Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Estímulos olfativos envolvidos no comportamento sexual e na seleção hospedeira de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae)

Cristiane Nardi

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2010

Cristiane Nardi
Engenheiro Agrônomo

Estímulos olfativos envolvidos no comportamento sexual e na seleção hospedeira de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae)

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ MAURÍCIO SIMÕES BENTO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Nardi, Cristiane
Estímulos olfativos envolvidos no comportamento sexual e na seleção hospedeira de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) / Cristiane Nardi. - - Piracicaba, 2010.
105 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Comportamento sexual 2. Ecologia química 3. Feromônios sexuais 4. Insetos nocivos Química ecológica 6. Vaquinha I. Título

CDD 632.76
N223e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

AGRADECIMENTOS

*Ao professor **José Maurício Simões Bento**, por todas as oportunidades que me ofereceu, pela paciência, compreensão e exemplo de profissionalismo.*

*Ao professor **José Roberto Postali Parra**, pelo apoio, pelo exemplo e por disponibilizar a estrutura do laboratório sempre que necessário;*

*Ao professor **Paulo Henrique Zarbin** (**UFPR**), por disponibilizar o seu tempo e a estrutura do seu laboratório.*

*Ao professor **Hermann Marich Niemeyer** (**Universidad de Chile**), pela oportunidade, pelo aprendizado que me proporcionou e pelo carinho com que me recebeu no seu laboratório.*

*Ao Prof. **Carlos Tadeu Dias**, pelas orientações nas análises estatísticas.*

*Ao Prof. **José Roberto Trigo** (**UNICAMP**), por sua atenção e oportunidade de cursar a sua disciplina.*

*Aos professores da **Universidade Federal de Santa Catarina**, **Afonso I. Orth** e **César Butignol**, pela formação inicial, apoio e amizade. Em especial à amiga e professora **Tânia Mara Guerra**, que me fez acreditar.*

*Aos **professores do Curso de Pós-Graduação em Entomologia** da **ESALQ**, pela convivência e aprendizado proporcionado.*

*Aos **funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia** da **ESALQ**, pela disposição em ajudar, pela convivência agradável e pela*

*paciência. Ao **Dino**, sempre disposto a cooperar e a oferecer uma palavra de ânimo. A **Marta** e ao **Carlos**, pela paciência e ajuda em tudo.*

*Aos **colegas do Laboratório de Química Ecológica da Universidad de Chile**. Em especial a **Marcela, Carolina** e **Daniel B.**, por sua ajuda, amizade e convivência divertida e agradável. Ao **Carlos** e ao **Javier**, por dividir os seus dias comigo.*

*Aos **colegas do Laboratório de Semioquímicos da Universidade Federal do Paraná**, por dividirem o seu espaço comigo, pela ajuda e pela disponibilidade em me receber no laboratório.*

*Aos **colegas do Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos** da **ESALQ**, que me ofereceram paciência e compreensão. Ao **Alberto, Nancy, Sandro, Crislany, Newton, Renata, Iris, Lais, Ohana, Laura, Weliton Silva, Isabel, Rejane K., Ana Lia, André, Vitor e Andréa**.*

*A **Rejane Luvizotto**, pela participação ativa e incentivadora, pelas noites em claro e pela convivência.*

*A **Ana Cristina Pellegrino**, pela alegria, amizade, simplicidade e ajuda.*

*A **Mayra**, pelas risadas, conversas, 'encrencas' e por me ensinar um pouco sobre o gosto pela 'boa música'.*

*A **María Fernanda**, por seu exemplo e pelo esforço ao realizar as análises químicas dos voláteis de milho.*

*Aos amigos que conheci em Piracicaba; pelos momentos agradáveis; a **Eliane, Ohana, Michelle, Viviane e Ellen**, pelo companheirismo e amizade.*

*A **Angela e a Rejane**, pelo apoio em um dos momentos mais difíceis de minha vida em Piracicaba e pelo companheirismo.*

*Ao **Fernando**, pela amizade, pela convivência e por tudo o que me ensinou. A sua adorável família, pelo carinho e atenção.*

*Ao meu amigo, **José Wilson** e sua linda família, pela alegria, amizade e pelas pessoas maravilhosas que são.*

*Ao **Vanderlei**, pela atenção e amizade desde o primeiro dia em que estive em Piracicaba.*

*Ao **Marcelo**, pela lição de vida, por me oferecer o exemplo de sua força, coragem e simplicidade. Pelo carinho, amizade, tolerância e compreensão.*

***A minha família**, pelo amor, apoio incondicional e incentivo.*

*À **Universidade de São Paulo**, pela oportunidade de fazer parte do seu corpo discente;*

*Ao **CNPq**, **Fapesp**, **INCT de Semioquímicos na Agricultura** pelo auxílio financeiro e pela bolsa de doutorado (CNPq Proc. Nº 141171/2006-5).*

SUMÁRIO

RESUMO 9
ABSTRACT 11
1 INTRODUÇÃO 13
Referências 17
2 COMPORTAMENTO SEXUAL DE *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) 23
Resumo 23
Abstract 23
2.1 Introdução 25
2.2 Material e métodos 26
2.2.1 Criação dos insetos 26
2.2.2 Coleta dos extratos naturais de machos e fêmeas 26
2.2.3 Idade, ritmo diário e número de cópulas 29
2.2.4 Atração sexual e atividade biológica dos extratos naturais de machos e fêmeas 29
2.2.5 Sequência de atividades envolvidas no comportamento sexual 30
2.2.6 Análise estatística 31
2.3 Resultados 31
2.4 Discussão 38
Referências 41
3 RESPOSTA COMPORTAMENTAL E ELETROANTENOGRÁFICA DE MACHOS DE *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) AO FEROMÔNIO DE ATRAÇÃO SEXUAL 45
Resumo 45
Abstract 45
3.1 Introdução 47
3.2 Material e métodos 48
3.2.1 Criação dos insetos 48
3.2.2 Obtenção dos extratos 48
3.2.3 Bioensaios comportamentais 49
3.2.4 Resposta eletroantenográfica de machos aos extratos naturais de fêmeas 50
3.2.5 Análise química dos extratos naturais de machos e fêmeas 51
3.2.6 Análise estatística 52
3.3 Resultados 52
3.4 Discussão 56
Referências 58

4 FEROMÔNIO SEXUAL DE CONTATO EM *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae): EVIDÊNCIAS COMPORTAMENTAIS 61
Resumo 61
Abstract.....61
4.1 Introdução.....63
4.2 Material e métodos 64
4.2.1 Criação dos insetos 64
4.2.2 Extração dos compostos cuticulares.....64
4.2.3 Extração dos feromônios de atração sexual 65
4.2.4 Bioensaios comportamentais.....66
4.2.5 Análise química dos extratos 67
4.2.6 Análise estatística.....67
4.3 Resultados.....68
4.4 Discussão 75
Referências.....78
5 EFEITO DA HERBIVORIA FOLIAR, RADICULAR E SIMULTÂNEA EM MILHO SOBRE O COMPORTAMENTO DE SELEÇÃO HOSPEDEIRA PARA OVIPOSIÇÃO EM *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae).....83
Resumo 83
Abstract.....83
5.1 Introdução.....85
5.2 Material e métodos 87
5.2.1 Criação dos insetos 87
5.2.2 Cultivo das plantas.....87
5.2.3 Indução das plantas.....88
5.2.4 Comportamento de seleção hospedeira para oviposição 89
5.2.5 Performance das larvas 92
5.2.6 Análise Estatística.....93
5.3 Resultados.....94
5.4 Discussão 98
Referências.....102

RESUMO

Estímulos olfativos envolvidos no comportamento sexual e na seleção hospedeira de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae)

Neste trabalho foi caracterizado o comportamento de *Diabrotica speciosa*, quando submetida a estímulos químicos de atração sexual ou de localização hospedeira. As atividades desenvolvidas foram: (i) Determinação da idade, horário, duração, número de cópulas, sexo responsável pela atração sexual e sequência de atividades envolvidas no comportamento sexual; (ii) investigação sobre o padrão de resposta dos machos ao feromônio sexual das fêmeas em olfatômetro e em eletroantenograma; (iii) investigação sobre a atividade feromonal dos compostos cuticulares presentes nas fêmeas, bem como a caracterização do comportamento envolvidos com o reconhecimento desses compostos pelos machos; e (iv) efeito da herbivoria em milho sobre o comportamento de seleção hospedeira para oviposição. As cópulas em *D. speciosa* iniciaram-se a partir do terceiro dia após a emergência dos adultos, com predominância das 18 às 24 horas e duração média de 2,7 horas. O comportamento sexual de *D. speciosa* apresenta padrões bem definidos de pré-cópula, cópula e pós-cópula, sendo que a atração sexual é realizada por um feromônio produzido pelas fêmeas. Os machos de *D. speciosa* responderam ao feromônio sexual produzido pelas fêmeas com idade superior a 3 dias. Tais respostas ocorreram ao longo de 24 horas, com predominância nos horários de maior atividade sexual nessa espécie. Machos de *D. speciosa* demonstraram sensibilidade, em eletroantenograma, a seis componentes presentes unicamente nos extratos de fêmeas com idade superior a 3 dias. Além dos feromônios de atração sexual, fêmeas dessa espécie também produzem compostos cuticulares que agem como feromônios sexuais de contato, estimulando machos a realizar os comportamentos de corte e as tentativas de cópula. Com relação ao comportamento de seleção hospedeira, as fêmeas grávidas de *D. speciosa,* aparentemente, são repelidas pelos voláteis de plantas induzidas por larvas. Por outro lado, essas fêmeas não foram influenciadas pelos voláteis de plantas de milho sadias e induzidas pelos adultos. O presente estudo fornece informações importantes sobre o comportamento e ecologia química de *D. speciosa*, as quais podem significar importantes subsídios para o desenvolvimento de técnicas para o manejo dessa espécie em campo.

Palavras-chave: Feromônio sexual; compostos cuticulares; voláteis de plantas; insetos de solo; ecologia química

ABSTRACT

Olfactory stimuli involved in sexual behavior and host selection of Diabrotica speciosa (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae)

In the current work we characterized *Diabrotica speciosa* behavior when submitted to chemical stimuli of sexual attraction or host selection. The developed activities were: (i) determination of age, time, duration, number of matings, sex responsible to sexual attraction and the sequence of activities involved with sexual behavior; (ii) investigation about the pattern of male responses to female sexual pheromones in olfactometer and electroantennogram; (iii) investigation about the pheromonal activity of cuticular compounds derived from females as well as the characterization of behaviors involved with recognition of these compounds by males; and (iv) effect of herbivory in maize on host selection behavior for oviposition. Matings in *D. speciosa* started from the third day after adult emergence, occurring mostly from 18 to 24 hours and lasting in average 2,7 hours. Sexual behavior of *D. speciosa* shows defined patterns of premating, mating and postmating, being the sexual attraction mediated by a pheromone produced by females. *D. speciosa* males responded to sexual pheromones produced by females with age up to 3 days old. Those responses occurred along 24 hours being predominant during times of higher sexual activity in this species. *D. speciosa* males showed sensitivity, in electroantennogram, to six components present only in up-to-3-day-old female extracts. Besides sexual pheromones, females of this species also produce cuticular compounds that act as contact sexual pheromones, which stimulate males to display courtship behavior and matings attempts. Concerning to the host selection behavior, *D. speciosa* gravid females were apparently repelled by plant volatiles induced by larvae. On the other side, these females were not influenced by volatiles from health maize plants and induced by adults. The current study provides relevant information about the behavior and chemical ecology of *D. speciosa*, what can result in important subsides to develop techniques to manage this species in field.

Keywords: Sexual pheromone; cuticular compounds; plant volatiles; soil insects; chemical ecology

1 INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Diabrotica* Chevrolat representam a maioria dos insetos da subtribo *Diabroticina* (Galerucinae: Luperini), divididas nos grupos *signifera*, *virgifera* e *fucata* (WILCOX, 1972; KRYSAN, 1986; KRYSAN; SMITH, 1987). O grupo *signifera* é composto de 11 espécies distribuídas na região Neotropical, as quais não apresentam importância agronômica e são pouco conhecidas em termos bioecológicos. Por outro lado, os membros de *virgifera* e *fucata* incluem alguns dos principais insetos-praga das Américas (MARQUES, 1941; KRYSAN, 1986; SPENCER et al., 2009). Espécies do grupo *virgifera* (35 spp.) ocorrem na Região Neártica, México e, desde 1992, também na Europa, onde causam sérios prejuízos em lavouras de milho (KRYSAN, 1986, BORIANI et al., 2006). Nas regiões temperadas, esses insetos apresentam hábitos univoltinos e um período de diapausa na fase de ovo (BRANSON; KRYSAN, 1981; KRYSAN, 1999 apud CAMPBELL, 2009; CLARK; MEINKE; FOSTER, 2001; CABRERA WALSH, 2003). O grupo *fucata* possui mais de 300 espécies, cujos indivíduos ocorrem nas regiões Neártica e Neotropical; apresentam hábitos multivoltinos e são polífagos nas fases de larva e adulto (BRANSON; KRYSAN, 1981; KRYSAN, 1986; CABRERA WALSH, 2003).

Na América do Sul, o grupo *fucata* é representado por diversas espécies, sendo *Diabrotica speciosa* (Germar) a mais abundante e danosa às culturas agrícolas (HAJI, 1981; KRYSAN, 1986). Os adultos dessa espécie se alimentam de uma ampla gama de hospedeiros, consumindo flores, frutos e especialmente folhas e brotações novas. Podem causar efeitos diretos, pela redução de tecido vegetal, ou efeito indireto, pela transmissão de patógenos (BOFF; GANDIN, 1992; OLIVEIRA et al., 1994). Os ovos de *D. speciosa* são depositados no solo, próximo a planta hospedeira, onde eclodem as larvas. Estas se desenvolvem em três instares e se alimentam das raízes de milho (*Zea mays* L.) (Poaceae), batata (*Solanum tuberosum* L.) (Solanaceae), entre outras, ocasionando a diminuição da altura das plantas, atraso no desenvolvimento, além de aumentar a suscetibilidade ao tombamento (MARQUES; ÁVILA; PARRA, 1999; ÁVILA; MILANEZ, 2004).

Em campo, o controle de *D. speciosa* é realizado principalmente por inseticidas químicos, os quais são extensivamente empregados, tanto para o controle de adultos, quanto de larvas (OEPP/EPPO, 2005). Em alguns casos, são utilizadas armadilhas com raízes, sementes e ramos de *Cayaponia tayuya* (Vell.), *Ceratosanthes hilariana* Cogn. ou *Lagenaria vulgaris* L. (Cucurbitaceae). Essas plantas são constituídas de cucurbitacinas, substâncias que agem como arrestantes e estimulantes alimentares para diversas espécies da tribo Luperini (METCALF et al., 1982; DEHEER; TALLAMY, 1991), e quando impregnadas com inseticidas ou fungos entomopatogênicos, causam a morte dos insetos que delas se alimentam (MAGALHÃES et al., 1988; DAOUST; PEREIRA, 1986; METCALF et al., 1987; LANCE, 1988). Entretanto, uma vez que a utilização dessas armadilhas no campo é dependente da disponibilidade das plantas, torna-se difícil o seu uso em grandes áreas.

Considerando-se as limitações dos métodos de manejo existentes para *D. speciosa*, bem como a dificuldade de controlar os insetos na fase larval, destaca-se a necessidade da adoção de táticas alternativas, a exemplo do que ocorre para espécies de *Diabrotica* dos Estados Unidos e Europa. Nestes locais, o controle comportamental é a base do manejo integrado de *Diabrotica* spp., o qual baseia-se, principalmente, na redução do sucesso reprodutivo dos insetos. Assim como os feromônios são utilizados para reduzir a chance de encontro de parceiros sexuais, os voláteis de plantas têm sido indicados para atração ou repelência de adultos. Como atrativos, esses voláteis podem promover a captura de machos e fêmeas, impedindo sua reprodução ou a oviposição (MARQUARDT; KRUPKE, 2009). Como repelentes, podem interferir na migração de fêmeas grávidas no cultivo, evitando, assim, a proliferação dos imaturos e o estabelecimento da progênie no local (HAMMACK et al., 1999; FERNANDES; HILKER, 2007). Desse modo, o controle comportamental pode significar uma alternativa promissora também para o controle de *D. speciosa* na América do Sul. Para tanto, são necessários estudos básicos acerca do comportamento sexual e ecologia química, a fim de oferecer subsídios para o desenvolvimento de técnicas de manejo integrado desses insetos.

A presença de feromônios sexuais em *Diabrotica* foi relatada pela primeira vez para *Diabrotica balteata* Le Conte (CUTHBERT; REID, 1964), embora a identificação

química dos compostos envolvidos na atração sexual tenha sido realizada primeiramente para *Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte (GUSS et al., 1982). O componente majoritário identificado nos extratos de fêmeas desta espécie é o propanoato de 8R-metil-2R-decenila, que também apresentou atividade biológica para *Diabrotica virgifera zeae* Krysan & Smith*, Diabrotica barberi* Smith & Lawrence*, Diabrotica undecempunctata howardi* Barber e *Diabrotica longicornis* (Say) (GUSS et al., 1982; DOBSON; TEAL, 1987).

De acordo com Chuman et al. (1987), o padrão de emissão de feromônios em *Diabrotica* pode estar relacionado às características taxonômicas, uma vez que machos das espécies pertencentes ao grupo *virgifera* respondem a um ou mais estereoisômeros do composto propanoato de 8R-metil-2R-decenila. Do mesmo modo, os autores sugerem que ocorra algo similar para o grupo *fucata*, uma vez que os feromônios de algumas destas espécies parecem ser estruturalmente semelhantes ao composto 6,12-dimetilpentadecan-2-ona, identificado para *D. balteata*.

Em campo, todas as pesquisas realizadas acerca dos padrões comportamentais e comunicação química de *Diabrotica* spp. na América do Norte e Europa têm possibilitado o uso de armadilhas de feromônios para o manejo dessas espécies (TOLLEFSON, 1998; BORIANI et al., 2006; CORNELIA et al., 2007; SPENCER et al., 2009). Este método é particularmente importante, uma vez que as populações, especialmente de *D. virgifera virgifera*, têm demonstrado alta capacidade de resistência aos inseticidas químicos e às práticas de controle cultural (BORIANI et al., 2006). Além disso, na Europa, onde *D. virgifera virgifera* é uma praga introduzida, as armadilhas de feromônio (Csalomon®) são o principal método utilizado para o monitoramento de novas infestações e da disseminação deste inseto pelo continente (CANNON et al., 2005).

Além dos estudos de comportamento sexual, a caracterização dos voláteis de plantas responsáveis pela atração ou repelência de adultos tem gerado perspectivas importantes para a manipulação das populações de *Diabrotica* spp. em campo (LAMPMAN; METCALF, 1987; HAMMACK et al. 1999; HAMMACK, 1997; 2001). Inicialmente, caracterizou-se a ação atraente e arrestante dos componentes de cucurbitáceas (LAMPMAN; METCALF, 1987; DEHEER; TALLAMY, 1991) e, posteriormente, identificou-se a ação de compostos químicos provenientes de diversas

espécies de plantas sobre o comportamento de adultos (LAMPMAN; METCALF, 1987; HAMMACK et al. 1999; HAMMACK, 1997; 2001).

Nos últimos anos, esses trabalhos têm sido mais frequentes para as espécies norte-americanas de *Diabrotica*, para as quais se tem verificado o efeito de voláteis de milho na atração e/ou repelência de machos e fêmeas. Entretanto, esses voláteis incluem aqueles liberados por flores e poucos compostos foliares foram investigados. De acordo com Hammack (1997, 2001), a atração de *Diabrotica* spp. por voláteis de plantas é proporcionada principalmente pelos compostos foliares β-cariofileno, linalol e acetato de geranila. Já os compostos provenientes dos estiletes do milho, (E-Z) 2-6-nonadienal e 2 tridecanona, foram relatados como repelentes para fêmeas de *D. virgifera* e *D. barberi*, respectivamente (HAMMACK et al., 1999). De acordo com Hammack et al. (1999) e Boriani et al. (2006), os compostos cuja repelência foi comprovada podem ser usados em áreas marginais aos cultivos, a fim de prevenir a migração das fêmeas grávidas e reduzir a oviposição. Entretanto, estudos adicionais são necessários para comprovar o efeito repelente sobre fêmeas grávidas, uma vez que estas podem responder aos compostos diferentemente de fêmeas em busca por alimento (VISSER, 1986; BRANSON; KRYSAN; 1981; HAMMACK; 2001).

Na América do Sul, apesar da importância de *D. speciosa* para os cultivos agrícolas, poucos trabalhos tem sido realizados acerca de seu comportamento e ecologia química. Um dos únicos estudos sobre o comportamento sexual foi publicado por Ventura et al. (2001), que relataram a atração de machos pelas fêmeas, inferindo a ação de um feromônio sexual. Posteriormente, Laumann et al. (2003) realizaram bioensaios para observar o comportamento sexual desses insetos, embora um número baixo de cópulas tenha impossibilitado a obtenção de informações relevantes sobre o assunto.

Acerca dos voláteis de plantas e o seu efeito sobre *D. speciosa*, Ventura; Martins; Pasini (2000) demonstraram a sua influência sobre a atração de *D. speciosa*. Testando diversos componentes voláteis, os autores verificaram que o composto floral 1,2-dimetoxibenzeno foi responsável pelo incremento da coleta de machos e fêmeas em armadilhas de campo. Entretanto, este é um dos poucos estudos que aborda a relação entre *D. speciosa* e os voláteis de plantas.

Neste trabalho, foi caracterizado o comportamento de *D. speciosa* com ênfase no efeito dos estímulos químicos sobre a busca pelo parceiro sexual e também sobre a seleção hospedeira para oviposição. Considerando-se que o sucesso reprodutivo dos indivíduos se baseia, principalmente, na localização do parceiro e no estabelecimento da progênie, a caracterização dos estímulos químicos que mediam esses comportamentos pode ser de grande valia para o desenvolvimento de técnicas alternativas de manejo de insetos. A fim de investigar o comportamento de adultos de *D. speciosa* em relação aos estímulos químicos relacionados à cópula e a seleção hospedeira, estudou-se: (i) os aspectos básicos do comportamento sexual de *D. speciosa*, identificando a idade em que ocorre a primeira cópula, o ritmo diário e a sequência comportamental relacionados à atividade sexual; a duração e o número de cópulas por casal, bem como o sexo responsável pela atração; (ii) os padrões de respostas dos machos aos feromônios das fêmeas em condições de laboratório, a fim de verificar a idade das fêmeas que proporciona a maior nível de atração de machos, o ritmo diário de respostas de machos aos extratos naturais de fêmeas em laboratório, e as respostas eletroantenográficas de machos a tais compostos; (iii) a ocorrência e o efeito de compostos cuticulares sobre o comportamento sexual de *D. speciosa*, avaliando o padrão comportamental de machos diante dos extratos cuticulares de fêmeas; e (iv) o efeito dos voláteis de milho induzidos pela herbivoria foliar, radicular e simultânea sobre o comportamento de seleção hospedeira para oviposição em *D. speciosa.*

As informações obtidas no presente trabalho proporcionam novas perspectivas para os estudos em ecologia química de *D. speciosa* e oferecem subsídios para que esses compostos sejam identificados e utilizados para o manejo dessa espécie em campo.

Referências

ÁVILA, C.J.; MILANEZ, J.M. Larva alfinete. In: SALVADORI, J.R.; ÁVILA, C.J.; SILVA, M.T.B. **Pragas de Solo no Brasil**. Passo Fundo: EMBRAPA, 2004. p. 345-378.

BOFF, M.I.C.; GANDIN, C.L. Principais pragas da cultura da melancia e seu controle. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 5, p. 39-41, 1992.

BORIANI, M.; AGOSTI, M.; KISSAND, J.; EDWARDS, C.R; Sustainable management of the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae), in infested areas: experiences in Italy, Hungary and the USA. **Bulletin OEPP/EPPO Bulletin**, Luxemburgo, n. 36, p. 531–537, 2006.

BRANSON, T.F.; KRYSAN, J.L. Feeding and oviposition behavior and life cycle strategies of *Diabrotica*: an evolutionary view with implications for pest management. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 10, p. 826-831, 1981.

CABRERA WALSH, G. Host range and reproductive traits of Diabrotica speciosa (Germar) and *Diabrotica viridula* (F.) (Coleoptera: Chrysomelidae), two species of South American pest rootworms, with notes on other species of *Diabroticina*. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 32, p. 276-285, 2003.

CAMPBELL, L.A. **Hybridization in *Diabrotica barberi* Smith and Lawrence and *Diabrotica longicornis* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae): Biology, behavior, field introgression, and a reevaluation of taxonomic status.** 2009. Dissertação (Entomology) - University of Nebraska, Lincoln, 2009. Disponível em: http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1002&context=entomologydis >. Acesso em: 09 nov. 2009.

CANNON R.J.C; MATTHEWS L; CHEEK S; BAKER R.H.A; MACLEOD A; BARTLETT P W. Surveying and monitoring western corn rootworm (*Diabrotica v. virgifera*) in England and Wales. In: PROCEEDINGS OF A BCPC SYMPOSIUM BERLIN, 2005, Berlin. **Proceedings...**Berlin: Webseiten, 2005. Disponível em: http://www.phytomedizin.org/fileadmin/alte_Webseiten/Invasive_Symposium/articles/039_Cannon.pdf. Acesso em: 8 nov. 2009.

CHUMAN, T., T.L.; GUSS, R.E.; DOOLITTLE, J.R.; MCLAUGHLIN, J.L.; KRYSAN, J.M.; SCHALK; J.H.; TUMLINSON. Identification of a female-produced sex pheromone from banded cucumber beetle, *Diabrotica balteata* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal Chemical Ecology**, New York, v. 13, p. 1601-1616, 1987.

CLARK, T.L.; MEINKE, L.J.; FOSTER, J.E. Molecular phylogeny of *Diabrotica* beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) inferred from analysis of combined mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 10, p. 303-314, 2001.

CORNELIA, C.; SANDOR, M.; DOMUTA, C.; CIOBANU, G.; RAMONA, A.; VUSCAN, A. **Life cycle of *Diabrotica virgifera virgifera* in the conditions from north – western part of the country**. Disponível em: <http://protmed.uoradea.ro/facultate/anale/protectia_mediului/2007/Agronomy/ciobanu%20cornelia%201.pdf>. Acesso em: 09 nov. 2009.

CUTHBERT, F.P.; REID, W.J. Studies of sex attractant of banded cucumber beetle. **Journal of Economic Entomology,** Lanham, v. 57, p. 247-250, 1964.

DAOUST, R.A.; PEREIRA, R.M. Stability of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisoplinae* on beetle attracting tubers and cowpea foliage in Brazil. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 15, n. 6, p. 1237-1243, 1986.

DEHEER; C.J.; TALLAMY, D.W. Affinity of spotted cucumber beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) larvae to cucurbitacinas. **Environmental Entomology,** Lanham, v. 20, p. 1173-1175, 1991.

DOBSON, I.D.; TEAL, P.E.A. Analysis of long-range reproductive behavior of male *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte and *D. barberi* Smith and Lawrence to stereoisomers of 8-methyl-2-decyl propanoate under laboratory conditions. **Journal Chemical Ecology**, New York, v. 13, p. 1331-1341, 1987.

FERNANDES, P.; HILKER, M. Host plant location by Chysomelidae. **Basic and Applied Ecology**, Jena, v. 8, p. 97-116, 2007.

GUSS, P.L.; TUMLINSON, J.H.; SONNET, P.E.; PROVEAUX, A.T. Identification of a female-produced sex pheromone of the western corn rootworm. **Journal Chemical Ecology**, New York, v. 8, p. 545-556, 1982.

HAJI, N.F.P. **Biologia, dano e controle do adulto de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) na cultura da batatinha (*Solanum tuberosum* L.).** 1981. 53p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1981.

HAMMACK, L. Attractiveness of synthetic corn volatiles to feral northern and western corn rootworm beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). **Environmental Entomology,** Lanham, v. 26, p. 311-317, 1997.

HAMMACK, L. Single and blended maize volatiles as attractants for Diabroticite corn rootworm beetles. **Journal of Chemical Ecology,** New York, v. 27, p. 1373-1390, 2001.

HAMMACK, L.; HIBBARD, B.E.; HOLYOKE, C.W.; KLINE, M.; LEVA, D.M. Behavioral response of corn rootworm adults to host plant volatiles perceived by western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). **Environmental Entomology**, Laham, v. 28, p. 961-967, 1999.

KRYSAN, J.L. Introduction: biology, distribution, and identification of pest *Diabrotica*. In: KRYSAN, J.L.; MILLER, T.A. **Methods for the study of pest *Diabrotica*.** New York: Springer-Verlag, 1986. cap.1, p. 1-23.

KRYSAN, J.L.; SMITH, R.F. Systematics of *virgifera* species groups of *Diabrotica* (Coleoptera: Chrysomleidae: Luperini). **Entomography**, Sacramento, v. 5, p. 375-484, 1987.

LANCE, D.R. Respnses of northern and western corn rootworm to semiochemical attractants in corn fields. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 14, p. 1177-1185, 1988.

LAPMANN, R.L.; METCALF, R.L. Multicomponent kairomonal lures for southern and western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae: Diabrotica spp.). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 80, p. 1137-1142, 1987.

LAUMANN, R.A.; RIBEIRO, P.H.; RAMOS, N.; PIRES, C.S.S.; SCHMIDT, F.G.V.; BORGES, M.; MORAIS, M.C.B.; SUJII, E.R. **Ritmos diários de atividades comportamentais de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) relacionados à temperatura.** 2003. 5p.(Comunicado Técnico EMBRAPA, 90).

MAGALHÃES, B.P.; CARVALHO, S.M.; PEIXOTO MAGALHÃES, B.; MARTINEZ, S.C. Insetos associados a cultura. In: ZIMMERMANN, M.J.; ROCHA, M.; YAMADA, T. **Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade.** Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potasso, 1988. p. 573-589.

