**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Semioquímicos envolvidos no comportamento de acasalamento de
Cyrtomon luridus Boheman (Coleoptera: Curculionidae) e na
interação com a planta hospedeira *Duboisia* sp. (Solanaceae)**

Aline Cristiane Kamiya

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

**Piracicaba
2015**

Aline Cristiane Kamiya
Bacharel em Ciências Biológicas

**Semioquímicos envolvidos no comportamento de acasalamento de
Cyrtomon luridus Boheman (Coleoptera: Curculionidae) e na interação com a
planta hospedeira *Duboisia* sp. (Solanaceae)**
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2015

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Kamiya, Aline Cristiane

Semioquímicos envolvidos no comportamento de acasalamento de *Cyrtomon luridus* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) e na interação com a planta hospedeira *Duboisia* sp. (Solanaceae) / Aline Cristiane Kamiya. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.
82 p. : il.

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

1. Voláteis de planta 2. Dimorfismo sexual 3. Etograma 4. Cópula 5. Feromônio
6. Ecologia química I. Título

CDD 632.76
K15s

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

Aos meus pais,
Célia Maria Kamiya e Edson Shigueo Kamiya.
Ao meu marido Matheus Peres Chagas,
e ao meu filho, Pedro Kamiya Chagas,
por todo amor, sacrifício, dedicação, carinho, apoio
e incentivo incondicionais.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

É com muita satisfação que hoje olho ao meu redor e vejo que não completei esta jornada sozinha. São muitas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão desta importante etapa da minha vida. A elas, devo minha eterna gratidão.

Ao meu orientador, Professor José Maurício Simões Bento, pela orientação, competência e paciência. Pela oportunidade de desfrutar desse laboratório incrível.

Ao Departamento de Entomologia e Acarologia (ESALQ/USP), que me rendeu boas experiências profissionais e pessoais. Agradeço a cada funcionário, por toda a educação, esforço e dedicação que sempre me foi dispensada. Em especial, agradeço à Andrea, nossa tão dedicada secretária da pós-graduação.

A CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

A Fazenda Solana Agropecuária, por toda a assistência neste trabalho, pela bela acolhida nos dias de coleta e pelo carinho e dedicação de todos os funcionários. Em especial ao Engenheiro Agrônomo Paulo Tironi, por todo o esforço e pela sua empolgação na pesquisa.

Aos companheiros de laboratório que convivi durante estes quatro anos, Rejane, Ana Lia, Renata, André, Luiza, Mateus, Fernando, Davi, Camila, Carol, Talita, Camila Costa, Natália, Fernando Cabezas, Felipe, Rafaela, Amanda e Patrícia, agradeço imensamente por todos os auxílios prestados, pelas boas conversas e muitas risadas. Por toda a generosidade demonstrada.

Um agradecimento especial a Arodí, pela fundamental ajuda laboratorial, e um agradecimento mais que especial, pela sua amizade sincera.

Obrigada Maria Fernanda, Carla, Mariana e Franciele. Sobre tudo, pela amizade, que certamente, extrapola as barreiras do laboratório.

Obrigada à minha amiga Lucila, minha comadre, por toda a ajuda e companheirismo fora e dentro do laboratório.

Muito obrigada a Equipe Rocket Curculionidae! Uma improvável parceria, que de tão peculiar, tem sido um sucesso. Obrigada Weliton, Lucila e Mariana. Em especial, ao Weliton, exemplo de dedicação, obrigada por acreditar e incentivar constantemente. Obrigada por não desistir de me apoiar!

Obrigada a cada *Cyrtomon luridus*, a cada vida utilizada em prol desse pequenino passo rumo a um mundo mais equilibrado e menos poluído.

Agradeço a família maravilhosa que tenho, por todo o apoio, carinho, amor e incentivo! Também por toda a força e energia e torcida! Obrigada Fran, Diego, Vinícius, Tia Tânia, Memy, Bibi, Tia Fu, Nina, Murilo e Alice! Obrigada pai! Obrigada mãe!

Ao Matheus e ao Pedro, obrigada por cuidarem de mim e por me fazerem tão feliz.

A família Peres Chagas e as minhas grandes amigas da República Pinga-ni-mim sempre de braços abertos, por tanto carinho e pelas inestimáveis ajudas.

As pessoas e aos lugares maravilhosos com quem tive a imensa sorte de conhecer aqui em Piracicaba (Que eu adoro tanto!), meu muito obrigado.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 <i>Duboisia</i> sp. (Solanaceae)	15
2.2 <i>Cyrtomon luridus</i> Boheman (Coleoptera: Curculionidae).....	18
2.3 Uso de semioquímicos no controle de pragas.....	20
2.3.1 Feromônios em Curculionídeos.....	21
2.3.2 Interações entre feromônios e a planta hospedeira.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Insetos.....	25
3.2 Morfometria	25
3.3 Comportamento de acasalamento de <i>C. luridus</i>	26
3.4 Bioensaios olfatométricos.....	27
3.5 Coleta dos voláteis	29
3.6 Análise dos extratos por cromatografia gasosa acoplada a um detector eletroantenográfico (GC-EAD).....	30
3.7 Análise dos extratos eletrofisiologicamente ativos por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS).....	31
3.8 Análises estatísticas	31
4 RESULTADOS	33
4.1 Morfometria	33
4.2 Comportamento de acasalamento de <i>C. luridus</i>	35
4.3 Bioensaios olfatométricos.....	40
4.4 Análise dos extratos naturais de machos e fêmeas de <i>C. luridus</i> por cromatografia gasosa acoplada a um detector eletroantenográfico (GC-EAD) e por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (GC-MS)	41
5 DISCUSSÃO	49
5.1 Morfometria	49
5.2 Comportamento de acasalamento de <i>C. luridus</i>	50
5.3 Bioensaios olfatométricos.....	52

5.4 Análise dos extratos naturais de machos e fêmeas de <i>C. luridus</i>	53
6 CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS	59
ANEXO	69

RESUMO

Semioquímicos envolvidos no comportamento de acasalamento de *Cyrtomon luridus* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) e na interação com a planta hospedeira *Duboisia* sp. (Solanaceae)

Neste trabalho objetivou-se estudar o comportamento de acasalamento de *Cyrtomon luridus* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), bem como a presença de semioquímicos mediando o acasalamento e a interação com a planta hospedeira *Duboisia* sp. (Solanaceae). Machos e fêmeas adultos recém-emergidos foram coletados no campo e levados para o laboratório. Inicialmente foi determinado o melhor parâmetro morfológico para diferenciação de machos e fêmeas. Verificou-se que machos deste curculionídeo possuem a abertura genital oclusa pelo último tergito. O comportamento de acasalamento foi observado em casais virgens durante nove dias. Verificou-se que machos e fêmeas de *C. luridus* atingiram a maturidade sexual dois dias após a emergência. Machos e fêmeas realizaram acasalamentos repetidos com o mesmo parceiro em qualquer horário do dia. O comportamento de acasalamento deste curculionídeo foi dividido nas fases pré-copulatória, copulatória e pós-copulatória. Além disso, estudos de olfatometria revelaram que machos e fêmeas de *C. luridus* foram fortemente atraídos por voláteis de machos se alimentando sobre a planta hospedeira. A coleta e análise destes voláteis revelaram a presença dos compostos (*Z*)-3-hexenal, hexanal, (*E*)-2-hexenal, (*E*)-2-hexen-1-ol, fenilacetaldéido, linalol e geraniol, como eletrofisiologicamente ativos. O presente trabalho traz importantes informações sobre o comportamento de acasalamento e ecologia química de Entiminae e servirão de base para estudos com outras espécies desta importante subfamília de Curculionidae.

Palavras-chave: Voláteis de planta; Dimorfismo sexual; Etograma; cópula; Feromônio; Ecologia química.

ABSTRACT

Semiochemicals involved in the mating behavior of *Cyrtomon luridus* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) and interaction with the host plant *Duboisia* sp. (Solanaceae)

This work aimed to study the mating behavior of *Cyrtomon luridus* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), as well as the presence of semiochemicals mediating the mating and the interaction of the insects with the host plant, *Duboisia* sp. (Solanaceae). Newly emerged males and females adults were collected in the field and taken to the laboratory. Initially it determined the best morphological parameter to differentiate males and females. It was found that males possess the genital opening occluded by the last tergite. The mating behavior was observed in virgin couples for nine days. It was found that males and females *C. luridus* reached sexual maturity two days after emergence. Males and females made repeated matings with the same partner at any time of day. The mating behavior was clearly divided into the pre-copulatory, copulatory, and post-copulatory phases. In addition, olfactometric studies revealed that males and females *C. luridus* were strongly attracted to volatile males feeding on the host plant. The collection and analysis of these volatiles revealed the compounds (Z)-3-hexenal, hexanal, (E)-2-hexenal, (E)-2-hexen-1-ol, phenylacetaldehyde, linalool and geraniol as being electrophysiologically. The present work brings important information about the mating behavior and chemical ecology of Entiminae, which will serve as support for studies with other species of this important subfamily of Curculionidae.

Keywords: Plant volatiles; Sexual dimorphism; Ethogram; Copula; Pheromone; Chemical ecology

1 INTRODUÇÃO

Duboísia (*Duboisia* spp.) é uma planta medicinal, originária da Austrália e pertencente à família Solanaceae. De suas folhas são extraídos alcaloides tropânicos, empregados pela indústria farmacêutica na produção de medicamentos amplamente utilizados, em todo o mundo, para tratamentos respiratórios (ex.: Spiriva®) e para dores e cólicas (ex.: Buscopan®) (OHLENDORF, 2002; SCARAMUZZO, 2013).

Em Arapongas-PR está localizada a maior área plantada de duboísia do mundo, pertencente ao principal grupo fornecedor destes compostos farmacêuticos, tornando o Brasil a principal fonte dessa matéria-prima. Contudo, esta cultura possui uma série de insetos e nematoides, que comprometem sua produção (OHLENDORF, 2002; SCARAMUZZO, 2013,).

Cyrtomon luridus (Boheman) (Coleoptera: Curculionidae) é considerado a principal praga da duboísia no Brasil (TIRONI; TREUENFELS; PARRA, 2005). Do ponto de vista de controle, ainda existem muitas dificuldades para um manejo eficiente desta praga. *C. luridus* passa boa parte de sua vida no interior do solo na forma larval. Isso, além de dificultar uma estratégia para o seu manejo, como o uso de um produto químico, por exemplo, faz com que a ação destes produtos seja pouco eficiente, considerando que as larvas podem se aprofundar no solo. Os produtos existentes, por sua vez, não possuem registro para *C. luridus* ou para cultura, e há pouco interesse das empresas em registrá-lo devido ao baixo retorno econômico. Outro aspecto importante é a necessidade de que não haja nenhum tipo de resíduo químico no material vegetal a ser processado pela indústria, pois se trata de uma matéria prima para fins medicinais. Outras opções de controle como o biológico por meio de parasitoides, fungos ou nematoides foram pouco promissoras em campo (TIRONI; TREUENFELS; PARRA, 2004). Dentre as alternativas disponíveis, a rotação de culturas passou a ser a mais adotada visando a redução populacional da praga, após estudos prévios com a dinâmica populacional de *C. luridus* (TIRONI; TREUENFELS; PARRA, 2005).

Neste contexto, o uso de semioquímicos envolvendo *C. luridus* e a planta *Duboisia* sp., para o seu monitoramento e um possível controle seria bastante oportuno. O monitoramento poderia ser útil para detectar áreas livres e infestadas, bem como, para medidas localizadas de controle. Já os métodos de coleta massal,

confusão sexual ou mesmo manipulação genética da planta hospedeira poderiam ser utilizados diretamente no controle. Em qualquer das opções seu uso seria vantajoso do ponto de vista ambiental.

Pelo exposto, neste trabalho objetivou-se estudar o comportamento de acasalamento de *C. luridus*, bem como a presença de semioquímicos mediando o acasalamento e a interação com a planta hospedeira *Duboisia* sp.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Duboisia* sp. (Solanaceae)

A família Solanaceae possui mais de 3000 espécies de plantas distribuídas em 90 gêneros, com grande diversidade de porte, entre árvores e pequenas ervas anuais com distintas características morfológicas de flores e frutos, e ampla distribuição geográfica (KNAPP et al., 2004; MARTINEZ; ALMEIDA; PINTO, 2009).

Espécies desta família são utilizadas como alimento (ex.: *Solanum tuberosum* Linnaeus, batata; *S. lycopersicum* Linnaeus, tomate; e *S. melongena* Linnaeus, berinjela), drogas (ex.: *Nicotiana tabacum* Linnaeus e *N. rustica* Linnaeus, fumo; *Atropa belladonna* Linnaeus, beladona; *Mandragora officinarum* Linnaeus, mandrágora; *Duboisia* spp., fontes de alcaloides comerciais), e como ornamentais (ex: *Petunia hybrida*, petúnia; *Salpiglossis sinuata* Ruiz e Pavón; *Schizanthus pinnatus* Ruiz e Pavón) (RIOS; STACHALEK, 1999; KNAPP et al., 2004; SOUZA; LORENZI, 2005; RATSCH; STEADMAN; BOGOSSIAN, 2010).

Embora seu centro de origem e diversidade primária seja a região central da América do Sul, existem outros centros de diversidade secundária, como por exemplo, a Austrália, onde é encontrado o gênero *Duboisia* (SOUZA; LORENZI, 2005).

O gênero *Duboisia* possui espécies utilizadas na extração de princípios ativos, como *D. myoporoides* F. Muell, *D. hopwoodii* F. Muell e *D. leichhardtii* R. Brown, e sua distribuição natural compreende a Austrália e a Nova Caledônia. Estas plantas são popularmente conhecidas como corticeiras, devido ao aspecto de seu caule e seu emprego medicinal tem sido feito há muito tempo por aborígenes australianos (OHLENDORF, 2002; RATSCH, STEADMAN; BOGOSSIAN, 2010).

De acordo com Ohlendorf (2002), por volta de 1880, já se conhecia os princípios ativos escopolamina e hiosciamina em folhas de *D. myoporoides* e *D. leichhardtii*, bem como a nicotina e compostos relacionados em folhas de *D. hopwoodii*. Ainda segundo este autor, durante a Segunda Guerra Mundial, com a escassez dos medicamentos tradicionalmente utilizados, a *Duboisia* sp., passou a ser empregada em larga escala e adquiriu maior importância. Com o início da produção comercial a partir de 1941, novas pesquisas foram conduzidas visando a obtenção de genótipos ricos em escopolamina, e em 1945, as primeiras plantas híbridas com este propósito foram estabelecidas em campo.

Duboisia sp., um híbrido entre *D. myoporoides* e *D. leichhardtii* (OHLENDORF, 2002) foi introduzido no Brasil, vindo da Austrália há mais de 30 anos, sendo cultivado na fazenda Solana Agropecuária, em Arapongas-PR, e controlada pela farmacêutica Boehringer Ingelheim (Figura 1) (TIRONI; TREUENFELS; PARRA, 2005; SCARAMUZZO, 2013).

Figura 1 – (A) Planta de *Duboisia* sp. em altura apropriada para corte (~ 1,50 m). (B) Folhas e flores de duboísia

2.2 *Cyrtomon luridus* Boheman (Coleoptera: Curculionidae)

A família Curculionidae, possui cerca de 50 mil espécies descritas (OBERPRIELER; MARVALDI; ROBERT 2007), e suas principais características morfológicas são a presença de um rostro desenvolvido e antenas geniculadas (KUSCHEL, 1995 apud AMBROGI et al., 2009).

Muitos curculionídeos são considerados pragas de importância agrícola, como por exemplo, bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*, Boheman) (MAGALHÃES et al., 2012), moleque-da-bananeira (*Cosmopolites sordidus* Germar) (BEAUHAIRE, 1995), e broca-do-café (*Hypothenemus hampei* Ferrari) (SILVA et al., 2012); e de grãos armazenados, como o gorgulho-do-arroz (*Sitophilus oryzae* Linnaeus) (PHILLIPS et al., 1993).

Figura 2 – Fases de desenvolvimento de *Cyrtomon luridus*. (A) Postura (massa de ovos), (B) Larvas, (C) Pupa, e (D) Adultos em cópula

O gênero *Cyrtomon* possui sete espécies que ocorrem em regiões neotropicais da América do Sul, sendo quatro delas no Brasil. *C. luridus* está presente na região sul do Brasil – Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná – assim como Argentina e Paraguai (Figura 2) (MORRONE, 1999; LANTERI, 1990).

Após a emergência, *C. luridus* normalmente caminha em busca de uma planta hospedeira, e dificilmente alça voo. O adulto se alimenta de folhas enquanto as larvas atacam as raízes, podendo ser encontrados em solanáceas nativas, tais como o fumo-bravo, *Solanum mauritanium* Scopoli e coerana, *Cestrum intermedium* Sendt.; ou em solanáceas introduzidas como é o caso de *Duboisia* sp. (LANTERI; DÍAZ; MORRONE, 1994; TIRONI; TREUENFELS; PARRA, 2005).

