramificadas contendo entre 10 e 18 átomos de carbono, com alcoóis, ésteres ou aldeídos como grupos funcionais (Roelofs and Rooney, 2003), é iniciado nas antenas quando a molécula atravessa os múltiplos poros cuticulares das sensilas olfativas e ingressa na sua cavidade aquosa (Angeli et al., 1999). Após seu ingresso, a molécula de feromônio é conduzida até os receptores de odores localizados nos dendritos (Steinbrecht, 1997; Steinbrecht, 1999), os quais têm a função de selecionar o odor para processar o tipo de receptor apropriado e transferir a mensagem química da face extracelular à face intracelular da membrana. Estes eventos induzem uma cascata de processos que resultam na produção de um potencial de ação; os sinais elétricos são conduzidos pelos neurônios aos lobos antenais no deutocérebro, onde são integrados e contribuem para produzir uma resposta comportamental apropriada (Hansson et al., 2003; Kaissling, 1987; Stengl et al., 1999; Vogt, 2003).

Devido à sua natureza hidrofóbica, o feromônio necessita de uma molécula transportadora que o ajude a atravessar a linfa sensilar para chegar à membrana do dendrito e se ligar ao receptor de membrana. Esta molécula é uma proteína hidrossolúvel denominada Proteína Ligante de Feromônio, **PBP**, do inglês *Pheromone binding protein* (Leal, 2005; Vogt, 2003; Vogt et al., 1991; Vogt and Riddiford, 1981).

As **PBP** pertencem a uma grande família de proteínas ligantes de odores (**OBP**, *odorant binding protein*), e fazem parte das três principais proteínas específicas que modulam diferentes processos extracelulares, tais como o ingresso e a saída do feromônio do receptor, a ativação do receptor neuronal e o tempo de ativação da molécula, entre outros. Estes processos são chamados de eventos perireceptores (Getchell et al., 1984). Os outros dois grupos de proteínas são as enzimas que degradam odores, **ODE**, e os receptores de odores, **OR**, dos neurônios sensoriais. Estas proteínas podem alcançar níveis de milimol na linfa da sensila (Angeli et al., 1999; Vogt, 2005; Vogt and Riddiford, 1981; Vogt et al., 1985) e sua secreção abundante influencia o sucesso do processo olfatório (Krieger et al., 1997).

As proteínas receptoras de odores estão localizadas nos dendritos dos neurônios receptores de odor, **ORN**, e têm como função a detecção da mistura feromonal. Os neurônios receptores de odor podem ser abundantes, sendo superiores a 40.000 em algumas espécies; podem estar juntos numa mesma sensila, como em Tortricidae e Crambidae, ou em sensilas diferentes, como em Noctuidae (Hansson and Christensen, 1999).

As enzimas que degradam odores inativam o feromônio dos enlaces das membranas extra e intracelulares e as enzimas citosólicas rompem as ligações depois da interação com os receptores (Prestwich, 1987; Vogt, 2003). A finalização do sinal é

muito importante no processo olfativo para manter a sensibilidade aos odores que continuam entrando, pois a permanência do feromônio na área de perirecepção pode interferir na ordem temporal dos sinais químicos. Alguns experimentos mostraram que o tempo de vida médio de atividade *in-vitro* de uma molécula de feromônio varia entre 0,6 e 15 ms (Vogt, 1987; Vogt et al., 1985; Vogt and Walker, 1987).

Geralmente, as PBP são proteínas de tamanho pequeno, com massas molares que variam entre 14 e 16 kDa e possuem entre 120 e 150 aminoácidos. A maioria contém 6 cisteínas em um padrão assimétrico (Breer et al., 1990) que formam pontes dissulfetos, as quais ajudam na estabilidade da estrutura tridimensional da proteína (Pelosi et al., 2005). Estas proteínas são expressas nas células suporte da sensila e são secretadas à cavidade aquosa do mesmo (Vogt et al., 2002), sendo sua concentração dentro da linfa da sensila alta, aproximadamente de  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  (Pelosi et al., 2006; Vogt and Riddiford, 1981). As PBP protegem, transportam e solubilizam o feromônio na linfa da sensila (Kaissling et al., 1985; Vogt and Riddiford, 1981), participam na desorção do feromônio das superfícies hidrofóbicas (Kowcun et al., 2001) e, talvez, atuam como filtros pela ligação específica aos compostos feromonais (Du and Prestwich, 1995; Feixas et al., 1995; Maïbèche-Coisne et al., 1997; Picimbon and Gadenne, 2002).

A expressão das PBP pode ocorrer a partir do terceiro dia antes da emergência do adulto, como em *Lymantria dispar* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Lymantriidae) (Vogt et al., 1989), ou 35 a 40 horas antes da emergência do adulto, como em *Manduca sexta* (Linnaeus, 1763) (Lepidoptera: Sphingidae) (Gyorgyi et al., 1988; Vogt et al., 1993). Inicialmente, considerava-se que as PBPS ocorriam apenas nas antenas dos machos devido a observações feitas em espécies de Saturniidae e Sphingidae

(Steinbrecht et al., 1995; Raming et al., 1990; Vogt and Riddiford, 1981), *Manduca sexta* (Gyorgyi et al., 1988) e *Bombyx mori* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Bombycidae) (Maida et al., 2003; Steinbrecht et al., 1995). Mais tarde foram determinados níveis de expressão em ambos os sexos, quando identificadas PBP em espécies Noctuidae, como *Mamestra brassicae* (Linnaeus, 1758) (Maibèche-Coisné et al., 1998; Meillour et al., 1996), *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Zhang et al., 2001), *Heliothis virescens* (Fabricius, 1777) (Callahan et al., 2000; Zhang et al., 2001), *Autographa gamma* (Linnaeus, 1758), *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) (Zhang et al., 2001), *S. frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Callahan et al., 2000), *S. litura* (Fabricius, 1775) (Xiu et al., 2008) e *Sesamia nonagrioides* (Lefèbvre, 1827) (Konstantopoulou et al., 2006). A família Tortricidae também apresentou diferença nos níveis de expressão em *Epiphyas postvittana* (Walker, 1863), onde duas PBP são expressas em maior quantidade na antena dos machos e uma PBP nas antenas das fêmeas (Jordan et al., 2008).

A ligação do feromônio com a PBP pode ser influenciada por mudanças de configuração que a proteína sofre devido a variações no pH do meio (Klusák et al., 2003; Sandler et al., 2000). Em *Bombyx mori* foram identificadas por ressonância magnética nuclear duas configurações da PBP, uma forma básica (BmorPBP<sup>B</sup>), que favorece a ligação do feromônio à PBP para que este seja transportado até o receptor olfativo, e outra forma ácida (BmorPBP<sup>A</sup>), que favorece a liberação do feromônio ao receptor olfativo (Damberger et al., 2000). Em contraposição, foi observado que as PBP de *Lymantria dispar* não são influenciadas pelas condições de pH da membrana para se ligar ao feromônio, mas sim pelas constantes de dissociação de cada um dos enantiômeros óticos do seu feromônio (Kowcun et al., 2001; Plettner et al., 2000; Vogt et al., 1989).

A função das PBP nas antenas dos machos é monitorar a liberação do feromônio (Callahan et al., 2000; Vogt et al., 2002), porém a função nas antenas das fêmeas ainda não está muito clara, mas acredita-se no seu envolvimento com o processo olfativo (Pelosi and Maida, 1995; Prestwich et al., 1995; Wojtasek and Leal, 1999). Acredita-se igualmente que a presença das PBP nas fêmeas possa contribuir para a especificidade da resposta das células receptoras, ligando ou removendo compostos não feromonais e fornecendo ânions orgânicos à linfa da sensila (Kaissling, 2001; Kaissling, 2004); também podem ajudar a monitorar a liberação do feromônio ou detectar seu próprio feromônio sexual, ou ainda algum dos componentes do feromônio (Hillier et al., 2005). Esta autodeteção já foi demonstrada em algumas espécies tais como *Panaxia quadripunctata* (Schneider et al., 1998), *Trichoplusia ni* (Todd and Baker, 1993), *Spodoptera littoralis* (Ljungberg et al., 1993), *Manduca sexta* (Kalinová et al., 2001), *Heliothis virescens* (Hillier et al., 2005) e *H. armigera* (Fan et al., 2003).

Não obstante existirem inúmeros estudos envolvendo o comportamento sexual e a identificação de compostos feromonais de *Diatraea saccharalis*, há uma lacuna no que diz respeito à expressão e identificação das PBP nesta espécie. Desta forma, o presente trabalho teve como finalidade avaliar a expressão das proteínas ligantes de feromônio em machos e fêmeas de *D. saccharalis* expostos a diferentes condições de luminosidade: fotofase contínua e fotoregime de 12 horas de fotofase e 12 horas de escotofase, assim a expressão das PBP nos diferentes sexos.

## 2 Material e métodos

### 2.1 Insetos

Pupas recém formadas de *D. saccharalis* foram obtidas da criação do Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, tendo as larvas sido alimentadas com dieta artificial a base de soja, açúcar e gérmen de trigo (Parra and Mishfeldt, 1992). As pupas foram sexadas, individualizadas e separadas em dois grupos para observar a influência do fotoperíodo na expressão das proteínas ligantes de feromônio. O primeiro grupo foi mantido em fotofase contínua e o segundo grupo sob um fotoregime de 12:12 h (L:D). Cada grupo foi considerado um tratamento. Ambos os tratamentos foram estabelecidos com temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de 70%. Após a emergência dos adultos, era colocado um algodão contendo solução de sacarose 10%.

Os tecidos coletados foram pernas e antenas de 30 machos e 30 fêmeas de três diferentes gerações. Os tecidos dos adultos entre dois e três dias de idade que permaneceram no fotoregime 12:12 h foram coletados durante a escotofase, entre a 5<sup>a</sup> e 7<sup>a</sup> hora, e os tecidos do grupo de adultos que permaneceu em fotofase contínua foram coletados 72 h após a emergência.

As antenas de cada tratamento foram cortadas na base com pinças e imediatamente transferidas a tubos Eppendorf, os quais estavam submersos em banho de gelo. O mesmo procedimento foi utilizado para coletar as pernas. Os tecidos foram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a extração da proteína.



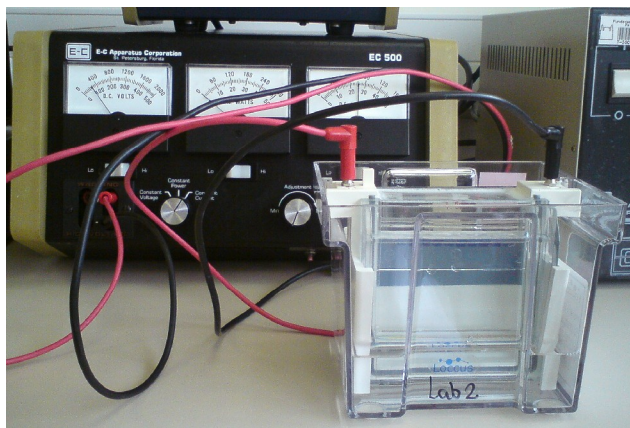
## 2.2 Extração da proteína total

Cada amostra constituída de 60 antenas foi homogeneizada com o auxílio do homogeneizador de vidro tipo Dounce em 60 µl de solução de PBS (NaCl 137 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,5), contendo 6 µl do inibidor de protease *complete Mini EDTA-free* (Roche) e 6 µl de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) a 1 mmol. Os extratos foram submetidos à centrifugação a 12.000 g a 4°C, por 20 min. O sobrenadante foi centrifugado mais duas vezes sob as mesmas condições. Posteriormente, a dosagem da proteína total foi feita empregando 1 µl do extrato bruto utilizando um Espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific), pela leitura da absorbância da solução a 280 nm. O mesmo procedimento foi empregado para as amostras das pernas. Os valores obtidos na quantificação da proteína total foram submetidos a análises de variância simples (ANOVA) e as médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey (p<0,05). As análises foram realizadas utilizando o programa BioEstat 3.0 (Ayres et al., 2003).

## 2.3 Detecção imunológica

Extratos protéicos equivalentes a 15 µg de proteína total foram fervidos em banho maria por 5 min após a adição de ¼ do volume do tampão de amostra para proteína (40 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 6,8; 10% SDS, 2,5% β-mercaptoetanol, 6% glicerol e 0,005 azul de bromofenol). Posteriormente, as proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% em condições desnaturantes, SDS-PAGE (“Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis”), sob temperatura ambiente e voltagem constante de 30 mA (Laemmli, 1970) (Figura 3.1). Utilizou-se como referência o marcador de massa molar *BenchMark* (Invitrogen). O gel foi corado com *Coomassie brilliant blue* R250 (Bio-Rad) para visualizar os padrões da proteína.

Posteriormente, o gel foi descorado com uma solução de descoloração (7,5 % de ácido acético e 20 % de etanol).

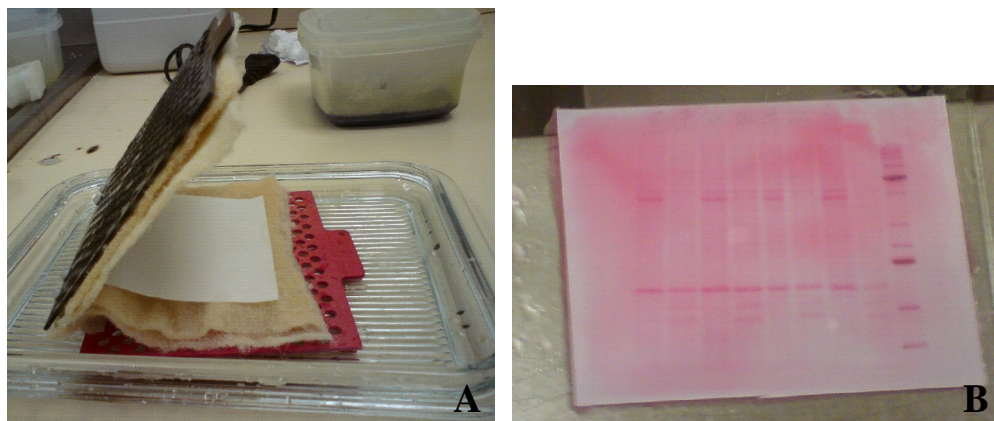


**Figura 3.1** Fotografia da cuba de eletroforese vertical (Fonte: arquivo do Laboratório de Semioquímicos-UFPR).

Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-C Extra, Amersham Biosciences) durante 16 h sob voltagem constante de 20 V a 4°C (Sambrook et al., 1989). Para a transferência foi utilizado tampão Tris/glicina. Posteriormente, a membrana foi corada com Ponceau S (Sigma P-3504 0,5%, ácido acético glacial 1%) por 5 min à temperatura ambiente para a identificação das bandas do marcador de massa molar *Benchmark* (Invitrogen) e então descorada em água bidestilada (Figura 3.2).