MARQUARDT, P.T.; KRUPKE, C.H. Dispersal and mating behavior of *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) in *Bt* cornfields. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 38, n. 1; p. 176-182, 2009.

MARQUES, G.B.C.; ÁVILA, C.J.; PARRA, J.R.P. Danos causados por larvas e adultos de *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, p. 1983-1986, 1999.

MARQUES, M.A. Contribuição ao estudo dos crisomelídeos do gênero *Diabrotica*. **Boletim da Escola Nacional de Agronomia**, Rio de Janeiro, v. 2, p. 61-147, 1941.

METCALF, R.L.; METCALF, E.R. **Plant kairomone in insect ecology and control**. New York: Chapman and Hall, 1982.168p.

METCALF,R.L.; FERGUNSON, J.E.; LAMPMAN, R.; ANDERSEN, J.F. Dry cucurbitacin-containing baits for controlling diabroticide beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 80, p. 870-875, 1987.

OEPP/EPPO, European and Mediterranean Plant Protection Organization Bulletin. ***Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae)**. Luxemburgo: OEPP/EPPO, v. 35, p. 374–376, 2005. Disponível em: <http://www.eppo.org/QUARANTINE/insects/Diabrotica_speciosa/DS_Diabrotica_speciosa.pdf>. Acesso em: 13 maio 2009.

OLIVEIRA, C.R.B.; MARINHO, V.L.A.; ASTOLFI, F.S.; AZEVEDO, M.; CHAGAS, C.M.; KITAJIMA, E.W. Purification, serology and some properties of the purple granadilla (*Passiflora edulis*) mosaic virus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, p. 455-462, 1994.

SPENCER, J.L.; HIBBARD, B.E.; MOESER, J.; ONSTAD, D.W. Behaviour and ecology of the western corn rootworm *(Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). **Agricultural and Forest Entomology**, Washington, v. 11, p. 9-27, 2009.

TOLLEFSON, J.J. Rootworm areawide management program in Iowa. **Journal of Agricultural Entomology**, Clemson, n. 15, p. 351–357, 1998.

VENTURA, M.U.; MARTINS, M.C.; PASINI, A. Responses of *Diabrotica speciosa* and *Cerotoma arcuata tingomariana* (Coleoptera: Chrysomelidae) to valeriles attractants. **Florida Entomologist,** Gainesville, v. 83, p. 403-410, 2000.

VENTURA, M.U.; MELLO, P.P.; OLIVEIRA, A.R.M.; SIMONELLI, F.; MARQUES, F.A.; ZARBIN, P.H.G. Males are attracted by females traps: a new perspective for management of *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) using sexual pheromone. **Neotropical Entomology,** Londrina, *v.* 30, p. 361-364, 2001.

VISSER, J.H. Host odor perception in phytophagous insects. **Annual Review of Entomology,** Palo Alto, v. 31, p. 121–144, 1986.

WILCOX, J.A. Chrysomelidae: Galerucinae. In: _____. **Coleopterum Catalogus.** Gravenhage: W. Junk, 1972. p. 296-323.

2 COMPORTAMENTO SEXUAL DE *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae)

Resumo

Neste trabalho demonstrou-se que comportamento sexual de *Diabrotica speciosa* apresentou sequências bem definidas de pré-cópula, cópula e pós-cópula. A primeira cópula ocorreu entre o terceiro e sétimo dia após a emergência, sendo predominante em insetos com quatro dias. A atividade sexual foi maior entre o final da fotofase (18-20h) e a primeira metade da escotofase (20-2h), não ocorrendo cópulas entre as 4 e 8 horas. Durante os sete dias de observação, a maioria dos casais copulou uma única vez, embora 30% dos adultos tenham copulado de 2 a 4 vezes. Os machos de *D. speciosa* foram atraídos pelas fêmeas virgens, assim como pelos seus extratos naturais. As observações comportamentais apresentadas nesse trabalho permitem concluir que o efeito de atração dos machos é decorrente de um feromônio sexual produzido pelas fêmeas de *D. speciosa*.

Palavras chave: Cópula; comportamento de corte; feromônio sexual; semioquímicos; ritmo circadiano

Abstract

In this work we showed that mating behavior of *Diabrotica speciosa* showed well-defined sequences of premating, mating and postmating. The first mating occurred between the third and seventh day after emergence, being predominant in four-day-old insects. The sexual activity was higher between the end of the photophase (18-20h) and the first half of scotophase (20-2h). No mating behavior was observed between 4 and 8 hours. During seven days of observation, the majority of couples mated only once, although 30% of adults mated 2 to 4 times. *D. speciosa* males were attracted to virgin females, as well as to their natural extracts. Behavior observations are presented in this work and therefore allow us to conclude that the attraction of males is due to a sex pheromone produced by *D. speciosa* females.

Keywords: Copulatory behavior; courtship behavior; pheromones; semiochemicals; circadian rhythm

2.1 Introdução

O gênero *Diabrotica* Chevrolat inclui algumas das principais pragas das Américas, cujos indivíduos possuem hábito rizófago na fase larval e filófago na fase adulta. No Brasil, a espécie mais abundante e danosa às culturas agrícolas é *Diabrotica speciosa* (Germar), que ocorre praticamente em todos os estados, ocasionando danos em cultivos de milho (*Zea mays* L.) (Poaceae), batata (*Solanum tuberosum* L.) (Solanaceae), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (Leguminosae), entre outros (KRYSAN, 1986; ÁVILA; MILANEZ, 2004). Trata-se de um inseto polífago, cujas larvas podem causar o atraso no desenvolvimento e aumentar a suscetibilidade das plantas ao tombamento. Os adultos, por sua vez, podem danificar diretamente as plantas, pela redução da área folhar, ou indiretamente, pela transmissão de patógenos (BOFF; GANDIN, 1992; OLIVEIRA et al., 1994; MARQUES; ÁVILA; PARRA, 1999).

Considerando-se a importância de *Diabrotica* spp., muitas pesquisas têm sido realizadas sobre comportamento e ecologia química de algumas das espécies desse gênero (FERNANDES; HILKER, 2007). Em *Diabrotica undecempunctata howardi* Barber, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte e *Diabrotica barberi* Smith & Laurence, na região Neártica, os padrões comportamentais envolvidos com a cópula e a comunicação química já foram extensivamente estudados. Tais pesquisas permitiram o conhecimento sobre os mecanismos de acasalamento e emissão de feromônios, bem como o desenvolvimento de técnicas de manejo dessas espécies em cultivos agrícolas (BALL; CHAUDHURY, 1973; GUSS, 1976; BRANSON et al., 1977; GUSS et al., 1983; LEW; BALL, 1979; DOBSON; TEAL, 1986; MEINKE; MAYO; WEISSLING, 1989; HAMMACK, 1995; SPENCER et al., 2009). Por outro lado, poucas pesquisas sobre o comportamento e ecologia química das espécies sul americanas têm sido realizadas (VENTURA et al., 2001). Neste trabalho, objetivou-se caracterizar aspectos do comportamento sexual de *D. speciosa*, avaliando a idade da primeira cópula, o número de cópulas por casal e a sequência de atividades envolvidas no comportamento sexual. Além disso, foi investigado o sexo responsável pela atração sexual e a atividade biológica dos extratos naturais de machos e fêmeas.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Criação dos insetos

Os indivíduos de *D. speciosa* foram obtidos a partir de criação em laboratório, baseada na metodologia de Milanez (1995) e Ávila; Tabai; Parra (2000). Larvas e adultos foram alimentados com raízes de milho (‘Suwan’) e folhas de feijoeiro, (‘Carioca’), respectivamente. Adultos foram mantidos em gaiola plástica (40 x 30 x 40 cm) contendo plantas de feijoeiro e substrato de oviposição, constituído de um recipiente circular (10 x 1,5 cm) forrado com gaze preta umedecida (MILANEZ, 1995). Em intervalos de dois dias, as posturas foram coletadas, lavando-se a gaze em água corrente sobre uma peneira de voile, e os ovos recolhidos foram tratados com solução de sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4.H_2O$) a 1%, por dois minutos, e transferidos para placas de Petri (9 x 1 cm), onde permaneceram até a eclosão. As larvas recém-eclodidas foram inoculadas em sementes de milho pré-germinadas e mantidas em recipientes plásticos preenchidos com vermiculita umedecida (1 parte vermiculita: 2 partes água). Após 15 dias de desenvolvimento, os imaturos foram transferidos para novos recipientes contendo o mesmo substrato e novas plântulas de milho, permanecendo até a emergência dos adultos. Para a criação de *D. speciosa*, assim como para a realização dos bioensaios comportamentais, os insetos foram mantidos em salas climatizadas com temperatura de 22±3ºC, umidade relativa de 70±10% e fotoperíodo de 14:10h. Durante a escotofase, os insetos foram visualizados com lâmpada de diodo emissor de luz forrada com plástico vermelho (Supergel Rosco®, 4% transparencia), e durante a fotofase com luz branca artificial (32 W).

2.2.2 Coleta dos extratos naturais de machos e fêmeas

A coleta dos voláteis emitidos pelos adultos de *D. speciosa* foi realizada pelo sistema de aeração (MILLAR; HAYNES, 1998; ZARBIN et al., 1999) (Figura 2.1A), utilizando-se câmaras horizontais de vidro (20 x 7 cm) com aberturas laterais para a entrada e saída de ar. No interior de cada câmara, foram mantidos 30 machos ou 30

fêmeas de *D. speciosa* com 5 a 10 dias de idade, submetidos a um fluxo de ar de 800 mL/min, durante 12-14 horas. Na outra extremidade da câmara, foi conectada uma coluna de vidro (7,5 x 0,5 cm) contendo 0,150g de polímero adsorvente (Super Q® 80/100 Mesh, Alltech Assoc., IL, EUA) (Figura 2.1A, B).

O fluxo de ar no interior da câmara foi gerado por uma bomba de vácuo e regulado por fluxômetros, sendo que todas as conexões foram instaladas com mangueiras de Teflon® PTFE. Após cada coleta, os tubos com adsorvente foram retirados e os voláteis nele contidos foram eluídos com 2 mL de hexano (Figura 2.1C). As amostras foram concentradas para 150µL utilizando-se N_2 gasoso e mantidas em frascos vedados a temperatura de -10°C para utilização nos bioensaios (Figura 2.1D).

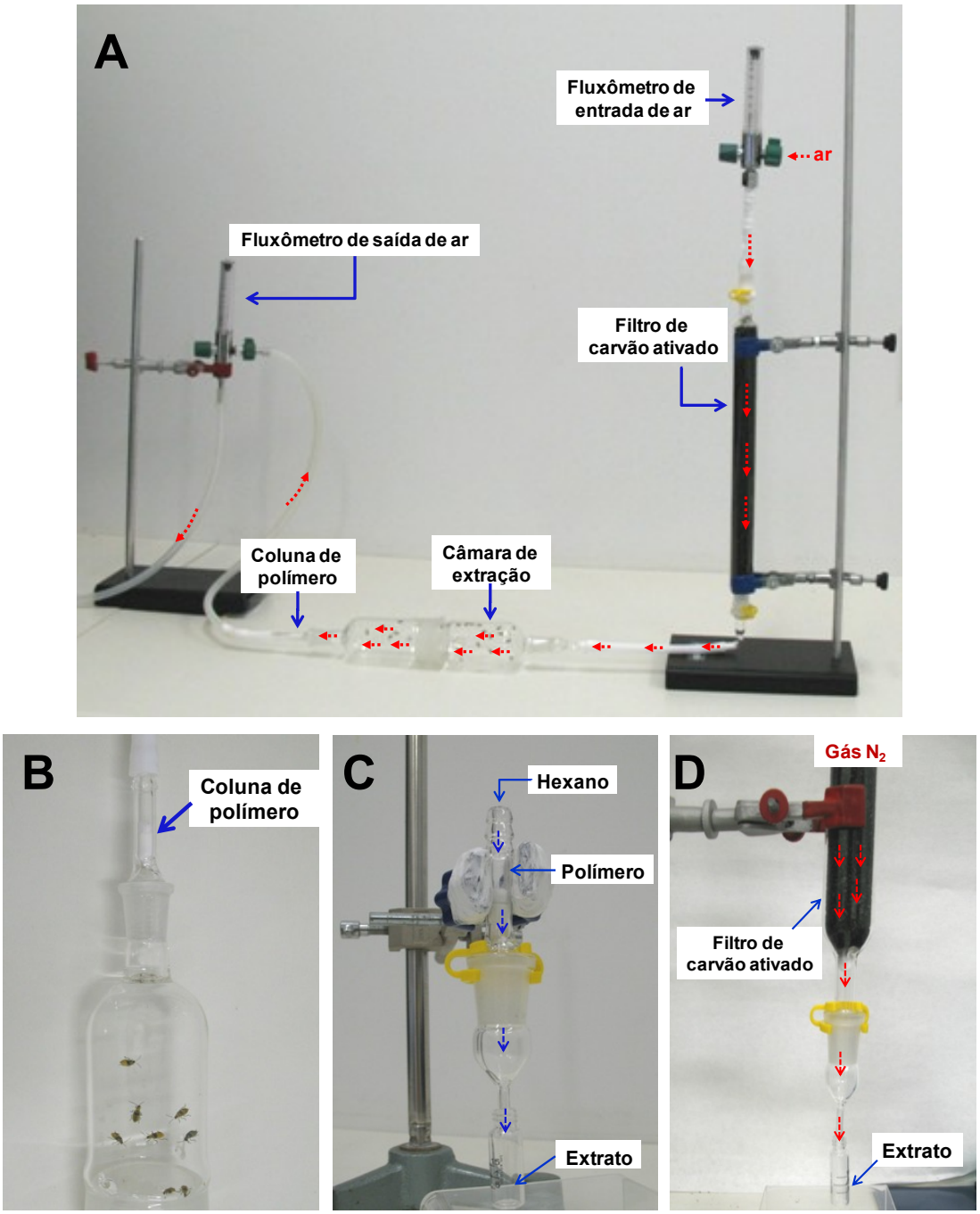

Figura 2.1 - Obtenção de extratos do feromônio sexual de *Diabrotica speciosa.* (A) Sistema de extração por aeração; (B) coluna de polímero para adsorção dos compostos químicos; (C) materiais utilizados para a eluição dos compostos contidos na coluna; (D) concentração do extrato utilizando nitrogênio gasoso filtrado

2.2.3 Idade, ritmo diário e número de cópulas

Para caracterizar a idade do inseto na primeira cópula, o ritmo diário e o número de cópulas por casal de *D. speciosa*, foram selecionados 70 casais de mesma idade, utilizando-se adultos recém emergidos. Cada casal foi mantido em gaiola circular transparente (12 x 10 cm) e alimentado com folhas de feijoeiro substituídas diariamente. As observações visuais foram realizadas de hora em hora, durante sete dias, verificando-se a ocorrência de cópulas. O registro dos casais em cópula foi definido pela introdução do edeago na fêmea, não sendo considerada cópula a atividade de monta sem introdução do edeago.

2.2.4 Atração sexual e atividade biológica dos extratos naturais de machos e fêmeas

Os bioensaios para avaliar a atratividade de machos e fêmeas de *D. speciosa* aos coespecíficos foram realizados em olfatômetro do tipo 'Y', constituído de um tubo principal e dois tubos laterais de vidro (20 x 3 cm), aos quais foram conectadas câmaras contendo os tratamentos a serem testados (Figura 2.2). O fluxo de ar foi gerado por uma bomba de vácuo conectada ao olfatômetro, que permitiu a passagem do ar pelos tubos laterais e a chegada dos odores ao tubo principal. O fluxo utilizado foi de 800 mL/min, controlado por fluxômetros dispostos nas extremidades da entrada de ar. Os bioensaios foram realizados durante o horário de maior atividade sexual dos insetos, ou seja, das 18 às 24h, utilizando-se adultos não acasalados, conforme estabelecido em estudos preliminares.

Para todos os bioensaios, foram liberados, individualmente, machos (n=50) e fêmeas (n=50) de *D. speciosa* no tubo principal do olfatômetro, verificando-se a frequência de insetos que se dirigiu para cada tratamento. Os tratamentos foram: (i) 10 fêmeas virgens; (ii) 10 machos virgens; (iii) extrato de 15 equivalentes-fêmeas (150µL); (iv) extrato de 15 equivalentes-machos (150µL); (v) controle 1 (vazio); e (vi) controle 2 (solvente). Para cada repetição confrontava-se um dos tratamentos *vs* controle (vazio

ou solvente), incluindo-se ‘vazio’ *vs* ‘vazio’ em um tempo máximo de cinco minutos, conforme estabelecido em estudos preliminares.

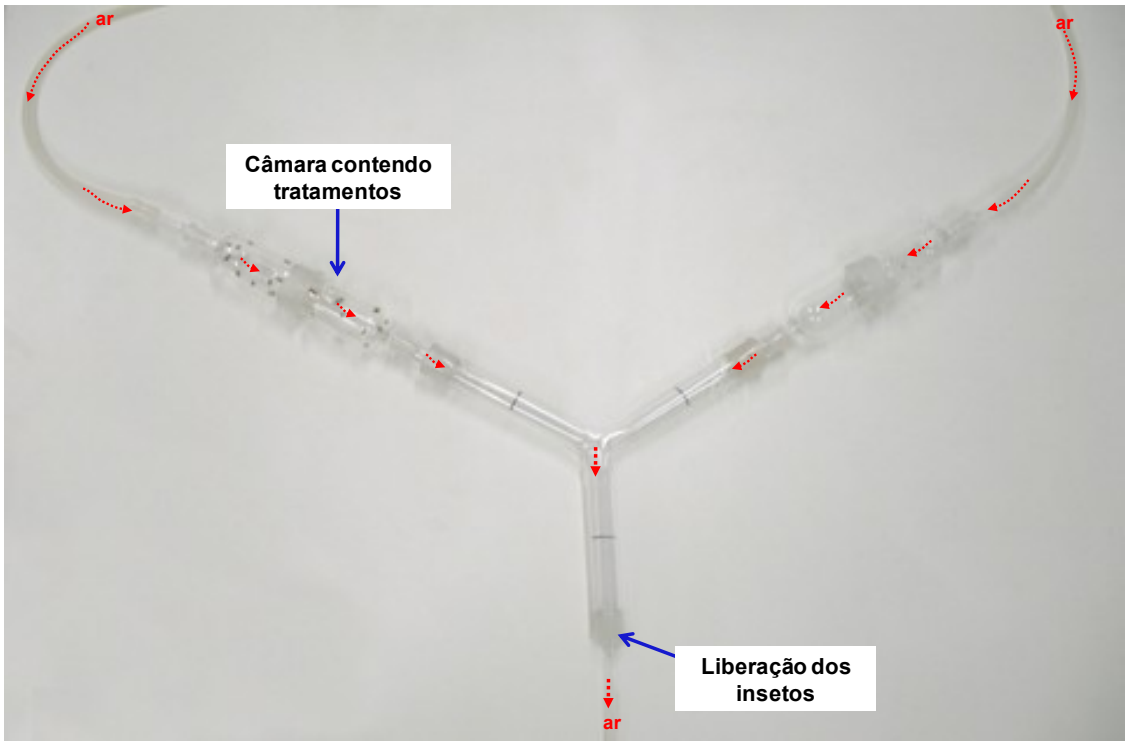

Figura 2.2 - Olfatômetro conectado a câmaras de vidro para os bioensaios comportamentais de *Diabrotica speciosa*

2.2.5 Sequência de atividades envolvidas no comportamento sexual

Para caracterizar a sequência de atividades envolvidas no comportamento sexual em *D. speciosa*, os bioensaios foram realizados durante o horário de maior atividade sexual dos insetos, utilizando-se machos e fêmeas não acasaladas. Casais virgens foram inseridos, individualmente, em recipientes circulares transparentes (10 x 8 cm) contendo folhas de feijoeiro. Em bioensaios preliminares, foi realizado o registro das atividades de machos e fêmeas (n=30) antes, durante e após a cópula, para a elaboração do etograma. Uma vez conhecidos os padrões motores, novos casais (n=50) foram observados para confirmar a sequência comportamental, quantificar as atividades e registrar sua duração. Adicionalmente, os comportamentos foram gravados

em câmera digital manual (Canon Power Shot® S2 IS), a fim de reavaliar cada comportamento, posteriormente.

2.2.6 Análise estatística

Os dados referentes à idade, horário e período de duração e número de cópulas por casal, foram analisados pelo teste de qui-quadrado ($P \leq 0,05$), testando-se a homogeneidade das proporções de cópulas e de não-cópulas. Para proporções não homogêneas, foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Marascuillo ($P \leq 0,1$) (MARASCUILLO, 1966; NIST/SEMATECH, 2002).

Os dados referentes aos bioensaios de olfatometria foram analisados pelo teste de qui-quadrado ($P \leq 0,05$), testando-se a hipótese de igualdade entre as frequências observadas e esperadas de indivíduos que se dirigiam para cada tratamento.

2.3 Resultados

Dentre os casais de *D. speciosa* observados, 76% realizaram a atividade de cópula, sendo observado um total de 80 cópulas no período dos estudos. A idade influenciou o início da atividade sexual, que ocorreu entre o terceiro e o sétimo dias após a emergência dos adultos (Figura 2.3). A primeira cópula ocorreu, predominantemente, em casais com quatro e cinco dias de idade. Adultos com um e dois dias após emergência não apresentaram atividade de cópula (Figura 2.3).

As cópulas em *D. speciosa* ocorreram ao longo de todo o dia, embora tenham se concentrado entre o final da fotofase (18-20h) e a primeira metade da escotofase (20-2h). Entre 4 e 8 horas não foram observadas cópulas (Figura 2.4).

Durante os sete dias de observação, a maioria dos casais copulou uma única vez, embora esse comportamento tenha se repetido por 2 a 4 vezes, em cerca de 30% dos adultos.

Os machos de *D. speciosa* foram atraídos pelas fêmeas virgens (85%), assim como pelos voláteis emitidos por elas (extratos) (≈75%) (Figura 2.5A).

Por outro lado, os machos não foram atraídos por seus coespecíficos, assim como as fêmeas, que não responderam às outras fêmeas, nem aos machos e seus extratos (Figura 2.5B).

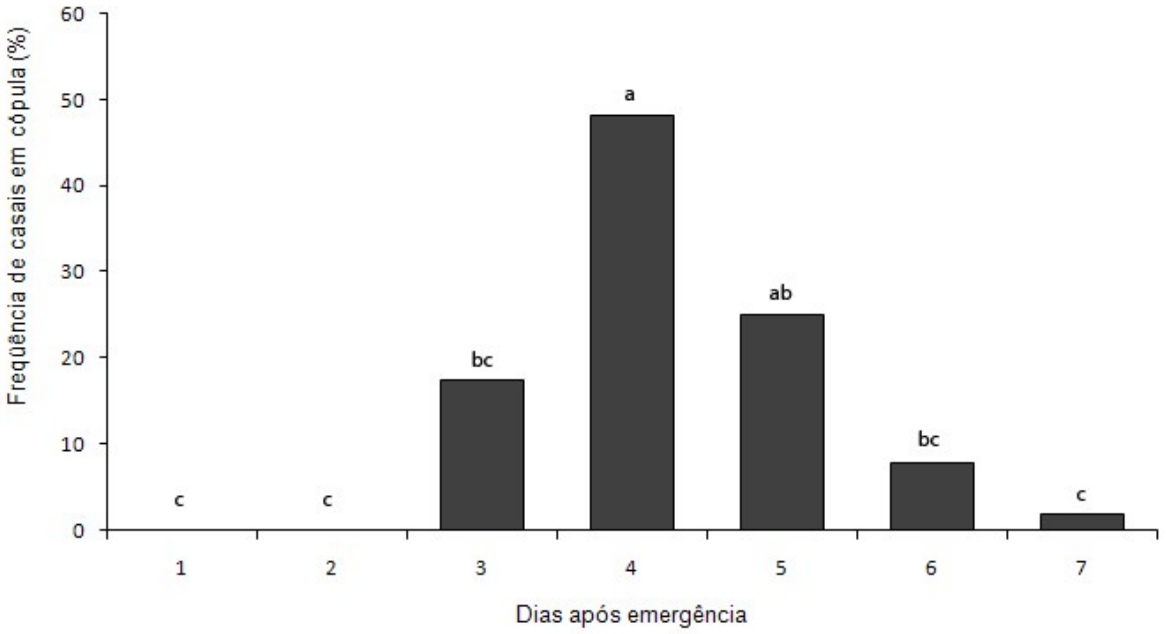

Figura 2.3 - Frequência de cópulas em *Diabrotica speciosa* do primeiro ao sétimo dia após a emergência. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos (n= 53, Marascuillo, *P*≤0,1) (T 22±3ºC; UR 70±10%; fotoperíodo de 14:10h)

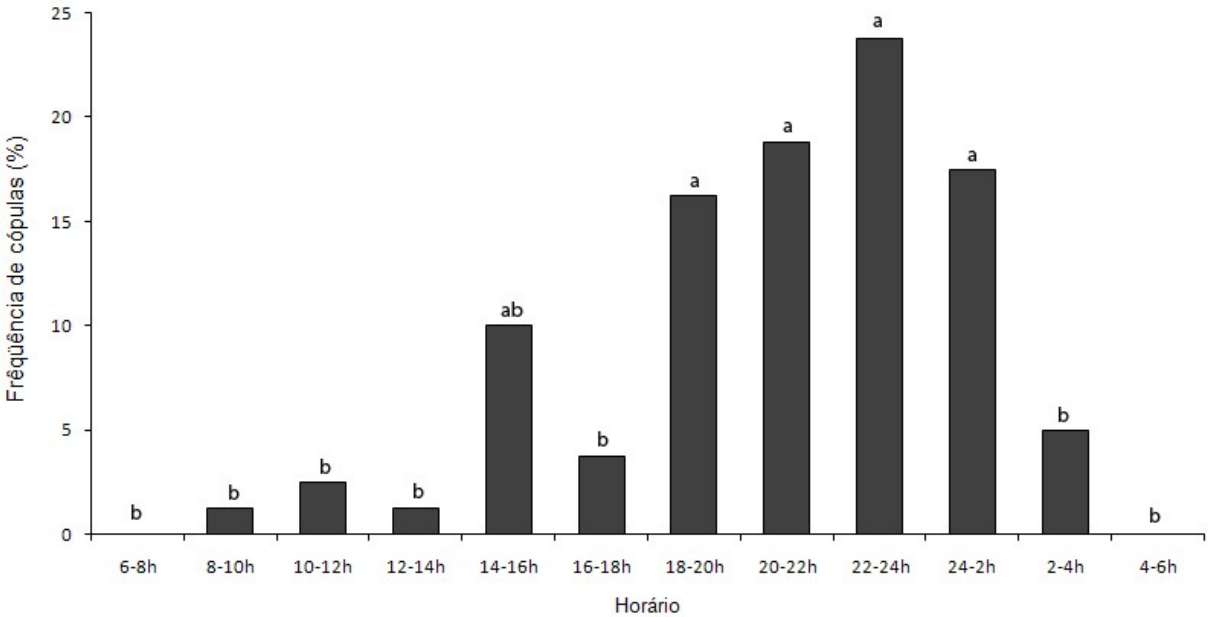

Figura 2.4 - Frequência de cópulas observadas em *Diabrotica speciosa* ao longo do dia. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos (n=80; Marascuillo, *P*≤0,1) (T 22±3ºC; UR 70±10%; fotoperíodo de 14:10h)

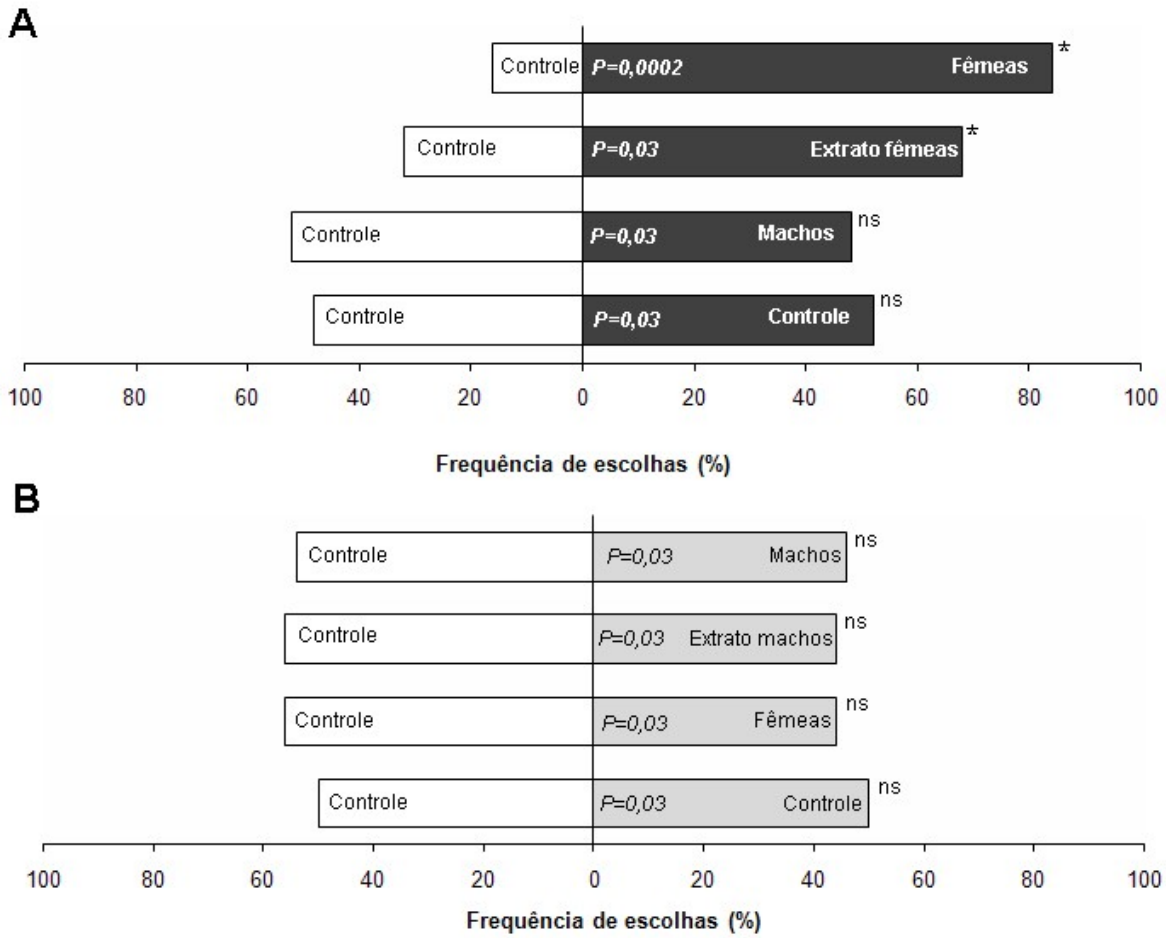

Figura 2.5 - Frequência de respostas de machos (A) e de fêmeas (B) de *Diabrotica speciosa*, em olfatômetro do tipo 'Y' em relação aos coespecíficos, seus respectivos extratos e ao tratamento controle (câmaras vazias). (*) Indica diferença significativa entre os tratamentos (n=50, Qui-quadrado, $P \leq 0,05$) (T 22±3ºC; UR 70±10%; fotoperíodo de 14:10h)

Machos e fêmeas de *D. speciosa* apresentaram padrões bem definidos de pré-cópula, cópula e pós-cópula (Figura 2.6). A maioria das fêmeas (52%) realizou o comportamento típico de chamamento, pela exposição de uma membrana localizada entre o sétimo e oitavo esternitos. A posição de chamamento em *D. speciosa* consistiu na exposição intermitente de tal estrutura, combinada com a distensão e retração do abdome. Para 48% das fêmeas observadas, não houve comportamento de chamamento, embora estas tenham copulado.

