

MARCY DAS GRAÇAS FONSECA

**EFEITO DA PLANTA HOSPEDEIRA E DA TÉCNICA DA CONFUSÃO
SEXUAL NO COMPORTAMENTO REPRODUTIVO DE *Leucoptera
coffeella* (LEPIDOPTERA: LYONETIIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2006

MARCY DAS GRAÇAS FONSECA

**EFEITO DA PLANTA HOSPEDEIRA E DA TÉCNICA DA CONFUSÃO
SEXUAL NO COMPORTAMENTO REPRODUTIVO DE *Leucoptera
coffeella* (LEPIDOPTERA: LYONETIIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 23 de fevereiro de 2006

**Prof. Evaldo Ferreira Vilela
(Conselheiro)**

Prof^a. Terezinha M C Della Lucia

Dr. Ronaldo Reis Júnior

Dr^a. Madelaine Venzon

**Prof. Eraldo Rodrigues de Lima
(Orientador)**

Aos meus queridos pais, Geraldo Eládio da Fonseca (*in memorian*) e Rita Barreto Fonseca, pelo amor e dedicação.

DEDICO

Aos meus queridos irmãos, pelo apoio, amizade, amor e pelo empenho em me oferecer uma boa educação.

OFEREÇO

À Deus, pela vida e pela força nos momentos de dificuldade.

AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Biologia Animal pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

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

Ao Prof. Eraldo Rodrigues de Lima, pela amizade, pela orientação e pelas inúmeras oportunidades oferecidas no decorrer destes 6 anos... Muito obrigada!!!

Aos Prof. Lino Neto e Prof. Evaldo Vilela, pela amizade e por seus importantes comentários e sugestões.

Ao Prof. Arne Janssen, pelas importantes sugestões no trabalho realizado com olfatometria.

A todos os Professores do curso de Pós-Graduação em Entomologia, pelo entusiasmo de ensinar, pela atenção aos alunos e pelo profissionalismo.

Ao Prof. Ronaldo Reis Jr. e a Ana Paula Albano pelo o grande auxílio nas análises estatísticas.

Ao Felipe Nalon e Gabriela Miranda pela amizade, força e ajuda indispensável à realização deste trabalho.

Aos meus colegas, Edmar, Claudinei, Ézio, Tobias, Lucimar, Marco Aurélio, Simone Freitas, Carina, Jeanne, Iracenir, Leandro, Janina, Nete, Fabricio, Guta, Aline, Fadini, Adrian, Romerinho, Claudia, Leandro Souto, Carolina, Célia pela convivência, amizade e coleguismo.

A secretária do curso de Pós-Graduação em Entomologia (UFV), Maria Paula A. da Costa, pela paciência, compreensão, ajuda e amizade durante todos estes anos.

Aos amigos do insetário, Gabriela, Ilka, Ethel, Marquinho, Márcio, Alice, Myrian, Lucas Sr. Manoel pela amizade e alegria durante nossa convivência.

À minha amiga Mônica Josene, pela amizade, apoio e carinho.

À minha grande amiga Rúbia, pela amizade e companhia durante todo o curso.

Ao meu amigo Vinícius, pela amizade, companheirismo e a grande ajuda nos seminários.

Aos funcionários do Insetário, Bioagro, e Entomologia pela agradável convivência.

Aos colegas do Laboratório de Feromônio e Comportamento dos Insetos, Tito, Ângela, Denise, Cris, Rondinelli, Tate, Luciano, Adriano, Andreza, Elaine, Amir, Eduardo, Felipe, Adolfo pela agradável convivência.

A fazenda DATERRA (Patrocínio-MG), por permitir a instalação do experimento em suas plantações, além do apoio de seus funcionários durante todo o experimento.

As minhas eternas amigas de república, Fran, Carol e Cris, pela amizade, compreensão, ajuda, alegria durante esses 5 anos de convivência.

Aos meus sobrinhos, cunhadas e cunhados, pelo carinho, amizade e amor em todos os momentos.

E a todas as pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram para que eu atingisse meu objetivo.

BIOGRAFIA

MARCY DAS GRAÇAS FONSECA, filha de Geraldo Eládio da Fonseca e Rita de Oliveira Barreto Fonseca, nasceu em Bias Fortes, em 17 de setembro de 1975.

Em janeiro de 2004, concluiu o curso de Eng. Agrônômica pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG.

