

CAMILA BORGES DA CRUZ MARTINS

Semioquímicos envolvidos nas interações intra e interespecíficas de
Oryzophagus oryzae (Lima, 1936) (Coleoptera: Curculionidae) e
Thaumastocoris peregrinus Carpintero & Dellapé, 2006
(Heteroptera: Thaumastocoridae)

CURITIBA

2013

CAMILA BORGES DA CRUZ MARTINS

Semioquímicos envolvidos nas interações intra e interespecíficas de
Oryzophagus oryzae (Lima, 1936) (Coleoptera: Curculionidae) e
Thaumastocoris peregrinus Carpintero & Dellapé, 2006
(Heteroptera: Thaumastocoridae)

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção
do grau de Doutor em Ciências, no Curso de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas, Área de
Concentração em Entomologia, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Dr. Paulo H. Gorgatti Zarbin

Co-orientador: Dra. Lúcia Massutti de Almeida

CURITIBA

2013

CAMILA BORGES DA CRUZ MARTINS

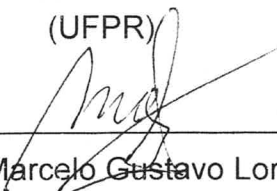
“SEMIOQUÍMICOS ENVOLVIDOS NAS INTERAÇÕES INTRA E INTERESPECÍFICAS DE
ORYZOPHAGUS ORYZAE (LIMA, 1936) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) E
THAUMASTOCORIS PEREGRINUS CARPINTERO & DELLAPÉ, 2006 (HETEROPTERA:
THAUMASTOCORIDAE)”

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



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

(UFPR)



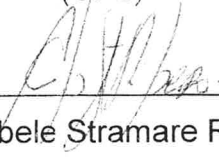
Prof. Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo

(FIOCRUZ)



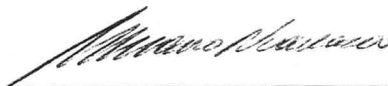
Profa. Dra. Bianca Giuliano Ambrogi

(UFS)



Profa. Dra. Cibele Stramare Ribeiro-Costa

(UFPR)



Prof. Dr. Mário Antonio Navarro da Silva

(UFPR)

Curitiba, 21 de fevereiro de 2013.

“O homem moderno, conquistador de micro e macro universos, tem enigmas interiores indecifráveis que sua Ciência não consegue resolver.” Mestre Arashamanan – Caboclo Urubatão da Guia

“Não fosse a concorrência de tantas forças tão reiteradamente exercidas tantas vezes em tantos lugares contribuindo para a derrocada espiritual do homem, nosso mundo poderia contar com a presença de centenas ou pelo menos dezenas (e tudo já seria muito diferente!) de Platões, de Einsteins, de Beethovens, de Arhapiaghas e tantas almas excelentes e grandiosas que, heroicamente, venceram e continuarão vencendo, bravamente, a violenta autoridade da estreiteza e da vulgaridade, mediante o emprego da eterna e intransigente irresignação que têm em relação à miséria espiritual e ao sofrimento humano. Educação espiritual - a cultura por excelência! - é, no entanto, coisa rara.” Thomé Sabbag Neto (Itarayara)

DEDICO

Aos meus pais, Thais, Máximo e Venancio, e a minha avó, Edith, que sempre me apoiaram e me incentivaram.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Paraná e ao Departamento de Entomologia pela oportunidade de realização do Doutorado.

Ao Prof. Dr. Paulo H. Gorgatti Zarbin e a Profa. Dra. Lúcia Massutti de Almeida pela orientação e amizade.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado e a CAPES pela concessão da bolsa sanduíche.

A Dra. Monika Hilker pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e pelo desafio de viver em outro país.

Ao Dr. Leonardo Barbosa (Embrapa Florestas) pelos insetos, informações sobre o comportamento de *T. peregrinus*, colaboração e dedicação.

Ao Dr. Eduardo Hickel (Epagri – SC) pelo envio de *O. oryzae* e pelos ensinamentos.

A Dra. Renata Morelli e ao Dr. Maurício Osvaldo Moura pelo auxílio com as análises estatísticas.

Aos amigos do laboratório de Semioquímicos e do Laboratório de Sistemática e Bioecologia de Coleoptera.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná pelas micrografias eletrônicas.

A Rede Paranaense de Coleções Biológicas da Universidade Federal do Paraná pelas fotos

A Dra. Mirian Morales pela ilustração de *Oryzophagus oryzae*.

A minha família e amigos, pelo apoio e incentivo, e por compreenderem a minha ausência em finais de semana e feriados.

Semioquímicos envolvidos nas interações intra e interespecíficas de *Oryzophagus oryzae* (Lima, 1936) (Coleoptera: Curculionidae) e *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Heteroptera: Thaumastocoridae)

Resumo

Além de sinais táteis, visuais e auditivos os insetos utilizam semioquímicos, ou sinais químicos, na mediação de diversos tipos de interação entre indivíduos da mesma espécie e de espécies diferentes. A comunicação entre insetos de mesma espécie é realizada através de semioquímicos chamados de feromônios, que podem ser classificados dependendo da função que exercem, por exemplo, sexual ou de agregação. A mediação química entre seres vivos de espécies diferentes ocorre através de substâncias químicas chamadas de aleloquímicos. Eles são classificados de acordo com a espécie que se beneficia com o sinal emitido, o emissor ou o receptor. Todos esses compostos são estudados pela Ecologia Química, disciplina que busca conhecer os mecanismos da comunicação química entre os seres vivos através da identificação dos compostos químicos envolvidos. Além disso, por causarem mudanças no comportamento das espécies, os semioquímicos são cada vez mais estudados com o objetivo de manipular espécies-pragas e inimigos naturais na agricultura. Neste contexto, foram estudados os insetos-praga *Oryzophagus oryzae* e *Thaumastocoris peregrinus*. Para a primeira espécie, praga de plantações de arroz irrigado, investigou-se aspectos comportamentais em busca do horário da atividade sexual e da sequência de comportamentos pré-cópula. Em seguida, realizaram-se diferentes técnicas de extração de semioquímicos (Capítulo 1). No Capítulo 2, investigou-se os aspectos morfológicos relacionados à atividade aquática de *O. oryzae*. Já o percevejo-bronzeado-do-eucalipto, *T. peregrinus*, praga de plantações de *Eucalyptus* spp., foi estudado com o objetivo de detectar e identificar os compostos químicos produzidos e emitidos por ninfas e adultos (Capítulo 3), além de investigar os compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por *Eucalyptus benthamii*, testando o efeito da alimentação de *T. peregrinus* e do dano mecânico, visando entender a relação inseto-planta (Capítulo 4).

Palavras-chave: comportamento de cópula, comportamento de natação, ecologia química, extração de corpo, compostos orgânicos voláteis (COVs).

Semiochemicals involved in the intra and interspecific interactions of *Oryzophagus oryzae* (Lima, 1936) (Coleoptera: Curculionidae) and *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Heteroptera: Thaumastocoridae)

Abstract

Besides tactile, visual and sound signals, insects use semiochemicals or chemical signals to mediate different types of interactions among conspecifics or interspecifics. The communication among insects of the same species is accomplished with semiochemicals called pheromones, which can be classified depending on their function, for example, sexual or for aggregation. The chemical interaction among different species is accomplished with semiochemicals called allelochemicals and they are classified according to whom benefits from the emitted signal, the emitter or the receptor. All compounds mentioned above are studied by Chemical Ecology, a discipline that aims to explain the mechanisms of chemical communication among all living organisms, through the identification of chemicals involved. Thus, because semiochemicals cause behavioral changes of target species, they are constantly studied to manipulate agricultural pests and their natural enemies. In this context, were studied the pest species *Oryzophagus oryzae* and *Thaumastocoris peregrinus*. For the first species, a pest of irrigated rice plantations, were investigated behavioral aspects indicating the period sexual activity and the sequence of pre-mating behaviors. Subsequently, different technics were used to extract semiochemicals (Chapter 1). In Chapter 2, were investigated the morphological aspects associated with *O. oryzae* aquatic activity. Additionally, the bronze bug *T. peregrinus*, pest of *Eucalyptus* spp. plantations, was studied with the objective of identifying the chemical compounds produced and emitted by nymphs and adults (Chapter 3). Thus, were identified the volatile chemical compounds (VOCs) emitted by *Eucalyptus benthamii* plants, testing the effects of *T. peregrinus* feeding activity and of mechanical damage, aiming to understand the insect-plant interaction (Chapter 4).

Keywords: sexual behavior, swimming behavior, chemical ecology, whole body extraction, volatile organic compounds (VOCs).

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Fig. 1 Esquema experimental dos bioensaios de cópula de *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) que avaliou a duração e o número de cópulas por casal e o período da atividade sexual durante a fotofase e escotofase. Cada copo plástico continha um casal de *O. oryzae*, 150 ml de água e uma planta de arroz..... 30
- Fig. 2 Casais de *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) embaixo d'água sobre folha de arroz demonstrando a diferença angular da posição do macho em relação à fêmea durante a cópula (a) e a monta (b)..... 31
- Fig. 3 Sistema de aeração utilizado para *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). a) O ar que entra no sistema é filtrado, umidificado e segue em direção aos insetos e plantas até passar por colunas de vidro contendo polímero adsorvente onde os voláteis ficarão retidos. b) Em maior detalhe, as câmaras de machos e fêmeas contendo plantas de arroz. 33
- Fig. 4 Sequência de comportamentos pré-cópula de *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) (a-d): (a) fêmea nadou em direção ao macho; (b) macho montou na fêmea; (c) macho se movimentou no dorso da fêmea e a tocou na cabeça com seu 1º par de pernas (mecanismo de *tapping*); (d) fêmea aceitou o macho e a cópula ocorreu. 35
- Fig. 5 Frequência de cópulas de *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) (com barras de erro) estimada a cada 30 min durante a 1ª – 12ª h da fotofase e escotofase. ... 36
- Fig. 6 Número de cópulas por casal de *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) estimada para os 30 casais analisados durante a fotofase e escotofase. 37
- Fig. 7 Duração (min.) das cópulas por casal de *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) estimada para os 30 casais analisados durante a fotofase e escotofase. 37

Fig. 8 Comparação do número total de casais de *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) em cópula na fotofase (30 min – 3h) com água e sem água. 38

Fig. 9 Respostas comportamentais (em %) dos machos de *Oryzophagus oryzae* a fêmeas lavadas (a) e a fêmeas pintadas com extrato cuticular (b). 39

Fig. 10 Comparação dos perfis cromatográficos do extrato cuticular em hexano de machos e fêmeas de *Oryzophagus oryzae*. PI – padrão interno; * – contaminante ou sangramento de coluna. 40

CAPÍTULO 2

Figs. 11-16. Microscopia eletrônica de *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). 11) Vista ventral do abdômen da fêmea: escama hidrofóbica (hsII) e sensila escamiforme (ssII); 12) Escama hidrofóbica (hsII) com projeções longas no interior de projeções de cutícula; 13) Vista lateral do abdômen do macho: escama hidrofóbica (hsII) e sensila escamiforme (ssII); 14) Escama hidrofóbica (hsII) com projeções longas no interior de poços formados por cutícula; 15) Vista lateral da coxa posterior do macho: escama hidrofóbica (hsII); 16) Vista aproximada das escamas hidrofóbicas (hsII) na coxa posterior do macho. 55

Figs. 17-20. Microscopia eletrônica de *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). 17) Vista ventral da cabeça da fêmea: escama hidrofóbica (hsII) com projeções curtas no interior de poços formados pela cutícula; 18) Vista ventral do élitro do macho, com foco na margem e sua estrutura estriada; 19) Vista ventral da junção do pro e mesonoto da fêmea: escama hidrofóbica (hsII); 20) Vista aproximada da escama hidrofóbica (hsII) com projeções curtas no interior de projeções cuticulares na junção do pro e mesonoto da fêmea. 56

Figs. 21-26. Microscopia eletrônica de *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). 21) Vista lateral do rostro e antena do macho: sensilas escamiformes (ssI, ssII), escamas hidrofóbicas (hsII, hsIII), e sensila tricóide (ts). 22) Vista aproximada do escrobo: escamas hidrofóbicas (hsII); 23) Vista dorsal do élitro do macho: pilares cuticulares suportando as escamas; 24) Vista aproximada da clava da

antena da fêmea: escamas hidrofóbicas (hsI, hsIII), sensila escamiforme (ssI), e sensila tricóide (ts). 25) Vista aproximada da clava da antena do macho: cuticular pit (cp), escama hidrofóbica (hsIII), e sensila tricóide (ts); 26) Vista lateral da mesotíbia do macho e tarsos: pelos e sensila escamiforme (ssII). 57

CAPÍTULO 3

Fig. 27 (A-D). Machos, fêmeas e ninfas de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae). A – Vista dorsal de uma ninfa de 5^o instar; B – Vista ventral de uma ninfa de 5^o instar evidenciando o órgão retal (seta); C – Vista ventral do macho evidenciando o órgão retal evertido (seta); D – Vista ventral de um macho e de uma fêmea com o órgão retal não exposto. 70

Fig. 28 Metodologia de criação de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) com as ninfas individualizadas em tampas plásticas contendo gel e uma folha de *Eucalyptus benthamii* cortada sobre o gel. 72

Fig. 29 Metodologia de manutenção de adultos de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae). No exemplo, machos virgens de mesma idade agrupados em placas de Petri (5 cm de diâmetro) contendo gel e folha cortada de *Eucalyptus benthamii*. 73

Fig. 30 Cromatograma típico do extrato de exúvia de 5^o instar de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae). Os números (1 - 6) correspondem, respectivamente, ao benzaldeído, ácido hexanóico, octanal, (*E*)-2-octenal, ácido octanóico e decanal. Os extratos foram analisados em GC-MS-QP 2010 (Shimadzu); PI - padrão interno (tridecano). 77

Fig. 31 Comparação dos perfis cromatográficos dos extratos de corpo de machos e fêmeas de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) de 21 dias de idade. Compostos minoritário e majoritário, butirato de 3-metilbut-3-en-1-ila (A) e butirato de 3-metilbut-2-en-1-ila (B), respectivamente. PI – padrão interno (tridecano). Os extratos foram analisados em GCMS-QP 2010 Plus. 78

Fig. 32 Espectros de massas (GC-MS) e de infravermelho (GC-FTIR) do composto minoritário butirato de 3-metilbut-3-en-1-ila (A) e do majoritário butirato de 3-metilbut-2-en-1-ila (B), identificados no extrato de adultos de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae). 80

Fig. 33 (A-D) Número de respostas de machos e fêmeas acasalados, e de fêmeas virgens de *T. peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) a soluções sintéticas (1ME e 5ME) vs. hexano (controle). Soluções (30:1): 1ME - 750 ng: 25 ng e 5ME - 3.750 ng: 125 ng. Majoritário: butirato de 3-metilbut-2-en-1-ila e Minoritário: butirato de 3-metilbut-3-en-1-ila. 81

CAPÍTULO 4

Fig. 34 Cromatogramas representativos dos COVs (1-12) emitidos por plantas de *Eucalyptus benthamii* 24h após os tratamentos: herbivoria de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae), dano mecânico e controle. As flechas indicam os três compostos majoritários emitidos em maior concentração após a herbivoria (compostos 1, 7 e 11). 95

Fig. 35 Quantidade média de COVs emitidos por plantas de *Eucalyptus benthamii* 24h a 120h após a herbivoria de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae), comparados com os tratamentos de dano mecânico e controle. Análise estatística: MANOVA ($P < 0,05$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos. 96

Fig. 36 Espectro de massas (esquerda - 1A, 7A e 11A) e de infravermelho (direita - 1B, 7B e 11B) dos três compostos majoritários emitidos por plantas de *Eucalyptus benthamii* após a herbivoria de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae). 98

Fig. 37 COVs emitidos por plantas de *Eucalyptus benthamii* 24h após a herbivoria de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae). * Composto não identificado; PI: padrão interno (tridecano). 100

Fig. 38 Dinâmica de emissão dos COVs majoritários (α -pineno, aromadendreno e globulol) liberados por plantas de *Eucalyptus benthamii* entre 24h e 120h após a herbivoria de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae). Análise estatística: ANOVA ($P < 0,05$). As letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos..... 101

Fig. 39 Dinâmica de emissão dos COVs (números de 1-12) produzidos por plantas de *Eucalyptus benthamii* durante a fotofase e escotofase após a herbivoria de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) (24h - 96h). Análise estatística: MANOVA ($P < 0,05$). 102

Fig. 40 (A-D) Número de respostas de fêmeas acasaladas (idade: 3-20 dias) de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) aos COVs de *Eucalyptus benthamii* de extratos de planta após herbivoria e controle, de plantas após herbivoria e controle e de soluções de α -pineno em duas concentrações diferentes (180 ng e 15 ng), em um olfatômetro em Y. * Significativo; ns: não significativo com $P \leq 0,05$. Análise estatística: Teste Binomial ($P < 0,05$). Concentrações de α -pineno: 180 ng – equivalente à emissão de plantas 24h após a herbivoria; 15 ng – equivalente à emissão de plantas controle. 103

Fig. 41 (A-C) Número de respostas de fêmeas virgens (idade: 3-20 dias) de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) aos COVs de *Eucalyptus benthamii* de extratos de planta após herbivoria e controle, de plantas após herbivoria e controle, e de soluções de α -pineno (180 ng), em um olfatômetro em Y. * Significativo; ns: não significativo com $P \leq 0,05$. Análise estatística: Teste Binomial ($P < 0,05$). Concentrações de α -pineno: 180 ng – equivalente à emissão de plantas 24h após a herbivoria..... 104

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela I. Quantificação (ng) dos compostos químicos identificados nos extratos cuticulares de machos e fêmeas de *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). EP – erro padrão; ns – sem diferenças estatísticas.....40

CAPÍTULO 2

Tabela II. Localização e mensurações das escamas, sensilas e orifícios cuticulares de *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae).....59

CAPÍTULO 3

Tabela III. Identificação e quantificação (em ng) dos compostos presentes nas exúvias das ninfas de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae). As letras diferentes para cada composto indicam diferenças significativas entre os ínstaes (KI - Índice de Kovats; EP - erro padrão). Comparações estatísticas: Kruskal-Wallis rank sum test seguido de um teste não paramétrico de comparações múltiplas ($P > 0,05$).....77

Tabela IV. Quantificação (ng) dos ésteres identificados em extratos do corpo de machos e fêmeas virgens e acasalados de diferentes idades de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae); 3-9 dias (1), 10-21 (2) e 22-33 dias (3). Para cada éster identificado, ns - não significativo, * - $P < 0,05$; EP - erro padrão, rep. / n° t – número de repetições / número total de insetos extraídos. Comparações estatísticas: ANOVA (GLM - Gaussian) ($P > 0,05$).....79

CAPÍTULO 4

Tabela V. Identificação e quantificação (média \pm SE) (ng) dos COVs emitidos por plantas de *Eucalyptus benthamii*. Tratamentos: herbivoria de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) (24h – 120h), dano mecânico e controle. N – número do composto químico; RT – tempo de retenção; KI – índice de Kovats; nd – não detectável; EP – erro padrão; X – composto não identificado; * – identificação baseada em espectros de massas e de infravermelho, em índice de Kovats, e em coinjeções com compostos sintéticos ou óleo essencial de *E. benthamii*.....99

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	15
1.1 Comunicação Química	15
1.2 Semioquímicos na Agricultura	16
1.3 O estudo da Ecologia Química	18
2 ORGANIZAÇÃO DA TESE	18
3 REFERÊNCIAS	19
PARTE I - <i>Oryzophagus oryzae</i> (Lima, 1936) (Coleoptera: Curculionidae)	21
CAPÍTULO 1 - Reconhecimento de compostos cuticulares, comportamento de cópula e metodologias de extração de semioquímicos do gorgulho-aquático-do-arroz <i>Oryzophagus oryzae</i> (Lima, 1936) (Coleoptera: Curculionidae)	22
Resumo	23
Abstract.....	24
1 INTRODUÇÃO	25
1.1 A cultura e a praga.....	25
1.2 Estudos Comportamentais	27
2 OBJETIVOS	28
2.1 Geral	28
2.2 Específicos.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Obtenção e manutenção de <i>O. oryzae</i>	29
3.2 Bioensaios de cópula	29
3.3 Cópula na ausência de água.....	30
3.4 Sequência de comportamentos pré-cópula	31
3.5 Cópula na presença de machos rivais	31
3.6 Extração dos compostos cuticulares das fêmeas e resposta dos machos.....	31
3.7 Extração de compostos cuticulares de machos e fêmeas.....	32
3.8 Aeração dos insetos, extratos de água e extratos de abdômen de <i>O. oryzae</i>	32
3.9 Identificação e síntese dos compostos cuticulares de <i>O. oryzae</i>	34
3.10 Análises estatísticas	34
4 RESULTADOS	35
4.1 Sequência de comportamentos pré-cópula	35
4.2 Bioensaios de cópula	36
4.3 Cópula na presença de machos rivais	38
4.4 Extração dos compostos cuticulares das fêmeas e resposta dos machos.....	38
4.5 Extração de compostos cuticulares de machos e fêmeas.....	39
4.6 Aeração dos insetos, extratos de água e extratos de abdômen de <i>O. oryzae</i>	40
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÕES	44
7 REFERÊNCIAS	45

CAPÍTULO 2 - Micrografias eletrônicas, plastro e comportamento de natação de <i>Oryzophagus oryzae</i> (Lima, 1936) (Coleoptera: Curculionidae).....	48
Resumo	49
Abstract.....	50
1 INTRODUÇÃO	51
2 OBJETIVOS	52
2.1 Geral	52
2.2 Específicos.....	52
3 MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1 Insetos e comportamento de natação	53
3.2 Microscopia Eletrônica.....	53
4 RESULTADOS	54
4.1 Bioensaio de natação e comportamento aquático.....	54
4.2 Microscopia Eletrônica.....	54
5 DISCUSSÃO	58
6 CONCLUSÕES.....	61
7 REFERÊNCIAS	62
PARTE II - <i>Thaumastocoris peregrinus</i> Carpinteiro & Dellapé, 2006 (Heteroptera: Thaumastocoridae).....	65
CAPÍTULO 3 - Voláteis químicos de adultos e ninfas da praga <i>Eucalyptus</i> spp., <i>Thaumastocoris peregrinus</i> Carpintero & Dellapé, 2006 (Heteroptera: Thaumastocoridae).....	66
Resumo	67
Abstract.....	68
1 INTRODUÇÃO	69
1.1 A cultura e a praga.....	69
2 OBJETIVOS	71
2.1 Geral	71
2.2 Específicos.....	71
3 MATERIAL E MÉTODOS	72
3.1 Criação dos insetos e extrações	72
3.2 Extração das exúvias de <i>T. peregrinus</i> (1 ^o ao 5 ^o instar)	73
3.3 Extração dos adultos de <i>T. peregrinus</i>	74
3.4 Identificação dos compostos químicos e síntese dos ésteres	74
3.5 Análises estatísticas	75
3.6 Bioensaios.....	76
4 RESULTADOS	76
4.1 Extração das exúvias de ninfas de <i>T. peregrinus</i>	76
4.2 Extração de adultos de <i>T. peregrinus</i>	77
4.3 Bioensaios.....	80
5 DISCUSSÃO	81
6 CONCLUSÕES.....	83
7 REFERÊNCIAS	84

CAPÍTULO 4 - Compostos orgânicos voláteis de <i>Eucalyptus benthamii</i> induzidos pela herbivoria de <i>Thaumastocoris peregrinus</i> Carpintero & Dellapé, 2006 (Heteroptera: Thaumastocoridae) influenciam a preferência de fêmeas acasaladas	87
.....	
Resumo	88
Abstract.....	89
1 INTRODUÇÃO	90
2 OBJETIVOS	91
2.1 Geral	91
2.2 Específicos.....	91
3 MATERIAL E MÉTODOS	92
3.1 Obtenção e manutenção de <i>Thaumastocoris peregrinus</i> no laboratório	92
3.2 Coleta dos voláteis (COVs)	92
3.3 Análises dos extratos	93
3.4 Identificação dos compostos químicos	93
3.5 Bioensaios.....	93
3.6 Análises Estatísticas	94
4 RESULTADOS	95
4.1 COVs de <i>E. benthamii</i> : análise e comparação dos tratamentos	95
4.2 Efeito do fotoperíodo na emissão dos COVs induzidos por herbivoria	101
4.3 Bioensaios.....	102
5 DISCUSSÃO	104
6 CONCLUSÕES.....	107
7 REFERÊNCIAS	108
Anexo 1	111
Anexo 2	112
Anexo 3	115

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Comunicação Química

Além de sinais táteis, visuais e auditivos os insetos utilizam semioquímicos, ou sinais químicos, na mediação de diversos tipos de interação entre indivíduos da mesma espécie e de espécies diferentes.

A comunicação entre insetos de mesma espécie é realizada através de semioquímicos chamados de feromônios, que podem ser classificados dependendo da função que exercem. Os feromônios de trilha geralmente são emitidos por formigas e formam um rastro de sinais químicos indicando o caminho para outras formigas da mesma espécie. Os feromônios sexuais têm função de atração do sexo oposto para a cópula e são produzidos por um dos sexos. Por exemplo, fêmeas de *Grapholita molesta* (Busck 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) emitem um feromônio sexual que atraem machos (Botton et al. 2001). Os feromônios de agregação, geralmente emitidos por um dos sexos, atraem ambos os sexos, sinalizando a descoberta de uma fonte alimentar e facilitando a cópula. Por exemplo, machos do bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843) (Coleoptera: Curculionidae) produzem um feromônio de agregação que atraem machos e fêmeas para a fonte alimentar (Fernandes et al. 2001). Além da função de atração, os feromônios também podem ter função repelente, como é o caso dos feromônios de alarme geralmente produzidos por insetos sociais e por percevejos, para alertar coespecíficos sobre alguma situação de perigo.

A mediação química entre espécies diferentes de seres vivos ocorre através de substâncias químicas chamadas de aleloquímicos. Eles são classificados de acordo com a espécie que se beneficia com o sinal emitido. Por exemplo, os alomônios favorecem a espécie emissora (geralmente substâncias de defesa da espécie emissora), os cairomônios favorecem a espécie receptora (geralmente utilizados pelo predador na localização da presa) e os sinomônios com os quais ambas as espécies, receptora e emissora, são favorecidas (por exemplo, os compostos que atraem parasitoides emitidos por plantas após a herbivoria).

Todos esses compostos são o objeto de estudo da Ecologia Química, ciência que busca conhecer os mecanismos da comunicação química entre os seres vivos através da identificação dos compostos químicos envolvidos. Além disso, por causarem mudanças no comportamento das espécies, os semioquímicos são cada vez mais estudados com o objetivo de manipular espécies-pragas e inimigos naturais.

1.2 Semioquímicos na Agricultura

Dentro dos programas de manejo integrado de pragas (MIP), feromônios sexuais sintéticos são bastante utilizados nas técnicas de coleta massal, confusão sexual e em armadilhas atrai-e-mata, com o objetivo de manter os níveis populacionais abaixo do nível de dano econômico. Feromônios também são utilizados para o monitoramento das populações-praga, o que permite ao produtor conhecer os níveis populacionais ao longo do tempo, facilitando a determinação do momento correto da aplicação do inseticida. Nas diferentes técnicas são utilizados principalmente feromônios sexuais e de agregação.

Exemplos do uso de feromônios podem ser encontrados em diferentes culturas pelo mundo. São exemplos no Brasil, o monitoramento das populações de *Anthonomus grandis* Boheman, 1843 através do feromônio de agregação (Grandlure[®]) produzido pelos machos (Fernandes et al. 2001), e o uso do feromônio de agregação (Rincoforol[®]) para coleta massal da broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* L., ambos curculionídeos (Ferreira 2007). Além disso, pode-se ressaltar o monitoramento de populações de *Migdolus fryanus* (Westwood 1863) (Coleoptera: Vesperidae) em cana-de-açúcar (Leal et al. 1994) e de *Ecdyolopha aurantiana* (Lima, 1927) (Lepidoptera: Tortricidae) em citros (Bento et al. 2001), ambos através da liberação do feromônio sexual produzido pelas fêmeas. Outro caso é o de monitoramento e confusão sexual de *Grapholita molesta* (Busck 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) em pomares de maçã, pêssigo, pera, ameixa e nêspera, através da liberação do feromônio sexual (Biolita[®]) produzido pelas fêmeas (Botton et al. 2001).

Os métodos de controle baseados na utilização de semioquímicos contribuem para a racionalização do uso de inseticidas e, como consequência a essa diminuição, há uma redução dos custos de produção e do impacto ao meio ambiente. Essa diminuição do uso de inseticidas é relevante diante do panorama atual, no qual a produção agrícola mundial sofre com exigências de alta produtividade aliada a preservação dos recursos naturais. Por isso, novas técnicas de controle de pragas que utilizem menos inseticidas devem ser desenvolvidas. Segundo Picket (2012), a Ecologia Química, que é uma disciplina intrinsecamente multidisciplinar, deve ser expandida para que forneça novas tecnologias para a produção sustentável de alimento frente ao aumento populacional mundial e às mudanças climáticas.

Além de envolver métodos de captura de insetos-praga através de armadilhas feromonais, a Ecologia Química também busca entender a comunicação entre os

diferentes níveis tróficos, por exemplo, entre as plantas e os insetos-praga, através do estudo dos aleloquímicos. Sabe-se que geralmente os insetos herbívoros reconhecem e localizam suas plantas hospedeiras através da detecção de misturas características de voláteis emitidas por elas (Webster et al. 2010). Por exemplo, o afídeo *Toxoptera aurantii* Boyer (Hemiptera: Aphididae) mostrou-se atraído por voláteis de folhas verdes liberados por plantas de *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze (Theaceae) (Han et al. 2012). No entanto, um determinado grupo de compostos pode ser atraente ou repelente dependendo do contexto em que estejam inseridos. Por exemplo, o afídeo *Aphis fabae* Scopoli, 1763 (Hemiptera: Aphididae) foi atraído pelo conjunto de compostos emitidos por sua planta hospedeira, *Vicia faba* (Fabaceae). No entanto, quando os compostos foram apresentados isoladamente, eles causaram repelência, ou seja, não foram reconhecidos como pertencentes à planta hospedeira (Webster et al. 2010). Esse exemplo demonstra a complexidade na qual o reconhecimento de compostos voláteis está envolvido. No entanto, com estudos aprofundados em cada sistema é possível manipular a emissão de compostos, atraindo ou repelindo espécies alvo. Um exemplo da utilização de voláteis de planta no controle de pragas é a técnica do “push and pull” (“repelir e atrair”). O objetivo desta técnica é tornar a planta cultivada não atrativa ou repelente para as pragas (push) e ao mesmo tempo atraí-las (pull) para outra fonte, retirando-as da área de interesse (Cook et al. 2007). Nessa técnica pode-se utilizar além dos compostos das plantas para atração e repelência, pistas visuais que simulem a planta hospedeira, feromônios sexuais e de agregação para atração e feromônios de alarme para repelência. Um exemplo bem sucedido em pequenas propriedades africanas é a plantação de *Melinis minutiflora* e *Desmodium uncinatum* intercaladas com o milho (*Zea mays*) ou sorgo (*Sorghum bicolor*). Estas plantas liberam compostos repelentes para lepidópteros como *Chilo partellus*, *Eldana saccharina*, *Busseola fusca* e *Sesamia calamistis*, que são atraídos pelos voláteis emitidos por *Pennisetum purpureum* ou *Sorghum vulgare sudanense*, afastando as pragas do milho.

Este exemplo demonstra a importância de se identificar compostos de plantas e de se testar o efeito nas pragas. Portanto, estudos básicos que identifiquem compostos de plantas e testem sua atividade nas espécies-praga são o primeiro passo para a criação de novas estratégias de controle.

1.3 O estudo da Ecologia Química

Para o estudo da Ecologia Química de determinada espécie ou sistema, tem-se como objetivo principal a detecção e identificação dos semioquímicos envolvidos. Para a extração de feromônios são utilizadas diferentes técnicas, como a extração direta da glândula produtora de feromônio, quando se conhece a sua localização, e a aeração de machos e fêmeas separadamente, que possibilita a detecção de compostos sexo-específicos (Zarbin et al. 1999). Como base para os estudos químicos, o comportamento dos insetos precisa ser investigado. A partir destes estudos são obtidas informações utilizadas no desenvolvimento da metodologia de extração e de bioensaios, revelando informações importantes do comportamento da praga, como por exemplo, qual sexo é responsável pela atração sexual, qual é atraído e o horário de atividade sexual (e.g. *Hedypathes betulinus* Cerambycidae, em Fonseca et al. 2009). Por exemplo, existem insetos que emitem feromônio apenas em algumas horas do dia, restringindo o horário possível de extração. É o caso de *Sternechus subsignatus* Boheman, 1836 (Coleoptera: Curculionidae), praga da soja, cujo feromônio de agregação é liberado apenas durante a fotofase, com pico de emissão entre a 4^a e 6^a h (Ambrogi e Zarbin 2008). Neste caso, tanto a extração de compostos quanto os bioensaios devem ser realizados nesse horário.