A pré-cópula em *D. speciosa* teve início com a aproximação sem contato físico entre os sexos, caracterizado pelo caminhamento ou por saltos rápidos do macho em direção à fêmea. Após aproximar-se, o macho realizava o contato exploratório, tocando antenas e palpos nos segmentos terminais do abdome da parceira (70%) ou realizava a "monta" imediata, sem contato prévio (30%). Durante essas atividades, fêmeas não receptivas evitaram a aproximação, afastando-se rapidamente. Uma vez em posição de "monta", o macho friccionava suas antenas ao longo de todo o comprimento das antenas da fêmea ('antenação'). Por sua vez, esta movimentava as pernas posteriores em direção ao corpo do parceiro (4%) e/ou caminhava com o macho sobre si (44%). Concomitantemente, o macho repetia os movimentos de corte (48%), batendo suas pernas e peças bucais contra os élitros da parceira, ao mesmo tempo em que intensificava a 'antenação'. Em 52% dos casais, as fêmeas permaneceram imóveis, o que favoreceu o início imediato da cópula, sem que houvesse o comportamento de corte. Neste caso, o macho introduzia o edeago imediatamente após a 'monta'. Nesta etapa, fêmeas não receptivas ainda conseguiam escapar por meio de caminhamento rápido ou agitação do corpo. Para casais cujas fêmeas apresentavam-se receptivas, o macho introduzia o edeago em movimentos laterais e frontais bruscos com o abdome. O tempo de duração da pré-cópula variou de 0,05 até 14,65 minutos (Tabela 2.1).

A cópula iniciou-se no momento em que o edeago estava completamente introduzido na genitália da fêmea. Nessa etapa, a maioria das fêmeas mostrava-se agitada (56%) ocasionando a repetição dos comportamentos de corte pelos machos. Por outro lado, as fêmeas que permaneceram paradas (44%) promoviam a imobilidade também dos seus parceiros.

Uma vez em repouso, o casal em cópula vibrava lentamente as antenas que, nos machos ficavam posicionadas lateralmente ou para trás e, na fêmea, para frente. Além disso, o macho realizava movimentos ocasionais com o corpo, girando-o lentamente para os dois lados e mantendo o edeago fixado à fêmea (100%).

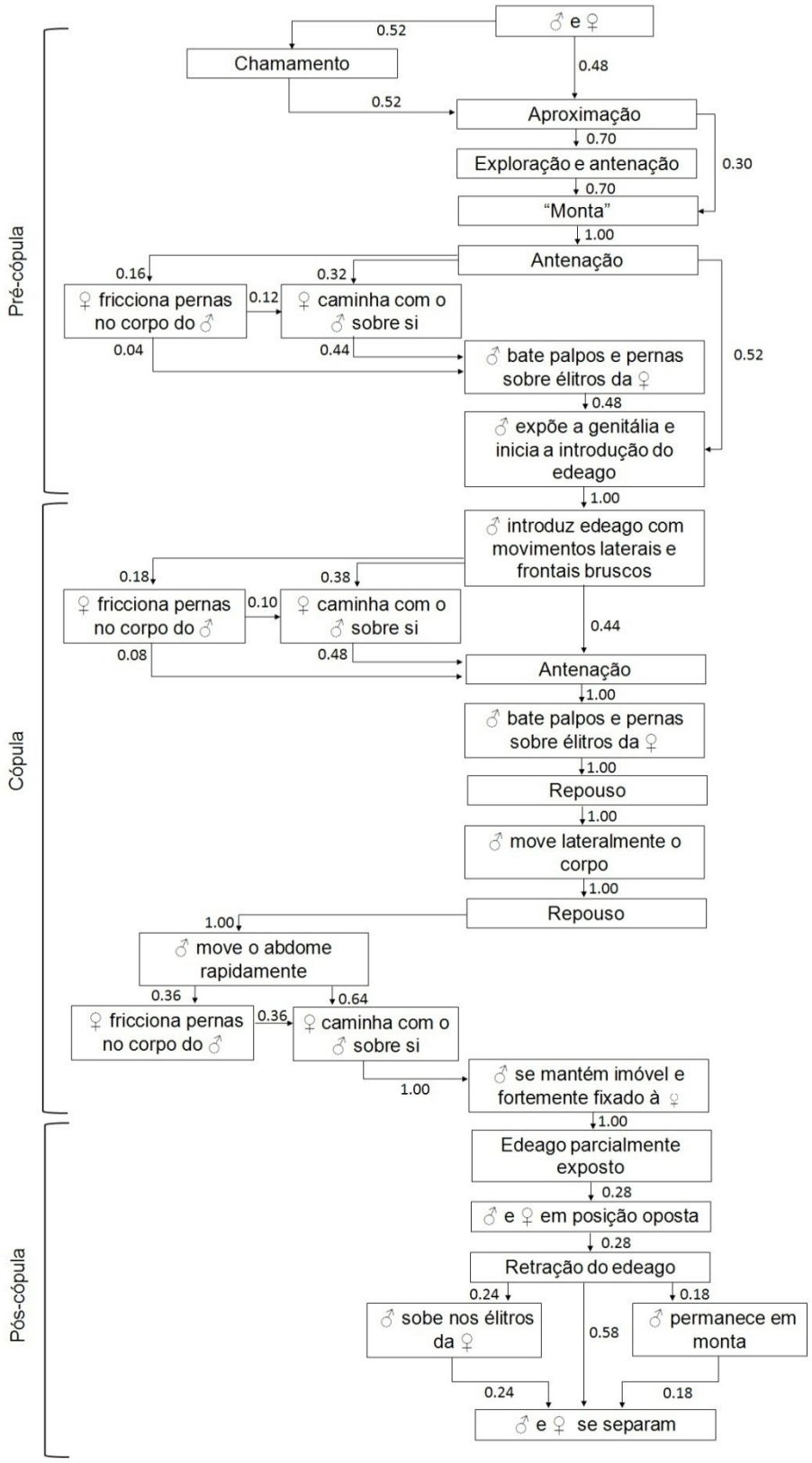

Figura 2.6 - Sequência de comportamentos relacionados à cópula em *Diabrotica speciosa*, em laboratório (n=50, números indicam proporção de casais em cada sequência comportamental)

Tabela 2.1 - Duração média, mínima e máxima (minuto) das principais atividades comportamentais de *Diabrotica speciosa* durante a pré-cópula, cópula e pós-cópula (n=50) (T 22±3ºC; UR 70±10%; fotoperíodo de 14:10h)

Atividade	**Duração média (Intervalo de variação) (minutos)**
Pré-cópula	2,32 (0,05-14,65)
Cópula	166,20 (60,00-360,00)
Pós-cópula	0,48 (0,03-11,73)

No período final da cópula, as fêmeas mostravam-se agitadas, movendo vigorosamente o abdome para as laterais, ao mesmo tempo em que caminhavam com o macho sobre si e empurravam as pernas posteriores contra o parceiro (100%). Aparentemente, esse comportamento, verificado para todos os casais, relacionou-se à tentativa da fêmea de encerrar a cópula. Entretanto, o macho fixava-se fortemente ao corpo da parceira, mantendo as pernas anteriores e medianas sobre seu élitro e as pernas posteriores fixadas nos seus esternitos finais. Durante essas atividades, o macho conseguia manter-se em cópula, até que finalmente ocorria a exposição e retração do edeago. A maioria dos casais (≈40%) permaneceu em cópula por, pelo menos, 3 horas, embora a duração tenha variado de 1 a 6 horas (Tabela 2.1).

Após a exposição parcial do edeago iniciaram-se as atividades de pós-cópula, nas quais parte dos casais (28%) mantinha os corpos em direção oposta, com o edeago unindo ambos até a separação e o distanciamento. Para os demais casais (72%), a retração do edeago ocorria com o macho ainda sobre a fêmea, embora fossem seguidas sequências diferenciais de comportamentos. Em 58% dos casais, o macho retraía o edeago e descia da fêmea rapidamente, sem apresentar comportamento de guarda. Para esses casais, a pós-cópula teve um curto período de duração, com um mínimo de 0,03 minutos (2 seg.). Entretanto, 18% dos machos permaneceram em “monta” por um período de até 11,73 minutos antes de distanciar-se da parceira. Em 24% dos casais, os machos permaneceram sobre o corpo das fêmeas, apoiando os três pares de pernas sobre seus élitros e tocando as peças bucais no corpo da parceira.

2.4 Discussão

Casais de *D. speciosa* apresentaram ritimicidade nos comportamentos relacionados à cópula, sugerindo uma sincronização da emissão e recepção dos estímulos sexuais entre machos e fêmeas. Outras espécies de *Diabrotica* também apresentam ritimicidade associada às cópulas, como *D. virgifera*, cujos adultos copulam durante todo o dia, embora intensifiquem tal comportamento no final da noite e início da manhã (CATES *apud* SPENCER et al., 2009). Considerando-se que os machos de *D. virgifera* são capazes de responder aos feromônios durante todo o dia, é possível que a emissão desses compostos pelas fêmeas esteja determinando essa ritimicidade (DOBSON; TEAL, 1986). Para *D. speciosa*, os resultados do presente trabalho indicam que a comunicação sexual concentra-se no final da fotofase e início da escotofase, embora cópulas tenham sido verificadas em outros períodos. Adicionalmente, observações realizadas em campo, por Nava et al. (2004), já haviam demonstrado o incremento da atividade de machos e fêmeas durante o final da fotofase, o que pode estar relacionado à dispersão dos insetos para a busca dos insetos do sexo oposto.

As múltiplas cópulas, verificadas para *D. speciosa*, corroboram o que ocorre para a maioria dos crisomelídeos, cujos machos e fêmeas possuem diversos parceiros e copulam diversas vezes ao longo do período reprodutivo. De acordo com Dickinson (1997), tal comportamento tem um valor adaptativo importante, uma vez que pode incrementar o sucesso reprodutivo dos indivíduos, influenciando vários aspectos do seu comportamento e ecologia. Além disso, a ocorrência de múltiplas cópulas em insetos pode influenciar o monitoramento e manejo de populações de campo (SADEK, 2001).

Os resultados obtidos em bioensaios de olfatometria complementam aqueles obtidos por Ventura et al. (2001), demonstrando que as fêmeas são as responsáveis pela atração dos machos. Além disso, a atratividade dos extratos de fêmeas comprova que um feromônio é o mediador da comunicação sexual em *D. speciosa*. Para outras espécies do gênero *Diabrotica*, é comum a emissão de feromônios sexuais pelas fêmeas. Dentre eles, o propanoato de 8R-metil-2R-decenila e o 10R-metil-2R-tridecanona foram identificados como componentes majoritários dos feromônios de *D. virgifera virgifera* e *D. undecempunctata*, respectivamente (GUSS et al., 1983;

DOBSON; TEAL., 1987). Tais compostos foram sintetizados e são importantes para o manejo de populações de campo. Para *D. speciosa*, este é o primeiro estudo que aborda o comportamento sexual, fornecendo subsídios para novas pesquisas acerca da ecologia química dessa espécie.

As observações sobre a atividade sexual de *D. speciosa* demonstraram que o padrão comportamental de machos e fêmeas assemelha-se ao verificado para as demais espécies do gênero e também para outros Coleoptera (HILL, 1975; SANTOLAMAZZA; CORDERO RIVERA, 1998; WANG; DAVIS, 2005; IBEAS et al., 2008). Lew; Ball (1979) estudaram a atividade de cópula de casais de *D. virgifera*, para a qual foram observados 10 padrões comportamentais distintos, desde o chamamento até a pós-cópula.

Para *D. speciosa*, o comportamento sexual iniciou-se pelo chamamento, o qual é comum também em outras espécies do gênero, cujas fêmeas expõem uma membrana localizada no final do abdome. De acordo com Lew; Ball (1979), essa membrana é constituída de células epiteliais do tipo secretoras que, possivelmente, são as responsáveis pela produção e liberação do feromônio sexual. Entretanto, considerando-se que uma grande proporção (48%) das fêmeas receptivas de *D. speciosa* não apresentou o comportamento de chamamento, é provável que a emissão do feromônio esteja ocorrendo mesmo sem a exposição dessa membrana. Conforme já demonstrado por Hammack (1995), a postura de chamamento não é um pré-requisito para a cópula em *D. virgifera*, uma vez que 70% das fêmeas copularam mesmo sem que a membrana fosse exposta.

O comportamento de corte em machos de *D. speciosa* foi relativamente rápido e caracterizou-se pela ‘antenação’ e pelas batidas leves das peças bucais do macho sobre o dorso da fêmea. De acordo com Tallamy et al. (2003), o contato das antenas realizadas pelo macho sobre o dorso da fêmea promovem o relaxamento do duto copulatório e facilita o acesso do edeago até a bolsa copuladora. Além disso, uma taxa rápida de batidas sobre o dorso da fêmea está associada a uma pronta aceitação do parceiro (TALLAMY et al., 2002). Esses comportamentos parecem ser comuns também para outros Chrysomelidae e Cerambycidae. Em *Monochamus galloprovincialis* Olivier (Coleoptera: Cerambycidae), a fricção das peças bucais contra os élitros da fêmea

determina a aceitação do parceiro e acelera o início da cópula (IBEAS et al., 2008). Para *Gastrophysa atrocyanea* (Motschulsky), *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) e diversos cerambicídeos, foi demonstrada a presença de compostos químicos nas fêmeas, os quais agem como feromônios de contato. Esses estímulos táteis são reconhecidos pelos receptores localizados nas antenas e palpos de machos, desempenhando papel primordial no comportamento de corte (JERMY; BUTT, 1991; GINZEL; HANKS, 2003; ZHANG et al., 2003; SUGENO; HORI; MATSUDA, 2005). Para *D. speciosa*, esse comportamento foi verificado em todos os casais observados e parece influenciar o comportamento durante a pré-cópula, cópula e pós-cópula. Considerando-se que, para outras espécies, essa atividade está estreitamente relacionada a um composto químico presente nos élitros das fêmeas, para *D. speciosa*, o isolamento e avaliação da atividade biológica dos extratos podem confirmar a presença e a ação de tais compostos.

Assim como para outras espécies de *Diabrotica*, as cópulas tiveram duração variável entre 1 e 6 horas e o repertório comportamental restringiu-se à antenação, ao repouso e aos movimentos laterais do corpo do macho sobre a fêmea. Tais atividades seguiram padrões semelhantes aos verificados para *D. virgifera*, cujos machos permaneceram sobre as fêmeas fixando as pernas medianas e posteriores nas laterais do abdome da parceira (LEW; BALL, 1979). Sobre este aspecto, Hammack; French (2007) demonstraram que machos de algumas espécies de *Diabrotica* e *Cerotoma* possuem áreas com estrutura diferenciada na porção ventral do basitarso, que permitem maior fixação e o prolongamento do período de cópula. Para *D. speciosa*, embora esse dimorfismo sexual tenha sido constatado em estudos morfológicos preliminares, uma análise mais acurada permitirá a descrição minuciosa de tal característica.

Referências

ÁVILA, C.J.; MILANEZ, J.M. Larva alfinete. In: SALVADORI, J.R.; ÁVILA, C.J.; SILVA, M.T.B. **Pragas de Solo no Brasil**. Passo Fundo: EMBRAPA, 2004. p. 345-378.

ÁVILA, C.J.; TABAI, A.C.P.; PARRA, J.R.P. Comparação de técnicas para criação de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) em dietas natural e artificial. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 257-267, 2000.

BALL, H.J.; CHAUDHURY, M.F.B . A sex attractant of the western corn rootworm. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 66, p. 1051-1053, 1973.

BOFF, M.I.C.; GANDIN, C.L. Principais pragas da cultura da melancia e seu controle. **Agropecuária Catarinense**, Floriaópolis, v. 5, p. 39-41, 1992.

BRANSON, T.F., GUSS, P. L., JACKSON, J.J. Mating frequency of the western corn rootworm. **Annals of the Entomological Society of America**, Gainesville, v. 70, p. 506–508, 1977.

DICKINSON, J.L. Multiple mating, sperm competition, and cryptic female choice in the leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). In: CHOE, J.C.; CRESPI, B.J. **The Evolution of Mating Systems in Insects and Arachnids.** Cambridge; New York : Cambridge University Press, 1997. 387 p.

DOBSON , I.D.; TEAL , P.E.A. Field studies of the temporal response patterns of male *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte and *D. barberi* Smith and Lawrence to 8R-methyl-2R-decyl propanoate. **Physiological Entomology,** Oxford, v. 11, p. 44, 405-410, 1986.

FERNANDEZ, P.; HILKER, M. Host plant location by Chrysomelidae. **Basic and Applied Ecology**, Jena, v. 8, p. 97-116, 2007.

GINZEL, M. D.; HANKS, L. M. Contact pheromones as mate recognition cues of four species of longhorned beetles (Coleoptera: Cerambycidae). **Journal of Insect Behavior,** New York, v. 16, p. 181–187, 2003.

GUSS, P.L. The sex pheromone of the western corn rootworm (*Diabrotica* virgifera). **Environmental Entomology**, Lanhan, v. 5, p. 219-223, 1976.

GUSS, P.L.; TUMLINSON, J.H., SONNET, P.E.; McLAUGHLIN, J.R. Identification of a female-produced sex pheromone from the southern corn rootworm, *Diabrotica undecimpunctata* howardi Barber. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 9, p. 1363-1375, 1983.

HAMMACK, L. Calling behavior in female western corn rootworm beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). **Annals of Entomological Society of America**, Gainesville, v. 88, n. 4, p. 562-569, 1995.

HAMMACK, L.; FRENCH, B. W. Sexual dimorphism of basitarsi in pest species of *Diabrotica* and *Cerotoma* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Annals of the Entomological Society of America,** Gainesville, v. 100, p. 59-63, 2007.

HILL, R.E. Mating, oviposition pattern, fecundity and longevity of the western corn rootworm. **Journal of Economic Entomology,** College Park, v. 72, p. 311-315, 1975.

IBEAS, F.; DÍEZ, J.J.; PAJARES, J.A. Olfactory sex attraction and mating behaviour in the pine sawyer *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae). **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 21, n. 3, p. 101-110, 2008.

JERMY, T.; BUTT, B.A. Method for screening female sex pheromone extract of the Colorado potato beetle. **Entomology Experimentalis et Applicata**, Edinburgh, v. 59, p. 75-78, 1991.

KRYSAN, J.L. Introduction: biology, distribution, and identification of pest *Diabrotica*. In: KRYSAN, J.L.; MILLER, T.A. **Methods for the Study of Pest *Diabrotica*.** New York: Springer-Verlag, 1986. p. 1-23.

LEW, A.C. BALL, H.J. The mating behavior of the. western corn rootworm *Diabrotica virgifera* (Coleoptera:. Chrysomelidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Gainesville, v. 72, n. 3, p. 15-15, 1979.

MARASCUILLO, L. A. Large-sample multiple-comparisons. **Psychological Bulletin**, Amsterdan, v. 65, p. 280-290, 1966.

MARQUES, G.B.C.; ÁVILA, C.J.; PARRA, J.R.P. Danos causados por larvas e adultos de *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, p. 1983-1986, 1999.

MEINKE, L. J.; MAYO, Z. B.; WEISSLING, T. J. Pheromone delivery system: western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) pheromone encapsulation in a starch borate matrix. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.82, p.1830-1835, 1989.

MILANEZ, J.M. **Técnicas de criação e bioecologia de *Diabrotica speciosa* (Germar), 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae)**. 1995. 102p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba,1995.

MILLAR, J.G.; HAYNES, K.F. **Methods in chemical ecology**. New York: Chapman & Hall. Mead, R. 1998. 420p.

NAVA, D.E.; ÁVILA, C.J.; PARRA, J.R.P. **Atividade diurna de adultos de *Diabrotica speciosa* na cultura do milho e de *Cerotoma arcuatus* na cultura da soja**, 2004. 23p. . (Documento Técnico EMBRAPA, 64).

NIST/SEMATECH. **e-Handbook of Statistical Methods.** Disponível em: http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/, 2009. Acesso em: 02 mar. 2009.

OLIVEIRA, C.R.B.; MARINHO, V.L.A.; ASTOLFI, F.S.; AZEVEDO, M.; CHAGAS, C.M.; KITAJIMA, E.W. Purification, serology and some properties of the purple granadilla (*Passiflora edulis*) mosaic virus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, p. 455-462, 1994.

SADEK, M.M. Polyandry in field-collected *Spodoptera littoralis* moths and laboratory assessment of the effects of male mating history. **Entomological Experimentalis et Aplicatta**, Edinburgh, v. 98, p. 165-172, 2001.

SANTOLAMAZZA, C.S.; CORDERO RIVERA, A. Sperm competition, cryptic female choice and prolonged mating in the *Eucalyptus* Snout-Beetle, *Gonipterus scutellatus* (Coleoptera, Curculionidae). **Etología**, Pontevedra, v. 6, p.33-40, 1998.

SPENCER, J.L.; HIBBARD, B.E.; MOESER, J.; ONSTAD, D.W. Behaviour and ecology of the western corn rootworm *(Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). **Agricultural and Forest Entomology**, Washington, v. 11, p. 9-27, 2009.

SUGENO W.; HORI, M.; MATSUDA, K. Identification of the contact sex pheromone of *Gastrophysa atrocyanea* (Coleoptera : Chrysomelidae*).* **Applied Entomology and Zoology*,*** Tokyo, v. 41, n. 2, p. 269-276, 2005.

TALLAMY, D.W.; POWELL, B.E.; McCLAFFERTY, J.A. Male traits under cryptic female choice in the spotted cucumber beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **Behavioral Ecology**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 511-518, 2002.

TALLAMY, D.W.; DARLINGTON, M.B.; PESEK, J.D.; POWELL, B.E. Copulatory courtship signals male genetic quality in cucumber beetles. **Proceeding of Royal Society of London**, London, v. 270, p. 77-82, 2003.

VENTURA, M.U.; MELLO, P.P.; OLIVEIRA, A.R.M.; SIMONELLI, F.; MARQUES, F.A.; ZARBIN, P.H.G. Males are attracted by females traps: a new perspective for management of *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) using sexual pheromone. **Neotropical Entomology,** Londrina, *v.* 30, p. 361-364, 2001.

WANG, Q.; DAVIS, L.K. Mating behavior of *Oemona hirta* (Fabr.)(Coleoptera: Cerambycidae: Cerambycinae) in laboratory conditions. **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 18, p. 187-191, 2005.

ZARBIN, P. H. G.; FERREIRA, J. T. B.; LEAL, W. S. Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrutural de feromônios de insetos. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 2, 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40421999000200018&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 06 abr. 2009.

ZHANG, A.; OLIVER, J.E.; CHAUHAN, K.; ZHAO, B.; XIA, L.; XU, Z. Evidence for contact sex recognition pheromone of the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabriepennis* (Coleoptera: Cerambycidae). **Naturwissenschaften**, Heidelberg, v. 90, p. 410-413, 2003.

3 RESPOSTA COMPORTAMENTAL E ELETROANTENOGRÁFICA DE MACHOS DE *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) AO FEROMÔNIO DE ATRAÇÃO SEXUAL

Resumo

Neste estudo, investigou-se o ritmo diário de respostas de machos de *Diabrotica speciosa* ao feromônio sexual de fêmeas com idades diferentes, em condições de laboratório. As fêmeas de *D. speciosa* com 3 a 15 dias de idade foram atrativas aos machos, enquanto que as recém-emergidas parecem não produzir o feromônio sexual. Os machos responderam ao feromônio ao longo de todo o dia, com predominância entre as 18-24 horas. Análises dos extratos naturais em GC-MS demonstraram que as fêmeas produzem de seis compostos químicos distintos daqueles produzidos pelos machos, sendo um majoritário e os demais minoritários. Em GC-EAG, tais compostos ocasionaram as respostas eletroantenográficas de machos, sendo que quatro dessas respostas mostraram-se mais intensas. O presente trabalho fornece uma importante contribuição para estudos sobre a ecologia química de *D. speciosa*, principalmente aos referentes à identificação química dos feromônios sexuais.

Palavras-chave: Semioquímicos; ecologia química; comportamento sexual; ritmo circadiano

Abstract

In this study we investigated the daily rhythm of *Diabrotica speciosa* male responses to sexual pheromone of females of different ages in laboratory conditions. *D. speciosa* females of 3 to 15 days old were attractive to males, while newly emerged females seem not to produce sexual pheromone. Males responded to pheromone in different times of the day. GC-MS analysis revealed that females produce six chemical volatiles that are distinct from those produced by males, being one majoritary and other five minoritary compounds. In GC-EAD these compounds occasioned electrophysiological responses in male antennae, being more strong four of these responses. The current study provides an important contribution to studies about *D. speciosa* chemical ecology, mainly in regard to chemical identification of sexual pheromones.

Keywords: Semiochemicals; chemical ecology; mating behavior; circadian rhythm

3.1 Introdução

Diabrotica speciosa (Germar) é uma das espécies mais importantes deste gênero na América do Sul, estando distribuída em quase todos os estados brasileiros e causando prejuízos em cultivos de diversas plantas. Ao contrário das espécies norte americanas, para as quais se estudou profundamente o comportamento e a ecologia química (KRYSAN, 1986; GUSS, 1976; LEW; BALL, 1979; HAMMACK, 1995; SPENCER et al., 2009), *D. speciosa* é pouco conhecida em termos comportamentais e seus feromônios ainda não foram identificados. Recentemente, estudos revelaram que adultos dessa espécie realizam múltiplas cópulas, as quais ocorrem a partir do terceiro dia após emergência, mais frequentemente no final da fotofase (NARDI et al.[1], dados não publicados).

De acordo com Rosén; Han; Löfstedt (2003), a ritimicidade relacionada aos comportamentos de cópula em insetos, pode indicar que feromônios sexuais são emitidos e reconhecidos de forma sincronizada pelos adultos, obedecendo ao tempo de maturação sexual e aos ritmos diários de cada espécie. Essa sincronização relacionada a produção e percepção dos feromônios tem sido documentada para diversas espécies de insetos (ZHUKOVSKAYA, 1995; LINN et a., 1996; ROSÉN; HAN; LÖFSTEDT, 2003). Para *Diabrotica virgifera* Le Conte, Dobson; Teal (1986) observaram que os machos podem responder aos feromônios sintéticos durante todo o dia, o que reflete no ritmo diário de captura em armadilhas de feromônios instaladas no campo. Desse modo, caracterizar os padrões de emissão e resposta a esses estímulos químicos é de extrema importância para viabilizar o manejo dos insetos em campo.

No presente trabalho, buscou-se caracterizar os aspectos relacionados à emissão e resposta ao feromônio sexual em *D. speciosa*. Para tanto, foram realizados bioensaios de olfatometria visando identificar a idade das fêmeas em que ocorre a emissão de feromônios, bem como o ritmo diário de respostas dos machos a tais componentes. Além disso, foram realizados testes em eletroantenograma para caracterizar os componentes químicos ativos aos receptores de machos, a fim de oferecer subsídios à identificação química dos compostos.

---

[1] NARDI, C.; LUVIZOTTO, R.A.G.; PARRA, J.R.P.; BENTO, J.M.S. **Comportamento sexual de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae).**

3.2 Material e métodos

3.2.1 Criação dos insetos

Os indivíduos de *D. speciosa* foram obtidos a partir de criação em laboratório, baseada na metodologia de Milanez (1995) e Ávila; Tabai; Parra (2000). Larvas e adultos foram alimentados com raízes de milho, *Zea mays* L. ('Suwan') e folhas de feijoeiro, *Phaseolus vulgaris* (L.) ('Carioca'), respectivamente. Adultos foram mantidos em gaiola plástica (40 x 30 x 40 cm) contendo plantas de feijoeiro e substrato de oviposição, constituído de um recipiente circular (10 x 1,5 cm) forrado com gaze preta umedecida (MILANEZ, 1995). Em intervalos de dois dias, as posturas foram coletadas, tratadas com sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4.5H_2O$, 1%), por dois minutos, e transferidas para placas de Petri (9 x 1 cm), onde permaneceram até a eclosão. As larvas recém-eclodidas foram inoculadas em plântulas de milho e mantidas em recipientes plásticos contendo vermiculita umedecida (1 parte vermiculita: 2 partes água), onde permaneceram até a emergência. Para a criação de *D. speciosa*, assim como para a realização dos bioensaios comportamentais, os insetos foram mantidos em salas climatizadas com temperatura de 22±3ºC, umidade relativa de 70±10% e fotoperíodo de 14:10h. Durante a escotofase, os insetos foram mantidos sob luz vermelha fornecida por lâmpada de diodo emissor de luz forrada com plástico vermelho (Supergel Rosco®, 4% transparencia), e durante a fotofase sob luz branca artificial (32 W).