Os sintomas de ataque nas plantas hospedeiras vão desde o amarelecimento e queda das folhas, até a morte das plantas, podendo ser encontradas até 60 larvas por planta (TIRONI; TREUENFELS; PARRA, 2005).

A dinâmica populacional de *C. luridus* foi descrito por Tironi, Treuenfels e Parra (2005) em áreas com plantas de *Duboisia* sp. O período larval foi de 120 a 150 dias (janeiro a maio), sendo as larvas observadas em uma profundidade de $24,9 \pm 8,6$ a $45,0 \pm 10,0$ cm. A fase de pupa teve início em abril, com seu auge em junho do mesmo ano. Os primeiros adultos apareceram no solo em julho. Contudo, o pico de emergência se deu na estação chuvosa, entre setembro e outubro, estendendo-se até janeiro do ano seguinte. Ainda segundo estes autores, a partir de casais estabelecidos em vasos contendo folhas de *Duboisia* sp. como alimento, foi possível avaliar que o período de pré-oviposição de *C. luridus* durou $24,0 \pm 2,8$ dias, enquanto que a oviposição se estendeu por até 16 semanas. A longevidade da fêmea foi de $113,7 \pm 15,2$ dias e sua capacidade de postura de $42,7 \pm 7,9$ massas de ovos, com $9,4 \pm 0,61$ ovos por massa, totalizando $402 \pm 72,9$ ovos por fêmea. A fase

de ovo durou 25-30 dias, o desenvolvimento larval 120 a 150 dias, e pupal 30 dias em média. Por fim, estes autores concluíram com base nos dados observados em campo e dos casais mantidos em vasos, que *C. luridus* é univoltino.

Os métodos de controle para *C. luridus* são ainda pouco estudados e os atualmente utilizados são pouco eficientes. *C. luridus* passa boa parte de sua vida no interior do solo na forma larval o que dificulta uma estratégia viável para o seu controle. Os produtos químicos disponíveis são pouco eficientes – considerando que as larvas podem se aprofundar no solo. Além do mais, não possuem registro para *C. luridus* ou para cultura, e há pouco interesse das empresas em registrá-lo devido ao baixo retorno econômico. Em razão de se tratar de uma planta para uso medicinal também não pode haver resíduos de produtos químicos, o que dificulta ainda mais o uso destes compostos. Outras opções como o controle biológico foram pouco promissoras em campo, especialmente, por meio de parasitoides, como *Microctonus* sp. (Hymenoptera: Braconidae) (TIRONI; TREUENFELS; PARRA, 2004), fungos e nematoides (TIRONI, informação pessoal).

2.3 Uso de semioquímicos no controle de pragas

Os insetos exercem suas relações ecológicas com o ambiente e com os outros organismos de várias maneiras, sendo uma das mais importantes a comunicação por meio de compostos químicos. Estes compostos no indivíduo receptor da mensagem química agem como gatilhos fisiológicos de reações comportamentais específicas. Em uma nomenclatura mais generalista estas substâncias são denominadas de semioquímicos. É através da detecção e emissão destes compostos que os insetos encontram parceiros para o acasalamento, alimento ou presa, escolhem local de oviposição, se defendem contra predadores e organizam suas comunidades, no caso dos insetos sociais (ZARBIN; RODRIGUEZ; LIMA, 2009).

Os semioquímicos são subdivididos segundo o tipo de interação inter ou intraespecífica e com base nos custos e benefícios de cada organismo. Os aleloquímicos são mediadores de interações entre dois indivíduos de espécies diferentes (ação interespecífica), enquanto os feromônios são utilizados entre indivíduos de mesma espécie (ação intraespecífica) (ZARBIN; RODRIGUEZ; LIMA, 2009; ROITBERG; ISMAN, 1992).

Entre os insetos, diferentes tipos de feromônios são reconhecidos através dos comportamentos que estes compostos produzem no receptor da mensagem. Os comportamentos mais comuns mediados por feromônio são: a atração de indivíduos do sexo oposto para acasalamento, denominados de feromônios sexuais; a agregação de indivíduos de ambos os sexos para um local específico para alimentação e/ou de acasalamento, através de feromônios de agregação; a demarcação de espaço ou formação de trilhas, comportamento comum em formigas, através de feromônios classificados como de marcação ou trilha. (ZARBIN; RODRIGUEZ; LIMA, 2009).

2.3.1 Feromônios em Curculionídeos

O uso de feromônios de pragas constitui uma técnica bastante promissora para utilização no MIP, uma vez que a utilização de inseticidas para o controle de curculionídeos-praga não tem sido muito eficiente, uma vez que esses insetos geralmente são brocas, alimentam-se dentro de frutos, caules e sementes (AMBROGI et al., 2009).

A maioria dos feromônios em gorgulhos é produzida pelos machos e normalmente, atraem ambos os sexos a grandes distâncias, este tipo de feromônios é denominado feromônio de agregação (BARTELT, 1999). A função dos feromônios de agregação é a de auxiliar os machos na atração de fêmeas para seleção sexual e potencializar a cópula. No entanto, o feromônio só é produzido na presença de alimento, atraindo ambos os sexos; sendo que muitos machos respondem de forma oportuna, representando custos para o macho emissor em termos de maior competência por cópula e alimento (BIRKINSHAW; SMITH 2000).

Existem evidências da produção de outros feromônios pelos curculionídeos em algumas espécies: (i) fêmeas que produzem feromônios sexuais de longa distância atraindo exclusivamente machos; (ii) feromônios de contato de curta distância que atuam sobre o corpo destes insetos, permitindo o reconhecimento de machos coespecíficos; e (iii) feromônios deterrentes que impedem a oviposição, utilizados por fêmeas para marcar seu hospedeiro e evitar que seja ovipositado por outras. Além disso, há exemplos de kairomônios usados pelos gorgulhos com outras espécies de besouros (BARTELT, 1999). No caso de *Dendroctonus brevicornis* (Coleoptera: Scolytidae), além do feromônio de agregação, existe também a

presença um feromônio que inibe a agregação após a colonização do seu hospedeiro por certo número de indivíduos, para evitar a chegada de mais concorrentes (HOWSE; STEVENS; JONES, 1998).

Estudos comportamentais com gorgulhos apresentam relativa dificuldade, pois estes insetos respondem aos feromônios com pequenos saltos, vôos ou caminharmento, tornando os bioensaios em laboratório demorados e delicados. Muitos feromônios de gorgulhos são constituídos por misturas de compostos que atuam sinergicamente, e a ausência de um composto chave durante a síntese pode comprometer a ação dos demais compostos que estimulam o comportamento (BARTELT, 1999).

Técnicas modernas de cromatografia gasosa acoplada ao eletroantenograma (GC-EAD) favorecem a determinação de componentes dos feromônios dos gorgulhos, obtendo-se assim progressos mais rápidos de identificação. Portanto, é possível determinar qual composto volátil tem atividade sensorial e a informação pode ser combinada e comparada com a GC dos voláteis derivados dos machos e das fêmeas para o reconhecimento dos componentes específicos dos feromônios (BARTELT, 1999).

Ambrogi e colaboradores (2009), em uma revisão de feromônios de agregação da Família Curculionidade, cita 28 espécies de curculionídeos com seus feromônios de agregação identificados. No bicudo-do-algodoeiro, *Anthononous grandis*, o feromônio de agregação é produzido pelo macho e foi o primeiro feromônio de um gorgulho identificado com quatro compostos, sendo 'Grandisol' o principal (FRANCKE; DETTNER, 2005). Atualmente, esse feromônio é utilizado para detecção, monitoramento e supressão das populações de bicudo no campo. A fêmea possui um feromônio de curta distância encontrado nas fezes, mais ainda não se conhece sua real atividade. Além disso, este inseto possui outro feromônio de deterência da oviposição ou feromônio de marcação do hospedeiro.

Na broca-da-bananeira *Cosmopolites sordidus*, o macho produz um feromônio e ambos os sexos respondem (BARTELT, 1999), sendo o feromônio representado por um alto grau de oxigenação ao longo da cadeia (1S, 3R, 5R, 7S), denominado 'Sordidin' (FRANCKE; DETTNER, 2005). Segundo Viana e Vilela (1996), além do feromônio de agregação dos machos, a mistura entre voláteis do rizoma da bananeira e a presença de fêmeas de *C. sordidus* atraem os machos. Nesta espécie, os voláteis da planta hospedeira exercem uma forte atração nos adultos,

sendo este comportamento observado em vários outros curculionídeos (CUILLÉ, 1950, *apud* VIANA; VILELA, 1996).

Algumas pragas de importância econômica na cana-de-açúcar no mundo têm estudos com feromônios como, por exemplo, *Metamasius hemipterus* (L.), *Diaprepes abbreviatus* (L.), e *Rhabdoscelus obscurus* (Boisduval). *M. hemipterus* apresenta feromônio de agregação, sendo o principal componente o 'Ferruginol', identificado como sendo o 4-Methyl-5-Nonanol, além de outros compostos minoritários específicos do macho (BARTLELT, 1999; FRANCKE; DETTNER, 2005). Em *D. abbreviatus* ambos os sexos produzem um feromônio, associado às fezes, mais ainda não foi identificado quimicamente, devido às dificuldades dos estudos com feromônios nestas espécies e pela alta resposta aos odores da planta hospedeira. Já para a espécie *R. obscurus*, estudos preliminares no laboratório e campo demonstraram que os machos produzem um feromônio que atrai principalmente as fêmeas. A atividade deste feromônio está associada com o abdômen do macho, a parte posterior do intestino e as fezes (BARTLELT, 1999).

Muitos feromônios já são produzidos comercialmente e têm sido utilizados com sucesso no monitoramento e controle de coleópteros pragas, tais como *C. sordidus*, *A. grandis*, *Migdolus fryanus*, *Rhynchophorus palmarum*, *Hypothenemus hampei* entre outros (GOULART, 2015; TINZAARA et al., 2003; MOURA et al., 1997; AQUINO et al., 1986, SANTOS & HOFER 1996, FAVERO et al., 1993). A utilização de feromônios para monitoramento desses insetos facilita a determinação da dinâmica populacional, auxiliando a tomada de decisão do agricultor no manejo dos insetos. O controle de curculionídeos utilizando feromônios tem sido feito principalmente por meio de coleta massal e com grande sucesso, uma vez que os feromônios atraem ambos os sexos (AMBROGI et al., 2009).

2.3.2 Interações entre feromônios e a planta hospedeira

As plantas hospedeiras têm um papel importante na origem do feromônio de muitos insetos fitófagos, estes adquirem compostos químicos bioativos que integram o feromônio ou serão precursores químicos para um componente feromonal. Estes compostos químicos podem ser obtidos via consumo, absorção ou inalação de material da planta hospedeira (REDDY; GUERRERO, 2004).

A mediação do feromônio na agregação dos coleópteros, particularmente aqueles atrativos produzidos pelos machos, é reconhecido por estar inter-

relacionados com a presença de alimento (material da planta hospedeira) nos trabalhos de Borden (1985). Os primeiros estudos com identificação de feromônios das espécies de besouros-da-casca (Coleoptera: Scolytidae), cuja biologia do feromônio sexual, incluindo a biossíntese de feromônio e a atratividade, são integrados com os odores químicos da árvore hospedeira, foram realizados por Wood (1982).

Os voláteis da planta hospedeira podem induzir a produção ou liberação de feromônios em certos insetos e também podem ter um efeito inibitório ou repelente, interrompendo a resposta dos insetos aos seus próprios feromônios. Em outros casos, compostos derivados da planta hospedeira, após um ataque de herbívoro, podem atrair predadores, servindo como um mecanismo de defesa para a planta (REDDY; GUERRERO, 2004). Porém, há casos em que os voláteis de planta podem provocar uma resposta positiva sobre o comportamento dos insetos em resposta a feromônios liberados em associação com a planta hospedeira. Este efeito pode resultar em sinergismo, no qual a resposta à mistura de produtos voláteis de feromônios e da planta é maior do que as respostas aos componentes individuais (DICKENS et al., 1990; 1993).

Vários estudos sobre a resposta ao sinergismo entre feromônios e os odores da planta hospedeira tem sido realizados para as várias ordens de insetos, incluindo lepidópteros, coleópteros e dípteros (LANDOLT et al., 1992; DICKENS et al., 1990; 1993; REDDY; GUERRERO, 2000; DENG et al., 2004; ZARBIN et al., 2007; TAFOYA et al., 2007; LESKEY et al., 2014).

Diversos trabalhos demonstram o sinergismo entre o feromônio e os voláteis da planta em curculionídeos. Testes em campo demonstraram que o rincoforol, feromônio de agregação de *Rhynchophorus palmarum*, apresenta uma maior eficiência quando associado com pedaços de cana, estipe do coqueiro ou frutos do abacaxi (ROCHAT et al., 1993; WEISSLING et al., 1992; DUARTE et al., 2003).. Em *Metamasius spinolae*, testes de campo mostraram maior atratividade dos insetos para as armadilhas contendo os compostos feromonais junto da planta hospedeira (TAFOYA et al., 2007). Testes em laboratório utilizando olfatômetro em Y com a broca do mamoeiro (*Pseudopiazurus obesus*) demonstraram que tanto machos como fêmeas são atraídos para uma combinação dos voláteis emitidos pelos machos da espécie e pela planta hospedeira (ZARBIN et al., 2007). Segundo WEISSLING e colaboradores (1994), machos de *R. cruentatus* são os responsáveis

pela liberação de um feromônio de agregação que é altamente atrativo para ambos os sexos quando combinado com os voláteis da planta hospedeira.

Machos de *Pissodes approximatus* juntamente com a planta hospedeira atraíram machos e fêmeas coespecíficos em testes de campo fornecendo assim em a primeira evidência de um feromônio de agregação em *Pissodes* (BOOTH; LANIER, 1974). Grandisol, 2a e seu aldeído correspondente grandisal, 1a, foram isolados de machos de *P. approximatus*, *P. nemorensis* e *P. strobi* e mostraram ter atratividade feromonal quando junto da planta hospedeira (PHILIPS et al., 1984).

Ceruti (2007), conclui que os efeitos das plantas hospedeiras em relação ao comportamento pelo feromônio parece ser parte das estratégias dos machos em maximizar encontros com as fêmeas, bem como das fêmeas quanto ao acesso a novos recursos de alimentação e locais de oviposição.

O aumento da atração de machos e/ou fêmeas, pelos odores da planta hospedeira sugere que possam ser desenvolvidas armadilhas mais efetivas para o controle de pragas. Iscas baseadas somente em feromônio sintético não são completamente atrativas para a maioria dos insetos e são improváveis de serem completamente competitivas com os sinais que emanam das plantas hospedeiras e dos alimentos. Na prática, o uso de semioquímicos aproveita o sinergismo existente entre os feromônios de agregação e os cairomônios de plantas, melhorando a atração da praga alvo resulta em maiores chances de sucesso para o manejo integrado de pragas, pode-se utilizar os semioquímicos para minimizar os custos de controle de pragas, por exemplo, combinando pequenas quantidades de ingredientes ativos feromonais, de custo elevado, acrescentando pequenas quantias de voláteis de plantas, mais baratos, misturados ao feromônios (CERUTI, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Insetos

Adultos virgens recém-emergidos de *C. luridus* foram coletados em uma plantação de *Duboisia* sp. na Fazenda Solana Agropecuária em Arapongas, PR. Os besouros foram coletados pelo revolvimento do solo abaixo da copa do arbusto para exposição das câmaras pupais contendo os adultos recém-emergidos. Os insetos foram mantidos individualizados em potes plásticos e enviados ao Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos, da ESALQ/USP, Piracicaba, SP. Os besouros foram mantidos em uma sala climatizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, U.R. $70 \pm 10\%$, fotoperíodo 12:12h) até a realização dos experimentos.

3.2 Morfometria de adultos de *C. luridus*

Inicialmente foi necessária a determinação dos caracteres morfológicos que auxiliaram, posteriormente, na separação de machos e fêmeas de *C. luridus* para a realização dos demais experimentos do presente trabalho. Para isso, imagens das partes do corpo do inseto foram geradas sob um microscópio estereoscópico Zeiss, modelo Stemi 2000-C, acoplado a uma câmera fotográfica digital Casio (A640). Essas imagens foram analisadas e as medidas das estruturas do corpo tomadas com o programa Motic Image Plus®.

Adultos de *C. luridus* (20 machos e 20 fêmeas) foram inicialmente mortos por congelamento em um freezer (-24°C) e, em seguida, tomados os seguintes dados morfométricos: (i) comprimento do corpo (CC), (ii) largura do corpo (LC), (iii) comprimento do pronoto (CP), (iv) largura do pronoto (LP), (v) comprimento do último esternito (CE), (vi) largura do último esternito (LE), (vii) comprimento da cabeça (CCb), (viii) largura da cabeça na região das antenas (LA), e (ix) largura da cabeça na região dos olhos (LO) (Figura 3). Além disso, foram observados: (i) padrão de inserção da antena no rostro, (ii) número de antenômeros, (iii) número de espinhos nos tarsos, (iv) número e forma dos segmentos abdominais, (v) coloração, e (vi) distribuição da pilosidade aparente pelo corpo.