2 ORGANIZAÇÃO DA TESE

Nesta tese estudaram-se os insetos-praga *Oryzophagus oryzae* (Lima, 1936) (Coleoptera: Curculionidae) e *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Heteroptera: Thaumastocoris). Primeiramente, com o objetivo de iniciar os estudos de Ecologia Química de *O. oryzae*, praga de plantações de arroz irrigado, investigou-se aspectos comportamentais em busca do horário da atividade sexual e da sequência de comportamentos pré-cópula. Em seguida, realizaram-se diferentes técnicas de extração de semioquímicos e analisaram-se os resultados (Capítulo 1). No Capítulo 2, investigou-se os aspectos morfológicos relacionados à atividade aquática de *O. oryzae*.

Já o percevejo-bronzeado-do-eucalipto, *T. peregrinus*, foi estudado com o objetivo de detectar e identificar os compostos químicos produzidos e emitidos por ninfas e adultos (Capítulo 3). Estes estudos foram baseados em dados comportamentais e biológicos fornecidos pela Embrapa Florestas, através do Dr. Leonardo Barbosa.

Além dos compostos químicos produzidos pelo percevejo-bronzeado, buscou-se também conhecer os compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por *Eucalyptus benthamii*, testando o efeito da alimentação de *T. peregrinus* e do dano mecânico na

emissão dos voláteis da planta-hospedeira, visando entender a relação inseto-planta (Capítulo 4).

Esta tese foi dividida em duas partes, a primeira relacionada aos estudos de *O. oryzae* (Capítulos 1 e 2), e a segunda aos estudos de *T. peregrinus* (Capítulos 3 e 4).

3 REFERÊNCIAS

- Ambrogi, B. G., Zarbin, P. H. G. (2008) Aggregation Pheromone in *Sternechus subsignatus* (Coleoptera: Curculionidae): Olfactory Behavior and Temporal Pattern of Emission. *Journal of Applied Entomology*. 132: 54–58.
- Bento, J. M. S., Vilela, E. F., Parra, J. R. P., Leal, W. S. (2001) Monitoramento do bicho-furão-do-citros com feromônio sexual: bases comportamentais para utilização dessa nova estratégia. *Laranja, Cordeirópolis*, v.22, p. 351–366.
- Botton, M.; Ariolli, C. J. Colletta, V. D. 2001. Monitoramento da mariposa oriental *Grapholita molesta* (Busck, 1916) na cultura do pessegueiro. Comunicado técnico n° 38, abr./01, p. 1–4.
- Cook, S. M., Khan, Z. R., Picket J. A. (2007) The Use of Push-Pull Strategies in Integrated Pest Management. *Annual Review of Entomology*. 52: 375–400.
- Fernandes, W. D., Carvalho, S. Luis, Habib, M. (2001) Between-season attraction of cotton boll weevil, *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera: Curculionidae) adults by its aggregation pheromone. *Scientia Agricola*. 58: 229–234.
- Ferreira, J. M. S. (2007) Sistema de Captura do *Rhynchophorus palmarum* com Armadilha Tipo Pet. Encarte Embrapa.
- Fonseca, M. G., Vidal, D. M., Zarbin, P. H. G. (2009) Male-Produced Sex Pheromone of the Cerambycid Beetle *Hedypathes betulinus*: Chemical Identification and Biological Activity. *Journal of Chemical Ecology*. 36: 1132–1136.
- Han, B., Zhang, Q-H, Byers, J. (2012) Attraction of the tea aphid, *Toxoptera aurantii*, to combinations of volatiles and colors related to tea plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 144: 258–269.
- Leal, W. S., Bento, J. M. S., Vilela, E.F., Della Lucia, T.M.C. (1994) Female sex pheromone of the longhorn beetle *Migdolus fryanus* Westwood: N-(2'S)-methylbutanoyl 2-methylbutylamine. *Experientia*. 50: 853–856.
- Picket, J. A. (2012) New Synthesis: Chemical Ecology and Sustainable Food Production. *Journal of Chemical Ecology*. 38: 1071.

- Webster, B., Bruce, T., Pickett, J., Hardie, J. (2010) Volatiles functioning as host cues in a blend become nonhost cues when presented alone to the black bean aphid. *Animal Behaviour*. 79: 451-457.
- Zarbin, P. H. G., Ferreira, J. T. B., Leal, W. S. (1999). Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrutural de feromônio de insetos. *Química Nova*. 22: 263–268.

PARTE I

Oryzophagus oryzae (Lima, 1936)

(Coleoptera: Curculionidae)

CAPÍTULO 1

Reconhecimento de compostos cuticulares, comportamento de cópula e metodologias de extração de semioquímicos do gorgulho-aquático-do-arroz

Oryzophagus oryzae (Lima, 1936) (Coleoptera: Curculionidae)

CAPÍTULO 1

Reconhecimento de compostos cuticulares, comportamento de cópula e metodologias de extração de semioquímicos do gorgulho-aquático-do-arroz *Oryzophagus oryzae* (Lima, 1936) (Coleoptera: Curculionidae)

Resumo

Oryzophagus oryzae, conhecido como gorgulho-aquático-do-arroz, é praga importante em plantações de arroz irrigado no sul do Brasil. As larvas se alimentam das raízes do arroz causando prejuízos econômicos e o controle é realizado principalmente através de inseticidas. Com o objetivo de descrever o comportamento de cópula e de investigar a presença de semioquímicos intermediando o reconhecimento e o comportamento sexual de *O. oryzae* foram realizados bioensaios e testadas diferentes metodologias de extração de feromônio, como aeração e extrações de corpo, água e abdômen de machos e fêmeas separadamente. Os bioensaios revelaram que os casais foram sexualmente ativos principalmente nas primeiras horas da fotofase e escotofase e que os adultos copularam e re-copularam na presença de água. Na ausência da água apenas 10% dos adultos copularam, pois os casais não se encontraram. No bioensaio da sequência de comportamentos pré-cópula, quatro passos foram observados (*a-d*): a aproximação da fêmea do macho (*a*); a monta do macho na fêmea (*b*); o mecanismo de “*tapping*” (*c*), no qual o macho tocou a cabeça da fêmea com seu primeiro par de pernas a preparou para a cópula, o aceite da fêmea e a cópula (*d*). As fêmeas sempre foram atraídas para os machos, os encontrando embaixo d’água antes que eles tentassem a cópula; após a cópula, os machos apresentaram atividade de guarda de duração variada, que preveniu a atividade sexual das fêmeas com outros machos e permitiu a re-cópula. As aerações e extrações de água e de abdômen não revelaram a presença de semioquímicos específicos intermediando a atração sexual. As extrações cuticulares revelaram que machos e fêmeas apresentam compostos químicos similares. Esses compostos foram identificados como aldeídos (hexadecanal, octadecanal e eicosanal) e uma cetona (nonadecan-2-ona), não hidrocarbonetos, talvez em função do seu hábito aquático. Os bioensaios sugeriram que os machos reconhecem as fêmeas por meio da composição cuticular.

Palavras-chave: aeração, extração de cutícula, sequência pré-cópula.

Cuticular compounds recognition, mating behavior and extraction methodologies of semiochemicals of the rice water weevil *Oryzophagus oryzae* (Lima, 1936) (Coleoptera: Curculionidae)

Abstract

Oryzophagus oryzae, the rice water weevil is an important pest of irrigated rice plantations in the South of Brazil. Larva feed on rice roots causing economic losses and control is performed mainly with insecticides. To describe the mating behavior and to investigate the presence of semiochemicals mediating the recognition and the sexual behavior of *O. oryzae* bioassays were performed and different pheromone extraction methodologies were tested, as aeration and whole body, water, and abdomen extractions of males and females separately. Bioassays revealed that couples were sexually active mainly in the first 3 hours of photophase and scotophase and that adults mated and re-mated in the presence of water. In the absence of water, only 10% of adults mated, because couples did not find each other. In the sequence of pre-mating behaviors bioassay, four steps were observed (*a-d*): female approached male (*a*); male mounted female (*b*); *tapping* mechanism (*c*), males tapped females head using his forelegs preparing her for copulation; female accepted male and they mated (*d*). Females were always attracted to males, seeking them under water before males tried to mate; after copulation, males showed guarding activity of variable duration, which prevented female sexual activity with rival males and allowed remating. Aerations and water and abdomen extractions did not reveal the presence of specific semiochemicals mediating the sexual attraction. Cuticle extractions revealed that males and females had similar cuticular chemical compounds. These compounds were identified as aldehydes (hexadecanal, octadecanal and eicosanal) and a ketone (nonadecan-2-one), not as hydrocarbons, maybe because of its aquatic life habits. Bioassays suggested that males recognized females by their cuticle composition.

Keywords: aeration, cuticle extraction, pre-mating sequence.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A cultura e a praga

A produção de arroz (*Oryza sativa* L. – Poaceae) no Brasil entre os anos de 2009/2010 foi de mais de 11 milhões de toneladas e a previsão para a safra de 2012/2013 é de quase 12 milhões. As plantações de arroz, que podem ser de dois tipos sequilho ou irrigado, estão distribuídas nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Mato Grosso, sendo que o cultivo de arroz irrigado, encontrado nos estados da região sul, contribui com 54% da produção nacional (MAPA 2013).

Diversas pragas prejudicam a produção de arroz e dentre elas, destaca-se o curculionídeo *Oryzophagus oryzae* (Lima, 1936) (Coleoptera: Curculionidae), um dos insetos mais prejudiciais à orizicultura irrigada do Brasil (Carbonari et al. 2000). A larva de *O. oryzae*, conhecida como bicheira-da-raiz, causa danos severos ao sistema radicular em plantações de solo inundado (Martins et al. 1996), pois ao se alimentarem das raízes, reduzem severamente a capacidade de absorção de nutrientes comprometendo o desenvolvimento da planta (Martins et al. 2001). O adulto, conhecido como gorgulho-aquático-do-arroz, raramente causa prejuízos econômicos em lavouras implantadas através de semeadura em solo seco desnudo ou com cobertura vegetal dessecada. Nestes sistemas os insetos intensificam a alimentação nas folhas de arroz quando as plantas já estão mais fortalecidas (aproximadamente 25 dias de idade), na época de irrigação por inundação das lavouras (Martins et al. 1993). No entanto, em sistemas de arroz pré-germinado, devido a distribuição das sementes em solo já alagado (Epagri, 1998), os adultos se estabelecem na cultura mais cedo, destruindo uma quantidade considerável de plântulas (Lima 1951).

São observadas duas gerações anuais desta praga e os adultos podem ficar até 150 dias em diapausa até o novo plantio. Os adultos de *O. oryzae*, no Rio Grande do Sul, permanecem em diapausa entre os meses de abril a outubro (período de entressafra) nos restos de plantações de arroz e na base de gramíneas e ciperáceas vizinhas a lavoura (Pugliese, 1955). No mês de outubro, os adultos voam para as plantações irrigadas de arroz, onde se alimentam e se reproduzem provavelmente estimulados pelo início das chuvas da primavera (Hickel E. comunicação pessoal). As larvas de *O. oryzae* são aquáticas e necessitam de locais irrigados para sobreviver, por isso as chuvas podem ser uma indicação de que os insetos vão encontrar as plantações já alagadas, permitindo a reprodução.

O dano causado pelas larvas de *O. oryzae* deve ser evitado principalmente em lavouras manejadas para altas produtividades (Pulver e Carmona 2004), por isso os produtores utilizam inseticidas como método de controle usual desta praga. No entanto, outras formas de controle já foram testadas. Pode-se utilizar cultivares de arroz resistentes como a cultivar Dawn, com nível de infestação reduzida (Silva et al. 2003; Martins et al. 1993), e combinações de agentes entomopatogênicos, como *Beauveria bassiana* a inseticidas, que reduzem em até 90% o nível de infestação larval em arroz pré-germinado (Prando e Sosa-Gomes 1998). No entanto, em algumas situações, estas medidas são insuficientes para evitar que o nível de infestação larval seja economicamente prejudicial à cultura, tornando necessária a adoção do controle químico. Com o uso de inseticidas, no entanto, ocorre um aumento dos custos de produção e dos riscos de contaminação ambiental (Martins et al. 2001).

Para que a utilização de inseticidas diminua e seja menos agressivo ao meio, o desenvolvimento de um sistema de manejo integrado para *O. oryzae* é de fundamental importância. Cada vez mais os semioquímicos vêm sendo utilizados como material atraente em culturas comerciais, através de armadilhas de captura massal e/ou monitoramento populacional. É o caso de *Anthonomus rubi* (Herbst, 1795) (Coleoptera: Curculionidae), praga de morango na Europa, cujo feromônio sexual foi utilizado em armadilhas. As capturas detectadas pelo menos uma semana antes dos primeiros danos causados na plantação promoveram um conhecimento importante a respeito da época de aplicação de inseticidas, prevenindo prejuízos (Cross et al. 2006).

No Brasil, é possível adquirir semioquímicos sintéticos para o manejo integrado de pragas. Por exemplo, o feromônio de agregação sintético de *Cosmopolites sordidus* (Germar, 1824) (Coleoptera: Curculionidae) nomeado de Cosmolure® é utilizado como substância atraente na técnica de coleta massal desta praga. Esta tecnologia reduz a população da praga a um nível que não causa danos econômicos (Romano e D'Agostino 2003a). O Rhynchophorol® (feromônio sexual sintético), associado a iscas de cana-de-açúcar, também é utilizado para monitorar e realizar a coleta massal da praga-chave dos coqueiros, a broca *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Curculionidae) (Romano e D'Agostino 2003b).

Assim sendo, o manejo integrado de pragas utilizando semioquímicos, através do desenvolvimento de substâncias atraentes que auxiliem no monitoramento populacional e em armadilhas de captura em massa é uma alternativa que pode incentivar uma redução do uso de inseticidas, a diminuição de custos de produção, um

menor impacto ao meio ambiente e uma produção de alimento com maior qualidade para o consumidor.

1.2 Estudos Comportamentais

Estudos sobre o comportamento de cópula auxiliaram a evidenciar a presença feromônios de contato em *Aegorhinus superciliosus* (Guérin) (Curculionidae) (Mutis et al. 2009). No entanto, em besouros aquáticos (e.g. *Neochetina* spp., *Euhrychiopsis lecontei* Dietz e *O. oryzae*) não existem informações a respeito do comportamento sexual. Em espécies de *Neochetina* spp. (Coleoptera: Curculionidae) foram investigados a biologia, a alimentação, as preferências de oviposição (Stark e Goyer 1983) e os aspectos práticos da eficiência do controle biológico (Wright e Center 1984), e em *E. lecontei* (Coleoptera: Curculionidae), o papel da visão para localizar a planta hospedeira, *Myriophyllum spicatum* Linnaeus (Reeves e Lorch 2011), e os compostos químicos que influenciaram a atração dos insetos a essas plantas (Marko et al. 2005). Bioensaios de comportamento de *O. oryzae* poderiam auxiliar as investigações de semioquímicos através de informações básicas, como qual sexo atrai e qual sexo é atraído, assim como o horário de atividade sexual. Esses semioquímicos podem fazer parte de mecanismos de atração e reconhecimento entre os sexos e, portanto, novos métodos de monitoramento e controle poderiam ser desenvolvidos com base nesses compostos.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Analisar o comportamento de cópula de *Oryzophagus oryzae* e investigar a presença de feromônios atuando na comunicação sexual desta espécie.

2.2 Específicos

- Através de bioensaios com *O. oryzae*, investigar:
 - a sequência de comportamentos pré-cópula;
 - o período da atividade sexual;
 - a duração e número de cópulas por casal;
 - a influência da água na cópula;
 - a resposta de machos e fêmeas em cópula na presença de machos rivais;
 - a resposta de machos frente a fêmeas lavadas e “pintadas” com seu extrato cuticular.
- Testar diferentes metodologias de extração de compostos químicos buscando a presença de feromônios em *O. oryzae*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e manutenção de *O. oryzae*

Adultos de *O. oryzae* foram obtidos de plantações de arroz irrigado da Estação Experimental de Itajaí da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A. (EPAGRI), durante o período de outubro a dezembro de 2009-2012. Os insetos foram enviados para o Laboratório de Semioquímicos – Universidade Federal do Paraná em Curitiba/Paraná e mantidos em plantas de arroz suscetíveis (*Oryza sativa* var. SCS 114 Andossan) cultivadas em copos plásticos de 400 ml com água.

Como os insetos foram obtidos diretamente do campo não foi possível definir a idade e o estado sexual de machos e fêmeas (virgens ou acasalados).

Antes de cada experimento os insetos foram sexados e os casais foram criados aleatoriamente.

3.2 Bioensaios de cópula

Casais foram observados a cada 5 min durante 12h de fotofase e 12h de escotofase. As observações durante a escotofase foram realizadas numa sala climatizada ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) com fotoperíodo invertido (12D: 12N) durante o dia (das 8:00 as 20:00) através do uso de uma lanterna recoberta com papel celofane vermelho, de modo que a luminosidade não foi percebida pelos insetos. As observações durante a fotofase foram realizadas no mesmo horário, com o fotoperíodo não invertido.

Cada réplica foi composta por um copo plástico de 400 ml coberto por um tecido transparente (voil) e preso com elástico que continha um casal criado aleatoriamente, 150 ml de água e uma planta de arroz de aproximadamente 30 dias de idade (12 a 15 cm de comprimento). Os copos foram posicionados um ao lado do outro para facilitar a observação (Fig. 1). No total, foram observados cerca de 40 casais em cópula durante a fotofase e 40 durante a escotofase. Em função da rejeição dos machos por algumas fêmeas apenas 30 casais por fotoperíodo foram considerados para as análises. Durante as observações, os casais foram classificados em três condições: separados um do outro, montados (equivalente à atividade de guarda após a primeira cópula) ou em cópula. A distinção entre a cópula e a monta foi baseada na posição do macho em relação à fêmea (Fig. 2). Durante a monta, os machos permaneceram em posição horizontal (180°) em relação à fêmea. Durante cópula, a posição do macho em relação à fêmea foi de aproximadamente 60° . Os casais considerados em cópula permaneceram nessa posição (60° em relação à fêmea) por pelo menos três observações seguidas (15 min). Baseados

nesse experimento foram estimados o número e a duração de cópulas por casal. A porcentagem de casais em cópula foi estimada para intervalos de 30 min.

Para alcançar o valor de 30 casais em cópula este valor, pois em algumas repetições não houve cópula (devido à idade e estado sexual dos insetos) cerca de 40 casais foram observados por fotoperíodo.

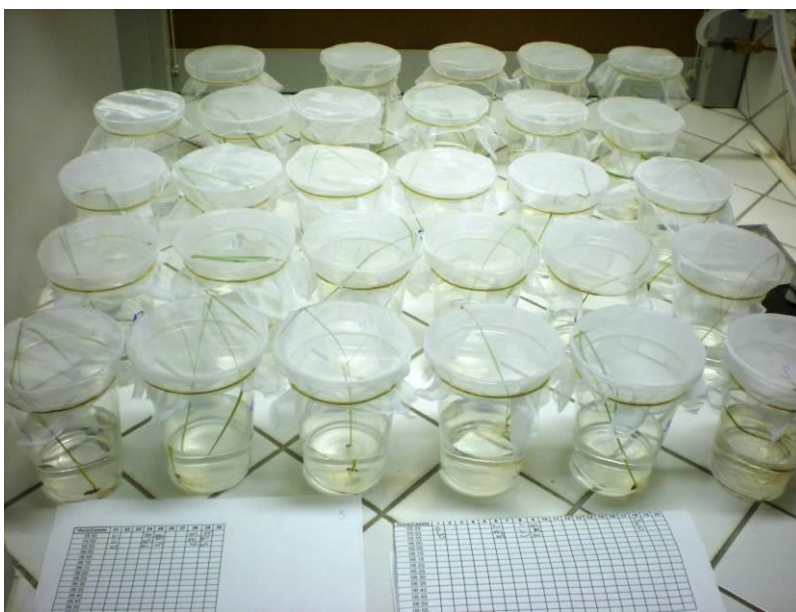


Fig. 1 Esquema experimental dos bioensaios de cópula de *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) que avaliou a duração e o número de cópulas por casal e o período da atividade sexual durante a fotofase e escotofase. Cada copo plástico continha um casal de *O. oryzae*, 150 ml de água e uma planta de arroz.

3.3 Cópula na ausência de água

Este experimento foi realizado nas primeiras 3h da fotofase, com base nos resultados do experimento anterior (período de atividade sexual maior) com o mesmo esquema experimental do experimento anterior (Fig. 1), no entanto não foi adicionada água dentro dos copos plásticos. No total, 30 réplicas foram avaliadas analisando o número de casais em cópula. Este resultado foi comparado com o experimento anterior, no qual havia água no interior do copo plástico.

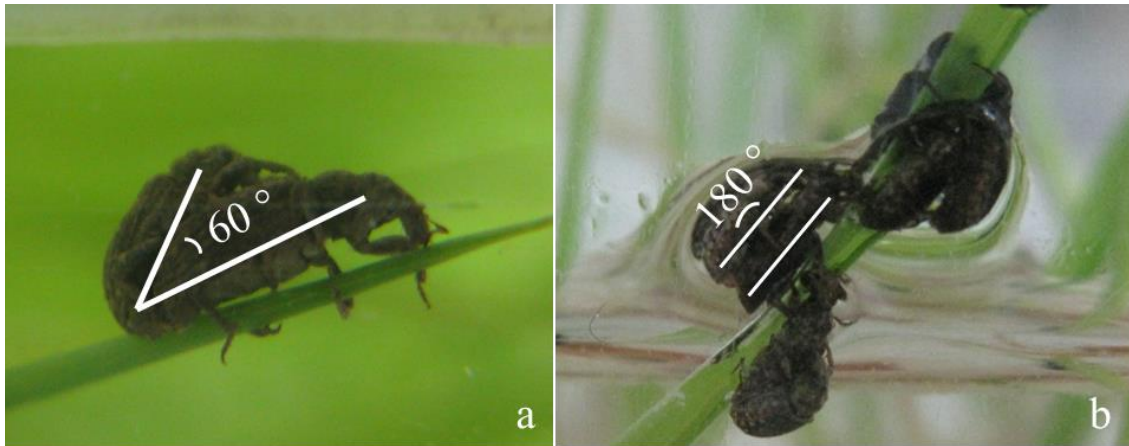


Fig. 2 Casais de *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) embaixo d'água sobre folha de arroz demonstrando a diferença angular da posição do macho em relação à fêmea durante a cópula (a) e a monta (b).

3.4 Sequência de comportamentos pré-cópula

Durante as primeiras 3h da fotofase, a sequência de comportamentos pré-cópula dos casais foram analisados ($n = 20$). A metodologia foi a mesma citada previamente (Fig. 1), no entanto, as observações foram de uma réplica por vez.

3.5 Cópula na presença de machos rivais

Um casal em cópula e três machos rivais foram colocados no interior de copos plásticos que continham 150 ml de água e uma planta de arroz de aproximadamente 30 dias de idade. Este número de machos foi utilizado para que a probabilidade de interação entre os machos rivais e o casal em cópula fosse maior. As reações do macho em cópula, dos machos rivais e da fêmea foram observadas ($n = 10$).

3.6 Extração dos compostos cuticulares das fêmeas e resposta dos machos

Os compostos químicos presentes na cutícula das fêmeas foram extraídos com 30 μ l de hexano bidestilado (HPLC-grade) durante 10 min. Em seguida, foi realizada uma segunda extração com 100 μ l de hexano por 10 min, garantindo que compostos cuticulares residuais fossem removidos. O primeiro extrato de cutícula da fêmea (30 μ l) foi concentrado para 15 μ l com uma corrente de ar filtrado e o segundo extrato foi descartado.

Sobre um papel toalha, a fêmea cuja cutícula foi extraída foi oferecida a dois machos, um em seguida do outro, e a resposta dos machos foi registrada. Em seguida, 10 µl do primeiro extrato de cutícula da fêmea foram reaplicados ao corpo dela, ou seja, ela foi pintada com seu extrato e novamente oferecida aos machos. A resposta dos machos a essas fêmeas pintadas foi anotada (n = 20).

3.7 Extração de compostos cuticulares de machos e fêmeas

Extrações de machos e fêmeas separadamente (n = 15 por sexo) contendo de 15 a 30 insetos/réplica, dependendo da disponibilidade de insetos, foram realizadas por 30 min em hexano bidestilado (HPLC-grade) na quantidade necessária para cobrir os insetos (150 µl a 200 µl). Os extratos foram concentrados na proporção de 1 inseto por 1 µl e analisados por cromatografia gasosa (GC-2010 - Shimadzu), cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS-QP 2010 Plus - Shimadzu), e cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de infravermelho (GC-FTIR) (GC-2010 acoplado a DiscovIR-GC – Shimadzu). Os extratos foram injetados (1 µl) utilizando o método splitless e temperatura do injetor de 250°C. A temperatura do forno foi mantida em 50°C por 1 min e elevada até 250°C com taxa de 7°C min⁻¹, e mantida por 10 min. O GC e o GCMS foram equipados com colunas RTX-5 (30 m x 0.25 mm i.d. e 0.25 µm de espessura de filme; Restek, Bellefonte, Pennsylvania, USA) utilizando hélio como gás carreador e coluna com pressão de 170 kPa. Todas as análises utilizaram os mesmos parâmetros. A quantificação dos compostos presentes nos extratos foi realizada através da comparação da área de um padrão interno (C13 – tridecano) com os picos relevantes. Na análise de infravermelho (GC-FTIR), o GC foi operado no modo splitless e equipado com a coluna capilar DB-5 (0,25 µm, 0,25 m x 30 m) (J&W Scientific, Folsom, California, EUA) com hélio como gás carreador. A temperatura do forno foi mantida a 50°C por 1 min e elevada até 250°C numa taxa de 7°C min⁻¹. Um detector fotocondutivo de mercúrio-cadmio-telúrio (MCT) resfriado por nitrogênio líquido foi utilizado com FT-IR de resolução de 8 cm⁻¹.

3.8 Aeração dos insetos, extratos de água e extratos de abdômen de *O. oryzae*

Aerações de machos e fêmeas foram realizadas em pares através de uma corrente de ar filtrada (carvão ativado) e umidificada no interior de câmaras de vidro separadas para cada sexo (30 cm x 15 cm) (Fig. 3 a). Em duas câmaras separadas foram colocados o mesmo número de machos e fêmeas (de 15 a 1000 insetos por câmara) e um número

suficiente de plantas de arroz (3 - 20) para alimenta-los (Fig. 3 b). Essa variação do número de machos e fêmeas por câmara foi testada em função do tamanho pequeno desta espécie e da possibilidade de mais insetos emitirem feromônio e, portanto, do extrato final ser mais concentrado. No total, foram realizadas 60 réplicas, sendo 1 réplica = 1 câmara contendo machos + 1 câmara contendo fêmeas, cujos extratos foram respectivamente comparados. Os voláteis foram coletados a cada 24h em colunas contendo Super Q (Alltech, Deerfield, IL). As extrações foram feitas com 3 ml de hexano bidestilado (HPLC-grade) e concentrados na proporção de 1:1.

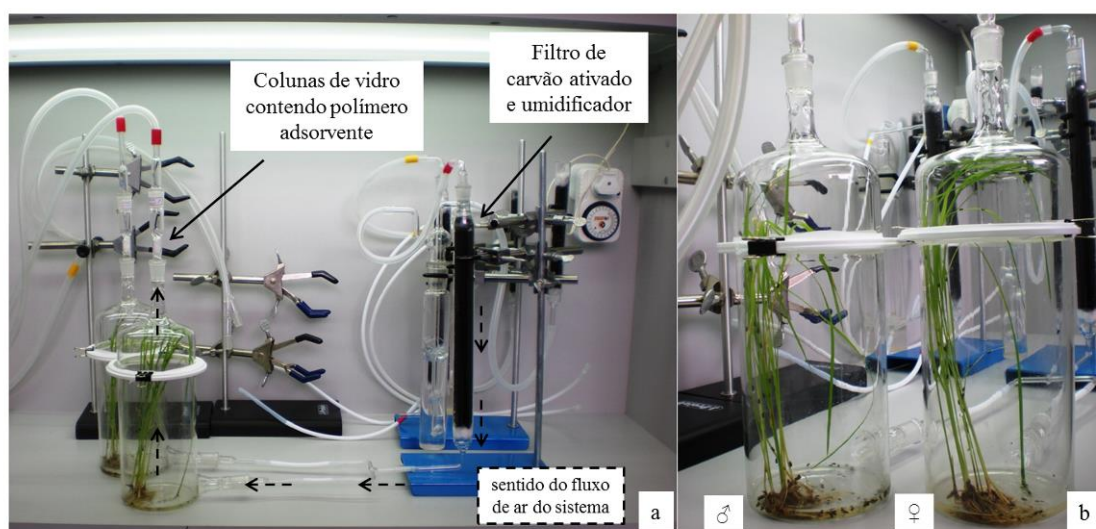


Fig. 3 Sistema de aeração utilizado para *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). a) O ar que entra no sistema é filtrado, umidificado e segue em direção aos insetos e plantas até passar por colunas de vidro contendo polímero adsorvente onde os voláteis ficarão retidos. b) Em maior detalhe, as câmaras de machos e fêmeas contendo plantas de arroz.

No experimento no qual a água foi extraída, 30 machos e 30 fêmeas foram mantidos separados em béqueres de 250 ml contendo 100 ml de água e três plantas de arroz. Após 48h, insetos e plantas foram removidos e os 100 ml de água foram divididos em duas amostras de 50 ml. As amostras foram agitadas cinco vezes durante 30 seg com 100 ml de hexano bidestilado (HPLC-grade) ou éter destilado. Após a agitação, os solventes foram separados da água através de micropipeta, os extratos produzidos foram concentrados para 2 ml e 1 μ L de cada extrato foi injetado e analisado em GC e GC-MS.

No experimento de extração de abdomens de machos e fêmeas, os insetos tiveram seus abdomens destacados do corpo e seu conteúdo removido individualmente. Após limpeza minuciosa com pinça e papel, os abdomens (o que restou foi cutícula) foram extraídos por 30 min em 30 μL de éter destilado e/ou diclorometano. Foram utilizados de 10 a 30 abdomens por réplica num total de 20 réplicas. Os extratos foram concentrados na proporção de um abdômen/ μL e 1 μL do extrato produzido foi injetado e analisado em GC e GC-MS.

3.9 Identificação e síntese dos compostos cuticulares de *O. oryzae*

A identificação dos compostos cuticulares foi baseada em análises de espectros de massa (GC-MS) e coinjeções com compostos sintéticos em duas diferentes colunas (DB-5 e EC-1). Os compostos hexadecanal e octadecanal foram sintetizados através da oxidação dos álcoois correspondentes, utilizando clorocromato de piridínio (PCC). O composto eicosanal foi sintetizado através da redução do seu éster correspondente utilizando hidreto de lítio alumínio (LiAlH_4) e subsequente oxidação com PCC. A nonadecan-2-ona foi sintetizada através da adição do reagente de Grignard ao octadecanal gerando o álcool secundário que, em seguida, foi submetido a uma reação de oxidação utilizando o reagente de Jones. Os compostos sintéticos, hexadecanol e octadecanol, foram adquiridos da Acros Organics (Geel, Turnhout, Belgium) e o estearato de metila da Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI, USA).

3.10 Análises estatísticas

O software R, versão 2.13 (R Development Core Team, 2011), foi utilizado em todas as análises. A normalidade dos dados foi confirmada através dos testes de Liliefors e Shapiro-Wilk. Para comparar as médias do número de cópulas ocorridas na fotofase e escotofase, o número de cópulas na ausência e na presença de água, e o número de cópulas/casal foi utilizada a análise de variância (ANOVA) no modelo linear generalizado (GLM) (Quasi-Poisson). A duração das cópulas por casal também foi avaliada através de uma ANOVA-GLM (Gaussian). A comparação das quantidades dos compostos cuticulares de machos e fêmeas foi realizada através do teste não paramétrico de Wilcoxon. Para todas as análises, quando o $P > 0,05$ os dados foram considerados não significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Sequência de comportamentos pré-cópula

A seguinte sequência de quatro passos foi observada até que ocorresse a cópula (Fig. 4). A fêmea aproximou-se do macho (passo *a*); depois que ela tocou o macho ou se aproximou o bastante, ele se aproximou, montou (passo *b*) e tentou a cópula. O primeiro contato entre fêmeas e machos ocorreu na água em todas as réplicas. A fêmea recusou a primeira tentativa de cópula em 90% das réplicas. Após a recusa, o macho se movimentou sobre a parte dorsal da fêmea e a tocou na cabeça com o primeiro par de pernas (mecanismo de *tapping*) (passo *c*), e em seguida, uma nova tentativa de cópula foi feita. Esse passo, seguido por uma nova tentativa de cópula se repetiu de 0 a 8 vezes (média de 4,3 vezes). Então, a fêmea moveu seu abdômen para o lado permitindo a cópula (passo *d*).