3.2.2 Obtenção dos extratos

A coleta dos voláteis emitidos pelos adultos de *D. speciosa* foi realizada pelo sistema de aeração (MILLAR; HAYNES, 1998; ZARBIN et al., 1999), utilizando-se câmaras horizontais de vidro (7 cm diâmetro x 20 cm comprimento). Nessas câmaras, adultos de *D. speciosa* foram submetidos a um fluxo de 1 L/min de ar filtrado em carvão ativado. Na extremidade de saída de ar foi conectada uma coluna (7,5 x 0,5 cm) preenchida com 0,150g de polímero (Super Q® 80/100 Mesh, Alltech Assoc., IL, EUA),

que adsorvia os compostos emitidos pelos insetos. O fluxo de ar foi gerado por uma bomba de vácuo e regulado por fluxômetros.

As coletas foram realizadas em etapas, utilizando-se uma quantidade mínima de 30 insetos, até a obtenção de 10 extratos (repetições) para cada um dos seguintes grupos de insetos: (i) fêmeas com 0 e 2 dias (n=100); (ii) fêmeas de 3-5 dias (n=100); (iii) fêmeas com 6-15 dias (n=100); e (iv) machos de 3-15 dias (n=100).

Após cada coleta, as colunas de polímero foram retiradas e os voláteis eluídos com 1 mL de solvente hexano. As amostras foram concentradas utilizando-se N_2 gasoso e mantidas em frascos vedados em temperatura de -10°C para uso nos bioensaios ou análises químicas.

3.2.3 Bioensaios comportamentais

Os bioensaios para avaliar a atividade biológica dos extratos de fêmeas de *D. speciosa* foram realizados em olfatômetro do tipo 'Y', constituído de um tubo principal e dois tubos laterais de vidro (20 x 3 cm), aos quais são conectadas câmaras contendo os tratamentos. O fluxo de ar foi promovido por uma bomba de vácuo conectada ao olfatômetro, utilizando-se fluxômetros para controlar a passagem de 1 L/min de ar no interior do olfatômetro.

Resposta de machos a fêmeas de diferentes idades e seus extratos. No olfatômetro, avaliou-se a resposta de machos aos os seguintes tratamentos: (i) 10 fêmeas de 0-2 dias *vs* controle (vazio); (ii) extrato de fêmea de 0-2 dias (10 equivalentes-fêmeas) vs controle (100µL de hexano); (iii) 10 fêmeas de 3-5 dias *vs* controle (vazio); (iv) extrato de fêmeas de 3-5 dias (10 equivalentes-fêmeas) *vs* controle (100µL de hexano); (v) 10 fêmeas de 6-15 dias *vs* controle (vazio); e (vi) extratos de fêmeas de 6-15 dias (10 equivalentes-fêmeas) *vs* controle (100µL de hexano). Cada um dos tratamentos foi impregnado em septos de borracha e evaporado utilizando-se N_2 gasoso em fluxo baixo.

Esses bioensaios foram realizados durante o horário de maior atividade sexual dos insetos, utilizando machos em idade propícia ao acasalamento, conforme Nardi et

al.[2], (dados não publicados). Machos de *D. speciosa* (n=40) foram liberados, individualmente, no tubo principal do olfatômetro, sendo avaliada a frequência de indivíduos que se direcionava para cada tratamento. Ao final dos bioensaios, foram comparadas as respostas de machos em relação a fêmeas de cada idade e seus respectivos extratos.

Ritmo diário de respostas de machos aos extratos naturais de fêmeas. Bioensaios foram realizados durante 24 horas, em intervalos de duas horas, liberando-se machos de *D. speciosa* (n=40) no olfatômetro, cujos tubos laterais continham septos de borracha impregnados com os extratos naturais de fêmeas (10 equivalentes-fêmeas) ou o controle (100µL de hexano). Os extratos utilizados foram obtidos a partir de fêmeas que proporcionaram as maiores frequências de respostas de machos em bioensaios anteriores (3-5 ou 6-15 dias). Para cada horário de avaliação, foi registrada a frequência de machos que se direcionava para cada tratamento, determinando o ritmo de respostas aos feromônios de fêmeas ao longo do dia.

3.2.4 Resposta eletroantenográfica de machos aos extratos naturais de fêmeas

Para avaliar as respostas eletroantenográficas de machos de *D. speciosa* aos feromônios sexuais foram utilizados extratos de fêmeas com 0-2 dias, 3-5 dias e 6-15 dias, os quais foram injetados em cromatógrafo a gás (Shimadzu GC-2010, coluna DB-5, J&W Scientific, Folson, California-EUA, 30m x 0.25mm x 0.25µm) acoplado a um sistema de eletroantenografia (Syntech, Hilversum, The Netherlands) (CG-EAG).

As antenas foram extraídas de machos vivos de *D. speciosa* (3-25 dias de idade) e fixadas em eletrodos do EAG utilizando-se gel condutor. Os eletrodos foram mantidos no interior do tubo de vidro conectado ao GC, mantendo-se um fluxo constante (250 mL/min) de ar sintético umedecido para o arraste dos compostos químicos (Figura 3.1A-D). Posteriormente, 1 µL do extrato (10 equivalentes-fêmeas) foi injetado no GC, caracterizando-se os compostos ativos de acordo com a diferença de potencial gerada

---

[2] NARDI, C.; LUVIZOTTO, R.A.G.; PARRA, J.R.P.; BENTO, J.M.S. **Comportamento sexual de Diabrotica speciosa (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae).**

pela vibração das antenas diante dos componentes separados pela coluna do equipamento. No total, foram analisadas as respostas de 5 antenas por tratamento, sendo que cada antena foi utilizada por um tempo máximo de 30 minutos, período necessário para a corrida de uma amostra no GC-EAG.

Após a injeção dos extratos, o forno do cromatógrafo foi mantido em 100°C por um minuto e elevado a 270°C numa taxa de 10°C por minuto, permanecendo nessa temperatura por 7 minutos. As respostas eletroantenográficas foram detectadas pela amplificação (50x) com um amplificador AC/DC UM-6 em modo DC (Syntech Laboratories, Hilversusm, The Netherlands) e gravadas com o Software Syntech GC-EAD32 (versão 4.6).

3.2.5 Análise química dos extratos naturais de machos e fêmeas

A análise química dos extratos de *D. speciosa* foi realizada injetando-se uma alíquota de 1 µl dos extratos (10 equivalentes-insetos) em cromatógrafo a gás (Shimadzu GC 17A) contendo coluna capilar DB-5 (J&W Scientific, Folson, Califórnia, EUA; 30m x 0,25mm x 0,25µm). O equipamento foi programado para uma temperatura inicial de 50°C por 1 minuto com aumento de 7°C por minuto até uma temperatura final de 250°C, a qual foi mantida por 10 minutos.

Os cromatogramas obtidos pela injeção dos extratos de machos e fêmeas foram comparados entre si para a detecção das diferenças entre os compostos químicos liberados por ambos os sexos.

Os componentes presentes unicamente nos extratos de fêmeas foram comparados aos compostos ativos em GC-EAG, a partir da co-injeção dos extratos com padrões internos de hidrocarbonetos em ambos os equipamentos e posterior cálculo do índice de Kovats (IK).

3.2.6 Análise estatística

Os dados referentes aos bioensaios de olfatometria foram analisados pelo teste de Qui-quadrado ($P \leq 0,05$), testando-se a hipótese de igualdade entre as frequências observadas e esperadas de indivíduos que se direcionavam para cada tratamento.

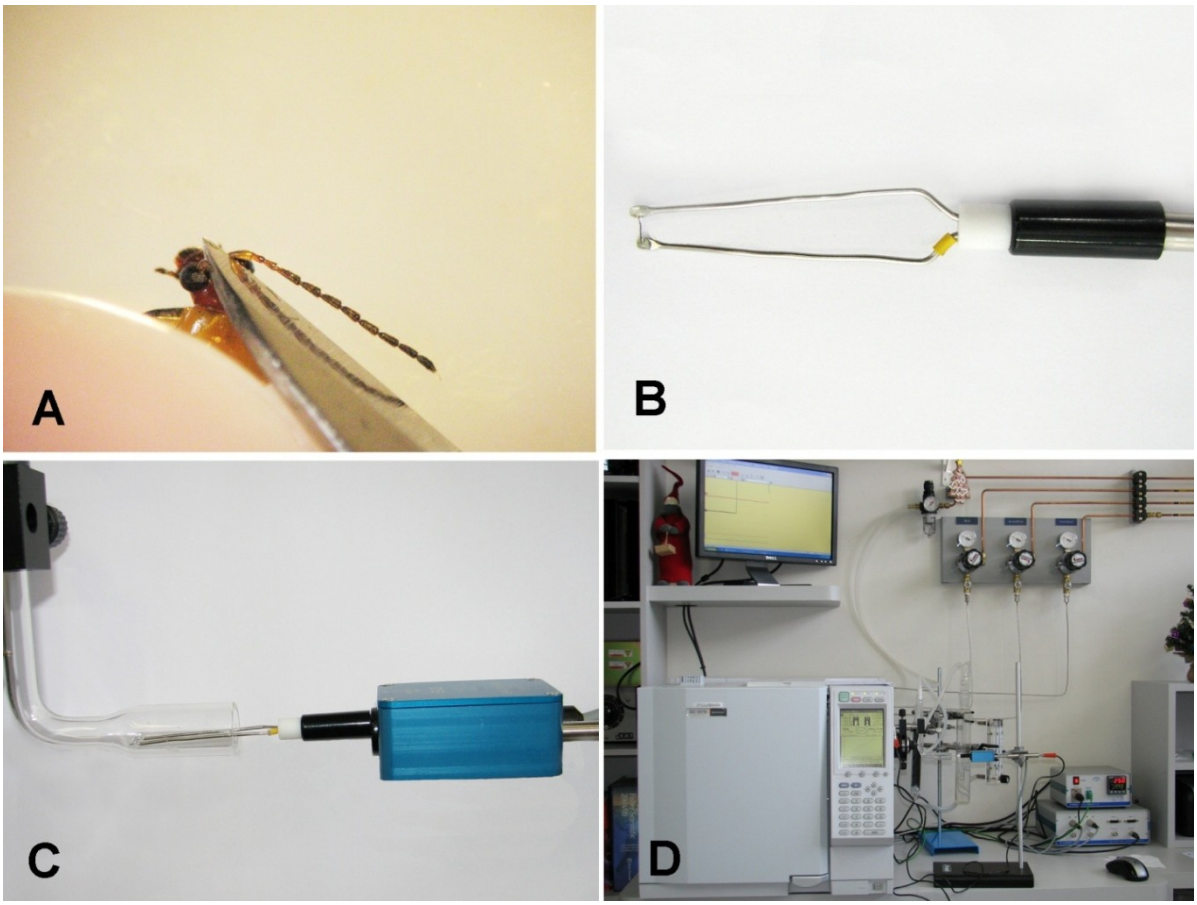

Figura 3.1 - Preparo de antenas de *Diabrotica speciosa* para eletroantenografia. (A) Excisão da antena do macho com lâmina; (B) antena de macho montada no suporte do eletroantenograma; (C) eletrodo inserido no tubo de vidro por onde passam os compostos químicos separados pela coluna do cromatógrafo a gás; (D) cromatógrafo a gás acoplado a um eletroantenograma

3.3 Resultados

A idade das fêmeas influenciou a resposta sexual dos machos de *D. speciosa*, sendo que apenas as fêmeas com mais de três dias de idade (3-5 e 6-15 dias) foram atrativas aos machos, assim como os extratos delas obtidos (Figura 3.2).

Machos de *D. speciosa* foram atraídos pelos extratos naturais de fêmeas na maioria dos horários do dia, com predominância no início da escotofase (18-24h). A partir do final da noite (2h) até o final da manhã (10h), os machos não diferenciaram entre o feromônio sexual e o controle, direcionando-se igualmente para ambos os tubos laterais do olfatômetro (Figura 3.3).

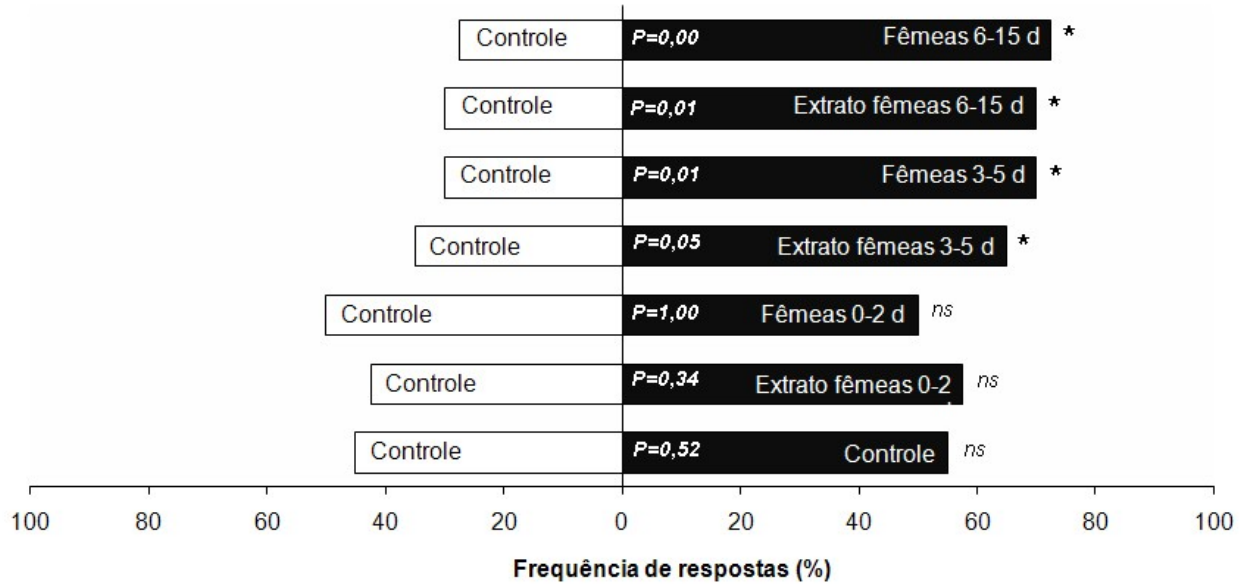

Figura 3.2 - Frequência de respostas de machos de *Diabrotica speciosa* aos extratos de fêmeas com diferentes idades e seus respectivos extratos em olfatômetro do tipo 'Y'. (*) Indica diferença significativa entre fêmeas/extratos e o controle (n= 30; Qui-Quadrado, $P \leq 0,05$) (T 22±3ºC; UR 70±10%; fotoperíodo de 14:10h)

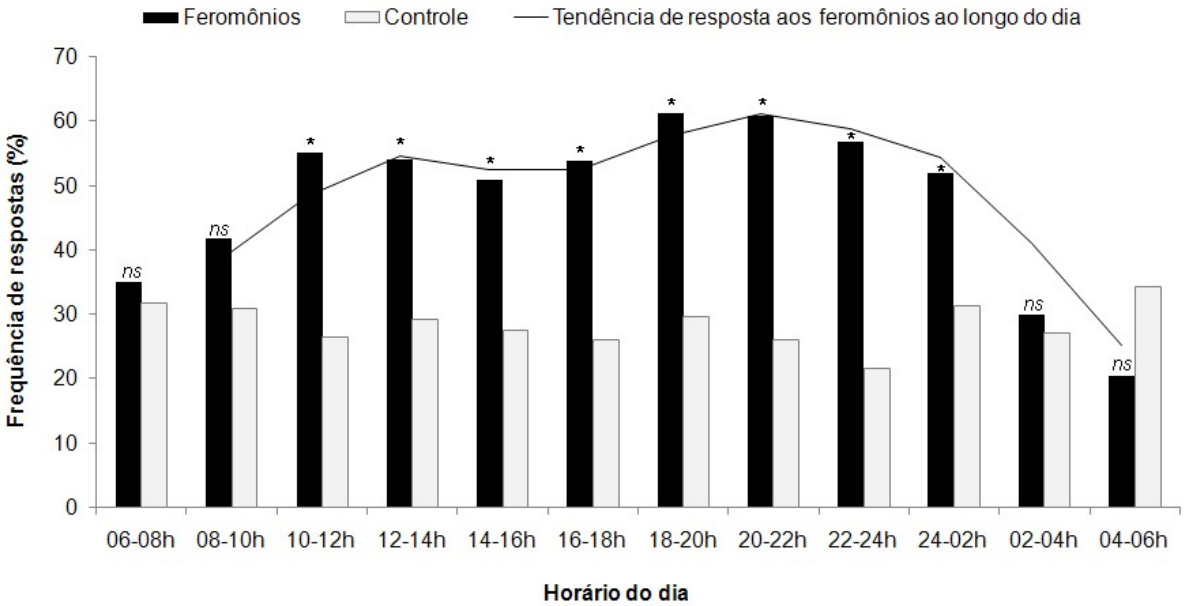

Figura 3.3 - Frequência de respostas de machos de *Diabrotica speciosa* aos extratos de fêmeas ao longo do dia, em olfatômetro do tipo 'Y'. (*) Indica diferença significativa entre os extratos e o controle (n=40; Qui-Quadrado, $P \leq 0,05$) (T 22±3ºC; UR 70±10%; fotoperíodo de 14:10h)

Extratos de fêmeas com 3-5 e 6-15 dias proporcionaram respostas eletroantenográficas de machos em GC-EAG (Figura 3.4). Por outro lado, as antenas não mostraram sensibilidade aos extratos de fêmeas com menos de 0-2 dias de idade. Foram caracterizadas respostas eletroantenográficas para seis componentes presentes nos extratos ativos, sendo que quatro dessas respostas mostraram-se mais intensas (Figura 3.4).

Os perfis cromatográficos dos extratos naturais de *D. speciosa* demonstraram que as fêmeas produzem seis compostos químicos distintos daqueles produzidos pelos machos (Figura 3.5). Dentre esses compostos, observa-se a existência de um majoritário (Figura 3.5, composto 'e') e outros cinco minoritários (Figura 3.5, compostos 'a', 'b', 'c', 'd', 'f').

Pelo índice de Kovats (IK) confirmou-se que os compostos presentes unicamente nos extratos de fêmeas em GC-MS são os mesmos componentes que proporcionaram as respostas eletroantenográficas de machos em GC-EAG.

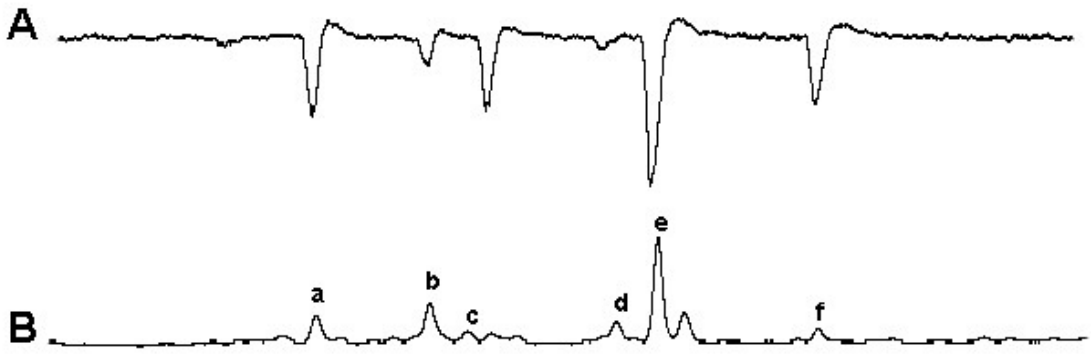

Figura 3.4 - (A) Respostas eletroantenográficas de machos de *Diabrotica speciosa* aos compostos químicos presentes nos extratos das fêmeas com 3-5 e 6-15 dias de idade; (B) cromatograma dos extratos naturais de fêmeas com 3-5 e 6-15 dias de idade

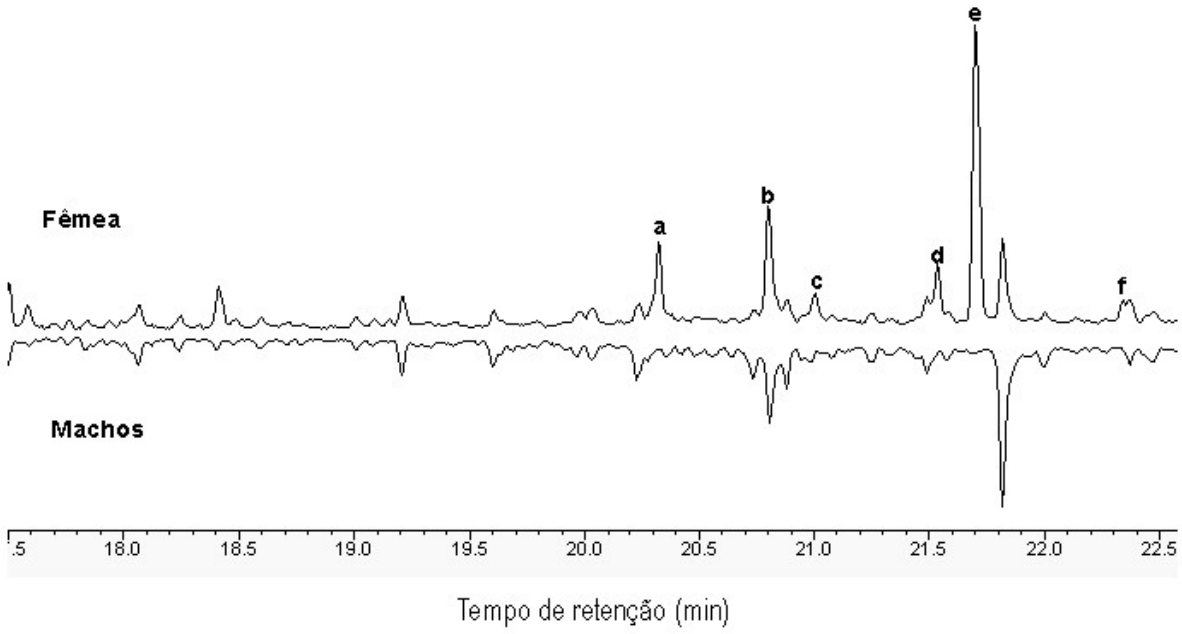

Figura 3.5 – Cromatogramas obtidos pela injeção, em cromatógrafo a gás, dos extratos naturais de machos e fêmeas de *Diabrotica speciosa*. Letras indicam compostos presentes unicamente nos extratos de fêmeas

3.4 Discussão

No presente estudo, observou-se que fêmeas de *D. speciosa* emitem compostos químicos atrativos aos machos a partir do terceiro dia após emergência. Em condições de laboratório, fêmeas de 0 a 2 dias de idade e seus respectivos extratos não proporcionaram a atração de machos, indicando que estas não emitem atraentes sexuais nesse período. Esses resultados coincidem com as observações comportamentais realizadas por Nardi et al.[3] (dados não publicados), de que a primeira cópula em casais de *D. speciosa* ocorre somente a partir do terceiro dia de idade. A análise dos extratos naturais em GC-EAG confirmou os resultados obtidos nos bioensaios de olfatometria, sendo que apenas os extratos de fêmeas com mais de três dias estimularam os receptores presentes nas antenas de machos de *D. speciosa*. A partir da análise dos perfis cromatográficos, pode-se verificar que os extratos de fêmeas são constituídos de seis componentes distintos daqueles presentes nos machos, sendo um majoritário e os demais minoritários. Considerando-se tais informações, é possível afirmar que as fêmeas dessa espécie alcançam a maturidade sexual a partir do terceiro dia de idade, quando são receptivas ao acasalamento e capazes de produzir feromônios atrativos aos coespecíficos do sexo oposto.

Embora neste trabalho as observações comportamentais tenham coincidido com as análises em GC-EAG, essas informações não corroboram os resultados obtidos por Ventura et al. (2001). Em bioensaios de campo, esses autores verificaram que fêmeas virgens de 0 a 72 horas foram mais atrativas aos machos quando comparadas com fêmeas mais velhas em armadilhas de campo. Sendo assim, são necessários estudos adicionais de campo que confirmem as observações comportamentais obtidas no laboratório e avaliem a atividade biológica dos extratos em campo.

O ritmo diário de resposta dos machos aos extratos naturais de fêmeas coincidiu com as observações comportamentais realizadas por Nardi et al.[3] (dados não publicados), sobre o ritmo de cópulas ao longo do dia. Tais pesquisas indicam que os machos de *D. speciosa* podem responder aos feromônios durante todo o dia, embora

---

[3] NARDI, C.; LUVIZOTTO, R.A.G.; PARRA, J.R.P.; BENTO, J.M.S. **Comportamento sexual de Diabrotica speciosa (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae).**

com menor intensidade no final da tarde e início da noite. Do mesmo modo, a atividade sexual em casais dessa espécie apresentou o mesmo ritmo de ocorrência. De acordo com Rosén, Han; Löfstedt (2003), as respostas aos feromônios em insetos podem depender, em maior grau, do ritmo diário de locomoção dos insetos, do que da sensibilidade dos receptores a tais componentes. Além disso, na presença do organismo emissor, é o ritmo circadiano de liberação desses componentes que determina o ciclo de respostas do organismo receptor (BAKER; CARDÉ, 1979; HAYNES; BIRCH, 1984). Para *D. speciosa*, Nava et al. (2004), demonstraram que os adultos são mais ativos no final da fotofase e início da escotofase, o que pode explicar também a maior frequência de respostas aos feromônios nesse período. No presente estudo, verificou-se que, embora os machos tenham respondido aos feromônios durante a maioria dos horários do dia, a atividade de locomoção influenciou o número de respostas e o tempo despendido para as escolhas. No final da escotofase, por exemplo, foi observada uma alta frequência de não respostas dos machos (≈45%), provavelmente em razão da sua baixa atividade locomotora n esse período.

É importante considerar também que o ritmo de respostas de machos é dependente do ritmo circadiano relacionado a produção dos feromônios pelas fêmeas, fator que não foi abordado no presente estudo. Entretanto, nos casos em que se utilizam liberadores de feromônios em campo, os machos recebem os estímulos constantemente e, se aptos a responder, são atraídos por eles. Sobre esse aspecto, Dobson; Teal (1986) estudaram o ritmo de respostas de machos aos feromônios sintéticos de *D. virgifera* em campo e concluíram que esses insetos podem responder aos compostos feromonais durante todo o dia. Além disso, esses autores verificaram que a temperatura pode influenciar expressivamente o comportamento de machos, sendo que o seu aumento pode significar uma menor captura. Com relação a *D. speciosa*, estudos adicionais em campo são necessários para caracterizar o ritmo de respostas de machos aos extratos de fêmeas, bem como a influencia dos fatores abióticos sobre a frequência de respostas.

Referências

ÁVILA, C.J.; TABAI, A.C.P.; PARRA, J.R.P. Comparação de técnicas para criação de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) em dietas natural e artificial. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 257-267, 2000.

BAKER, T.C.; CARDÉ, R.T. Endogenous and exogenous factors affecting periodicities of female calling and male sex pheromone response in *Grapholita molesta.* **Journal of Insect Physiology,** Oxford, v. 24, p. 889-892.

DOBSON, I.D.; TEAL, P.E.A. Field studies of the temporal re- sponse patterns of male *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte and *D. barberi* Smith and Lawrence to 8R-methyl-2R-decyl propanoate. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 11, n. 44, p. 405-410, 1986.

GUSS, P.L. The sex pheromone of the western corn rootworm (*Diabrotica* virgifera). **Environmental Entomology**, Lanhan, v. 5, p. 219-223, 1976.

HAMMACK, L. Calling behavior in female Western corn rootworm beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). **Annals of Entomological Society of America**, Gainesville, v. 88, n. 4, p. 562-569, 1995.

HAYNES, K.; BIRCH, M. The periodicity of pheromone release and male responsiveness in the artichoke plume moth. **Physiological Entomology,** Oxford, v. 9, p. 287-295, 1984

KRYSAN, J.L. Introduction: biology, distribution, and identification of pest *Diabrotica*. In: KRYSAN, J.L.; MILLER, T.A. **Methods for the study of pest *Diabrotica*.** New York: Springer-Verlag, 1986, p. 1-23.

LEW, *A.* C. BALL, H.J. The mating behavior of the. western corn rootworm *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Gainesville, v. 72, n. 3, p. 15-15, 1979.

LINN, C.E.; CAMPBEL, M.G.; POOLE, K.R.; WU, W.Q.; ROELOFS, W. Effects of photoperiod on the circadian timing of pheromone response of *Trichoplusia ni*: relationship to the modulatory action of octopamine. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 42, p. 881-891, 1996.

MILANEZ, J.M. **Técnicas de criação e bioecologia de *Diabrotica speciosa* (Germar), 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae).** 1995. 102p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.

MILLAR, J.G.; HAYNES, K.F. **Methods in chemical ecology**. New York: Chapman & Hall. Mead, R. 1998. 420p.

NAVA, D.E.; ÁVILA, C.J.; PARRA, J.R.P. Atividade diurna de adultos de *Diabrotica speciosa* na cultura do milho e de *Cerotoma arcuatus* na cultura da soja. 2004. 23p. (Documento Técnico Embrapa, 64.)

ROSÉN, W.Q.; HAN, G.B.; LÖFSTEDT, C. The circadian rhythm of the sex-pheromone-mediated behavioral response in the Turnip Moth, Agrotis segetum, is not controlled at the peripheral level. **Journal of Biological Rhythms**, New York, v. 18, p. 402-408, 2003.

SPENCER, J.L.; HIBBARD, B.E.; MOESER, J.; ONSTAD, D.W. Behaviour and ecology of the western corn rootworm *(Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). **Agricultural and Forest Entomology**, Washington, v. 11, p. 9-27, 2009.