Em seguida, a membrana foi transferida para a solução de bloqueio [leite desnatado 5% em TBST (Tris-HCL 20 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,5; NaCl 150 mmol L<sup>-1</sup>; Tween 20 a 0,05%)] por uma hora sob agitação suave, seguida da incubação com anticorpo primário anti-BmoriPBP-IgG (cedido pelo prof. Dr. W. Leal) em uma diluição 1:1.500 na solução de bloqueio por uma hora sob agitação (Figura 3.3). A membrana foi lavada 3 vezes com a solução TBST por 5 minutos. Posteriormente, a membrana foi incubada

por 1 h sob agitação com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com a enzima fosfatase alcalina (Promega), diluído 1:10.000 na solução de bloqueio. A membrana foi lavada como descrito anteriormente.



**Figura 3.2** Fotografias; A: sistema de transferência da membrana, B: membrana corada com solução Ponceau (Fonte: arquivo do Laboratório de Semioquímicos-UFPR).



**Figura 3.3** Fotografia da membrana em processo de incubação com anticorpos primários (Fonte: arquivo do Laboratório de Semioquímicos-UFPR).

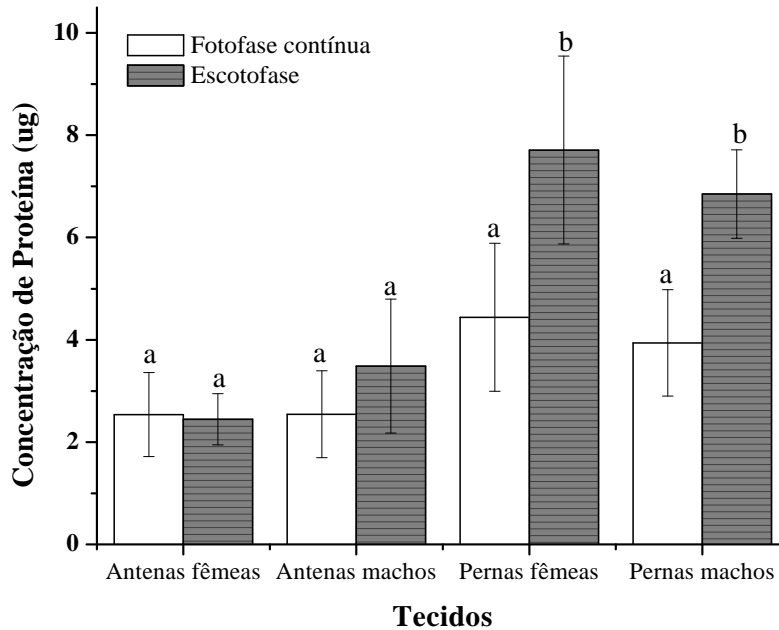
A reação imunoenzimática foi visualizada após 15 min de incubação em temperatura ambiente com a solução composta por 33  $\mu\text{L}$  5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfatase (BCIP – Promega) e 66  $\mu\text{L}$  de nitrobluetetrazolium (NBT – Promega)

para cada 10 mL de tampão fosfatase alcalina (Tris HCL 100 mmol L<sup>-1</sup> pH 9,5; MgCl<sub>2</sub> 5 mmol L<sup>-1</sup>). A reação foi interrompida pela transferência da membrana para uma solução de EDTA 100 mmol L<sup>-1</sup>.

### 3 Resultados

As quantidades de proteína total obtidas de antenas e pernas de machos e fêmeas variaram entre 2,5 e 7,7 µg para as diferentes condições de fotoperíodo avaliadas, como pode ser observado na figura 3.4. As maiores quantidades foram verificadas nas pernas das fêmeas e dos machos que foram coletados na escotofase: 7,7±1,8 µg para as fêmeas e 6,8±0,9 para os machos. Por sua vez, estes valores foram diferentes quando comparados aos outros valores obtidos, tanto para machos e fêmeas em ambas condições, fotofase contínua ou fotoregime (12:12). A quantidade de proteína total média das pernas das fêmeas que permaneceram sob luz contínua foi de 4,4±1,4 µg, enquanto os machos apresentaram uma quantidade média de 3,9±1,0 µg. Os valores de proteína total observados nas antenas dos machos e das fêmeas nas condições de fotoperíodo estudadas foram semelhantes. Porém, foi observado um leve incremento na quantidade presente nas antenas dos machos procedentes da escotofase. Os valores de proteína total nas antenas para a escotofase variaram entre 2,4±0,5 µg nas fêmeas e 3,4±1,3 µg nos machos, sendo considerados semelhantes do ponto de vista estatístico.

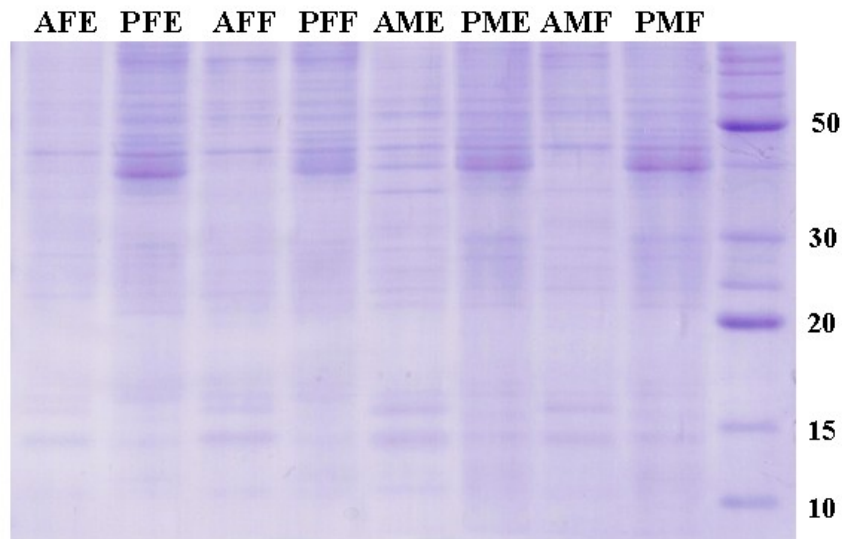
O perfil eletroforético das proteínas presentes nos extratos dos tecidos analisados de *D. saccharalis* empregando SDS-PAGE pode ser observado na figura 3.5.



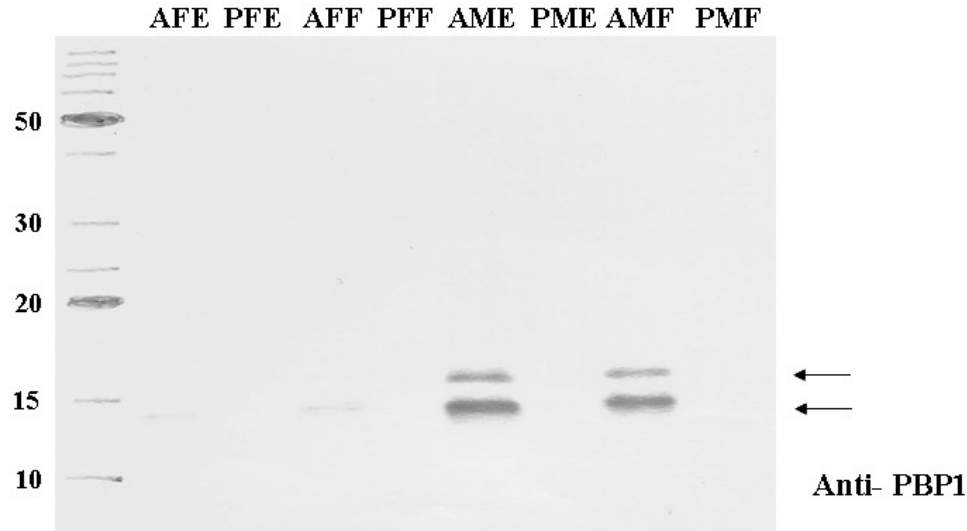
**Figura 3.4** Quantidade média de proteína total das antenas e pernas de *D. saccharalis* coletadas na fotofase contínua e na escotofase em fotoregime 12:12 h. Barras com diferentes letras indicam diferenças significativas (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

A expressão das PBPs nos diferentes tecidos foi analisada pelo método *Western blot* utilizando os anticorpos policlonais desenvolvidos contra a proteína ligante de feromônio de machos de *Bombyx mori*, BmoriPBP (Figura 3.6). A expressão da proteína imunorreativa BmoriPBP nas pernas de ambos os sexos foi negativa (PFE, PFF, PME e PMF), enquanto a expressão nas antenas de ambos os sexos foi positiva (AFE, AFF, AME, AMF). No caso dos machos (AME e AMF), foram observadas duas bandas expressas com uma massa molar aparente de aproximadamente 15 e 18 kDa. Contudo, para as fêmeas (AFE e AFF), observou-se apenas uma única banda com intensidade muito fraca, referente a uma massa molar aparente de 15 kDa. Uma vez que as amostras foram normalizadas pela quantidade de proteína total, é possível comparas as intensidades das bandas e inferir sobre variações na expressão da proteína imunoreativa nas amostras submetidas a diferentes fotoperíodos. Assim, podemos notar

que pela intensidade das bandas imunoreativas obtidas nas amostras AME e AMF, a expressão da proteína específica nas antenas dos machos apresentou maior intensidade naquelas antenas que foram coletadas na escotofase.



**Figura 3.5** Gel de poliacrilamida 15% corado com coomassie-blue, mostrando o perfil eletroforético das proteínas extraídas de antenas e pernas de *D. saccharalis*, após separação por SDS-PAGE. As amostras foram extraídas de insetos submetidos a condições de fotofase contínua e escotofase de fotoregime 12:12 h. **AFE**: antenas de fêmeas da escotofase; **PFE**: pernas de fêmeas de escotofase; **AFF**: antenas de fêmeas de fotofase contínua; **PFF**: pernas de fêmeas de fotofase contínua; **AME**: antenas de machos da escotofase; **PME**: pernas de machos de escotofase; **AMF**: antenas de machos de fotofase contínua; **PMF**: pernas de machos de fotofase contínua.



**Figura 3.6** Western blot do extrato cru de proteína de antenas e pernas de machos e fêmeas de *D. saccharalis* em condições de fotofase contínua e escotofase do fotoregime 12:12 h após SDS-PAGE (15%), empregando o anticorpo anti-PBP1 na diluição (1:1.500). **AFE**: antenas de fêmeas da escotofase; **PFE**: pernas de fêmeas de escotofase; **AFF**: antenas de fêmeas de fotofase contínua; **PFF**: pernas de fêmeas de fotofase contínua; **AME**: antenas de machos da escotofase; **PME**: pernas de machos de escotofase; **AMF**: antenas de machos de fotofase contínua; **PMF**: pernas de machos de fotofase contínua.

#### 4 Discussão

Este estudo confirmou a independência da expressão das PBP em *D. saccharalis* em relação às condições de fotoperíodo. A maior expressão das PBP presente nas antenas dos machos na escotofase pode estar relacionada com o comportamento de acasalamento que é apresentado durante este período (Hammond and Hensley, 1970), maximizando o monitoramento do feromônio liberado pelas fêmeas (Callahan et al., 2000), independentemente do fato das fêmeas iniciarem ou não a liberação do feromônio.

Devido aos níveis de expressão das PBP observados nas fêmeas de *D. saccharalis*, paralelamente foram realizados bioensaios eletrofisiológicos empregando EAD. Os bioensaios foram conduzidos estimulando antenas de fêmeas com o componente majoritário (Z9-E11-16:Ald) do feromônio sexual e com extratos obtidos de fêmeas virgens. Porém, não foram registradas respostas positivas, o que sugere que a expressão das PBP nas fêmeas desta espécie não significa, necessariamente, sensibilidade a seu próprio feromônio. Este tipo de comportamento foi descrito anteriormente em Noctuidae (Acín et al., 2009; Zhang et al., 2001). Os resultados sugerem que as PBP em *D. saccharalis* podem estar envolvidas na especificidade dos estímulos como a desintoxicação dos órgãos sensoriais ou a inativação rápida dos estímulos (Kaissling, 1998; Kaissling, 2001; Ziegelberger, 1996).

A detecção de duas bandas no imunoblot das amostras de antenas de machos pode ser decorrência de uma reação cruzada do anti-soro com proteínas apresentando epítopos conservados, já que este grupo de proteínas possui regiões muito conservadas entre diversas espécies (93 a 100% de similaridade), sendo semelhantes também às proteínas GOBP (Tegoni et al., 2004; Vogt et al., 2002), o que talvez explique a reação cruzada do anti-soro, como já foi observado nas espécies *Antheraea* e *Bombyx mori* (Laue et al., 1994; Steinbrecht et al., 1995).

Outra possibilidade seria a presença de um precursor das PBP, pois alguns relatos mostram que as mesmas são sintetizadas como precursores. O precursor possui um peptídeo que representa um sinal típico de proteínas secretadas ou de membrana, que depois sofre clivagem; no caso de *Antheraea polyphemus*, análises do cADN mostraram que a proteína PBP precursora tem um tamanho de aproximadamente 18 kDa, enquanto que a proteína madura tem um tamanho de cerca de 15 kDa (Raming et



al., 1989). Isso pode explicar os resultados do western blot obtidos neste trabalho, sendo a proteína com massa molar mais elevada identificada a proteína precursora presente em menor quantidade.

A realização deste trabalho tornou possível a geração dos primeiros resultados relacionados com a expressão de proteínas ligantes de feromônio na espécie em questão. Ficou evidenciado que a expressão ocorre especificamente nas antenas, tanto de machos quanto de fêmeas, sendo que a expressão se deu de forma mais elevada nos machos.

Uma perspectiva para um aprofundamento no conhecimento envolvendo o processo olfativo seria a identificação de tais proteínas empregando, por exemplo, técnicas de proteômica.