Em abril de 2004, ingressou no curso de mestrado em Entomologia na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se á defesa de tese em 23 de fevereiro de 2006.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	6
CAPÍTULO 1 Comportamento reprodutivo de <i>Leucoptera coffeella</i> (Guérin-Méneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae): Efeito da planta hospedeira:.....	9
Resumo.....	9
Introdução.....	10
Materiais e Métodos.....	12
Resultados.....	17
Discussão.....	20
Referências.....	23
CAPÍTULO 2 Emprego do feromônio sexual sintético do bicho mineiro do café, <i>Leucoptera coffeella</i> (Guérin-Méneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae) para a confusão sexual de macho.....	26
Resumo.....	26
Introdução.....	27
Materiais e Métodos.....	29
Resultados.....	33
Discussão.....	38
Referências.....	41
CONCLUSÕES GERAIS.....	44

RESUMO

FONSECA, Marcy das Graças, M.S. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2006. **Efeito da planta hospedeira e da técnica da confusão sexual no comportamento reprodutivo de *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae).** Orientador: Eraldo Rodrigues de Lima. Conselheiros: Evaldo Ferreira Vilela e José Lino Neto

Nesta tese foi estudada a importância da planta hospedeira no comportamento reprodutivo de *L. coffeella*. Inicialmente avaliou-se: (i) o efeito da condição reprodutiva das fêmeas em resposta aos voláteis da planta hospedeira; (ii) se a proporção de acasalamento, tempo de início e duração da cópula são afetadas pela presença de voláteis da planta hospedeira; (iii) e se fêmeas de *L. coffeella*, em condições de não escolha, podem ovipositar em hospedeiro alternativo. Foi estudada também a eficiência da técnica de confusão sexual de machos como método de controle deste inseto. Foi testada a eficiência dos liberadores de feromônio PB-Rope em condições de baixa população de adultos em campo. Estes liberadores PB-Rope foram usados para saturar o ambiente com feromônio sexual sintético e consistem de um tubo afilado de polietileno contendo 200 mg de 5,9-dimetilpentadecano, fabricados pela Shin-Etsu Chemical Co. Ltda (Tóquio, Japão). Para isto testaram-se as hipóteses: (i) de que nas áreas tratadas com feromônio, o liberador PB-Rope provoca desorientação nos machos de *L. coffeella* e (ii) que a confusão sexual leva a redução das injúrias causadas ao cafeeiro por *L. coffeella*. No primeiro trabalho, ficou evidenciado que os voláteis sozinhos emitidos pela planta não constituem pista relevante para as fêmeas localizarem seu hospedeiro, porém têm papel importante durante o acasalamento. Quando ofereceu-se às fêmeas outra planta não hospedeira como sítio de oviposição, pode-se observar uma redução considerável no número de ovos depositados, indicando que as fêmeas usam pistas da planta hospedeira para a oviposição. No segundo trabalho, o número de machos capturados nas armadilhas de feromônio nas áreas tratadas foi reduzido em relação às áreas controles, mas, o dano deste inseto à lavoura não foi diferente entre as áreas tratadas e áreas controles. Neste caso, não foi possível quantificar a eficiência da técnica porque os mesmos níveis de folhas minadas e ovos foram encontrados em ambas as áreas.

ABSTRACT

FONSECA, Marcy das Graças, M.S. Universidade Federal de Viçosa, February 2006. **Effect of both host plant and mating disruption technique on the reproductive behavior of *Leucopteta coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae).** Adviser: Eraldo Rodrigues de Lima. Committee members: Evaldo Ferreira Vilela and José Lino Neto

The present thesis had the aim to study the importance of the host plant to the reproductive behavior of *L. coffeella*. At first, the following aspects were evaluated: (i) the effect of the reproductive condition of females in response to host plant volatiles; (ii) if mating proportion, initiation time and copulation duration are affected by the presence of volatiles in the host plant; (iii) and if females of *L. coffeella*, under no choice conditions, may be able to lay eggs in an alternative host. The efficiency of the mating disruption technique of males as a control method for this insect was also studied. In addition, the efficiency of PB-Rope dispensers was tested under low population conditions of adults in the field. These PB-Rope dispensers were used in order to saturate the environment with synthetic sexual pheromone and consist of a polyethylene tube containing 200 mg of 5,9-dimethylpentadecane, produced by Shin-Etsu Chemical Co. Ltd (Tokyo, Japan). In order to do so, the following hypotheses were tested: (i) that the PB-Rope dispenser provokes disorientation in males of *L. coffeella* in the areas treated with pheromone and (ii) that mating disruption leads to a decrease of lesions caused to the genus *L. coffeella*. In the first work, it was evidenced that only the volatiles emitted by the plant do not comprise relevant clue for females to spot their host. Nevertheless, they play an important role during the mating process. When another non-host plant was offered to the females as an oviposition site, it was observed that there was a considerable reduction in the number of laid eggs, indicating that females use cues of the host plant for oviposition. In the second work, the number of males captured in the pheromone traps in the treated area was reduced in relation to the control areas; however, the damage that this insect causes to the plantation was not different between the treated areas and the control areas. In this case, it was not possible to quantify the efficiency of the technique because the same levels of mined leaves and eggs were found in both areas.