Os sexos dos indivíduos analisados foram confirmados por dissecação das estruturas reprodutivas (edeago e ovipositor).

Figura 3 – Esquema utilizado para as medidas morfométricas (mm) de diferentes partes do corpo de machos e fêmeas de *Cyrtomon luridus*

3.3 Comportamento de acasalamento de *C. luridus*

O comportamento de acasalamento foi observado em 28 casais virgens recém-emergidos de *C. luridus*, colocados individualmente em gaiolas plásticas (35 cm altura × 20 cm diâmetro interno) forradas com papel de filtro umedecido com água destilada. Diariamente foi colocado um ramo com 10 folhas de *Duboisia* sp. em cada gaiola como alimento para os insetos. Os recipientes foram cobertos com filme de PVC para evitar a fuga de insetos e manter a umidade relativa dentro da gaiola.

O comportamento de acasalamento foi observado no laboratório em intervalos de duas horas durante nove dias, quando foram determinados os seguintes parâmetros: (i) idade da primeira cópula; (ii) número de cópulas por casal; e (iii) horário de acasalamento. Para o horário do acasalamento, foram utilizados os dados do dia em que ocorreram a maioria dos acasalamentos. Durante a noite, os insetos

foram observados com luz de comprimento de onda vermelho para não interferir em seu comportamento.

Em um experimento posterior, para determinar a sequência de acasalamento e o tempo gasto na realização de cada fase da sequência comportamental de acasalamento, 28 casais de *C. luridus* de idade na qual eles exibem maior atividade sexual foram colocados individualmente em gaiolas e filmados continuamente por 24 h com uma câmera digital Sony modelo HDR-SR12. Os vídeos foram transferidos para um computador e analisados com um “software” de edição de vídeos da Sony®. Adicionalmente, um etograma do comportamento de acasalamento de *C. luridus* foi construído, no qual foi mostrada a proporção de casais que realizaram cada fase comportamental.

A partir das observações, apenas as sequências de comportamento que resultaram em cópulas de sucesso foram incluídas nas análises.

3.4 Bioensaios olfatométricos

As respostas olfativas de machos e fêmeas de *C. luridus* aos voláteis de coespecíficos com ou sem a planta hospedeira, *Duboisia* sp., foram determinadas. Foi utilizado um olfatômetro de vidro do tipo ‘Y’ (3 cm de Ø interno para cada parte do ‘Y’; 40° de ângulo entre os braços; comprimento do tubo principal de 40 cm, e comprimento de cada braço de 20 cm), o qual foi conectado pelos braços a duas câmaras de vidro (9,5 cm Ø interno x 51 cm de altura).

Cada tratamento foi colocado dentro das câmaras de vidro. Por meio de um compressor, houve o fornecimento de ar purificado através de filtros de carvão ativado e, posteriormente, umidificado num sistema coletor de voláteis (‘Research Analytical Systems’, Gainesville-FL, EUA). Este sistema promoveu a circulação do ar no sistema a um fluxo constante de 600 mL/min em direção às câmaras de vidro (tratamentos) e ao olfatômetro ‘Y’ (Figura 4).

Machos e fêmeas virgens de *C. luridus* com quatro dias de idade foram inseridos individualmente na abertura do tubo principal do olfatômetro. Uma vez dentro do olfatômetro, os besouros foram observados por um período máximo de 20 minutos, durante o qual a escolha por um dos tratamentos foi feita. A escolha dos insetos por um dos tratamentos foi considerada após ter sido cruzada uma linha tracejada feita a 1 cm da porção final de cada braço do olfatômetro e permanecido lá

por pelo menos 20 segundos. Todos os bioensaios foram realizados entre as 10h:00min e 16h:00min (horário local), que coincidiu com o período de maior atividade dos adultos de *C. luridus* no campo.

Os bioensaios foram realizados com os seguintes tratamentos: (i) dois machos sozinhos; (ii) duas fêmeas sozinhas; (iii) dois machos + planta hospedeira (uma muda de *Duboisia* sp. de 30 cm de altura)(insetos se alimentam na planta); (iv) duas fêmeas + planta hospedeira (insetos se alimentam na planta); (v) planta hospedeira sozinha; (vi) branco (ar limpo).

Todos os insetos e plantas foram utilizados somente uma vez. Os besouros que não escolheram nenhum dos braços do olfatômetro foram desconsiderados das análises. A posição das fontes de odor em cada braço foi revezada após cada repetição para eliminar algum efeito de posição.

Após cada cinco repetições, o olfatômetro e as câmaras foram lavadas com Extran® (10%), álcool (99,5%), acetona (99,5%), e água destilada; e secadas em estufa a 160 °C por uma hora.

Figura 4 – (A) Olfatômetro ‘Y’ utilizado nos bioensaios com *Cyrtomon luridus*. (B) Cubas contendo plantas de *Duboisia* sp. utilizados nos bioensaios de olfatômetro ‘Y’

3.5 Coleta dos voláteis

Os voláteis de machos e fêmeas adultos de *C. luridus* com ou sem a planta hospedeira foram coletados por 24 h em câmaras de vidro horizontais (7,0 cm Ø interno x 20 cm de comprimento) (Figura 5). A entrada de cada câmara foi conectada a um sistema de coleta de voláteis (*Research Analytical Systems*, Gainesville-FL, EUA), que introduz o ar purificado e umidificado a um fluxo constante e uniforme de 500 mL/min. Na saída da câmara foi conectada uma coluna de vidro (7,5 de comprimento x 0,5 cm Ø interno) contendo 50 mg de polímero adsorvente Hayesep® (80/100 mesh; Supelco, Bellefonte, PA, USA).

Os voláteis foram coletados dos seguintes tratamentos: (i) machos; (ii) fêmeas; (iii) machos + duboísia (5 folhas da planta embebidas na base em um frasco de 5 mL de água destilada); (iv) fêmeas + duboísia; (v) duboísia e (vi) branco (ar limpo).

Os voláteis foram eluídos das colunas com duas alíquotas de 250 µL de diclorometano (SupraSolve®, Merck KGaA; Largo, FL, USA) em vials de 2 mL. Os extratos foram mantidos em freezer a -30 °C até a realização das análises.

Figura 5 – Adultos de *Cyrtomon luridus* em câmaras de aeração horizontais para a extração dos voláteis acoplados à coluna de extração (círculo tracejado vermelho)

3.6 Análise dos extratos por cromatografia gasosa acoplada a um detector eletroantenográfico (GC-EAD)

Os compostos fisiologicamente ativos dos extratos naturais foram determinados em um cromatógrafo a gás (GC) (Shimadzu GC-2010) equipado com detector de ionização de chama (FID) e uma coluna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m; Agilent J&W, Califórnia-EUA) acoplado a um detector eletroantenográfico (EAD) (IDAC-2; Syntech EAD System; Hilversum, The Netherlands) (GC-EAD). O hélio foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 1 mL/min, sendo que as temperaturas do injetor e detector foram mantidas, respectivamente, a 250 °C e 300 °C. A temperatura da coluna foi mantida, inicialmente, a 35 °C/1min, depois aumentada a uma taxa de 2 °C/min até 40 °C na qual permaneceu por 1 min e, finalmente, atingiu 250 °C a uma taxa de 10 °C/min e mantida nesta por 10 min.

Uma antena de macho ou fêmea de *C. luridus* foi cortada na base do escapo com auxílio de um bisturi e suas extremidades foram colocadas sobre dois eletrodos de aço inoxidável contendo uma fina camada de gel condutor (Spectra 360 Electrode Gel; Parker Laboratories, INC., Fairfield, NJ, USA). Os eletrodos foram conectados em um amplificador de sinal (EAD-Kombi Probe, Synthech, Hilversum, The Netherlands). A antena preparada foi mantida na porção final de um tubo de vidro conectado na saída da linha transferidora do GC. Uma bomba de pressão manteve um fluxo constante e uniforme (250mL/min) de ar umidificado para o arraste dos compostos até a antena.

Dois microlitros de extrato natural foram injetados em modo “splitless”. O efluente da coluna foi repartido a uma proporção de 1:1 (v/v), onde uma parte foi direcionada para o detector (FID) e, simultaneamente, a outra parte foi direcionada para a antena conectada ao EAD. O sinal elétrico da antena foi armazenado e analisado em um computador contendo o “software” EAD versão 2.3 (Synthech, Hilversum, The Netherlands).

Foram utilizadas 15 antenas de machos e 15 antenas de fêmeas para cada extrato analisado. Os compostos que apresentaram um pico no EAD correspondente a um pico no FID em, pelo menos, cinco repetições foram considerados eletrofisiologicamente ativos.

3.7 Análise dos extratos eletrofisiologicamente ativos por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS)

Um microlitro dos extratos naturais de machos e fêmeas de *C. luridus* foram injetados em modo “splitless” no cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (GC-MS QP2010 Shimadzu Corporation, Kyoto-Japão), equipado com uma coluna capilar HP-5MS (30m x 0.25mm x 0.25µm) (Agilent J&W, Califórnia-EUA). O hélio foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 1 mL/min. Tanto a linha transferidora como a fonte de íons foram mantidas a 250 °C. A fim de evitar a isomerização dos analitos de interesse, a temperatura do injetor foi mantida a 100 °C. A programação de temperatura do forno foi a mesma utilizada para as análises eletroantegráficas (ver item 3.6). Os espectros foram obtidos a 70eV no modo de impacto de elétrons (EI).

Os cromatogramas dos extratos de macho e fêmea foram comparados entre si para diferenciar os compostos químicos exclusivos de cada sexo liberados na presença ou ausência da planta. O extrato natural da planta foi utilizado para discriminar os compostos químicos exclusivos da planta, presentes nos extratos naturais de machos e fêmeas.

3.8 Análises estatísticas

Para os dados referentes à análise morfométrica de machos e fêmeas de *C. luridus*, foi realizada a análise de variância e do teste de comparação de médias Tukey ($P < 0,05$).

A frequência de acasalamento de *C. luridus* ao longo do tempo foi analisada utilizando-se uma equação generalizada de estimativa (modelo GEE) com uma função logit-link. Foi empregado o modelo linear generalizado para dados binários (acasalamento ou não acasalamento) com medidas repetidas no tempo para verificar o efeito da hora do dia (hora) sobre a frequência de acasalamento ($\alpha = 0,05$). Para isso, foram utilizados os casais que apresentaram a maior atividade sexual. O cálculo foi executado no software R usando o pacote 'geepack'.

A idade do primeiro acasalamento foi determinada usando a análise de sobrevivência de Kaplan-Meier com o pacote R 'sobrevivência'. A análise de sobrevivência é uma técnica de análise de 'tempo-para-evento' ou dados 'falha de

tempo', que pode ou não estar relacionada com a sobrevivência e morte no sentido habitual (GOEL et al., 2010). Para calcular a curva de Kaplan-Meier, a probabilidade de ocorrência do primeiro acasalamento foi obtida a partir da proporção da chance dos adultos de *C. luridus* realizarem a primeira cópula. A probabilidade cumulativa foi iniciada com o acasalamento não ocorrendo. A significância estatística foi determinada utilizando um log-rank (Teste de Mantel-Cox) teste ($\alpha = 0,05$).

Para os bioensaios em olfatômetro visando determinar se o número de machos e fêmeas de *C. luridus* que escolheram uma fonte odor no olfatômetro utilizou-se o teste binomial ('Sign Test'), considerando uma escolha aleatória de direção. Todos os testes e análises foram realizados com a versão do software R 3.1.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012).

4 RESULTADOS

4.1 Morfometria

As medidas das estruturas corpóreas nas fêmeas de *C. luridus* foram superiores as observadas nos machos, exceto pelo comprimento do último esternito (CE) que não diferiram (Tabela 1) (Figura 6).

Tabela 1 - Média $\pm$ erro padrão e intervalos de confiança (95 %) das medidas (mm) das estruturas do corpo de machos e fêmeas de *Cyrtomon luridus* (n = 20 indivíduos por sexo). CCb = comprimento da cabeça; LA = largura da cabeça na região das antenas; LO = largura da cabeça na região dos olhos; CP = comprimento do pronoto; LP = largura do pronoto; CC = comprimento do corpo; LC = largura do corpo; CE = comprimento do último esternito; e LE = largura do último esternito

Estrutura (mm)	Macho	Fêmea
Cabeça (CCb)	5,08 $\pm$ 0,05 a (4,73 – 5,64)	6,06 $\pm$ 0,06 b (5,77 – 6,40)
Cabeça (LA)	2,44 $\pm$ 0,66 a (1,6 – 2,0)	2,94 $\pm$ 0,46 b (1,9 – 2,3)
Cabeça (LO)	1,78 $\pm$ 0,38 a (1,9 – 2,7)	2,08 $\pm$ 0,33 b (2,7 – 3,5)
Pronoto (CP)	3,82 $\pm$ 1,12 a (3,3 – 4,3)	4,27 $\pm$ 0,76 b (3,7 – 4,6)
Pronoto (LP)	4,32 $\pm$ 0,83 a (3,8 – 4,5)	4,90 $\pm$ 0,87 b (4,4 – 5,4)
Corpo (CC)	19,65 $\pm$ 0,38 a (16,4 – 21,8)	23,09 $\pm$ 0,43 b (21,2 – 24,9)
Corpo (LC)	6,57 $\pm$ 0,07 a (6,22 – 6,99)	8,05 $\pm$ 0,14 b (7,15 – 8,98)
Último Esternito (CE)	2,40 $\pm$ 0,05 a (2,0 – 2,63)	2,45 $\pm$ 0,05 a (2,15 – 2,66)
Último Esternito (LE)	4,02 $\pm$ 0,09 a (3,5 – 4,7)	4,58 $\pm$ 0,07 b (4,3 – 4,9)

Médias seguidas de mesma letra, na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Machos e fêmeas de *C. luridus* não diferiram quanto aos números de antenômeros, espinhos nos tarsos e de segmentos abdominais; bem como na pilosidade aparente, coloração e inserção da antena. Das estruturas analisadas

neste trabalho, apenas a morfologia dos últimos segmentos abdominais apresentaram diferenças.

Figura 6 – Comparação do tamanho corporal de uma fêmea (contorno preto) e um macho (contorno vermelho) de *Cyrtomon luridus*

Nas fêmeas de *C. luridus* foi observado a porção final do ovipositor dentro da cavidade, enquanto que nos machos, a abertura genital, por onde sai o edeago, era oclusa pelo oitavo tergito abdominal (Figura 7).

Figura 7 – (A) Final do abdômen de macho de *Cyrtomon luridus* com a abertura genital oclusa pelo 8º tergito (último). (B) Final do abdômen de fêmea com a abertura genital exposta e o 7º tergito aparente (penúltimo)

Nas fêmeas, quando a compressão manual no abdômen ocorre, o tergito aparente foi o penúltimo, ou seja, o sétimo, que recobre o último tergito, acobertando-o (Figura 7B). O oitavo tergito da fêmea possui pouca pilosidade, sendo menor em comparação ao último tergito do macho, e só pode ser observado quando a fêmea exibiu o ovipositor. Nos machos o último tergito possui grande pilosidade, sendo curvado e maior do que a fêmea, não sendo encoberto pelo penúltimo tergito. O último tergito do macho pode ser facilmente observado, mesmo sem o auxílio de lupa, e recobre a abertura genital (Figura 7A).

4.2 Comportamento de acasalamento de *C. luridus*

O efeito da idade sobre a ocorrência da primeira cópula foi significativo em *C. luridus* ($\chi^2 = 41,9$; gl = 27; $P < 0,05$; n = 15). A curva de Kaplan - Meier mostrou que os casais adultos iniciaram os acasalamentos $2,0 \pm 0,1$ dias após a emergência (Figura 8). Os insetos acasalaram $3,9 \pm 0,5$ vezes durante os nove dias de avaliação. A atividade de acasalamento ocorreu em quase qualquer horário, embora dois picos significativos foram observados – na 7ª hora da fotofase e 3ª hora da escotofase – durante as 24 horas de avaliação ($\chi^2 = 14521$; gl = 11; $P < 0,0001$; n = 15 casais de 4 d de idade) (Figura 9).