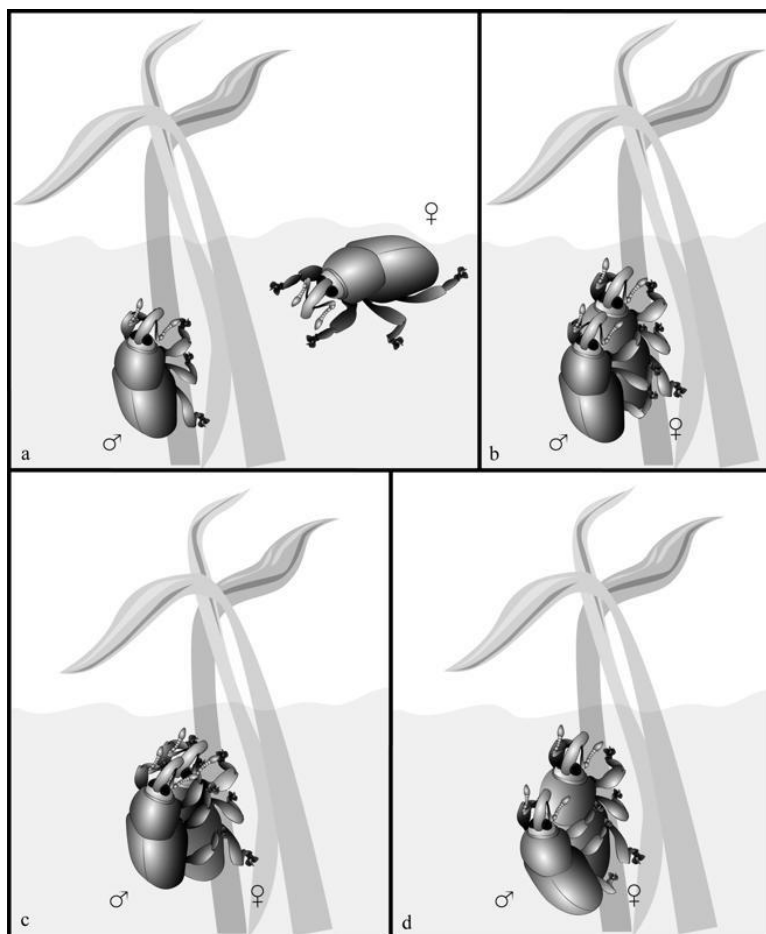


Fig. 4 Sequência de comportamentos pré-cópula de *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) (*a-d*): (*a*) fêmea nadou em direção ao macho; (*b*) macho montou na fêmea; (*c*) macho se movimentou no dorso da fêmea e a tocou na cabeça com seu 1^o par de pernas (mecanismo de *tapping*); (*d*) fêmea aceitou o macho e a cópula ocorreu.

Após a cópula, os machos permaneceram montados nas fêmeas até a re-cópula. Neste experimento, 50% dos casais foram desconsiderados das análises porque as fêmeas rejeitaram os machos e não houve cópula.

4.2 Bioensaios de cópula

Os casais copularam durante o dia e a noite (Fig. 5) e o pico de atividade sexual ocorreu na 2ª h da fotofase (87% dos casais em cópula). Não houve diferenças estatísticas entre o número de cópulas total, o número de cópulas por casal (Fig. 6) e a duração das cópulas por casal (Fig. 7) durante a fotofase e a escotofase (períodos de 12h) ($F = 1,53$; $P = 0,22$; $F = 1,32$, $P = 0,25$; $F = 0,64$, $P = 0,42$, respectivamente). A média calculada foi de 5,37 cópulas na fotofase e de 6,33 na escotofase e a duração média das cópulas foi de aproximadamente 310 min na escotofase e 279 min na fotofase.

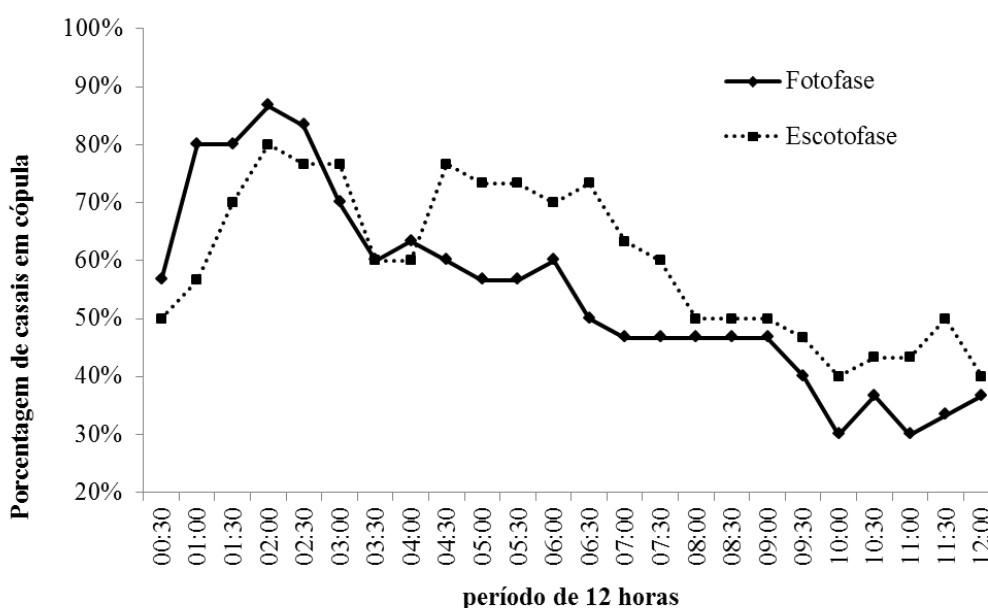


Fig. 5 Frequência de cópulas de *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) (com barras de erro) estimada a cada 30 min durante a 1ª – 12ª h da fotofase e escotofase.

Os machos permaneceram em atividade de guarda (montados nas fêmeas) por períodos que variaram de 5 – 160 min na fotofase e de 5 – 250 min na escotofase. Após a primeira cópula, 50% dos casais na fotofase e 36% na escotofase ficaram separados por um período de 5 – 365 min e 5 – 270 min, respectivamente. A atividade de guarda

foi observada por períodos que variaram entre 5 – 160 min na fotofase e entre 5 – 150 min na escotofase.

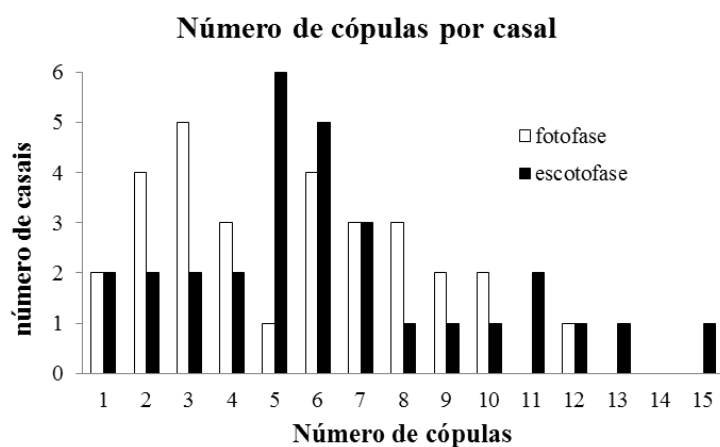


Fig. 6 Número de cópulas por casal de *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) estimada para os 30 casais analisados durante a fotofase e escotofase.

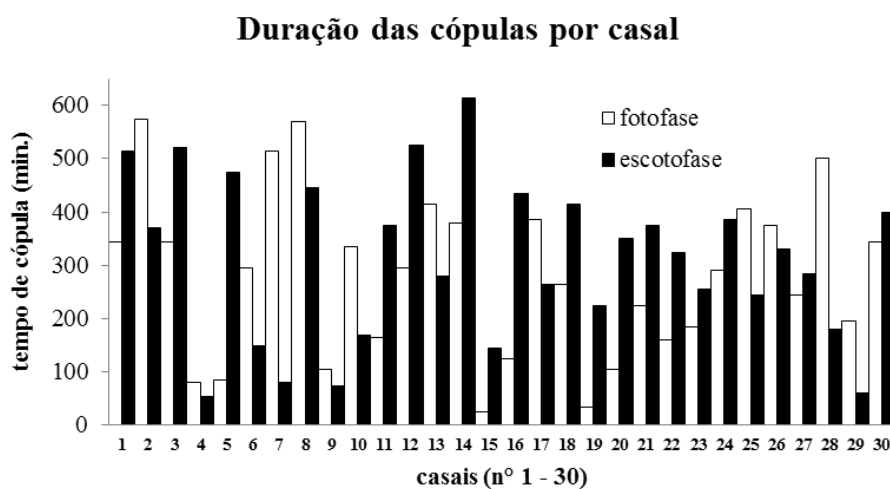


Fig. 7 Duração (min.) das cópulas por casal de *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) estimada para os 30 casais analisados durante a fotofase e escotofase.

Na comparação entre o número de cópulas na presença ou ausência de água, mais cópulas ocorreram na presença de água ($F = 479,86$; $P < 0,001$) (Fig. 8). Na ausência de água apenas três casais copularam.

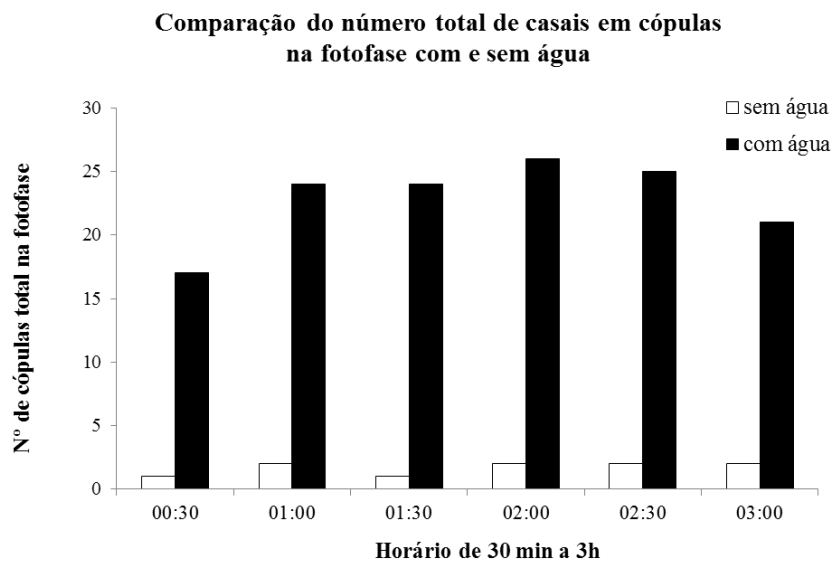


Fig. 8 Comparação do número total de casais de *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) em cópula na fotofase (30 min – 3h) com água e sem água.

4.3 Cópula na presença de machos rivais

Os casais reagiram contra o interesse dos machos rivais durante ou após a cópula. Os machos rivais andaram sobre o casal em cópula em 90% das repetições e 30% deles se posicionaram entre a fêmea e o macho. A única resposta observada do macho em cópula foi sua permanência sobre a fêmea, em atividade de guarda. Em 40% das réplicas, as fêmeas se afastaram dos machos rivais carregando os machos montados sobre elas.

4.4 Extração dos compostos cuticulares das fêmeas e resposta dos machos

Os machos não foram atraídos sexualmente às fêmeas lavadas com hexano (Fig. 9 a). Apenas após a reaplicação dos extratos cuticulares nas fêmeas, o reconhecimento sexual foi reestabelecido e 70% dos machos montaram nas fêmeas (Fig. 9 b).

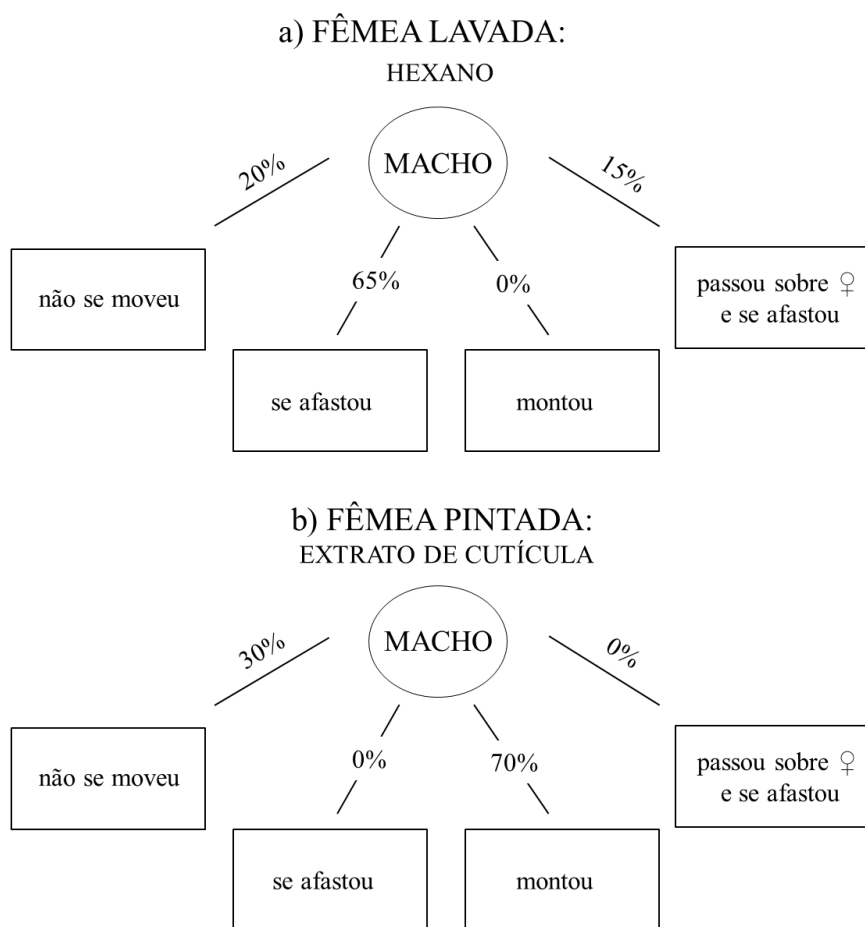


Fig. 9 Respostas comportamentais (em %) dos machos de *Oryzophagus oryzae* a fêmeas lavadas (a) e a fêmeas pintadas com extrato cuticular (b).

4.5 Extração de compostos cuticulares de machos e fêmeas

A análise dos extratos revelou a presença de quatro compostos majoritários nas fêmeas, com diferenças quantitativas entre os sexos (Fig. 10, Tabela I). Esses compostos foram identificados como aldeídos e cetona (hexadecanal, octadecanal, eicosanal e nonadeca-2-ona). Apesar das fêmeas terem apresentado maior concentração para todos os compostos (Fig. 10), não houve diferença significativa entre as concentrações presentes nos extratos cuticulares de machos e fêmeas (hexadecanal: $W = 27$, $P = 0,80$; octadecanal: $W = 34$, $P = 0,26$; nonadeca-2-ona: $W = 40$, $P = 0,053$; eicosanal: $W = 24$, $P = 1$) (Tabela I).

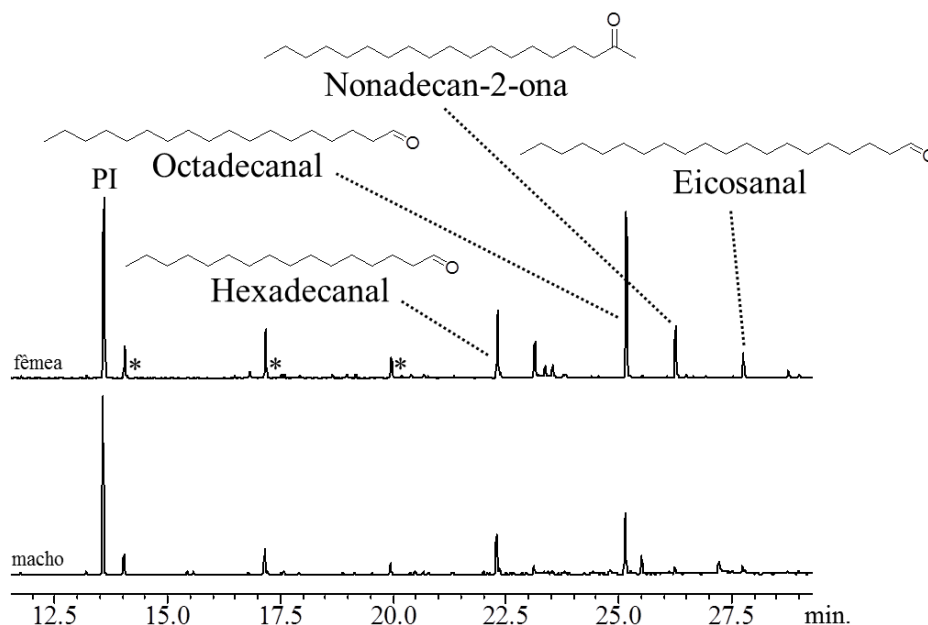


Fig. 10 Comparação dos perfis cromatográficos do extrato cuticular em hexano de machos e fêmeas de *Oryzophagus oryzae*. PI – padrão interno; * – contaminante ou sangramento de coluna.

Tabela I. Quantificação (ng) dos compostos químicos identificados nos extratos cuticulares de machos e fêmeas de *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) EP – erro padrão; ns – sem diferenças estatísticas.

TR	Compostos químicos	Fêmeas (ng)		Machos (ng)		
		Média	EP	Média	EP	
22,309	Hexadecanal	11,08	± 5,80	8,83	± 4,45	ns
25,159	Octadecanal	30,73	± 12,89	21,43	± 10,91	ns
26,259	Nonadecan-2-ona	8,98	± 4,56	7,11	± 6,20	ns
27,769	Eicosanal	3,83	± 1,83	14,61	± 13,20	ns

4.6 Aeração dos insetos, extratos de água e extratos de abdômen de *O. oryzae*

Não foram encontradas diferenças consistentes nos extratos de machos e fêmeas através das metodologias de extração testadas.

5 DISCUSSÃO

Os primeiros passos da sequência de comportamentos pré-cópula (*b-c*) (Fig. 4) revelaram que os machos tentaram copular várias vezes antes que as fêmeas os aceitassem como parceiros. As fêmeas recusaram a primeira tentativa de cópula 90% das vezes. Os machos tentaram copular com a mesma fêmea de 0-8 vezes antes de serem aceitos, com a média de quatro tentativas por macho. De acordo com Seymour e Sozou (2009), quando as fêmeas não aceitam os machos imediatamente, elas estão testando o macho. Os machos considerados com um fitness melhor têm duração de corte maior.

Em algumas espécies de gorgulhos, como *H. postica* (LeCato e Pienkowski 1970) e *Diaprepes abbreviatus* (L.) (Sirot et al. 2007), os machos utilizam um mecanismo chamado de “*tapping*” (carícia) ou “*stroking*” (passar a mão, alisar) para “acalmar” a fêmea prevenindo o esforço ou a preparando para a inserção do edeago. Em *H. postica*, imediatamente após a monta, o macho acaricia o pronoto e a cabeça da fêmea com suas antenas, tanto antes quanto durante a cópula. Em *D. abbreviatus*, o macho toca com suas antenas o tórax ou os élitros da fêmea. Nesta espécie, o macho também ocasionalmente fricciona o tarso do último par de pernas alternadamente aos ventritos abdominais da fêmea durante a cópula. Em *O. oryzae*, no passo *c* do experimento de comportamento pré-cópula (Fig. 2), os machos tocaram as fêmeas antes da cópula até que a fêmea os aceitasse. Depois de aceitos esse comportamento não foi mais observado, mas a re-cópula ocorreu até 15 vezes. Portanto, esse mecanismo de “*tapping*” ou “*stroking*” pode ter sido utilizado pelo macho para preparar a fêmea para a cópula.

Nos bioensaios de cópula observou-se que na escotofase, as cópulas tiveram duração média total de aproximadamente 310 min. Essa duração foi muito maior do que no gorgulho-da-alfafa, *Hypera postica* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae), que teve duração média de 58 min de monta (LeCato e Pienkowski 1970). Considerando o número de cópulas/casal, o valor máximo foi de 10 e 15 cópulas/casal, respectivamente, na fotofase e escotofase. Já os casais de *Hypera postica* copularam no máximo 10 vezes (LeCato e Pienkowski 1970). Por isso, pode-se dizer que os casais de *O. oryzae* possuem intensa atividade sexual, principalmente nas primeiras horas da fotofase e da escotofase.

Em um estudo com o gorgulho-da-batata-doce, *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire) (Coleoptera: Curculionidae), Sato e Kohama (2007) testaram duas hipóteses

referentes ao comportamento de guarda da fêmea pelos machos. As hipóteses eram de que a guarda da parceira sexual contribui para a prevenção de futuras cópulas com machos rivais (hipótese 1) e/ou contribui no ganho de novas cópulas (hipótese 2). Os autores concluíram que o comportamento de guarda em *E. postfasciatus* era explicado pela hipótese 2. Em nosso estudo, ambas as hipóteses podem ser aceitas. A primeira hipótese é suportada pelo fato de que os machos rivais disputaram as fêmeas com os machos em cópula e a atividade de guarda foi suficiente para prevenir que os machos rivais conseguissem copular. Comportamento este que já foi relatado para outros Curculionidae (Polak e Brown 1995). A segunda delas é corroborada pelo fato de que os casais re-copularam até 15 vezes.

Neste estudo observou-se que fêmeas de *O. oryzae* copularam várias vezes (2 – 15 vezes) com o mesmo macho e que estes permaneceram montados nas fêmeas após a primeira cópula, guardando as parceiras para re-cópula. Em outras espécies de Curculionidae, incluindo o gorgulho-da-alfafa *Odoiporus longicollis* Oliver e o gorgulho *Hylobitelus xiaoi* Zhang as fêmeas também foram observadas em cópula com o mesmo parceiro durante o dia e a noite (LeCato e Pienkowski 1970; Padmanaban e Sathiamoorthy 2001; Wen et al. 2004).

No sul do Brasil, durante o mês de outubro, adultos de *O. oryzae* se deslocam voando até as plantações de arroz onde se alimentam e se reproduzem, provavelmente estimulados pelo início das chuvas (Hickel, E. comunicação pessoal). O gorgulho-aquático-do-arroz nada muito bem e possui escamas com propriedades hidrofóbicas e um plastro que permite sua permanência embaixo d'água (Martins et al. 2012 – Anexo 1, referente ao Capítulo 2), além disso, as larvas são aquáticas e precisam de plantações irrigadas para sobreviverem. Por isso, as chuvas poderiam ser um indicativo de que os insetos teriam água para se reproduzirem. De acordo com os experimentos, a água foi um fator importante para que os casais se encontrassem, porque na ausência de água houve uma redução drástica no número de casais em cópula. Nos copos plásticos utilizados nos experimentos de cópula na ausência de água, fêmeas e machos andavam para localizar seus parceiros, enquanto que na presença de água, as fêmeas encontraram os machos nadando.

Apesar do uso de diferentes técnicas, métodos e solventes, os experimentos não evidenciaram a presença de nenhum composto químico nos machos que poderia explicar essa atração das fêmeas. Nesses experimentos, diferentes fatores foram levados em consideração, incluindo a emissão de compostos na água ou no ar, solventes com

polaridades diferentes que poderiam extrair melhor compostos de polaridades variáveis, o número de insetos por câmara de aeração.

Apesar de nenhum composto macho-específico ter sido detectado, as extrações cuticulares revelaram que os machos reconheceram os compostos de cutícula das fêmeas e responderam a eles com a monta. Esta resposta foi perdida após a lavagem das fêmeas e foi reestabelecida após as fêmeas terem sido pintadas com seus próprios extratos cuticulares. Analisando os cromatogramas dos extratos cuticulares de machos e fêmeas foram detectados os mesmos compostos, mas em concentrações diferentes. No entanto, essa diferença quantitativa não foi suportada pelas análises estatísticas, pois as concentrações variaram muito (Tabela I). Surpreendentemente, esses compostos não foram identificados como hidrocarbonetos, o que seria esperado para insetos de hábitos terrestres, mas como aldeídos (hexadecanal, octadecanal e eicosanal) e uma cetona (nonadecan-2-ona) (Fig. 10). Compostos pouco polares (e.g. hidrocarbonetos) não foram detectados em *O. oryzae* em quantidades significativas. Essa diferença da composição cuticular de *O. oryzae* com a de outros insetos pode estar relacionada com seus os hábitos aquáticos. Em testes preliminares, após as fêmeas terem sido pintadas com os quatro compostos cuticulares individualmente e agrupados, o reconhecimento pelos machos não foi reestabelecido, indicando que mais compostos poderiam estar envolvidos. O reconhecimento de fêmeas através dos compostos de cutícula também foi evidenciado no gorgulho-da-framboesa, *Aegorhinus superciliosus* (Guerin) (Coleoptera: Curculionidae). Nesta espécie, as extrações cuticulares revelaram que apesar de machos e fêmeas possuírem os mesmo compostos, suas concentrações foram diferentes e os machos reconheceram os compostos presentes na cutícula das fêmeas (Mutis et al. 2009).

No campo, milhares de adultos de *O. oryzae* podem ser encontrados nas plantações irrigadas de arroz, diminuindo a possibilidade de machos e fêmeas não se encontrarem. Possivelmente após a diapausa, as chuvas estimulem os insetos a voarem até as plantações de arroz aonde se alimentam e se reproduzem (Hickel E. comunicação pessoal). No entanto, a existência de um feromônio macho específico responsável pela atração de fêmeas, carregado pela água, não pode ser descartada, pois explicaria a atração das fêmeas no experimento da sequência de comportamentos pré-cópula (Fig. 4). Tal feromônio também explicaria a diminuição do número de cópulas na ausência de água.

Estudos futuros devem focar no desenvolvimento de métodos de extração de água que examinem a existência de semioquímicos em *O. oryzae* e em experimentos comportamentais que esclareçam a atração dos adultos às plantações.

6 CONCLUSÕES

A partir dos experimentos comportamentais foi observado que *O. oryzae* possui intensa atividade sexual nas primeiras horas da fotofase e escotofase, que os adultos copularam e re-copularam em qualquer horário do dia na presença de água, que os machos demonstram o comportamento de guarda da fêmea com duração variável, que preveniu a atividade sexual da fêmea com machos rivais e que permitiu a re-cópula e que as fêmeas foram sempre atraídas aos machos antes que eles tentassem a cópula.

Além disso, foi descrito o comportamento de “*tapping*” ou “*stroking*” com função de preparar as fêmeas para a cópula e foi demonstrada a importância da água para que as fêmeas encontrassem os machos nadando.

Os principais compostos encontrados nos extratos de cutícula de machos e fêmeas foram identificados como três aldeídos (hexadecanal, octadecanal e eicosanal) e uma cetona (nonadecan-2-ona), que seriam compatíveis com a polaridade no ambiente aquático, ao contrário dos hidrocarbonetos.

7 REFERÊNCIAS

- Ambrogi, B. G., Zarbin, P. H. G. (2008) Aggregation Pheromone in *Sternechus subsignatus* (Coleoptera: Curculionidae): Olfactory Behavior and Temporal Pattern of Emission. *Journal of Applied Entomology*. 132: 54–58.
- Arnqvist, G., Nilsson, T. (2000) The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Animal Behavior*. 60: 145–164.
- Carbonari, J. J., Martins, J. F. da S., Vendramim, J. D., Botton, M. (2000) Relação entre flutuação populacional de *Oryzophagus oryzae* (Costa Lima) (Coleoptera: Curculionidae) e período de perfilhamento de cultivares de arroz irrigado. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. 29: 361–366.
- Cross, J. V., Hall, D. R., Innocenzi, P. J., Hesketh, H., Jay, C. N., Burgess, C. M. (2006) Exploiting the aggregation pheromone of strawberry blossom weevil *Anthonomus rubi* (Coleoptera: Curculionidae): Part 2. Pest monitoring and control. *Crop Protection*. 25: 155–166.
- LeCato, G. L., Pienkowski, R. L. (1970) Laboratory mating behavior of the alfafa weevil *Hypera postica*. *Annals of the Entomological Society of America*. 63: 1000–1007.
- Lima, A. D. F. (1951) O bicho do arroz. *Boletim Fitossanitário*. 5: 49–53.
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2013) <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/arroz>. Acesso em: 17/01/13
- Martins, C. B. C., Almeida, L. M., Zarbin, P. H. G. (2012) Scanning electron micrographs of *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae), plastron structure and swimming behavior. *Micron*. 43: 321–325.
- Martins, J. F. da S., Terres, A. L. S., Botton, M. (1993) Alternativas de controle da bicheira-da-raiz visando um menor impacto ambiental. *Lavoura Arrozeira*. 46: 12–14.
- Martins, J. F. da S., M. Botton, Carbonari, J.J. (1996) Efeito de inseticidas no tratamento de sementes e na água de irrigação no controle de *Oryzophagus oryzae* (Costa Lima), em arroz irrigado. *Revista Brasileira de Agrociência*. 2: 27–32.
- Martins, J. F. da S., Carbonari, J.J., Prando, H.F. (2001) Gorgulho aquático-do-arroz, *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). In: Vilela, E.F.; R.A. Zicchi; F. Cantor (eds.). Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil, com ênfase na fruticultura. Ribeirão Preto: Holos. 2001. p.128–134.

- Marko, M. D., Newman, R. M., Gleason, F. K. (2005) Chemically mediated host-plant selection by the milfoil weevil: a freshwater insect-plant interaction. *Journal of Chemical Ecology*. 31: 2857–2874.
- Mutis, A., Parra, L, Palma, R. (2009) Evidence of Contact Pheromone Use in Mating Behavior of the Raspberry Weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology*. 38: 192–197.
- Padmanaban, B., Sathiamoorthy, S. (2001) The banana stem weevil *Odoiporus longicollis*. Montpellier: National Research Center for Banana. 5 p. Musa Pest Fact.Sheet,5).<http://bananas.bioversityinternational.org/files/files/pdf/publication/s/pest5.pdf>. Acesso em: 08/06/10.
- Polak, M., Brown, W. D. (1995) Mating tactics and courtship behavior in *Cleogonus rubetra* (Fabricius) (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Insect Behavior*. 8: 453–46.
- Prando, H. F., Sosa-Gomez, D. R. (1998) *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e fipronil para o controle de *Oryzophagus oryzae* (Col., Curculionidae), em arroz irrigado, sistema pré-germinado, pag. 86. In: Resumos do 17 Congresso Brasileiro de Entomologia. Sociedade Entomológica do Brasil/Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Pugliese, A. (1955) A larva da raiz do arroz. *Lavoura Arrozeira*. 9: 17–18.
- Pulver, E., Carmona, L. C. (2004) Reduzindo as lacunas de produtividade em arroz irrigado na Venezuela e no Rio Grande do Sul. Relatório Anual – Safra 2004/2005. Cachoeirinha, 54p.
- R Development Core Team (2011) R: a language and environment for statistical computing. <http://www.R-project.org>.
- Reeves, J. L., Lorch, P. D. (2011) Visual Active Space of the Milfoil Weevil, *Euhrychiopsis lecontei* Dietz (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Insect Behavior*. 24: 264–273.
- Romano, F. C., D’Agostino, F. (2003a). Eficiência de captura de adultos da moleque da bananeira *Cosmopolites sordidus* através da utilização do atrativo alimentar COSMOLURE[®]. Em: www.biocontrole.com.br/artigos/artigo_cosmolure.doc Acesso em: 07/10/2008
- Romano, F. C., D’Agostino, F. (2003b). Controle da broca do coqueiro através da utilização de feromônio de coleta massal. Em: www.biocontrole.com.br/artigos/artigo_rmd1.doc Acesso em: 07/10/2008.