Introdução Geral

Os insetos são os seres vivos que mais utilizam os odores nas atividades relacionadas à sobrevivência e reprodução (Bernays & Chapman 1994). Desta maneira, o olfato é fundamental para a seleção da planta hospedeira ou presa, atração sexual, corte, acasalamento e escolha do local de oviposição (Landolt & Phillips 1997).

Os semioquímicos, substâncias químicas envolvidas na comunicação entre os organismos em geral, podem mediar a comunicação inter-específica (aleloquímicos) ou intra-específica (feromônios) (Price et al. 1980, Baker 1989, Cardé & Minks 1995, Reddy & Guerrero 2004). Aleloquímicos são classificados conforme a vantagem adaptativa que conferem ao emissor ou receptor. O cairomônio proporciona vantagem adaptativa para o receptor e desvantagem para o emissor; com o alomônio, geralmente substância de defesa, a situação é completamente oposta onde a vantagem é do emissor. O sinomônio beneficia a ambos, receptor e emissor (Dicke & Sabelis 1992).

A comunicação intra-específica, mediada por feromônios, inclui os feromônios de trilha, agregação, marcação, alarme e sexual. O feromônio sexual, denominado assim por Karlson & Luscher (1959), é amplamente usado na agricultura, principalmente na ordem Lepidoptera. Neste grupo de insetos, as moléculas utilizadas para mediar a comunicação têm baixo peso molecular, alta volatilidade e são comumente emitidos pelas fêmeas para a atração dos machos a longas distâncias (Cardé & Minks 1996).

Voláteis de planta

Plantas superiores emitem uma grande variedade de compostos voláteis oriundos do metabolismo secundário (Landolt & Phillips 1997). Evidências indicam que a procura e localização de hospedeiros em mariposas é controlada por esses voláteis que podem ser constitutivos ou induzidos por herbivoria. Fêmeas decidem pelo hospedeiro antes e durante a oviposição e estudos recentes mostram que somente poucos compostos “chave” mediam a atração a longa distância e estes compostos são percebidos por neurônios quimio-receptores especializados na antena das fêmeas (Ansebo et al. 2005). O comportamento reprodutivo de fêmeas frente aos voláteis de plantas foi avaliado em vários estudos. Yan et al. (1999) determinaram a importância dos voláteis dos frutos de maçã em parâmetros do comportamento

reprodutivo da mariposa da maçã *Cydia pomonella*, incluindo comportamento de chamamento, orientação aos frutos, mostrando uma forte dependência destes voláteis. Além disso, Witzgall et al. (2005) observaram que fêmeas da mariposa da maçã, *C. pomonella* dependem dos voláteis da planta hospedeira para ovipositarem e que esta dependência diminuiu quando o inseto foi criado sucessivamente em dieta artificial. Os autores explicaram que isto se deva talvez pela forte seleção dos indivíduos menos dependentes dos voláteis da planta quando transferidos do campo para o laboratório. Mais recentemente, Tasin et al. (2005) foram capazes de determinar uma mistura de três compostos, beta-farneseno, beta-cariofileno e (E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno, atrativa para *Lobesia botrana*, a mariposa européia da uva. No entanto, quando as três substâncias foram formuladas na mistura em que ocorrem em frutos de maçã perderam a atratividade para aquele inseto, indicando alta especificidade da mistura.

Uso de Feromônios

No contexto da agricultura e pecuária, os feromônios têm sido um instrumento adequado, aumentando a eficiência do monitoramento de populações de insetos e gerando informações importantes que suportam as tomadas de decisão para o controle de pragas. Desde a sua descoberta no final da década de 50, e com o seu uso em armadilhas adesivas, os feromônios se envolveram em múltiplos usos incluindo: detecção da emergência dos primeiros indivíduos de uma população, avaliação da eficácia do controle de insetos, medição da densidade dos insetos, determinação da origem de onde um inseto está vindo e verificação das variações populacionais a cada ano. Estes diferentes usos podem ser implementados, servindo-se dos mais de 60 tipos de armadilhas existentes no mercado, associados a grande variedade de feromônios sintéticos manufaturados (Cardé & Minks 1995).

Uma das utilidades da aplicação de feromônio na agricultura é o monitoramento de pragas em lavouras. Este monitoramento pode ser utilizado para detectar, ou determinar a incidência prematura de pragas e estabelecer quando a praga não esta presente, através do uso de armadilhas iscadas com feromônio sintético. Normalmente se utiliza uma taxa mínima de captura, como sinal para se calcular ou predizer o momento de ocorrência do estágio nocivo ou danoso do ciclo de vida do inseto (Wall 1989). No Manejo Integrado de Pragas isto pode representar uma diminuição significativa no uso de inseticidas.