## Capítulo 4

### Comportamento de chamamento e avanços na identificação do feromônio sexual de *Diatraea indigenella* Dyar & Heinrich, (Lepidoptera: Crambidae)

#### Resumo

Aspectos como início, duração e padrão temporal de chamamento, e número de vezes de exposição da glândula produtora de feromônio de *Diatraea indigenella* Dyar & Heinrich, 1927 (Lepidoptera: Crambidae) foram observados durante sete escotofases. O comportamento de chamamento foi observado desde a emergência das fêmeas com um decréscimo no número de vezes que a glândula era exposta e na duração depois da sexta escotofase. A maior percentagem de fêmeas chamando foi verificada seis horas após o início da escotofase. O principal componente do feromônio sexual foi identificado a partir de extratos obtidos de fêmeas virgens utilizando GC-EAD, GC-MS e bioensaios em olfatômetro. O componente majoritário foi identificado como (Z,E)-9,11-hexadecadienal (Z9,E11-16:Ald). Adicionalmente, foram observados dois componentes minoritários ativos frente a antena de machos. A concentração do (Z9,E11-16:Ald) variou de 2,53 a 13,7 ng glândula<sup>-1</sup>, sendo a maior concentração detectada na sexta hora de escotofase. Embora os tempos de retenção dos dois compostos minoritários presentes no extrato tenham sido estimados pelas respostas observadas no EAD, as suas estruturas químicas não foram confirmadas devido às baixas concentrações nos extratos. Bioensaios com olfatômetro mostraram que os extratos obtidos das glândulas e o componente majoritário atraíram 86% e 68% dos machos, respectivamente, quando testados individualmente contra hexano. Porém, uma atração significativa (77%) foi observada quando extratos de glândula foram avaliados *versus* o padrão sintético do componente majoritário. A identificação do componente majoritário do feromônio sexual de *D. indigenella* realizada neste trabalho representa um importante avanço para a completa elucidação da sua mistura feromonal.

**Abstract** Behavioral aspects such as calling start time as well as length and calling bouts of *Diatraea indigenella* Dyar & Heinrich 1927 (Lepidoptera: Crambidae) were evaluated during seven scotophases in this work. Calling behavior was observed since the emergence of the females with a decrease in calling bouts and length after the sixth scotophase. The highest percentage of calling females was verified passed six hours after the lights off. The main sex pheromone component was identified from extracts of female glands, using GC-EAD, GC-MS and olfactometer bioassays. The major pheromone component, identified as (Z,E)-9,11-hexadecadienal (9Z,11E-16:Ald), and two other unidentified minor components elicited antennal responses. This major component concentration varied from 2.53 to 13.7 ng gland<sup>-1</sup>, and the highest concentration was detected at the sixth hour of the scotophase. Although we could estimate the retention times of the other two active components present in extracts due to the EAD response, their chemical structures could not be confirmed because of their

low concentration levels in the extracts. Olfactometer bioassays showed that gland extracts were able to attract 86% of the males. Significant attraction (77%) was also observed when the gland extract was tested against the synthetic major component. In addition, 68% of males preferred the synthetic major component instead of the hexane. It could be noticed the importance of the minor components in the male attractiveness. The identification of the major sex pheromone component carried out in the present study represents an important step towards the complete elucidation related to the composition of the sex pheromone of *D. indigenella*.

## 1 Introdução

A emissão de feromônios sexuais na maioria das espécies da ordem Lepidoptera é realizada pelas fêmeas e tem a finalidade de atrair os machos coespecíficos pelo vôo direto ou ainda pelo cortejo para possibilitar o acasalamento (Baker, 1989; Linn and Roelofs, 1995). Padrões de comportamento como o chamamento, onde a maioria das vezes é liberada a mistura feromonal, podem influenciar o processo de acasalamento (Hou and Sheng, 2000). Outros fatores, como a idade, podem modular a periodicidade da liberação do feromônio sexual e o comportamento de chamamento das fêmeas (Delisle and McNeil, 1987; Webster and Cardé, 1982).

A identificação do padrão de liberação do feromônio tem sido extensivamente estudada nos últimos anos (Gibb et al., 2008; Löfstedt et al., 2008; Yamamoto et al., 2007), uma vez que facilita o desenvolvimento de técnicas para atrair, capturar e manipular os adultos e, dessa forma, controlá-los (Lingren et al., 1977).

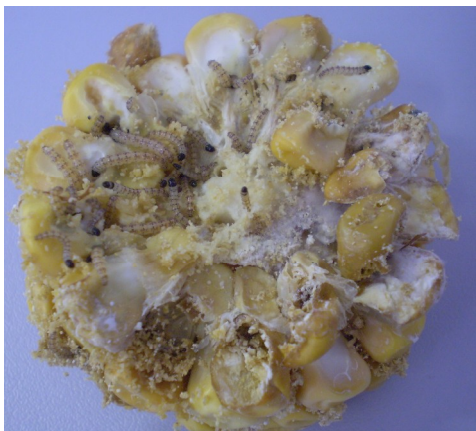
*Diatraea indigenella* é um inseto presente principalmente em plantações de cana de açúcar e sorgo, sendo sua ocorrência relatada na Colômbia e no Brasil (Box, 1930; Leslie, 2007). Os danos às plantas são provocados pelo estágio larval, onde os colmos são perfurados pela formação de galerias que propiciam sua quebra, o decréscimo do seu desenvolvimento e a perda de massa (Goméz and Lastra, 1995; Leslie, 2007; Vargas and Goméz, 2005). Insetos com hábitos alimentares como este, onde as larvas e as pupas permanecem no interior da planta, podem ser monitorados e/ou controlados pela liberação de parasitóides (Botelho et al., 1999), mas tem sido observado que os níveis de parasitismo nesta espécie são inferiores a outras espécies próximas, tais como *D. saccharalis* (Goméz and Lastra, 1995).

Não obstante o potencial econômico da *D. indigenella* e a necessidade de ferramentas de monitoramento e controle, não existem relatos de estudos visando a identificação dos componentes do feromônio sexual deste inseto. Neste estudo foram conduzidos vários experimentos para avaliar o comportamento de chamamento, a produção do feromônio sexual e sua composição, mediante a resposta de antenas de machos, via cromatografia em fase gasosa acoplada à detecção eletroantenográfica (GC-EAD) e cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massas (GC-MS). A resposta ao componente majoritário do feromônio sexual também foi avaliada empregando-se um olfatômetro do tipo Y.

## **2 Material e métodos**

### **2.1 Insetos**

A colônia de *D. indigenella* foi estabelecida no Laboratório de Semioquímicos da Universidade Federal do Paraná. As larvas foram colocadas em recipientes plásticos (20 cm × 15 cm) com tampa ventilada, e mantidas a  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 70% de umidade relativa e um regime de fotoperíodo de 13 horas de fotofase e 11 horas de escotofase. As larvas foram alimentadas com dieta natural, espigas de milho verde (*Zea mays L.*), até a formação de pupas (Figura 4.1). As pupas foram separadas por sexo e individualizadas em containeres plásticos (10 × 8 cm) para a emergência dos adultos. Os adultos foram separados diariamente e alimentados com uma solução de sacarose a 10%.



**Figura 4.1** Larvas de *Diatraea indigenella* se alimentando de milho (Fonte: arquivo do Laboratório de Semioquímicos-UFPR).

## **2.2 Comportamento de chamamento**

O experimento teve início durante a primeira escotofase completa após a emergência, sendo definida como idade 1. Trinta fêmeas com idade entre 1 e 7 dias foram observadas a cada 10 min durante a escotofase (Figura 4.2). Uma lâmpada vermelha foi utilizada para facilitar as observações e para evitar a perturbação dos insetos. Fêmeas em processo de chamamento foram reconhecidas pelo levantamento sutil das asas e pela extensão parcial ou total do ovipositor. As observações registradas foram: início do chamamento, padrão temporal do chamamento, duração do chamamento e número e vezes que a glândula era exposta.

## **2.3 Extração do feromônio**

Os segmentos terminais do abdome foram suavemente comprimidos com pinças para expor a glândula contendo o feromônio, a qual foi removida e transferida para frascos cônicos. A extração foi realizada empregando-se 10  $\mu$ L de hexano por glândula, durante 20 min (Berger, 1972). Os extratos foram transferidos para tubos de vidro e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização das análises. Frações contendo 13 glândulas de

fêmeas virgens de 2 a 4 dias de idade e entre a quinta e nona hora da escotofase foram obtidas para as análises empregando GC-EAD. Os extratos utilizados na quantificação do feromônio foram procedentes de uma única glândula de fêmeas com 2 dias de idade. Foram quantificadas quatro glândulas individualmente de cada hora da escotofase, da primeira à décima primeira hora. A extração de cada glândula foi realizada como descrito anteriormente, e as mesmas foram imediatamente analisadas por cromatografia em fase gasosa.



**Figura 4.2** Fêmeas de *Diatraea indigenella* em observação durante experimento de avaliação do comportamento de chamamento (Fonte: arquivo do Laboratório de Semioquímicos-UFPR).

#### **2.4 Análise dos extratos contendo o feromônio sexual**

*Cromatografia em fase gasosa e detecção por eletroantenografia (GC-EAD).* Os extratos contendo o feromônio sexual foram analisados por GC-EAD empregando um cromatógrafo operando em fase gasosa Shimadzu modelo GC-2010 e um sistema eletroantenográfico Syntech (Hilversum, Holanda). O cromatógrafo estava equipado com uma coluna DB-5 (30 m × 0,25 mm d.i. e espessura de filme de 0,25 µm) (J&W Scientific Inc, EUA). Um volume de 1 µL de cada extrato foi injetado empregando-se o modo *splitless* com o injetor a 250°C. A temperatura da coluna foi mantida a 100°C por

1 min, sendo então aumentada para 270°C a uma velocidade de 10°C min<sup>-1</sup>, sendo então mantida nesta temperatura por 7 min. Hélio foi empregado como gás carregador a uma pressão de 170 kPa. O gás efluente da coluna era dividido em uma razão 1:1, com uma parte indo para o detector de ionização em chama (FID), a uma temperatura de 270°C, e a outra parte passando através de uma linha de transferência aquecida e sob um fluxo de ar umidificado (300 ml min<sup>-1</sup>) direcionado para a antena de um macho. A antena era fixada entre dois eletrodos de aço inox utilizando um gel condutor (Signa gel, Parker Labs., EUA). Foram testadas 26 antenas e os sinais provenientes do GC-EAD foram analisados empregando-se o programa CG-EAD32 (versão 4.6).

*Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS).* Os extratos utilizados nas análises de GC-EAD também foram analisados por GC acoplado a espectrômetro de massas Shimadzu QP-2010 Plus contendo uma coluna DB-5 semelhante àquela descrita anteriormente. O espectrômetro de massas foi operado no modo de impacto de elétrons a 70 eV. A injeção foi realizada no modo *splitless* a 250°C. O programa de temperatura empregado era o seguinte: temperatura inicial de 50°C (1 min); aquecimento até 250°C a uma velocidade de 7°C min<sup>-1</sup>, com manutenção na temperatura máxima por 10 min. A linha de transferência foi mantida a 270°C e o gás utilizado como carregador foi o Hélio. O componente feromonal que estimulou repetidamente a resposta da antena foi identificado pela comparação do seu espectro de massas com aquele contido na base de dados de espectros de massas do *National Institute of Standards and Technology* (NIST) e também pela comparação do seu tempo de retenção com o de padrões autênticos.

*Cromatografia em fase gasosa (GC).* Análises empregando cromatografia em fase gasosa foram realizadas nas mesmas condições das análises de GC-EAD visando a



quantificação dos principais compostos que apresentaram atividade biológica. A concentração do componente majoritário do feromônio foi determinada por calibração externa, tendo sido empregada uma curva analítica com padrões nas concentrações 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10 ng mL<sup>-1</sup>. Uma mistura contendo hidrocarbonetos saturados C10-C24 foi co-injetada com os extratos do feromônio para o cálculo do índice de Kovatz (KI) dos compostos com atividade eletrofisiológica. Estas características de retenção foram subsequentemente utilizadas para comparar a identidade e a atividade no eletroantenógrafo de compostos autênticos com os padrões sintéticos.

*Padrões Químicos.* Decano, dodecano, tetradecano, hexadecano, octadecano, nonadecano, eicosano, docosano e tetracosano foram adquiridos da Aldrich (EUA) e o composto (*Z,E*)-9,11-hexadecadienal foi adquirido de Pherobank (Holanda).

## **2.5 Bioensaio em olfatômetro**

Para verificar a atividade biológica dos extratos das glândulas de feromônio sexual de fêmeas virgens, foi utilizado um olfatômetro de vidro de dupla escolha do tipo Y (tubo principal com 40 cm com braços de 20 cm; 5 cm de diâmetro) (Figura 4.3), com um fluxo de ar de 4 L min<sup>-1</sup>, previamente umidificado e passado em carvão ativado. A temperatura foi mantida em 23±2°C e a umidade relativa do ar em 75%. Em cada tratamento foi avaliado o comportamento de 35 machos. Os machos eram introduzidos no olfatômetro entre a quinta e a décima hora da escotofase e seu comportamento foi observado por 10 min sob luz vermelha. Se o macho permanecia no tubo principal, era registrado como ausência de escolha e o valor era excluído da análise estatística; se o inseto se dirigia para um dos braços do tubo em Y, era registrado como escolha. Cada indivíduo era testado apenas uma vez. Os estímulos para as escolhas foram realizados empregando-se o extrato de glândulas sob uma dose de 1

inseto equivalente *versus* hexano, o padrão sintético Z9,E11-16:Ald (1 ng mL<sup>-1</sup>) *versus* hexano e o extrato de glândulas (1 inseto equivalente) *versus* Z9,E11-16:Ald (1 ng mL<sup>-1</sup>). As soluções foram impregnadas em pedaços de papel filtro (2 × 2 cm). A fonte de odor era girada 180° a cada quatro insetos para evitar tendências em função do posicionamento. Após cada teste o sistema era mantido sob um fluxo de ar limpo por 15 min.