- Sato, Y., Kohama, T. (2007) Post-copulatory mounting behavior of the West Indian sweetpotato weevil, *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire) (Coleoptera: Curculionidae). *Ethology*. 113: 183–189.
- Seymour, R. M., Sozou, P. D. (2009) Duration of courtship effort as a costly signal. *Journal of Theoretical Biology*. 256: 1–13.
- Silva, F. F. da, Martins, J. F. da S., Grützmacher, A. D., Storch, G., Azevedo, R., Giolo, F. P. (2003). Avaliação da resistência de arroz a *Oryzophagus oryzae* com e sem chance de escolha da planta hospedeira. *Revista Brasileira de Agrociência*. 9: 135–140.
- Sirot, L. K., Brockmann, H. J., Lapointe, S. L. (2007) Male postcopulatory reproductive success in the beetle, *Diaprepes abbreviatus*. *Animal Behavior*. 74: 143–152.
- Stark, J. D., Goyer, R. A. (1983) Life-cycle and behavior of *Neochetina eichhorniae* Warner (Coleoptera: Curculionidae) in Louisiana – A biological control agent of waterhyacinth. *Environmental Entomology*. 12: 147–150.
- Wen, X., Kuang, Y., Shi, M., Li, H., Luo, Y., Deng, R. (2004) Biology of *Hylobitelus xiaoi* (Coleoptera: Curculionidae), a new pest of slash pine, *Pinus elliottii*. *Journal of Economic Entomology*. 97: 1958–1964.
- Wright, A. D., Center, T. D. (1984) Predicting population intensity of adult *Neochetina eichhorniae* (Coleoptera: Curculionidae) from incidence of feeding on leaves of waterhyacinth *Eichhornia crassipes*. *Environmental Entomology*. 13: 1478–1482.

CAPÍTULO 2

Micrografias eletrônicas, plastro e comportamento de natação de *Oryzophagus oryzae* (Lima, 1936) (Coleoptera: Curculionidae)

Os resultados deste capítulo estão publicados
na revista Micron/2012 (vide Anexo 1)

CAPÍTULO 2

Micrografias eletrônicas, plastro e comportamento de natação de *Oryzophagus oryzae* (Lima, 1936) (Coleoptera: Curculionidae)

Resumo

As estruturas morfológicas de *Oryzophagus oryzae* e o comportamento de natação deste inseto foram estudados e comparados com outros gorgulhos e besouros aquáticos. A utilização da microscopia eletrônica permitiu o reconhecimento de três tipos de escamas hidrofóbicas e a caracterização de dois tipos de sensilas (tricóide e escamiforme). Com base em observações ao microscópio, evidências morfológicas e comparações com outras espécies de Curculionidae, foi suportada a hipótese de que as trocas gasosas em adultos de *O. oryzae* são realizadas através de uma bolsa de ar presente abaixo dos élitros e mantida por escamas hidrofóbicas e pela margem interna denteada dos élitros. A estrutura do plastro de *O. oryzae* é idêntica a da praga do arroz irrigado dos Estados Unidos, *Lissorhoptrus oryzophilus* permitindo a utilização dos mesmos métodos de controle baseados na ruptura do plastro e na armadilha de captura de adultos para as duas espécies.

Palavras-chave: trocas gasosas; sensilas antenais; praga do arroz; pelos hidrofóbicos.

Scanning electron micrographs, plastron structure and swimming behavior of *Oryzophagus oryzae* (Lima, 1936) (Coleoptera: Curculionidae)

Abstract

The morphological structures and the swimming behavior of *Oryzophagus oryzae* were studied and compared with various weevils and other relevant species. The use of scanning electron microscopy facilitated the recognition of three different hydrophobic scales and two types of sensilla, trichoid and squamiform. Based on the microscopic observations of behavior, morphological evidence, and comparisons with other curculionid species, it was supported that the gas exchange in *O. oryzae* adults relies on a subelytral air store maintained by hydrophobic scales and a ribbed margin on the adult elytra. This plastron structure is identical to that of *Lissorhoptrus oryzophilus* supporting the application of similar control measures based on plastron disruption for both species.

Keywords: air exchange; antennal sensilla; rice pest; hydrophobic hairs.

1 INTRODUÇÃO

O curculionídeo *Oryzophagus oryzae* (Lima, 1936) é a praga de arroz irrigado mais importante do sul do Brasil (Santa Catarina e Rio Grande do Sul). Larvas e adultos tem hábito aquático e são encontrados dentro d'água. As larvas se alimentam das raízes do arroz, danificando a planta e causando perdas significativas na produção (Grutzmacher et al. 2008). Os adultos se alimentam raspando o parênquima foliar e entram em diapausa durante os meses frios, em locais secos e próximos às plantações de arroz, na base de gramíneas (Mielitz et al. 1996).

Apesar da importância agrícola de *O. oryzae*, estudos que investiguem seus aspectos biológicos e seus hábitos de vida são escassos (e.g. Prando 1999). Com base nesses estudos, informações importantes poderiam ser utilizadas no desenvolvimento de novas estratégias de controle e monitoramento. A medida de controle mais utilizada é através da aplicação de inseticidas, que depende do número de larvas coletadas nas raízes do arroz. Para *Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel, 1952 (Coleoptera: Curculionidae), praga do arroz irrigado em plantações nos EUA, cujo hábito de vida é muito similar ao de *O. oryzae*, o monitoramento é realizado através da contagem do número de adultos nadando na água de irrigação (Hix et al. 2001). Neste caso, a armadilha utilizada foi desenvolvida com base nas atividades aquáticas desta espécie. Essa armadilha, desenvolvida com base na profundidade de natação dos adultos, é checada a cada 24h - 36h e o número de adultos capturados é proporcional ao de larvas presentes nas raízes.

Outra metodologia pouco estudada que pode ser utilizada no controle de pragas aquáticas é baseada na interrupção do plastro, como por exemplo, para espécies de *Lissorhoptrus* spp. (Hix et al. 2000; Leite et al. 1992). Neste estudo, óleo vegetal foi utilizado para romper o plastro. Esta estrutura, também chamada de plastrão, é um filme de ar que funciona como uma brânquia física (troca de gases) e está localizada geralmente sob as asas ou na superfície ventral do corpo de besouros e percevejos aquáticos quando submergem e pode ser mantida através de cerdas hidrofóbicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Tendo em vista os métodos de controle testados para *Lissorhoptrus* spp., o objetivo geral deste estudo foi investigar o comportamento de natação de *Oryzophagus oryzae* e, através da microscopia eletrônica, confirmar ou refutar a existência do plastro.

2.2 Específicos

- Investigar as características de natação de *O. oryzae* e compara-las com outras espécies de insetos aquáticos, principalmente *Lissorhoptrus oryzophilus*.
- Analisar as estruturas encontradas nas micrografias eletrônicas de *O. oryzae* avaliando possíveis funções na formação do plastro e compará-las entre os sexos e com outras espécies de insetos aquáticos, principalmente *L. oryzophilus*

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Insetos e comportamento de natação

Os insetos examinados para este estudo foram obtidos da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) em Itajaí, Santa Catarina, em outubro de 2009, e mantidos em potes plásticos com plantas de arroz germinadas no laboratório com aproximadamente 30 dias de idade. Posteriormente, foram separados para os estudos de comportamento de natação e de microscopia eletrônica.

Em uma placa de Petri graduada em cm, 25 e 10 adultos foram filmados em vista dorsal e ventral, respectivamente. Em um recipiente de vidro transparente, 10 insetos foram filmados em vista lateral. Em todos os casos, os adultos foram filmados nadando por 5 min. Para a determinação da velocidade média (V_m) e o número de golpes/min, com um golpe consistindo em uma protração e retração completas (Hix et al. 2000), vinte adultos foram examinados e os quatro períodos mais longos de nado (pelo menos 5 cm percorridos em cada caso) foram considerados. Em todas as filmagens foi utilizada uma câmera Canon A2000.

Durante a filmagem, os insetos também foram observados em relação a qualquer comportamento relacionado a formação e/ou manutenção de um plastro. Após a filmagem, os insetos foram examinados em microscópio estereoscópico na procura de aspectos morfológicos que contribuíssem para sua permanência embaixo d'água.

3.2 Microscopia Eletrônica

Após sacrificados os insetos tiveram o segundo par de pernas removido e foram dissecados entre a cabeça e o protórax, e entre o protórax e o mesotórax. As estruturas foram montadas sobre uma fita de cobre fixada em placas de alumínio, de maneira a apresentar as estruturas de interesse, e posteriormente cobertas com ouro. Os espécimes foram examinados em microscópio eletrônico Jeol JSM 6360LV no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná. As microscopias eletrônicas (MEs) de *O. oryzae* foram comparadas com as das seguintes espécies aquáticas e terrestres presentes na literatura: *L. oryzophilus* (Hinton 1976; Hix et al. 2003); *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus, 1758) (Said et al. 2003); *Hypera postica* (Gyllenhal, 1813) (Bland, 1981); *Curculio caryae* (Horn, 1873) (Hatfield et al. 1976); *Endalus disgregus* Burke, 1961 (= *Notiodes*), *Eubrychius velatus* (Beck, 1817), *Neochetina bruchi* Hustache, 1926 e *Hydronomus alismatis* (Marsham, 1802) (=

Bagous) (Hinton 1976); *Hypera meles* (F.) (Smith et al. 1976); e *Elmis maugéi* (Bedel) (Thorpe e Crisp 1949).

A classificação das sensilas encontradas nas MEs de *O. oryzae* foram baseadas em Zacharuk (1985), e a nomenclatura das escamas e sensilas foi baseada em Hix et al. (2003): escamas hidrofóbicas I, II e III – ramificadas, plumosas e de finas camadas, respectivamente; sensilas tricóides – sensilas setiformes de forma sigmoide com pontas com ganchos; sensilas escamiformes I e II – sensilas de forma espatulada.

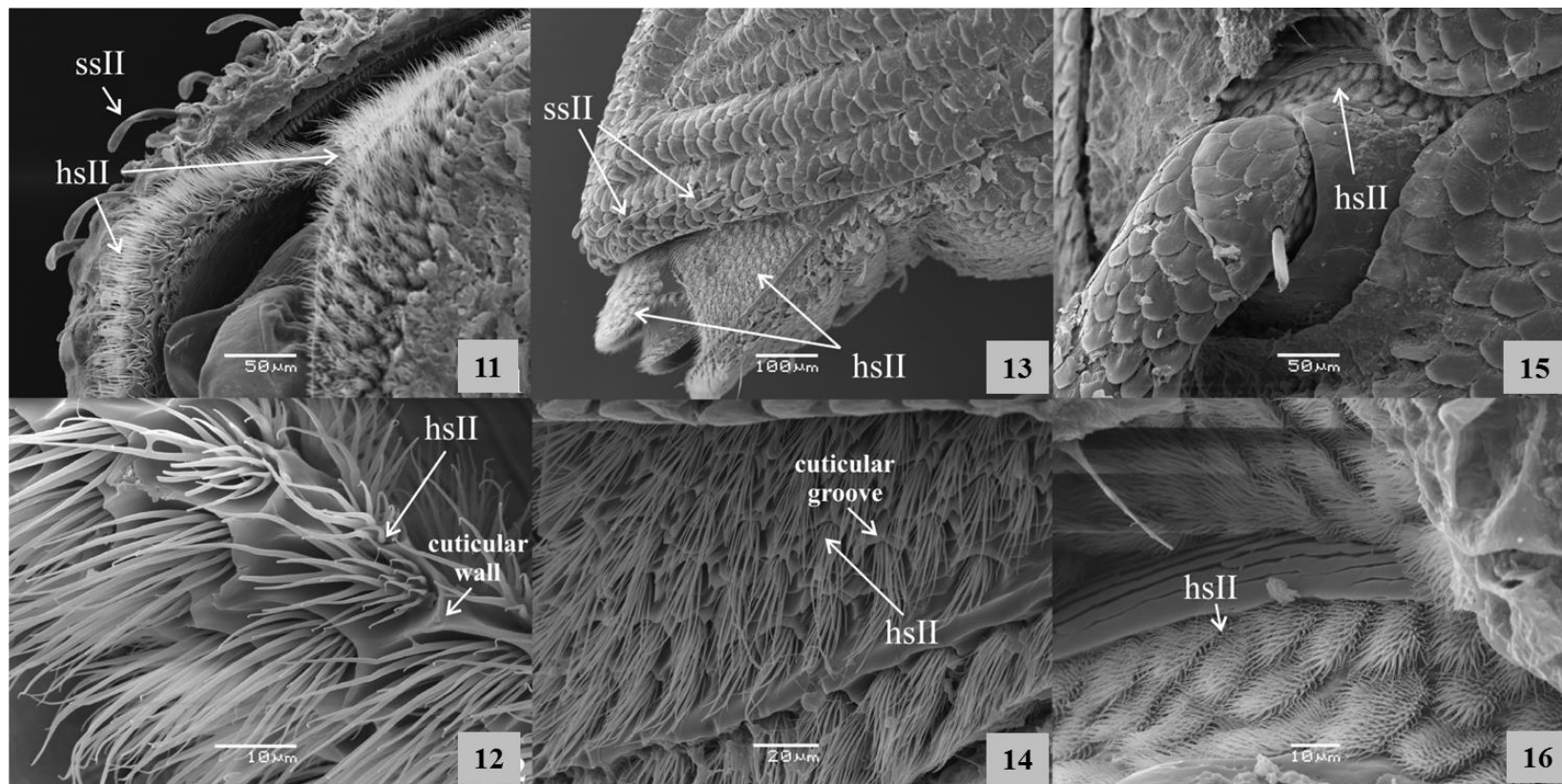
4 RESULTADOS

4.1 Bioensaio de natação e comportamento aquático

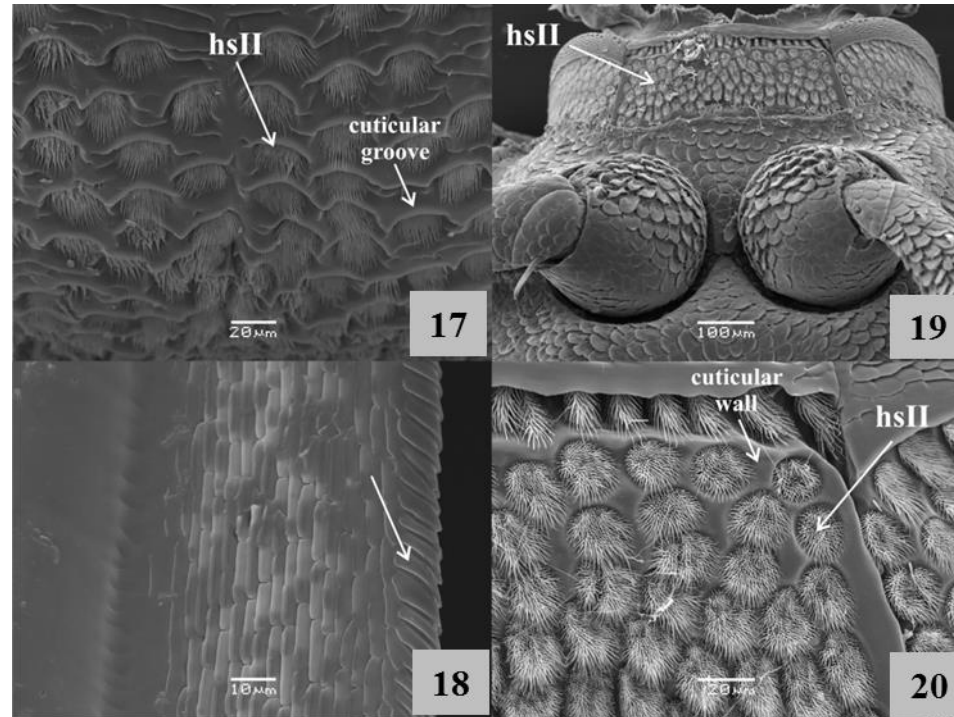
A cutícula dos adultos de *O. oryzae* é hidrofóbica e, até estes se encontrem completamente submersos, tenderam a permanecer suspensos pela tensão superficial da água. Após completamente submersos, os insetos nadaram principalmente abaixo da superfície da água com $V_m = 0,96 \pm 0,29$ /seg, com alcance de 0,63 a 1,66 cm/seg e tempo médio de golpes de natação de $0,17 \pm 0,04$ segundos. No total, foram 5,85 golpe/seg. A propulsão foi alcançada através das pernas mesotorácicas, que se moveram sincronicamente durante a protração e retração, funcionando como um remo (achatadas ântero-posteriormente). As pernas protorácicas (estendidas para frente) e as metatorácicas (estendidas para trás) funcionaram como estabilizadores. A virada foi conseguida de forma idêntica a de *L. oryzophilus* com “a perna mesotorácica oposta à direção da virada completando a sequência de protração e retração e a perna mesotorácica do lado da virada empregando uma sequência de protração e retração mais curta” (Hix et al. 2000). O modo de natação de *O. oryzae* é idêntico ao descrito para *L. oryzophilus*. Desta forma, utilizou-se como modelo as figuras representativas apresentadas em Hix et al. (2000), que estão no Anexo 2.

4.2 Microscopia Eletrônica

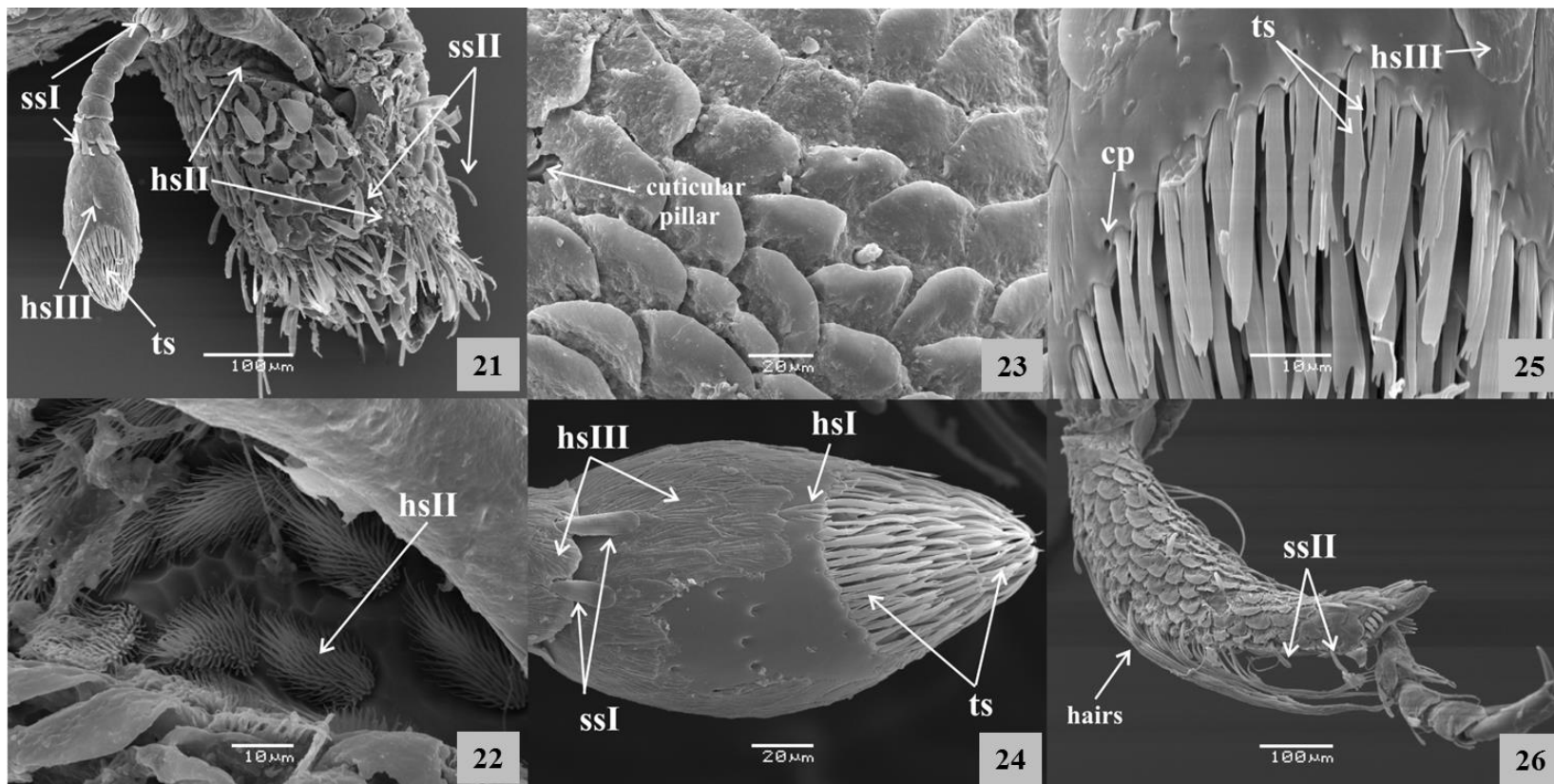
Machos e fêmeas de *O. oryzae* apresentam o corpo cobertos por escamas. Não houve diferenças entre machos e fêmeas baseado nessas estruturas. Em ambos os sexos ocorrem três tipos de escamas hidrofóbicas (hsI, hsII, hsIII), dois tipos de sensilas escamiformes (ssI, ssII) e uma sensila tricóide (ts) (Fig 5-20). Suas localizações, densidades e tamanhos encontram-se na Tabela II.



Figs. 11-16. Microscopia eletrônica de *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). 11) Vista ventral do abdômen da fêmea: escama hidrofóbica (hsII) e sensila escamiforme (ssII); 12) Escama hidrofóbica (hsII) com projeções longas no interior de projeções de cutícula; 13) Vista lateral do abdômen do macho: escama hidrofóbica (hsII) e sensila escamiforme (ssII); 14) Escama hidrofóbica (hsII) com projeções longas no interior de poços formados por cutícula; 15) Vista lateral da coxa posterior do macho: escama hidrofóbica (hsII); 16) Vista aproximada das escamas hidrofóbicas (hsII) na coxa posterior do macho.



Figs. 17-20. Microscopia eletrônica de *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). 17) Vista ventral da cabeça da fêmea: escama hidrofóbica (hsII) com projeções curtas no interior de poços formados pela cutícula; 18) Vista ventral do élitro do macho, com foco na margem e sua estrutura estriada; 19) Vista ventral da junção do pro e mesonoto da fêmea: escama hidrofóbica (hsII); 20) Vista aproximada da escama hidrofóbica (hsII) com projeções curtas no interior de projeções cuticulares na junção do pro e mesonoto da fêmea.



Figs. 21-26. Microscopia eletrônica de *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). 21) Vista lateral do rostró e antena do macho: sensilas escamiformes (ssI, ssII), escamas hidrofóbicas (hsII, hsIII), e sensila tricóide (ts). 22) Vista aproximada do escrobo: escamas hidrofóbicas (hsII); 23) Vista dorsal do élitro do macho: pilares cuticulares suportando as escamas; 24) Vista aproximada da clava da antena da fêmea: escamas hidrofóbicas (hsI, hsIII), sensila escamiforme (ssI), e sensila tricóide (ts). 25) Vista aproximada da clava da antena do macho: cuticular pit (cp), escama hidrofóbica (hsIII), e sensila tricóide (ts); 26) Vista lateral da mesotórax do macho e tarsos: pelos e sensila escamiforme (ssII).

5 DISCUSSÃO

De acordo com Chapman (1969), a maioria dos insetos utiliza as pernas posteriores, ou menos frequentemente, as pernas mesotorácicas para o nado. Ambas as pernas podem ser achatadas ântero-posteriormente, formando uma estrutura parecida com um remo. O gorgulho-aquático-do-arroz utiliza as pernas mesotorácicas em forma de remo para nadar e as pernas anteriores e posteriores têm função de estabilização. Os movimentos de natação de *O. oryzae* foram idênticos aos do gorgulho-do-arroz-irrigado dos EUA, *L. oryzophilus* (Hix et al. 2003), utilizando as pernas mesotorácicas para a propulsão. Suas velocidades, no entanto, não são similares, pois *L. oryzophilus* é mais rápido, com $V_m = 1,53$ cm/seg (variação de 0,88 a 2,52 cm/seg) e média de golpes por segundo de 5,67 (Hix et al. 2000).

Além de *L. oryzophilus*, nenhum outro gorgulho possui a mesma técnica de natação de *O. oryzae*. Essas duas espécies pertencem à mesma subfamília Erihrininae que forma um grupo monofilético com Curculioninae (Marvaldi 1997). Os curculionídeos, *Ochetina uniformis* Pascoe e *Ludovix fasciatus* (Gyllenhal), nadam com os três pares de pernas, mas em *L. fasciatus* as pernas meso-torácicas tem função principal na propulsão (Sousa et al. 2007). O modo de nado de *O. oryzae* também diferiu de *Litodactylus leucogaster*, que utiliza os três pares de pernas para a propulsão (Buckingham e Bennett 1981) e de *Bagous cavifrons* LeConte e *B. americanus* LeConte que utilizam as pernas protorácicas para propulsão e alternam as pernas meso e metatorácicas empurrando-as contra a tensão superficial da água (O'Brien e Marshall 1979).

Já a cutícula recoberta por escamas hidrofóbicas de *O. oryzae* não tem função de manter os insetos na superfície da água como ocorre em *Podura aquatica* Linnaeus, 1758 (Collembola: Isotomidae), que podem se mover sobre ou na superfície da água (Chapman 1969).

Machos e fêmeas de *O. oryzae* interagem e copulam embaixo da água e podem permanecer embaixo d'água por longos períodos de tempo. Chapman (1969) comentou que insetos que permanecem constantemente submersos respiram por brânquias ou através de um plastro, sugerindo que a cutícula a prova d'água está relacionada aos hábitos respiratórios. Em observações sob lupa foi possível notar bolhas de ar na porção final do abdômen de machos e fêmeas que eram liberadas ou sugadas novamente para a região do subélitro. Notou-se também que os insetos flutuaram rapidamente para a

superfície da água após se soltarem das plantas de arroz, indicando que estavam guardando ar. Sem as plantas de arroz para se segurarem, os adultos não conseguiram ficar embaixo d'água no fundo do copo por muito tempo.

Tabela II. Localização e mensurações das escamas, sensilas e orifícios cuticulares de *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae).

Estrutura	Local	Tamanho
Sensila tricóide (ts)	Clava da antena	12-24 μm
Sensila Escamiforme I (ssI)	Antena: 1 ^o e 6 ^o segmento funicular	17,5-27,5 μm
Sensila Escamiforme II (ssII)	Rostro, élitro e tibia	30-105,7 μm
Escama hidrofóbica I (hsI)	Clava da antena	18,4 μm
Escama hidrofóbica II (hsII)	Rostro, coxas, junção do pronoto e mesonoto, junção do fêmur e tibia, porção final do abdômen, cabeça.	20,5-39,6 μm
Escama hidrofóbica III (hsIII)	Antena: 2 ^o , 5 ^o e 6 ^o segmento funicular e clava	25-32 μm
Orifícios cuticulares (cp)	Clava da antena	0,8 μm

As MEs mostraram que *O. oryzae* possui escamas com propriedades hidrofóbicas na porção final do abdômen (Fig. 11-16), nas coxas (Fig. 15-16), na junção da cabeça com o protórax (Fig. 17), na junção do mesotórax e metatórax (Fig. 19-20), e na cabeça (Fig. 21-22, 24). Estas escamas estão estrategicamente posicionadas e podem manter o plastro subelital conectado com os espiráculos, numa estrutura parecida à descrita para a espécie *Elmis maugaei* (Bedel). De acordo com Flynn e Bush (2008), o plastro deve estar em contato com os espiráculos para permitir a troca de gases. No entanto, em *E. maugaei* essa estrutura foi utilizada também no ajuste da flutuação (Thorpe e Crisp 1949), e em *O. oryzae* não foi observado nenhum ajuste dessa função. Em *O. oryzae*, além das escamas, que formam uma superfície hidrofóbica, a manutenção do plastro também se deve à margem interna denteada dos élitros (Fig. 18), permitindo o encaixe perfeitamente ajustado e prevenindo a entrada de água ou a saída do ar. O plastro mantido abaixo dos élitros de *O. oryzae* possui o mesmo padrão

descrito para *L. oryzaophilus*, mantido por uma cutícula com propriedades hidrofóbicas e escamas que repelem água.

Ainda em *L. oryzaophilus*, outro plastro estruturado abaixo das escamas do corpo, foi sugerido. O plastro seria suportado por numerosos pilares verticais que se ligam à cutícula e se localizam abaixo das escamas na superfície do corpo, permitindo a formação de uma lacuna de ar. Similarmente, em *O. oryzae* também foram observados pilares abaixo das escamas da superfície ventral do tórax, do abdômen e dos élitros (Fig. 23). Essa área de plastro poderia manter comunicação com o ar estocado embaixo dos élitros através do sulco das articulações entre as margens laterais dos élitros, o esterno abdominal e a pleura torácica abdominal. No entanto, apenas um estudo mais detalhado nessas estruturas de *O. oryzae* poderia confirmar essa suposta conexão.

Em relação às escamas hidrofóbicas de *O. oryzae*, a escama hsI foi encontrada na clava da antena (Fig. 24), onde camadas finas de ar foram observadas na lupa embaixo d'água. Essa camada de ar suporta a hipótese de Hix et al. (2003) para *L. oryzaophilus*, de que sua função é formar uma bolha associada à clava da antena do inseto. As escamas hsII são plumosas e foram encontradas no interior de sulcos cuticulares (Figs. 14 e 17) e de paredes cuticulares projetadas (Figs. 12 e 20), mais curtas (Fig. 15-17, 20) ou mais longas (Figs. 11-14). Na porção final do abdômen, foi possível observar escamas hsII no interior de paredes cuticulares e sulcos com projeções mais longas (Figs. 11-14), que alcançaram mais de 39 µm. As escamas hsII presentes nas articulações da cabeça, e entre o pronoto e o mesonoto tiveram projeções menores e também estavam dentro de sulcos cuticulares (Figs. 17, 19 e 20). As projeções das escamas hsII presentes ventralmente entre as junções coxais anteriores, médias e posteriores (Figs. 15 e 16), no rostro e no escrobo (Figs. 21 e 22), também eram menores e não estavam no interior de sulcos ou paredes cuticulares. Escamas com estruturas similares foram encontradas atrás dos olhos de *Hydronomus alismatis* (= *Bagous*), *Bagous limosus*, e no segundo e quinto ventritos abdominais de *Eubrychius velatus* (Beck, 1817) (Coleoptera: Curculionidae) e *Neochetina bruchi* Hustache, 1926 (Coleoptera: Curculionidae), respectivamente (Hinton 1976). As escamas do tipo hsIII são finas e estavam posicionadas adjacentes umas às outras, cobrindo o segundo, quinto e sexto segmentos funiculares e a clava da antena de *O. oryzae* (Figs. 18, 21 e 22).

As sensilas escamiformes foram encontradas no último segmento do funículo e pedicelo (ssI) da antena de *O. oryzae* (Figs. 21 e 24). As sensilas do tipo ssI não foram encontradas nas antenas de outros curculionídeos, exceto em *L. oryzaophilus* (Hix et al.

2003). Sensilas escamiformes maiores (ssII) foram encontradas nos élitros (Figs. 11 e 13), rostró (Fig. 21) e pernas (Fig. 26). Na mesotibia foram encontrados muitos pelos (Fig. 26) utilizados durante a natação. A provável função das sensilas escamiformes está relacionada à propriorrecepção e mecanorrecepção, indicando a posição da antena em relação à orientação do corpo (ssI) e a velocidade de natação (ssII) (Hix et al. 2003).

Apesar das sensilas tricóides (ts) estarem presentes na clava das antenas, elas são muito diferentes das sensilas tricóides de outros curculionídeos (Bland 1981; Hatfield et al. 1976; Smith et al. 1976) que geralmente possuem uma base cilíndrica mais larga e uma ponta mais fina. O pelo do tipo III descrito na antena de *R. palmarum* (Said et al. 2003) se parece com a sensila tricóide (ts) de *O. oryzae*, pois podem ser divididas em duas (bífido); no entanto, em *O. oryzae*, podem ser três ou múltiplas divisões na ponta da sensila, especialmente na primeira fila de sensilas (Fig. 24 e 25). No ápice da clava, as sensilas tricóides são mais curtas, finas e cilíndricas. Conforme vão se aproximando da base da clava, as ts vão ficando mais compridas e menos cilíndricas. Outras ts mais longas ainda puderam ser observadas no abdômen, rostró e pernas de *O. oryzae*. As ts das antenas têm provável função olfatória e gustatória, mas de acordo com Altner e Prillinger (1980), apenas após a investigação das estruturas internas das sensilas, seria possível definir sua função.

As escamas hidrofóbicas hsI, hsII, e hsIII e as sensilas escamiformes ssI e ssII também foram encontradas em *L. oryzaophilus* nos mesmos locais (Hix et al. 2003). Já os pelos chamados de “tuft hairs” encontrados no primeiro segmento funicular das antenas de *L. oryzaophilus* não foram observados em *O. oryzae*.

Hix et al. (2000) sugeriram que surfactantes, microrganismos e outros agentes poderiam ser utilizados na interrupção do plastro de *L. oryzaophilus*. Leite et al. (1992) mostraram que o óleo de soja ou o óleo de soja adicionado a *Beauveria bassiana* promoveram o controle de 100% de adultos de *Lissorhoptrus* spp.