VENTURA, M.U.; MELLO, P.P.; OLIVEIRA, A.R.M.; SIMONELLI, F.; MARQUES, F.A.; ZARBIN, P.H.G. Males are attracted by females traps: a new perspective for management of *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) using sexual pheromone. **Neotropical Entomology,** Londrina, *v.* 30, p. 361-364, 2001.

ZARBIN, P.H.G.; FERREIRA, J.T.B.; LEAL, W.S. Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrutural de feromônios de insetos. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 2, 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40421999000200018&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 6 abr. 2009.

ZHUKOVSKAYA, M.I. Circadian rhythm of sex pheromone perception in the male American cockroach, *Periplaneta americana* L. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, 41, p. 941-946, 1995.

4 FEROMÔNIO SEXUAL DE CONTATO EM *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae): EVIDÊNCIAS COMPORTAMENTAIS

Resumo

Para avaliar a hipótese da ocorrência de um feromônio sexual de contato em *Diabrotica speciosa*, investigou-se a atividade biológica de machos aos extratos naturais de compostos cuticulares de outros machos e fêmeas virgens (1 dia) e fêmeas maduras sexualmente (6 dias) nas doses de 1, 2 e 3 equivalentes-insetos em diferentes solventes (acetona, hexano, clorofórmio e diclorometano). Além disso, a atividade biológica do feromônio de atração sexual foi comparada com a dos compostos cuticulares. A acetona foi o solvente que proporcionou as maiores frequências de respostas. Os machos de *D. speciosa* apresentaram comportamento típico de corte quando em contato com os extratos de fêmeas, o que não ocorreu para os extratos de outros machos. Embora extratos de fêmeas imaturas tenham estimulado alguns machos a copular, a frequência de respostas foi baixa e não diferiu do controle. Para os extratos de fêmeas maduras, as doses mais eficientes em estimular tentativas de cópula foram as de 2 e 3 equivalentes-fêmeas, que também proporcionaram maior tempo de permanência, em relação ao extrato de 1 equivalente-fêmea. O feromônio de atração sexual não apresentou ação de contato quando aplicado isoladamente. O perfil cromatográfico dos compostos cuticulares demonstrou a presença de componentes distintos em machos e fêmeas. O presente estudo demonstra que fêmeas de *D. speciosa* produzem, além de um feromônio de atração sexual volátil compostos cuticulares que atuam como feromônio sexual de contato.

Palavras chave: Compostos cuticulares; comportamento sexual; comportamento de corte; comunicação química

Abstract

To evaluate the hypothesis that a contact sexual pheromone occurs in *D. speciosa*, we investigated male biological activity towards natural extracts of cuticular compounds from other males and virgin females (1 day old) and sexually mature females (6 days old) at doses of 1, 2 and 3 insect equivalents in different solvents (ketone, hexane, chloroform and dichloromethane). Moreover, biological activity of the sexual pheromone was compared with cuticular compounds. The ketone was the solvent that provided higher response frequencies. *D. speciosa* males displayed a typical behavior of courtship when in contact with female extracts what it did not occur when male extracts were tested. Although immature-female extracts stimulated some males to mate, the frequency of responses was low and it did not differ from control. In regard to mature-female extracts, doses that were more efficient in stimulating mate attempts were 2 and 3 female equivalents, what also provided higher time spent in relation to 1- female-

equivalent extract. Sexual pheromone did not show contact action when isolated applied. The chromatographic profile of cuticular compounds demonstrated the presence of distinct compounds in males and females. The current study reveals that *D. speciosa* females produce, besides a volatile pheromone for sexual attraction, cuticular compounds that act as contact sexual pheromone.

Keywords: Cuticular compounds; mating behavior; courtship; chemical communication

4.1 Introdução

Os compostos cuticulares produzidos por insetos incluem os lipídeos, ésteres, triglicerídeos, hidrocarbonetos, entre outros (WAKU, FOLDI, 1984), os quais podem agir na comunicação inter e intra-específica, na defesa contra inimigos naturais, nas interações entre castas e no reconhecimento sexual (SINGER, 1998; MANT et al., 2005, HOWARD et al., 2005). Como feromônios sexuais, os compostos cuticulares são explorados por receptores táteis e gustativos e, sendo pouco voláteis, agem apenas em curtas distâncias após a aproximação dos parceiros (BIRCH, 1974).

Em Coleoptera, os feromônios sexuais de contato são principalmente encontrados nas espécies de Cerambycidae (ZHANG et al., 2003), Curculionidae (LAPOINTE; HUNTER; ALESSANDRO, 2004; MUTIS et al., 2009) e Bruchidae (NOJIMA et al., 2007). Em Chrysomelidae, a ação feromonal desses compostos foi demonstrada para *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (JERMY; BUTT, 1991; OTTO, 1997); *Gastrophysa atrocyanea* Motschulsky (SUGENO; HORI; MATSUDA, 2006), *Chrysochus cobaltinus* LeConte (PETERSON et al., 2007) e *Phaedon cochleariae* (Fabricius) (GEISELHARDT; OTTE; HILKER, 2009). Machos dessas espécies friccionavam palpos e pernas sobre o corpo de fêmeas como forma de reconhecimento sexual e, uma vez em contato com os feromônios secretados por elas, são estimulados a iniciar a cópula.

Para *Diabrotica* Chevrolat, os compostos cuticulares foram identificados para algumas espécies, embora sua ação sobre a comunicação química não tenha sido explorada (GOLDEN, MEINKE, STANLEY-SAMUELSON, 1992). Para essas espécies, os estudos em ecologia química abordam, principalmente, os feromônios de atração sexual, que agem em longas distâncias e são liberados por meio de membranas intersegmentais, providas de células epiteliais secretoras e localizadas no abdome (LEW; BALL, 1979; SPENCER et al., 2009).

Para *Diabrotica speciosa* (Germar), observações comportamentais demonstraram que, uma vez em posição de cópula, os machos friccionam repetidamente os palpos sobre os élitros das fêmeas antes de introduzir o edeago (NARDI et al.[4], dados não

---

[4] NARDI, C.; LUVIZOTTO, R.A.G.; PARRA, J.R.P.; BENTO, J.M.S. **Comportamento sexual de Diabrotica speciosa (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae).**

publicados). Considerando-se que, para outras espécies, essa atividade está relacionada a presença de feromônios sexuais de contato, sugere-se a hipótese de que os compostos cuticulares de fêmeas também apresentem atividade feromonal em *D. speciosa*. Neste trabalho, investigou-se a ação dos compostos cuticulares de fêmeas sobre o comportamento sexual de machos de *D. speciosa.*

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Criação dos insetos

Os adultos de *D. speciosa* foram obtidos a partir de criação em laboratório, baseada na metodologia de Milanez (1995) e Ávila; Tabai; Parra (2000). As larvas foram alimentadas com raízes de milho *Zea mays* L. ('Suwan') e mantidas em recipientes plásticos contendo vermiculita umedecida até a emergência de adultos. Estes foram coletados, separados por sexo e mantidos, isoladamente, em gaiolas contendo folhas de feijoeiro *Phaseolus vulgaris* (L.) ('Carioca') até atingirem a idade adequada para a obtenção dos extratos ou para a realização dos bioensaios. A criação de *D. speciosa* e os bioensaios foram realizados em salas climatizadas com temperatura de 22±3ºC e umidade relativa de 70±10%. As observações comportamentais foram realizadas sob luz artificial indireta fornecida por uma lâmpada de diodo emissor de luz forrada com plástico vermelho (Supergel Rosco®, 4% transparência).

4.2.2 Extração dos compostos cuticulares

A fim de caracterizar a existência de um feromônio de contato em *D. speciosa* e avaliar a atividade biológica dos compostos cuticulares, foram preparados extratos de acetona (Synth, 100% p.a.), dlorofórmio (Synth, 100% p.a.), diclorometano (Sigma-Aldrich, 99,9% p.a.) e hexano (Merck, 100% p.a.). Os compostos cuticulares de *D. speciosa* foram obtidos pela excisão dos élitros de 50 indivíduos, os quais foram inseridos em frascos de vidro contendo 1mL de solvente e mantidos sob refrigeração (-

10°C) durante 24 horas (Figura 4.1). Após esse período a fração líquida foi separada e concentrada para 500 µL, utilizando-se gás nitrogênio em fluxo baixo (<0,1L/min). Cada extrato foi mantido sob refrigeração (-10 °C).

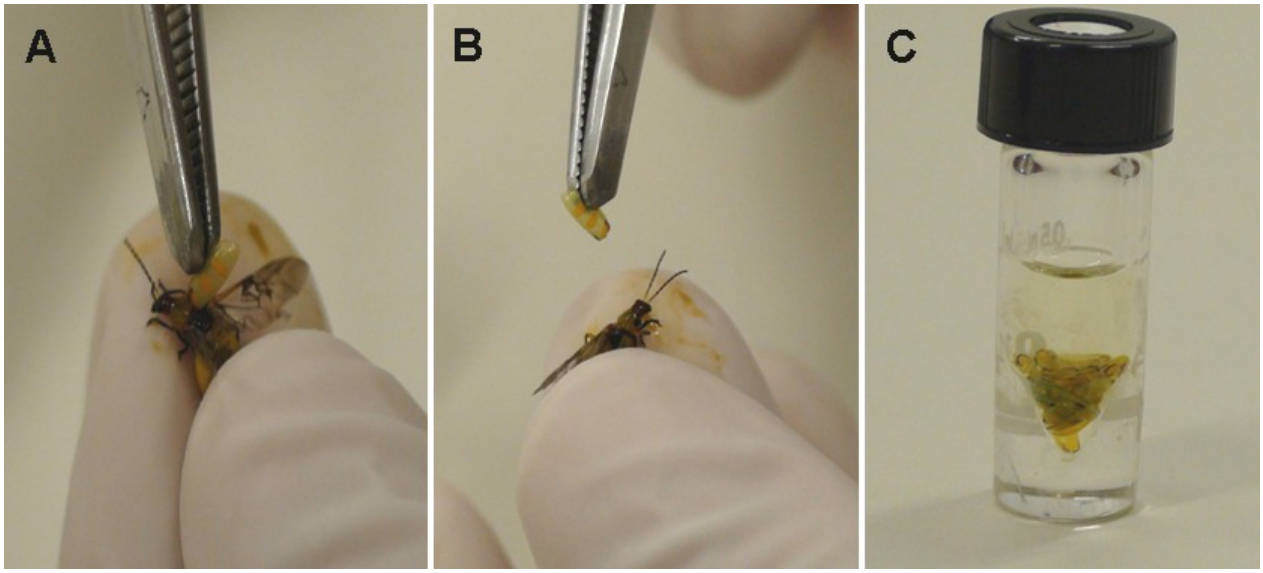

Figura 4.1 - Preparo de extratos dos compostos cuticulares de fêmeas de *Diabrotica speciosa* a partir dos élitros. (A-B) Excisão dos élitros; (C) élitros de fêmeas mantidos em frascos com solvente durante 24 horas a -10°C

4.2.3 Extração dos feromônios de atração sexual

A coleta dos feromônios de atração sexual de *D. speciosa* foi realizada por aeração (MILLAR; HAYNES, 1998; ZARBIN et al., 1999), utilizando-se câmaras horizontais de vidro (20 cm comprimento x 7 cm diâmetro) com aberturas laterais para a entrada e saída de ar. No interior de cada câmara foram mantidas, pelo menos, 30 fêmeas de *D. speciosa* com 6 a 15 dias de idade, submetidas a um fluxo de ar de 1 L/min. Na outra extremidade da câmara, foi conectada uma coluna de vidro (7,5 x 0,5 cm) contendo 0,150g de polímero adsorvente (Super Q® 80/100 Mesh, Alltech Assoc., IL, USA). O fluxo de ar no interior da câmara foi gerado por uma bomba de vácuo e regulado por fluxômetros, sendo que todas as conexões foram montadas com mangueiras de Teflon® PTFE. Após cada coleta, os tubos com adsorvente foram retirados e os voláteis nele contidos foram eluídos com 2 mL de hexano. As amostras

foram concentradas utilizando-se N_2 gasoso e mantidas em frascos vedados em temperatura de -10°C para utilização nos bioensaios.

4.2.4 Bioensaios comportamentais

Nos bioensaios comportamentais, utilizaram-se bastões de vidro (4 mm diâmetro x 30 cm comprimento), cujas extremidades foram banhadas com uma amostra líquida dos extratos a serem testados, conforme a metodologia descrita por Jermy; Butt (1991). Esses bastões foram inseridos, individualmente, em gaiolas contendo 50 machos virgens de 6-15 dias após emergência, os quais possuíam livre acesso aos tratamentos (Figura 4.2).

Inicialmente, foram realizados bioensaios para caracterizar a atividade biológica de extratos obtidos com acetona, clorofórmio, hexano ou diclorometano, aplicando-se 2 equivalentes-fêmeas do extrato em cada bastão. Assim, o solvente que proporcionou o maior número de respostas foi utilizado para os estudos subsequentes. Após, foram realizados bioensaios para caracterizar o efeito da idade, do sexo e da concentração dos extratos sobre as respostas comportamentais de machos. Para tanto, avaliou-se a ação dos compostos de machos e fêmeas, imaturos e maduros sexualmente, com 1 e 6 dias após emergência, respectivamente, nas doses de 1, 2 e 3 equivalentes-insetos.

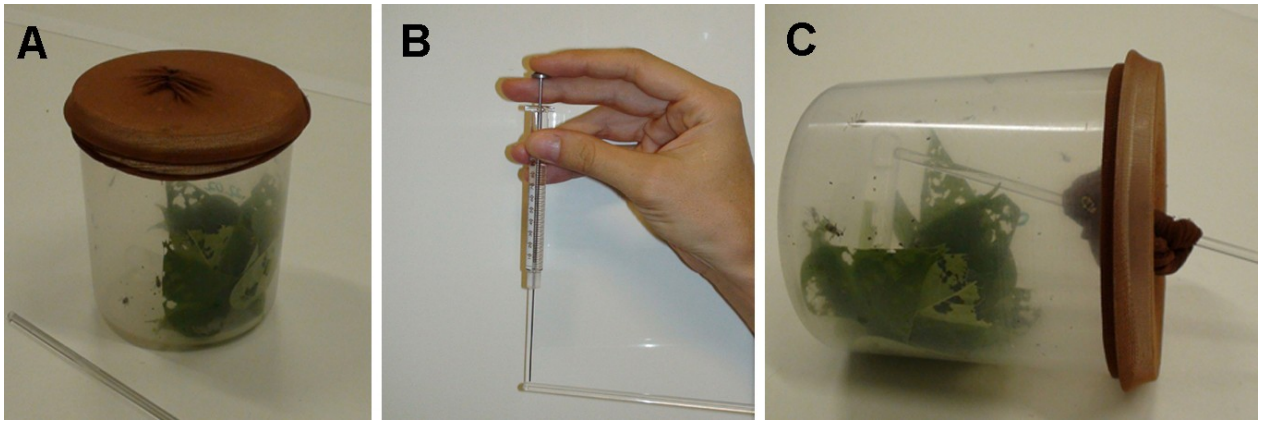

Figura 4.2 - Materiais utilizados para caracterizar a atividade biológica dos compostos cuticulares de *Diabrotica speciosa*. (A) gaiola onde permaneceram 50 machos de 6-15 dias; (B) aplicação dos extratos sobre o bastão de vidro (4 mm); (C) gaiola com o bastão contendo os extratos

Considerando-se que as fêmeas de *D. speciosa* produzem feromônios de atração sexual que agem em longas distâncias, buscou-se investigar se esses compostos também possuem ação de contato e influenciam o comportamento de machos durante a corte. Para isso, foram utilizados extratos contendo 2 equivalentes-fêmeas do feromônio de atração sexual, avaliando-se a sua ação de contato quando aplicado isoladamente ou em combinação com os compostos cuticulares.

Avaliaram-se as respostas obtidas nos bioensaios comportamentais somente para machos que permaneceram por mais de 5 segundos sobre a extremidade dos bastões, sendo registrados os seguintes comportamentos: (i) a fricção dos palpos e pernas sobre a superfície do bastão; (ii) a exposição do edeago; e (iii) o tempo total (segundos) de permanência sobre o bastão (exploração).

A resposta positiva foi caracterizada para machos que apresentaram comportamentos de corte, expondo o edeago e realizando tentativas de cópula. Por outro lado, considerou-se uma resposta negativa aquela cujos machos não tentaram copular com os bastões, mesmo após permanecer em contato com os extratos por mais de cinco segundos. Para cada tratamento foram registrados os comportamentos de 40 indivíduos.

4.2.5 Análise química dos extratos

A fim de caracterizar as diferenças entre os compostos cuticulares de machos e fêmeas, injetou-se uma alíquota de 1 µl de cada extrato (10 equivalentes-insetos) em um cromatógrafo a gás (Shimadzu GC 17A) contendo uma coluna capilar DB-5 (J&W Scientific, Folson, Califórnia; 30m x 0.25mm x 0.25µm). O equipamento foi programado para uma temperatura inicial de 50°C por 1 minuto com aumento de 7°C por minuto até uma temperatura final de 250°C, mantida por 10 minutos.

4.2.6 Análise estatística

As respostas de machos de *D. speciosa* aos extratos dos compostos cuticulares foram analisadas pelo teste de Qui-quadrado ($P \leq 0,05$), testando-se a homogeneidade

das proporções de respostas positivas e negativas. Para proporções não homogêneas, foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Marascuillo ($P \leq 0,05$) (MARASCUILLO, 1966; NIST/SEMATECH, 2002). Os dados referentes ao tempo de permanência dos machos sobre os bastões contendo os estímulos foram avaliados pelo teste de Kruskal Wallis ($P \leq 0,05$).

4.3 Resultados

Os compostos cuticulares de fêmea apresentaram atividade biológica, induzindo os machos a expor o edeago e realizar tentativas de cópula com os bastões contendo os extratos. Após o primeiro contato com os compostos, os machos apresentaram comportamentos típicos de corte, explorando a região impregnada com os extratos pela fricção dos palpos e pernas (Figura 4.3). Primeiramente, os machos mostravam-se agitados e, após a exploração, iniciavam a tentativa de cópula, expondo o edeago em movimentos bruscos e fixando-se ao bastão com as pernas anteriores e medianas.

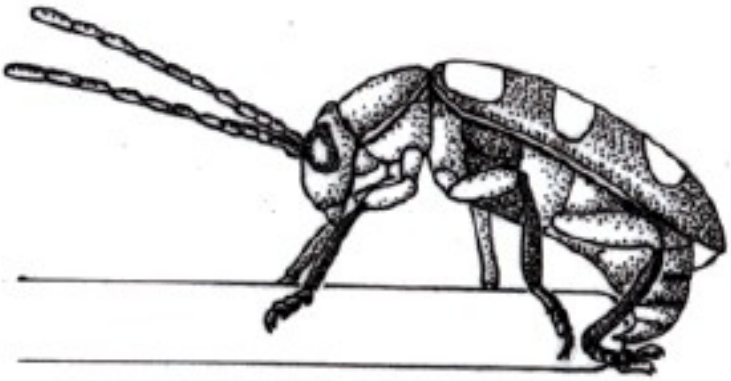

Figura 4.3 - Macho de *Diabrotica speciosa* expondo o edeago em resposta ao estímulo dos compostos cuticulares de fêmeas aplicados sobre um bastão de vidro

O tipo de solvente utilizado para o preparo dos extratos influenciou a resposta dos machos de *D. speciosa* (Figura 4.4A, B). A exposição do edeago e as tentativas de cópula foram mais frequentes quando os machos entraram em contato com os extratos de acetona e hexano (Figura 4.4A). Por outro lado, os extratos de clorofórmio e

diclorometano proporcionaram baixa frequência de respostas (<10%), sendo pouco efetivos em estimular os machos a copular.

Uma vez em contato com os extratos, os machos exploravam a superfície impregnada e podiam realizar uma ou várias tentativas de cópula. Essas atividades determinavam o tempo de permanência sobre o estímulo, o qual se mostrou superior quando utilizados os extratos de acetona (Figura 4.4B). Considerando-se a maior frequência de respostas, bem como o maior tempo de permanência de machos sobre os extratos de acetona, esse solvente foi utilizado para a realização dos bioensaios subsequentes.

Machos de *D. speciosa* foram capazes de discriminar entre os extratos de seus coespecíficos do mesmo sexo e do sexo oposto, realizando tentativas de cópulas apenas quando submetidos aos extratos de fêmeas e despendendo mais tempo quando em contato com tais tratamentos (Figuras 4.5; 4.6).

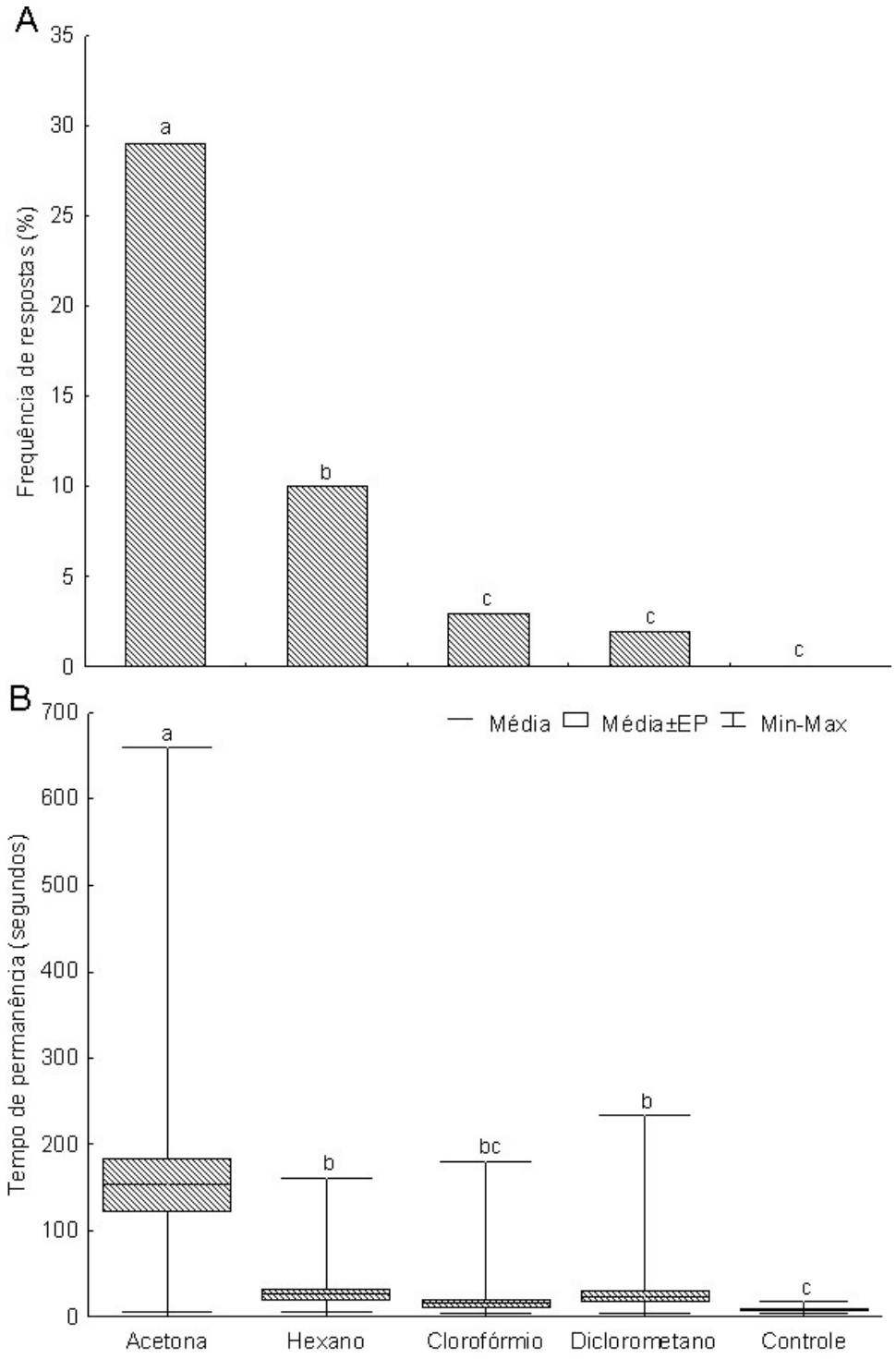

Figura 4.4 - Respostas de machos de *Diabrotica speciosa* aos extratos de compostos cuticulares de fêmeas obtidos com acetona, hexano, clorofórmio, diclorometano e controle (bastão). (A) Frequência de machos que realizaram tentativas de cópula em cada tratamento (n=40, Marascuillo, $P \leq 0,05$); (B) tempo de permanência de machos sobre bastões de vidro contendo cada tratamento (n=40, Kruskal-Wallis, $P \leq 0,05$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos. (T 22±3ºC; UR 70±10%; fotoperíodo de 14:10h)

A idade dos adultos e a concentração dos extratos influenciaram as respostas dos machos, sendo que os extratos de fêmeas maduras (6 dias) na dose de 2 e 3 equivalentes-insetos foram os mais eficientes em induzir a exposição do edeago e a estimular as tentativas de cópula (Figura 4.5). Embora os extratos de fêmeas imaturas tenham estimulado alguns machos a realizar comportamentos de corte, a frequência de tais respostas foi baixa e não diferiu do controle nas três doses utilizadas

Do mesmo modo, o tempo de exploração foi superior para extratos de fêmeas maduras, quando oferecidos nas doses de 2 e 3 equivalentes-insetos. Para todas as doses utilizadas, o tempo de permanência dos machos sobre os extratos de fêmeas imaturas, machos imaturos e machos maduros não diferiram do controle (Figura 4.6).

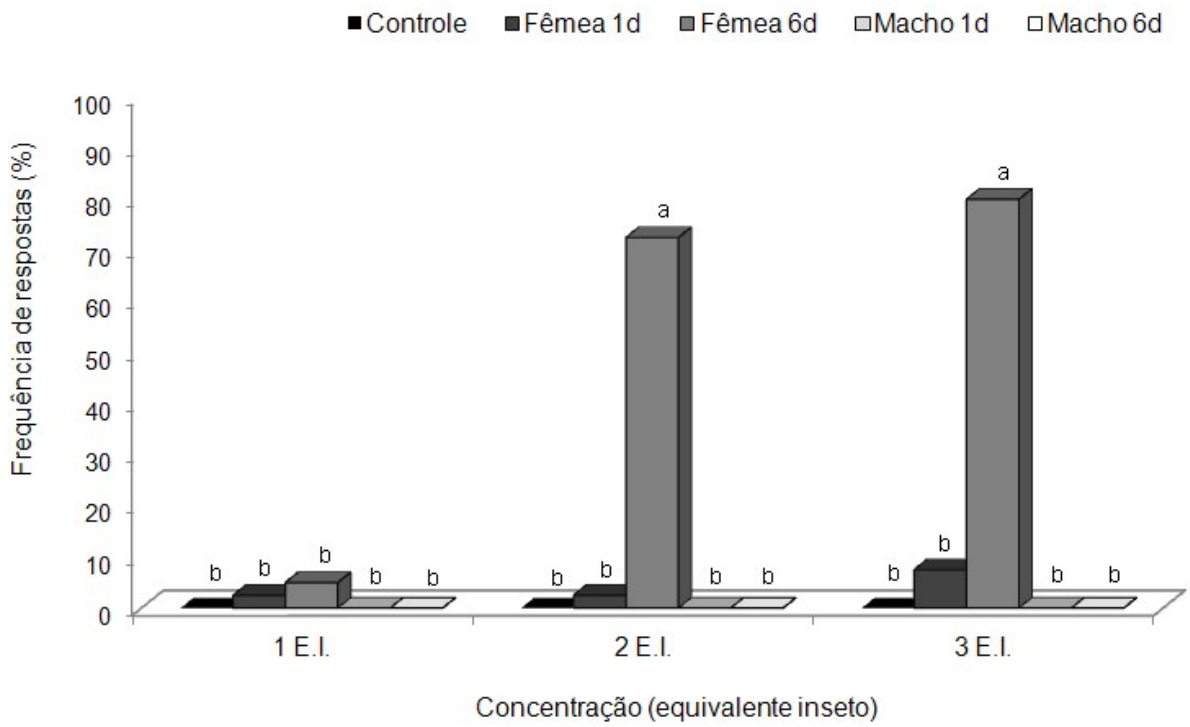

Figura 4.5 - Frequência de machos que realizaram tentativas de cópula quando submetidos a 1, 2 e 3 equivalentes-insetos (E.I.) do extrato de fêmeas recém emergidas (1 dia), de fêmeas maduras (6 dias), de machos recém emergidos (1 dia), de machos maduros (6 dias) ou controle (acetona). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada concentração (n=40; Marascuillo $P \leq 0,05$) (T 22±3ºC; UR 70±10%; fotoperíodo de 14:10h)

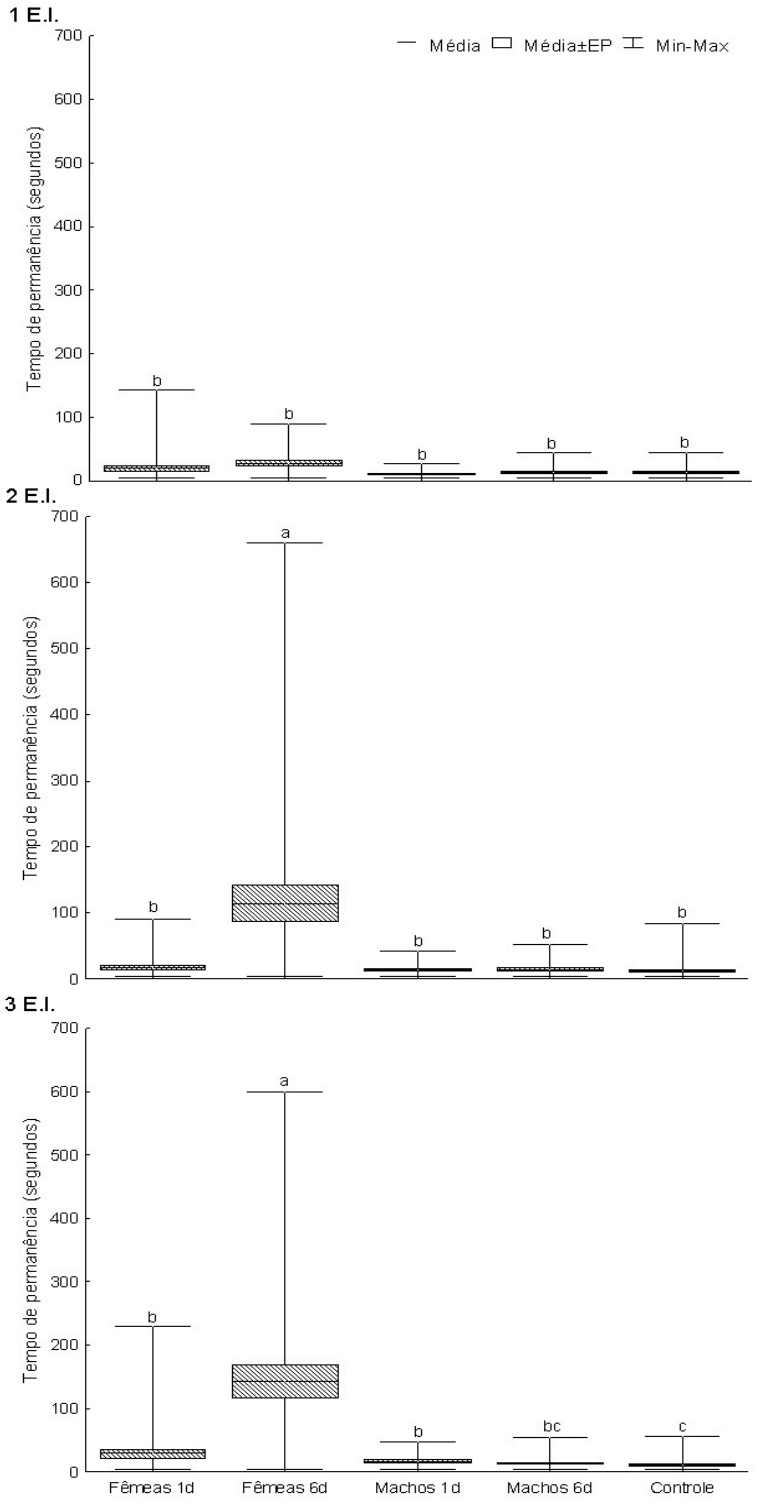

Figura 4.6 - Tempo de permanência de machos de *Diabrotica speciosa* sobre os bastões contendo extratos dos compostos cuticulares de fêmeas recém emergidas (1 dia), de fêmeas maduras (6 dias), de machos recém emergidos (1 dia), de machos maduros (6 dias) e controle (acetona), oferecidos nas doses de 1, 2 e 3 equivalentes-insetos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos (n=40, Kruskal Wallis; $P \leq 0,05$) (T 22±3ºC; UR 70±10%; fotoperíodo de 14:10h)

O feromônio de atração sexual não apresentou atividade biológica em curtas distâncias, quando aplicado isoladamente (Figura 4.7), sendo que o tempo despendido pelos machos para explorar esses compostos foi inferior aquele destinado aos compostos cuticulares (Figura 4.8). Embora tenha sido observado um pequeno incremento na frequência de respostas dos machos quando oferecida uma combinação de ambos os extratos, esse incremento não foi significativo, quando comparado com as respostas proporcionadas pelos compostos cuticulares isolados (Figura 4.8).