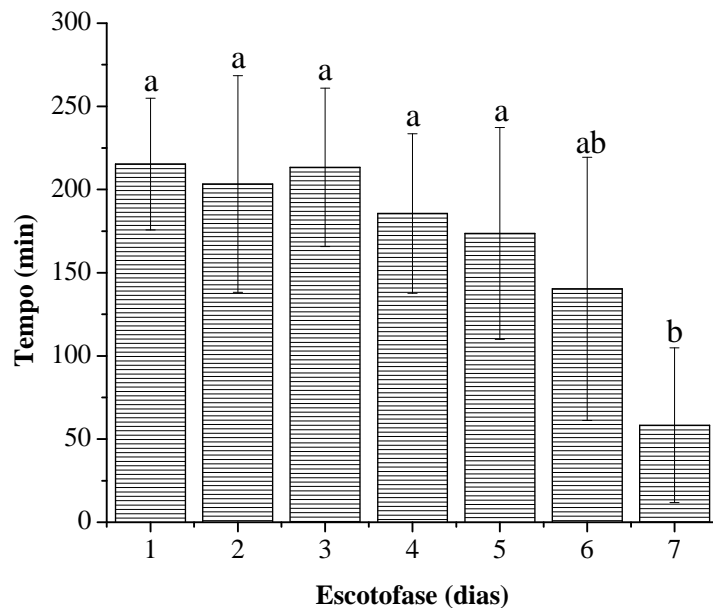
**Figura 4.3** Fotografia do olfatômetro de vidro de dupla escolha do tipo Y (Fonte: arquivo do Laboratório de Semioquímicos-UFPR).

*Análise estatística dos dados* Os dados obtidos a partir das observações envolvendo o comportamento de chamamento e também da quantificação do componente majoritário do feromônio foram tratados empregando-se a análise de variância simples (*one-way ANOVA*) e o teste de Tukey. Testes binomiais foram utilizados para avaliar os resultados obtidos no bioensaio de olfatometria. Os níveis de significância foram de 0,05 em todas as análises. Os dados foram processados utilizando-se o programa BioEstat 3.0 (Ayres et al., 2003).

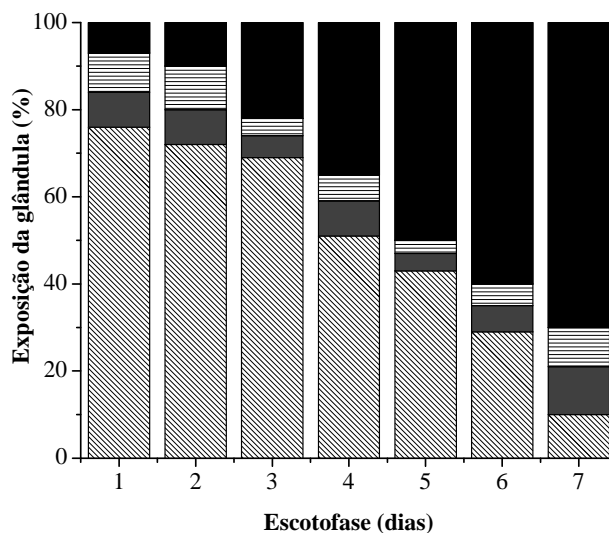
### 3 Resultados

As fêmeas que apresentaram comportamento de chamamento exibiram a postura característica que consiste da extrusão e curvatura da ponta do abdome na direção da superfície dorsal. A maioria das fêmeas recém-emergidas (93%) mostrou comportamento de chamamento durante a primeira escotofase após a emergência; este percentual decresceu para 70% e 30% durante a sexta e a sétima escotofase, respectivamente. A duração do chamamento foi similar durante as seis primeiras escotofases, com valores variando de 215,3 a 140,3 min (Figura 4.4). Contudo, a duração média do chamamento na última escotofase avaliada foi estatisticamente diferente das demais, tendo duração média de 58,3 min ( $F_{6,203}=7,89$ ;  $P<0,0001$ ).

O número de vezes que a glândula produtora de feromônio foi exposta durante as sete escotofases observadas variou de 1 a 3. Entretanto, na sexta e sétima escotofases várias fêmeas não exibiram este comportamento, sendo que na sétima escotofase apenas 30% delas expuseram a glândula ( $F_{6,203}=10,08$ ;  $P<0,0001$ ) (Figura 4.5). Observou-se que a maioria das fêmeas exibiu comportamento de chamamento entre a sexta e a décima primeira hora após início da escotofase durante os sete dias de observação ( $F_{6,203}=11,48$ ;  $P<0,0001$ ), conforme mostra a figura 4.6.A.

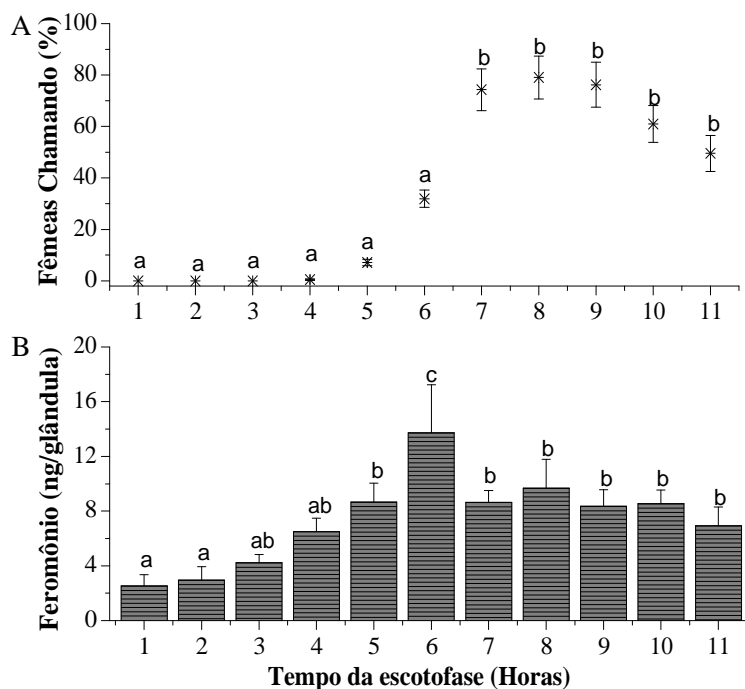


**Figura 4.4** Duração média do chamamento em minutos de 30 fêmeas de *D. indigenella* durante sete escotofases. Letras diferentes indicam diferença significativa (Teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).



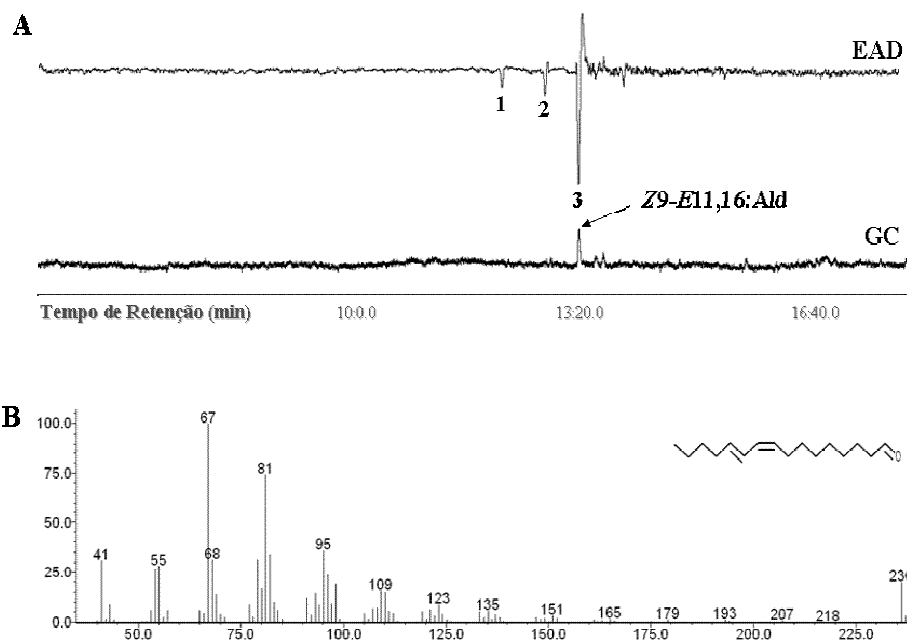
**Figura 4.5** Número de vezes, expressos em porcentagem, de exposição da glândula produtora de feromônio de 30 fêmeas virgens de *D. indigenella* durante sete escotofases. Percentual de fêmeas que expuseram sua glândula uma vez (▨); duas vezes (■); três vezes (▤) e que não apresentaram exposição da glândula (■).

Os extratos do feromônio sexual de *D. indigenella* estimularam repetidamente um forte sinal na antena, correspondente ao componente majoritário detectado pelo FID (Figura 4.7.A). O espectro de massas deste composto indica tratar-se de um dieno com duas duplas ligações correspondente ao *Z9,E11-16:Ald.* A identificação foi posteriormente confirmada pela co-injeção no GC e comparação do espectro de massas com o de um padrão autêntico, além das fortes respostas obtidas no CG-EAD utilizando o padrão sintético deste aldeído como estímulo para a antena. O composto apresentou KI de 1870, um tempo de retenção de 13,26 min, um íon molecular em  $m/z$  236 (9%) e um pico base em  $m/z$  67. Foram também observados íons fragmentos em  $m/z$  81 (74,4%), 95 (3,6%), 109 (14,2%) e 123 (7,1%), conforme pode ser constatado na figura 4.7.B. Adicionalmente, os extratos de fêmeas *D. indigenella* estimularam duas respostas menores nas antenas de machos devido à presença de dois compostos desconhecidos registrados em 12,2 e 12,8 min. Não foram detectadas quantidades rastreáveis destes compostos nos extratos para realizar sua identificação devido à suas baixas concentrações na glândula produtora de feromônio.



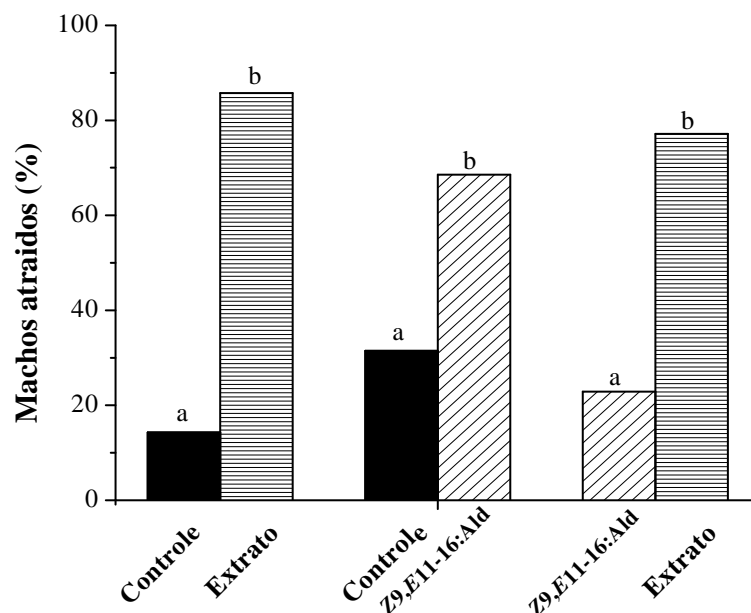
**Figura 4.6 A:** Padrão temporal de chamamento exibido por 30 fêmeas de *D. indigenella* durante uma escotofase completa. **B:** Concentração média em ng glândula<sup>-1</sup> do Z9,E11-16:Ald, componente majoritário do feromônio sexual de *D. indigenella*, durante uma escotofase completa (n=4). Letras diferentes indicam diferença significativa (Teste de Tukey, p< 0,05).

Quando a atratividade dos machos foi avaliada no olfatômetro, 86% dos indivíduos mostraram preferência por extratos obtidos de fêmeas virgens, em detrimento ao hexano, utilizado como controle ( $X^2= 17,85$ ;  $df=1$ ;  $P=0,0000$ ). Por outro lado, 68% dos machos preferiram o padrão sintético quando testado contra o controle ( $X^2= 4,83$ ;  $df=1$ ;  $P=0,042$ ). Finalmente, quando o padrão sintético foi testado contra o extrato das fêmeas, 77% dos machos exibiram preferência pelo extrato ( $X^2= 10,31$ ;  $df=1$ ;  $P=0,0023$ ). Estes resultados são apresentados na figura 4.8.



**Figura 4.7 A:** GC-EAD de uma antena de macho *D. indigenella* estimulada com um extrato de feromônio obtido de 13 glândulas de fêmeas virgens, entre dois e três dias após a emergência. **1** e **2** são os componentes minoritários e **3** é o componente majoritário Z9,E11-16:Ald. **B:** Espectro de massa do componente majoritário presente no extrato do feromônio sexual de *D. indigenella*.

A concentração de Z9,E11-16:Ald foi quantificada em extratos de glândulas de fêmeas virgens, tendo variado de 2,53 ng glândula<sup>-1</sup> a 13,70 ng glândula<sup>-1</sup> durante todas as 11 h de duração de uma escotofase (Figura 4.4.B). Três diferentes níveis de concentração foram observados, isto é, no início da escotofase, no meio e também ao final da escotofase ( $F_{10,33}=18,77$ ;  $P<0.0001$ ).



**Figura 4.8** Preferência de machos de *D. indigenella* ao extrato do feromônio sexual obtido de fêmeas virgens e ao componente majoritário Z9,E11-16:Ald em bioensaio utilizando olfatômetro do tipo Y. Foram avaliados o extrato e o padrão sintético do componente majoritário *versus* o hexano, como controle, e o extrato *versus* o padrão sintético em três experimentos independentes empregando 35 machos cada um. Letras maiúsculas indicam diferença significativa (teste  $X^2$ ,  $p < 0,05$ ).

#### 4 Discussão

Observações iniciais permitiram coletar evidências de que fêmeas de *D. indigenella* não apresentam comportamento de chamamento durante a fotofase. Portanto, todas as observações relacionadas ao seu comportamento foram realizadas durante a escotofase.

As fêmeas de *D. indigenella* iniciaram o chamamento durante a primeira escotofase, indicando sua maturidade do ponto de vista reprodutivo. Esta associação entre a produção de feromônio e a maturidade sexual foi estabelecida para várias espécies de lepidópteros (Babilis and Mazomenos, 1992; Delisle and Royer, 2004;



Gómez and Rojas, 2006; Mazo-Cancino et al., 2004; Silva et al., 2006; Webster and Cardé, 1982). Este comportamento também pode estar associado a um aumento na probabilidade de acasalamento sendo o primeiro a atrair os machos (Batista-Pereira et al., 2004; Gadenne, 1993; Turgeon and McNeil, 1982; Zarbin et al., 2007). Portanto, não há necessidade de se fornecer suplementos de carboidratos para que tenha início o chamamento, no caso das fêmeas de *D. indigenella* (Han and Gatehouse, 1991b).