6 CONCLUSÕES

Observou-se que *O. oryzae* tem o comportamento de natação idêntico ao de *L. oryzaophilus* baseado na propulsão pelo movimento do segundo par de pernas, funcionando o primeiro e o terceiro pares de pernas como estabilizadores. Foi suportada a existência de um plastro localizado abaixo dos élitros e mantido por escamas hidrofóbicas e pela margem interna denteada dos élitros. Foram encontradas escamas recobrendo os corpos de machos e fêmeas e, em ambos os sexos, três tipos de escamas

hidrofóbicas (hsI, hsII, hsIII), dois tipos de sensilas escamiformes (ssI, ssII) e uma sensila tricóide (ts) foram encontradas. Em função da similaridade da estrutura de manutenção do plastro e do comportamento natatório de *O. oryzae* e *L. oryzophilus*, pode-se concluir que as mesmas medidas de controle baseadas na interrupção do plastro por surfactantes e na armadilha de captura de adultos (formada por um objeto flutuante e outro de captura), poderiam ser utilizadas no controle e monitoramento de ambas as espécies.

7 REFERÊNCIAS

- Altner, H., Prillinger, L. (1980) Ultrastructure of invertebrate chemo-, thermo-, and hygroreceptors and its functional significance. *International Review of Cytology*. 67: 69–139.
- Bland, R. G. (1981) Antennal Sensilla of the Adult Alfalfa Weevil, *Hypera-Postica* (Gyllenhal) (Coleoptera: Curculionidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*. 10: 265–274.
- Buckingham, G. R., Bennett, C. A. (1981) Laboratory Biology and Behavior of *Litodactylus-Leucogaster* Coleoptera, Curculionidae, a Ceutorhynchine Weevil That Feeds on Watermilfoils Haloragaceae, *Myriophyllum*. *Annals of the Entomological Society of America*. 74: 451–458.
- Chapman, R. F. (1969) Locomotion, in: Chapman, R.F., The insects: structure and function. The English Universities Press Ltd. London, pp. 142–164.
- Flynn, M. R., Bush, J. W. M. (2008) Underwater breathing: the mechanics of plastron respiration. *Journal of Fluid Mechanics*. 608: 275–296.
- Grutzmacher, A.D., Martins, J.F.D., da Cunha, U.S., Giolo, F.P., das Neves, M.B., Harter, W. D., Franco, D. F., Mattos, M. L. T. (2008) Viability of the advance rice seed treatment with insecticides in relation to sowing date in the control of *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Ciencia Rural*. 38: 1830–1835.
- Hatfield, L. D., Frazier, J. L., Coons, L. B. (1976) Antennal sensilla of the pecan weevil, *Curculio caryae* (Horn) (Coleoptera: Curculionidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*. 5: 279–287.
- Hinton, H. E. (1976) Plastron Respiration in Bugs and Beetles. *Journal of Insect Physiology*. 22: 1529–1550.

- Hix, R. L., Johnson, D. T., Bernhardt, J. L. (2000) Swimming behavior of an aquatic weevil, *Lissorhoptrus oryzophilus* (Coleoptera: Curculionidae). *Florida Entomologist*. 83: 316–324.
- Hix, R. L., Johnson, D. T., Bernhardt, J. L. (2001) Trapping adult *Lissorhoptrus oryzophilus* (Coleoptera: Curculionidae) with aquatic barrier traps. *Environmental Entomology*. 30: 770–775.
- Hix, R. L., Johnson, D. T., Bernhardt, J. L. (2003) Antennal sensory structures of *Lissorhoptrus oryzophilus* (Coleoptera: Curculionidae) with notes on aquatic adaptations. *Coleopterists Bulletin*. 57: 85–94.
- Leite, L. G., Camargo, L. M. P. C. A., Filho, A. B., Urashima, A. S., Asayama, T., Leite N., Vilella, O., Prada, W. L. A. (1992) Control of water weevil adults on irrigated rice fields through the mix of *Beauveria bassiani* fungi with soybean oil. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. 21: 83–94.
- Marvaldi, A. E. (1997) Higher Level Phylogeny of Curculionidae (Coleoptera: Curculionoidea) based mainly on Larval Characters, with Special Reference to Broad-Nosed Weevils. *Cladistics*. 13: 285–312.
- Mielitz, L. R., Becker, M., Romanowski, H. P. (1996) Hibernation dynamics of *Oryzophagus oryzae* and its implications for management. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 78: 159–166.
- O'Brien, C. W., Marshall, G. B. (1979) U.S. Bagous, bionomic notes, a new species, and a new name (Bagoini, Eirrhiniinae, Curculionidae, Coleoptera). *Southwestern Entomologist*. 4: 141–149.
- Prando, H. F. (1999) Aspectos bioetológicos e de controle de *Oryzophagus oryzae* (Costa Lima, 1936) (Coleoptera: Curculionidae) em arroz irrigado, sistema de cultivo pré-germinado. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná.
- Said, I., Tauban, D., Renou, M., Mori, K., Rochat, D. (2003) Structure and function of the antennal sensilla of the palm weevil *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Insect Physiology*. 49: 857–872.
- Smith, C. M., Frazier, J. L., Coons, L. B., Knight, W. E. (1976) Antennal Sensilla of Clover Head Weevil *Hypera meles* (F) (Coleoptera, Curculionidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*. 5: 349–355.
- Sousa, W. O., Marques, M. I., Rosado-Neto, G. H., Adis, J. (2007) Surface swimming behavior of the curculionid *Ochetina uniformis* Pascoe (Eirrhiniinae,

Stenopelmini) and *Ludovix fasciatus* (Gyllenhal) (Curculioninae, Erodiscini).
Revista Brasileira de Entomologia. 51: 87–92.

Thorpe, W. H., Crisp, D. J. (1949) Studies on Plastron Respiration. 4. Plastron Respiration in the Coleoptera. *Journal of Experimental Biology*. 26: 219–261.

Zacharuk, R. Y. (1985) Antennae and sensilla, in: Kerkuk, G.A. and Gilbert, L.I., *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon Press Ltd., Oxford, England, pp. 1–69.

PARTE II

Thaumastocoris peregrinus Carpinteiro & Dellapé, 2006

(Heteroptera: Thaumastocoridae)

CAPÍTULO 3

Químicos voláteis químicos de adultos e ninfas da praga do *Eucalyptus* spp.,
Thaumastocoris peregrinus Carpintero & Dellapé, 2006 (Heteroptera:
Thaumastocoridae)

Os resultados deste capítulo estão publicados
na revista *Psyche*/2012 (vide Anexo 3)

CAPÍTULO 3

Químicos voláteis de adultos e ninfas da praga do *Eucalyptus* spp., *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Heteroptera: Thaumastocoridae)

Resumo

O heteróptero introduzido, *Thaumastocoris peregrinus*, é uma praga severa de plantações de *Eucalyptus* em vários países do Hemisfério Sul. Os semioquímicos dos Thaumastocoridae não são conhecidos, por isso, químicos voláteis de ninfas e adultos de *T. peregrinus* foram identificados como possíveis guias num potencial controle com feromônios. O conteúdo das glândulas exócrinas das ninfas, que são liberadas após a muda, foi identificado dos extratos das exúvias. Os adultos desta espécie não possuem a glândula metatorácica funcional que é característica para a maioria dos heterópteros. No entanto, machos e fêmeas possuem um órgão de fixação de aparência glandular que eles rapidamente externalizam posteriormente quando são perturbados. Extrações do corpo de machos e fêmeas foram preparadas através do congelamento dos insetos em um frasco de vidro, de modo que esse órgão de fixação ficasse externalizado, e depois disso, foram extraídos com hexano. Dentre os voláteis extraídos das exúvias das ninfas encontram-se os compostos, benzaldeído, ácido hexanóico, ácido octanóico, octanol, (*E*)-2-octenol e decanal. Os voláteis dos adultos incluíram o composto majoritário butirato de 3-metil-but-2-enila e o composto minoritário, butirato de 3-metil-but-3-enila que foram produzidos em quantidades diferentes dependendo do sexo e da idade dos insetos. Machos acasalados e fêmeas virgens foram atraídos para os extratos sintéticos equivalentes a um macho. Machos acasalados rejeitaram o extrato sintético mais concentrado (equivalente a cinco machos).

Palavras-chave: ecologia-química; percevejo-bronzeado; glândula abdominal.

Volatile chemicals of adults and nymphs of the *Eucalyptus* pest, *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae)

Abstract

Thaumastocoris peregrinus is an introduced “true bug” that is now a severe pest in *Eucalyptus* plantations of various Southern Hemisphere countries. The semiochemicals of thaumastocorids are completely unknown; therefore, volatile chemicals from *T. peregrinus* nymphs and adults were identified as possible leads for pheromones potentially useful for control. The contents of nymphal exocrine glands, which are shed at molting, were identified from extracts of exuviae. Adults lack functional metathoracic scent glands that are characteristic of most heteropterans; however, both males and females possess a glandular-appearing hold-fast organ that they quickly extrude posteriorly when disturbed. Whole body extracts from males and females were prepared by freezing the insects in a flask so that they extruded the hold-fast organ, and then extracting with hexane. Volatiles from nymphal exuviae included benzaldehyde, hexanoic acid, octanoic acid, octanol, (*E*)-2-octenol, and decanal. Adult volatiles included the major compound 3-methyl-but-2-enyl butyrate and the minor compound 3-methyl-but-3-enyl butyrate, which were produced in different quantities depending on the sex and age of insects. Mated males and virgin females were attracted to one-male equivalent synthetic extracts. Mated males rejected more concentrated synthetic extracts (five-male equivalent).

Keywords: chemical ecology; bronze bug; abdominal gland.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A cultura e a praga

Em 2011, no Brasil, foram responsáveis em área plantada de *Eucalyptus* spp. os segmentos industriais de papel e celulose (71,2%), siderurgia e carvão vegetal (18,4%), painéis de madeira industrializada (6,8%) e produtores independentes (3,6%). A área ocupada por plantios florestais de *Eucalyptus* spp. foi de quase cinco milhões de ha, possuindo os estados de Minas Gerais e São Paulo, mais de um milhão de ha plantados, seguido pelo Paraná com 800 mil ha. Os segmentos de madeira processada mecanicamente (exceto móveis) e papel e celulose exportaram cerca de oito bilhões de dólares. Sendo que a participação do setor florestal na balança comercial nacional foi de quase 20% do saldo total do PIB (ABRAF 2012).

Existem inúmeras pragas que atacam as plantações de *Eucalyptus* spp., dentre elas formigas cortadeiras, dos gêneros *Atta* spp. e *Acromyrmex* spp., os cupins, (Rhinotermitidae e Termitidae), lagartas (e.g. Geometridae) e besouros desfolhadores e broqueadores (Chrysomelidae, Curculionidae, Scarabaeidae e Buprestidae) (Embrapa Florestas 2010). Além destas, vem ganhando destaque o percevejo *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Heteroptera: Thaumastocoridae) introduzido em vários países do Hemisfério Sul (e.g. África do Sul, Argentina, Uruguai e Brasil) (Carpintero & Dellapé 2006; Nadel et al. 2010; Paine et al. 2011).

Em 2005, *T. peregrinus* foi encontrado pela primeira vez em Buenos Aires, Argentina, em *Eucalyptus viminalis*, *E. tereticorni* e *E. camaldulensis* (Carpintero & Dellapé 2006). No Brasil, foi encontrado pela primeira vez em 2008, em um clone híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla* em São Francisco de Assis, Rio Grande do Sul, e em árvores de *E. camaldulensis* em Jaguariúna, São Paulo (Wilcken et al. 2010). Estudos de base sobre a biologia do inseto foram realizados na Austrália (Noack e Rose 2007) e no Brasil (Soliman 2012).

As ninfas e adultos pertencentes à ordem Heteroptera produzem alomônios de defesa. Tipicamente, as secreções defensivas das ninfas são produzidas em glândulas abdominais dorsais (DAGs) (Aldrich 1988). O conteúdo das DAGs é liberado com a exúvia toda vez que a ninfa sofre a muda, por isso, a extração da exúvia é um método conveniente para a obtenção da secreção das DAGs (Borges e Aldrich 1992). Já os heterópteros adultos possuem glândulas de cheiro metatorácicas, das quais são liberadas secreções irritantes (Aldrich 1988). Após o exame dos adultos, no entanto, foi verificado que as glândulas metatorácicas são vestigiais (Aldrich, J. - dados não

publicados). Além disso, adultos e ninfas possuem órgãos retais, similares aos descritos para Miridae (Wheeler 1980), os quais são evertidos quando os insetos são perturbados. O órgão retal de *T. peregrinus* tem aparência glandular fixando imediatamente o inseto no substrato quando estão sofrendo algum estresse, podendo rapidamente se desgrudar (Fig. 27) (Aldrich, J. - dados não publicados).

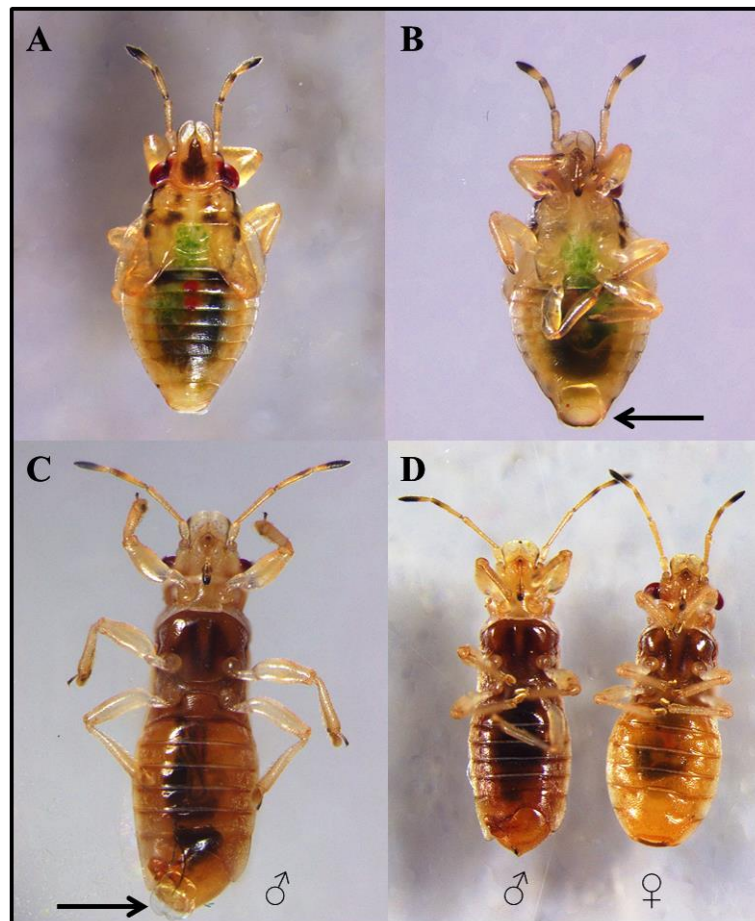


Fig. 27 (A-D). Machos, fêmeas e ninfas de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae). A – Vista dorsal de uma ninfa de 5^o instar; B – Vista ventral de uma ninfa de 5^o instar evidenciando o órgão retal (seta); C – Vista ventral do macho evidenciando o órgão retal evertido (seta); D – Vista ventral de um macho e de uma fêmea com o órgão retal não exposto.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Os feromônios são conhecidos para muitas famílias de heterópteros (Millar 2005), mas os semioquímicos de *T. peregrinus* e outros membros da família Thaumastocoridae são completamente desconhecidos. Sendo assim, o objetivo geral deste capítulo foi identificar e quantificar os compostos químicos voláteis presentes nas exúvias dos cinco ínstaes ninfais e nos adultos de *T. peregrinus*, e testar a atração de adultos frente aos compostos produzidos por machos e fêmeas.

2.2 Específicos

- Quantificar e identificar os compostos presentes nos extratos de ninfas de 1° a 5° instar e de extratos de machos e fêmeas de idades diferentes.
- Determinar o papel ecológico dos compostos emitidos pelos adultos e comparar com outros estudos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Criação dos insetos e extrações

Os insetos foram obtidos de uma criação na EMBRAPA Florestas, Colombo, Paraná e mantidos no Laboratório de Semioquímicos, Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR), sob condições controladas de temperatura e fotoperíodo ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ e 12 L: 12 E). Adultos e ninfas foram mantidos em ramos de *Eucalyptus benthamii* em caixas de acrílico (30 cm x 30 cm x 30 cm) até o uso nos experimentos. Para obtenção as exúvias e adultos virgens para as extrações, ninfas de todos os ínstares foram individualizadas em recipientes plásticos (2,5 cm de diâmetro). O gel (Hydroplan – EB/HyC, SNF S.A. Floger) foi colocado no recipiente para manter a umidade e impedir a fuga dos insetos. Sobre o gel foi colocada uma folha de *E. benthamii* cortada (Fig. 28). As folhas foram trocadas a cada dois dias ou quando necessário. Após a muda das ninfas, as exúvias foram coletadas para as extrações. Os machos e fêmeas recém-emergidos foram isolados e colocados em grupos por data de emergência em placas de Petri (5 cm de diâmetro) contendo gel e disco foliar até as extrações (Fig. 29). Para a extração dos adultos copulados, os casais foram formados com no máximo dois dias de diferença de emergência e as extrações dos adultos realizadas após a presença de ovos, confirmando a cópula.

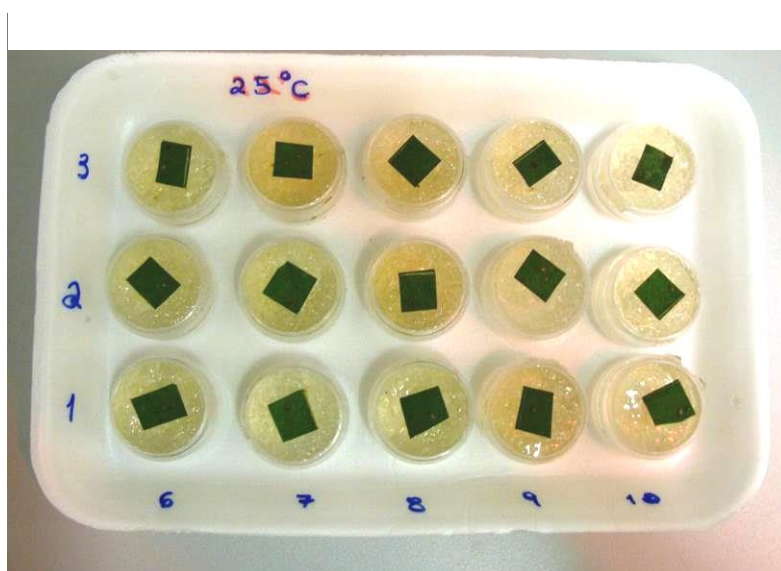


Fig. 28 Metodologia de criação de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) com as ninfas individualizadas em tampas plásticas contendo gel e uma folha de *Eucalyptus benthamii* cortada sobre o gel.



Fig. 29 Metodologia de manutenção de adultos de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae). No exemplo, machos virgens de mesma idade agrupados em placas de Petri (5 cm de diâmetro) contendo gel e folha cortada de *Eucalyptus benthamii*.

3.2 Extração das exúvias de *T. peregrinus* (1^o ao 5^o instar)

Extrações de exúvias foram realizadas durante 24h com 180 μ L de hexano bidestilado (HPLC-grade). Cada extração foi realizada com exúvias do mesmo estágio disponíveis no dia, com o mínimo de 12 e o máximo de 24 exúvias. Pelo menos três repetições foram realizadas para cada instar, com no mínimo 45 exúvias extraídas no total. Após a extração, o hidrocarboneto tridecano (10 ppm) foi adicionado a cada amostra como padrão interno (PI) e sua concentração final (PI) foi calculada para cada extrato. Os extratos foram concentrados e posteriormente analisados utilizando um cromatógrafo gasoso (GC-2010) e um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS-QP 2010 Plus - Shimadzu) e a quantificação foi baseada na área do PI. O GC foi equipado com uma coluna RTX-5 (30 m x 0,25 mm i.d. e 0,25 mm de espessura de filmes; Restek, Bellefonte, Pennsylvania, USA). As injeções foram de 1 μ l do extrato utilizando o método splitless com injetor na temperatura de 250°C. A temperatura do forno da coluna foi mantida a 50 °C por 1 min e, então, elevada para 250°C com taxa de 7°C/min e mantida em 250°C por 10 min. O hélio foi utilizado como gás carreador e a pressão na coluna utilizada foi de 170 kPa. Os mesmos parâmetros foram utilizados para todas as análises.

3.3 Extração dos adultos de *T. peregrinus*

Machos e fêmeas virgens e acasalados de diferentes idades (3-9, 10-21, 22-34 dias de idade) foram extraídos de acordo com a disponibilidade de insetos. A quantificação dos extratos foi comparada para machos e fêmeas virgens (10-21 e 3-9 dias de idade, respectivamente), machos virgens e acasalados (21-34 dias de idade) e machos e fêmeas acasalados (21-34 dias de idade). Obtiveram-se no mínimo duas repetições para cada tratamento, com o mínimo de 15 insetos extraídos no total. Nas extrações de insetos virgens e/ ou acasalados, os adultos foram separados por sexo em Erlenmeyers. Os frascos foram colocados no freezer, por uma hora, de modo que os insetos estivessem “fixados” ao vidro, com o órgão retal exposto. A extração foi realizada entre as 11:00 - 16:00 utilizando 150 µl de hexano bidestilado (HPLC-grade) por 10 min, e logo depois, 15 µl de uma solução de tridecano (100 ppm) foi adicionada como PI. As amostras foram concentradas antes da injeção em GC-2010, GC-MS-QP 2010 Plus e em cromatógrafo gasoso acoplado a Espectrômetro Infravermelho com Transformada de Fourier (GC-FTIR) (GC-2010 acoplado a um DiscovIR-GC – Shimadzu). Nas análises de infravermelho, o GC foi operado no modo splitless e foi equipado com uma coluna capilar DB-5 (0,25 µm, 0,25 m x 30 m) (J&W Scientific, Folsom, California, EUA) com hélio como gás carreador. A temperatura do forno foi mantida em 50°C por 1 min, e então, aumentada para 250°C com uma taxa de 7 °C/min até 250°C. Um detector fotocondutivo de mercúrio-cadmio-telúrio (MCT) resfriado por nitrogênio líquido foi utilizado com FT-IR de resolução de 8 cm⁻¹. Assim como para os extratos de ninfas, a concentração final do PI foi calculada para cada extrato e os compostos químicos de interesse foram quantificados baseados na área do PI.

3.4 Identificação dos compostos químicos e síntese dos ésteres

A identificação dos compostos foi baseada em coinjeções com padrões sintéticos, índices de Kovats (KI), espectros de massas (MS) e análises de GC-FTIR. Os compostos, benzaldeído, ácido hexanóico, ácido octanóico, octanol e decanal foram obtidos da Aldrich Chemical Company (Milwaukee, Wisconsin, USA). O composto (*E*)-2-octenol foi obtido da Acros Organics (Geel, Turnhout, Belgium).

Vinte e um ésteres foram sintetizados através da esterificação do ácido propiônico, ácido isobutírico e ácido butírico com os seguintes álcoois: pentanol, 3-metilbutan-1-ol, 3-metilbut-2-en-1-ol, 3-metilbut-3-en-1-ol, (*Z*)-pent-2-en-1-ol, (*E*)-pent-2-en-1-ol, pent-4-en-1-ol (todos da Aldrich Chemical Company, Milwaukee,

Wisconsin, USA). O composto 3-metil-2-buten-1-ol (34,03 mmol, 3 g) e o ácido butírico (68,06 mmol, 6 g) foram refluxados em um frasco de base redonda com ácido p-toluenesulfônico (TsOH) (1 mol%, 0,35 mmol, 0,06 g) e hidroquinona (5% (w/w) em relação ao álcool, 1,75 mmol, 0,191 g). O meio reacional foi aquecido até 60°C com agitação magnética por 3h sob argônio. O produto foi purificado pela adição de solução aquosa de NaOH 10% (m/V) até que o pH estivesse neutro. Logo depois, o produto foi extraído com etil éter. As soluções orgânicas combinadas foram lavadas com solução saturada de NaHCO₃ e NaCl, secas com Na₂SO₄ anidro, e concentradas por rota-evaporação. O produto bruto foi purificado por destilação em pressão reduzida e coletado de 150-160°C. As mesmas condições experimentais foram utilizadas na síntese dos outros ésteres saturados, no entanto, a hidroquinona não foi empregada nos álcoois saturados.

Os seguintes ésteres foram coinjetados com o extrato natural em três diferentes colunas (DB-5, DB-Wax e HP-1) para identificação: propionato de pentila (rendimento 94%), propionato de 3-metilbutila (rendimento 74%), propionato de pent-4-en-1-ila (rendimento 91%), propionato de (Z)-pent-2-en-1-ila (rendimento 83%), propionato de (E)-pent-2-en-1-ila (rendimento 83%), propionato de 3-metilbut-2-en-1-ila (rendimento 92%), propionato de 3-metilbut-3-en-1-ila (rendimento 90%), 2-metilpropanoato de pentila (rendimento 90%), 2-metilpropanoato de 3-metilbutila (rendimento 87%), 2-metilpropanoato de pent-4-en-1-ila (rendimento 92%), 2-metilpropanoato de (2Z)-pent-2-en-1-ila (rendimento 61%), 2-metilpropanoato de (2E)-pent-2-en-1-ila (rendimento 71%), 2-metilpropanoato de 3-metilbut-2-en-1-ila (rendimento 92%), 2-metilpropanoato de 3-metilbut-3-en-1-ila (rendimento 75%), butirato de pentila (rendimento 90%), butirato de 3-metilbutila (rendimento 92%), butirato de pent-4-en-1-ila (rendimento 92%), butirato de (Z)-pent-2-en-1-ila (rendimento 68%), butirato de (E)-pent-2-en-1-ila (rendimento 74%), butirato de 3-metilbut-2-en-1-ila (rendimento 92%) e butirato de 3-metilbut-3-en-1-ila (rendimento 80%).

3.5 Análises estatísticas

As análises foram realizadas com o programa R versão 2.13 (R Development Core Team 2011). A normalidade dos dados foi realizada através dos testes de Lilliefors e Shapiro-Wilk. Para a comparação das concentrações dos seis compostos encontrados nas exúvias de *T. peregrinus*, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis rank sum test foi utilizado seguido do teste não paramétrico de comparações múltiplas, através do

pacote “pgirmess”. Para analisar os dois compostos presentes nos extratos de adultos virgens e acasalados de diferentes idades, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) com modelo linear generalizado (GLM) (Gaussian). Para todas as análises, quando o $p > 0,05$ os dados foram considerados não significativos.

3.6 Bioensaios

Os bioensaios de comportamento foram conduzidos em um olfatômetro em Y de 17 cm de comprimento, com dois braços de 13 cm cada. No final de cada braço, a fonte de odor foi colocada dentro de um tubo de vidro conectado ao sistema (1 cm de diâmetro e 4 cm de comprimento). Para cada repetição, um novo papel filtro (1 cm²) contendo a solução preparada com o composto majoritário (maj.) + minoritário (min.) ou contendo hexano (controle), foi utilizado como fonte de atração. Duas soluções foram preparadas com os compostos majoritário e minoritário sintéticos na proporção encontrada no extrato (30:1), em duas concentrações, uma equivalente a um macho [1ME = 750 ng (maj.): 25 ng (min.)] e outra equivalente a cinco machos [5ME = 3.750 ng (maj.): 125 ng (min.)]. A atração de machos e fêmeas acasalados, e de fêmeas virgens de *T. peregrinus* (3 a 20 dias de idade) foi testada para: solução 1ME vs. controle (hexano). A solução 5ME vs. controle (hexano) foi testada apenas para machos acasalados.

4 RESULTADOS

4.1 Extração das exúvias de ninfas de *T. peregrinus*

Seis compostos foram encontrados nas exúvias de ninfas de *T. peregrinus*, incluindo benzaldeído, ácido hexanóico, ácido octanóico, octanol, (*E*)-2-octenol, e decanal (Tabela III) (Fig. 30). O 4° e o 5° ínstaes produziram mais ácido hexanóico ($H_4 = 15,9$, $P = 0,003$) e ácido octanóico ($H_4 = 15,9$, $P = 0,003$) se comparados com os primeiros ínstaes. Para todos os outros compostos, não houve diferença entre os ínstaes: benzaldeído ($H_4 = 7,9$, $P = 0,09$), (*E*)-2-octenol ($H_4 = 3,2$, $P = 0,52$), octanol ($H_4 = 6,1$, $P = 0,19$) e decanal ($H_4 = 3,9$, $P = 0,41$) (Tabela III).

Tabela III. Identificação e quantificação (em ng) dos compostos presentes nas exúvias das ninfas de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae). As letras diferentes para cada composto indicam diferenças significativas entre os ínstaes (KI - Índice de Kovats; EP - erro padrão). Comparações estatísticas: Kruskal-Wallis rank sum test seguido de um teste não paramétrico de comparações múltiplas ($P > 0,05$).

Compostos Químicos	DB-5 coluna	1° instar		2° instar		3° instar		4° instar		5° instar		
		IK	Média	EP	Média	EP	Média	EP	Média	EP	Média	EP
1 benzaldeído	962		0,09 ± 0,02	a	0,15 ± 0,03	a	0,23 ± 0,01	a	0,10 ± 0,02	a	0,09 ± 0,03	a
2 ácido hexanóico	988		0,45 ± 0,09	a	1,74 ± 0,46	ab	8,47 ± 3,88	ab	21,25 ± 7,75	b	25,85 ± 6,75	b
3 octanal	996		2,09 ± 0,61	a	5,85 ± 1,20	a	5,72 ± 1,74	a	6,58 ± 2,56	a	3,59 ± 1,10	a
4 (<i>E</i>)-2-octenal	1062		0,28 ± 0,07	a	0,44 ± 0,13	a	0,30 ± 0,02	a	0,26 ± 0,03	a	0,20 ± 0,08	a
5 ácido octanóico	1209		0,23 ± 0,04	a	0,91 ± 0,29	ab	2,62 ± 1,08	ab	7,35 ± 2,90	b	7,35 ± 0,81	b
6 decanal	1239		0,27 ± 0,08	a	0,36 ± 0,06	a	0,32 ± 0,19	a	0,17 ± 0,09	a	0,14 ± 0,05	a
total (ng)			3,41		9,45		17,65		35,71		37,21	

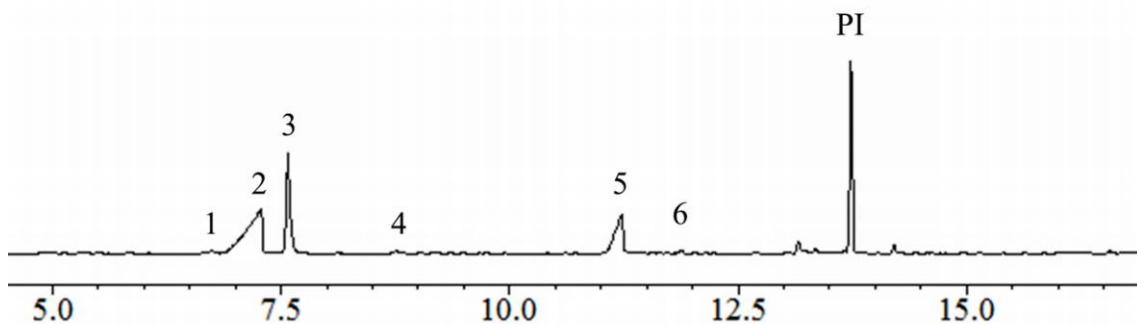


Fig. 30 Cromatograma típico do extrato de exúvia de 5° instar de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae). Os números (1 - 6) correspondem, respectivamente, ao benzaldeído, ácido hexanóico, octanal, (*E*)-2-octenal, ácido octanóico e decanal. Os extratos foram analisados em GC-MS-QP 2010 (Shimadzu); PI - padrão interno (tridecano).

4.2 Extração de adultos de *T. peregrinus*

Os perfis cromatográficos dos extratos de machos e fêmeas de *T. peregrinus* revelaram a presença de dois ésteres, um minoritário (**A**) e outro majoritário (**B**) (Fig. 31). As concentrações variaram de acordo com o sexo e a idade, no entanto, apenas a quantidade do composto majoritário (**B**) de machos acasalados foi diferente da quantidade encontrada nas fêmeas acasaladas ($F_{1,3} = 10,3$, $P = 0,048$). A concentração

dos ésteres de machos e fêmeas virgens não diferiu nem para o composto minoritário (**A**) ($F_{1,4} = 0,6$, $P = 0,47$), nem para o majoritário (**B**) ($F_{1,4} = 3,2$, $P = 0,14$). Da mesma forma, a comparação estatística da concentração dos ésteres em machos virgens e acasalados (**A**: $F_{1,3} = 2,4$, $P = 0,21$; **B**: $F_{1,3} = 5,7$, $P = 0,09$) e em machos e fêmeas acasalados (**A**: $F_{1,3} = 4,5$, $P = 0,12$) não foi diferente (Tabela IV). As extrações de adultos de 10-21 dias de idade não tiveram repetições suficientes para serem comparadas com os outros tratamentos, por isso, foram desconsideradas.