Figura 8 – Curva de Kaplan-Meier da idade de primeira cópula de adultos de *Cyrtomon luridus* (n=15 casais). Linhas pontilhadas indicam o intervalo de confiança de 95%

A sequência de acasalamento em *C. luridus* exibiu três fases distintas:

A fase pré-copulatória iniciou quando o macho se aproximou da fêmea. A aproximação do macho ocorreu pela parte posterior, frontal ou lateral da fêmea (Figura 10a). Após a aproximação, o macho tateou com a antena e friccionou com o rostro o élitro e o pronoto da fêmea assim que ele iniciou a monta (Figura 10b). No entanto, nenhum comportamento de cortejo ocorreu antes da monta. O macho montou a fêmea somente por trás (Figura 10c). Após a monta, o macho moveu seu corpo para frente e realizou fricções rostrais e tateamento antenal sobre a cabeça e o pronoto da fêmea por poucos segundos (Figura 10d). Em seguida, o macho se moveu para trás e curvou seu abdome ventralmente e evertiu seu edeago. O macho depois tentou o acoplamento genital tateando o final do abdome da fêmea com o seu edeago evertido (Figura 10e).

Na fase copulatória, o macho posicionou o corpo em aproximadamente 45° em relação ao da fêmea e inseriu o edeago na câmara genital (Figura 10f). Durante o acasalamento, a fêmea permaneceu imóvel, moveu-se vagarosamente a curtas distâncias ou movimentou as antenas e as pernas anteriores. Além disso, o macho realizou o tateamento antenal sobre o pronoto da fêmea. Após o período de cópula a fêmea iniciou a finalização do acasalamento empurrando o abdome do macho com as pernas posteriores (Figura 10g), ou caminhando rapidamente com o macho sobre ela. A fase copulatória terminou com o recolhimento do edeago do macho da câmara genital da fêmea (Figura 10h).

Na fase pós-copulatória, o macho desceu da fêmea imediatamente após a retração genital. Macho e fêmea permaneceram imóveis e próximos um do outro por poucos segundos e depois se separaram (Figura 10i).

Se não receptiva, a fêmea fugiu do macho quando tocada ou realizou uma série de movimentos de rejeição para evitar a monta. Estas manobras consistiram de movimentos rápidos pela fêmea, incluindo o curvamento do abdome para baixo a fim de evitar o acoplamento genital ou o deslocamento do macho sobre ela com as pernas posteriores.

A partir de análises preliminares desta sequência comportamental, um etograma do comportamento de acasalamento de *C. luridus* foi estabelecido (Figura 11). Foi observado uma série de etapas comportamentais durante a fase pré-copulatória. Na maioria dos casais (62 %), o macho se aproximou da fêmea por trás. Em todos os casais, o macho realizou a fricção rostral e o tateamento antenal no

élitro da fêmea, e montou-a por trás. Após a monta, 84 % dos machos tatearam com a antena e friccionaram com o rostro a cabeça e o pronoto da fêmea. Em 100 % dos casais, o macho tateou o final do abdome da fêmea com o edeago. Durante a fase copulatória, 68 % dos machos tatearam o pronoto da fêmea com a antena. Em todos os casais, macho e fêmea se separaram após a desmonta na fase pós-copulatória.

Houve um efeito significativo da fase de acasalamento sobre o tempo ($\chi^2 = 28,91$; gl = 2; $P < 0,0001$; n = 13 casais de 4 d de idade). A fase copulatória ($151,69 \pm 10,92$, média $\pm$ erro padrão) foi significativamente maior do que a fase pré-copulatória ($4,50 \pm 1,60$ min; $P < 0,0001$) e a fase pós-copulatória ($40,85 \pm 1,00$ min; $P < 0,0001$), enquanto que a fase pós-copulatória foi maior que a fase pré-copulatória ($P = 0,001$).

Figura 9 – Acasalamientos de *Cyrtomon luridus*, observados a cada duas horas por um período de 24 h em laboratório. A porção branca da barra horizontal abaixo do gráfico representa a fotofase, e a porção preta representa a escotofase. Barras com letras diferentes são significativamente diferentes pelo teste 't' de pares ($P < 0,05$).

Figura 10 – Sequência do acasalamento de *Cyrtomon luridus* (n = 28 casais de 4 d de idade). (a) aproximação de macho e fêmea; (b) toque do macho em fêmea com suas antenas; (c) monta do macho pela parte posterior da fêmea; (d) toque com o rostró do macho no pronoto da fêmea; (e) extrusão do edeago; (f) acoplamento do edeago à abertura genital da fêmea; (g) fêmea empurra macho com pernas posteriores; (h) macho retrai edeago e (i) macho e fêmea se separam

Figura 11 – Etograma do comportamento de acasalamento de *Cyrtomon luridus* (n=28 casais de 4 d de idade). Números indicam a proporção de casais que procederam a cada etapa comportamental

4.3 Bioensaios olfatométricos

Os bioensaios no olfatômetro 'Y' mostraram que fêmeas ($P = 0,041$) e machos ($P = 0,001$) preferiram a planta hospedeira (*Duboisia* sp.) comparado com o branco (ar limpo) (Figura 12). Contudo, eles mostraram uma preferência significativa para os machos + a planta hospedeira em relação a planta hospedeira sozinha (fêmea: $P = 0,029$ e macho: $P = 0,02$). Além disso, ambos os sexos não mostraram nenhuma preferência para as fêmeas + planta hospedeira comparado com a planta hospedeira sozinha (fêmea: $P = 0,720$ e macho: $P = 1$) ou a machos comparados com fêmeas (fêmea: $P = 0,618$ e macho: $P = 1$). Curiosamente, as fêmeas preferiram a planta hospedeira em relação aos machos ($P = 0,047$), enquanto que os machos preferiram a planta hospedeira em relação as fêmeas ($P = 0,02$). Somente as fêmeas foram significativamente atraídas por machos + planta hospedeira comparado com fêmea + planta hospedeira ($P = 0,001$).

Figura 12 – Resposta de fêmeas e machos de *Cyrtomon luridus* pelos voláteis dos coespecíficos com ou sem a planta hospedeira (*Duboisia* sp.) em ensaios olfactômetro Y-tubo. N = Número de besouros testados. * = Significativo e ns = não significativo a 5% de probabilidade de acordo com o método exato binomial

4.4 Análise dos extratos naturais de machos e fêmeas de *C. luridus* por cromatografia gasosa acoplada a um detector eletroantenográfico (GC-EAD) e por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (GC-MS)

As análises em GC-EAD dos extratos naturais de *C. luridus* mostraram que somente os machos produziram compostos eletrofisiologicamente ativos. Neste caso, sete compostos produzidos pelos machos elicitaram respostas antenais em fêmeas e machos desta espécie (Figura 13). Os tamanhos dos picos destes compostos no cromatograma do íon total foram maiores nos machos em relação às fêmeas (Figura 14).

Figura 13 – Análise representativa do extrato natural de aeração de machos de *Cyrtomon luridus* por cromatografia gasosa acoplada a um detector eletroantenográfico (GC-EAD). O traço abaixo é o cromatograma gerado por um detector de chama ionizante (FID) em uma coluna DB-5. Os traços invertidos acima representam os sinais da antena de macho e fêmea gerados por um detector eletroantenográfico (EAD). As letras sobre os picos representam aqueles que foram eletrofisiologicamente ativos (vide texto para nome e identificação dos compostos)

Figura 14 – Cromatograma representativo do íon total do extrato de aeração de machos e fêmeas de *Cyrtomon luridus* com a planta hospedeira. As letras sobre os picos representam aqueles que foram eletrofisiologicamente ativos representados na Figura 13 (vide texto para nome e identificação dos compostos)

A análise detalhada dos espectros de massas dos compostos eletrofisiologicamente ativos, juntamente com os índices de retenção calculados para cada um, e a coinjeção de padrões sintéticos autênticos forneceram subsídios importantes para a identificação deles (Figuras 13 e 14).

O composto “a” apresentou o índice de retenção (IR) de 798 e pico base de m/z 41, além dos fragmentos de m/z 69 (45,26%), 55 (31,66%), 83 (15,94%) e 98 (5,6%) (Figura 15). A comparação deste padrão de fragmentação com aquele da biblioteca NIST do GC-MS sugeriu tratar-se provavelmente da estrutura do (*Z*)-3-hexanal. Não foi possível a utilização de um padrão autêntico para confirmar este composto, uma vez que o produto não chegou a tempo de finalizar este trabalho. Além deste, o composto “b” também não teve sua estrutura confirmada pela utilização de um padrão sintético. Entretanto, podemos inferir que esse segundo composto se tratava do hexanal, pois apresentou o IR = 801, pico base de m/z 41, além dos fragmentos de m/z 44 (94,09%), 56 (77,94%), 72 (21,01%) e 82 (15,47%) (Figura 16).

Figura 15 – Espectro de massas gerado por ionização de impacto de elétrons (70-eV) de (Z)-3-hexenal, do extrato natural de aeração de machos de *Cyrtomon luridus* (acima) e de um padrão autêntico (abaixo)

Figura 16 – Espectro de massas gerado por ionização de impacto de elétrons (70-eV) de hexanal, do extrato natural de aeração de machos de *Cyrtomon luridus* (acima) e de um padrão autêntico (abaixo)

O composto “c” apresentou IR = 858, pico base de m/z 41 e fragmentos de m/z 55 (79,2%), 69 (77,39%), 83 (58,23%) e 98 (14,06%). Com base neste padrão de fragmentação sugeriu-se a estrutura do (*E*)-2-hexenal, o qual foi confirmado pela coinjeção de um padrão sintético (Figura 17).

O composto “d” apresentou IR = 870, pico base de m/z 57, além dos fragmentos de m/z 41 (46,1%), 82 (24,2%), 67 (20,15%), o que sugeriu, com base na biblioteca NIST do GC-MS, se tratar da estrutura do (*E*)-2-hexen-1-ol, o qual posteriormente foi confirmada pela coinjeção de um padrão sintético (Figura 18).

O composto “e” foi identificado como fenilacetaldéido e foi confirmado com a coinjeção de um padrão sintético, e análise do IR (1054), pico base de m/z 91, fragmentos de m/z 120 (21,52 %), 65 (20,84 %) e 51 (4,78 %) (Figura 19).

Figura 17 – Espectro de massas gerado por ionização de impacto de elétrons (70-eV) de (*E*)-2-hexenal, do extrato natural de aeração de machos de *Cyrtomon luridus* (acima) e de um padrão autêntico (abaixo)

Figura 18 – Espectro de massas gerado por ionização de impacto de elétrons (70-eV) de (*E*)-2-hexen-1-ol, do extrato natural de aeração de machos de *Cyrtomon luridus* (acima) e de um padrão autêntico (abaixo)

Figura 19 – Espectro de massas gerado por ionização de impacto de elétrons (70-eV) de fenilacetaldéido, do extrato natural de aeração de machos de *Cyrtomon luridus* (acima) e de um padrão autêntico (abaixo)

Figura 20 – Espectro de massas gerado por ionização de impacto de elétrons (70-eV) de linalol, do extrato natural de aeração de machos de *Cyrtomon luridus* (acima) e de um padrão autêntico (abaixo)

O pico “f” apresentou IR = 1120, pico base de m/z 71 e os fragmentos de m/z 93 (81,03%), 43 (71,51%), 41 (67,08%), 80 (31,64%), 121 (21,90%) e 136 (6,3%), o que sugeriu a estrutura do linalol (Figura 20). Este composto foi confirmado com padrão sintético.

Por fim, o composto “g” foi identificado como geraniol e foi exclusivo de machos de *C. luridis*, o qual foi inferido pelo IR de 1259, pico base de m/z 69 e fragmentos de m/z 41 (71,44%), 93 (21,48%), 123 (10,15%), 84 (8,27%), 53 (7,54%), 111 (10,15%) e 139 (2,49%), e confirmado pela coinjeção de padrão sintético (Figura 21).

Figura 21 – Espectro de massas gerado por ionização de impacto de elétrons (70-eV) de geraniol, do extrato natural de aeração de machos de *Cyrtomon luridus* (acima) e de um padrão autêntico (abaixo)

Após a identificação dos compostos eletrofisiologicamente ativos, foram realizadas análises em GC-EAD com a mistura de alguns dos padrões sintéticos destes compostos. Como explicitado anteriormente, nem todos os compostos estavam disponíveis para a realização dos testes, seja pela indisponibilidade comercial ou por atrasos na entrega do produto. Portanto, os compostos que foram utilizados na mistura foram: (*E*)-2-hexenal, (*E*)-2-hexen-1-ol, linalol e geraniol.

Todos os compostos sintéticos testados foram eletrofisiologicamente ativos a machos e fêmeas de *C. luridus* (Figura 22).

Figura 22 – Análise representativa de uma mistura de padrões autênticos de alguns dos compostos fisiologicamente ativos encontrados no extrato de aeração de machos de *Cyrtomon luridus* por cromatografia gasosa acoplada a um detector eletroantegráfico (GC-EAD). O traço do cromatograma contendo os padrões autênticos foi gerado por um detector de chama ionizante (FID), em uma coluna DB-5. Os traços invertidos representam os sinais das antenas de macho e fêmea gerados por um detector eletroantenográfico (EAD)

5 DISCUSSÃO

5.1 Morfometria

Diferenças de tamanho entre machos e fêmeas nos curculionídeos não é uma característica incomum (BARRETO; LINO NETO; ANJOS, 1999; SILVA-FILHO; BAILEZ; VIANA-BAILEZ, 2007). Contudo, apesar da evidente diferença no tamanho corporal entre machos e fêmeas de *C. luridus*, a separação por sexo baseado somente nesta particularidade não garante um reconhecimento de forma confiável, uma vez que os intervalos de medidas foram sobrepostos. Neste sentido outros trabalhos também já confirmaram esta sobreposição, como, por exemplo, em *Anthonomus grandis* Boheman, *A. pomorum* Linnaeus e *Cronotrachelus psidii* Marshall (BLAIR; KEARBY, 1979; DUAN et al., 1999; SAPPINGTON; SPURGEON, 2000).

Não foram constatadas diferenças morfológicas entre machos e fêmeas de *C. luridus* quanto aos números de antenômeros e espinhos nos tarsos, pilosidade aparente, coloração e inserção da antena. Entretanto, para muitos curculionídeos estas características têm sido mencionadas como importantes para a separação entre os sexos (CLARK, 1978; ROSADO-NETO, 1987; ZORZENON; BERGMANN; BICUDO, 2000; INNOCENZI et al., 2002; SARRO; CROCOMO; FERREIRA, 2004; SILVA-FILHO; BAILEZ; VIANA-BAILEZ, 2007; BARRETO; ROSADO-NETO, 2012).

As diferenças observadas nos últimos tergitos abdominais de machos e fêmeas de *C. luridus* constatada neste trabalho já foi igualmente relatada para outros curculionídeos (THOMPSON, 1992), sendo muitas vezes utilizadas como característica segura para a identificação do gênero, entre eles *A. grandis*, *A. pomorum*, *Cosmopolites sordidus* Germar, *C. psidii*, *C. schoofi* Papp, *Curculio nucum* Linnaeus, *Homalinotus coriaceus* Gyllenhal e *Onchoscelis germari* Boheman (ROTH; WILLIS, 1963; TEDDERS; PAYNE, 1986; DUAN et al., 1999; SAPPINGTON; SPURGEON, 2000; SARRO; CROCOMO; FERREIRA, 2004; SILVA-FILHO; BAILEZ; VIANA-BAILEZ, 2007; AKÇA; TUNCER; SARUHAN, 2007; BARRETO; ROSADO-NETO, 2012).

Embora, na maioria das espécies de curculionídeos seja necessário o deslocamento dos élitros para a observação dos últimos tergitos, isso pode ocasionar lesões ou alterações no comportamento do inseto, sendo assim, é pouco utilizada em indivíduos vivos quando da separação (SILVA-FILHO; BAILEZ; VIANA-

BAILEZ, 2007). No caso de *C. luridus*, todavia, a separação dos sexos por meio da visualização da abertura genital, foi possível apenas com uma leve compressão do abdômen. Isso tornou essa técnica, vantajosa sob vários aspectos, uma vez que foi possível separar os insetos em campo imediatamente após a captura, sem a necessidade de equipamentos específicos, como lupa ou pinças e sem causar lesões ou mudanças no comportamento, uma vez que o stress promovido foi pequeno e rápido.

5.2 Comportamento de acasalamento de *C. luridus*

O comportamento de acasalamento em *C. luridus* foi claramente dividido nas fases pré-copulatória, copulatória e pós-copulatória. Os casais adultos desta espécie atingiram a maturidade sexual dois após a emergência e acasalaram repetidamente. Durante este período, a esclerotização dos órgãos sexuais ocorreu em ambos os sexos. Contudo, estudos adicionais serão necessários para determinar a efetividade da transferência espermática, além dos efeitos diretos e indiretos das cópulas repetidas (mesmo macho) ou múltiplas cópulas (diferentes machos) sobre as fêmeas de *C. luridus* e sua prole.

Em *C. luridus* foram observados dois picos na atividade de acasalamento durante um ciclo de 24 horas. Entretanto, esta informação foi coletada a partir da observação de um número limitado de casais de uma idade específica em laboratório. Por isso, mais estudos também serão necessários para verificar se este padrão ocorre no campo.