A postura de chamamento adotada pela extrusão e curvatura do abdome na direção da superfície dorsal é similar àquela relatada para outras mariposas da família Crambidae, como nas espécies *Dichocrocis punctiferalis* (Guenée, 1854) (Konno et al., 1980), *Diaphania indica* (Saunders, 1851) (Kinjo and Arakaki, 1997) e *Glyphodes pyloalis* Walker, 1859 (Seol et al., 1986). Aspectos tais como o tempo de início do chamamento, sua duração, assim como o número de vezes que a glândula é exposta nas fêmeas de *D. indigenella*, foram fortemente influenciados pela idade. A maior atividade de chamamento ocorreu após a sexta hora da escotofase, sugerindo que este é o melhor momento para a extração da glândula do feromônio das fêmeas de *D. indigenella*.

Os três níveis de concentração encontrados para o composto Z9,E11-16:Ald mostraram uma razoável correlação com a postura das fêmeas. O constituinte majoritário pôde ser quantificado mesmo quando não havia fêmeas exibindo comportamento de chamamento. Além disso, foi observado que a concentração mais elevada de feromônio foi determinada exatamente quando a maioria das fêmeas iniciou a postura de chamamento, na sexta hora da escotofase. Após este período de tempo, embora a porcentagem de fêmeas exibindo comportamento de chamamento ainda fosse alta, a concentração do componente majoritário decresceu de maneira significativa. A especificidade dos intervalos de tempo para a liberação do feromônio tem sido

reconhecida em algumas espécies como um mecanismo de assegurar o isolamento reprodutivo (Cardé and Roelofs, 1973).

Quando a eficiência do extrato de feromônio obtido das glândulas de fêmeas virgens e o padrão sintético do componente majoritário do feromônio foram testados no olfatômetro quanto a sua capacidade de atrair machos, a porcentagem de insetos que foram atraídos pelo fluxo de ar que continha o extrato da glândula foi, em ambos os casos, superior a 75%. Estes resultados acentuam a importância dos outros componentes ativos presentes no extrato. Por outro lado, o padrão sintético foi menos eficiente que a mistura completa presente no extrato da glândula quando testado contra o controle (hexano). Comportamentos similares têm sido descritos na literatura (Cabrera et al., 2001; Kawazu et al., 2007; Yang et al., 2002; Yang et al., 2007; Yu-yong et al., 2009). Por exemplo, o componente majoritário do feromônio sexual de *Diatraea saccharalis* Z9,E11-16:Ald (Svatoš et al., 2001), apresenta uma baixa atratividade em campo quando comparado com a atratividade de fêmeas virgens colocadas em gaiolas (Batista-Pereira et al., 2002; Hammond and Hensley, 1971; Kalinová et al., 2005; Perez and Hensley, 1973). Diferentes abordagens para identificar outros componentes presentes no feromônio de *D. saccharalis* têm sido utilizadas (Batista-Pereira et al., 2002; Kalinová et al., 2005); entretanto, o sucesso na atração do macho no campo ainda é um objetivo a ser alcançado, no caso da presente espécie.

Embora tenham sido estimados os tempos de retenção de outros dois componentes ativos presentes nos extratos de glândulas de fêmeas de *D. indigenella* em virtude das respostas obtidas no EAD, suas estruturas químicas não puderam ser confirmadas em análises via GC-MS devido às baixas concentrações destes compostos presentes nos extratos das glândulas. As baixas concentrações não permitiram a

observação de um padrão claro de fragmentação para estes compostos e sua subsequente inclusão nos bioensaios.

Através do presente trabalho mostramos que o comportamento de chamamento de *D. indigenella* se dá a partir da primeira escotofase, com a ocorrência de um ponto máximo após a 6<sup>a</sup> hora de escotofase. Os extratos das glândulas de feromônio foram responsáveis pela atração de machos e, de acordo com resultados obtidos via GC-EAD foi possível identificar o componente majoritário, responsável pela maior resposta, assim como pelo menos dois outros componentes ativos nas antenas dos machos. Estes componentes minoritários, contudo, permanecem não identificados. Assim sendo, a identificação do componente majoritário do feromônio sexual conduzida neste estudo representa um passo importante na completa elucidação da composição do feromônio sexual de *D. indigenella*.

No que diz respeito à identificação dos constituintes do feromônio sexual, foi possível observar que o composto majoritário, Z9,E11-16:Ald, identificado para a *D. indigenella*, também foi determinado como constituinte majoritário para a outra espécie estudada, isto é, a *D. saccharalis*, conforme descrito nos capítulos 1 e 2.

## Conclusões

A realização deste trabalho possibilitou a geração de resultados que demonstram uma variação na composição dos dois principais componentes do feromônio sexual de *D. saccharalis*. Também ficou evidenciada uma co-variação das populações submetidas a avaliação.

No processo de identificação do feromônio sexual desta espécie, além dos dois compostos principais já descritos na literatura, dois novos componentes foram identificados nos extratos analisados. A identificação destes novos componentes ativos é de relevância no aprimoramento de técnicas que estejam relacionadas ao sistema de comunicação química deste inseto.

Neste estudo também foram gerados os primeiros resultados envolvendo a expressão de proteínas ligantes de feromônio para a *D. saccharalis*. Os resultados mostraram que a expressão ocorre especificamente nas antenas de machos e fêmeas, sendo sensivelmente mais elevada nos machos. Também foi possível observar que a expressão ocorre de maneira independente das condições de luminosidade.

Finalmente, os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o comportamento de chamamento de *D. indigenella* ocorre a partir da primeira escotofase. Os machos foram atraídos quando testados frente a extratos de glândulas de feromônio, tendo sido possível a identificação do componente majoritário, responsável pela maior resposta. Componentes minoritários foram detectados, porém não puderam ser identificados. A identificação do componente majoritário do feromônio sexual realizada neste trabalho abre novas perspectivas na completa elucidação da composição do feromônio sexual deste inseto.

Em termos gerais, todos estes resultados representam um avanço no conhecimento do processo de comunicação química das espécies estudadas, devendo contribuir para o aprimoramento de técnicas de monitoramento e controle destes insetos, os quais estão associados à produtividade de plantas de reconhecida importância econômica, como por exemplo, a cana de açúcar.

## Bibliografia

- Acín, P., Carrascal, M., Abián, J., Guerrero, A., Quero, C., 2009. Expression of differential antennal proteins in males and females of an important crop pest, *Sesamia nonagrioides*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 39, 11-19.
- Alfaro, M., Zoller, S., Lutzoni, F., 2003. Bayes or Bootstrap? A Simulation Study Comparing the Performance of Bayesian Markov Chain Monte Carlo Sampling and Bootstrapping in Assessing Phylogenetic Confidence. **Molecular Biology and Evolution** 20, 255-266.
- Almeida, L.C., Macedo, N., Botelho, P.S.M., Araujo, J.R.J., Degaspari, N., 1983. Population fluctuations of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* by means of pheromone traps, utilizing synthetic pheromone and virgin females. **Congress of the ISSCT** 18, 2.
- Ando, T., Inomata, S., Yamamoto, M., 2004. Lepidopteran Sex Pheromones. **Topics in Current Chemistry** 239, 51-96.
- Angeli, S., Ceron, F., Scaloni, A., Monti, M., Monteforti, G., Minnocci, A., Petacchi, R., Pelosi, P., 1999. Purification, structural characterization, cloning and immunocytochemical localization of chemoreception proteins from *Schistocerca gregaria*. **European Journal of Biochemistry**. 262, 745-754.
- Arn, H., Esbjerg, P., Bues, R., Toth, M., Szocs, G., Guerin, P., Rauscher, S., 1983. Field attraction of *Agrotis segetum* males in four European countries to mixtures containing three homologous acetates. **Journal of Chemical Ecology** 9, 267-276.
- Avise, J.C., 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, New York.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C., 1987. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial ADN Bridge Between Population Genetics and Systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics** 18, 489-522.
- Ayres, M., Ayres Jr, M., Ayres, D., Santos, A., 2003. BioEstat 3.0 Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Sociedade Civil Mamirauá, Belém.
- Babilis, N.A., Mazomenos, B.E., 1992. Pheromone production in *Sesamia nonagrioides*: Diel periodicity and effect of age and mating. **Journal of Insect Physiology** 38, 561-564.
- Baker, T.C., 1989. Sex pheromone communication in the lepidoptera: New research progress. **Cellular and Molecular Life Sciences** 45, 248-262.
- Batista-Pereira, L.G., Santangelo, E.M., Stein, K., Unelius, C.R., Eiras, A.E., Correa, A.G., 2002. Electrophysiological Studies and Identification of Possible Sex Pheromone Components of Brazilian Populations of the Sugarcane Borer, *Diatraea saccharalis*. **Zeitschrift für Naturforschung** 57, 753-758.
- Batista-Pereira, L.G., Wilken, C.F., Neto, S.D.P., Marques, E., 2004. Comportamento de Chamamento de *Thyrintina arnobia* (Stoll) (Lepidoptera: Geometridae) em *Psidium guajava*, *Eucalyptus grandis* e em Dieta Artificial. **Neotropical Entomology** 33, 021-028.

- Berger, R.S., 1972. 2,6-Dichlorophenol, sex pheromone of the lone star tick. **Science** 177, 704-705.
- BIC: Schwarz, G., 1978. Estimating the dimension of a model. **The Annals of Statistics** 6, 461-464.
- Bjostad, L.B., Wolf, W.A., Roelofs, W.L., 1987. Pheromone biosynthesis in lepidopterans: Desaturation and chain shortening., **in**: Blomquist, G.J., Prestwich, G.D. (Ed.), Pheromone Biochemistry. Academic Press, Orlando, Florida, pp. 77-120.
- Blum, M.S., 1985. Exocrine systems, **in**: Blum, M.S. (Ed.), Fundamentals of Insect Physiology. John Wiley and Sons, New York, pp. 535-579.
- Borges, M., Aldrich, J.R., 2001. Feromônio de Heteroptera: Oportunidades para o manejo de insetos benéficos, **in**: Vilela, E.F., Lúcia, T.M.C.D. (Eds.), Feromônios de Insetos: Biologia, química e emprego no manejo de pragas, 2 ed. Holos, Riberão Preto-SP, pp. 93-98.
- Bortoli, S.A.d., Dória, H.O.S., Albergaria, N.M.M.S., Botti, M.V., 2005. Aspectos biológicos e dano de *Diatraea saccharalis* (fabr., 1794) (Lepidoptera: Pyralidae) em sorgo cultivado sob diferentes doses de nitrogênio e potássio. **Ciência e Agrotecnologia** 29, 267-273.
- Botelho, P.S., Parra, J.R.P., Neto, J.F.C., Oliveira, C.P.B., 1999. Associação do parasitóide de ovos *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e do parasitóide larval *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae) no controle de *Diatraea saccharalis*, (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) em cana de açúcar. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** 28, 491-496.
- Botelho, P.S.M., 1992. Quinze anos de controle biológico da *Diatraea saccharalis* utilizando parasitóides. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 27, 256-262.
- Botelho, P.S.M., Macedo, N., 2002. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*, **in**: Parra, J.R., Botelho, P.S.M., Correa-Ferreira, B.S., Bento, J.M.S. (Eds.), Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores. Manole, São Paulo, pp. 409-425.
- Box, H., 1956. New species and records of *Diatraea* and *Xanthopherme* (Lep: Pyralidae). **Bulletin of Entomological Research** 22, 1-50.
- Box, H.E., 1930. The crambinae Genera *Diatraea* and *Xanthopherme* (Lep., Pyral.). **Bulletin of Entomological Research** 22, 27-28.
- Box, H.E., 1960. The species of *Diatraea* and allied genera attacking the sugar cane **Proceedings International Congress Sugar Cane Technology** 10, 870-876.
- Breer, H., Boekhoff, I., Tareilus, E., 1990. Rapid kinetics of second messenger formation in olfactory transduction. **Nature** 345, 65-68.
- Breer, H., Krieger, J., 2003. Transduction Mechanisms of Olfactory Sensory Neurons, **in**: Blomquist, G.J., Vogt, R. (Eds.), Insect pheromone Biochemistry and Molecular Biology: the biosynthesis and detection of insect pheromones and plant volatiles. Elsevier, Oxford, pp. 593-607.
- Brower, A.V., 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial ADN

- evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 91, 6491-6495.
- Cabrera, A., Eiras, A.E., Gries, G., Gries, R., Urdaneta, N., Mirás, B., Badji, C., Jaffe, K., 2001. Sex Pheromone of Tomato Fruit Borer, *Neoleucinodes elegantalis*. **Journal of Chemical Ecology** 27, 2097-2107.
- Callahan, F.E., Vogt, R.G., Tucker, M.L., Dickens, J.C., Mattoo, A.K., 2000. High level expression of "male specific" pheromone binding proteins (PBPs) in the antennae of female noctuid moths. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 30, 507-514.
- Capinera, J.L., 2001. Sugarcane Borer, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae). Featured Creatures. Department of Entomology and Nematology, Division of Plant Industry, Extension Digital Information Source. [http://creatures.ifas.ufl.edu/field/sugarcane\\_borer.htm](http://creatures.ifas.ufl.edu/field/sugarcane_borer.htm), 1-5.
- Cardé, R.T., Elkinton, J.S., 1984. Field trapping with attractants: methods and interpretation, **in**: Hummel, H.E., Miller, T.A. (Eds.), *Techniques in pheromone research*. Springer-Verlag, New York, p. 280.
- Cardé, R.T., Haynes, K.F., 2004. Structure of the pheromone communication channel in moths, **in**: Cardé, R.T., Millar, J.G. (Ed.), *Advances in insect chemical ecology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 283–332.
- Cardé, R.T., Roelofs, W.L., 1973. Temperature modification of the male sex pheromone response and factors affecting female calling in *Holomelina immaculata* (Lepidoptera: Arctiidae). **The Canadian Entomologist** 105, 1505-1512.
- Carney, R.L., Lui, A.S.T., 1982. Insect pheromone. **Chemical Abstracts** 98, 125738b.
- Cenicaña, 1988. Informe anual de Labores. Programa de Agronomía. Centro de investigación de la caña de azúcar, 330p.
- Clark, J., Haynes, K.F., 1990. Sex Attractant for the Bluegrass Webworm (Lepidoptera: Pyralidae) **Journal of Economic Entomology** 83, 856-859.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K.A., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology** 9, 1657-1660.
- Cork, A., Beever, P.S., Hall, D.R., Nesbitt, B.F., Arida, G.S., Mochida, O., 1985. Components of the female sex pheromone of the yellow stem borer, *Scirpophaga incertulas*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 37, 149-153.
- Cork, A., De Souza, K., Krishnaiah, K., Kumar, D.V.S.S.R., Reddy, A.A., Casagrande, E., 1996. Control of yellow stem borer, *Scirpophaga incertulas* (Lepidoptera: Pyralidae) by mating disruption on rice in India: effect of unnatural pheromone blends and application time on efficacy. **Bulletin of Entomological Research** 86, 515-524.
- Cork, A., Lobos, E.A., 2003. Female sex pheromone components of *Helicoverpa gelotopoeon*: first heliothine pheromone without Z-11-hexadecenal. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 107, 201-206.
- Cueva, M.C., Ayquipa, G.A., Mescua, V.B., 1980. Estudios sobre *Apanteles flavipes* (Cameron) introducido para controlar *Diatraea saccharalis* en el Peru. **Revista Peruana Entomologia** 23, 73-76.