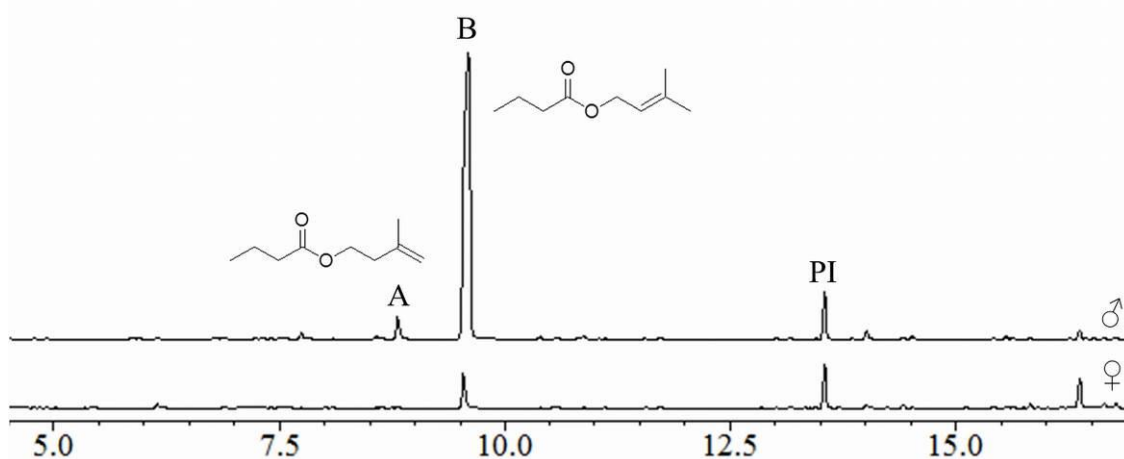


Fig. 31 Comparação dos perfis cromatográficos dos extratos de corpo de machos e fêmeas de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) de 21 dias de idade. Compostos minoritário e majoritário, butirato de 3-metilbut-3-en-1-ila (**A**) e butirato de 3-metilbut-2-en-1-ila (**B**), respectivamente. PI – padrão interno (tridecano).

Seus tempos de retenção (Tr) e Índices de Kovats (KI) em coluna RTX-5 foram os seguintes: **A**: $Tr = 8,86$ min., $KI = 1068$ e **B**: $Tr = 9,55$ min., $KI = 1103$. O espectro de massas de **B** tinha pico base de m/z 71, fragmentos em m/z 68, m/z 85, m/z 128 e um íon molecular de 56 Da (Fig. 32). Quando este espectro foi comparado com a biblioteca do GC-MS (NIST library), foi evidente que **B** poderia ser um éster propiônico, isobutírico ou butírico, com fórmula molecular de $C_9H_{16}O_2$. Os sinais mais importantes dos espectros de infravermelho (GC-FTIR) de **B** (Fig. 32) foram uma banda vibracional C-H (2962 , 2935 e 2871 cm^{-1}), uma banda de éster carbonil (1730 cm^{-1}), e múltiplas bandas de C(CO)O, características de ésteres (1445 , 1381 e 1189 cm^{-1}). Essas bandas associadas à banda de estiramento C-H de ligações duplas substituídas em 3023 cm^{-1} e a presença da banda em 1674 cm^{-1} , característica de alcenos trissubstituídos, revelou que **B** é um éster insaturado com uma dupla ligação interna. O íon molecular encontrado nos espectros de massas (GC-MS) de **A** não foi tão óbvio, no entanto, o pico base em m/z 68

e um fragmento em m/z 71, sugeriu que **A** fosse um éster similar ao **B**. Apesar dos espectros de infravermelho (GC-FTIR) de **A** revelarem as mesmas bandas características de ésteres que foram detectadas para o composto **B**, a presença de uma banda em 3080 cm^{-1} devido ao estiramento assimétrico de uma ligação dupla terminal, demonstraram que **A** é um éster insaturado com uma dupla ligação terminal. Para confirmar a identificação dos compostos naturais **A** e **B**, os 21 ésteres sintetizados foram coinjetados com o extrato. Através da coinjeção com padrões sintéticos em três colunas diferentes (GC - RTX-5, RTX-WAX e HP-1) observou-se a coeluição do composto majoritário **B**, com o butirato de 3-metilbut-2-en-1-ila, e do composto minoritário **A**, com o butirato de 3-metilbut-3-en-1-ila, confirmando a identificação.

Tabela IV. Quantificação (ng) dos ésteres identificados em extratos do corpo de machos e fêmeas virgens e acasalados de diferentes idades de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae); 3-9 dias (1), 10-21 (2) e 22-33 dias (3). Para cada éster identificado, ns - não significativo, * - $P < 0,05$; EP - erro padrão, rep. / nº t – número de repetições / número total de insetos extraídos. Comparações estatísticas: ANOVA (GLM - Gaussian) ($P > 0,05$).

	rep. / nº t	Butirato de 3-metilbut-3-en-1-ila (A)			Butirato de 3-metilbut-2-en-1-ila (B)				
			Média	EP		Média	EP		
♂ virgens (1)	5 / 45	ns	0,1	±	0,0	ns	11,2	±	3,8
♀ virgens (3)	2 / 14		0,2	±	0,1		0,5	±	0,0
♂ virgens (3)	2 / 17	ns	8,3	±	0,2	ns	191,8	±	19,1
♂ acasalados (3)	3 / 28		20,7	±	5,4		743,5	±	61,7
♂ acasalados (3)	3 / 28	ns	20,7	±	5,4	*	743,5	±	61,7
♀ acasaladas (3)	2 / 16		0,1	±	0,1		0,5	±	0,3

4.3 Bioensaios

O extrato sintético 1ME não foi atraente para fêmeas acasaladas ($P = 0,82$) vs. hexano (Fig. 33 A), no entanto, foi atraente para machos acasalados ($P = 0,002$) (Fig. 33 B) e fêmeas virgens ($P = 0,04$) (Fig. 33 C). Já o extrato 5ME não foi atraente para machos acasalados, já que houve preferência pelo hexano ($P = 0,04$) (Fig. 33 D).

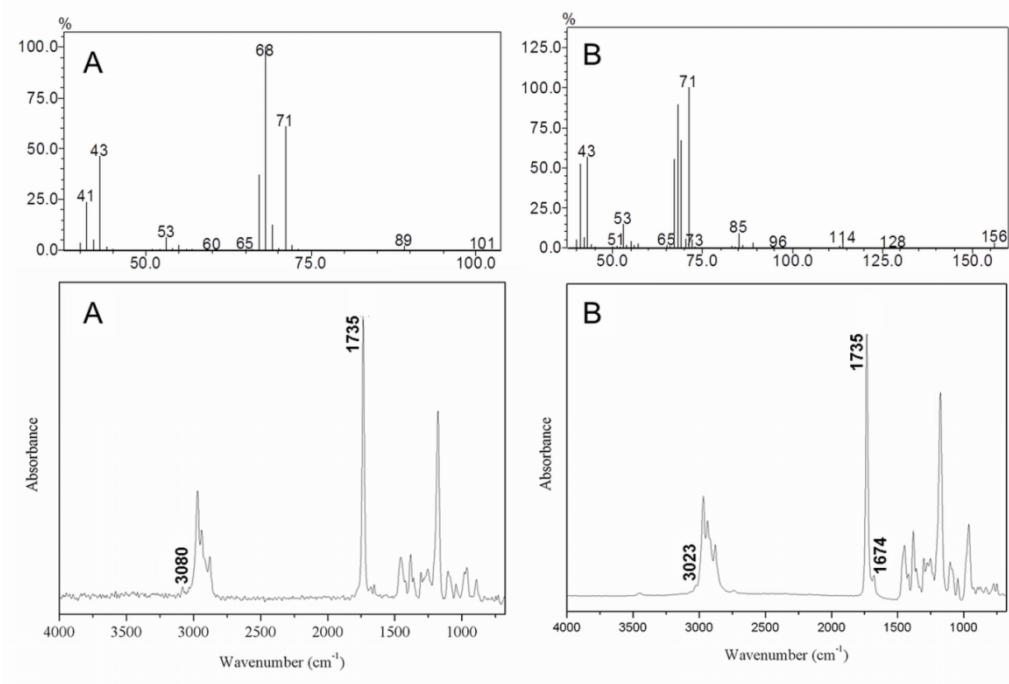


Fig. 32 Espectros de massas (GC-MS) e de infravermelho (GC-FTIR) do composto minoritário butirato de 3-metilbut-3-en-1-ila (A) e do majoritário butirato de 3-metilbut-2-en-1-ila (B), identificados no extrato de adultos de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae).

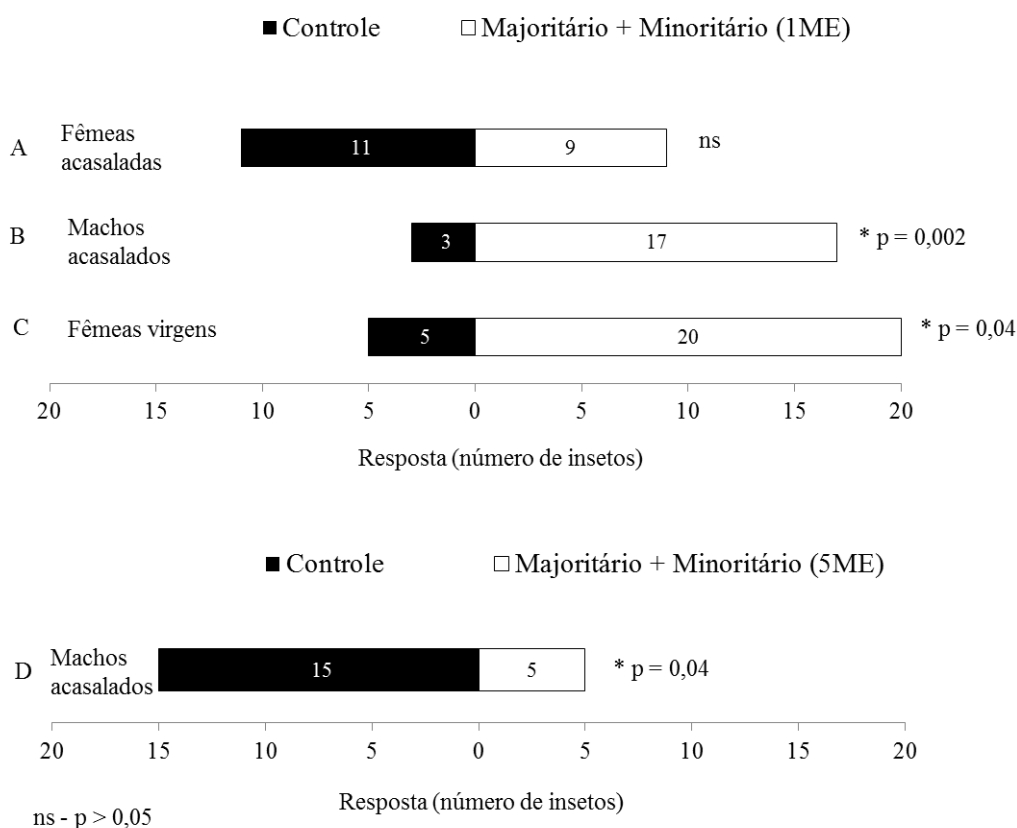


Fig. 33 (A-D) Número de respostas de machos e fêmeas acasalados, e de fêmeas virgens de *T. peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) a soluções sintéticas (1ME e 5ME) vs. hexano (controle). Soluções (30:1): 1ME - 750 ng: 25 ng e 5ME - 3.750 ng: 125 ng. Majoritário: butirato de 3-metilbut-2-en-1-ila e Minoritário: butirato de 3-metilbut-3-en-1-ila.

5 DISCUSSÃO

Alguns dos compostos presentes nas exúvias de *T. peregrinus* são descritos como substâncias repelentes ou atrativas para outros Heteroptera. Por exemplo, em *Triatoma infestans* (Klug 1834) (Reduviidae) o benzaldeído é atraente para fêmeas em baixas concentrações (0,05 – 0,1 µg) (Fontan et al. 2002). Em *Cimex lectularius* (Linnaeus 1758) (Cimicidae), os compostos decanal, (*E*)-2-octenal e benzaldeído fazem parte do feromônio de agregação (Siljander et al. 2008). Já o ácido hexanóico está presente nas glândulas meta-torácicas de outras espécies, como em *Eurygaster maura* (Linnaeus, 1758) (Scutelleridae), assim como o (*E*)-2-hexanal, acetato de (*E*)-2-hexenila, *n*-tridecano, ácido octadecanoico e *n*-dodecano (Dilek e Yusuf 2007). O feromônio de alarme de adultos de *Leptoglossus zonatus* (Dallas 1852) (Coreidae) é

composto pelo acetato de hexila, hexanol, hexanal e pelo ácido hexanóico (Leal et al. 1994). A mistura de acetato de (*E*)-2-octenila e 1-octanol é atrativa para *Leptocoris chinensis* Dallas, 1852 (Alydidae) (Watanabe et al. 2009). Os compostos identificados para as ninfas de *T. peregrinus* são comumente encontrados em Heteroptera, no entanto, a combinação dos compostos identificados nas ninfas de *T. peregrinus* é única quando comparada com outras espécies (Aldrich 1988). Por exemplo, *Cimex lectularius* produz alguns compostos, mas em combinações diferentes da encontrada em *T. peregrinus*.

As extrações de adultos de *T. peregrinus* revelaram que fêmeas e machos produziram os mesmos ésteres, mas a quantidade produzida variou de acordo com o sexo e idade, principalmente para o composto majoritário (**B**), butirato de 3-metilbut-2-en-1-ila (Fig. 31, Tabela IV). Machos de idade entre 22-33 dias apresentaram os dois compostos (**A** e **B**) em abundância, com o valor máximo de cerca de 1 µg/inseto. Já as fêmeas de 3-9 dias de idade tiveram a menor abundância para os dois compostos (**A** e **B**). Butiratos e isobutiratos são componentes feromonais dos Heteroptera, e já foram identificados nas famílias Alydidae (Aldrich et al. 2000), Miridae (Zhang e Aldrich 2003; Higuchi et al. 2004) e em Pentatomidae (Asopinae) e triatomíneos (Aldrich et al. 1986). Em *Alydus eurinus* (Say) (Alydidae), o feromônio sexual das fêmeas é composto pelo butirato de 2-metilbutila e pelo butirato de (*E*)-2-metil-2-butenila (Aldrich et al. 2000). Os mirídeos, particularmente as espécies do gênero *Phytocoris*, produzem semioquímicos que contém butiratos e acetatos insaturados. As fêmeas de *Phytocoris* atraem machos com feromônios sexuais baseados em misturas de butiratos e acetatos (Millar et al. 1997; Millar e Rice 1998; Zhang e Aldrich 2008), enquanto que, aparentemente, os machos emitem altas concentrações de certos butiratos utilizados como anti-feromônios sexuais (Zhang e Aldrich 2003).

González et al. (2012) atribuíram uma função de agregação aos compostos emitidos por machos de *T. peregrinus*, pois em experimentos de olfatométria, machos vivos atraíram apenas machos. Neste trabalho, foram testados os compostos sintéticos na concentração encontrada nos extratos de machos acasalados com mais de 22 dias de idade em proporção de 1ME e 5ME. Através desses testes, verificou-se que os ésteres, butirato de 3-metilbut-2-en-1-ila (maj.) e butirato de 3-metilbut-3-en-1-ila (min.), em concentração 1ME (750 ng: 25 ng), atraíram machos acasalados e fêmeas virgens. Esses resultados sugerem que a atração dos machos para os compostos produzidos por machos poderia auxiliar na busca de fêmeas e que os compostos têm função sexual, atraindo fêmeas na concentração de 1ME. As fêmeas acasaladas não foram atraídas para o

extrato de macho, sugerindo que, uma vez acasaladas, elas não são mais atraídas. Na concentração 5ME, os extratos perderam a atratividade para os machos acasalados. Por isso, sugere-se que em maior concentração, ou seja, quando existem mais machos juntos, outros machos não seriam atraídos.

Os alomônios e feromônios dos heterópteros originaram-se de glândulas abdominais dorsais (DAGs) de ninfas ou de glândulas metatorácicas (MTGs), que são características para a maioria dos Heteroptera adultos. Em *T. peregrinus*, no entanto, as glândulas metatorácicas são vestigiais (Aldrich, J. – dados não publicados). Os butiratos de *T. peregrinus* parecem estar associados com a extrusão do órgão retal (Fig. 21), o qual, em Heteroptera, só foi descrito em Miridae (Wheeler 1980). A confirmação de que o órgão retal é o responsável pela produção dos ésteres ainda precisa ser finalizada.

Se forem comparados machos copulados de *T. peregrinus* com 21-34 dias de idade com machos virgens e machos acasalados de menor idade, os primeiros produziram grandes quantidades de ambos os ésteres, especialmente do **B**. No entanto, os ésteres **A** e **B** também são produzidos pelas fêmeas, sugerindo que provavelmente não estão envolvidos somente na função de atração e agregação dos sexos para a cópula. A diferença de concentração de ambos os ésteres em machos e fêmeas de idades diferentes pode ser um indicativo de que sejam os responsáveis pelo reconhecimento do sexo e da idade em *T. peregrinus*.

6 CONCLUSÕES

Os compostos benzaldeído, ácido hexanóico, ácido octanóico, octanal, (*E*)-2-octenal e decanal foram identificados em extratos de exúvia de ninfas de *T. peregrinus*. Em fêmeas e machos adultos foram identificados os ésteres butirato de 3-metilbut-2-en-1-ila (maj.) e butirato de 3-metilbut-3-en-1-ila (min.), que em conjunto, na concentração de 1ME se mostrou atraente para fêmeas virgens e machos acasalados. Compostos idênticos e/ou similares aos encontrados nas exúvias de *T. peregrinus* e aos ésteres produzidos pelos adultos já foram identificados em outros heterópteros com funções de atração e repelência. Testes com armadilhas em campo precisam ser realizados para comprovar a atração destes insetos aos compostos sintéticos.

7 REFERÊNCIAS

- ABRAF – Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. Anuário Estatístico da ABRAF 2012 ano base 2011 (2012). <http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF12/ABRAF12-BR.pdf>. Acesso em: 18/01/13.
- Aldrich, J. R. (1988) Chemical ecology of the Heteroptera. *Annual Review of Entomology*. 33: 211–238.
- Aldrich, J. R., Zhang, A., Oliver, J. E. (2000) Attractant pheromone and allomone from the metathoracic scent gland of a broad-headed bug (Hemiptera: Alydidae). *Canadian Entomologist*. 132: 915–923.
- Aldrich, J. R., Oliver, J. E., Lusby, W. R., Kochansky, J. P. (1986) Identification of male-specific exocrine secretions from predatory stink bugs (Hemiptera, Pentatomidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 3: 1–12.
- Borges, M., Aldrich, J. R. (1992) Instar specific defensive secretions of stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *Experientia*. 48: 893–896.
- Carpintero, D. L., Dellapé, P. M. (2006) A new species of *Thaumastocoris* Kirkaldy from Argentina (Heteroptera: Thaumastocoridae: Thaumastocorinae). *Zootaxa*. 1228: 61–68.
- Dilek, D., Yusuf, K. (2007) Fine structure and chemical analysis of the metathoracic scent gland of *Eurygaster maura* (Linnaeus, 1758) (Heteroptera: Scutelleridae). *Folia Biologica Krakow*. 55: 133–141.
- Embrapa Florestas, Sistemas de Produção, 4 (2010) http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Eucalipto/CultivodoEucalipto_2ed/Pragas.htm. Acesso em: 17/01/13
- Leal, W. S., Panizzi, A. R., Niva, C. C. (1994) Alarm pheromone system of leaf-footed bug *Leptoglossus zonatus* (Heteroptera, Coreidae). *Journal of Chemical Ecology*. 20: 1209–1216.
- Fontan, A., Audino, P. G., Martinez, A., Alzogaray, R. A., Zerba, E. N., Camps, F., Cork, A. (2002) Attractant Volatiles Released by Female and Male *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), a Vector of Chagas disease: Chemical Analysis and Behavioral Bioassay. *Journal of Medical Entomology*. 39: 191–197.

- González, A., Calvo, M. V., Cal, V., Hernandez, V., Florencia, D., Alves, L., Gaménara, D., Rossini, C., Martínez, G. (2013) A Male Aggregation Pheromone in the Bronze Bug, *Thaumastocoris peregrinus* (Thaumastocoridae). *Psyche*. 1–7.
- Higuchi, H., Takahashi, A., Fukumoto, T., Mochizuki, F. (2004) Attractiveness of synthetic sex pheromone of the rice leaf bug, *Trigonotylus caelestialium* (Kirkaldy) (Heteroptera: Miridae) to males. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*. 48: 345–347.
- Millar, J. G. (2005) Pheromones of true bugs. *Topics in Current Chemistry*. 240: 37–84.
- Millar, J. G., Rice, R. E., Wang, Q. (1997) Sex pheromone of the mirid bug *Phytocoris relativus*. *Journal of Chemical Ecology*. 23: 1743–1754.
- Millar, J. G., Rice, R. E. (1998) Sex pheromone of the plant bug *Phytocoris californicus* (Heteroptera: Miridae). *Journal of Economic Entomology*. 91: 132–137.
- Nadel, R. L., Slippers, B., Scholes, M. C., Lawson, S. A., Noack, A. E., Wilcken, C. F., Bouvet, J. P., Wingfield, M. J. (2010) DNA bar-coding reveals source and patterns of *Thaumastocoris peregrinus* invasions in South Africa and South America. *Biological Invasions*. 12: 1067–1077.
- Noack A. E., Rose, H. A. (2007) Life-history of *Thaumastocoris peregrinus* and *Thaumastocoris* sp. in the laboratory with some observations on behavior. *General and Applied Entomology*. 30: 27–33.
- Paine, T. D., Steinbauer, M. J., Lawson, S. A. (2011) Native and exotic pests of *Eucalyptus*: A worldwide perspective. *Annual Review of Entomology*. 56: 181–201.
- R Development Core Team (2011) R: a language and environment for statistical computing. 584 computing. <http://www.R-project.org>.
- Siljander, E., Gries, R., Khaskin, G., Gries, G. (2008) Identification of the Airborne Aggregation Pheromone of the Common Bed Bug, *Cimex lectularius*. *Journal of Chemical Ecology*. 34: 708–718.
- Soliman, E. P., Wilcken, C. F., Pereira, J. M., Dias, T. K. R., Zaché, B., Dall Pogetto, M. H. F. A., Barbosa, L. R. (2012) Biology of *Thaumastocoris peregrinus* in different eucalyptus species and hybrids. *Phytoparasitica*. 40: 223–230.
- Watanabe, T., Takeuchi, H., Ishizaki, M., Yasuda, T., Tachibana, S., Sasaki, R., Nagano, K., Okutani-Akamatsu, Y., Matsuki, N. (2009) Seasonal attraction of

- the rice bug, *Leptocorisa chinensis* Dallas (Heteroptera: Alydidae), to synthetic attractant. *Applied Entomology and Zoology*. 44: 155–164.
- Wheeler, A. G. J. (1980) The mirid rectal organ: purging the literature. *Florida Entomologist*. 63: 481–485.
- Wilcken, C., Soliman, E., Soliman, E. P., Sá, L. A. N., Barbosa, L. R., Dias, T. K. R. Ferreira-Filho, P. J., Oliveira, R. J. R. (2010) Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on *Eucalyptus* in Brazil and its distribution. *Journal of Plant Protection Research*. 50: 201–205.
- Zhang, Q., Aldrich, J. R. (2003) Male-produced anti-sex pheromone in a plant bug. *Naturwissenschaften*. 90: 505–508.
- Zhang, Q.-H., Aldrich, J. R. (2008) Sex pheromone of the plant bug, *Phytocoris calli* Knight. *Journal of Chemical Ecology*. 34: 719–724.

CAPÍTULO 4

Compostos orgânicos voláteis de *Eucalyptus benthamii* induzidos pela herbivoria de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Heteroptera: Thaumastocoridae) influenciam a preferência de fêmeas acasaladas

CAPÍTULO 4

Compostos orgânicos voláteis de *Eucalyptus benthamii* induzidos pela herbivoria de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Heteroptera: Thaumastocoridae) influenciam a preferência de fêmeas acasaladas

Resumo

As plantas geralmente respondem ao ataque de herbívoros sintetizando e emitindo compostos orgânicos voláteis (COVs). Inimigos naturais são atraídos a esses COVs, no entanto, pouco se sabe sobre seus efeitos nos herbívoros. Neste estudo, a herbivoria de *Thaumastocoris peregrinus* e o dano mecânico em plantas de *Eucalyptus benthamii* foram avaliados. Foram mensurados os COVs emitidos pelas plantas após o dano mecânico, antes e após a herbivoria, assim como durante a fotofase e escotofase, separadamente, após a herbivoria. Além disso, foram estudadas as respostas de fêmeas virgens e acasaladas de *T. peregrinus* a esses COVs. Aerações das plantas foram realizadas para todos os tratamentos e as extrações iniciaram 24h após a herbivoria ou dano mecânico e tiveram duração de quatro ou cinco dias, dependendo do tratamento. Os perfis cromatográficos dos tratamentos foram comparados e os COVs foram identificados e quantificados. No total, 12 compostos foram detectados. Cinco compostos emitidos após a herbivoria e dano mecânico não foram detectados nos extratos de plantas não atacadas (plantas controle) (β -pineno, linalool, 9-epi-(*E*)-cariofileno, viridiflorol e um composto não identificado). Três compostos majoritários, α -pineno, aromadendreno e globulol, foram emitidos após a herbivoria e foram detectados em altas quantidades quando comparados com as plantas controle e com as plantas que sofreram dano mecânico. Após a herbivoria, as plantas emitiram quantidades maiores de COVs quando comparadas aos outros tratamentos. Os COVs emitidos durante a fotofase e escotofase não foram diferentes entre si. As fêmeas acasaladas têm forte preferência por plantas não atacadas quando comparadas com plantas que sofreram herbivoria, e preferiram hexano quando comparado com soluções de α -pineno com concentração equivalente a emitida por plantas após herbivoria. As fêmeas virgens não revelaram nenhuma preferência entre plantas atacadas ou não atacadas.

Palavras-chave: percevejo bronzeado; praga florestal; voláteis de plantas induzidos por herbivoria (VPIHs); terpenos; COVs.

Volatile Organic Compounds of *Eucalyptus benthamii* induced by the herbivory of *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) influence the preference females

Abstract

Generally plants respond to herbivory by synthesizing and releasing novel blends of volatile organic compounds (VOCs). Natural enemies are attracted to these VOCs, but little is known on their effects on herbivores. In this study, the effects of herbivory by *Thaumastocoris peregrinus* and mechanical damage were studied on *Eucalyptus benthamii* plants. The VOCs emitted by plants after mechanical damage were measured, before and after the herbivory, and during photophase and scotophase, separately, after herbivory. Besides, the responses of mated and virgin of females *T. peregrinus* to these VOCs were analyzed. Headspace collections of *E. benthamii* plants were performed for all treatments and extractions initiated after 24h of herbivory or mechanical damage and lasted for four or five days, depending on the treatment. The chromatographic profiles of all treatments were compared, and VOCs were identified and quantified. In total, 12 compounds were detected. Five compounds emitted after herbivory and mechanical damage were not detected in unattacked plants (control plants) (β -pinene, linalool, 9-epi-(*E*)-caryophyllene, viridiflorol, and one unidentified compound). Three major compounds, α -pinene, aromadendrene, and globulol, were released after herbivory and were detected in greater quantities when compared with control groups, and after mechanical damage. After herbivory, plants released a larger quantity of VOCs when compared with other treatments. The VOCs emitted during photophase and scotophase after herbivory did not differ. Mated females showed stronger preference for unattacked plants when compared with herbivore-damaged plants, and preferred hexane over α -pinene in a dosage equivalent to that emitted by an attacked plant. Virgin females did not show any preference for either attacked or unattacked plants.

Keywords: Bronze bug; forestry pest; herbivore-induced plant volatiles (HIPVs); terpenes; VOCs.

1 INTRODUÇÃO

As plantas respondem ao ataque dos herbívoros através da síntese e emissão de um novo conjunto de compostos orgânicos voláteis (COVs) (Turlings et al. 1990) que são específicos de acordo com a espécie de herbívoro (Turlings e Wackers 2004). Esses conjuntos específicos de COVs são utilizados pelos inimigos naturais para encontrarem suas presas. No entanto, apenas alguns estudos exploraram a resposta dos herbívoros frente aos COVs de plantas induzidas por herbívoros. Por exemplo, fêmeas de *Heliothis virescens* (Fabricius, 1777) (Lepidoptera: Noctuidae) foram repelidas por voláteis emitidos a noite por plantas de tabaco, *Nicotiana tabacum* (Solanaceae), infestadas com suas larvas, indicando que as fêmeas evitaram ovipositar em plantas atacadas (De Moraes et al. 2001). Em outro exemplo, as formas aladas de *Aphis gossypii* Glover, 1877 (Hemiptera: Aphididae) passaram mais tempo na presença do odor de plantas de algodão não infestadas comparado com ar limpo em um olfatômetro de quatro vias e significativamente menos tempo na presença do odor de plantas infestadas (Hedge et al. 2011).

Neste trabalho, inicia-se o estudo de um novo sistema incluindo o herbívoro *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Heteroptera: Thaumastocoridae) e sua planta hospedeira *Eucalyptus benthamii* (Myrtaceae). Esta espécie de *Eucalyptus* é encontrada em áreas limitadas próximas a Sidney na Austrália e no sul do Brasil tem mostrado bom crescimento e resistência a geadas (Higa 1999), além de ser susceptível ao ataque de *T. peregrinus*.

Conhecido como percevejo bronzeado, *T. peregrinus* é um inseto sugador, praga de plantações de *Eucalyptus* em vários países (e.g., África do Sul, Argentina, Uruguai e Brasil) provavelmente introduzido acidentalmente na América do Sul através do transporte internacional oriundo da Austrália (Nadel et al. 2009; Wilcken et al. 2010). No Brasil, ainda não existe um método de controle efetivo para esta espécie (Wilcken et al. 2010) e a introdução do parasitoide de ovos *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae) está em andamento.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Em função da interação entre *T. peregrinus* e sua planta hospedeira ainda não ter sido investigada, teve-se como objetivo geral deste capítulo:

- investigar a resposta de plantas de *E. benthamii* frente a três tratamentos: herbivoria, dano mecânico e fotoperíodo, comparando com plantas não atacadas (controle); e testar a atratividade para fêmeas virgens e acasaladas dos COVs emitidos por plantas após a herbivoria comparado com o controle.

2.2 Específicos

- identificar e comparar os COVs emitidos por plantas de *E. benthamii* antes e após a alimentação de *T. peregrinus* e após dano mecânico; e os COVs emitidos ao longo do tempo 24h-120h, após cada tratamento (herbivoria, dano mecânico e controle).
- determinar se há diferenças quantitativas e qualitativas entre os compostos liberados após a herbivoria na fotofase e escotofase.
- avaliar a atração de fêmeas acasaladas e virgens de *T. peregrinus* aos COVs de plantas atacadas e controle em olfatômetro em Y, através das seguintes combinações:
 - planta controle x planta após herbivoria;
 - extrato de planta controle x extrato de planta após herbivoria;
 - soluções sintéticas de α -pineno na concentração equivalente à induzida por herbivoria x equivalentes aos das plantas controle.
- avaliar a atratividade de fêmeas acasaladas, em olfatômetro em Y, às soluções sintéticas de α -pineno na concentração equivalente à induzida por herbivoria x hexano; e às soluções sintéticas de α -pineno na concentração equivalente ao controle x hexano.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e manutenção de *Thaumastocoris peregrinus* no laboratório

A obtenção e manutenção dos insetos foram realizadas de acordo com metodologia descrita no capítulo anterior.

3.2 Coleta dos voláteis (COVs)

As aerações foram realizadas em câmaras de vidro (11,5 cm x 35 cm) no interior de uma sala climatizada com temperatura e fotoperíodo ($24 \pm 2^\circ\text{C}$ e 12 L: 12 E). Antes de entrar no sistema de aeração, o ar foi umidificado e filtrado através de uma coluna de carvão ativado com velocidade de 1 ml/min. Os voláteis foram capturados através de uma coluna de vidro contendo 20 mg do polímero adsorvente HayeSep Q 80-100 mesh (Althech, Lokeren, Belgium) e eluidos com 180 μl de hexano HPLC bidestilado. Como padrão interno (PI) foi adicionado tridecano (C13) (20 μl) no extrato final e sua concentração final foi calculada para cada extrato. Os compostos presentes nos extratos foram quantificados baseados na área do PI.