Os padrões comportamentais exibidos por *C. luridus* durante a sequência de acasalamento foram similares a aqueles observados em outras espécies de curculionídeos, tais como *Diaprepes abbreviatus* Linnaeus (SIROT; BROCKMANN; LAPOINTE, 2007), *Hypera postica* Gyllenhal (LeCATO; PIENKOWSKI, 1970), *Cleogonus rubetra* Fabricius (POLAK, BROWN, 1995), *Rhynchophorus cruentatus* Fabricius (VANDERBILT; GIBLIN-DAVIS; WEISSLING, 1998), *Hypothenemus hampei* Ferrari (SILVA et al., 2012) e *Aclees sp. cf. foveatus* Voss (BENELLI; MEREGALLI; CANALE, 2014). Embora o comportamento de cortejo não tenha sido conspícuo, o macho realizou o toque de antena e a fricção do rostro sobre o pronoto e élitro da fêmea durante a fase pré-copulatória. Alguns curculionídeos usam este comportamento para reconhecer parceiros a curtas distâncias. Substâncias

presentes na cutícula da fêmea, tais como os feromônios de contato sexual são responsáveis pela mediação do reconhecimento em *Aegorhinus superciliosus* (Guérin) (MUTIS et al., 2009). Contudo, o toque de antena e a fricção do rostro observados no presente trabalho poderiam ter sido também uma forma de ‘sinal de apaziguamento’ antes que a monta ocorresse, o qual já foi reportado em alguns besouros da casca (Curculionidae: Scolytinae) (BIRCH, 1978).

Após a monta, o macho realizou o toque de antena e a fricção do rostro sobre a cabeça e o pronoto da fêmea. Nesse estágio, o comportamento poderia ser considerado um cortejo do macho à fêmea, o qual poderia estar não receptiva as tentativas de acasalamento. Em *R. cruentatus*, o toque de antena e a fricção do rostro são indicativos do advento da cópula (VANDERBILT et al., 1998). Durante a fase copulatória, o macho realizou o toque da antena sobre o élitro e o pronoto da fêmea. Sirot, Brockmann e Lapointe (2007) referiram-se a este comportamento como sendo um ‘acariciamento’ em *D. abbreviatus*, no qual a fêmea favorece o esperma do macho que ‘acariciar’ mais rápido. Estes autores inferiram que o comportamento de ‘acariciamento’ é mediado pela escolha críptica da fêmea.

Em razão dos machos de *C. luridus* deixarem o corpo da fêmea imediatamente após a retração do edeago, a ‘fase passiva’, ou seja, o período de tempo em que o macho permanece montado sobre a fêmea sem contato genital (PARKER, 1974) e o comportamento de guarda pós-copulatória (ALCOCK, 1994) não foram observados. Contudo, neste trabalho os casais de *C. luridus* estiveram separados durante as observações, e a competição entre machos por parceiras não ocorreu. Por isso, não se pode inferir que os machos desta espécie não realizariam a guarda pós-acasalamento sob condições de campo. A guarda pós-copulatória já foi observada, por exemplo, em *D. abbreviatus* (SIROT; BROCKMANN; LAPOINTE, 2007), *R. cruentatus* (VANDERBILT; GIBLIN-DAVIS; WEISLING, 1998), e *H. postica* (LeCATO; PIENKOWSKI 1970). Em *D. abbreviatus*, o sucesso reprodutivo tem sido associado ao comportamento de guarda (HARARI et al., 1999, 2003).

Os casais de *C. luridus* permaneceram em cópula por aproximadamente 2,5 h. Este tempo foi similar ao reportado para *R. cruentatus* (≈ 2 h) (VANDERBILT; GIBLIN-DAVIS; WEISLING, 1998), mas foi maior do que o de *C. rubra* (≈ 22 min) (POLAK; BROWN, 1995), e menor do que o de *D. abbreviatus* (≈ 16 h) (HARARI et al., 2003) e *H. postica* (≈ 12 h) (LeCATO; PIENKOWSKI, 1970).

Os machos de *C. luridus* procuraram pela fêmea em todas as situações, enquanto que as fêmeas foram indiferentes a presença do parceiro. Comportamento similar tem sido observado em *H. postica* (LeCATO; PIENKOWSKI, 1970). Frequentemente, neste trabalho, foram observadas fêmeas se alimentando de folhas de duboísia antes da aproximação do macho. Após o contato inicial do macho, elas pararam de se alimentar e permaneceram imóveis ou caminharam lentamente enquanto a cópula ocorria. Contudo, em muitas ocasiões as fêmeas pareceram não receptivas, e fizeram movimentos abruptos para evitar a tentativa de monta pelo macho. Baseado nesta informação, os acasalamentos adicionais observados poderiam ter sido devido ao desenho experimental utilizado, uma vez que as fêmeas não podiam evitar as tentativas de acasalamento pelo mesmo macho. Além disso, machos e fêmeas de *C. luridus* foram encontrados agregados sobre a mesma planta hospedeira em condições naturais. Por isso, uma fêmea de *C. luridus* provavelmente acasalaria múltiplas vezes com machos diferentes ao invés de repetidas vezes com o mesmo macho. Além disso, nas agregações artificiais dentro de gaiolas de laboratório, foram observados múltiplos acasalamentos por machos e fêmeas desta espécie. Este comportamento também foi observado em *D. abbreviatus* (SIROT; BROCKMANN; LAPOINTE, 2007), *R. cruentatus* (VANDERBILT; GIBLIN-DAVIS; WEISLING, 1998) e *H. postica* (LeCATO; PIENKOWSKI, 1970).

5.3 Bioensaios olfatométricos

Neste estudo, foram testadas as respostas de machos e fêmeas de *C. luridus* aos voláteis de coespecíficos sozinhos ou coespecíficos associados com a planta hospedeira, *Duboisia* sp.. Os voláteis produzidos pelos machos alimentando-se sobre a planta hospedeira foram atrativos a ambos os sexos desta espécie. Em contraste, fêmeas sozinhas ou fêmeas + planta hospedeira não foram atrativas. Tomados juntos, estes resultados oferecem evidências de que a comunicação química entre coespecíficos de *C. luridus* foi provavelmente mediada por um feromônio de agregação produzido pelo macho. Na literatura, a produção de feromônios de agregação pelos machos na subfamília Entiminae já foi reportada para *Sitona lineatus* Linnaeus (BLIGHT et al., 1984; BLIGHT; WADHAMS, 1987) e *D. abbreviatus* (LAPOINTE et al., 2012), embora Unelius et al. (2013) reportaram a produção de um feromônio sexual em *S. discoideus* Gyllenhal.

Os feromônios de agregação são geralmente utilizados na localização do hospedeiro e agregação de coespecíficos (BARTELT, 1999). É esperado que este semioquímico poderia auxiliar na agregação de machos e fêmeas de *C. luridus* sobre *Duboisia* sp. ou outras solanáceas hospedeiras para alimentação e acasalamento. A estimulação conferida por plantas hospedeiras na produção e liberação de feromônios de agregação já foi documentado para *D. abbreviatus* (LAPOINTE et al., 2012) e *S. lineatus* (BLIGHT et al., 1984, 1987), assim como para vários outros curculionídeos, tais como, *Rhyncophorus palmarum* Linnaeus (L.) (JAFFÉ et al., 1993) e *Sternechus subsignatus* Boheman (AMBROGI; ZARBIN, 2008) e *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (RUÍZ-MONTIEL et al., 2009). Machos de *C. luridus* poderiam inicialmente localizar a planta hospedeira por percepção olfativa; depois com a alimentação e a passagem de material fecal liberariam os voláteis atrativos para os coespecíficos. Todavia, ainda é preciso ser confirmado se os machos de *C. luridus* liberam estes compostos feromonais pelas fezes e/ou outras partes do corpo.

Adicionalmente, os voláteis da planta hospedeira poderia agir sinergisticamente com o feromônio de *C. luridus*. Em outros curculionídeos, voláteis de plantas aumentam a atração de coespecíficos ao feromônio de agregação por machos de *A. grandis* (DICKENS, 1989) e *R. cruentatus* (WEISSLING et al., 1994). De fato, foi observada uma preferência de machos e fêmeas de *C. luridus* pela planta hospedeira comparado com o branco ou coespecíficos sozinhos. Similarmente ao semioquímicos produzidos pelo macho, esses resultados sugerem que os voláteis da planta hospedaria, *Duboisia* sp. também pode representar importantes componentes na ecologia química deste curculionídeo.

Sob uma perspectiva prática, o feromônio de agregação de *C. luridus* poderia ser utilizado com uma fonte de atração para esta espécie em um programa de Manejo Integrado de Pragas (MIP).

5.4 Análise dos extratos naturais de machos e fêmeas de *C. luridus*

Entre os sete compostos identificados no presente trabalho, nenhum deles já foi descrito como feromônio entre os curculionídeos (AMBROGI et al., 2009). Porém, todos os compostos podem ser encontrados em diversos trabalhos como sendo

voláteis de plantas, agindo de alguma forma no comportamento de um determinado inseto (El-SAYED, 2012).

O comportamento sexual de insetos fitófagos são muitas vezes relacionados em diversas interações com as suas plantas hospedeiras. Estas interações podem ser manifestadas como efeitos ou influências da planta hospedeira sobre a fisiologia e o comportamento dos insetos, incluindo a comunicação por meio dos feromônios, que refletem em estratégias para otimizar o acasalamento e reprodução (LANDOLT; PHILLIPS, 1997).

Sun et al. (2010), em bioensaios comportamentais utilizando olfatômetro em 'Y', observou que compostos voláteis emitidos a partir de plantas de chá infestadas por *Myloccerinus aurolineatus* Voss (Coleoptera: Curculionidae) eram atraentes para seus co-específicos. Entre estes, o (Z)-3-hexenal, refere-se ao composto 'a' encontrado neste estudo. O hexenal, referido como o composto 'b', já foi descrito por Jaffé et al. (1993) como uns dos responsáveis no aumento da eficiência do feromônio de agregação em *R. palmarum*.

O composto 'c' aparece na literatura diversas vezes interagindo de diferentes maneiras com coleópteros. Algumas espécies de besouros foram atraídas pelos tratamentos contendo o aldeído (E)-2-hexenal em bioensaios de olfatômetro, como *Scolytus intricatus* Ratzeburg (Coleoptera: Scolytidae) e *Hylastinus obscurus* Marsham (Coleoptera: Curculionidae) (VRKOCOVA et al., 2000; PALMA et al., 2012; PARRA et al., 2013). Já para *Dendroctonus rufipennis* Kirby e *D. brevicornis* LeConte (Coleoptera: Scolytidae), (E)-2-hexenal, reduziu o número de besouros capturados em armadilhas com atrativos (POLAND et al., 1998). Leskey et al. (2014), constatou que *Conotrachelus nenuphar* Herbst (Coleoptera: Curculionidae) apresentava notáveis respostas em eletroantenogramas quando era exposto ao (E)-2-hexenal, porém ao testar o aldeído em campo, não constatou respostas de repelência ou atração. (E)-2-hexenal exerceu em *Listronotus maculicollis* Kirby respostas em bioensaios em EAD e atração em bioensaios em olfatômetro (Mc GRAW et al., 2011).

Dickens et al. (1989), pesquisando os voláteis de folhas verdes no incremento do feromônios de agregação de *A. grandis* constataram que (E)-2-hexen-1-ol – referente ao composto 'd' no presente trabalho – não apenas aumentou o número de capturas nas armadilhas com feromônio, como também estendeu a duração da atratividade das armadilhas.

Testando seis voláteis sintéticos de frutas em adição as armadilhas de feromônios para *C. nenuphar*, (PIÑERO; WRIGHT; PROKOPYEM, 2001) observaram que quando fenilacetaldéido era adicionado nas amostras, as capturas aumentavam duas vezes mais que apenas o feromônios. Neste estudo com *C. luridus*, o composto “e” foi identificado como fenilacetaldéido.

Diversos trabalhos citam o linalol, composto ‘f’ deste trabalho, como substância atraente entre os coleópteros, dentre eles *M. aurolineatus*, *Otiorhynchus sulcatus*, *Sitona lineatus* e *Scyphophorus acunpunctatus*. (BLIGHT et al., 1984; VanFOL; VISSER, 1998; ALTUZAR et al., 2007; SUN et al., 2010). Por fim, o composto ‘g’, identificado como geraniol é tido na literatura como um dos compostos envolvidos na agregação de duas espécies de curculionídeos do gênero *Anthonomus* (ELLER et al., 1994; SZENDREI et al., 2011).

Para muitas espécies, as influências da planta hospedeira sobre a comunicação com seus coespecíficos são importantes questões para estudo, não só com relação a questões ecológicas como, constatação de acolhimento e seleção hospedeira ou isolamento reprodutivo entre as espécies crípticas; como também em questões práticas de manejo, como a eficácia de iscas à base de feromônios, que pode depender de números e padrões espaciais em decorrência da concorrência com as plantas hospedeiras ou da adição de compostos sinérgicos à base de plantas para potencializar a atração (LANDOLT; PHILLIPS, 1997).

Com base nos resultados obtidos é possível afirmar que um ou mais compostos de folhas verdes exerce(m) relação de sinergismo com o feromônio dos machos de *C. luridus*.

6 CONCLUSÕES

- Há diferenças nas medidas corporais entre os sexos de *C. luridus*, e a visualização da porção final do abdome possibilita identificar machos e fêmeas com segurança;
- Adultos de *C. luridus* adquirem sua maturidade sexual com cerca de dois dias após a emergência, e cópulas múltiplas podem ocorrer durante o dia ou noite;
- Adultos de *C. luridus* possuem uma sequência típica de comportamento de acasalamento dividida em três etapas: pré-cópula, cópula e pós-cópula;
- Fêmeas e machos de *C. luridus* são atraídos pela planta hospedeira, *Duboisia* sp., sozinha ou na presença de machos;
- Os compostos (*Z*)-3-hexenal, hexanal, (*E*)-2-hexenal, (*E*)-2-hexen-1-ol, fenilacetaldéido, linalol e geraniol presentes nos voláteis de machos de *C. luridus* juntamente com a planta hospedeira, *Duboisia* sp., possuem atividade eletrofisiológica para ambos os sexos.

REFERÊNCIAS

- AKÇA, I.; TUNCER, C.; SARUHAN, I. Sex discrimination of adult *Curculio nucum* L. (Coleoptera: Curculionidae), a pest of hazelnuts in Turkey. **Entomological News**, Philadelphia, v. 118, n. 1, p. 87-89, 2007.
- ALTUZAR, A.; MALO, E.A.; GONZALEZ-HERNANDEZ, H.; ROJAS, J.C. Electrophysiological and behavioural responses of *Scyphophorus acupunctatus* (Col., Curculionidae) to Agave tequilana volatiles. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 131, n. 2, p. 121-127, 2007.
- AMBROGI, B.G.; ZARBIN, P.H.G. Aggregation pheromone in *Sternechus subsignatus* (Coleoptera: Curculionidae): olfactory behaviour and temporal pattern of emission. **Journal Applied Entomology**, Berlin, v. 132, p. 54–58, 2008.
- AMBROGI, B.G.; VIDAL, D.M.; ZARBIN, P.H.G.; ROSADO-NETO, G.H. Feromônios de agregação em Curculionidae (Insecta: Coleoptera) e sua implicação taxonômica. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 8, p. 2151-2158, 2009.
- AQUINO, I.S., RAMALHO, F.S., JESUS, F.M.M., GUEVARA, L.A.C. & HARDEE, D.D. Eficência de armadilhas de feromônio novas e usadas na captura do bicudo-do-algodoeiro. **Pesquisa. Agropecuária**. Brasil. 21: 817-821. 1986.
- BAILEZ, O.E.; VIANA-BAILEZ, A.M.; LIMA J.O.G.; MOREIRA, D.D.O. Life, history of the guava weevil, *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae), under laboratory conditions. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 203-207, 2003.
- BARRETO, M.R.; ROSADO-NETO, G.H. Dimorfismo sexual de *Onchoscelis germari* (Boheman) (Coleoptera: Curculionidae). **EntomoBrasilis**, Vassouras, v. 5, n. 3, p. 242-245, 2012.
- BARRETO, M.R.; LINO NETO, J.; ANJOS, N. Dimorfismo e razão sexual em pupas e adultos de *Spermologus rufus* Boheman 1843 (Coleoptera: Curculionidae). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, p. 358-364, 1999.
- BARTELT, R.J. Weevils. In: HARDIE, J.; MINKS, A.K. (Ed.). **Pheromones of non-lepidopteran insects associated with agricultural plants**. Wallingford: CABI Publ., 1999. p. 91–112.
- BEAUHAIRE, J.; DUCROT, P.H.; MALOSSE, C., ROCHAT, R.; NDIEGE, I.O.; DALMAS, O. Identification and synthesis of sordidin, a male pheromone emitted by *Cosmopolites sordidus*. **Tetrahedron Letters**, Elmsford, v. 36, n. 7, p. 1043-1046, 1995.
- BENELLI, G.; MEREGALLI, M.; CANALE, A. Field observations on the mating behavior of *Aclees* sp. cf. *foveatus* Voss (Coleoptera: Curculionidae), an exotic pest noxious to fig orchards. **Journal of Insect Behaviour**, Riverside, v. 27, p. 419–427, 2014.