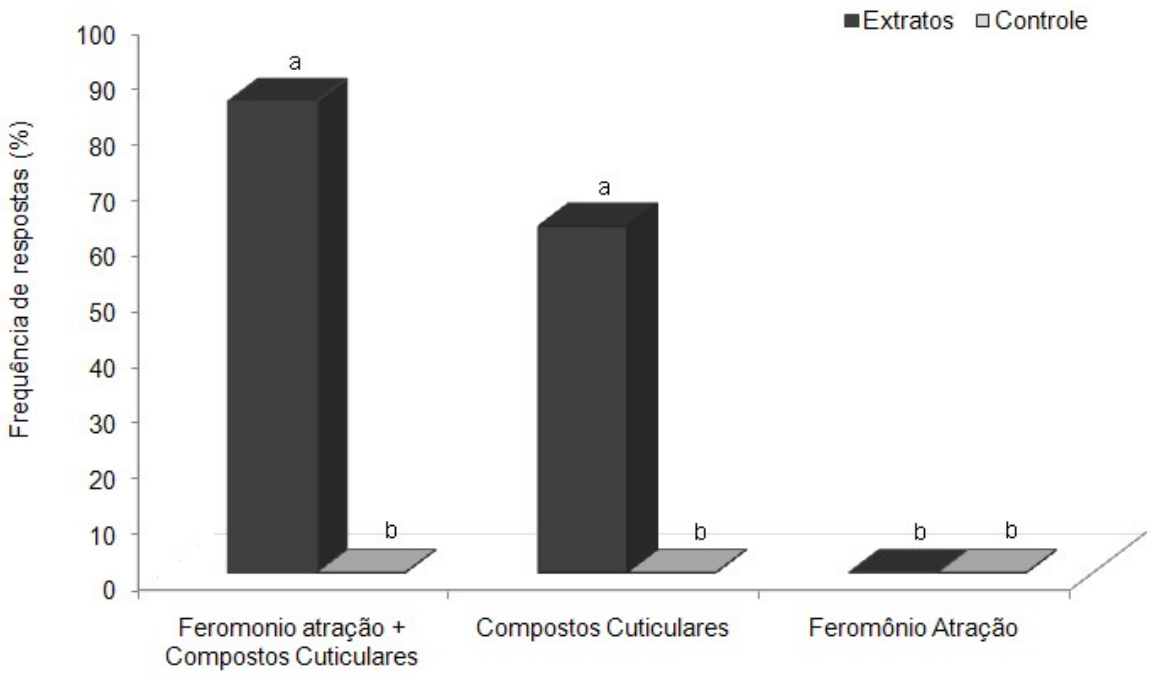

Figura 4.7 - Frequência de machos de *Diabrotica speciosa* que realizaram tentativas de cópula com bastões de vidro contendo extratos de feromônios de atração, de compostos cuticulares e de feromônios de atração + compostos cuticulares produzidos por fêmeas Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos (n=40; Marascuillo, $P \leq 0,05$) (T 22±3ºC; UR 70±10%; fotoperíodo de 14:10h)

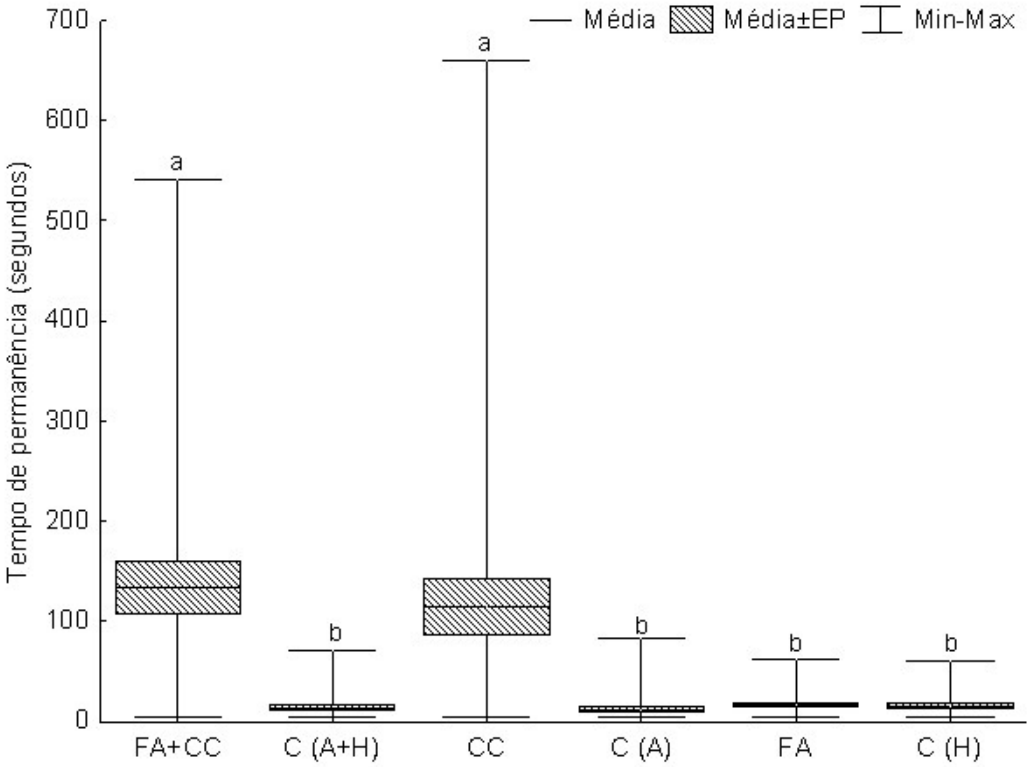

Figura 4.8 - Tempo de permanência de machos de *Diabrotica speciosa* sobre os bastões contendo extratos dos compostos cuticulares de fêmeas recém emergidas (1 dia), de fêmeas maduras (6 dias), de machos recém emergidos (1 dia), de machos maduros (6 dias) e controle (acetona). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos (n=40, Kruskal Wallis; $P \leq 0,05$) (T 22±3ºC; UR 70±10%; fotoperíodo de 14:10h)

A análise química indicou diferenças expressivas entre os componentes presentes em extratos de machos e fêmeas de *D. speciosa* (Figura 4.9). Extratos de fêmeas demonstraram a presença de três substâncias distintas daquelas presentes nos seus coespecíficos do sexo oposto. Por outro lado, seis substâncias foram verificadas unicamente nos machos, aparentemente em maiores quantidades em relação àquelas verificadas nos extratos de fêmeas.

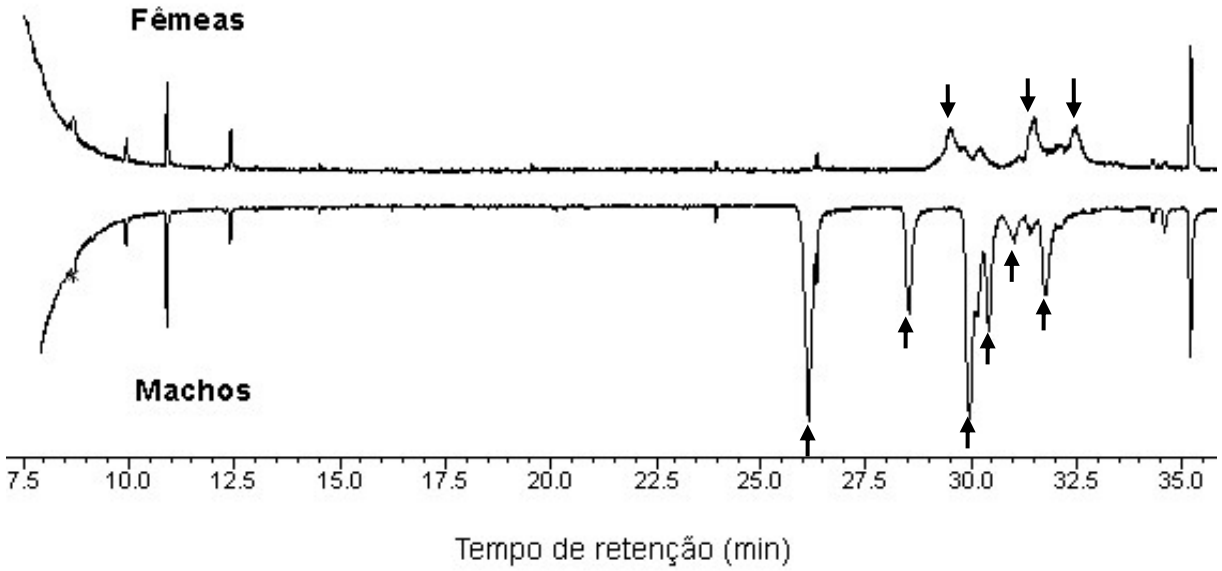

Figura 4.9 - Análise cromatográfica dos compostos cuticulares de machos e fêmeas de *Diabrotica speciosa*. Setas indicam compostos distintos presentes nos extratos de machos e fêmeas

4.4 Discussão

Machos de *D. speciosa* apresentaram comportamentos típicos de corte quando entraram em contato com os compostos cuticulares de fêmeas, sendo que a sequência de atividades coincidiu com aquela descrita para machos em contato com fêmeas vivas (NARDI et al.[5], dados não publicados). Em ambas as situações, os machos mostraram-se agitados, realizando movimentos bruscos e friccionando os palpos e pernas anteriores sobre a área contendo os estímulos sexuais. Esse tipo de comportamento durante a corte tem sido verificado para espécies de Curculionidae (LAPOINTE; HUNTER; ALESSANDRO; 2004), Cerambycidae (ZHANG et al., 2003; IBEAS et al., 2008; 2009), Buprestidae (LELITO et al., 2009) e Chrysomelidae (JERMY; BUTT, 1991; OTTO, 1997). Considerando-se que os compostos cuticulares possuem baixa volatilidade e são reconhecidos em curtas distâncias, o uso das antenas, palpos e pernas para o contato com as fêmeas sugere a presença de quimioreceptores nessas estruturas. Embora nenhum estudo tenha sido realizado para elucidar essa questão,

[5] NARDI, C.; LUVIZOTTO, R.A.G.; PARRA, J.R.P.; BENTO, J.M.S. **Comportamento sexual de Diabrotica speciosa (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae).**

Lelito et al. (2009) comentaram que as antenas de machos de *Agrilus planipennis* Fairmaire (Coleoptera: Buprestidae) parecem possuir sensilas específicas para o reconhecimento dos feromônios sexuais de contato. Do mesmo modo, o contato repetido dos tarsos de *A. planipennis* com os élitros das fêmeas indica que essa estrutura também esteja envolvida na recepção dos estímulos químicos de contato.

Para *D. speciosa*, as antenas parecem não influenciar o reconhecimento dos compostos cuticulares. Embora os machos movimentem vigorosamente essas estruturas durante a pré-cópula, não foi observada a exploração dos extratos diretamente pelo contato. Por outro lado, os palpos e pernas anteriores parecem exercer um papel importante durante a corte, pois os machos as friccionam repetidamente sobre os élitros das fêmeas, ou sobre os extratos dos feromônios sexuais de contato.

A resposta diferencial de machos aos extratos de fêmeas com idades distintas sugere que a maturação sexual influencie a produção desses compostos, uma vez que fêmeas com 6 dias de idade foram mais efetivas em estimular a resposta de machos. De acordo com Nardi et al.[6] (dados não publicados), casais de *D. speciosa* com idade inferior a 3 dias não apresentam atividade de cópula. No presente estudo, mesmo que as respostas dos machos aos extratos de fêmeas imaturas tenham sido baixas, elas demonstraram a presença de um estímulo químico nas fêmeas com essa idade. No entanto, considerando-se que tais respostas foram menos frequentes do que as verificadas para fêmeas maduras, sugere-se que os compostos apresentem características qualitativas e/ou quantitativas distintas em fêmeas de diferentes idades. De acordo com Lapointe; Hunter; Alessandro (2004), o padrão de produção dos compostos cuticulares em *Diaprepes abbreviatus* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) também foi dependente da maturidade sexual dos adultos. Nesses insetos, embora as aberturas glandulares tenham sido evidenciadas em fêmeas imaturas e maduras sexualmente, os autores demonstram que apenas insetos maduros produzem as secreções serosas pelos élitros.

---

[6] NARDI, C.; LUVIZOTTO, R.A.G.; PARRA, J.R.P.; BENTO, J.M.S. **Comportamento sexual de Diabrotica speciosa (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae).**

Embora a identificação química dos compostos cuticulares de *D. speciosa* não tenha sido realizada no presente trabalho, verificou-se que a extração com solvente possibilitou a caracterização das diferenças entre os extratos de machos e fêmeas. Assim como verificado para espécies de Cerambycidae (IBEAS et al., 2009) e Curculionidae (MUTIS et al., 2009), os machos de *D. speciosa*, aparentemente, apresentaram uma diversidade maior de compostos.

Considerando-se que as fêmeas de *D. speciosa* produzem um feromônio de atração sexual que age em longas distâncias, buscou-se testar a hipótese de que esses compostos estivessem exercendo uma ação de contato e influenciando as respostas de machos. Neste estudo, a extração dos compostos cuticulares foi realizada apenas dos élitros de fêmeas, o que garantiu a ausência dos feromônios de atração sexual nos extratos testados, uma vez que estes são emitidos por uma estrutura localizada nos últimos uroesternitos (LEW; BALL, 1979). Em bioensaios comportamentais utilizando feromônios de atração sexual em comparação com compostos cuticulares, confirmou-se que estes últimos são os únicos a estimular os machos a realizar atividades de corte. Um padrão semelhante de emissão de feromônios também ocorre para *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) e *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae), cujas fêmeas produzem compostos voláteis como feromônios de atração sexual e compostos cuticulares que agem somente após o contato com o parceiro (TANAKA et al., 1986; NOJIMA et al., 2007). Em *T. molitor*, Tanaka et al. (1986) demonstraram que, embora sejam voláteis, os feromônios de atração sexual incrementam as respostas dos machos, em curtas distâncias, quando combinados com os feromônios sexuais de contato. Provavelmente, esse incremento das respostas seja devido ao maior número de machos que, atraídos pelo feromônio de atração, teve acesso ao feromônio de contato. Para *D. speciosa*, embora a combinação do feromônio de atração e dos compostos cuticulares tenha aumentado, em cerca de 15%, as respostas de machos, esse incremento não apresentou-se significativo. Desse modo, o presente estudo demonstra, com evidências comportamentais, que os compostos cuticulares de fêmeas de *D. speciosa* agem como um feromônio sexual de contato e independem da ação dos feromônios de atração sexual.

O tempo de permanência dos machos sobre os bastões contendo os feromônios de contato demonstrou que estes estimulam os insetos a permanecer sobre os estímulos oferecidos. Considerando-se essa capacidade dos compostos cuticulares em reter os machos, é possível que esses componentes possam ser utilizados em armadilhas de captura. Embora não se conheça nenhum exemplo de utilização dos feromônios sexuais de contato em campo, estudos podem ser realizados para investigar se esses componentes podem ser associados a atraentes que agem em longas distâncias (ex. armadilhas atrai e mata) e, assim, incrementar a eficiência de captura destas.

Para algumas espécies de *Diabrotica*, os compostos cuticulares foram isolados e sua estrutura química identificada (GOLDEN; MEINKE; STANLEY-SAMUELSON, 1992). Entretanto, esses estudos foram realizados unicamente com o objetivo de caracterizar as diferenças específicas, sem mencionar a atividade biológica dos componentes. Para *Diabrotica* spp, a identificação dos compostos cuticulares pode esclarecer aspectos importantes sobre sua ecologia química. Considerando-se que o feromônio sexual propanoato de 8R-metil-2R-decenila promove a atração de machos de várias espécies do grupo *virgifera*, Spencer et al. (2009) comentam que outros fatores podem ser os responsáveis pelo isolamento reprodutivo dessas espécies. Do mesmo modo, Chuman et al. (1987) sugerem que o mesmo ocorre para as espécies do grupo *fucata*, cujo feromônio sexual é estruturalmente semelhante a 6,12-dimetilpentadecan-2-ona. Nesse sentido, estudos adicionais sobre os compostos cuticulares presentes em *Diabrotica* spp. podem ser realizados para caracterizar a sua relação com os mecanismos de isolamento reprodutivo em *Diabrotica*.

Referências

ÁVILA, C.J.; TABAI, A.C.P.; PARRA, J.R.P. Comparação de técnicas para criação de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) em dietas natural e artificial. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 257-267, 2000.

BIRCH, C. Aphrodisiac pheromones in insects. In:BIRCH,C. **Pheromones.** Amsterdan: North-Holland, 1974. p. 115-134.

CHUMAN, T.; GUSS, T.L.; .; DOOLITTLE, R.E.; MCLAUGHLIN, J.R; KRYSAN, J.L.; SCHALK, J.M.; TUMLINSON, J.H.; Identification of a female-produced sex pheromone from banded cucumber beetle, *Diabrotica balteata* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal Chemical Ecology**, New York, v. 13, p. 1601-1616, 1987.

GEISELHARDT, S.F.; OTTE, T.; HILKER, M. The role of cuticular hydrocarbons in male mating behavior of the mustard leaf beetle, *Phaedon cochleariae* (F.). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 35, p. 1162-1171, 2009.

GOLDEN*,* K.L.*;* MEINKE L. J.; STANLEY-SAMUELSON W. Cuticular hydrocarbon discrimination of Diabrotica (Coleoptera: Chrysomelidae) sibling species. **Annals of the Entomological Society of America**, Gainesville, v. 85, n. 5, p. 561-570, 1992.

HOWARD, R.W.; MCDANIEL, C.A.; NELSON, D.R.; BLOMQUIST, G.J.; GELBAUM, G.T.; ZALKOW, L.H. Cuticular hydrocarbons of *Reticulitermes virginicus* (Banks) and their role as potential species- and caste-recognition cues. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.8, p. 1227-1239, 2005.

IBEAS, F.; DÍEZ, J.J.; PAJARES, J.A. Olfactory sex attraction and mating behaviour in the pine sawyer *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae). **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 21, n. 3, p. 101-110, 2008.

IBEAS, F.; GEMENO, C.; DIÉZ, J.J.; PAJARES, J.A. Female recognition and sexual dimorphism of cuticular hydrocarbons in *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Gainesville, v. 102, p. 317-325, 2009.

JERMY, T.; BUTT, B.A. Method for screening female sex pheromone extracts of the Colorado potato beetle. **Entomologia Experimentalis et Applicata,** Edinburgh, v. 59, v. 1, p. 75-78, 1991.

LAPOINTE, S.L.; HUNTER, W.B.; ALESSANDRO, R.T. Cuticular hydrocarbons on elytra of the Diaprepes root weevil Diaprepes abbreviatus (L.) (Coleoptera: Curculionidae). **Agricultural and Forest Entomology**, Washington, v. 6, p. 251-257, 2004.

LELITO, J.P.; BÖRÖCZKY, K.; JONES, T.H.; FRASER, I.; MASTRO, V.C.; TUMLINSON, J.H.; BAKER, T.C. Behavioral evidence for a contact sex pheromone component of the emerald ash borer, *Agrilus Planipennis* Fairmaire. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 35, n. 1, p. 104-110, 2009.

LEW*, A.*C. BALL, H.J. The mating behavior of the. western corn rootworm *Diabrotica virgifera* (Coleoptera:. Chrysomelidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Gainesville, v. 72, n. 3, p. 15-15, 1979*.*

MANT, J.; BRANDLI, C.; VEREECKEN, N.J.; SCHULZ, C.M.; FRANCKE, W.; SCHIESTL, F.P. Cuticular hydrocarbons as sex pheromone of the bee colletes cunicularius and the key to its mimicry by the sexually deceptive orchid, *Ophrys exaltata*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.31, p. 1765-1786, 2005.

MARASCUILLO, L. A. Large-sample multiple-comparisons. **Psychological Bulletin**, Amsterdan, v. 65, p. 280-290, 1966.

MILANEZ, J.M. **Técnicas de criação e bioecologia de *Diabrotica speciosa* (Germar), 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae).** 1995. 102p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba,1995.

MILLAR, J.G.; HAYNES, K.F. **Methods in chemical ecology**. New York: Chapman & Hall. Mead, R. 1998. 420p.

MUTIS, A.; PARRA, L.; PALMA, R.; ARDO, F.; PERIHI, F.; QUIROZ, A. Evidence of contact pheromone use in mating behavior of raspberry weevil (Coleoptera: Curculionidae). **Environmental Entomology**, Lanham, v. 38, p. 192-297, 2009.

NIST/SEMATECH. **e-Handbook of Statistical Methods.** Disponível em: http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/, 2009. Acesso em: 02 mar.2009.

NOJIMA, S.; SHIMOMURA, K.; HONDA, H.; YAMAMOTO, I.; OHSAWA, K. Contact sex pheromone components of the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*. **Journal Chemical Ecology**, New York, v. 33, n. 5, p. 923-33, 2007.

OTTO, V.D. Some properties of the female sex pheromone of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. Say. (Col. Chysomelidae). **Journal of Pest Science**, Berlin, v. 70, p. 30-33, 1997.

PETERSON, M.A.; DOBLER, S.; LARSON, E.L.; JUARÉZ, D.; SCHLARBAUM, T.; MONSEN, K.J.; FRNACKE, W. Profiles of cuticular hydrocarbons mediate male mate choice and sexual isolation between hybridizing *Chrysochus* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Chemoecology**, Basel, v. 17, p. 87-96, 2007.

SINGER, T.L. Roles of Hydrocarbons in the Recognition Systems of Insects. **American Zoologist**, Thousand Oaks, v. 38, p. 394-405, 1998.

SPENCER, J.L.; HIBBARD, B.E.; MOESER, J.; ONSTAD, D.W. Behaviour and ecology of the western corn rootworm *(Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). **Agricultural and Forest Entomology**, Washington, v. 11, p. 9-27, 2009.

SUGENO, W.; HORI, M.; MATSUDA, M. 2006. Identification of the contact sex pheromone *of Gastrophysa atrocyanea* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Applied Entomology and Zoology,** Tokyo, v. 41, p. 269-276, 2006.

TANAKA, K.; HONDA, H.; OHSAWA, K.; YAMAMOTO, I. A sex attractant of yellow mealworm, *Tenebrio molitor* L. and its role in the mating behavior. **The Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 11, p. 49-55, 1986.

WAKU, Y.; FOLDI, A.I. The fine structure of insect glands secreting waxy substances, p. 303-322. In: R.C. KING; AKAI, H. **Insect Ultrastructure**. New York, Plenum Press, 1984. v.2 485p.

ZARBIN, P. H. G.; FERREIRA, J. T. B.; LEAL, W. S. Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrutural de feromônios de insetos. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 2, 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40421999000200018&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 6 Abril 2009.

ZHANG , A.J.; OLIVER, J.E.; CHAUHAN, K.; ZHAO, L.; XU, Z. Evidence for contact sex recognition pheromone of the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae). **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 90, p 410-413, 2003.

5 EFEITO DA HERBIVORIA FOLIAR, RADICULAR E SIMULTÂNEA EM MILHO SOBRE O COMPORTAMENTO DE SELEÇÃO HOSPEDEIRA PARA OVIPOSIÇÃO EM *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae)

Resumo

No presente trabalho, investigou-se a hipótese de que fêmeas grávidas de *D. speciosa* utilizam os voláteis de plantas de milho sadias e induzidas pela herbivoria de seus coespecíficos imaturos e adultos, para realizar a seleção hospedeira para oviposição. Para isso, quantificou-se a resposta de fêmeas de *D. speciosa* aos voláteis dos seguintes tratamentos: (i) plantas sadias; (ii) plantas induzidas por herbivoria radicular (danificadas por larvas); (iii) plantas induzidas por herbivoria foliar (danificadas por adultos); e (iv) plantas induzidas por herbivoria simultânea (danificadas por larvas e adultos). Além disso, foi avaliado se as fêmeas seriam capazes de identificar as condições de competição e de adequação hospedeira para a prole a partir dos sinais químicos emitidos pelas plantas. Os resultados indicaram que a presença de coespecíficos de *D. speciosa* em plantas de milho ocasionou a emissão de voláteis que influenciaram a seleção hospedeira para oviposição. Fêmeas grávidas evitaram plantas atacadas por larvas (herbivoria radicular). O mesmo foi observado para plantas com herbivoria simultânea (radicular+foliar), no entanto, somente por um período inferior a 6 horas. A indução por herbivoria foliar, quando realizada isoladamente, não influenciou o comportamento de seleção hospedeira de fêmeas. O ganho de peso foi maior em larvas mantidas em plantas sadias que em plantas induzidas por herbivoria radicular ou simultânea, sugerindo que a preferência das fêmeas está relacionada à performance da sua progênie.

Palavras-chave: Semioquímicos; voláteis de plantas; insetos subterrâneos; interação planta-inseto; comportamento de oviposição

Abstract

In the current work, we investigated the hypothesis that *D. speciosa* gravid females use volatiles derived from health maize plants and herbivore-induced plants under attack of their conspecific immatures and adults in host selection for oviposition. In order to that, response of *D. speciosa* females to volatiles was quantified to the following treatments: (i) health plants; (ii) plants induced by root herbivory (damaged by larvae); (iii) plants induced by leaf herbivory (damaged by adults); and (iv) plants induced by simultaneous herbivory (damaged by larvae and adults). Furthermore, we assessed if females were able to identify conditions of competition and host adequacy to offspring by means of chemical cues emitted by these plants. The results indicated that the presence of *D. speciosa* conspecifics on maize plants triggered the emission of volatiles which influenced host selection for oviposition. Gravid females avoided plants induced by larval attack (root herbivory). The same effect was observed in plants induced by

simultaneous herbivory (root+leaf), however, only at time intervals prior to 6 hours. The leaf herbivory induction, separately, did not influence the host selection behavior of females. The weight gain was higher in larvae kept on health plants than on plants induced by root or simultaneous herbivory, suggesting that female preference is related to its offspring performance.

Keywords: Semiochemicals; plant volatiles; belowground insects; plant-insect interaction; oviposition behavior

5.1 Introdução

Para muitos insetos herbívoros, a seleção hospedeira para oviposição tem um forte impacto sobre a dinâmica populacional e o sucesso reprodutivo dos indivíduos (HASSEL, 1987; PEARMAN; WILBUR, 1990; MAYHEW, 1997), uma vez que pode afetar o acesso dos imaturos ao hospedeiro, seu desenvolvimento e sua sobrevivência (RESETARITS; WILBUR, 1989). Durante o processo de busca, as fêmeas podem utilizar sinais físicos e químicos do hospedeiro e, de acordo com a teoria da otimização da oviposição, selecionam aqueles mais apropriados para o desenvolvimento da progênie (JAENIKE, 1978).