As mudas de *E. benthamii* utilizadas no experimento tinham aproximadamente 120 dias de idade (28 – 35 cm e com 10 – 12 folhas). Elas foram mantidas no interior de câmaras de aeração por dois dias antes do início dos tratamentos para aclimatização. Para diminuir a captura de voláteis do solo, os tubetes de plástico nos quais as plantas foram plantadas, foram recobertos com papel alumínio.

Foram testadas as repostas das plantas à herbivoria e ao dano mecânico. Os COVs emitidos das plantas durante a fotofase e escotofase após a herbivoria foram capturados separadamente. Em ambos os tratamentos três réplicas foram realizadas e uma planta não atacada foi utilizada como controle. Para o tratamento de herbivoria, 10 machos foram colocados no interior da cada câmara de aeração e removidos após 24h. A coleta dos voláteis iniciou 24h após a remoção dos machos. Os extratos foram coletados a cada 24h durante cinco dias. Para o tratamento de dano mecânico, uma folha de *E. benthamii* foi cortada na metade com uma tesoura e, após 24h, a coleta dos COVs iniciou. Os extratos foram coletados a cada 24h durante quatro dias. Todos os extratos obtidos foram imediatamente analisados por cromatografia gasosa e armazenados em freezer (-20°C).

3.3 Análises dos extratos

Os extratos foram analisados através de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GCMS) (QP 2010 Plus – Shimadzu) e de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de infravermelho transformado de Fourier (GC-FTIR) (GC-2010 acoplado a um DiscovIR-GC – Shimadzu). O GC e o GCMS estavam equipados com uma coluna RTX-5 (30 m x 0,25 mm i.d. e 0,25 mm de espessura de filme; Restek, Bellefonte, Pennsylvania, USA). Injeções de 1 µl de cada extrato foram realizadas utilizando o modo splitless com temperatura do injetor de 250°C. A temperatura da coluna foi mantida em 40 °C por 1 min, em seguida foi elevada a 180°C numa taxa de 5°C min⁻¹, e depois elevada a 250°C min⁻¹, numa taxa de 10°C min⁻¹, na qual se manteve por 2 min. O hélio foi utilizado como gás carreador, com pressão da coluna de 170 kPa. Os mesmos parâmetros foram usados para todas as análises.

Nas análises de infravermelho, o GC foi operado no modo splitless e equipado com uma coluna capilar DB-5 (0,25 µm, 0,25 m x 30 m) (J & W Scientific, Folsom, Califórnia, EUA) utilizando o hélio como gás carreador. O programa de temperatura foi o mesmo utilizado na análise de GC-MS. Um detector fotocondutivo de mercúrio-cadmio-telúrio (MCT) resfriado por nitrogênio líquido foi utilizado com FT-IR de resolução de 8 cm⁻¹.

3.4 Identificação dos compostos químicos

Os COVs foram identificados através da análise dos espectros de massas e de infravermelho (GC-MS e GC-FTIR) de cada componente, índices de Kovats (KI) e coinjeções com compostos comerciais e extratos de óleos essenciais. Os compostos α -pineno, β -pineno, limoneno, *p*-cimeno e linalool foram adquiridos da Aldrich Chemical Company (Milwaukee, Wisconsin, USA). Os compostos aromadendreno, globulol, epiglobulol, viridiflorol e 9-epi-(*E*)-cariofileno foram identificados baseados em análises de espectros de massas e KI. O aromadendreno, globulol e epiglobulol estão presentes no óleo essencial de *E. benthamii* (Döll-Boscardin et al. 2010) e coinjeções com esse extrato corroboraram a identificação.

3.5 Bioensaios

Os bioensaios de comportamento foram conduzidos em um olfatômetro em Y de 17 cm de comprimento, com dois braços de 13 cm cada. No final de cada braço, a fonte de odor foi colocada dentro de um tubo de vidro conectado ao sistema (1 cm de

diâmetro e 4 cm de comprimento). Para cada repetição, um novo papel filtro (1 cm²) contendo o extrato foi utilizado como fonte de atração (1 µl do extrato + 9 µl de hexano) para fêmeas acasaladas e virgens de *T. peregrinus* de 3 a 20 dias de idade. Inicialmente, foram testados extratos controle e extratos de plantas após 24h de herbivoria (extrato de planta controle vs. extrato de planta após herbivoria). Em seguida, os mesmos tratamentos foram testados utilizando plantas (planta controle vs. planta após herbivoria).

Soluções de α -pineno sintético (Aldrich Chemical Company) foram preparadas de forma que as concentrações fossem equivalentes às encontradas nos extratos de plantas após 24h de herbivoria (180 ng) e nos extratos de plantas controle (15 ng). A atração das fêmeas acasaladas e virgens foi testada para: A) extrato de planta controle vs. extrato de planta após herbivoria; B) planta controle vs. planta após herbivoria; C) α -pineno (180 ng) vs. hexano. A atração de fêmeas acasaladas ainda foi testada para: D) α -pineno (15 ng) vs. hexano. As respostas foram consideradas positivas após a escolha de um dos braços (ao menos 3 cm) pelo inseto. O tempo limite para cada resposta foi de 10 min. Para cada tratamento (fêmea acasalada ou virgem), 20 a 35 repetições foram realizadas.

3.6 Análises Estatísticas

Uma análise de variância multivariada (MANOVA) foi realizada avaliando todos os compostos e comparando os tratamentos (herbivoria, dano mecânico e controle). A MANOVA também foi realizada para comparar os COVs emitidos durante a fotofase e escotofase após a herbivoria. Três análises de variância individuais (ANOVAs) seguidas do teste de Tukey foram realizadas para os três compostos majoritários (α -pineno, aromadendreno e globulol) comparando os tratamentos ao longo do tempo. As análises de ANOVA e MANOVA foram realizadas utilizando o programa R versão 2.13 (R Development Core Team 2011). Os bioensaios foram analisados através do Teste Binomial com probabilidade de escolha de um dos braços do olfatômetro de 50%, utilizando o programa BioEstat 3.0 (Ayres et al. 2003).

4 RESULTADOS

4.1 COVs de *E. benthamii*: análise e comparação dos tratamentos

As análises dos extratos de aeração no GC revelaram diferenças entre os tratamentos controle, herbivoria e dano mecânico. Dentre outros, três componentes (**1**, **7** e **11**) estavam presentes nos extratos de herbivoria após 24h em quantidades maiores aos dos extratos controle e de dano mecânico (Fig. 34). A análise de variância multivariada (MANOVA) revelou que a quantidade média dos COVs emitidos após a herbivoria foi diferente da dos outros dois tratamentos, controle e dano mecânico (Wilks' $\lambda = 0,063$; $F = 5,74$; $P < 0,001$) (Fig. 35).

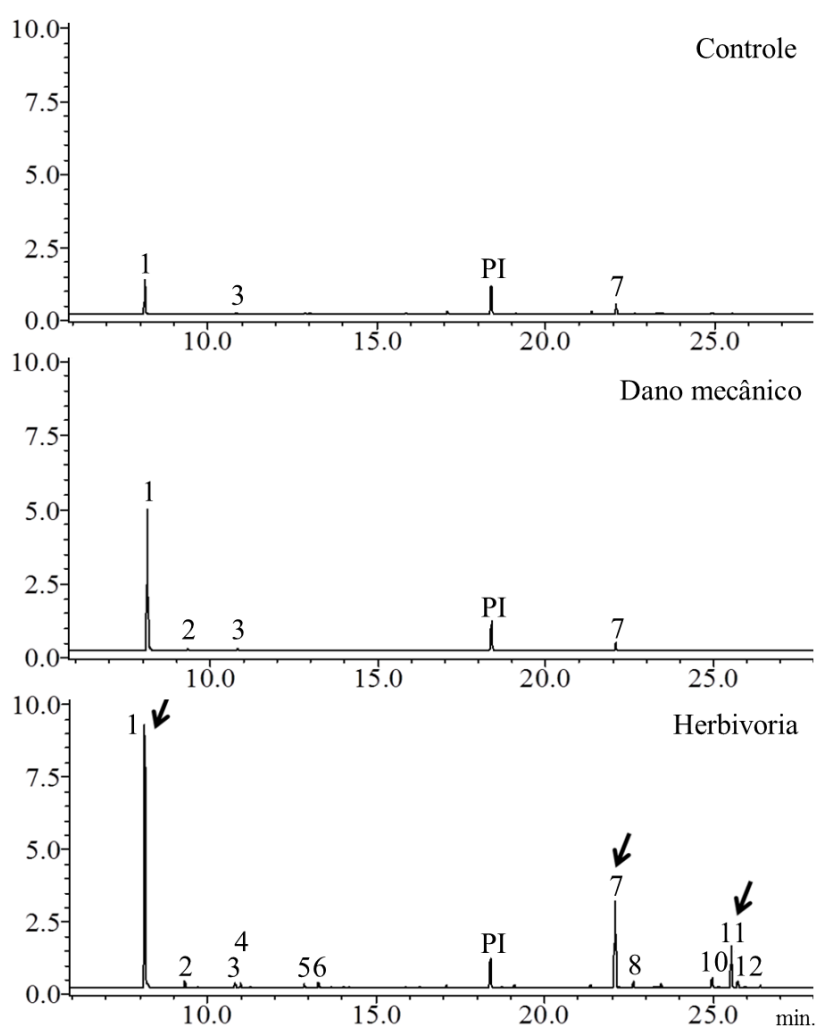


Fig. 34 Cromatogramas representativos dos COVs (1-12) emitidos por plantas de *Eucalyptus benthamii* 24h após os tratamentos: herbivoria de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae), dano mecânico e controle. As flechas indicam os três compostos majoritários emitidos em maior concentração após a herbivoria (compostos 1, 7 e 11).

A identificação dos três compostos majoritários está explicada abaixo e a mesma metodologia foi utilizada para a identificação dos demais compostos. Seus tempos de retenção (Rts) e índices de Kovats (KIs) em coluna RTX-5 foram: **1**: Rt = 8,13 min, KI = 928; **7**: Rt = 22,09 min, KI = 1448; e **11**: Rt = 25,5 min, KI = 1593. O espectro de massas do composto **1** revelou um pico base de m/z 93, fragmentos de m/z 41, m/z 77, m/z 91, m/z 105, m/z 121 e um íon molecular de 136 Da (Fig. 36 - 1A). Comparações de espectros de massas com a biblioteca NIST indicaram que o composto **1** poderia se tratar do α -pineno. O sinal mais importante do espectro de infravermelho (GC-FTIR) do composto **1** foi em 3028 cm^{-1} , referente ao estiramento C-H *cis* assimétrico (Smith 1999) (Fig. 36 - 1B), corroborando a identificação do composto como α -pineno. A estrutura química foi confirmada através da coinjeção do extrato com o padrão sintético.

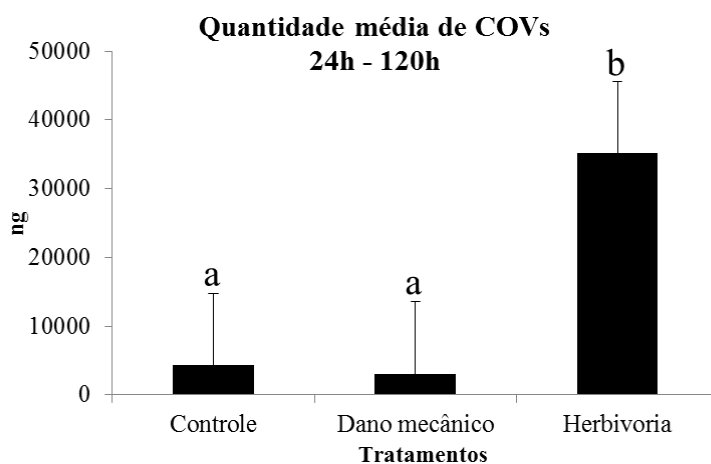


Fig. 35 Quantidade média de COVs emitidos por plantas de *Eucalyptus benthamii* 24h a 120h após a herbivoria de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae), comparados com os tratamentos de dano mecânico e controle. Análise estatística: MANOVA ($P < 0,05$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

O espectro de massas do composto **7** revelou um pico base de m/z 91, fragmentos de m/z 41, m/z 105, m/z 119, m/z 133, m/z 161 e íon molecular de 204 Da (Fig. 36 - 7A), que sugeriu fortemente sua estrutura como um sesquiterpeno de fórmula molecular $C_{15}H_{24}$. O espectro de infravermelho (GC-FTIR) revelou um sinal em 3083 cm^{-1} , referente ao estiramento assimétrico de um CH_2 vinílico e um segundo sinal em

1638 cm^{-1} , referente a um estiramento de dupla ligação C=C (Smith 1999) (Fig. 36 - 7B). A comparação do espectro de massas e do índice de Kovats com a literatura (Adams 2007) sugeriu que o composto fosse o aromadendreno. A coinjeção do extrato com o óleo essencial de *E. benthamii* contendo o composto aromadendreno (Döll-Boscardin et al. 2010) confirmou a identificação do composto **7**.

O espectro de massas do composto **11** revelou um pico base de m/z 43, fragmentos de m/z 69, m/z 81, m/z 109, m/z 122, m/z 161, m/z 189, m/z 204 e íon molecular de 222 Da (Fig. 36 - 11A), sugerindo uma estrutura sesquiterpenoide com fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$. A análise de GC-FTIR revelou um sinal em 3328 cm^{-1} , caracterizando um estiramento O-H de um álcool (Smith 1999) (Fig. 36 - 11B). Além disso, observou-se o desaparecimento da dupla ligação terminal no espectro de infravermelho comparado ao espectro do aromadendreno. O tempo de retenção maior do composto **11**, em conjunto com seu índice de Kovats e a comparação do espectro de massas disponível na literatura (Adams 2007), sugeriram que fosse o globulol, sesquiterpenoide proximamente relacionado ao aromadendreno **7**. Coinjeções com o óleo essencial de *E. benthamii*, que continha o composto globulol (Döll-Boscardin et al. 2010) suportaram fortemente a identificação do composto **11**.

Um total de doze compostos químicos, principalmente, monoterpenos e sesquiterpenos, foram detectados nos extratos de aeração de *E. benthamii* nos diferentes tratamentos (Fig. 37). Comparando as quantidades emitidas 24h após a herbivoria para os três compostos majoritários **1**, **7** e **11**, pode-se observar um aumento de aproximadamente 11, 69 e 59 vezes do que nas plantas controle, respectivamente. Após 120h esses números diminuíram para 3, 10 e 11 vezes (Tabela V).

Juntamente com esses três compostos majoritários, outros cinco compostos foram emitidos pelas plantas após a alimentação de *T. peregrinus* e não foram detectados nos extratos das plantas controle: β -pineno **2**, linalool **5**, 9-epi-(*E*)-cariofileno **8**, viridiflorol **12** e o composto minoritário não identificado **9**. Após o dano mecânico, esses compostos foram emitidos em menores quantidades quando comparados com as plantas 24h após a herbivoria. Por exemplo, o β -pineno foi emitido 150 vezes a mais após a herbivoria do que após o dano mecânico (Tabela V). Para a maioria dos compostos as quantidades emitidas foram maiores após as primeiras 24h de herbivoria e diminuíram gradativamente com o passar dos dias. Foi uma exceção o composto *p*-cimeno **3**, cuja emissão diminuiu após a herbivoria e sofreu um grande aumento após 72h.

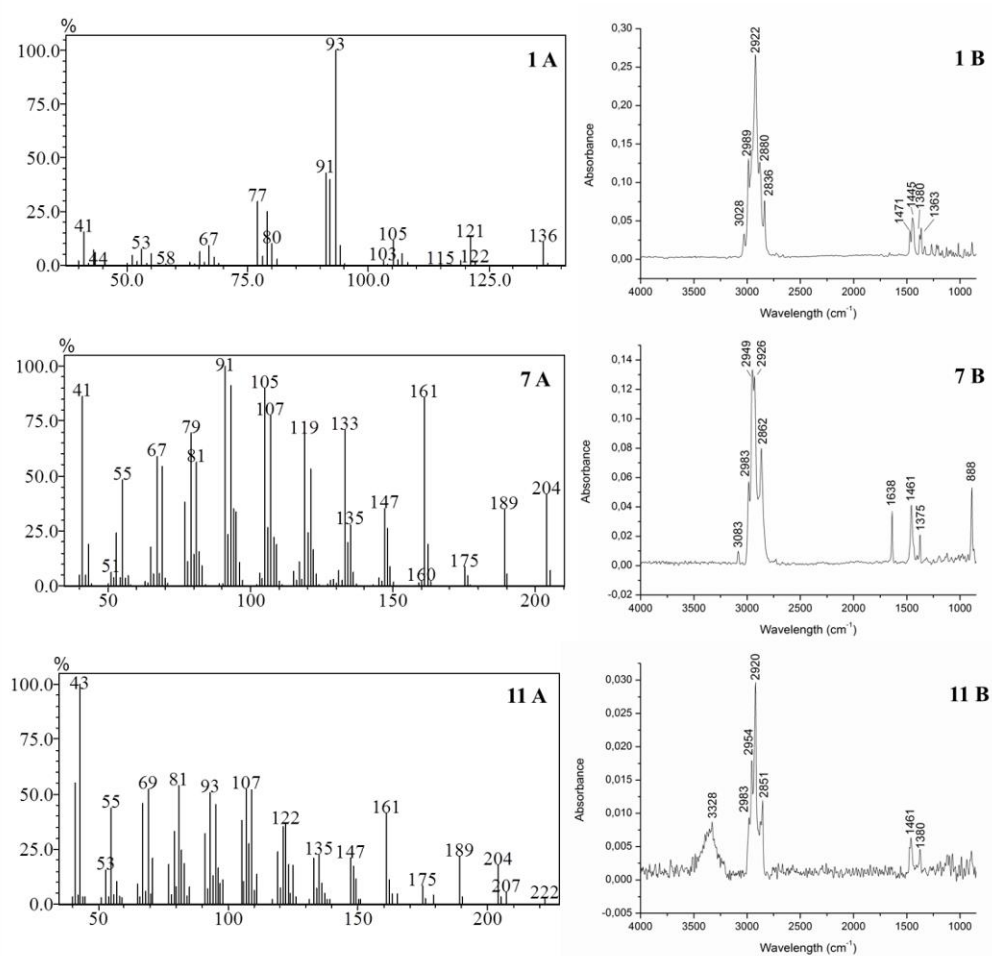


Fig. 36 Espectro de massas (esquerda - 1A, 7A e 11A) e de infravermelho (direita - 1B, 7B e 11B) dos três compostos majoritários emitidos por plantas de *Eucalyptus benthamii* após a herbivoria de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae).

Tabela V. Identificação e quantificação (média ± SE) (ng) dos COVs emitidos por plantas de *Eucalyptus benthamii*. Tratamentos: herbivoria de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) (24h – 120h), dano mecânico e controle. N – número do composto químico; RT – tempo de retenção; KI – índice de Kovats; nd – não detectável; EP – erro padrão; X – composto não identificado; * – identificação baseada em espectros de massas e de infravermelho, em índice de Kovats, e em coinjeções com compostos sintéticos ou óleo essencial de *E. benthamii*.

N	RT	KI	Compostos	Controle		Dano Mecânico		Herbivoria									
				Média	EP	Média	EP	24h		48h		72h		96h		120h	
								Média	EP	Média	EP	Média	EP	Média	EP	Média	EP
1	8,134	928	α-pineno	2900,01 ± 1159,79		2141,15 ± 656,70		36116,41 ± 921,17		20051,63 ± 2471,11		24009,17 ± 4171,83		23833,09 ± 5297,19		11181,55 ± 1699,73	
2	9,331	977	β-pineno	nd		4,53 ± 2,78		766,47 ± 16,62		332,44 ± 50,45		351,66 ± 64,79		315,24 ± 56,71		152,31 ± 26,80	
3	10,603	1025	p-cimeno	682,23 ± 287,62		344,46 ± 101,98		161,51 ± 49,55		124,65 ± 36,90		1405,14 ± 580,89		93,29 ± 25,58		25,56 ± 8,58	
4	10,822	1030	limoneno	280,41 ± 265,93		46,79 ± 14,14		760,47 ± 61,72		316,61 ± 61,01		406,74 ± 82,54		488,78 ± 121,65		209,72 ± 43,98	
5	12,873	1102	linalool	nd		15,58 ± 8,59		532,28 ± 144,42		197,04 ± 56,38		204,60 ± 61,41		165,29 ± 50,68		105,56 ± 36,76	
6	13,315	1116	x	16,51 ± 5,85		129,87 ± 42,67		74,83 ± 16,92		69,75 ± 19,03		83,77 ± 25,38		174,31 ± 63,65		201,62 ± 78,46	
7	22,093	1448	aromadendreno*	240,15 ± 98,49		326,80 ± 110,09		16502,26 ± 1315,42		6272,95 ± 1084,73		4964,08 ± 1103,31		3310,29 ± 874,76		2360,70 ± 659,76	
8	22,631	1470	epi-(E)-cariofileno*	nd		2,11 ± 2,11		1492,65 ± 156,77		429,73 ± 74,04		317,41 ± 77,55		179,99 ± 57,24		117,26 ± 40,34	
9	23,447	1505	x	nd		6,20 ± 6,07		732,82 ± 221,84		211,00 ± 49,37		160,65 ± 38,40		75,89 ± 22,87		42,69 ± 17,26	
10	24,937	1569	epiglobulol*	23,29 ± 18,03		0,27 ± 0,27		2440,78 ± 302,74		777,04 ± 58,15		242,84 ± 80,55		472,32 ± 87,24		223,23 ± 43,70	
11	25,532	1593	globulol*	69,12 ± 31,23		16,87 ± 13,04		3845,56 ± 492,83		815,42 ± 240,52		487,32 ± 182,08		1442,62 ± 432,06		786,18 ± 252,86	
12	25,719	1602	viridiflorol*	nd		6,42 ± 3,85		502,36 ± 135,31		11,49 ± 5,14		0,94 ± 0,42		150,59 ± 67,35		81,17 ± 36,30	
Total (ng) - Controle				4211,72 ± 1423,54													
Total (ng) - Dano Mecânico						3041,05 ± 821,15											
Total (ng) - Herbivoria								63928,40 ± 4341,64		29609,75 ± 8456,30		32634,31 ± 12396,38		30701,69 ± 13070,93		15487,54 ± 5384,20	

Para o α -pineno, principal composto emitido por *E. benthamii*, os valores variaram de $2,9 \pm 1,1 \mu\text{g}$ nas plantas controle até $36,1 \pm 0,9 \mu\text{g}$ nas plantas após 24h de herbivoria. As plantas controle e as do tratamento com dano mecânico não emitiram compostos específicos. Apesar do α -pineno ter aumentado após o dano mecânico, sua concentração foi menor do que após a herbivoria, como pode ser observado para a maioria dos compostos (Tabela V). A concentração dos três compostos majoritários emitidos por plantas após o tratamento de herbivoria foi diferente das plantas controle e tratadas com dano mecânico (α -pineno, aromadendreno e globulol; $P < 0,001$). Para o α -pineno ($P = 0,011$) e o globulol ($P < 0,001$) as primeiras 24h de todos os tratamentos diferiram das 72h - 120h. Já as 48h não diferiram das 72h - 120h. Para o aromadendreno não houve diferenças entre 24h - 120h ($P = 0,778$) (Fig. 38).

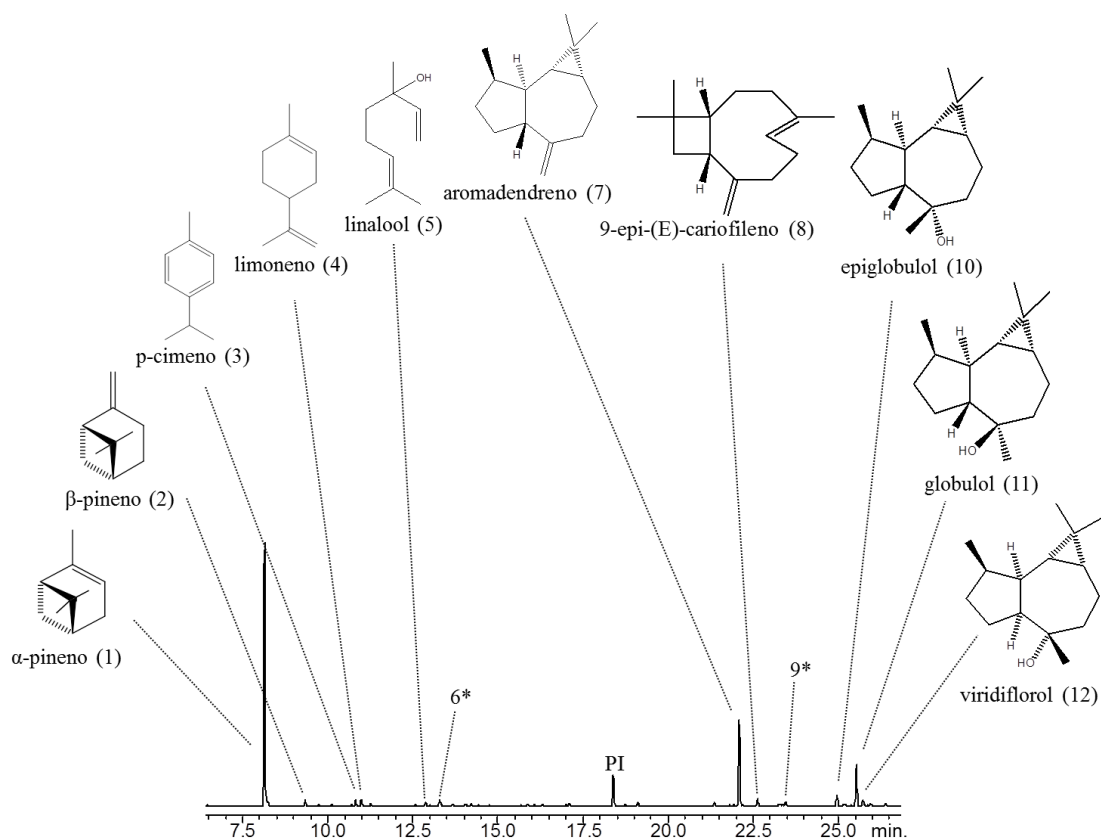


Fig. 37 COVs emitidos por plantas de *Eucalyptus benthamii* 24h após a herbivoria de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae). * Composto não identificado; PI: padrão interno (tridecano).

4.2 Efeito do fotoperíodo na emissão dos COVs induzidos por herbivoria

Na análise do fotoperíodo, todos os compostos foram emitidos na fotofase e na escotofase (Tabela V) e a MANOVA indicou que a fotofase e a escotofase não foram diferentes entre si quando comparadas nas 24h – 96h de análise (*tratamentos*: Wilks' $\lambda = 0,24$; $F_{15,2} = 0,41$; $P = 0,87$; *tempo (24h-96h)*: Wilks' $\lambda = 0,006$; $F_{45,6.7} = 0,65$; $P = 0,81$; *tempo e tratamento*: Wilks' $\lambda = 0,009$; $F_{45,6.7} = 0,55$; $P < 0,88$) (Fig. 39).

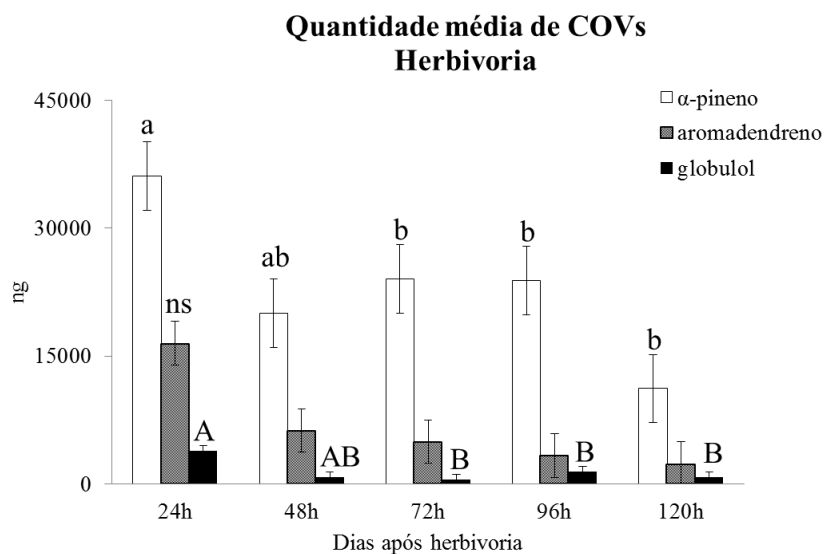


Fig. 38 Dinâmica de emissão dos COVs majoritários (α -pineno, aromadendreno e globulol) liberados por plantas de *Eucalyptus benthamii* entre 24h e 120h após a herbivoria de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae). Análise estatística: ANOVA ($P < 0,05$). As letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

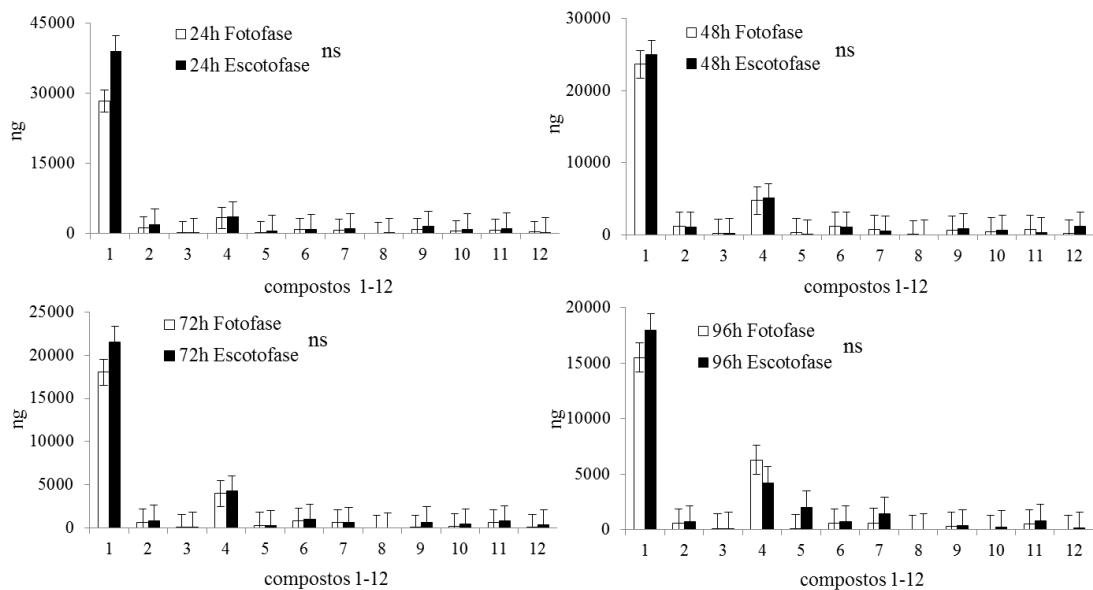


Fig. 39 Dinâmica de emissão dos COVs (números de 1-12) produzidos por plantas de *Eucalyptus benthamii* durante a fotofase e escotofase após a herbivoria de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) (24h - 96h). Análise estatística: MANOVA ($P < 0,05$).

4.3 Bioensaios

A atração de fêmeas virgens e acasaladas foi testada frente a diferentes extratos, voláteis de plantas e soluções sintéticas de α -pineno. Os bioensaios revelaram que as fêmeas acasaladas preferiram o extrato de plantas controle ($P = 0,019$) (Fig. 40 A) e a planta controle ($P = 0,03$) (Fig. 40 B) quando comparados aos extratos de herbivoria e a planta após a herbivoria, respectivamente. As fêmeas virgens não revelaram preferência entre os extratos controle e de herbivoria ($P = 0,62$) (Fig. 41 A), e entre as plantas controle e planta após a herbivoria ($P = 0,85$) (Fig. 41 B). As fêmeas acasaladas foram atraídas para o hexano vs. α -pineno (180 ng) ($P = 0,004$) (Fig. 40 C). No entanto, elas não mostraram preferência entre o α -pineno (15 ng) vs. hexano ($P = 0,5$) (Fig. 40 D). Já as fêmeas virgens não demonstraram preferência entre hexano vs. α -pineno (180 ng) ($P = 0,5$) (Fig. 41 C).