- Damberger, F., Nikonova, L., Horst, R., PEng, G., Leal, W.S., Wuthrich, K., 2000. NMR characterization of a pH-dependent equilibrium between two folded solution conformations of the pheromone-binding protein from *Bombyx mori*. **Protein Science** 9, 1038-1041.
- Davis, F.M., Bird, T.G., Knutson, A.E., Ng, S.-S., 1986. Evaluation of Trapping Methods for Southwestern Corn Borer (Lepidoptera: Pyralidae) Using Synthetic Sex Pheromone. **Journal of Economic Entomology** 79, 1385-1389.
- Davis, L.B., Kuehl, W.M., Battey, J.F., 1994. Basic Methods in Molecular Biology, 2 ed. Appleton and Lange, Norwalk, CT.
- Delisle, J., McNeil, J.N., 1987. Calling behaviour and pheromone titre of the true armyworm *Pseudaletia unipuncta* (Haw.) (Lepidoptera: Noctuidae) under different temperature and photoperiodic conditions. **Journal of Insect Physiology** 33, 315-324.
- Delisle, J., Royer, L., 2004. Changes in pheromone titer of oblique-banded leafroller, *Choristoneura rosaceana*, virgin females as a function of time of day, age; temperature. **Journal of Chemical Ecology** 20, 45-46.
- Dossi, F.C.A., Conte, H., Zacaro, A.A., 2009. Histochemical Characterization of the Embryonic Stages in *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Annals of the Entomological Society of America** 99, 1206-1212.
- Du, G., Prestwich, G.D., 1995. Protein Structure Encodes the Ligand Binding Specificity in Pheromone Binding Proteins. **Biochemistry** 34, 8726-8732.
- El-Sayed, A.M., 2006. The Pherobase: Database of Insect Pheromones and Semiochemicals.
- El-Sayed, A.M., Delisle, J., De Lury, N., Gut, L.J., Judd, G.J.R., Legrand, S., Reissig, W.H., Roelofs, W.L., Unelius, C.R., Trimble, R.M., 2003. Geographic Variation in Pheromone Chemistry, Antennal Electrophysiology, and Pheromone-Mediated Trap Catch of North American Populations of the Obliquebanded Leafroller. **Environmental Entomology** 32, 470-476.
- Fan, W.M., Sheng, C.F., Su, J.W., 2003. Electrophysiological and behavioral responses of both sexes of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner to sex pheromones. **Acta Entomologica Sinica** 46, 138-143.
- Feixas, J., Prestwich, G.D., Guerrero, A., 1995. Ligand specificity of pheromone binding proteins of the processionary moth. **European Journal of Biochemistry** 234, 521-526.
- Felsenstein, J., 1981. Confidence limits of phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution** 39, 783-791.
- Ferreira, E., 1998. Insetos prejudiciais ao arroz de terras altas, in: Breseghello, F., Stone, L.F. (Eds.), Tecnologia para o arroz de terras altas. Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, p. 161.
- Ferreira, E., F. Breseghello, Castro, E.d.M.d., Barrigossi, J.A.F., 2001. Broca-do-colmo nos agroecossistemas de arroz do Brasil. **Documentos Embrapa Arroz e Feijão**, Santo Antônio de Goiás 114, 42 p.
- Ferreira, J.T.B., Zarbin, P.H.G., 1998. Amor ao primeiro odor. **Química Nova na Escola** 2, 3-6.

- Field, L.M., Pickett, J.A., Wadhams, L.J., 2000. Molecular studies in insect olfaction. **Insect Molecular Biology** 6, 545-551.
- Gadenne, C., 1993. Effects of fenoxycarb, juvenile hormone mimetic, on female sexual behaviour of the black cutworm, *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Insect Physiology** 39, 25-29.
- Gallo, D., Nakano, O., Silveira-Neto, S., L.Carvalho, R.P., Batista, G.C., Berti-Filho, E., P.Parra., J.R., R. A. Zucchi, Alves, S.B., J.D.Vendramim, 1988. Manual de Entomologia Agrícola. Editora Ceres, São Paulo.
- Gallo, D., Nakano, O., Silveira-Neto, S., L.Carvalho, R.P., Batista, G.C., Berti-Filho, E., P.Parra., J.R., R. A. Zucchi, Alves, S.B., J.D.Vendramim, Marchini, L.C., Lopes, J.R.S., Omoto, C., 2002. Entomologia Agrícola. FEALQ, Piracicaba.
- Gemeno, C., sar, Lutfallah, A.F., Haynes, K.F., 2000. Pheromone Blend Variation and Cross-Attraction Among Populations of the Black Cutworm Moth (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America** 93, 1322-1328.
- Gerber, G.H., Howlader, M.A., 1987. The effects of photoperiod and temperature on calling behaviour and egg development of the bertha armyworm, *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Insect Physiology** 33, 429-436.
- Getchell, T.V., Margolis, F.L., Getchell, M.L., 1984. Perireceptor and receptor events in vertebrate olfaction. **Progress in Neurobiology** 23, 317-345.
- Gibb, A., Suckling, D., Fielder, S., Bunn, B., Jamieson, L., Larsen, M., Walter, G., Kriticos, D., 2008. Major Sex Pheromone Components of the Australian Gum Leaf Skeletonizer *Uraba lugens*: (10E,12Z)-Hexadecadien-1-yl Acetate and (10E,12Z)-Hexadecadien-1-ol. **Journal of Chemical Ecology** 34, 1125-1133.
- Gibb, A.R., Pinese, B., Tenakanai, D., Kawi, A.P., Bunn, B., Ramankutty, P., Suckling, D.M., 2007. (Z)-11-Hexadecenal and (3Z,6Z,9Z)-Tricosatriene:Sex Pheromone Components of the Red Banded Mango Caterpillar *Deanolis sublimbalis*. **Journal of Chemical Ecology** 33, 579-589.
- Gómez, L.A., Lastra, L.A., 1995. Los barrenadores de la caña de azúcar. **Serie Divulgativa, Cenicafía** 6.
- Gómez, V.R.C., Rojas, J.C., 2006. Calling behavior of *Zamagiria dixolophella* (Lepidoptera:Pyralidae). **Florida Entomologist** 89, 83-84.
- Goyes, P.C., Sánchez, F.A., Gomez, L.A., 2008. Caracterización morfológica y molecular de especies de *Diatraea* spp. (Lepidoptera: Crambidae). Informe final joven investigador Colciencias - Cenicafía, 31.
- Gries, R., Dunkelblum, E., Gries, G., Baldilla, F., Hernandez, C., Alvarez, F., Perez, A., Velasoc, J., Oehlschlager, A.C., 1998. Sex pheromone components of *Diatraea considerata* (Heinrich) (Lep., Pyralidae). **Journal of Applied Entomology** 122, 265-268.
- Guevara, L.A.C., Wiendl, 1980. Aspectos da Biologia, em condições de campo, da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794). **Revista Agropecuária Técnica** 1, 32-39.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology** 52, 696-704.

- Gyorgyi, T.K., Roby-Shemkovitz, A.J., Lerner, M.R., 1988. Characterization and cADN cloning of the pheromone binding protein from tobacco hornworm, *Manduca sexta*: A tissue-specific, developmentally regulated protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 85, 9851-9855.
- Hall, T.A., 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series** 40, 413-427.
- Hammond, A.M., Hensley, S.D., 1970. A bioassay for the sex attractant in the sugarcane borer. **Annals of the Entomological Society of America** 63, 64-66.
- Hammond, A.M., Hensley, S.D., 1971. The sugarcane borer sex attractant. **Entomophaga** 16, 159-164.
- Han, E.-N., Gatehouse, A.G., 1991a. Effect of temperature and photoperiod on the calling behaviour of a migratory insect, the oriental armyworm *Mythimna separata*. **Physiological Entomology** 16, 419-427.
- Han, E.N., Gatehouse, A.G., 1991b. The effect of adult feeding on female pre-calling period and ovarian development in a migratory moth, the Oriental armyworm *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin of Entomological Research** 81, 395-400.
- Hansen, K., 1984. Discrimination and Production of Disparlure Enantiomers by the Gypsy Moth and the Nun Moth. **Physiological Entomology** 9, 9-18.
- Hansson, B.S., Carlsson, M.A., Kalinova, B., 2003. Olfactory activation patterns in the antennal lobe of the sphinx moth, *Manduca sexta*. **Journal of Chemical Ecology** 29, 301-308.
- Hansson, B.S., Christensen, T.A., 1999. Functional characteristics of the antennal lobe, in: Hansson, B.S. (Ed.), *Insect Olfaction*. Springer, Berlin, pp. 126-162.
- Hansson, B.S., Tóth, M., Löfstedt, C., Szöcs, G., Subchev, L., Löfqvist, J., 1990. Pheromone variation among eastern european and a western asian population of the turnip moth *Agrotis segetum*. **Journal of Chemical Ecology** 16, 1611-1622.
- Harrison, R.G., 1989. Animal mitochondrial ADN as a genetic marker in population and evolutionary biology. **Trends in Ecology & Evolution** 4, 6-11.
- Hayward, K.J., 1943. A broca da cana de açúcar. Brasil **Açucareiro** 22, 69-74.
- Hedin, P., Davis, F.M., Dickens, J.C., Burks, M.L., Bird, T.G., Knutson, A.E., 1986. Identification of the sex attractant pheromone of the southwestern corn borer *Diatraea grandiosella* Dyar. **Journal of Chemical Ecology** 12, 2051-2053.
- Hillier, N.K., Kleineidam, C., Vickers, N.J., 2005. Physiology and glomerular projections of olfactory receptor neurons on the antenna of female *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) responsive to behaviorally relevant odors. **Journal of Comparative Physiology** A 192, 199-219.
- Hou, M.L., Sheng, C.F., 2000. Calling behaviour of adult female *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lep., Noctuidae) of overwintering generation and effects of mating. **Journal of Applied Entomology** 124, 71-75.

- Huang, Y., Takanashi, T., Hoshizaki, S., Tatsuki, S., Honda, H., Yoshiyashu, Y., Ishikawa, Y., 1998. Geographic variation in sex pheromone of Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*, in Japan. **Journal of Chemical Ecology** 24, 2079-2088.
- Jordan, M.D., Stanley, D., Marshall, S.D.G., Silva, D.D., Crowhurst, R.N., Gleave, A.P., Greenwood, D.R., Newcomb, R.D., 2008. Expressed sequence tags and proteomics of antennae from the tortricid moth, *Epiphyas postvittana*. **Insect Molecular Biology** 17, 361-373.
- Kaissling, K., 1987. Wright Lectures on Insect Olfaction. Simon Fraser University, Burnaby, Canada, pp. 17-32.
- Kaissling, K., 1998. Pheromone deactivation catalyzes by receptor molecules: a quantitative kinetic model. **Chemical Senses** 23, 385-395.
- Kaissling, K., Klein, U., Kramer, J.J.D., Keil, T.A., Kanaujia, S., Hemberger, J., 1985. Insect olfactory cells: electrophysiological and biochemical studies, in: Changeux, J.P., Hucho, F. (Eds.), *Molecular Basis of Nerve Activity*. Walter de Gruyter & Co., Berlin, pp. 173-183.
- Kaissling, K.E., 2001. Olfactory perireceptor and receptor events in moths: a kinetic model. **Chemical Senses** 26, 125-150.
- Kaissling, K.E., 2004. Physiology of pheromone reception in insects (an example of moths). **Anir** 6, 73-91.
- Kalinová, B., Hoskovec, M., Liblikas, I., Unelius, C.R., 2001. Detection of Sex Pheromone Components in *Manduca sexta* (L.). **Chemical Senses** 26, 1175-1186.
- Kalinová, B., Kindl, J., Hovorka, O., Hoskovec, M., Svato, A., 2005. (11Z)-hexadec-11-enal enhances the attractiveness of *Diatraea saccharalis* main pheromone component in wind tunnel experiments. **Journal of Applied Entomology** 129, 70-74.
- Karlson, P., Luscher, M., 1959. A new term for a class of biologically active substances. **Nature** 183, 55-56.
- Kawazu, K., Adati, T., Yoshiyasu, Y., Sumiartha, K., Susila, W., Sudiarta, P., Purwanto, H., Tatsuki, S., 2009. Sex pheromone components of the rice leaffolder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Crambidae), in Indonesia. **Journal of Asia-Pacific Entomology** 12, 97-99.
- Kawazu, K., Hasegawa, J., Honda, H., Ishikawa, Y., Wakamura, S., Sugie, H., Kamiwada, H., Kamimuro, T., Yoshiyasu, Y., Tatsuki, S., 2000. Geographical variation in female sex pheromones of the rice leaffolder moth, *Cnaphalocrocis medinalis*: identification of pheromone components in Japan. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 96, 103-109.
- Kawazu, K., Honda, H., Nakamura, S., Adati, T., 2007. Identification of Sex Pheromone Components of the Box Tree Pyralid, *Glyphodes perspectalis*. **Journal of Chemical Ecology** 33, 1978-1985.
- King, H., Conlong, D.E., Mitchell, A., 2002. Genetic differentiation in *Eldana saccharina* (Lepidoptera: Pyralidae) evidence from mitochondrial cytochrome oxidase I and II genes. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association** 76, 321-328.