Dentre os sinais químicos utilizados para a seleção hospedeira de insetos, os voláteis induzidos pela herbivoria são os mais importantes, pois podem indicar a qualidade nutricional da planta, além da presença de competidores ou de inimigos naturais (KARBAN; BALDWIN, 1997; DICKE, 2000; DICKE; VAN LOON, 2000; RANDLKOFER; BERMAIER; MEINERS, 2007). Nos últimos anos, diversos estudos têm mostrado o papel dos voláteis induzidos de plantas sobre o comportamento de seleção hospedeira de insetos, embora a maioria dessas pesquisas tenha sido realizada com espécies cujos imaturos e adultos são herbívoros foliares (MAYHEW, 1997; BERNASCONI et al., 1998; ROSTÁS; HILKER, 2002; WISE; WEINBERG, 2002). Entretanto, mais recentemente, tem-se investigado as interações de insetos rizófagos e fitófagos que compartilham a mesma planta hospedeira (VAN DAM et al., 2003; VAN DAM; BEZEMER, 2006; SOLER et al., 2007; RASMANN; TURLINGS, 2007). Nesse sistema, os voláteis induzidos adquirem ainda mais importância, uma vez que a presença de herbívoros nas raízes pode ocasionar a emissão de compostos em toda a planta e influenciar o comportamento dos organismos que vivem na parte aérea (BEZEMER et al., 2003; WÄCKERS; BEZEMER, 2003). Dessa forma, a planta torna-se um canal de comunicação entre o ambiente subterrâneo e o aéreo (SOLER et al., 2009).

De acordo com Johnson et al. (2006), a compreensão do papel dos voláteis induzidos de plantas sobre o comportamento de seleção hospedeira para oviposição pode significar a chave para o manejo de insetos de solo, principalmente de espécies

cujos imaturos são rizófagos e os adultos fitófagos de uma mesma planta. Para estes, o período em que ocorre a seleção do hospedeiro pela fêmea e o primeiro deslocamento dos imaturos seriam os momentos ideais para o controle populacional. Além disso, o uso dos voláteis que determinam a preferência de oviposição pode ser uma ferramenta importante para evitar a imigração de fêmeas grávidas em áreas de cultivo.

Para *Diabrotica* spp., a comunicação química mediada pelos voláteis induzidos de plantas já foi descrita para algumas espécies (HAMMACK, 1997; 2001; HAMMACK et al., 1999). Voláteis de milho, por exemplo, podem ocasionar a atração ou repelência de fêmeas e machos em grandes áreas agrícolas. De acordo com Hammack et al. (1999) e Boriani et al. (2006), os compostos cuja repelência foi comprovada podem ser empregados em áreas marginais aos cultivos, a fim de prevenir a colonização por fêmeas grávidas. Por outro lado, voláteis atraentes podem ser utilizados para a captura das fêmeas e, consequentemente, reduzir o número de ovos depositados.

Diabrotica speciosa (Germar) é um crisomelídeo cujas larvas são subterrâneas e alimentam-se, principalmente de raízes de milho (HAJI, 1981; MARQUES; ÁVILA; PARRA, 1999; ÁVILA; MILANEZ, 2004), enquanto que os adultos são fitófagos e pode alimentar-se de uma ampla gama de hospedeiros, entre eles, o próprio milho (ÁVILA; MILANEZ, 2004). Para essa espécie, Milanez (1995) demonstrou que as fêmeas preferem ovipositar próximo a plantas de milho, embora selecionem outras plantas para alimentação. Além disso, esse autor verificou que os imaturos de *D. speciosa* apresentam melhor performance quando alimentados com raízes de milho, onde apresentaram maiores níveis de sobrevivência e ganho de peso. Sendo assim, sugere-se que o comportamento de oviposição das fêmeas esteja relacionado ao melhor desempenho dos imaturos, de acordo com a ‘teoria da otimização da oviposição’ (JAENIKE, 1978).

No presente trabalho, investigou-se a hipótese de que fêmeas de *D. speciosa* utilizam os voláteis induzidos de plantas de milho ao realizar a seleção hospedeira para oviposição. Considerando-se que as larvas subterrâneas dessa espécie apresentam mobilidade reduzida e sua sobrevivência depende da escolha das fêmeas para oviposição, estudou-se também se estas fêmeas são capazes de identificar condições de competição a partir dos sinais químicos emitidos por plantas de milho. Para isso, foi

avaliado se a presença de coespecíficos adultos e/ou imaturos nessas plantas influencia o comportamento de oviposição de *D. speciosa*. Adicionalmente, investigou-se se a seleção dessas fêmeas é baseada na performance dos imaturos quando alimentados em plantas sadias ou induzidas, comparando-se o ganho de peso das larvas com a resposta das fêmeas.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Criação dos insetos

Os indivíduos de *D. speciosa* foram obtidos a partir de criação em laboratório, baseada na metodologia de Milanez (1995) e Ávila; Tabai; Parra (2000). Larvas e adultos foram alimentados com raízes de milho, *Zea mays* L. ('Suwan') e folhas de feijão, *Phaseolus vulgaris* (L.) ('Carioca'), respectivamente. Adultos foram mantidos em gaiola plástica (40 x 30 x 40 cm) contendo plantas de feijão e substrato de oviposição, constituído de um recipiente circular (10 x 1,5 cm) forrado com gaze preta umedecida. Em intervalos de dois dias, os ovos foram coletados, tratados com solução de sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4.H_2O$) a 1%, por dois minutos, e transferidos para placas de Petri (9 x 1 cm), onde permaneceram até a eclosão. As larvas recém-eclodidas foram inoculadas sobre sementes de milho pré-germinadas e mantidas, até a emergência, em recipientes plásticos preenchidos com vermiculita esterilizada umedecida (1 parte vermiculita: 2 partes água). Para a criação de *D. speciosa*, assim como para a realização dos bioensaios, os insetos foram mantidos em salas climatizadas sob temperatura de 22±3ºC, umidade relativa de 70±10% e fotoperíodo de 14L:10E.

5.2.2 Cultivo das plantas

Sementes de milho pré-germinadas foram inseridas em recipientes plásticos (250 mL) contendo substrato comercial Basiplant® e umedecidas diariamente. As plantas utilizadas nos bioensaios foram mantidas em casa de vegetação até o estágio em que

apresentavam duas folhas parcialmente desdobradas e a terceira em início de brotação (Figura 5.1A-C). Aquelas destinadas aos bioensaios de performance de larvas foram transferidas para novos recipientes quando apresentavam uma folha aberta e a segunda em início de brotação. Neste momento, essas plantas foram retiradas do substrato, lavadas cuidadosamente e inseridas em recipientes (250 mL) contendo vermiculita umedecida (1 parte vermiculita: 2 partes água), onde permaneceram até o estágio apropriado. A transferência das plantas foi realizada, pelo menos, três dias antes dos bioensaios, buscando-se evitar qualquer influência da manipulação sobre a emissão de voláteis (HILTPOLD; TURLINGS, 2008).

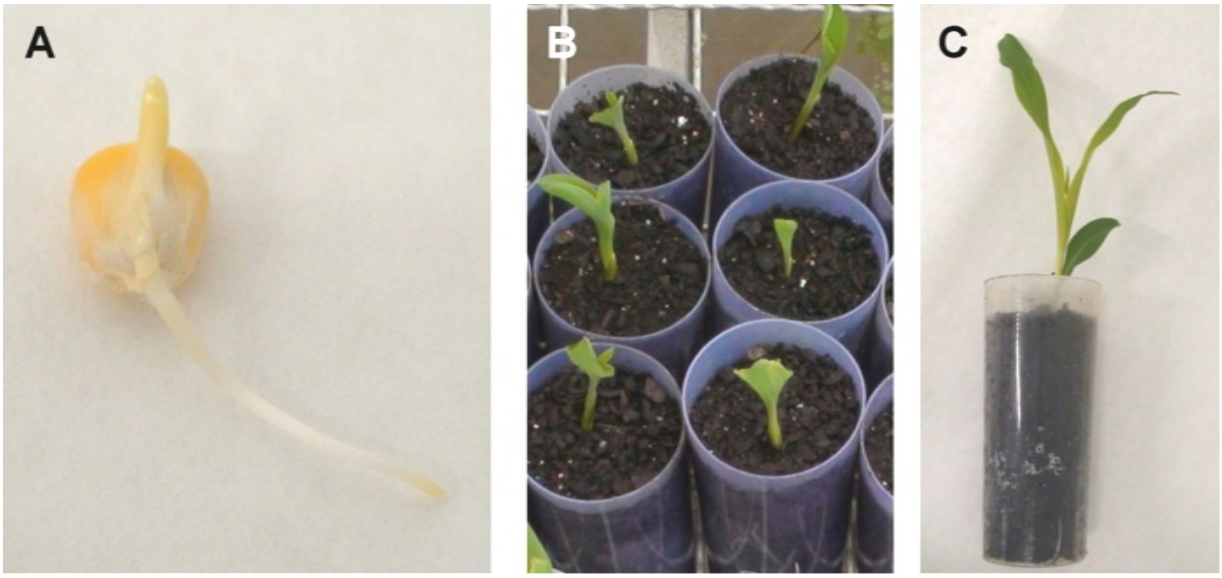

Figura 5.1 – Cultivo de plantas de milho (*Zea mays*) para a realização dos bioensaios de seleção hospedeira para oviposição em *Diabrotica speciosa*. (A) Semente de milho pré-germinada; (B) plântulas de milho em desenvolvimento, mantidas em casa de vegetação; (C) plantas em estágio apropriado para uso nos bioensaios (duas folhas expandidas)

5.2.3 Indução das plantas

As plantas utilizadas nos bioensaios comportamentais foram submetidas, ou não, a herbivoria, sendo obtidos os seguintes tratamentos: (i) plantas sadias; (ii) plantas induzidas por herbivoria radicular (danificadas por larvas); (iii) plantas induzidas por

herbivoria foliar (danificadas por adultos); e (iv) plantas induzidas por herbivoria simultânea (danificadas por larvas e adultos).

As plantas sadias foram mantidas sem danos, enquanto que as induzidas por herbivoria radicular foram obtidas inserindo-se 20 larvas de segundo e terceiro instares de *D. speciosa* por recipiente de cultivo (Figura 5.2A; B). Os danos nas folhas foram ocasionados, colocando-se 20 adultos recém-emergidos de *D. speciosa* em gaiolas de papel (5 cm comprimento x 5 cm largura) sobre a segunda folha da planta (Figura 5.2C). Por sua vez, os danos simultâneos foram ocasionados por 20 larvas nas raízes e 20 adultos nas folhas.

Os adultos e larvas destinados a indução foram colocados em contato com a planta 1 hora e 2 horas antes dos bioensaios, respectivamente, visando a ambientação e locomoção inicial. Para as plantas induzidas por herbivoria foliar, a área ocupada pela gaiola de papel, a qual continha os adultos foi retirada antes do início dos bioensaios, a fim de evitar que estímulos dos coespecíficos influenciassem o comportamento das fêmeas.

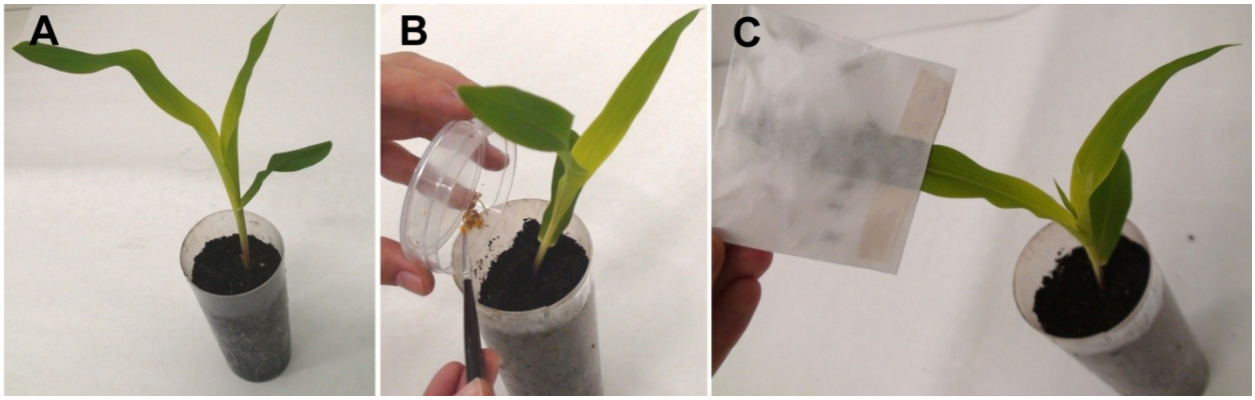

Figura 5.2 - Plantas de milho (*Zea mays*) utilizadas nos bioensaios comportamentais de *Diabrotica speciosa*. (A) planta sadia; (B) inserção de larvas no substrato para a indução radicular; (C) gaiola de papel para a manutenção de adultos e indução por herbivoria foliar

5.2.4 Comportamento de seleção hospedeira para oviposição

Bioensaios em olfatômetro. Para investigar o efeito dos voláteis da plantas de milho sobre o comportamento de seleção hospedeira para oviposição de *D. speciosa*

foram realizados bioensaios em olfatômetro de vidro do tipo 'Y', constituído de um tubo principal e dois tubos laterais de vidro (20 x 3 cm), aos quais foram conectadas câmaras contendo os tratamentos. As plantas foram mantidas em câmaras de vidro conectadas ao olfatômetro por mangueiras de silicone. O fluxo de ar de 1 L/min foi promovido por uma bomba de vácuo e controlado por fluxômetros conectados ao olfatômetro, permitindo passagem do ar pelos tubos laterais e a chegada dos odores ao tubo principal (Figura 5.3).

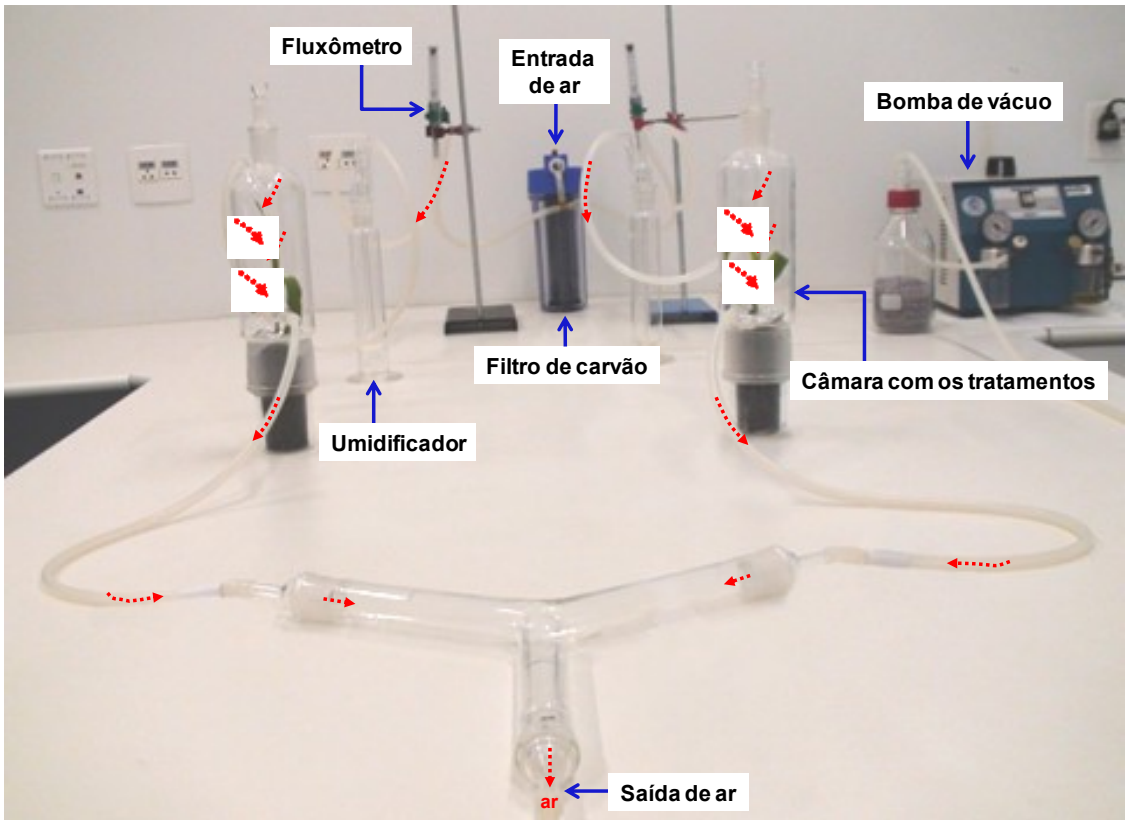

Figura 5.3 - Sistema de olfatometria utilizado nos bioensaios para avaliar a preferência de fêmeas acasaladas de *Diabrotica speciosa* por plantas de milho sadias ou induzidas pela herbivoria foliar, radicular e subterrânea

A atratividade das fêmeas grávidas foi avaliada comparando-se a preferência destas em relação a plantas sadias ou induzidas. Para tanto, os recipientes de cultivo (recipiente + substrato + planta) contendo as plantas foram dispostos nos tubos laterais do olfatômetro, obedecendo à seguinte combinação de tratamentos: (i) planta sadia *vs* planta induzida por herbivoria foliar; (ii) planta sadia *vs* planta induzida por herbivoria

radicular; (iii) planta sadia *vs* planta induzida por herbivoria simultânea; e (iv) planta sadia *vs* planta sadia.

Nos bioensaios de olfatometria, considerou-se que as plantas de milho danificadas pelo herbívoro emitem misturas de voláteis cuja composição varia ao longo do tempo (TURLINGS et al., 1998). Sendo assim, os tratamentos de indução por herbivoria foram realizados nos seguintes intervalos antes do início dos bioensaios: 0-2, 2-4, 4-6, 6-8, 8-10, 10-12h.

No tubo principal do olfatômetro foram liberadas, individualmente, 40 fêmeas grávidas de *D. speciosa*, avaliando-se o número de indivíduos que se direcionou para cada um dos tratamentos. Os bioensaios foram realizados entre as 14 e 18 horas, horário em que as fêmeas apresentam maior atividade de oviposição, de acordo com observações comportamentais prévias (Nardi, et al.[7], dados não publicados). Desse modo, buscou-se explorar os horários que, possivelmente, os insetos realizam a seleção hospedeira para oviposição.

Bioensaios em gaiola. A preferência de fêmeas de *D. speciosa* para oviposição também foi caracterizada em experimentos de gaiola (60 x 50 x 50 cm), onde foram inseridos recipientes plásticos (250 mL) contendo as plantas (recipiente + substrato + planta) ou o tratamento controle (recipiente + substrato) (Figura 5.4A). Na abertura de cada recipiente foi inserido o substrato de oviposição, composto por três gases de coloração preta (MILANEZ, 1995) umedecidas uniformemente (20 mL água).

Para evitar que as fêmeas se alimentassem do milho, cada planta foi envolvida com uma proteção de tecido de filó, o qual permitia a passagem dos voláteis emitidos pelas plantas e evitava a herbivoria foliar e o contato com a superfície das folhas (Figura 5B). As fêmeas foram alimentadas com grãos de pólen, os quais foram oferecidos em tubos circulares (0,5 cm diâmetro x 0,2 cm altura) colocados sobre cada um dos substratos de oviposição (Figura 5.4B).

No interior da gaiola, 25 fêmeas grávidas de *D. speciosa* foram liberadas, onde permaneceram por 24 horas e tiveram acesso as seguintes combinações de

---

[7] NARDI, C.; LUVIZOTTO, R.A.G.; BENTO, J.M.S. **Ritmo diário de alimentação e oviposição de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae).**

tratamentos: (i) planta sadia *vs* planta induzida por herbivoria foliar *vs* controle (somente substrato de oviposição); (ii) planta sadia *vs* planta induzida por herbivoria radicular *vs* controle; e (iii) planta sadia *vs* planta induzida por herbivoria simultânea *vs* controle (Figura 5.4C).

Após 24 horas, as fêmeas foram retiradas das gaiolas e os substratos de oviposição foram lavados, individualmente, sobre uma peneira de voile, onde os ovos ficaram retidos. Esses ovos foram coletados, inseridos em placas de Petri e contabilizados em microscópio estereoscópio, registrando-se o número de ovos depositados pelas fêmeas em cada um dos tratamentos.

Para cada uma das combinações de tratamentos foram realizadas quatro repetições de forma casualizada ao longo do tempo.

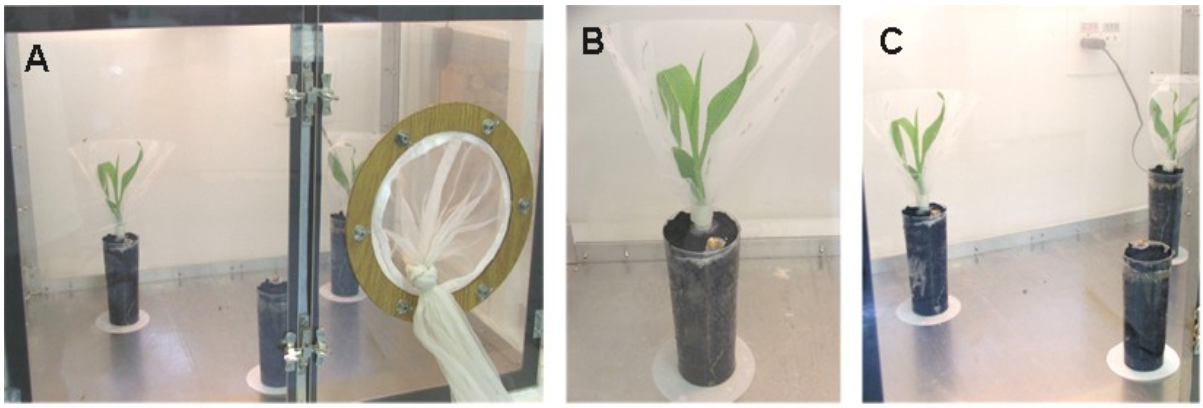

Figura 5.4 - (A) Gaiola onde foram realizados os bioensaios comportamentais relativos ao comportamento de oviposição de fêmeas de *Diabrotica speciosa* mediante os voláteis de plantas de milho induzidas pela herbivoria foliar, radicular e simultânea; (B) recipiente de plantio contendo uma planta de milho, o substrato de oviposição e pólen, como alimento; (C) disposição dos tratamentos no interior da gaiola durante os bioensaios com chance de escolha

5.2.5 Performance das larvas

Para testar a hipótese de que a seleção hospedeira para oviposição está relacionada à performance dos imaturos, foram realizados bioensaios avaliando a sobrevivência e o ganho de peso de larvas quando alimentadas com plantas sadias, plantas induzidas por herbivoria foliar, radicular ou simultânea. Nas plantas induzidas por herbivoria radicular, as raízes foram envolvidas por um envoltório de tecido voile

(5 x 7 cm), o qual permitia a passagem de parte das raízes e separava as larvas utilizadas para indução daquelas a serem avaliadas (Figura 5.5A-F). Em cada planta, os danos foram realizados mantendo-se as larvas e/ou adultos nas plantas durante todo o período.

No início dos bioensaios, larvas recém emergidas de *D. speciosa* foram pesadas e inoculadas, individualmente, no recipiente de cultivo de milho, onde permaneceram por sete dias. Passado esse período, as larvas foram retiradas do substrato e pesadas novamente. Para cada tratamento, foram realizadas 15 repetições, avaliando-se a sobrevivência e o ganho de peso das larvas.

5.2.6 Análise Estatística

Os dados referentes aos bioensaios de olfatometria foram submetidos à análise do qui-quadrado ($P \leq 0,05$), comparando-se os insetos que se direcionaram para plantas induzidas ou plantas sadias. O número de ovos depositados pelas fêmeas e o ganho de peso das larvas alimentadas em plantas de milho sadias ou induzidas foram comparados pelo teste de Kruskal Wallis ($P \leq 0,05$).

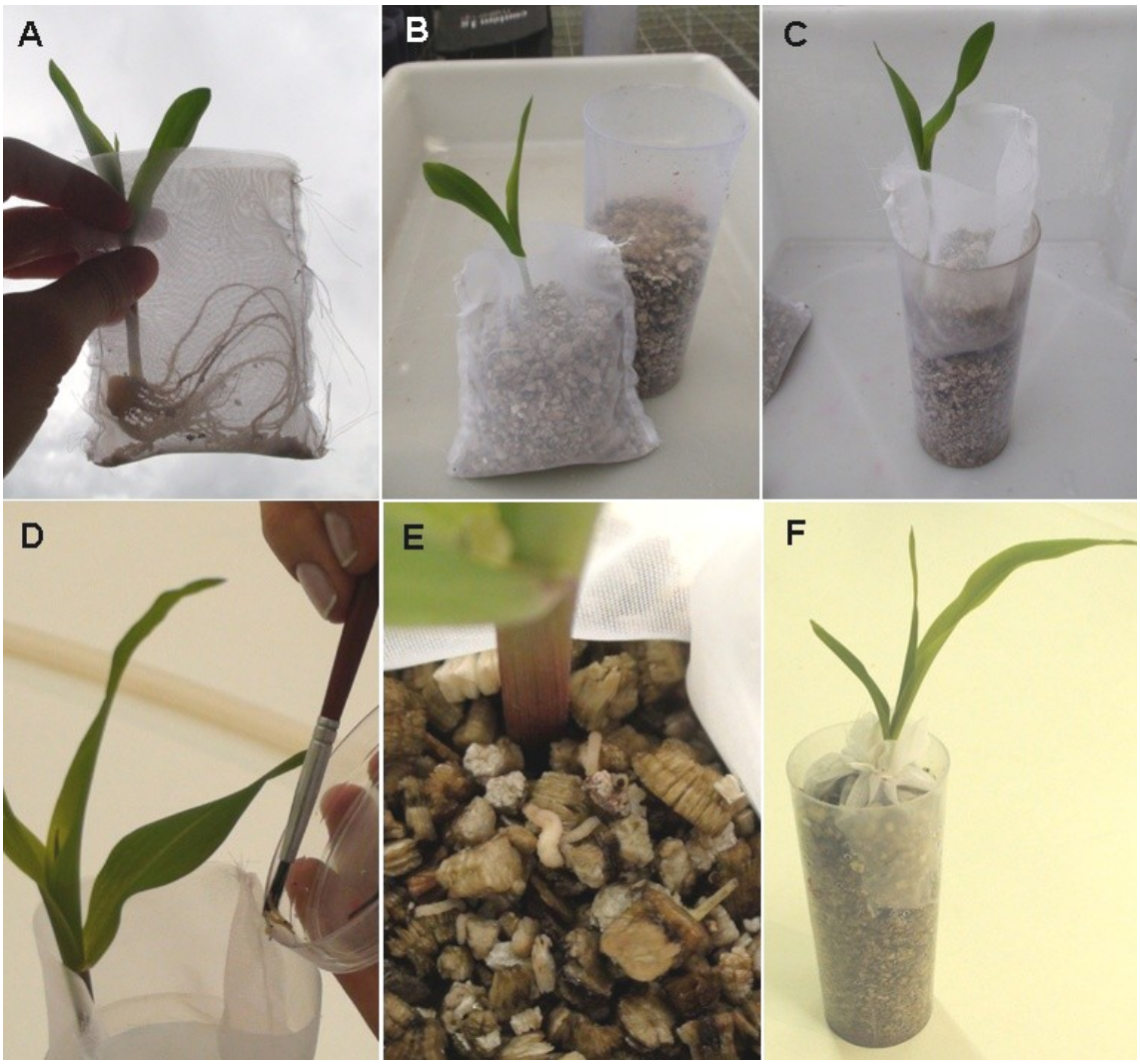

Figura 5.5 - Recipientes para manutenção das plantas induzidas pela herbivoria radicular de milho para a realização dos bioensaios de performance de larvas de *Diabrotica speciosa*: (A) transferência das plantas para pacotes de voile; (B) preenchimento dos recipientes de cultivo com vermiculita; (C) recipientes de cultivo; (D) inoculação das larvas para indução das plantas de milho; (E) larvas de *D. speciosa* inoculadas; (F) recipientes de cultivo preparados para a montagem dos bioensaios

5.3 Resultados

Os voláteis de plantas de milho influenciaram a seleção hospedeira de fêmeas grávidas de *D. speciosa*, uma vez que estas demonstraram resposta diferencial às plantas sadias e submetidas à indução (Figura 5.6). As fêmeas foram capazes de identificar a presença de coespecíficos imaturos, evitando plantas com raízes previamente atacadas e preferindo as plantas sadias. Esse comportamento foi

evidenciado para todos os tempos de indução avaliados (Figura 5.6A). Por outro lado, a indução por herbivoria foliar não influenciou a escolha de fêmeas grávidas, uma vez que estas se direcionaram igualmente para plantas induzidas e sadias, independente do período de indução (Figura 5.6B). Para as plantas submetidas à herbivoria simultânea de folhas e raízes, os períodos de indução influenciaram a resposta de fêmeas de *D. speciosa*, as quais evitaram as plantas induzidas por 2 a 6 horas e preferiram direcionar-se para as plantas sadias (Figura 5.6C). Entretanto, a indução simultânea ocasionada por mais de 6 horas não proporcionou a resposta diferencial de fêmeas, que se direcionaram igualmente para plantas induzidas e sadias.

Os resultados dos bioensaios em gaiolas corroboraram os obtidos nos testes de olfatometria, sendo que as fêmeas apresentaram uma evidente rejeição pelas plantas atacadas por larvas, depositando a maioria dos ovos sob plantas sadias (χ^2, P=0,04) (Figura 5.7A). O número de ovos depositados sob plantas induzidas por herbivoria foliar mostrou-se semelhante aquele depositado em plantas sadias (χ^2, P=1,00), confirmando que a presença de coespecíficos adultos nas folhas não inibe a oviposição das fêmeas de *D. speciosa* (Figura 5.7B). Do mesmo modo, a preferência pela oviposição também não foi influenciada pela indução simultânea na raiz e na parte aérea das plantas de milho (χ^2, P=0,06) (Figura 5.7C).