BIRCH, M.C. Chemical communication in pine bark beetles. **American Scientist**, New Haven, v. 66, p. 409–419, 1978.

BIRKINSHAW, L. A. SMITH R. H. Function of Aggregation Pheromone in the Larger Grain Borer *Prostephanus truncatus*: Variation in Response to Individuals as Evidence for a Role in Sexual Selection. **Journal of Chemical Ecology**, Volume 26, Number 6, Page 1325, 2000.

BLAIR, L.M.; KEARBY, W.H. Sex differentiation by sternal characters of adults of *Contrachelus retentus* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 52, n. 1, p. 226-228, 1979.

BLIGHT, M.M.; WADHAMS, L. J. Male-produced aggregation pheromone in pea and bean weevil, *Sitona lineatus* (L.). **Journal of Chemical Ecology**, Berlin, v. 13, n. 4, p. 733-739, 1987.

BLIGHT, M.M.; PICKETT, J.A.; SMITH, M.C.; WADHAMS, L.J. An aggregation pheromone of *Sitona lineatus*. **Naturwissenschaften**, Hamburg, v. 71, p. 480, 1984.

BOOTH, D.C. & LANIER, G.N.. Evidence of an aggregation pheromone in *Pissodes approximatus* and *P. strobi*. *Annals Entomological Society American*. 67: 992-994. 1974.

BORDEN, J.H. Aggregation pheromones, pp. 257-285. In: Kerkut, G.A. & Gilbert, L.I. (eds.). *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, Vol. 9. Pergamon Press, Oxford. 1985.

CLARK, W.E. The weevil genus *Sibinia* Germar: natural history, taxonomy, phylogeny, and zoogeography, with revision of the new world species (Coleoptera: Curculionidae). **Quaestiones Entomologicae**, Edmonton, v. 14, p. 91-387, 1978.

Ceruti, F.C. Interações entre feromônio de insetos e semioquímicos de plantas. **Revista Acadêmica**, Curitiba. 5: 73-82. 2007.

DICKENS, J.C. Green leaf volatiles enhance aggregation pheromone of boll weevil, *Anthonomus grandis*. **Entomologia experimentalis et applicat**, Dordrecht, v. 52, p. 191–203, 1989.

DICKENS, J. C., JANG E. B., LIGHT D. M., ALFORD A. R. Enhancement of Insect Pheromone Responses by Green Leaf Volatiles. **Naturwissenschaften** 77: 29–31. 1990.

DUAN, J.J.; WEBER, D.C.; HIRS, B.A., DORN, S. A new character for sex differentiation of adults of *Anthonomus pomorum* L. (Col., Curculionidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 123, n. 5, p. 319-320, 1999.

DUARTE, A.G., LIMA, I.S., NAVARRO, D.M.A.F. & SANT'ANA, A.E.G. Captura de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) em armadilhas iscadas com o feromônio de agregação e compostos voláteis de frutos do abacaxi. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 25: 81-84. 2003.

ELLER, F. J.; BARTELT, R. J.; SHASHA, B. S.; SCHUSTER, D. J.; RILEY, D. G.; STANSLY, P. A.; SUTHERLAND, C. A. Aggregation pheromone for the pepper weevil, *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae): identification and field activity. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 20, n. 4, p. 1537-1555, 1994.

EL-SAYED, A.M. **The pherobase**: database of pheromones and semiochemicals. 2012. Disponível em: <<http://www.pherobase.com>>. Acesso em: 25/04/2015.

FAVERO, S., SALGADO, L.O., VILELA, E.F. & PILI, R.A. Resposta olfativa de *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) ao feromônio sintético de agregação sitofilure. *An. Soc. Entomol. Brasil*. 22: 427-432. 1993.

FRANCKE, W., DETTNER, K. Chemical signalling in beetles. **Topics in Current Chemical**. 240:85–166. 2005.

GIBLIN-DAVIS, R.M.; PEÑA, J.E.; DUNCAN, R.E. Lethal pitfall trap for evaluation of semiochemical-mediated attraction of *Metamasius hemipterus sericeus* (Coleoptera: Curculionidae). **Florida Entomologist**, Litz, v. 77, n. 2, p. 247-255, 1994.

GIBLIN-DAVIS R.M.; WEISSLING, T.J.; OESCHLAGER, A.C.; GONZALEZ, L.M. Field response of *Rhynchophorus cruentatus* (Coleoptera: Curculionidae) to its aggregation pheromone and fermenting plant volatiles. **Florida Entomologist**, Litz, v. 77, p. 164–177, 1994.

GRIES, G.; GRIES, R.; PEREZ, A.L.; GONZALES, L.M.; PIERCE, H.D. JR. Ethyl propionate: synergistic kairomone for African palm weevil, *Rhynchophorus phoenicis* L. (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 20, p. 889–897, 1994.

GOLD, C.S.; PENA, J.E.; KARAMURA, E.B. Biology and integrated pest management for the banana weevil *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae). **Integrated Pest Management Reviews**, Heidelberg, v. 6, n. 2, p. 79-155, 2001.

GOULART, H.F. et al. Feromônios: Uma Alternativa Verde para o Manejo Integrado de Pragas. **Revista Virtual de Química**, 2015.

HARARI, A.R.; HANDLER, A.M.; LANDOLT, P.J. Size-assortative mating, male choice and female choice in the curculionid beetle *Diaprepes abbreviatus*. **Animal Behaviour**, Amsterdam, v. 58, p. 1191–1200, 1999.

HARARI, A.R.; LANDOLT, P.J.; O'BRIEN, C.W.; BROCKMANN, H.J. Prolonged mate guarding and sperm competition in the weevil *Diaprepes abbreviatus* (L.). **Behavioral Ecology**, Oxford, v. 14, p. 89–96, 2003.

HOWSE, P.; STEVENS, J.M.; JONES, O. **Insect pheromones and their use in pest management**. London: Chapman & Hall, 1998.

INNOCENZI, P.J.; HALL, D.R.; CROSS, J.V.; GREEN, S.V. Sexing adults of the strawberry blossom weevil, *Anthonomus rubi* (Col., Curculionidae). **Journal Applied Entomology**, Berlin, v. 126, n. 4, p. 159-160, 2002.

JAFFÉ, K.; SÁNCHEZ, P.; CERDA, H.; HERNÁNDEZ, J.V.; JAFFÉ, R.; URDANETA, N.; GUERRA, G.; MARTÍNEZ, R.; MIRAS, B. Chemical ecology of the palm weevil *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae): attraction to host plants and to a male-produced aggregation pheromone. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 19, p. 1703–1720, 1993.

KNAPP, S.; BOHS, L.; NEE, M.; SPOONER, D.M. Solanaceae: a model for linking genomics with biodiversity. **Comparative and Functional Genomics**, Chichester, v. 5, p. 285-291, 2004.

KOHAMA, T.; SHIMOJI, Y. Reproductive maturity of the female West Indian sweet potato weevil, *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire) (Coleoptera: Curculionidae), **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 33, n. 1, p. 1-4, 1997.

LANDOLT, P.J.; PHILLIPS, T.W. Host plant influences on sex pheromone behavior of phytophagous insects 1. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 42, n. 1, p. 371-391, 1997.

LANTERI, A.A. Revisión sistemática del género *Cyrtomon* Schönherr (Coleoptera, Curculionidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 34, p. 387–402, 1990.

LANTERI, A.A.; DÍAZ, N.B.; MORRONE, J.J. Identificación de las especies. In: LANTERI, A.A. (Ed.). **Bases para el control integrado de los gorgojos de la alfalfa**. La Plata; Buenos Aires: De La Campana Ediciones, 1994. p. 3-40.

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**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 251-257, 2004.

LAPOINTE, S.L.; ALESSANDRO, R.T.; ROBBINS, P.S.; KHRIMIAN, A.; SVATOS, A.; DICKENS, J.C.; OTÁLORA-LUNA, F.; KAPLAN, F.; ALBORN, H.T.; TEAL, P.E. Identification and synthesis of a male-produced pheromone for the Neotropical root weevil *Diaprepes abbreviatus*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 38, p. 408–417, 2012.

Le CATO, G.L.; PIENKOWSKI, R.L. Laboratory mating behavior of the alfalfa weevil *Hypera postica*. **Annals of the Entomological Society of America**. Lanham, v. 63, n. 4, p. 1000-1007, 1970.

LESKEY, T.C.; HOCK, V.; CHOUINARD, G.; CORMIER, D.; LEAHY, K.; COOLEY, D.; ZHANG, A. Evaluating electrophysiological and behavioral responses to volatiles for improvement of odor-baited trap tree management of *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae). **Environmental entomology**, Lanham, v. 43, n. 3, p. 753-761, 2014.

LINSTROM, P.J.; MALLARD, W.G. Chemistry WebBook., Gaithersburg. National Institute of Standards and Technology, 2011. (NIST. Standard Reference Database, 69). Disponível em: <<http://webbook.nist.gov>>. Acesso em: 22 abr. 2015.

MCGRAW, B.A.; RODRIGUEZ-SAONA, C.; HOLDCRAFT, R.; SZENDREI, Z.; KOPPENHÖFER, A.M. Behavioral and electrophysiological responses of *Listronotus maculicollis* (Coleoptera: Curculionidae) to volatiles from intact and mechanically damaged annual bluegrass. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 40, n. 2, p. 412-419, 2011.

MAGALHÃES, D.M.; BORGES, M.; LAUMANN, R.A.; SUJII, E.R.; MAYON, P.; CAULFIELD, J.C.; MIDEGA, C.A.O.; KHAN, Z.R.; PICKETT, J.A.; BIRKETT, M.A.; BLASSIOLI-MORAES, M.C. Semiochemicals from herbivory induced cotton plants enhance the foraging behavior of the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*. **Journal of Chemical Ecology**, New York v. 38, n. 12, p. 1528-1538, 2012.

MARTINEZ, S.T.; ALMEIDA, M.R.; PINTO, A.C. Alucinógenos naturais: um voo da Europa Medieval ao Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2501-2507, 2009.

MORRONE J.J. The species of Entiminae (Coleoptera: Curculionidae) ranged in America south of the United States. **Annals of the Institute of Biology**. Series of Zoology, v. 76, p. 99–168, 1999.

MOURA, J.I.L., BENTO, J.M.S., SOUZA, J. & VILELA, E.F. Captura de *Rhynchophorus palamarum* (L.) pelo uso de feromônio de agregação associado a árvore-armadilha e inseticida. **Annals of Society Entomological**. Brasil. 26: 69-73. 1997.

MUTIS, A.; PARRA, L.; PALMA, R.; PARDO, F.; PERICH, F.; QUIROZ, A Evidence of contact pheromone use in mating behavior of the raspberry weevil (Coleoptera: Curculionidae). **Environmental Entomology**, Lanham, v. 38, p. 192–197, 2009.

OBERPRIELER, R.G.; MARVALDI, A.E.; ANDERSON, R.S. Weevils, weevils, weevils everywhere. **Zootaxa**, Auckland, v. 1668, p. 491-520, 2007.

OHLENDORF, W. **Domestication and crop development of *Duboisia* sp. (Solanaceae)**. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/w3735e/w3735e23.htm>>. Acesso em: 13 de mai. 2012.

OTÁLORA-LUNA, F.; HAMMOCK, J.A.; ALESSANDRO, R.T.; LAPOINTE, S.L.; DICKENS, J.C. Discovery and characterization of chemical signals for citrus root weevil, *Diaprepes abbreviatus*. **Arthropod-Plant Interactions**, Helsinki, v. 3, n. 2, p. 63-73, 2009.

PALMA, R.; MUTIS, A.; MANOSALVA, L.; CEBALLOS, R.; QUIROZ, A. Behavioral and electrophysiological responses of *Hylastinus obscurus* to volatiles released from the roots of *Trifolium pratense* L. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 12, p. 183-193, 2012.

PARRA, L.; MUTIS, A.; ORTEGA, F.; QUIROZ, A. Field response of *Hylastinus obscurus* Marsham (Coleoptera: Curculionidae) to *E*-2-hexenal and limonene, two host-derived semiochemicals. **Ciencia y Investigación Agraria**, Santiago, v. 40, n. 3, p. 637-642, 2013.

PHILIPS, T.W., WEST, J.R., FOLTZ, J.L., SILVERSTEIN, R.M. & LANIER, G.N. Aggregation pheromone of the deodar weevil, *Pissodes nemorensis* (Coleoptera: Curculionidae): isolation and activity of grandisol and grandisal. **Journal of Chemical Ecology**. New York, 10: 1417-1423. 1984.

PHILLIPS, T.W.; JIANG, X.L.; BURKHOLDER, W.E.; PHILLIPS, J.K.; TRAN, H.Q. Behavioral responses to food volatiles by two species of stored-product coleoptera, *Sitophilus oryzae* (curculionidae) and *Tribolium castaneum* (tenebrionidae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 19, n. 4, p. 723-734, 1993.

PIÑERO, J.C.; WRIGHT, S.E.; PROKOPY, R.J. Response of plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) to odor-baited traps near woods. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 94, n. 6, p. 1386-1397, 2001.

POLAK, M.; BROWN, W.D. Mating tactics and courtship behavior in *Cleogonus rubetra* (Fabricius) (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of Insect Behaviour**, Riverside, v. 8, p. 453-463, 1995.

POLAND, T.; BORDEN, J.; STOCK, A.; CHONG, L. Green leaf volatiles disrupt responses by the spruce beetle, *Dendroctonus rufipennis*, and the western pine beetle, *Dendroctonus brevicornis* (Coleoptera: Scolytidae) to attractant-baited traps. **Journal of the Entomological Society of British Columbia**, Victoria, v. 95, p. 17-24, 1998.

R Development Core Team R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2012.

RATSCH, A.; STEADMAN, K.; BOGOSSIAN, F. The pituri story: a review of the historical literature surrounding traditional Australian Aboriginal use of nicotine in Central Australia. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, Flagstaff, v. 6, n. 26, p. 3-13, 2010.

REDDY, G. V. P.; GUERRERO, A. Interactions of insects pheromones and plant semiochemicals. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 253-261, 2004.

RIOS, M.D.; STACHALEK, R. The *Duboisia* genus, Australian aborigines and suggestibility. **Journal of Psychoactive Drugs**, San Francisco, v. 31, n. 2, p. 155-161, 1999.

ROCHAT, D.; GONZALEZ, A.; DOMINIQUE, M.; VILLANUEVA, A.; ZAGATTI, P. Evidence for male-produced aggregation pheromone in American palm weevil, *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 17, p. 1221–1230, 1991.

ROCHAT, D., DESCOINS, C., MALOSSE, C., NAGNON, P., ZAGATTI, P., AKAMOU, F. & MARIAU, D. Ecologie chimique des charançons des palmiers, *Rhynchophorus* spp. (Coleoptera). **Oléagineux** 48: 225-236. 1993.

ROSADO-NETO, G.H. Dimorfismo sexual e distribuição geográfica de *Sternechus subsignatus* Boheman, 1836 (Coleoptera: Curculionidae) no Brasil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 16, p. 199-204, 1987.

ROITBERG, B. D.; ISMAN, M. B. **Insect chemical ecology**: an evolutionary approach. New York: Chapman and Hall, 359 p. 1992.

ROTH, L.; WILLIS, E. The humidity behavior of *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 56, p. 41–42, 1963.

RUÍZ-MONTIEL C.; ROJAS, J.C.; CRUZ-LOPEZ, L.; GONZALEZ-HERNANDEZ, H. Factors affecting pheromone release by *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae). **Environmental Entomology**, Lanham, v. 38, p. 1423–1428, 2009.

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

SANTOS, W.J. & HOFER, D. Study of the effectiveness of boll weevil control applying drops of a mixture of sex pheromone (Grandlure) and cypermethrin through a pistol. **Proceedings of the Beltwide Cotton Conferences**, Nashville 2: 712-715. 1996.

SAPPINGTON, T.W.; SPURGEON, D.W. Preferred technique for adult sex determination of the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, p. 610-615, 2000.

SARRO, F.B.; CROCOMO, W.B.; FERREIRA, J.M.S. Aspectos da biologia e morfologia da broca do pedúnculo floral do coqueiro, *Homalinotus coriaceus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, p. 7-12, 2004.

SCARAMUZZO M. Boehringer produz no país insumo estratégico. **Valor Econômico**, São Paulo Disponível em: <<http://www.valor.com.br/empresas/3099750/boehringer-produz-no-pais-insumo-estrategico>>. Acesso em: 26 de fev. 2015.

SILVA, W.D.; MASCARIN, G.M.; ROMAGNOLI, E.M.; BENTO, J.M.S. Mating behavior of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Journal Insect Behaviour**, Riverside, v. 25, p. 408–417, 2012.