Outra forma de utilização dos feromônios é a coleta massal, um método de controle no qual se utiliza um feromônio natural ou sintético, onde a densidade de armadilhas é muito

superior àquela usada para o monitoramento. Com o intuito de capturar seletivamente o maior número possível de indivíduos do inseto-praga alvo para manter sua população abaixo do nível de dano econômico.

Existe ainda uma técnica de controle denominada interrupção de acasalamento ou confusão sexual de macho, utilizada para interferir ou bloquear a transmissão de sinais entre os parceiros sexuais. Isto tem sido obtido com a liberação de feromônio sexual sintético, para saturar o ambiente em que se deseja fazer o controle e, desta forma, diminuir ou impedir a habilidade dos insetos de localizar seu respectivo parceiro, reduzindo a possibilidade de encontros que potencialmente formarão casais. Com a diminuição de tais acasalamentos, espera-se uma redução da oviposição pelas fêmeas e, conseqüentemente, diminuição da intensidade populacional nas gerações futuras (Baker et al. 1997).

Os mecanismos de ação pelos quais o feromônio sintético provoca a interrupção ainda são pouco conhecidos. Para auxiliar o entendimento da questão de que algumas formulações são bem sucedidas e outras não, alguns mecanismos têm sido propostos (Bartell 1982, Cardé 1990, Minks & Cardé 1988, Cardé & Minks 1995). Quando o feromônio usado para confusão sexual é uma cópia da mistura natural, acredita-se que três mecanismos são predominantes: (i) adaptação sensorial de receptores periféricos ou habituação de respostas do sistema nervoso central bloqueiam respostas ao feromônio e assim diminuem a capacidade de encontrar o parceiro; (ii) competição entre as fontes de feromônio sintéticas e naturais. Esse mecanismo assume que os machos seguem trilhas falsas de feromônio sintético até encontrar a fonte artificial de feromônio, o que diminui o tempo disponível que os machos têm para localizar e seguir as trilhas naturais de feromônio emitidas pelas fêmeas; (iii) formulações de feromônio podem camuflar plumas de feromônio de fêmeas chamando. Neste caso, quanto mais distante um macho estiver de uma fêmea, o mais provável é que a pluma da fêmea seja imperceptível no interior de uma nuvem de feromônio sintético. A onipresença de plumas naturais e sintéticas também pode perturbar a estrutura fina da pluma natural, diminuindo desta maneira a probabilidade de um macho localizar a fonte de feromônio (Mafra-Neto & Cardé 1994, Vickers & Baker 1994).

Outros mecanismos podem contribuir para a confusão sexual. A presença de feromônio formulado pode adiantar as respostas dos machos, fazendo com eles iniciem os vôos de procura antes das fêmeas começarem a chamar (Cardé et al. 1993). Machos podem tornar-se “inativos” em altas concentrações de feromônio (Baker & Cardé 1979), falhando no processo de vôo.

O controle direto de insetos-pragas por confusão sexual tem apresentado sucesso em alguns casos, mas o seu uso ainda é pequeno em relação ao número de espécies as quais possuem

seu feromônio identificado, isolado e sintetizado. O exemplo de maior sucesso, até hoje, é o controle de *Pectinophora gossypiella*, uma das mais importantes pragas do algodão (Cardé & Minks 1995) e nos Estados Unidos a área de controle atinge 100%. Dentre outras pragas, destacam-se ainda a *Grapholita molesta*, importante em pomares comerciais de pêssegos e nectarinas na Austrália (Il'ichev *et al.* 2004) e *Sesamia nonagrioides*, praga de milho na Espanha, Grécia e França (Albajes *et al.* 2002). Existem também casos onde esta técnica não teve o êxito esperado, como por exemplo, para *Lobesia botrana* em vinhedos da Sardenha (Nannini & Delrio 1993). Apesar do número de indivíduos terem sido reduzidos nas armadilhas de captura com feromônio nas áreas tratadas, não houve redução esperada na população. Outro exemplo de insucesso foi o caso de *Tuta absoluta* na cultura do tomate no Brasil (Michereff Filho *et al.* 2000).

A falha na técnica de confusão sexual pode ser devido a vários fatores: grande número de gerações por ano; alta densidade populacional que aumenta a possibilidade de mais acasalamentos; uma disseminação baixa ou irregular do feromônio, a qual não foi forte o suficiente para competir com as plumas das fêmeas ou para criar uma nuvem de feromônios maior que a do feromônio natural; efeitos de alta temperatura e fortes ventos nas concentrações do feromônio e ainda a possibilidade de imigração de fêmeas acasaladas de fora da área tratada (Sanders 1989, Suckling 2000).

Devido a todos esses fatores, de acordo com Sanders (1989), as situações mais favoráveis para o uso desta técnica no manejo de pragas são: espécies que podem ser tratadas em baixas densidades populacionais; as que possuem um ciclo de vida protegido dos tratamentos de inseticidas convencionais; e aquelas onde as áreas tratadas por confusão sexual não possam ser reinfestadas pela postura de fêmeas grávidas imigrantes.