A sobrevivência de larvas de *D. speciosa* aproximou-se de 95% para todos os tratamentos, não sendo evidenciadas diferenças entre eles. Entretanto, larvas mantidas em plantas de milho sadias apresentaram ganho de peso superior, quando comparadas com aquelas mantidas em plantas induzidas por herbivoria radicular (χ^2, P=0,0004) e simultânea (χ^2, P=0,00007) (Figura 5.8). Por outro lado, o ganho de peso das larvas mantidas em plantas induzidas por adultos mostrou-se semelhante ao daquelas mantidas em plantas sadias (χ^2, P=0,22), com indução radicular (χ^2, P=0,32) ou simultânea (χ^2, P=0,12).

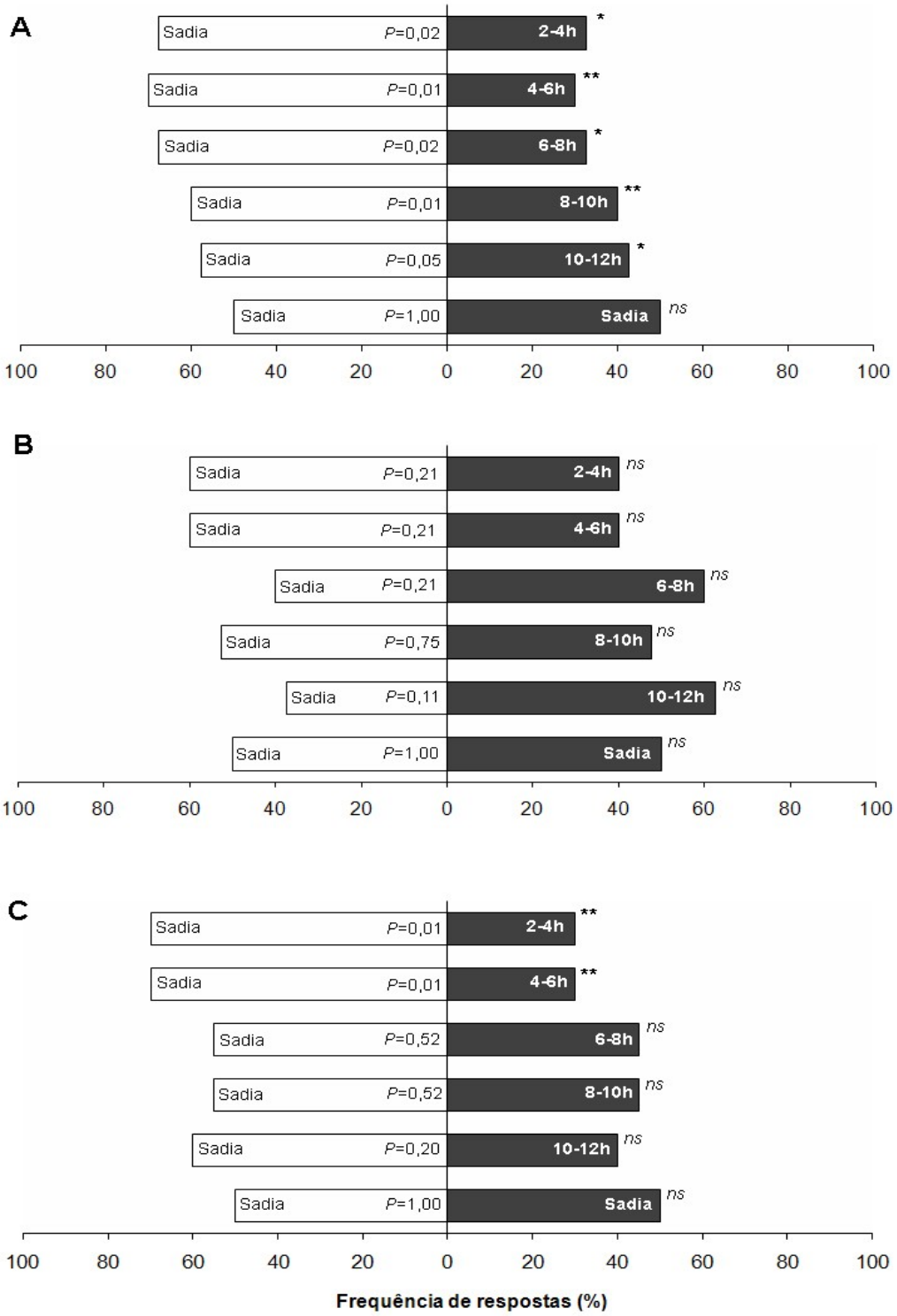

Figura 5.6 - Frequência de respostas de fêmeas grávidas de *Diabrotica speciosa*, em olfatômetro, aos voláteis de plantas de milho sadias ou induzidas durante diferentes intervalos de tempo. Combinação dos tratamentos no olfatômetro: (A) plantas sadias vs plantas induzidas por herbivoria radicular; (B) plantas sadias vs plantas induzidas por herbivoria foliar; (C) plantas sadias vs plantas induzidas por herbivoria simultânea (radicular e foliar). (n= 40; Qui-quadrado; * $P \leq 0,05$; **$P \leq 0,01$; *ns*= não significativo) (T 22±3ºC; UR 70±10%; fotoperíodo de 14:10h)

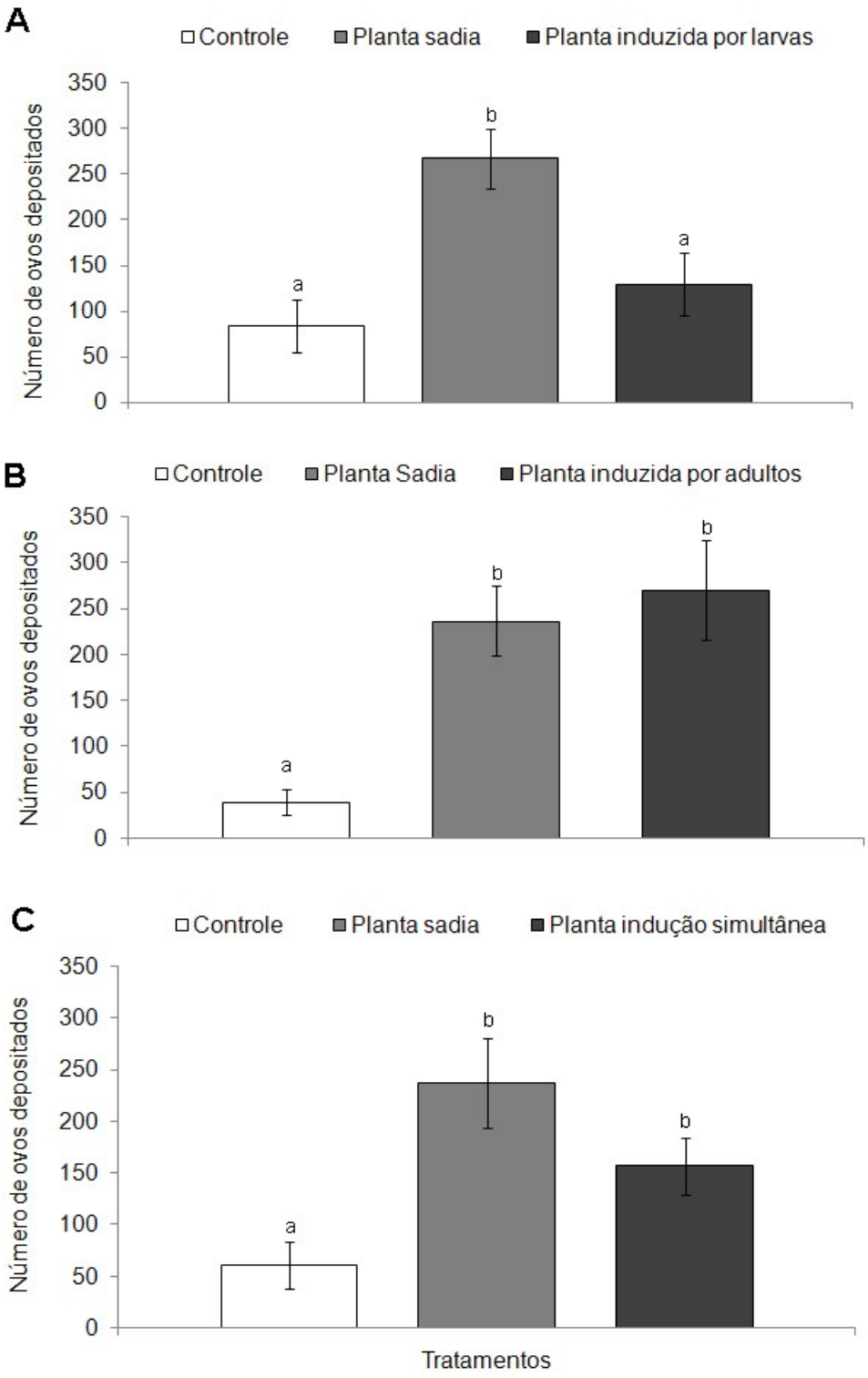

Figura 5.7 - Número de ovos depositados por fêmeas grávidas de *D. speciosa* sob plantas sadias ou submetidas à (A) herbivoria foliar (induzida por adultos), (B) herbivoria radicular (induzida por larvas) ou (C) herbivoria simultânea (indução por larvas e adultos). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos (n=25; Kruskal-Wallis, $P \leq 0,05$) (T 22±3ºC; UR 70±10%; fotoperíodo de 14:10h)

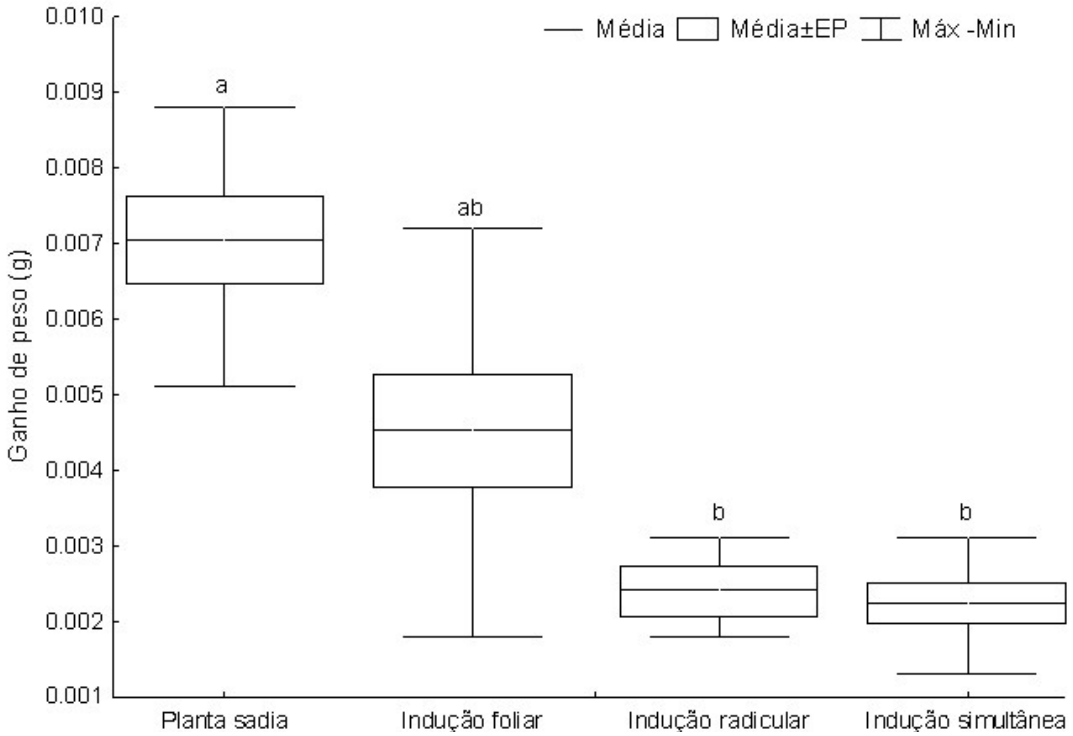

Figura 5.8 - Ganho de peso de larvas de *Diabrotica speciosa* alimentadas, durante 7 dias, com plantas de milho (*Zea mays*) sadias, induzidas por herbivoria foliar, radicular ou simultânea (foliar e radicular). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos (n=15; Kruskal-Walis, $P \leq 0,05$) (T 22±3ºC; UR 70±10%; fotoperíodo de 14:10h)

5.4 Discussão

A presença de coespecíficos em plantas de milho influenciou a seleção hospedeira para oviposição em *D. speciosa*. Fêmeas grávidas evitaram depositar ovos em plantas já atacadas pelos imaturos, sendo que esse comportamento mostrou-se evidente em relação a plantas induzidas por herbivoria radicular e simultânea por um período inferior a 6 horas. Sendo assim, a competição intraespecífica sob o solo interferiu no comportamento de fêmeas grávidas de *D. speciosa* sobre o solo. Por outro lado, a indução por herbivoria foliar, quando realizada isoladamente, não influenciou o comportamento de seleção hospedeira de fêmeas, pois a presença de coespecíficos adultos não evitou que fêmeas se direcionassem a essas plantas e depositassem seus ovos próximos a elas. Entretanto, o comportamento de fêmeas foi alterado diante de plantas submetidas à herbivoria simultânea, sendo que estas passaram a não

diferenciar entre plantas sadias e aquelas com larvas nas raízes após 6 horas de indução.

Nos últimos anos, diversos estudos têm mostrado a ação dos voláteis induzidos de plantas sobre o comportamento de seleção hospedeira de insetos, embora a maioria dessas pesquisas seja realizada com espécies cujos imaturos e adultos são herbívoros foliares (MAYHEW, 1997; BERNASCONI et al., 1998; KESSLER; BALDWIN, 2001; ROSTÁS; HILKER, 2002; WISE; WEINBERG, 2002; BRUINSMA et al., 2007). Entretanto, também se demonstrou que a alimentação de herbívoros nas raízes pode ocasionar a alteração dos compostos liberados em toda a planta e influenciar o comportamento dos organismos que vivem na parte aérea (BAUR; KOSTÁL; STANDLER, 1996; DE MORAES; MESCHER; TUMLINSON, 2001; BEZEMER et al., 2003; WÄCKERS; BEZEMER, 2003). Nesses casos, pequenas variações na composição dos voláteis podem atuar em distintas interações ecológicas, atraindo ou repelindo outros organismos (KARBAN; BALDWIN, 1997; DICKE, 2000; DICKE; VAN LOON, 2000; RANDLKOFER; BERMAIER; MEINERS, 2007; ERB et al., 2008).

Os bioensaios de olfatometria demonstraram que os voláteis de plantas de milho têm um papel importante no processo de seleção hospedeira para oviposição em *D. speciosa,* sendo que as fêmeas são capazes de reconhecer tais compostos químicos, identificando e diferenciando as plantas sadias daquelas submetidas à indução. Portanto, a herbivoria de folhas e/ou raízes estaria ocasionando variações qualitativas e/ou quantitativas nos compostos químicos liberados pelas folhas de milho, as quais determinariam o comportamento de seleção pelas fêmeas.

Em plantas de milho, tal variação no padrão de emissão dos voláteis foi demonstrada por Rasmann; Turlings (2007), que estudaram a influência da herbivoria foliar, radicular e simultânea sobre a emissão de compostos químicos. Esses autores verificaram que essas plantas emitem uma mistura complexa de voláteis quando induzidas apenas pelo herbívoro foliar, *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lepidoptera: Noctuidae), enquanto que não emitem compostos pelas folhas quando as raízes estão sob o ataque de larvas de *Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte. Entretanto, quando as plantas são submetidas à indução simultânea por esses insetos, a mistura de voláteis emitida pelas folhas é significativamente suprimida em termos quantitativos e

qualitativos. Assim, comprovou-se que a herbivoria radicular por *D. virgifera virgifera* altera significativamente o padrão de voláteis emitidos pelas folhas de milho.

Conforme verificado no presente trabalho, a não preferência de fêmeas de *D. speciosa* por plantas danificadas nas raízes pode indicar que a liberação de voláteis atrativos esteja sendo suprimida. Por outro lado, tais compostos estariam sendo liberados normalmente pelas plantas sadias, com indução foliar ou indução simultânea e, assim, atraindo as fêmeas de *D. speciosa*. Dentre esses compostos, é possível que estejam o linalol, o β-cariofileno e o acetato de geranila, uma vez que a sua atratividade já foi demonstrada para *Diabrotica* spp. (HAMMACK, 1997; 2001).

Considerando-se que o volátil linalol é o único liberado por plantas de milho sadias e está entre os liberados por plantas induzidas pela herbivoria foliar (RASMANN; TURLINGS, 2007; D´ALESSANDRO; TURLINGS 2006), é possível que este esteja entre os componentes-chave da atração de *Diabrotica* spp. Para *D. speciosa*, verificou-se que tanto as plantas sadias, quanto as plantas induzidas por herbivoria foliar, foram atrativas as fêmeas. Além disso, a indução das plantas por herbivoria simultânea ocasionou a atração das fêmeas a partir de seis horas de indução. Para este último caso, a emissão de voláteis pelas folhas estaria sendo inicialmente suprimida, uma vez que as defesas estariam sendo direcionadas para as raízes. Após seis horas, entretanto, a herbivoria foliar acumulada pode estar ocasionando o direcionamento das defesas para a parte aérea e o incremento da produção dos compostos induzidos.

Para aquelas plantas submetidas à herbivoria radicular, sugere-se a hipótese de que esteja ocorrendo a supressão da emissão de voláteis pelas folhas, mais precisamente o linanol. Este composto, liberado por plantas sadias, estaria sendo suprimido após o ataque das larvas, e impedindo o reconhecimento/aceitação das plantas pelas fêmeas de *D. speciosa*.

Evidentemente, essas observações constituem-se de hipóteses que necessitam de comprovação a partir da identificação dos voláteis emitidos pelas plantas de milho sadias e induzidas pelos tratamentos aqui avaliados. A partir dessas análises, pode-se também investigar a hipótese de que compostos repelentes estejam sendo emitidos por plantas submetidas a herbivoria radicular, assim como foi verificado em outros estudos (BAUR; KOSTÁL; STANDLER, 1996; SOLER et al., 2007).

De acordo com a teoria de otimização da oviposição, as fêmeas selecionam hospedeiros que incrementem seu sucesso reprodutivo e aumentem as possibilidades de sobrevivência da progênie (JAENIKE, 1978). Tal teoria tem sido bastante discutida e, embora não possa ser aplicada para algumas espécies de insetos (VALLADARES; LAWTON, 1991), diversos estudos têm evidenciado sistemas em que ela foi validada (JOHNSON et al., 2006). Para estes, foi demonstrado que as fêmeas tendem a evitar condições de baixa qualidade nutricional, competição ou risco de predação (BYERS; KENDAL, 1982; QUINN; HOWER, 1986; WOLFSON, 1987; GERARD, 2001; JOHNSON et al. 2006), preferindo ovipositar em plantas que proporcionam maior sobrevivência e ganho de peso a sua progênie.

Para *D. speciosa*, plantas induzidas por herbivoria radicular proporcionaram às larvas um ganho de peso inferior aquele proporcionado por plantas sadias, assim como as plantas com indução simultânea. Por outro lado, verificou-se que o ganho de peso dos imaturos não diferiu significativamente quando estas foram mantidas em plantas sadias ou induzidas por herbivoria foliar. Sendo assim, os dados de ganho de peso de larvas corroboram com os resultados sobre preferência de oviposição de fêmeas, demonstrando que o comportamento de seleção hospedeira segue o que foi estabelecido na teoria de otimização da oviposição.

Johnson et al. (2006) comentam sobre a importância de se conhecer como os voláteis induzidos pela herbivoria radicular podem afetar o comportamento de oviposição em adultos fitófagos. Além disso, para insetos cujos imaturos apresentam hábitos subterrâneos, a adequação do hospedeiro, bem como a ausência de competidores e inimigos naturais, são fatores determinantes da sua sobrevivência, principalmente em razão da sua baixa capacidade de locomoção. Para estes, evitar a oviposição em plantas previamente atacadas pode ser altamente vantajoso, uma vez que diminui os riscos de predação e competição, além de aumentar a perspectiva de sobrevivência da progênie.

Para outras espécies de *Diabrotica* spp., os métodos de controle populacional baseados na manipulação da oviposição já foram descritos como alternativa para o manejo de populações em campo. De acordo com Hammack et al. (1999) e Boriani et al. (2006), os voláteis de plantas com atividade repelente podem ser usados em áreas

marginais aos cultivos, a fim de prevenir a migração das fêmeas grávidas e, consequentemente, a colonização por esses insetos. Por outro lado, os voláteis com ação atraente podem ser empregados em armadilhas de captura, a fim de monitorar e/ou controlar a população de fêmeas presentes no cultivo. Além disso, o uso de armadilhas contendo voláteis de plantas na atração de fêmeas grávidas pode ser vantajoso quando usado isoladamente ou em associação com outros métodos, como os feromônios sexuais, uma vez que age diretamente sobre fêmeas e, assim, contribui diretamente na redução da população da geração seguinte.

Referências

ÁVILA, C.J.; MILANEZ, J.M. Larva alfinete. In: SALVADORI, J.R.; ÁVILA, C.J.; SILVA, M.T.B. **Pragas de Solo no Brasil**. Passo Fundo: EMBRAPA, 2004. p. 345-378.

ÁVILA, C.J.; TABAI, A.C.P.; PARRA, J.R.P. Comparação de técnicas para criação de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) em dietas natural e artificial. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 257-267, 2000.

BAUR, R.; KOSTÁL, V.; STÄNDLER, E. Root damage by coespecific larvae indces preference for oviposition in cabbage root flies. **Entomologia Experimentalis et Applicata,** Oxford, v. 80, p. 224-227, 1996.

BERNASCONI, M.L.; TURLINGS, T.C.J.; AMBROSETTI, L.; BASSETTI, P.; DORN, S. Herbivore-induced emissions of maize volatiles repel the corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Oxford, v. 87, p. 133-142, 1998.

BEZEMER, T.M.; WAGENAAR, R.; VAN DAM, N.M.; WÄCKERS, F.L. Interactions between above- and belowground insect herbivores as mediated by the plant defense system. **Oikos**, Copenhagen, v. 101, p. 555-562, 2003.

BORIANI, M.; AGOSTI, M.; KISSAND, J.; EDWARDS, C.R; Sustainable management of the western corn rootworm, Diabrotica virgifera virgifera LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae), in infested areas: experiences in Italy, Hungary and the USA. **Bulletin OEPP/EPPO Bulletin**, Luxemburgo, v. 36, p. 531–537, 2006.

BRUINSMA, M., VAN DAM, N.M., VAN LOON, J.J.A.; DICKE, M. Jasmonic acid-induced changes in *Brassica oleracea* affect oviposition preference of two specialist herbivores. **Journal of Chemical Ecology**, New York, n. 33, p. 655-668, 2007.

BYERS, R.A.; KENDAL, W.A. Effects of plant genotypes and root nodulation on growth and survival of *Sitona* spp. Larvae (Coleoptera: Curculionidae). **Environmental Entomology**, Lanham, v. 11, p. 440-443, 1982.

D´ALESSANDRO, M.D.; TURLINGS, T.C.J. Advances and challenges in the identification of volatiles that mediate interactions among plants and arthropods. **Analyst**, Washington, v. 131, p. 24-32, 2006.

DE MORAES, C.M.; MESCHER, M.C.; TUMLINSON, J.H. Caterpillar-induced noctural plant volatiles repel conspecific females. **Nature**, London, v. 410, p. 577-580, 2001.

DICKE, M. Chemical ecology of host-plant selection by herbivorous arthropods: a multitrophic perspective. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 28, p. 601-617, 2000.

DICKE, M.; VAN LOON, J.A. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Oxford, v. 97, p. 237-249, 2000.

ERB, M., JURRIAAN, T., DEGENNHARDT, J.; TURLINGS, T.C.J. Interactions between arthropod-induced aboveground and belowground defenses in plantys. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 146, p. 867-874, 2008.

GERARD, P.J. Dependence of *Sitona Lepidus* (Coleoptera: Curculionidae) larvae on abundance of white clover *Rhizobium nodules*. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham, v. 91, p. 149-152, 2001.

HAJI, N.F.P. **Biologia, dano e controle do adulto de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomleidae) na cultura da batatinha (*Solanum tuberosum* L.).** 1981. 53p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1981.

HAMMACK, L. Attractiveness of synthetic corn volatiles to feral northern and western corn rootworm beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). **Environmental Entomology,** Lanham, v. 26, p. 311-317, 1997.

HAMMACK, L. Single and blended maize volatiles as attractants for Diabroticite corn rootworm beetles. **Journal of Chemical Ecology,** New York, v. 27, p. 1373-1390, 2001.

HAMMACK, L.; HIBBARD, B.E.; HOLYOKE, C.W.; KLINE, M.; LEVA, D.M. Behavioral response of corn rootworm adults to host plant volatiles perceived by western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). **Environmental Entomology**, Lanham, v. 28, p. 961-967, 1999.

HASSEL, M.P. Detecting regulation in patchily distributed animal populations. **Journal Animal Ecology**, Oxford, v. 56, p. 705-731, 1987.

HILTPOLD, I.; TURLINGS, T.C.J. Belowground chemical signaling in maize: when simplicity rhymes with efficiency. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 34, p. 628-635, 2008.

JAENIKE, J. On optimal oviposition behavior in phytophagous insects. **Theoretical Population Biology,** San Diego, v. 14, p. 350-356, 1978.

JOHNSON, S.N.; BIRCH, A.N.E.; GREGORY, P.J.; MURRAY, P.J. The 'mother knoes best' principle: should soil insects be included in the preference-performance debate? **Ecological Entomology**, London, v. 31, p. 395-401, 2006.

KARBAN, R.; BALDWIN, I.T. **Induced Responses to Herbivory**. Chicago: Chicago University Press, 1997. 319p.

KESSLER, A.; BALDWIN, I.T. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. **Science**, Washington, v. 291, p. 2141-2144, 2001.

MARQUES, G.B.C.; ÁVILA, C.J.; PARRA, J.R.P. Danos causados por larvas e adultos de *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, p. 1983-1986, 1999.

MAYHEW, P.J. Adaptive patterns of host-plant selection by phytophagous insects, **Oikos**, Copenhagen, v. 79, 417-428, 1997.

MILANEZ, J.M. **Técnicas de criação e bioecologia de *Diabrotica speciosa* (Germar), 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae).** 1995. 102p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba,1995.

PEARMAN, P.B.; WILBUR, H.M. Changes in population dynamics resulting from oviposition in a subdivided habitat. **The American Naturalist**, Lancaster, v. 135, p. 706-723, 1990.

QUINN, M.A.; HOWER, A.A. Effects of root nodules and taproots on survival and abundance of *Sitona hispidulus* (Coleoptera: Curculionidae) on *Medicago sativa*. **Ecological Entomology,** London, v. 11, 391-400, 1986.

RANDLKOFER, B.; BERMAIER, E.O.; MEINERS, T. Mother's choice of the oviposition site: balancing risk of egg parasitism and need of food supply for the progeny with an infochemical shelter? **Chemoecology**, Basel, v. 17, p. 177–186, 2007.

RASMANN, S.; TURLINGS, T.C.J. Simultaneous feeding by aboveground and belowground herbivores attenuates plant-mediated attraction on their respective natural enemies. **Ecology Letters**, Oxford, v. 10, p. 926-936, 2007.

RESETARITS, W.J.; WILBUR, H.M. Choice of oviposition site by *Hyla chrysoscelis*: role of predators and competitors. **Ecology**, Durham, v. 70, p. 220-228, 1989.

ROSTÁS, M.; HILKER, M. Feeding damage by larvar of mustard leaf beetle deters conspecific females from oviposition and feeding. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Oxford, v. 103, p. 267-277, 2002.

SOLER, R.; HARVEY, J.A.; KAMP, A.F.D.; VET, L.E.M.; VAN DER PUTTEN, W.H.; VAN DAM, N.M.; STUEFER, J.F.; GOLS, R.; HORDJK, C.A.; BEZEMER, T.M. Root herbivores influence the behaviour of an aboveground parasitoid through changes in plant-volatiles signals. **Oikos**, Copenhagen, v. 116, p. 367-376, 2007.

SOLER, R.; SONJA, V.S.; BEZEMER, M.T.; CORTESERO, A.M.; HOFFMEISTER, T.S.; VAN DER PUTTEN, W.H.; VET, L.E.M.; HARVEY, J.A. Influence of presence and spatial arrangement of belowground insects on host-plant selection of aboveground insects: a field study. **Ecological Entomology**, London, v. 34, p. 339-345, 2009.

TURLINGS, T.C.J.; LENGWILER, U.B.; BERNASCONI, M.L.; WECHSLER, D. Timing of induced volatiles emissions in maize seedlings. **Planta**, Berlin, v. 207, p. 146-152, 1998.

VALLADARES, G.; LAWTON, J.H. Host-plant selection in the Holly leaf-miner: does mother knows best? **Journal of Animal Ecology,** New York, v. 60, p.227-240, 1991.

VAN DAM, N.M.; HARVEY, J.A.; WÄCKERS, F.L.; BEZEMER, T.M.; VAN DER PUTTEN, W.H.; VET, L.E.M. Interactions between aboveground and belowground induced responses against phytophages. **Basic and Applied Ecology**, Jena, v. 4, p. 63-77, 2003.

VAN DAM. N.M.; BEZEMER, T.M. Chemical communication between roots and shoots: towards and integration of aboveground and belowground induced responses in plants. In: DICKE, M.; TAKKEN, W. **Chemical Ecology**: from gene to ecosystem. Netherlands: Springer Press, 2006. p. 127-143.

WÄCKERS, F.L.; BEZEMER, M. Root herbivory induces an above-ground indirect defence. **Ecology Letters**, Oxford, v. 6, p. 9-12, 2003.

WISE, M. J.; WEINBERG, A.M. Prior flea beetle herbivory affects oviposition preference and larval performance of a potato beetle on their shared host plant. **Ecological Entomology**, London, v. 27, p. 115-122, 2002.

WOLFSON, J.L. Impact of rhizobium nodules on *Sitona hispidulus*, the clover root curculio. **Entomologia Experimentalis et Applicata,** Oxford, v. 43, p. 237-243, 1987.