- Kinjo, K., Arakaki, N., 1997. Mating behavior of the cotton caterpillar, *Diaphania indica* (Saunders) (Lepidoptera: Pyralidae). **Applied Entomology and Zoology** 32, 641-644.
- Klun, J.A., Chapman, O., Mattes, K., Wojtkowski, P., Beroza, M., Sonnet, P., 1973. Insect sex pheromones: Minor amount of opposite geometrical isomer critical to attraction. **Science** 181, 661-663.
- Klun, J.A., Cooperators, 1975. Insect sex pheromones: intraspecific pheromonal variability of *Ostrinia nubilalis* in North America and Europe. **Environmental Entomology** 4, 891-894.
- Klusák, V., Havlas, Z., Rulísek, L., Vondrásek, J., Svatos, A., 2003. Sexual Attraction in the Silkworm Moth: Nature of Binding of Bombykol in Pheromone Binding Protein--An Ab Initio Study. **Chemistry & Biology** 10, 331-340.
- Knutson, A.E., Davis, F.M., Bird, T.G., Morrison, W.P., 1987. Monitoring southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella* Dyar with pheromone traps. **Southwestern Entomologist** 12, 65-71.
- Konno, Y., Honda, H., Matsumoto, Y., 1980. Observation on the mating behavior and bioassay for the sex pheromone of the yellow peach moth, *Dichocrocis punctiferalis* Guenée (Lepidoptera: Pyralidae). **Applied Entomology and Zoology** 15, 321-327.
- Konstantopoulou, M.A., Pratsinis, H., Kletsas, D., Mazomenos, B.E., 2006. Pheromone-binding protein and general odorant-binding protein of *Sesamia nonagrioides*: sex- and diel-dependent expression. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 119, 129-136.
- Kowcun, A., Honson, N., Plettner, E., 2001. Olfaction in the gypsy moth, *Lymantria dispar*: effect of pH, ionic strength, and reductants on pheromone transport by pheromone-binding proteins. **Journal of Biological Chemistry**. 276, 44770-44776.
- Krieger, J., Mamei, M., Breer, H., 1997. Elements of the olfactory signaling pathways in insect antennae. **Invertebrate Neuroscience** 3, 137-144.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature** 227, 680-685.
- Lambert, D.M., Michaux, B., White, C.S., 1987. Are species self-defining? . **Systematic Zoology** 36, 196-205.
- Lange, C.L., Scott, K.G., Graham, G.G., Sallam, M.N., Allsopp, P.G., 2004. Sugarcane moth borers (Lepidoptera: Noctuidae and Pyraloidea): phylogenetics constructed using COII and 16S mitochondrial partial gene sequences. **Bulletin of Entomological Research** 94, 457-464.
- Lastra, B.L.A., Gómez, L.A., 2006. La cría de *Diatraea saccharalis* (F.) para la producción masiva de sus enemigos naturales. **Serie Técnica Cenicña** 36.
- Laue, M., Steinbrecht, R.A., Ziegelberger, G., 1994. Immunocytochemical localization of general odorant-binding protein in olfactory sensilla of the silkworm *Antheraea polyphemus*. **Naturwissenschaften** 81, 178-180.
- Leal, W.S., 2005. Pheromone Reception. **Topics in Current Chemistry** 240, 1-36.

- Leslie, G., 2007. Pest of Sugarcane, **in**: Glyn, J. (Ed.), World Agriculture Series. Sugarcane, 2 ed. Blackwell Science, Ames IA, USA, p. 216.
- Lima-Filho, M., Lima, J.O.G.d., 2001. Massas de Ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Pyralidae) em Cana-de-Açúcar: Número de Ovos e Porcentagem de Parasitismo por *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em Condições Naturais. **Neotropical Entomology** 30, 483-488.
- Lima, E.R., Vilela, E.F., Sanchez, G.R., 1998. Avaliação do comportamento reprodutivo e do feromônio sexual sintético de *Mocis latipes* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** 27, 9-20.
- 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. **Annals of the Entomological Society of America** 70, 161-167.
- Linn, C.E., Jr, Roelofs, W.L., 1989. Response specificity of male moths to multicomponent pheromones. **Chemical Senses** 14, 421-437.
- Linn, C.E., JR., Campbell, M.G., Roelofs, W.L., 1987. Pheromone Components and Active Spaces: What Do Moths Smell and Where Do They Smell It? **Science** 237, 650-652.
- Linn, C.E., Roelofs, W.L., 1995. Pheromone communication in the moths and its role in the speciation process. Johns Hopkins University Press., Baltimore and London.
- Liu, M., Tian, Y., Li, Y., 1994. Identification of minor components of the sex pheromone of yellow peach moth *Dichorocis punctifealis* guenee, and field trials. **Insect Science** 1, 150-155.
- Ljungberg, H., Anderson, P., Hansson, B.S., 1993. Physiology and morphology of pheromone-specific sensilla on the antennae of male and female *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Insect Physiology** 39, 253-260.
- Löfstedt, C., 1990. Population variation and genetic control of pheromone communication systems in moths. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 54, 199-218.
- Löfstedt, C., 1991. Evolution of moth pheromones, **in**: Hrady, L. (Ed.), Insect Chemical Ecology. Academia, Praha, pp. 57-73.
- Löfstedt, C., 1993. Moth pheromone genetics and evolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London** 340, 167-177.
- Löfstedt, C., Bergmann, J., Francke, W., Jirle, E., Hansson, B.S., Ivanov, V.D., 2008. Identification of a Sex Pheromone Produced by Sternal Glands in Females of the Caddisfly *Molanna angustata* Curtis. **Journal of Chemical Ecology** 34, 220-228.
- Long, W.H., Hensley, S.D., 1972. Insect pests of sugarcane. **Annual Review of Entomology** 17, 149-176.
- Macedo, N., 2000. Método de criação do parasitóide *Cotesia flavipes* (Cameron, 1981), **in**: Bueno, V.H.P. (Ed.), Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade. UFLA, Lavras, pp. 161-166 e 172.
- Macedo, N., Botelho, P.S.M., 1988. Controle integrado da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabr.,1794) (Lepidoptera: Pyralidae). **Açucareiro** 160, 2-14.

- Maddison, D.R., Maddison, W.P., 2005. MacClade 4: Analysis of phylogeny and character evolution. Version 4.08. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Mafra-Neto, A., Cardé, R.T., 1995. Influence of plume structure and pheromone concentration on upwind flight of *Cadra cautella* males. **Physiological Entomology** 20, 117-133.
- Maibèche-Coisné, M., Jacquin-Joly, E., François, M.-C., Nagnan-Le Meillour, P., 1998. Molecular cloning of two pheromone binding proteins in the cabbage armyworm *Mamestra brassicae*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 28, 815-818.
- Maibèche-Coisné, M., Sobrio, F., Delaunay, T., Lettère, M., Dubroca, J., Jacquin-Joly, E., Meillour, P.N.-L., 1997. Pheromone binding proteins of the moth *Mamestra brassicae*: Specificity of ligand binding. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 27, 213-221.
- Maida, R., Ziegelberger, G., Kaissling, K.E., 2003. Ligand binding to six recombinant pheromone binding proteins of *Antheraea polyphemus* and *Antheraea pernyi*. **Journal of comparative physiology**. B 173, 565-573.
- Mazo-Cancino, A.d., Malo, E.A., Cruz-López, L., Rojas, J.C., 2004. Diel periodicity and influence of age and mating on female sex pheromone titre in *Estigmene acrea* (Lep., Arctiidae). **Journal of Applied Entomology** 128, 459-463.
- McElfresh, J.S., Hammond, A.M., Millar, J.G., 2001. Sex Pheromone Components of the Buck Moth *Hemileuca maia*. **Journal of Chemical Ecology** 27, 1409-1422.
- McElfresh, J.S., Millar, J.G., 2001. Geographic variation in the pheromone system of the Saturniid moth *Hemileuca eglanterina*. **Ecology** 82, 3505-3518.
- McNeil, J.N., 1991. Behavioral Ecology of Pheromone-Mediated Communication in Moths and its Importance in the use of Pheromone Traps. **Annual Review of Entomology** 36, 407-430.
- Meillour, P.N.-L., Huet, J.C., Maibeche, M., Pernollet, J.C., Descoins, C., 1996. Purification and characterization of multiple forms of odorant/pheromone binding proteins in the antennae of *Mamestra brassicae* (Noctuidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 26, 59-67.
- Moré, M., Trumper, E.V., Prola, M.J., 2003. Influence of corn, *Zea mays*, phenological stages in *Diatraea saccharalis* F. (Lep. Crambidae) oviposition. **Journal of Applied Entomology** 127, 512-515.
- Moritz, C., Dowling, T.E., Brown, W.M., 1987. Evolution of Animal Mitochondrial ADN: Relevance for Population Biology and Systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics** 18, 269-292.
- Novak, K., 1967. Contribución a la bionomía de *Diatraea saccharalis* (Fabricius). **Poeyana** 44, 7.
- Orlando-Filho, J., Macedo, N., Tokshi, H., 1994. Seja doutor do seu canavial. **Arquivo do Agrônomo** 6, 1-17.
- Palacio Cortés, A.M., Zarbin, P.H.G., Takiya, D.M., Bento, J.M.S., Guidolin, A.S., Consoli, F.L., 2010. Geographic variation of sex pheromone and mitochondrial ADN in *Diatraea saccharalis* (Fab., 1794) (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Insect Physiology** 56, 1624-30.

- Palaniswamy, P., Seabrool, D.W., 1985. The alteration of calling behaviour by female *Choristoneura fumiferana* when exposed to synthetic sex pheromone. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 37, 13-16.
- Pallini, A., Venzon, M., Janssen, A., 2001. Infoquímicos de ácaros mediando interações em teias alimentares, **in**: Vilela, E.F., Lucia, T.M.C.D. (Eds.), Feromônios de insetos: biologia, química e aplicação. Holos, Riberão Preto, pp. 113-120.
- Parra, J.R., 1993. Controle das principais pragas de cana-de-açúcar, **in**: Câmara, G.M.S., Oliveira, A.M. (Eds.), Produção da cana-de-açúcar. FEALQ, Piracicaba, pp. 184-197.
- Parra, J.R.P., Mishfeldt, L.J., 1992. Comparison of artificial diets for rearing the sugarcane borer, **in**: Anderson, T.E., Leppla, N.C. (Eds.), Advances in Insect Rearing for Research and Pest Management. Westview Press, Boulder, CO, pp. 195-209.
- Pastrana, C.E., Gomez, L.A., Zuluaga, I., 1993. Ciclo de vida de *Diatraea indigenella* bajo varios regímenes alimenticios. **Revista Colombiana de Entomologia** 19, 101-106.
- Patrick, J.C., Hensley, S.D., 1970. Recapture of males released at different distances from trap baited with virgin female sugarcane borer. **Journal of Economic Entomology** 63, 1341-1342.
- Peairs, F.B., Saunders, J.L., 1980. *Diatraea lineolata* y *D. saccharalis*; Una Revision en Relación con el Maiz. **Agronomia Costarricense** 4, 123-135.
- Pelosi, P., Calvello, M., Ban, L.P., 2005. Diversity of Odorant-binding Proteins and Chemosensory Proteins in Insects. **Chemical Senses** 30, i291-i292.
- Pelosi, P., Maida, R., 1995. Odorant-binding proteins in insects. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology** 1113, 503-514.
- Pelosi, P., Zhou, J.J., Ban, I., Calvello, M., 2006. Soluble proteins in insect chemical communication. **Cellular and Molecular Life Sciences** 63, 1658-1676.
- Percy-Cunningham, J.E., MacDonald, J.A., 1987. Biology and ultrastructure of sex pheromone-producing glands, **in**: Blomquist, G.J., Prestwich, G.D. (Eds.), Pheromone Biochemistry. Academic Press, Orlando Florida, pp. 25-75.
- Perez, R., Hensley, S.D., 1973. A comparison of pheromone and black-light traps for attracting sugarcane borer *Diatraea saccharalis* F. adults from a natural population. **Journal de Agricultura de la Universidad de Puerto Rico** 57, 320-329
- Perez, R., Long, W.H., 1964. Sex attractant and mating behaviour in the sugarcane borer. **Journal of Economic Entomology** 57, 1341-1342.
- Picimbon, J.F., Gadenne, C., 2002. Evolution of noctuid pheromone binding proteins: identification of PBP in the black cutworm moth, *Agrotis ipsilon*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 32, 839-846.
- Plettner, E., Lazar, J., Prestwich, E.G., Prestwich, G.D., 2000. Discrimination of Pheromone Enantiomers by Two Pheromone Binding Proteins from the Gypsy Moth *Lymantria dispar*. **Biochemistry** 39, 8953-8962.



- Posada, D., 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evolution** 25, 1253-1256.
- Prestwich, G., 1987. Chemistry of pheromone and hormone metabolism in insects. **Science** 237, 999-1006.
- Prestwich, G., Du, G., Laforest, S., 1995. How is pheromone specificity encoded in proteins. **Chemical Senses** 20, 461-469.
- Raina, A.K., Klun, J.A., Schwarz, M., Day, A., Leonhardt, B.A., Douglass, L.W., 1986. Female sex pheromone of the melonworm, *Diaphania hyalinata* (Lepidoptera: Pyralidae), and analysis of male responses to pheromone in a flight tunnel. **Journal of Chemical Ecology** 12, 229-237.
- Raming, K., Krieger, J., Breer, H., 1989. Molecular cloning of an insect pheromone-binding protein. **FEBS Letters** 256, 215-218.
- Raming, K., Krieger, J., Breer, H., 1990. Primary structure of a pheromone-binding protein from *Antheraea pernyi*: homologies with other ligand-carrying proteins. **Journal of Comparative Physiology, B** 160, 503-509.
- Rice, W.R., 1987. Speciation via habitat specialization. **Evolutionary Ecology** 1, 301-314.
- Roelofs, W., Rooney, A.P., 2003. Molecular genetics and evolution of pheromone biosynthesis in Lepidoptera. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 100, 9179-9184.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics** 19, 1572-1574.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sambrook, J., Russel, D.W., 2001. Molecular Cloning, 3 ed. Cold spring Harbor Laboratory, New York.
- Sandler, B.H., Clardy, J., Nikonova, L., Leal, W.S., 2000. Sexual attraction in the silkworm moth: Structure of the pheromone-binding-protein-bombykol complex. **Chemistry & Biology** 7, 143-151.
- Schneider, D., 1970. Olfactory receptors for the sexual attractant (Bombykol) of the silk moth, The neurosciences: second study program. Rockefeller University, New York, pp. 511-518.
- Schneider, D., Schulz, S., Priesner, E., Ziesmann, J., Francke, W., 1998. Autodetection and chemistry of female and male pheromone in both sexes of the tiger moth *Panaxia quadripunctaria*. **Journal of Comparative Physiology. A** 182, 153-161.
- Seol, K.Y., Honda, H., Matsumoto, Y., 1986. Mating behavior and the sex pheromone of the lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyoalis* Walker (Lepidoptera:Pyralidae). **Applied Entomology and Zoology** 21, 228-235.
- Serra, G., Trumper, E., 2006. Estimación de incidencia de daños provocados por larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) en tallos de maíz mediante evaluación de signos externos de infestación. **Agriscientia** 23, 1-7.