Aspectos gerais da biologia de *Leucoptera coffeella*

O bicho mineiro do café, *L. coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) é um dos mais importantes insetos da cultura do café por ser amplamente distribuído em todas as regiões produtoras da América do Sul e ser de difícil controle, principalmente pelo uso inadequado de inseticidas nas lavouras e cujos prejuízos podem atingir até 50% de queda na produção (Sanchez-De Leon 1984, Souza & Reis 1992).

Os adultos do bicho mineiro são micro-lepidópteros de hábitos diurnos e o único hospedeiro relatado na literatura é o cafeeiro (*Coffea* spp), onde as fêmeas depositam seus ovos.

As lagartas ao eclodirem penetram diretamente no interior do parênquima foliar e ao se alimentarem constroem galerias que se denominam de minas. Estas galerias provocam injúrias diretas nas folhas e quando há alta infestação a queda das mesmas reduz a área fotosintética da planta (Souza & Reis 1992). Seu ciclo de vida varia de 19 a 87 dias de acordo com as condições climáticas, principalmente temperatura, umidade relativa do ar e precipitação. Possui de 8 a 12 gerações anuais em condições de campo (Gallo et al. 1988).

Atualmente o controle químico é a medida mais empregada para o controle deste inseto quando atinge o nível de dano econômico; no entanto, o desenvolvimento de resistência aos inseticidas organofosforados comumente usados tem comprometido este método de controle (Fragoso et al. 2002, 2003).

Assim, esta tese teve como objetivo avaliar a importância da planta hospedeira no comportamento reprodutivo de *L. coffeella* (capítulo 1) e testar a técnica de confusão sexual de machos em campo, visando uma redução de machos coletados em armadilhas de feromônio em campo, bem como o dano causado a lavoura (capítulo 2).

Referências Bibliográficas

- Albajes, R., Konstantopoulou, M., Etchepare, O., Eizaguirre, M., Frérot, B., Sans, A., Krokos, F., Améline, A. & Mazomenos, B. 2002. Mating disruption of the corn borer *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) using sprayable formulations of pheromone. *Crop Protection* 21: 217-225.
- Ansebo, L., Ignell, R., Löfqvist, J. & Hansson, B.S. 2005. Responses to sex pheromone and plant odours by olfactory receptor neurons housed in sensilla auricillica of the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Insect Physiology* 51: 1066-1074.
- Baker, T. C. 1989. Sex pheromone communication in the Lepidoptera: new research progress. *Experientia* 45: 248-262.
- Baker, T. C., T. Dittl, & A. Mafra-Neto. 1997. Disruption of sex pheromone communication in the blackheaded fireworm in Wisconsin cranberry marshes by using MSTRS(TM) devices. *Journal of Agricultural Entomology* 14: 449-457.
- Baker, T. C. & Cardé, R. T. 1979. Analysis of pheromone mediated behavior in male *Grapholita molesta*, the oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Environmental Entomology* 8:956-968.
- Batell, R. J. 1982. Mechanisms of communication disruption by pheromone in the control of Lepidoptera : a review *Physiology Entomology* 7: 353-364.
- Bernays, E. A. & Chapman, R. F. 1994. Host-plant selection by phytophagous insects: new directions. Chapman & Hall, New York. 312p.
- Cardé, R. T. 1990. Principles of mating disruption. In: Ridgaway, R. L., Silverstein, R. M. & Inscoe, M. N (eds), Behavior-modifying chemicals for insect management. Marcel Dekker, New York, p.47-31.
- Cardé, R. T. & Minks, A. K. 1995. Control of moth pests by mating disruption: successes and constraints, *Annual Review of Entomology* 40: 559-585.
- Cardé, R.T., Mafra-Neto, A., Staten, R.T., Koch, U. & Farbert, P. 1993. Evaluation of communication disruption in the pink bollworm in field wind tunnels. *IOBC wprs Bulletin* 16(10), 23-28.
- Cardé, R. & Minks, T. A., Eds. 1996. *Insects Pheromone Research – New Directions*. New York, Chapman & Hall.
- Dicke, M. & Sabelis, M. W. 1992. Costs and benefits of chemical information conveyance: proximate and ultimate factors. P. 122-155. In: Roitberg, B. D. & Isman, M. B (eds.), *Insects chemical ecology: an evolutionary approach*. Chapman & Hall, New York.
- Fragoso D. B., Guedes R. N. C. & Ladeira J. A. 2003. Seleção na evolução da resistência a organofosforados em *Leucoptera coffeella* (Guérin-Ménéville) (Lepidoptera: Lyonetiidae). *Neotropical Entomology* 32: 329-334.