FÊMEAS ACASALADAS
3 a 20 dias

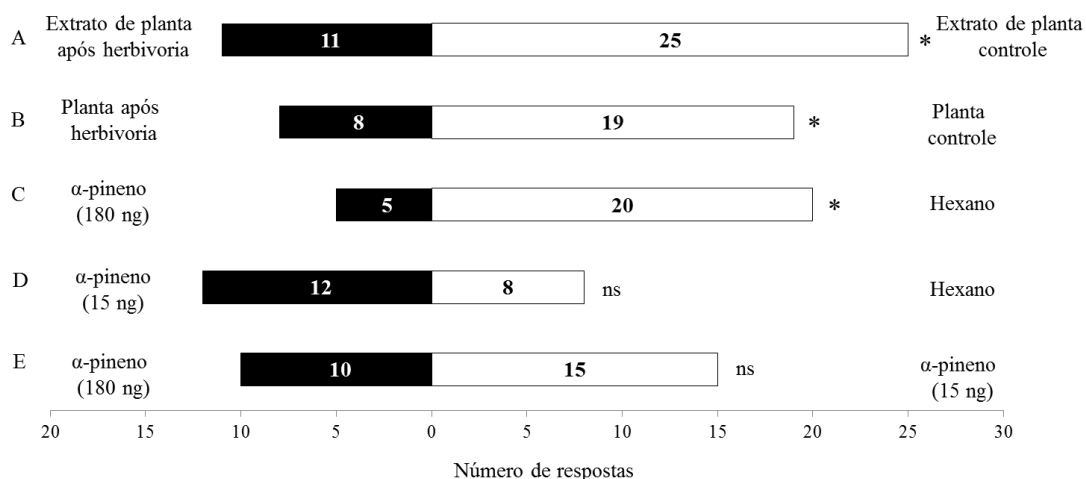


Fig. 40 (A-D) Número de respostas de fêmeas acasaladas (idade: 3-20 dias) de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) aos COVs de *Eucalyptus benthamii* de extratos de planta após herbivoria e controle, de plantas após herbivoria e controle e de soluções de α -pineno em duas concentrações diferentes (180 ng e 15 ng), em um olfatômetro em Y. * Significativo; ns: não significativo com $P \leq 0,05$. Análise estatística: Teste Binomial ($P < 0,05$). Concentrações de α -pineno: 180 ng – equivalente à emissão de plantas 24h após a herbivoria; 15 ng – equivalente à emissão de plantas controle.

FÊMEAS VIRGENS
3 a 20 dias

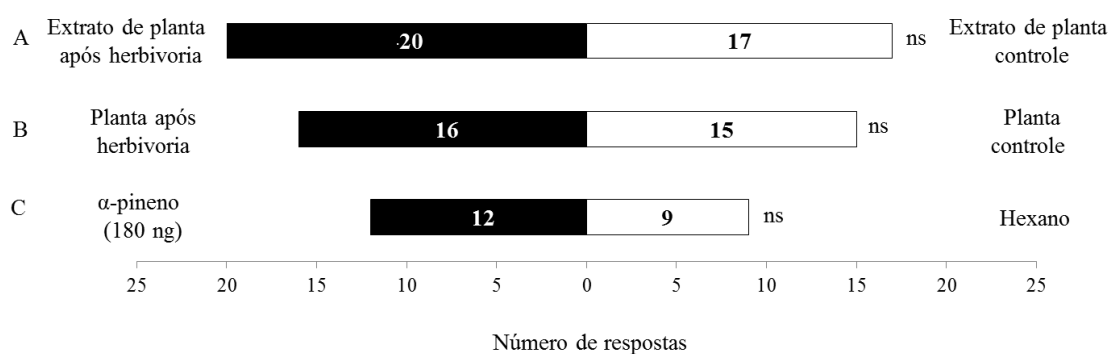


Fig. 41 (A-C) Número de respostas de fêmeas virgens (idade: 3-20 dias) de *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) aos COVs de *Eucalyptus benthamii* de extratos de planta após herbivoria e controle, de plantas após herbivoria e controle, e de soluções de α -pineno (180 ng), em um olfatômetro em Y. * Significativo; ns: não significativo com $P \leq 0,05$. Análise estatística: Teste Binomial ($P < 0,05$). Concentrações de α -pineno: 180 ng – equivalente à emissão de plantas 24h após a herbivoria.

5 DISCUSSÃO

Isopreno e monoterpenos são os compostos predominantes nas emissões biogênicas de inventários em todo o mundo (Kesselmeier e Staudt 1999). Dentre as espécies de *Eucalyptus*, o α -pineno é o principal composto emitido, seguido pelo 1,8-cineole e pelo β -pineno (He et al. 2000). Neste estudo, o α -pineno foi o composto mais abundante em todos os tratamentos, seguido pelo aromadendreno (um sesquiterpeno) e pelo globulol (um sesquiterpenoide). Em *E. citriodora*, *E. dunnii* e *E. saligna* os seguintes compostos também foram identificados a partir de extrações por microextração em fase sólida: α -pineno, β -pineno, p-cimeno, limoneno, linalool, aromadendreno e globulol (Zini et al. 2002).

A síntese de monoterpenos é influenciada pela luz e pela temperatura (Staudt et al. 1997), por isso as plantas podem produzir e emitir compostos diferentes e em diferentes taxas de acordo com o fotoperíodo. Plantas de algodão, *Gossypium hirsutum* (Malvaceae), emitiram α -pineno e cariofileno 24h após a alimentação de *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae). No entanto, depois de 48h, outros terpenos foram detectados (e.g. (*E*)-1-ocimeno, linalool, (*E*)- β -farneseno e (*E,E*)- α -farneseno) e exibiram uma periodicidade diurna (Loughrin et al. 1994). Em outro estudo, ocorreu o oposto, terpenos (e.g. linalool, (*E*)- β -cimeno, β -cariofileno, α -humuleno e (*E,E*)- α -farneseno) foram detectados apenas na escotofase nos extratos de

Nicotiana tabacum (Solanaceae) infestadas com *Heliothis virescens* (Fabricius, 1777) (Lepidoptera: Noctuidae) (De Moraes et al. 2001). Para *E. benthamii* não houve diferenças entre os COVs emitidos durante a fotofase e escotofase após a herbivoria. Diferentes espécies de *Eucalyptus*, como *E. grandis*, *E. globulus*, *E. camaldulensis* e *E. viminalis* também não apresentaram diferenças na emissão de monoterpenos durante a fotofase e escotofase. Por isso, aparentemente, a emissão de monoterpenos para estas espécies não foi foto-dependente, sugerindo que pode ser regulada predominantemente pela temperatura (Winters et al. 2009). Neste estudo, talvez pela temperatura ter se mantido constante durante os experimentos, não foram observadas diferenças quantitativas ou qualitativas nos compostos emitidos após a herbivoria durante a fotofase e escotofase.

Um conjunto de COVs conhecidos como voláteis de folhas verdes VFVs são comumente emitidos por plantas com tecidos danificados (Matsui 2006). São aldeídos com seis carbonos, álcoois e seus ésteres que não foram detectados nas emissões de *E. benthamii*. No entanto, Bouwer (2010) identificou os VFVs (*E*)-2-hexenal, (*Z*)-3-hexen-1-ol e acetato de (*Z*)-hexen-3-ila, juntamente com os monoterpenos α -pineno, β -pineno e limoneno nas aerações com extrato de folhas de *E. globulus*, *E. viminalis* e *E. citridora*.

As plantas sintetizam e emitem COVs em resposta a herbivoria (Turlings et al. 1990), e conjuntos de COVs também se modificam após o dano mecânico (Walling 2000). Por exemplo, Hegde et al. (2011) detectaram um aumento quantitativo nos compostos emitidos por plantas de algodão infestadas com *Aphis gossypii* Glover, 1877 (Hemiptera: Aphididae), quando comparados com plantas controle. Assim como no exemplo acima, no presente estudo, os COVs emitidos por plantas de *E. benthamii* em resposta à herbivoria foram diferentes qualitativamente e quantitativamente dos COVs emitidos por plantas controle. No entanto, os COVs emitidos por plantas após a herbivoria de *T. peregrinus* não foram diferentes qualitativamente dos emitidos por plantas que sofreram dano mecânico. Comparando-se as plantas que sofreram herbivoria e dano mecânico, a diferença quantitativa total de COVs emitidos foi de aproximadamente 10 vezes a mais após a herbivoria. O mesmo foi observado por Turlings et al. (1990), cujas plantas responderam ao dano mecânico emitindo pequenas quantidades dos mesmos compostos emitidos após a herbivoria.

Sabe-se que os compostos emitidos após a herbivoria atraem inimigos naturais específicos (De Moraes et al. 1998), no entanto, as respostas dos herbívoros a esses

COVs precisam ser melhor estudadas. Pesquisas revelaram que tanto a atração quanto a repelência de herbívoros pelos COVs de plantas atacadas já foram observadas e, por isso, a resposta dos herbívoros deve ser avaliada especificamente para cada sistema. Por exemplo, em *Frankliniella occidentalis* (Pergande, 1895) (Thysanoptera: Thripidae), houve preferência de distribuição e oviposição por plantas não atacadas de tabaco (*N. tabacum*), comparada com outros tratamentos (e.g. herbivoria) (Delphia et al. 2007). Entretanto, o besouro da batata *Leptinotarsa decemlineata* (Say, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) preferiu se orientar para plantas que foram infestadas por coespecíficos (Schultz et al. 1997).

Até hoje não foi detectado um padrão de como os herbívoros respondem aos COVs de plantas não atacadas e atacadas por coespecíficos. Por exemplo, os besouros são geralmente atraídos por COVs emitidos por plantas atacadas, enquanto as mariposas e os afídeos parecem evitar os COVs de plantas atacadas (Turlings e Wäckers 2004).

Pouco se sabe sobre as respostas dos heterópteros frente aos COVs de plantas atacadas, e menos ainda sobre Thaumastocoridae. Por isso, neste estudo focou-se na resposta de fêmeas acasaladas e virgens de *T. peregrinus* aos COVs de plantas de *E. benthamii* não atacadas e atacadas por coespecíficos. Os resultados indicaram que as fêmeas virgens não foram atraídas especificamente para nenhum dos tratamentos e que, ao contrário, fêmeas acasaladas preferiram os extratos de plantas controle ao extrato da planta atacada. Corroborando esses resultados, as fêmeas acasaladas preferiram o hexano ao α -pineno na concentração equivalente à emitida por plantas após a herbivoria, revelando preferência por um ambiente livre de α -pineno. Quando extratos de α -pineno foram testados numa concentração muito menor, equivalente à emissão de plantas controle, as fêmeas acasaladas não preferiram o hexano, revelando que apenas altas concentrações de α -pineno foram rejeitadas quando testadas contra o hexano.

Esta preferência das fêmeas acasaladas por plantas não atacadas pode representar a preferência por um ambiente com menos competidores e inimigos naturais para seus descendentes (Dicke e van Loon 2000). Corroborando esta hipótese, Thaler (1999) determinou uma maior taxa de parasitismo em larvas de *S. exigua* associadas a plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* var. Ace - Solanaceae) que foram induzidas por ácido jasmônico quando comparadas à plantas controle. Além disso, esta preferência de fêmeas acasaladas à plantas controle pode ser em função da alta concentração de compostos emitidos pelas plantas atacadas, especialmente o α -pineno, que está presente no óleo essencial de *Eucalyptus* spp. conhecido por sua ação repelente a insetos (Liu et

al. 2011; Batish et al 2008). Além disso, fêmeas acasaladas preferiram o hexano ao α -pineno (180 ng), sugerindo que em altas concentrações, como em 180 ng, o α -pineno poderia ser repelente para estas fêmeas.

As fêmeas virgens, no entanto, não foram atraídas especificamente para o extrato de planta atacada nem para o extrato de planta controle. Corroborando com este fato, os bioensaios com extratos de α -pineno revelaram que fêmeas virgens mantiveram a falta de preferência quando testadas para α -pineno (180 ng) vs. hexano, sugerindo que elas não detectaram ou não rejeitaram esse composto em altas concentrações. Para fêmeas virgens, a falta de preferência a COVs específicos já foi descrita para: *Delia antiqua* (Meigen) (Diptera: Anthomyiidae) ao dissulfeto de dipropila, um atrativo emitido pelo metabolismo bacteriano de raízes de cebola e na decomposição de material vegetal (Romeis et al. 2003); *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) a folhas de tomate (Proffit et al. 2011); e para o parasitoides *Cotesia vestalis* (Haliday) (Hymenoptera: Braconidae) a plantas hospedeiras infestadas vs. plantas controle (Kugimiya et al. 2010). A necessidade de buscar um local de oviposição ou não, pode ser responsável pela preferência das fêmeas acasaladas e pela não preferência das fêmeas virgens.

O entendimento dos mecanismos envolvidos na interação entre plantas, herbívoros e inimigos naturais pode ser utilizado como base no desenvolvimento de novas estratégias de controle e monitoramento de pragas. Estudos futuros devem focar na identificação e quantificação de COVs emitidos por outras espécies de *Eucalyptus*, que podem emitir COVs diferentes, e na atratividade de *T. peregrinus* a eles. Além disso, o efeito da oviposição na emissão de COVs e a resposta de parasitoides aos diferentes tratamentos devem ser explorados.

6 CONCLUSÕES

Os COVs emitidos por plantas de *E. benthamii* após a herbivoria de *T. peregrinus* foram diferentes dos COVs de planta controle e após o dano mecânico, especialmente porque emitiram compostos específicos em altas concentrações. As primeiras 24h após a herbivoria tiveram as emissões mais altas de voláteis, especialmente de α -pineno e globulol. Os COVs emitidos por plantas controle e plantas após o dano mecânico, apesar das suas diferenças qualitativas não tiveram sido diferentes nas análises estatísticas. Os COVs emitidos por plantas durante a fotofase e escotofase foram quantitativamente e qualitativamente iguais. Os bioensaios revelaram

a preferência de fêmeas acasaladas por plantas controle, quando comparadas a plantas infestadas. Essas fêmeas foram capazes de distinguir diferentes concentrações de α -pineno, preferindo o hexano quando testado contra a concentração mais alta. As fêmeas virgens não tiveram preferência entre as plantas controle e as que sofreram herbivoria, nem rejeitaram, como as acasaladas, o α -pineno em altas concentrações.

7 REFERÊNCIAS

- Adams, R. P. (2007) Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th Edition. Allured Publishing Corporation, 804 pp.
- Ayres, M., Ayres Jr. M., Santos, A. S. (2003) Bioestat 3.0. Soc. Civil Mamirauá, Belém.
- Batish, D. R., Singh, H. P., Kohli, R. K., Kaur, S. (2008) *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*. 256: 2166–2174.
- Bouwer, M. C. (2010) Identification of volatile organic compounds from *Eucalyptus* detected by *Gonipterus scutellatus* (Gyllenhal) females. Dissertação de Mestrado, University of Pretoria.
- Delphia, C. M., Mescher, M. C., De Moraes, C. M. (2007) Induction of Plant Volatiles by Herbivores with Different Feeding Habits and the Effects of Induced Defenses on Host-Plant Selection by Thrips. *Journal of Chemical Ecology*. 33: 997–1012.
- De Moraes, C. M., Mescher, M.C., Tumlinson, J. H. (2001) Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature*. 410: 577–580.
- De Moraes, C.M., Lewis, W.J., Pare, P.W. (1998) Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature*. 393: 570–573.
- Dicke, M., Van Loon, J. J. A. (2000) Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 97: 237–49.
- Döll-Boscardin, P. M., Farago, P. V., Nakashima T., Santos P.E.T. dos, Paula J. de F.P. de. (2010) Estudo Anatômico e Prospecção Fitoquímica de Folhas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage. *Latin American Journal of Pharmacy*. 29: 94–101.
- He, C., Murray, F., Lyons, T. (2000) Monoterpene and isoprene emissions from 15 *Eucalyptus* species in Australia. *Atmospheric Environment*. 34: 645–655.

- Hegde, M., Oliveira, J. N., da Costa, J. G., Bleicher E., Santana, A. E. G., Bruce, T. J. A., Caulfield, J., Dewhirst, S. Y., Woodcock, C. M., Pickett, J. A., Birkett, M. A. (2011) Identification of Semiochemicals Released by Cotton, *Gossypium hirsutum*, Upon Infestation by the Cotton Aphid, *Aphis gossypii*. *Journal of Chemical Ecology*. 37: 741–750.
- Higa, R. C. V. (1999) Aspectos ecológicos e silviculturais do *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage. *Boletim de Pesquisa Florestal*. 38: 121-123.
- Kesselmeier, J., Staudt, M. (1999) Biogenic Volatile Organic Compounds (VOC): An Overview on Emission, Physiology and Ecology. *Journal of Atmospheric Chemistry*. 33: 23–88.
- Kugimiya, S., Shimoda, T., Wajnberg, E., Uefune, M., Takabayashi, J. (2010) Host-searching responses to herbivory-associated chemical information and patch use depend on mating status of female solitary parasitoid wasps. *Ecological Entomology*. 35: 279–286.
- Liu, Z. L., Yu, M., Li, X. A. M. (2011) Repellent activity of eight essential oils of Chinese Medicinal Herbs to *Blattella germanica*. *Records of Natural Products*. 5: 176–183.
- Loughrin, J. H., Manukian, A., Heath, R. R., Tumlinson, J. H. (1994) Diurnal cycle of emission of induced volatile terpenoids by herbivore-injured cotton plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 21: 1217–1227.
- Matsui, K. (2006) Green leaf volatiles: Hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*. 9: 274–280.
- Nadel, R. L., Slippers, B. (2009) DNA bar-coding reveals source and patterns of *Thaumastocoris peregrinus* invasions in South Africa and South America. *Biological Invasions*. 12: 1067–1077.
- Proffitt, M., Birgersson, G., Bengtsson, M., Reis Jr., R., Witzgall, P., Lima, E. (2011) Attraction and Oviposition of *Tuta absoluta* Females in Response to Tomato Leaf Volatiles. *Journal of Chemical Ecology*. 37: 565–574.
- R Development Core Team (2011) R: a language and environment for statistical computing. <http://www.R-project.org>.
- Romeis, J., Ebbinghaus, D., Scherkenbeck, J. (2003) Factors accounting for the variability in the behavioral response of the onion fly (*Delia antiqua*) to n-dipropyl disulfide. *Journal of Chemical Ecology*. 29: 2131–2142.

- Schültz, S., Weißbecker, B., Klein, A., Hummel, H. E. (1997) Host plant selection of the Colorado Potato Beetle as influenced by damage induced volatiles of the potato plant. *Naturwissenschaften*. 84: 212–217.
- Smith, B. (1999). Infrared spectral interpretation: a systematic approach. CRC Press, 265 pp.
- Staudt, M., Bertin, N., Hansen, U., Seufert, G., Cicciooli, P., Foster, P., Frenzel, B., Fugit, J-L. (1997) Seasonal and diurnal patterns of monoterpene emissions from *Pinus pinea* (L.) under field conditions. *Atmospheric Environment*. 31: 145–156.
- Thaler, J. S. 1999. Jasmonate-inducible plant defenses cause increased parasitism of herbivores. *Nature*. 399: 686–588.
- Turlings, T. C. J., Tumlinson, J. H., Lewis, W. J. (1990) Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science*. 250: 1251–1253.
- Turlings, T. C. J., Wäckers, F. (2004) Recruitment of predators and parasitoids by herbivore-injured plants, pp. 21-75, em R. T. Cardé and J.G. Millar (eds.). *Advances in Insect Chemical Ecology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Walling, L. L. (2000) The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation*. 19: 195–216.
- Wilcken, C., Soliman, E., Soliman, E. P., Sá, L. A. N., Barbosa, L. R., Dias, T. K. R., Ferreira-Filho, P. J., Oliveira, R. J. R. (2010) Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on *Eucalyptus* in Brazil and its distribution. *Journal of Plant Protection Research*. 50: 201–205.
- Winters, A. J., Adams, M. A., Bleby, T. M., Rennenberg, H., Steigner, D., Steinbrecher R., Kreuzwieser, J. (2009) Emissions of isoprene, monoterpene and short-chained carbonyl compounds from *Eucalyptus* spp. in southern Australia. *Atmospheric Environment*. 43: 3035–3043.
- Zini, C. A., Augusto F., Christensen, E., Carama, E. B., Pawliszyn, J. (2002) SPME Applied to the Study of Volatile Organic Compounds Emitted by Three Species of *Eucalyptus* in Situ. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 50: 7199–7205.

Anexo 1

- Artigo referente ao Capítulo 2, publicado na revista Micron em fevereiro/2012.

Display Settings: Abstract



Micron, 2012 Feb;43(2-3):321-5. doi: 10.1016/j.micron.2011.09.008. Epub 2011 Sep 24.

Scanning electron micrographs of *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera, Curculionidae), plastron structure and swimming behavior.

Martins CB, de Almeida LM, Zarbin PH.

Universidade Federal do Paraná (UFPR), Departamento de Química, Laboratório de Semioquímicos, 81531-990 Curitiba, PR, Brazil. camibcm@yahoo.com

Abstract

The morphological structures that permit *Oryzophagus oryzae* aquatic activities and swimming behavior were studied and compared with various weevils and other relevant species. The use of scanning electron microscopy facilitated the recognition of three different hydrofuge scales and sensilla. Based on the microscopic observations of behavior, morphological evidence, and comparisons with other curculionid species, it was supported that the gas exchange in *O. oryzae* adults relies on a subelytral air store maintained by hydrofuge scales and a ribbed margin on the adult elytra. The plastron structure is identical to *Lissorhoptrus oryzophilus* supporting the application of similar control measures for both species.

Copyright © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

PMID: 22055468 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Publication Types, MeSH Terms

LinkOut - more resources

Anexo 2

- As duas figuras abaixo foram retiradas de Hix et al. (2000), pois descrevem o modo de natação de *Lissorhoptrus orzophilus* que é idêntico ao de *O. oryzae*.

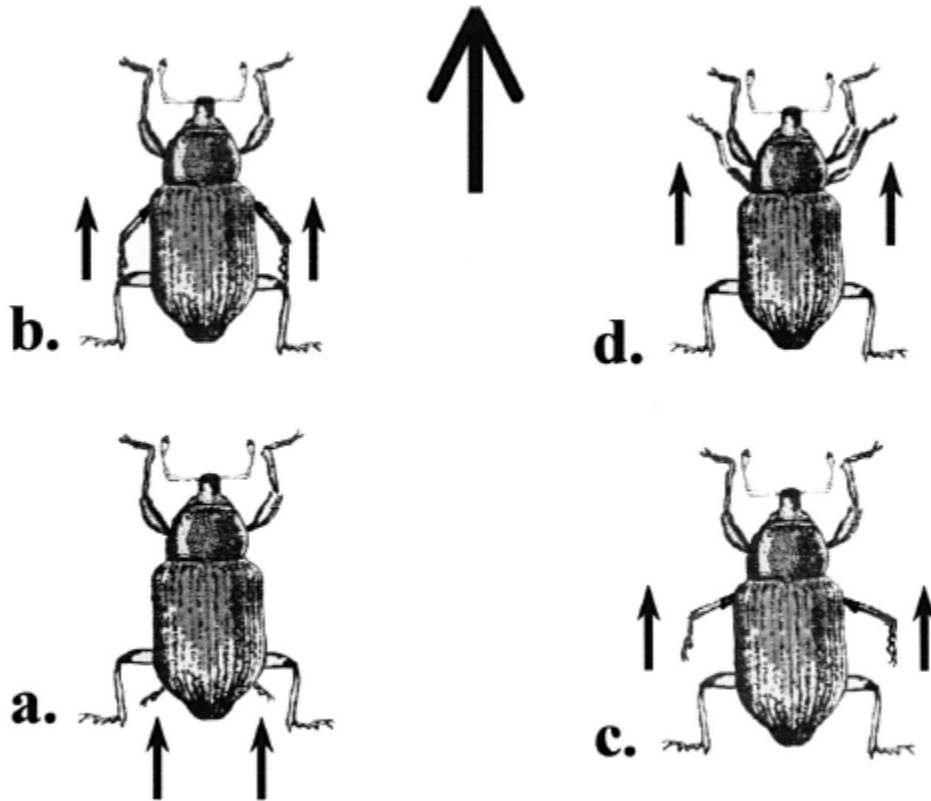


Fig. 1. Protraction sequence (a-d) by *Lissorhoptrus orzophilus* during swimming. Large arrow indicates the direction of insect travel. Small arrows indicate direction of mesothoracic leg movement. Swimming hairs are folded during this sequence.

Fig.1 Sequencia de protração (a-d) de *Lissorhoptrus orzophilus* durante a natação. As setas grandes indicam a direção de natação do inseto. As setas pequenas indicam a direção do movimento realizado pelas pernas mesotorácicas. Pelos de natação estão dobrados durante esta sequencia. Figura retirada de: Hix, R. L., Johnson, D. T., Bernhardt, J. L. (2000) Swimming behavior of an aquatic weevil, *Lissorhoptrus orzophilus* (Coleoptera: Curculionidae). *Florida Entomologist*. 83: 316–324.

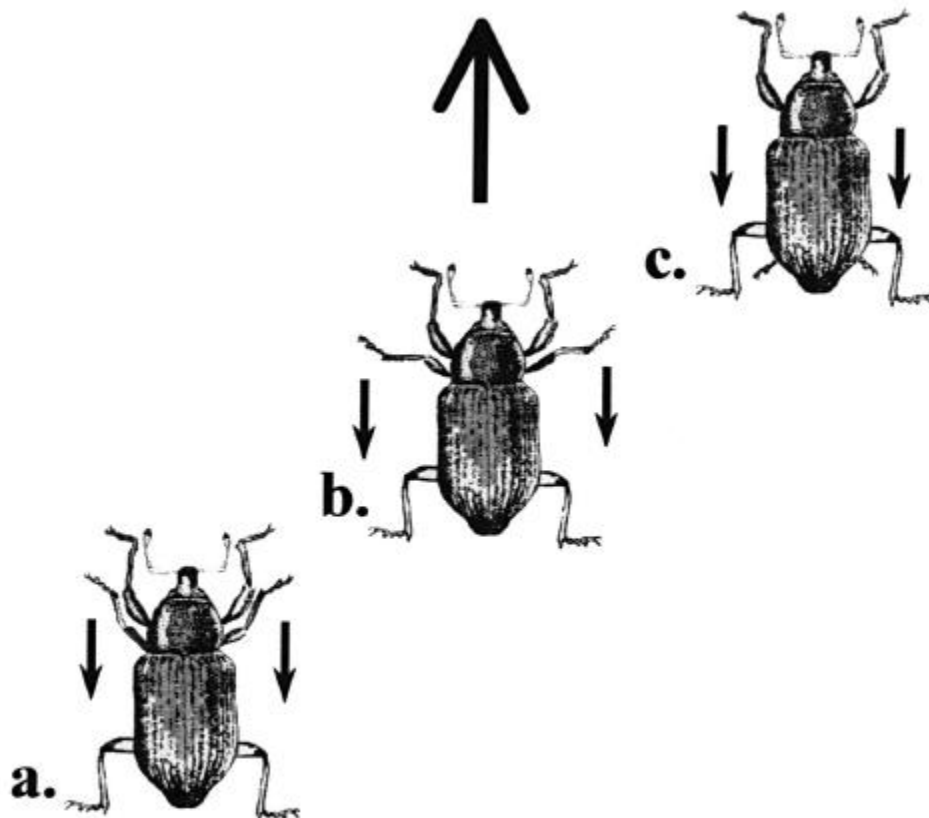


Fig. 2. Retraction sequence (power stroke) by *Lissorhoptrus oryzophilus*. Large arrow indicates direction of insect travel. Small arrows indicate direction of movement of mesothoracic legs. Swimming hairs on the mesotibia are deployed between a and b.

Fig. 2 Sequencia de retração (força de natação) de *Lissorhoptrus oryzophilus*. As setas grandes indicam a direção de natação do inseto. As setas pequenas indicam a direção do movimento realizado pelas pernas mesotorácicas. Pelos de natação presentes na mesotíbia são utilizados entre a e b. Figura retirada de: Hix, R. L., Johnson, D. T., Bernhardt, J. L. (2000) Swimming behavior of an aquatic weevil, *Lissorhoptrus oryzophilus* (Coleoptera: Curculionidae). *Florida Entomologist*. 83: 316–324.

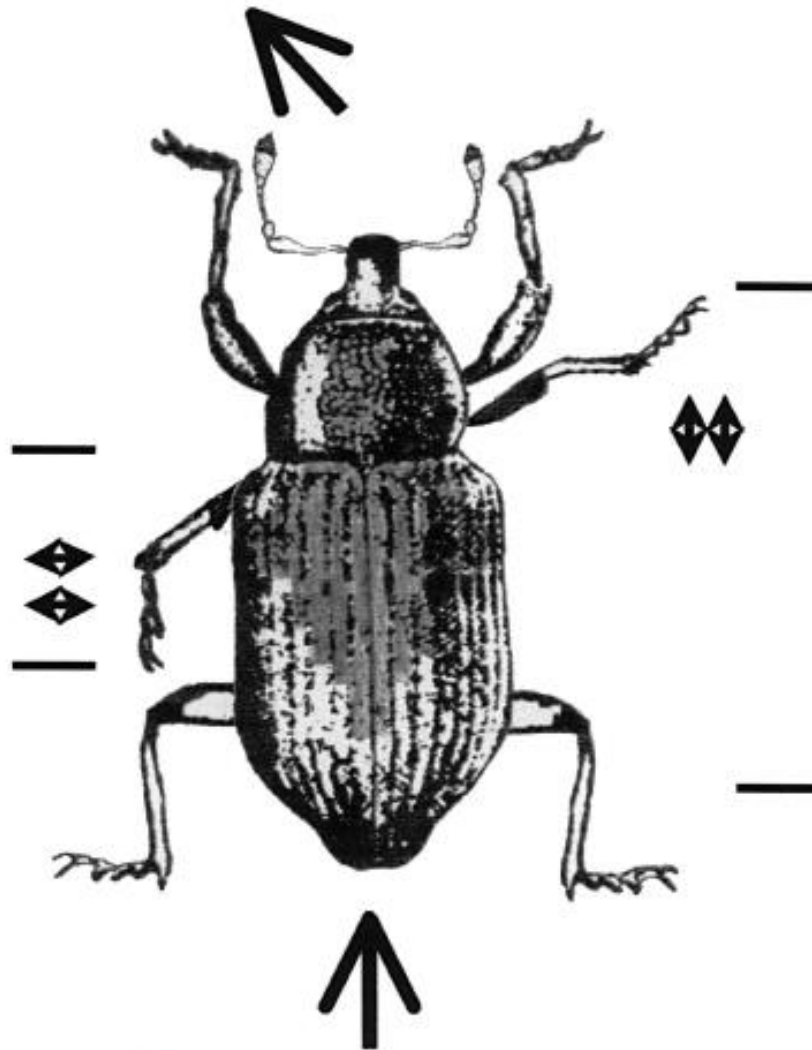


Fig. 3. Left turn sequence by *Lissorhoptrus oryzophilus*. Large arrows indicate direction of insect travel. Small double arrows indicate direction of mesothoracic leg movements. Lines mark the range of leg movement during turn. Mesothoracic leg movement is shorter on the turn side with turn side strokes across the body at an oblique angle.


Fig. 3 Virada de esquerda de *Lissorhoptrus oryzophilus*. As setas grandes indicam a direção de natação do inseto. As setas pequenas duplicadas indicam a direção do movimento realizado pelas pernas mesotorácicas. As linhas marcam a extensão do movimento das pernas durante a virada. O movimento das pernas mesotorácicas é mais curto do lado da virada com a puxada colada ao corpo feita com num ângulo oblíquo. Figura retirada de: Hix, R. L., Johnson, D. T., Bernhardt, J. L. (2000) Swimming behavior of an aquatic weevil, *Lissorhoptrus oryzophilus* (Coleoptera: Curculionidae). *Florida Entomologist*. 83: 316–324.

Anexo 3

- Artigo referente ao Capítulo 3, publicado na revista Psyche em 2012.

 Hindawi Publishing Corporation
Hindawi

Psyche: A Journal of Entomology



Psyche
Volume 2012 (2012), Article ID 275128, 6 pages
doi:10.1155/2012/275128

Research Article
Volatile Chemicals of Adults and Nymphs of the *Eucalyptus* Pest, *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae)

Camila B. C. Martins,¹ Rafael A. Soldi,¹ Leonardo R. Barbosa,² Jeffrey R. Aldrich,³ and Paulo H. G. Zarbin¹

¹Laboratório de Semioquímicos, Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Centro Politécnico, 81531-990, Curitiba, PR, Brazil
²Laboratório de Entomologia Florestal, Embrapa Florestas, Estrada da Ribeira, Guaraituba, 83411 000 Colombo, PR, Brazil
³Invasive Insect and Behavior Laboratory, ARS Biocontrol, USDA, Agricultural Research Center-West, B-007, Room 313, Beltsville, MD 20705, USA

Received 23 February 2012; Accepted 21 April 2012
Academic Editor: Jocelyn G. Millar

Copyright © 2012 Camila B. C. Martins et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

- Abstract
- Full-Text PDF
- Full-Text HTML
- Full-Text ePUB
- Linked References
- How to Cite this Article
- Complete Special Issue