- Sharma, H.C., 1993. Host-plant resistance to insects in sorghum and its role in integrated pest management. **Crop Protection** 12, 11-34.
- Shimizu, N., Kuwahara, Y., 2009. Female sex pheromone of a Japanese population of allium leafminer, *Acrolepiopsis sapporensis* (Lepidoptera: Acrolepiidae). **Journal of Pesticide Science** 34, 181-183.
- Silva, E.L.d., Carvalho, C.M.d., Nascimento, R.R.d., Mendonça, A.L., Silva, C.E.d., Gonçalves, G.B., Freitas, M.d.R.T.d., Sant'Ana, A.E.G., 2006. Reproductive Behaviour of the *Annona* Fruit Borer, *Cerconota anonella*. **Ethology** 112, 971-976.
- Simon, C., F., Frati, A., Beckenbach, B., B Crespi, H., Liu, F., Flook, P., 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved PCR primers. **Annals of the Entomological Society of America** 87, 651-701.
- Sorenson, C.E., Kennedy, G.G., Duyn, V.W., Bradley Jr, J.R., Walgenbach, J.F, 1992. Geographical variation in pheromone response of European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, in North Carolina. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 64, 177-185.
- Sperling, F.A.H., Hickey, D.A., 1994. Mitochondrial ADN sequence variation in the spruce budworm species complex (Choristoneutra: Lepidoptera). **Molecular Biology and Evolution** 11, 656-665.
- Sperling, F.A.H., Raske, A.G., Otvos, I.S., 1999. Mitochondrial ADN sequence variation among populations and host races of *Lambdina fiscellaria* (Gn.) (Lepidoptera: Geometridae). **Insect Molecular Biology** 8, 97-106.
- Steinbrecht, R.A., 1997. Pore structures in insect olfactory sensilla: A review of data and concepts. **International Journal of Insect Morphology and Embryology** 26, 229-245.
- Steinbrecht, R.A., 1999. Olfactory receptors, **in**: Eguchi, E., Tominaga, Y. (Eds.), Atlas of arthropod sensory receptors. Springer-Verlag, Tokyo, pp. 156-176.
- Steinbrecht, R.A., Laue, M., Ziegelberger, G., 1995. Immunolocalization of pheromone-binding protein and general odorant-binding protein in olfactory sensilla of the silk moths *Antheraea* and *Bombyx*. **Cell and Tissue Research** 282, 203-217.
- Stengl, M., Ziegelberger, G., Boekhoff, I., Krieger, J., 1999. Perioreceptor events and transduction mechanism in insect olfaction, **in**: Hansson, B.S. (Ed.), Insect Olfaction. Springer, Berlin, pp. 50-66.
- Strausfeld, N.J., Hildebrand, J.G., 1999. Olfactory systems: common design, uncommon origins? **Current Opinion in Neurobiology** 9, 634-639.
- Struble, D.L., Heinrich, A., 1984. Combined gas chromatography and eletroantennogram recording of insect ofactoryresponses, **in**: Hummel, H.E., Miller, T.A. (Eds.), Techniques in pheromone research. Springer-Verlag, New York, pp. 161-178.
- Sunnucks, P., Hales, D.F., 1996. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus Sitobion (Hemiptera: Aphididae). **Molecular Biology and Evolution** 13, 510-524.

- Svatos, A., Kalinová, B., Hoskovec, M., Kindl, J., Hovorka, O., Hrdý, I., 1999. Identification of a new lepidopteran sex pheromone in picogram quantities using an antennal biodetector: (8E,10Z)-tetradeca-8,10-dienal from *Cameraria ohridella*. **Tetrahedron Letters** 40, 7011-7014.
- Svatoš, A., Kalinová, B., Kindl, J., Kuldova, J., Hovorka, O., do Nascimento, R.R., Oldham, N.J., 2001. Chemical characterization and synthesis of the major component of the sex pheromone of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications** 66, 1682-1690.
- Swofford, D.L., 2000. PAUP\* Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Sinauer, Sunderland.
- Tamaki, Y., 1977. Chemical Control of Insect Behavior, Theory, and Application. Wiley-Interscience, New York.
- Tamaki, Y., 1985. Sex Pheromones, **in**: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Ed.), Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Pergamon Press, Oxford, pp. 145–191.
- Tegoni, M., Campanacci, V., Cambillau, C., 2004. Structural aspects of sexual attraction and chemical communication in insects. **Trends in Biochemical Sciences** 29, 257-264.
- Templeton, A.R., Crandall, K.A., Sing, C.F., 1992. A Cladistic Analysis of Phenotypic Associations With Haplotypes Inferred From Restriction Endonuclease Mapping and ADN Sequence Data. **Genetics** 132, 619-633.
- Templeton, A.T., 1980. The theory of speciation via the founder principle. **Genetics** 94, 1011-1038.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Symposium Series** 25, 4876-4882.
- Todd, J.L., Baker, T.C., 1993. Response of single antennal neurons of female cabbage loopers to behaviorally active attractants. **Naturwissenschaften** 80, 183-186.
- Turgeon, J., McNeil, J., 1982. Calling behaviour of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 31, 402-408.
- Turgeon, J.J., McNeil, J.N., 1983. Modifications in the calling behavior of *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) induced by temperature conditions during pupal and adult development **The Canadian Entomologist** 115, 1015-1022.
- Vargas, G.A., Gómez, L.A., 2005. Evaluación del daño causado por *Diatraea* spp. En caña de azúcar y su manejo en el valle del río Cauca. **Serie Divulgativa, Cenicaña** 9.
- Vilela, E.F., Lucia, T.M.C.D., 2001. Introdução aos semioquímicos e terminologia, **in**: Vilela, E.F., Lucia, T.M.C.D. (Eds.), Feromônios de insetos: biologia, química e aplicação. Holos, Riberão Preto, pp. 9-12.
- Vogt, R., Kohne, A., Dubnau, J., Prestwich, G., 1989. Expression of pheromone binding proteins during antennal development in the gypsy moth *Lymantria dispar*. **Journal of Neuroscience** 9, 3332-3346.

- Vogt, R.G., 1987. The molecular basis of pheromone reception: its influence on behavior, **in**: Prestwich, G., Blomquist, G. (Eds.), *Pheromone Biochemistry*. Academic Press, New York, pp. 385-431.
- Vogt, R.G., 2003. Biochemical diversity of odor detection: OBPs, ODEs and SNMPs, **in**: Bloomquist, G., Vogt, R. (Eds.), *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier, London, pp. 391-445.
- Vogt, R.G., 2005. Molecular basis of pheromone detection in insects, **in**: Gilbert, L.I., Iatro, K., Gill, S. (Eds.), *Comprehensive insect physiology, biochemistry, pharmacology and molecular biology*. Elsevier, London.
- Vogt, R.G., Prestwich, G.D., Lerner, M.R., 1991. Odorant-binding-protein subfamilies associate with distinct classes of olfactory receptor neurons in insects. **Journal of Neurobiology** 22, 74-84.
- Vogt, R.G., Riddiford, L.M., 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. **Nature** 293, 161-163.
- Vogt, R.G., Riddiford, L.M., Prestwich, G.D., 1985. Kinetic properties of a pheromone degrading enzyme: the sensillar esterase of *Antheraea polyphemus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 82, 8827-8831.
- Vogt, R.G., Rogers, M.E., Franco, M.-d., Sun, M., 2002. A comparative study of odorant binding protein genes: differential expression of the PBP1-GOBP2 gene cluster in *Manduca sexta* (Lepidoptera) and the organization of OBP genes in *Drosophila melanogaster* (Diptera). **Journal of Experimental Biology** 205, 719-744.
- Vogt, R.G., Rybczynski, R., Cruz, M., Lerner, M.R., 1993. Ecdysteroid regulation of olfactory protein expression in the developing antenna of the tobacco hawk moth, *Manduca sexta*. **Journal of Neurobiology** 24, 581-597.
- Vogt, W.G., Walker, J.M., 1987. Potential and realised fecundity in the bush fly, *Musca vetustissima* under favourable and unfavourable protein-feeding regimes. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 44, 115-122.
- Wakamura, S., Arakaki, N., 2004. Sex pheromone components of pyralid moths *Terastia subjectalis* and *Agathodes ostentalis* feeding on the coral tree, *Erithrina variegata*: Two sympatric species share common components in different ratios. **Chemoecology** 14, 181-185.
- Wakamura, S., Tanaka, A., Yasuda, K., Yasuda, T., 2001. Sex pheromone of *Acrolepiopsis nagaimo* Yasuda (Lepidoptera: Acrolepiidae), a predominant leafminer on Chinese yam in Tottori Prefecture: identification and field attraction. **Applied Entomology and Zoology** 36, 71-76.
- Walker, W.D., 1965. Bionomics of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (fab.) I. A description of the mating behaviour. **Proceedings of the Entomological Society of Washington** 67, 80-83.
- Waquil, J.M., Rodrigues, J.A.S., Santos, F.G., Ferreira, A.S., Vilella, F.M.F., Foster, J.E., 2001. Resistance of Commercial Hybrids and Lines of Sorghum, *Sorghum bicolor* (L.) Moench., to *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Pyralidae). **Neotropical Entomology** 30, 661-668.

- Webster, R.P., Cardé, R.T., 1982. Relationships among pheromone titre, calling and age in the omnivorous leafroller moth (*Platynota stultana*). **Journal of Insect Physiology** 28, 925-933.
- White, C.S., Lambert, D.M., Foster, S.P., 1995. Chemical signals and the recognition concept, **in**: Lamberte, D.H., Spencer, H.G (Ed.), *Speciation and the Recognition Concept: Theory and Application*. Johns Hopkins University Press, Baltimore and London.
- White, M.R., Amborski, R.L., Hammond, A.M., Amborski, G.F., 1972. Organ culture of the terminal abdominal segment of an adult female lepidopteron. **In Vitro** 8, 30-36.
- Wille, J.E., 1952. Insectos que atacan a la caña de azúcar. **Entomologia agrícola del Peru**, 137-153.
- William, J.R., Metcalfe Jr., M., R.W., Mathes, R., 1969. *Pests of Sugar Cane*. Elseiver Publications, New York.
- Wilson, A.C., Cann, R.L., Carr, S.M., George, M., Gyllensten, U.B., Helm-Bychowski, K.M., Higuchi, R.G., Palumbi, S.R., Prager, E.M., Sage, R.D., Stoneking, M., 1985. Mitochondrial ADN and two perspectives on evolutionary genetics. **Biological Journal of the Linnean Society** 26, 375-400.
- Wojtasek, H., Leal, W.S., 1999. Conformational change in the pheromone-binding protein from *Bombyx mori* induced by pH and by interaction with membranes. **Journal of Biological Chemistry** 274, 30950-30956.
- Xiu, W., Zhou, Y.Z., Dong, S.L., 2008. Molecular Characterization and Expression Pattern of Two Pheromone-Binding Proteins from *Spodoptera litura* (Fabricius). **Journal of Chemical Ecology** 34, 487-498.
- Yamamoto, M., Kamata, T., Do, N.D., Adachi, Y., Kinjo, M., Ando, T., 2007. A Novel Lepidopteran Sex Pheromone Produced by Females of a Lithosiinae Species, *Lyclene dharma dharma*, in the Family of Arctiidae. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** 71, 2860-2863.
- Yang, C.Y., Jung, J.K., Han, K.S., Boo, K.S., Yiem, M.S., 2002. Sex Pheromone Composition and Monitoring of the Oriental Fruit Moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) in Naju Pear Orchards. **Journal of Asia-Pacific Entomology** 5, 201-207.
- Yang, C.Y., Lee, S., Choi, K.S., Jeon, H.Y., Boo, K.S., 2007. Sex pheromone production and response in Korean populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 124, 293-298.
- Yu-yong, X., Mao-fa, Y., Zi-zhong, L., 2009. Sex Pheromone Components of the Female Black Cutworm Moth in China: Identification and Field Trials. **Zoological Research** 30, 59-64.
- Zarbin, P.G., Princival, J.L., Lima, E.R.d., Santos, A.A.d., Ambrogi, B.G., Oliveira, A.R.M., 2004. Unsymmetrical double Wittig olefination on the syntheses of insect pheromones. Part 1: Synthesis of 5,9-dimethylpentadecane, the sexual pheromone of *Leucoptera coffeella*. **Tetrahedron Letters** 45, 239-241.

- Zarbin, P.H.G., Lorini, L.M., Ambrogi, B.G., Vidal, D.M., Lima, E.R., 2007. Sex Pheromone of *Lonomia obliqua*: Daily Rhythm of Production, Identification, and Synthesis. **Journal of Chemical Ecology** 33, 555–565.
- Zhang, S.-g., Maida, R., Steinbrecht, R.A., 2001. Immunolocalization of Odorant-binding Proteins in Noctuid Moths (Insecta, Lepidoptera). **Chemical Senses** 26, 885-896.
- Ziegelberger, G., 1996. The multiple role of the pheromone-binding protein in olfactory transduction, in: Bock, G.R., Cardew, G. (Eds.), **Olfaction in Mosquito-Host Interaction**. Wiley, Chichester, pp. 267-275.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.