- Fragoso D. B., Guedes R. N. C., Picanço M. C. & Zambolin L. 2002. Insecticide use and organophosphate resistance in coffee leafminer *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). *Bulletin of Entomological Research* 92: 203–212.
- Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R. P. L., Batista, G. C., Berti Filho, E., Parra, J. R. P., Zucchi, R. A., Alves, S. B. & Vendramim, J. B. 1988. *Manual de Entomologia agrícola*. 2nd ed., Agron. Ceres, São Paulo, 649p.
- Il'ichev, A. L., Willians, D. G. & Milner, A. D. 2004. Mating disruption barriers in pome fruit for improved control of oriental fruit moth *Grapholita molesta* Busck (Lep., Tortricidae) in stone fruit under mating disruption. *Journal of Applied Entomology* 128: 126-132.
- Karlson, P. & Luscher, M. 1959. Pheromones, a new term for a class of biologically active substances. *Nature* 183: 55-56.
- Landolt, P. J. & Phillips, T.W. 1997. Host plant influences on sex pheromone behavior of phytophagous insects. *Annual Review Entomology* 42:371-91.
- Mafra-Neto, A. & Cardé, R. T. 1994. Fine scale structure of pheromone plumes modulates upwind orientation of flying moths. *Nature* 369: 142-144.
- Michereff Filho, M., Vilela, E.F., Jham, G.N., Attygalle, A., Svatos, A. & Meinwald, J. 2000. Initial studies of mating disruption of the tomato moth, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) using synthetic sex pheromone. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 11: 621-628.
- Minks, A. K. & Cardé, R. T. 1988. Disruption of pheromone communication in moths: is the natural blend really most efficacious? *Entomologia Experimentalis et Applicata* 49: 25-36.
- Nanini, M. & Delrio, G. 1993. Experiments on mating disruption of grape vine moth, *Lobesia botrana* in Sardinian vineyards. *IOBC/WPRS Bulletin* 16: 163-168.
- Oehlschlager, A. C., C. M. Chinchilla, L. M. Gonzalez, L. F. Jiron, R. Mexzon, & B. Morgan. 1993. Development of a pheromone-based trapping system for *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology* 86: 1381-1392.
- Price, P. W., Bouton, C. E; Gross, P; McPheron, B. A; Thompson, J. N. & Weis, A. E. 1980. Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11: 41-65.
- Reddy, G. V. P. & Guerrero, A. 2004. Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. *Trends in Plant Science* 9(5): 253-261.
- Sanchez-De Leon, A. 1984. El minador de la hoja Del café. *Revista Cafetalera* (Guatemala), 244: 6-10.
- Sanders, C. J. 1989. The further understanding of pheromones: Biological and chemical research for the future. In: Jutsum, A. R. & Gordon, R. F. S. (eds.), *Insects pheromone in plant protection*. John Wiley & Sons, New York, p.325-351.
- Souza, J. C, Reis, P. R. 1992. Bicho-mineiro: biologia, danos e manejo integrado. Belo Horizonte: EPAMIG. 67p. (Boletim Técnico, 37).

- Suckling, D. M. 2000. Issues affecting the use of pheromones and other semiochemicals in orchards. *Crop Protection* 19: 677-683.
- Tasin, M., Anfora, G., Ioriatti, C., Carlin, S., Cristofaro, A., Schmidt, S., Bengtsson, M., Versini, G., & Witzgall, P. 2005. Antenal and behavioral responses of grapevine moth *Lobesia botrana* females to volatiles from grapevine. *Journal Chemical Ecology* 31:77-87.
- Vickers, N.J. & Baker, T.C. 1994. Reiterative responses to single strands of odor promote sustained upwind flight and odor source location by moths. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91:5756-5760.
- Wall, C. 1989. Monitoring and spray timing, p. 39-66. In: Jutsum, A.R. & Gordon, R.F.S. (eds.), *Insect pheromone in plant protection*. John Wiley & Sons, New York. 369 p.
- Witzgall, P., Ansebo, L., Yang, Z., Angeli, G., Sauphanor, B., & Bengtsson, M. 2005. Plant volatiles affect oviposition by codling moths. *Chemoecology* 15:77-83.
- Yan, F., Bengtsson, M., & Witzgall, P. 1999. Behavioral response of female codling moths, *Cydia pomonella*, to apple volatiles. *Journal of Chemical Ecology* 25 (6): 1343- 1351.