SILVA-FILHO, G.; BAILEZ, O.E.; VIANA-BAILEZ, A.M. Dimorfismo Sexual do Gorgulho-da-Goiaba *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 36, p. 520-524, 2007.

SIROT, L.K.; BROCKMANN, H.J.; LAPOINTE, S.L. Male postcopulatory reproductive success in the beetle, *Diaprepes abbreviatus*. **Animal Behaviour**, Amsterdam, v. 74, p. 143–152, 2007.

SOUZA, V.C.; HARRI, L. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 768, 2005.

SUN, X.L.; WANG, G.C.; CAI, X.M.; JIN, S.; GAO, Y.; CHEN, Z.M. The tea weevil, *Myloccerinus aurolineatus*, is attracted to volatiles induced by conspecifics. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 36, n. 4, p. 388-395, 2010.

SZENDREI, Z.; AVERILL, A.; ALBORN, H.; RODRIGUEZ-SAONA, C. Identification and field evaluation of attractants for the cranberry weevil, *Anthonomus musculus* Say. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 37, n. 4, p. 387-397, 2011.

TAFOYA, F., WHALON, M.E., VANDERWOOT, C., COOMBS, A.B. & CIBRIAN-TOVAR, J. Aggregation pheromone of *Metamasius spinolae* (Coleoptera: Curculionidae): Chemical analysis and field test. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 36: 53-57. 2007.

TEDDERS, W.L.; PAYNE, J.A. Biology, life history, and control of *Conotrachelus schoofi* (Coleoptera: Curculionidae) on pecans. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 79, p. 490-496, 1986.

THOMPSON, R.T. Observations on the morphology and classification of weevils (Coleoptera: Curculionoidea) with a key to major groups. **Journal of Natural History**, London, v. 26, p. 835-891, 1992.

TINZAARA, W., DICKE, M., VAN HUIS, A., JOOP, J.J.A. & GOLD, C.S. Different bioassays for investigating orientation responses of the banana weevil, *Cosmopolites sordidus*, show additive effects of host plant volatiles and a synthetic male-produced aggregation pheromone. **Entomological Experimentalis Applied**. 106: 169-175. 2003.

TIRONI, P.; TREUENFELS, A. von; PARRA, J.R.P. Biology of *Microctonus* sp. (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of *Cyrtomon luridus* Boh. (Coleoptera: Curculionidae). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, p. 538-541, 2004.

_____. Population dynamics of *Cyrtomon luridus* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) on *Duboisia* sp. (Solanaceae) in Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, p. 473-477, 2005.

VANDERBILT, C.F.; GIBLIN-DAVIS, R.M.; WEISSLING, T.J. Mating behavior and sexual response to aggregation pheromone of *Rhynchophorus cruentatus* (Coleoptera: Curculionidae). **Florida Entomologist**, Lutz, v. 81, p. 351–360, 1998.

VAN TOL, R.W.H.M.; VISSER, J.H.; SABELIS, M.W. Olfactory responses of the vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*, to tree odours. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 27, n. 3, p. 213-222, 2002.

VIANA, A.; VILELA, E. Comportamento de agregação e acasalamento de *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleóptera:Curculionidae). **Anais da Sociedade Entomologica do Brasil**, Londrina, v. 25, n. 2, p. 347-350,1996.

VRKOČOVÁ, P.; VALTEROVÁ, I.; VRKOČ, J.; KOUTEK, B. Volatiles released from oak, a host tree for the bark beetle *Scolytus intricatus*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 28, p. 933-947, 2000.

ZARBIN, P. H. G.; RODRIGUES, M. A. C. M.; LIMA, E. R. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Química Nova**, 32, 722, 2009.

ZARBIN, P.H.G., MOREIRA, M.A.B., HAFTMANN, J., FRANCKE, W. & OLIVEIRA, A.R.M. Male-specific volatiles released by the Brazilian papaya weevil, *Pseudopiazurus obesus*: Partial identification and evidence of an aggregation pheromone. **Journal Brazilian Chemical Society**. 8: 1048 –1053. 2007.

ZORZENON, F.J.; BERGMANN, E.C.; BICUDO, J.E.A. Primeira ocorrência de *Metamasius hemipterus* (Linnaeus, 1758) e *Metamasius ensirotris* (Germar, 1824) (Coleoptera, Curculionidae) em palmiteiros dos gêneros *Euterpe* e *Bactris* (Arecaceae) no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, p. 265-268, 2000.

WEISSLING, T.J., GIBLIN-DAVIS, R.M., SCHEFFRAHN, R.H. & MARBAN-MENDOZA, N. M. Trap for capturing and retaining *Rhynchophorus cruentatus* (Coleoptera: Curculionidae) adults using Sabal palmetto as bait. **Florida Entomologist**. Florida 75: 212-221. 1992.

WEISSLING, T.J.; GIBLIN-DAVIS, R.M.; GRIES, G.; GRIES, R.; PEREZ, A.L.; PIERCE, H.D.; OEHLISCHLAGER, A.C. Aggregation pheromone of palmetto weevil, *Rhynchophorus cruentatus* (f.) (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 20, p. 505–515, 1994.

WEN, X.; KUANG, Y.; SHI, M.; LI, H.; LUO, Y.; DENG, R. Biology of *Hylobitelus xiaoi* (Coleoptera: Curculionidae), a new pest of slash pine, *Pinus elliottii*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 97, n. 6, p. 1958-1964, 2004.

WOOD, D. L. The role of pheromones, kairomones, and allomones in the host selection and colonization behavior of bark beetles. **Annual Review of Entomology**, v. 27, p. 411-446, 1982.

ANEXO

Anexo A

J Insect Behav
DOI 10.1007/s10905-014-9481-1

Mating Behavior and Evidence for Male-Produced Aggregation Pheromone in *Cyrtomon luridus* (Boheman) (Coleoptera: Curculionidae: Entiminae)

Aline Cristiane Kamiya · Weliton Dias Silva ·
Mariana O. Garrigós Leite · Paulo Tironi ·
Lucila Wadt · José Maurício Simões Bento

Revised: 27 November 2014 / Accepted: 9 December 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract *Cyrtomon luridus* (Boheman) (Coleoptera: Curculionidae: Entiminae) is a serious pest of *Duboisia* sp. (Solanaceae) in Brazil. However, our knowledge of the reproductive behavior and the chemical ecology of this curculionid is based on very limited data. The aim of this study was therefore to describe the mating behavior of *C. luridus* and the olfactory response of males and females to volatiles of conspecifics alone or conspecifics with a host plant. The mating behavior was observed in newly emerged pairs for 9 days in the laboratory. A Y-tube olfactometer was used to evaluate the responses of beetles to odor sources. The paired adults began to mate 2 days after emergence, and they displayed repeated matings that increased in frequency with age. The males were the most active sex in the mating system of *C. luridus*. The mating sequence in this species was divided into precopulatory, copulatory and postcopulatory phases. In the olfactometer bioassays, the volatiles emitted from males that fed on *Duboisia* sp. were attractive to conspecific weevils. The evidence from this result indicates that chemical communication in *C. luridus* is likely mediated by an aggregation pheromone produced by males. Our findings provide new insights into the mating system and chemical ecology of *C. luridus* and may serve as a foundation for future studies to develop strategies for the management of this curculionid in the field.

Keywords Weevil · courtship · copula · ethogram · semiochemicals · Solanaceae

A. C. Kamiya · W. D. Silva · M. O. G. Leite · L. Wadt · J. M. S. Bento
Departamento de Entomologia e Acarologia, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brazil

P. Tironi
Solana Agropecuária Ltda, Arapongas, PR, Brazil

J. M. S. Bento (✉)
Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos, ESALQ/USP, Av. Pádua Dias 11,
Piracicaba, SP 13418-900, Brazil
e-mail: jmsbento@usp.br

Published online: 19 December 2014

Springer

Introduction

Studies on the mating behavior of insects represent the first step toward a full understanding of the evolutionary behavioral ecology of insects (Thornhill and Alcock 1983). Mating behavior generally involves activities from pair formation through courtship and separation after copulation. The sequence of these activities can vary considerably among species (Gwynne 2003) and are lacking for many species such *Cyrtomon luridus* Boheman (Coleoptera: Curculionidae: Entiminae).

Cyrtomon luridus is native to southern Brazil, Argentina and Paraguay (Lanteri 1990; Morrone 1999), where it is commonly found on wild Solanaceae (Tironi et al. 2005). Until recently, *C. luridus* was not reported as an agricultural pest of any consequence. However, in the 1990s, this curculionid adapted to an important medicinal plant, *Duboisia* sp., on which it causes serious damage with up to 100 % mortality of shrubs. Introduced from Australia to Brazil, this plant is rich in scopolamine, an alkaloid widely used for human and animal health (Tironi et al. 2005).

The adults of *C. luridus* emerge from soil in September (beginning of the rainy season) through January. The larvae feed on the roots, and the adults feed on the leaves. The life cycle (egg to adult) is approximately 180 days, and on average, adult females live for 114 days and lay 400 eggs (Tironi et al. 2005).

In addition to these life history characteristics, field observations show that *C. luridus* adults congregate on the *Duboisia* sp. shrubs, where males and females feed and mate. The aggregation of conspecifics on host plants is associated with the production of volatile pheromones in other curculionids (Bartelt 1999). For the Entiminae, the few available studies identified male-produced aggregation pheromones in *Sitona lineatus* (L.) (Blight et al. 1984; Blight and Wadhams 1987) and *Diaprepes abbreviatus* (L.) (Lapointe et al. 2012) and a male-produced sex pheromone in *Sitona discoideus* Gyllenhal (Unelius et al. 2013).

By contrast, the mating behavior and the pheromone production in *C. luridus* is unknown. Therefore, we describe the mating behavior of *C. luridus* and the response of both sexes to volatiles of conspecifics alone or conspecifics with the host plant, *Duboisia* sp.

Materials and Methods

Insects

Newly emerged, virgin male and female adults of *C. luridus* were collected from a *Duboisia* sp. growing area in Arapongas, PR, Brazil. The beetles were collected by exposing the pupal chambers with emerged adults in the soil around infested shrubs. The insects were separated by sex according to the morphology of the last abdominal tergites. Next, the beetles were transported to the Laboratory of Chemical Ecology and Insect Behavior at the University of São Paulo, in Piracicaba, SP, Brazil.

The males and females were separated in plexiglass wire-top cages in a room at 25 ± 1 °C, 70 ± 10 % relative humidity, and a 12:12 h (Light:Dark) photoperiod. The experiments were also conducted in these conditions.

Mating Behavior

Each pair of adults of *C. luridus* was placed in a plastic container (35 cm high × 20 cm internal diameter, ID) lined with filter paper moistened with distilled water. A branch with 10 leaves of *Duboisia* sp. was offered to each pair and was replaced daily. The containers were covered with PVC film to prevent the beetles from escaping and to maintain the relative humidity inside the container.

The mating behavior of 28-paired adults of *C. luridus* was observed at two-hour intervals in the laboratory for 9 days. The following variables were assessed in the mating behavior of this species: (i) age at first mating; (ii) mean number of matings per pair; and (iii) time of day of mating. For the time of day of mating, the data were used from the day when the most matings were observed.

In a later experiment, to determine the mating sequence and the time spent performing each phase of the mating behavioral sequence, 28 pairs of *C. luridus* of the age when they exhibited the highest sexual activity were continuously recorded in the laboratory for 24 h using a digital camera (SONY HDR-SR12, Japan). The videos were transferred to a computer and analyzed with a SONY software video editor. Additionally, an ethogram of *C. luridus* mating behavior was constructed that showed the proportion of pairs that proceeded to the next step within each behavioral phase.

From the observations, only the behavioral sequences that resulted in successful copulation were included.

Bioassay for *C. luridus* Pheromone

The olfactory responses of *C. luridus* males and females to the volatiles of conspecifics with or without the host plant were determined. A Y-tube olfactometer was used that consisted of a Y-shaped glass tube (3 cm ID for each part of the 'Y', 40° angle between the arms, length of the main tube 40 cm, and length of each arm 20 cm), which was connected by the arms to two glass chambers (9.5 cm ID × 51 cm height).

Each treatment was placed inside the glass chambers. An air compressor provided purified air through activated carbon filters, and the air was humidified in a Volatile Collection System unit (Analytical Research Systems, Gainesville, FL, USA). In this same unit, a steady airflow at 600 mL min⁻¹ was directed toward the chambers with the volatiles and the Y-tube olfactometer.

A virgin *C. luridus* male or female aged four days was released within the basal part of the olfactometer. Once inside the main tube, the beetle was observed for a maximum of 20 min, during which a choice of treatments was made. The beetle choice for one of the treatments was considered after it crossed a line 1 cm from the distal end of each arm of the olfactometer and remained there for at least 20 s. All olfactometer assays were conducted between 1000 and 1600 h (local time), which is the diurnal period during which adult *C. luridus* are most active in the field.

Bioassays were performed using the following treatments: (i) two males alone; (ii) two females alone; (iii) two males+host plant (1 seedling of *Duboisia* sp. 30 cm in height); (iv) two females+host plant; (v) host plant alone; and (vi) a blank (clean air).

All tested insects and plants were used only once, and those beetles that chose neither of the olfactometer arms were not considered in the analysis. The assignment of odor sources to each arm was reversed after every trial to eliminate directional bias.

After each set of trials, the olfactometer and chambers were washed with Extran[®] (10 %), alcohol (99.5 %), acetone (99.5 %), and distilled water and dried in an oven at 160 °C for at least 1 hour.

All experiments were performed from September through November 2013, which coincided with the mating season of *C. luridus* (Tironi et al. 2005).

Statistical Analyses

The data on the duration of each phase of mating were submitted to the Kruskal-Wallis rank sum test to evaluate possible differences in the duration of the mating phases. The differences between means were tested with pairwise comparisons using the Wilcoxon rank sum test ($\alpha=0.05$). The frequency of mating over time was analyzed using a generalized estimating equation (GEE model) with a logit-link function. A generalized linear model for binary data (mate or no mate) with repeated measures in time was used to verify the effect of time of day (hour) on the % mating frequency ($\alpha=0.05$). For this analysis, pairs at the age that displayed the highest sexual activity were used. The computation was run in R using the package 'geepack'. The age of first mating was determined using the Kaplan-Meier survival analysis with the R package 'survival'. Survival analysis is a technique for analyzing 'time-to-event' or 'failure-time' data, which may or may not be related to survival and death in the usual sense (Goel et al. 2010). In calculating a Kaplan-Meier curve, the probability of occurrence of the first mating was obtained from the proportion of at-risk *C. luridus* adults that performed the first mating. The cumulative probability was initially one of the first mating not occurring. In this study, the proportion of *C. luridus* that did not perform the first mating over the time after emergence of the beetles was the probability. The statistical significance was determined using a log-rank (Mantel-Cox test) test ($\alpha=0.05$).

An 'exact binomial test' (sign test) was used to determine whether the number of *C. luridus* males and females that chose one odor source in the Y-tube olfactometer bioassay differed significantly from a random choice of direction (50 % chance of selecting each arm).

All tests and analyses were performed with the R software version 3.1.0 (R Development Core Team 2012).

Results

Mating Behavior

The effect of age on the occurrence of a first mating in *C. luridus* was significant ($\chi^2=41.9$; $df=27$; $P<0.05$; $n=15$ pairs). The Kaplan-Meier curve (Fig. 1) showed that paired adults started to mate 2.0 ± 0.1 days after emergence. They mated 3.9 ± 0.5 times during the 9-day evaluation period. The mating activity occurred at almost any time, although two significant peaks were observed (i.e., 7th hour in the photophase and 3rd hour in the scotophase) that occurred in the percentage of individuals mating during the 24 h evaluation ($\chi^2=14521$; $df=11$; $P<0.0001$; $n=15$ pairs aged 4 days; Fig. 2).

The mating behavior sequence in *C. luridus* exhibited three distinct phases.

Fig. 1 Kaplan-Meier curve of first mating in 15 paired *Cyrtomon luridus* adults (dashed lines indicate 95 % confidence intervals)

The precopulatory phase began when the male approached the female. The approach of the male could be posterior, frontal or lateral (Fig. 3a). After approaching, the male tapped with antennae and rubbed the rostrum on the elytra and pronotum of the female as he began to mount her (Fig. 3b). Nevertheless, no noticeable courtship behavior occurred prior to mounting. The male mounted the female only from the back (Fig. 3c). After mounting, the male moved his body in an anterior direction and performed rostral rubbing and antennal tapping on the female's head and pronotum for a few seconds (Fig. 3d). Next, the male moved in a posterior direction as the abdomen bent ventrally and the aedeagus was extruded. The male then attempted genital engagement by probing the end of the female's abdomen with his everted aedeagus (Fig. 3e).