Capítulo 1

Comportamento reprodutivo de *Leucoptera coffeella* (Guérin-Méneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae): Efeito da planta hospedeira

Resumo

Insetos fitófagos podem usar pistas da planta hospedeira para localizar parceiros, encontrar o local de alimentação e oviposição, entre outros. Esses comportamentos podem ocorrer exclusivamente na presença da planta hospedeira. O bicho mineiro do café, *Leucoptera coffeella*, é a principal praga do cafeeiro no Brasil, e pouco se conhece sobre a sua biologia reprodutiva. O objetivo deste trabalho foi avaliar a importância da planta hospedeira no comportamento reprodutivo de *L. coffeella*. Inicialmente avaliou-se o efeito da condição reprodutiva das fêmeas em resposta aos voláteis da folha do cafeeiro; (ii) se a proporção de acasalamento, tempo de início e duração da cópula são afetadas pela presença e ausência de voláteis da planta hospedeira; e (iii) se fêmeas de *L. coffeella*, em condições de não escolha, podem ovipositar em outro hospedeiro com proximidade taxonômica. Foram feitos três bioensaios: (i) para avaliar a resposta olfativa de fêmeas virgens e acasaladas à planta hospedeira, usando olfatômetro em “Y”; (ii) para avaliar a proporção de cópula, o tempo de início de cada cópula e o tempo de duração, utilizando casais virgens de *L. coffeella* com dois dias de idade em gaiolas plásticas com a presença ou ausência de voláteis das folhas do cafeeiro; (iii) para avaliar as respostas de fêmeas acasaladas à planta hospedeira e não hospedeira foi utilizado folhas de café e jenipapo como sítio de oviposição. Os resultados deste trabalho sugeriram que os voláteis emitidos pela planta não constituem pista relevante para as fêmeas localizarem seu hospedeiro, mas que eles têm papel importante durante o acasalamento. Quando ofereceu-se às fêmeas outra planta não hospedeira como sítio de oviposição, pode-se observar uma redução considerável no número de ovos depositados, indicando que as fêmeas usam pistas da planta hospedeira para a oviposição. Concluímos que a planta hospedeira tem papel relevante no comportamento reprodutivo de *L. coffeella*.

Palavras- chave: Voláteis da planta hospedeira, café, olfatômetro, acasalamento, oviposição.

Introdução

Os processos relativos à reprodução dos insetos fitófagos são fortemente integrados com a disponibilidade da planta hospedeira. Essa integração pode ser manifestada no comportamento e fisiologia dos insetos, incluindo a comunicação por feromônio sexual, que reflete estratégias dos insetos para otimizar a reprodução (Landolt & Phillips 1997). Em muitas espécies a planta hospedeira estimula a biossíntese e liberação do feromônio. Na mariposa *Helicoverpa zea* a produção do feromônio sexual é induzida pela presença de voláteis emitidos pela espiga do milho em um estágio apropriado para oviposição (Raina et al. 1992), gerando uma condição especial para o acasalamento sincronizado com a disponibilidade do hospedeiro. Fêmeas de muitos insetos podem modificar o período de atração sexual, a corte, a cópula e a oviposição para sincronizar com o hospedeiro apropriado (Landolt & Phillips 1997). São vários os exemplos onde os voláteis emitidos pela planta hospedeira estimulam o acasalamento e a oviposição (Geier 1963, Jackson 1979, Landolt & Phillips 1997, Yan et al. 1999). Em fêmeas grávidas de *Cydia pomonella* a atração para os odores de maçã está bem documentada (Yan et al. 1999, Reed & Landolt 2002, Witzgall 2005). Em testes com olfatômetro, fêmeas virgens e acasaladas de *C. pomonella* foram mais ativas na presença de voláteis de maçã que em ar puro. Neste caso as fêmeas acasaladas mostraram uma resposta de atração mais forte que as fêmeas virgens (Yan et al. 1999). Mostrando a importância dos voláteis da planta hospedeira para a fêmea de *C. pomonella* para localizar seu local de oviposição.

O encontro e a escolha correta da planta hospedeira por fêmeas é vital para as larvas neonatas que possuem pouca mobilidade. As fêmeas devem escolher corretamente a fonte de alimento para a sua descendência. Não sendo capazes de avaliar a qualidade nutricional diretamente, porque há uma diferença de hábitos alimentares de larvas e adultos, estas devem avaliar a planta hospedeira de outras formas (Renwick & Chew 1994). A localização da planta hospedeira pode envolver várias modalidades sensoriais. A discriminação final é complexa e frequentemente envolve vários sentidos, pistas das plantas e estado fisiológico do inseto. Visão e olfato podem ser usados para orientação a longa distância e dependem do modo de vida do inseto. Quando em contato com a planta, entretanto, a seqüência comportamental final para aceite ou rejeição do local para oviposição depende principalmente de pistas de contato e comumente de compostos da superfície da planta (Ramaswamy 1988, Renwick & Chew 1994, Honda 1995).