In the copulatory phase, the male positioned the body approximately 45° to that of the female and inserted the aedeagus into the female's genital chamber (Fig. 3f). During copulation, the female remained quiet, moved a short distance slowly or moved the antennae and forelegs. Moreover, the male performed antennal tapping on the pronotum of the female. After a period in copula, the female initiated the termination of mating by kicking the abdomen of the male with the hind legs (Fig. 3g), or by walking quickly with the male on her. The copulatory phase ended with withdrawal of the aedeagus from the genital chamber of the female (Fig. 3h).

Fig. 2 Circadian mating rhythms of pairs of *Cyrtomon luridus* observed at two-hour intervals for a 24-h period in the laboratory. The white portion of horizontal bar below graph represents photophase, and the black portion represents scotophase. Bars with different letters are significantly different by pairwise *t*-test ($P < 0.05$)

Fig. 3 Mating sequence of *Cyrtomon luridus* ($n=28$ pairs aged 4 days). **a** male approaches female; **b** male taps with antennae and rubs with the rostrum on the female's elytra and pronotum; **c** male mounts the female; **d** male moves anteriorly and rubs with the rostrum and taps with antennae on the female's head and pronotum; **e** male probes the end of the female's abdomen with his everted aedeagus; **f** copulation; **g** female kicks the male's abdomen with her hind legs; **h** genital disengagement; and **i** dismounting and separation

In the postcopulatory phase, the male dismounted immediately after genital retraction. The partners remained motionless and close to each other for a few seconds and then separated (Fig. 3i).

If unreceptive, the female ran away when touched by the male or performed a series of rejection displays upon his mounting, including running and accelerating as the female jerked the abdomen downward so the male could insert the aedeagus in the genital chamber only with difficulty or kicking the male abdomen with the hind legs.

From preliminary analysis of this behavioral sequence, an ethogram of *C. luridus* mating behavior was constructed (Fig. 4). We observed a number of behavioral steps during the precopulatory phase. In most of the pairs (62 %), the male approached the female from the back. In all the pairs, the male performed rostral rubbing and antennal tapping of the female's elytra, and mounted her from the back. After mounting, 84 % of the males tapped with the antenna and rubbed with the rostrum the female's head and pronotum. In 100 % of the pairs, the male probed the end of the female's abdomen with the aedeagus. During the copulatory phase, 68 % of the males tapped the female's pronotum with the antennae. In all the pairs, male and female moved away from each other after dismounting in the postcopulatory phase.

There was a significant effect of mating phase on time ($\chi^2=28.91$; $df=2$; $P<0.0001$; $n=13$ pairs aged 4 days). The copulatory phase (151.69 ± 10.92 min, $\text{mean}\pm\text{SE}$) was significantly longer than both precopulatory (4.50 ± 1.60 min; $P<0.0001$) and postcopulatory (40.85 ± 1.00 min; $P<0.0001$) phases, whereas the postcopulatory phase was longer than precopulatory phase ($P<0.05$).

Evidence for Aggregation Pheromone

Bioassays in the Y-tube olfactometer (Fig. 5) showed that *C. luridus* females ($P=0.041$) and males ($P=0.001$) preferred the host plant (*Duboisia* sp.) compared with the blank (clean air). However, they showed a significant preference for males+host plant over host plant alone (female: $P=0.029$ and male: $P=0.002$). Moreover, both sexes showed no preference for females+host plant compared with host plant alone (female: $P=0.720$ and male: $P=1$) or males compared with females (female: $P=0.618$ and male: $P=1$). Interestingly, females preferred the host plant in contrast to the males ($P=0.047$), whereas the males preferred the host plant in contrast to the females alone ($P=0.002$). Only females were significantly attracted to the males+host plant compared with females+host plant ($P=0.001$).

Discussion

The mating behavior in *C. luridus* is clearly divided into precopulatory, copulatory and postcopulatory phases. Paired adults of this species reach the sexual maturity 2 days after emergence and mate repeatedly. During this period, the sclerotization of sexual organs occurs in both sexes. However, additional studies are necessary that focus on the effectiveness of sperm transmission, in addition to the direct and indirect effects of

Fig. 4 Ethogram of *Cyrtomon luridus* mating behavior ($n=28$ pairs aged 4 days). Numbers represent the probability for mating pairs that proceeded to the next step

repeated matings (same male) or multiple matings (different males) on *C. luridus* females and their offspring.

Fig. 5 Response of females and males of *Cyrtomom luridus* to volatiles of conspecific with or without the host plant (*Duboisia* sp.) in Y-tube olfactometer trials. The blank was clean air. N=Number of beetles tested. *=Significant and ns=Non-significant at 5 % probability according to the exact binomial test

In *C. luridus*, we observed two peaks in mating activity during the day. However, this information was collected from the observations of a limited number of pairs of a specific age in the laboratory. Therefore, more studies are necessary to verify if this pattern also occurs in the field.

The behavior patterns exhibited by *C. luridus* during the mating sequence were similar to those observed in other Curculionidae species, such as *D. abbreviatus* (Sirot et al. 2007), *Hypera postica* (Gyllenhal) (LeCato and Pienkowski 1970), *Cleogonus rubetra* (Fabricius) (Polak and Brown 1995), *Rhynchophorus cruentatus* (Vanderbilt et al. 1998), *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Silva et al. 2012) and *Aclees* sp. cf. *foveatus* Voss (Benelli et al. 2014). Although the courtship behavior of *C. luridus* was not conspicuous, the male performed antennal tapping and rostral rubbing on the female's pronotum and elytra during the precopulatory phase. Some curculionids use this behavior to recognize mates at short distances. Substances present on the female's cuticle, such as a contact sex pheromone, are responsible for mediating such recognition in *Aegorhinus superciliosus* (Guérin) (Mutis et al. 2009). However, the antennal

tapping and rostral rubbing observed here might also be a 'placating gesture' before mounting takes place, which has been reported in some bark beetles (Birch 1978).

After mounting, the male performed antennal tapping and rostral rubbing on the female's head and pronotum. At this stage, the behavior might be the male's courtship display to the female, which appears to be unreceptive to the mating attempt. In *R. cruentatus*, the antennal tapping and rostral rubbing are indicative that a copulatory event is about to occur (Vanderbilt et al. 1998). During the copulatory phase, the male performed antennal tapping on the female's elytra and pronotum. Sirot et al. (2007) referred to this behavior as 'stroking' in *D. abbreviatus*, on which the female favors sperm from the males that stroke the fastest. These authors inferred that the stroking behavior is mediated by cryptic female choice.

Because *C. luridus* males searched immediately for the female's genitalia after the mount and left the female immediately after aedeagus retraction, neither the so-called passive phase (i.e., the male remains mounted on the female's back without genital contact; Parker 1974) nor the postcopulatory mate guarding (Alcock 1994) were observed. However, the paired adults of *C. luridus* were separated during observations, and male-to-male competition for partners did not occur. Therefore, we cannot infer that the males of this species would not display the post-mate guarding under field conditions. Postcopulatory mate guarding was observed in *D. abbreviatus* (Harari et al. 1999), *R. cruentatus* (Vanderbilt et al. 1998) and *C. rubra* (Polak and Brown 1995). In *D. abbreviatus*, the reproductive success has been associated with mate guarding (Harari et al. 1999, 2003).

The paired *C. luridus* adults remained in copula for approximately 2.5 h. This was similar to the time reported for *R. cruentatus* (≈ 2 h; Vanderbilt et al. 1998) but higher than that of *C. rubra* (≈ 22 min; Polak and Brown 1995) and lower than that of *D. abbreviatus* (≈ 16 h; Harari et al. 2003) and *H. postica* (≈ 12 h; LeCato and Pienkowski 1970).

The males of *C. luridus* searched for females in virtually all situations, whereas the females were indifferent to the presence of partners. Similar behavior has been observed in *H. postica*, a species in which the male is the 'aggressive' partner and the female is 'passive' (LeCato and Pienkowski 1970). We often observed the females feeding on *Duboisia* sp. leaves prior to the approach of the male. Following the initial contact by the male, they stopped feeding and remained motionless or walked slowly as copulation was occurring. However, the females appeared unreceptive at times and made abrupt movements to avoid the mounting attempts of the male. Based upon this information, the additional matings observed might be due to our experimental design because the female could not avoid additional mating attempts by the same male. Moreover, both sexes of *C. luridus* are found congregated on the same host plant under natural conditions. Therefore, a *C. luridus* female would likely mate multiple times with different males instead of mating repeated times with the same male. Moreover, in artificial aggregations inside laboratory cages, we observed multiple matings by males and females of *C. luridus*. This behavior was also observed in *D. abbreviatus* (Sirot et al. 2007), *R. cruentatus* (Vanderbilt et al. 1998) and *H. postica* (LeCato and Pienkowski 1970).

In this study, we tested the response of *C. luridus* males and females to volatiles of conspecifics alone or conspecifics associated with a host plant (*Duboisia* sp.). The volatiles produced by the males feeding on the host plant were attractive to both sexes

of *C. luridus*. By contrast, females alone or females+host plant were not attractive. When combined, these results offer compelling evidence that chemical communication among conspecifics of *C. luridus* is likely mediated by a male-produced aggregation pheromone. To our knowledge, male-produced aggregation pheromones in Entiminae were reported for *S. lineatus* (Blight et al. 1984; Blight and Wadhams 1987) and *D. abbreviatus* (L.) (Lapointe et al. 2012), although Unelius et al. (2013) reported on a male-produced sex pheromone in *S. discoideus*.

Aggregation pheromones are generally used for both host location and aggregation of conspecifics (Bartelt 1999). We hypothesized that these semiochemicals could assist in the congregation of both sexes of *C. luridus* on *Duboisia* sp. or other solanaceous hosts for feeding and mating. Host plant stimulation of production and release of aggregation pheromones was documented for *D. abbreviatus* (Lapointe et al. 2012) and *S. lineatus* (Blight et al. 1984; 1987), as well as for several other curculionids, such as *Rhyncophorus palmarum* (L.) (Jaffé et al. 1993), *Sternechus subsignatus* Boheman (Ambroggi and Zarbin 2008) and *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Ruiz-Montiel et al. 2009). Adult *C. luridus* males could initially locate a host plant by olfactory perception; then the subsequent feeding and passage of fecal materials would release the volatile attractants for conspecifics. It still remains to be confirmed whether *C. luridus* males release the pheromonal compounds with the frass and/or other parts of the body.

Moreover, the host plant volatiles may act synergistically with the *C. luridus* pheromone. These plant volatiles enhance the attraction of conspecifics to the male-produced aggregation pheromone in *Anthonomus grandis* (Dickens 1989) and *R. cruentatus* (F.) (Weissling et al. 1994). Indeed, we observed a preference of *C. luridus* males and females for the host plant compared with the blank or conspecifics alone. Similar to the male-produced semiochemicals, these findings suggest that host plant volatiles also represent important components in the chemical ecology of this curculionid.

From a practical perspective, the aggregation pheromone of *C. luridus* could be used as a source of attraction for this species in an integrated pest management program (IPM). Therefore, future works should aim to isolate, identify and synthesize the *C. luridus* pheromone, which could be incorporated into traps for monitoring and/or control of this pest not only in *Duboisia* sp. growing areas but also in those with other economically important solanaceous species. Additionally, the information on the mating behavior of *C. luridus* can be used as foundation for future studies that focus on the reproductive behavior of this species.

Acknowledgments We would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), INCT Semioquímicos na Agricultura (FAPESP/CNPq), and Boehringer Ingelheim for the financial support provided for this work. We are also grateful to Marcelo Kauffman Filho and Ricardo Luis Duarte for their help in the collection of the biological materials.

References

- Alcock J (1994) Postinsemination associations between males and females in insects: the mate-guarding hypothesis. *Annu Rev Entomol* 39:1–21

- Ambrogi BG, Zarbin PHG (2008) Aggregation pheromone in *Sternechus subsignatus* (Coleoptera: Curculionidae): olfactory behaviour and temporal pattern of emission. *J Appl Entomol* 132:54–58
- Bartelt RJ (1999) Weevils. In: Hardie J, Minks AK (eds) Pheromones of non-lepidopteran insects associated with agricultural plants. CABI Publishing, Wallingford, pp 91–112
- Benelli G, Meregalli M, Canale A (2014) Field observations on the mating behavior of *Acleos* sp. cf. *foveatus* Voss (Coleoptera: Curculionidae), an exotic pest noxious to fig orchards. *J Insect Behav* 27:419–427
- Birch MC (1978) Chemical communication in pine bark beetles. *Am Sci* 66:409–419
- Blight MM, Wadhams LJ (1987) Male-produced aggregation pheromone in pea and bean weevil, *Sitona lineatus* (L.). *J Chem Ecol* 13:733–739
- Blight MM, Pickett JA, Smith MC, Wadhams LJ (1984) An aggregation pheromone of *Sitona lineatus*. *Naturwissenschaften* 71:480
- Dickens JC (1989) Green leaf volatiles enhance aggregation pheromone of boll weevil, *Anthonomus grandis*. *Entomol Exp Appl* 52:191–203
- Goel MK, Khanna P, Kishore J (2010) Understanding survival analysis: Kaplan-Meier estimate. *Int J Ayurveda Res* 1:274–278
- Gwynne DT (2003) Mating behavior. In: Resh VH, Cardé RT (eds) Encyclopedia of insects. Academic, San Diego, pp 682–688
- Harari AR, Handler AM, Landolt PJ (1999) Size-assortative mating, male choice and female choice in the curculionid beetle *Diaprepes abbreviatus*. *Anim Behav* 58:1191–1200
- Harari AR, Landolt PJ, O'Brien CW, Brockmann HJ (2003) Prolonged mate guarding and sperm competition in the weevil *Diaprepes abbreviatus* (L.). *Behav Ecol* 14:89–96
- Jaffé K, Sánchez P, Cenda H, Hernández JV, Jaffé R, Urdaneta N, Guerra G, Martínez R, Miras B (1993) Chemical ecology of the palm weevil *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae): attraction to host plants and to a male-produced aggregation pheromone. *J Chem Ecol* 19:1703–1720
- Lanteri AA (1990) Revisión sistemática del género *Cyrtomon* Schönherr (Coleoptera, Curculionidae). *Rev Bras Entomol* 34:387–402
- Lapointe SL, Alessandro RT, Robbins PS, Khirman A, Svatos A, Dickens JC, Otálora-Luna F, Kaplan F, Albom HT, Teal PE (2012) Identification and synthesis of a male-produced pheromone for the neotropical root weevil *Diaprepes abbreviatus*. *J Chem Ecol* 38:408–417
- LeCato GL, Pienkowski RL (1970) Laboratory mating behavior of the alfalfa weevil, *Hypera postica*. *Ann Entomol Soc Am* 63:1000–1007
- Morrone JJ (1999) The species of Entiminae (Coleoptera: Curculionidae) ranged in America south of the United States. *An Inst Biol UNAM Ser Zool* 76:99–168
- Mutis A, Parra L, Palma R, Pardo F, Perich F, Quiroz A (2009) Evidence of contact pheromone use in mating behavior of the raspberry weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Environ Entomol* 38:192–197
- Parker GA (1974) Courtship persistence and female-guarding as male time investment strategies. *Behaviour* 48:157–184
- Polak M, Brown WD (1995) Mating tactics and courtship behavior in *Cleogonus rubetra* (Fabricius) (Coleoptera, Curculionidae). *J Insect Behav* 8:453–463
- R Development Core Team (2012) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna
- Ruiz-Montiel C, Rojas JC, Cruz-Lopez L, Gonzalez-Hernandez H (2009) Factors affecting pheromone release by *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Environ Entomol* 38:1423–1428
- Silva WD, Mascarín GM, Romagnoli EM, Bento JMS (2012) Mating behavior of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *J Insect Behav* 25:408–417
- Siroi LK, Brockmann HJ, Lapointe SL (2007) Male postcopulatory reproductive success in the beetle, *Diaprepes abbreviatus*. *Anim Behav* 74:143–152
- Thomhill R, Alcock J (1983) The evolution of insect mating systems. Harvard University Press, Cambridge
- Tironi P, von Treuenfels A, Parra JRP (2005) Population dynamics of *Cyrtomon luridus* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) on *Duboisia* sp. (Solanaceae) in Brazil. *Sci Agric* 62:473–477
- Unelius CR, Park KC, McNeill M, Wee SL, Bohman B, Suckling DM (2013) Identification and electrophysiological studies of (4S,5S)-5-hydroxy-4-methyl-3-heptanone and 4-methyl-3,5-heptanedione in male lucerne weevils. *Naturwissenschaften* 100:135–143
- Vanderbilt CF, Giblin-Davis RM, Weissling TJ (1998) Mating behavior and sexual response to aggregation pheromone of *Rhynchophorus cruentatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Fla Entomol* 81:351–360
- Weissling TJ, Giblin-Davis RM, Gries G, Gries R, Perez AL, Pierce HD, Oehlschlager AC (1994) Aggregation pheromone of palmetto weevil, *Rhynchophorus cruentatus* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *J Chem Ecol* 20:505–515