O bicho mineiro do café, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae) é, segundo Souza & Reis (1992), a principal praga do cafeeiro no Brasil, devido à sua ocorrência generalizada e aos prejuízos econômicos que causa. Apesar da sua importância e alto grau de especialização, conhece-se pouco sobre a relação que a sua planta hospedeira, *Coffea arabica*, exerce sobre o comportamento reprodutivo de adultos. Quando o grau de especialização de um inseto em relação a sua planta hospedeira é alto espera-se que os sinais visuais, químicos e táteis forneçam informações que otimizem o encontro e aceitação da planta pelas fêmeas. Neste caso as atividades associadas ao acasalamento e à oviposição devem ser alteradas na presença de tais pistas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a importância da planta hospedeira no comportamento reprodutivo de *L. coffeella*. Inicialmente avaliou-se (i) o efeito da condição reprodutiva das fêmeas (virgem e acasalada) em resposta aos voláteis da folha do cafeeiro utilizando um olfatômetro em “Y”; (ii) se a proporção de acasalamento, tempo de início e duração da cópula são afetadas pela presença e ausência de voláteis da planta hospedeira; e (iii) se fêmeas de *L. coffeella*, em condições de não escolha, podem ovipositar em outro hospedeiro (jenipapo), que é da mesma família do cafeeiro.

Materiais e Métodos

Insetos

Folhas minadas de cafeeiro foram coletadas semanalmente em cultivos comerciais da região de Viçosa - MG e acondicionadas em caixas de acrílico tipo Gerbox® (11,0 x 11,0 x 3,5 cm) contendo uma esponja cortada em fendas paralelas, onde os pecíolos das folhas foram fixados. Estas esponjas ficaram imersas em solução de hormônio de crescimento, Benzil Adenina, na concentração de 10^{-6} g/litro (Reis et al. 2000), mantendo as folhas túrgidas por mais de três semanas. Os recipientes contendo as folhas foram mantidos no laboratório, sob o regime de 12L:12E, a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 2\%$ UR. As folhas foram examinadas diariamente de onde foram coletadas as pupas do inseto que foram acondicionadas, individualmente, em tubos plásticos (2,5 cm de Ø x 6,0 cm de altura) até a emergência dos adultos. Após essa emergência, os indivíduos foram separados por sexo e colocados em sala climatizada nas mesmas condições da criação, e foram usados nos testes.

Plantas

As plantas de café *Coffea arabica* (var. Catuaí), família Rubiaceae usadas nos experimentos foram provenientes de cafezais da região de Viçosa - MG. Foram coletados ramos com ± 10 folhas. Nos experimentos foram utilizadas apenas as folhas. Estas foram destacadas do ramo 10 minutos antes do início dos experimentos. Folhas de jenipapo, (*Genipa americana*), família Rubiaceae foram coletadas no Horto Botânico da UFV em Viçosa - MG. Na realização dos experimentos, as folhas desta planta também foram destacadas do ramo 10 min antes do início do experimento.

Bioensaios

Todos os bioensaios foram realizados no Laboratório de Feromônio e Comportamento dos Insetos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - Minas Gerais, Brasil.

Condição reprodutiva das fêmeas em resposta aos voláteis da folha do cafeeiro

O bioensaio relativo à resposta olfativa de fêmeas aos voláteis da planta hospedeira foi avaliado em olfatômetro tipo Y (diâmetro interno de 0,5 cm e comprimento dos braços de 5 cm).

O aparelho é constituído por um tubo de vidro em forma de “Y”, sendo que cada braço é conectado através de uma mangueira de borracha a um erlenmayer de vidro de 50 ml mantidos com ou sem folhas. O fluxo de ar foi produzido por uma bomba de vácuo conectado a base do tubo de vidro, formando uma corrente de ar uniforme nos dois braços do aparelho. A velocidade da corrente de ar no interior do olfatômetro foi de 0,05 m/s em cada braço, medida por medidores de fluxo digitais e calibrada por registro manual. A luminosidade foi mantida baixa durante os experimentos, simulando uma condição crepuscular.

Para testar o efeito da planta hospedeira na resposta olfativa de fêmeas de *L. coffeella* as fêmeas foram divididas em dois experimentos. No primeiro, foram usadas fêmeas virgens e no segundo, fêmeas acasaladas. Para cada condição reprodutiva da fêmea foi testada sua resposta ao ar *versus* folhas de café. As fêmeas virgens (n = 80) e acasaladas (n = 80) foram avaliadas com 2 e 3 dias de idade respectivamente. Fêmeas com dois dias de idade foram acasaladas durante 2h às 7h da fotofase, sendo o início da fotofase às 6:00h. Todas as fêmeas foram testadas durante as cinco últimas horas da fotofase, horário de maior atividade de oviposição. Todas as fêmeas foram usadas apenas uma vez.

A fêmea foi colocada na extremidade basal do olfatômetro, contra a corrente de ar formada no interior do aparelho. As fêmeas virgens e acasaladas foram avaliadas da seguinte maneira: foram consideradas na análise aquelas que responderam em 5 minutos e ao chegarem na junção do tubo exerceram escolha por uma das fontes. Considerou-se uma resposta positiva a chegada da fêmea até a extremidade de um dos braços do olfatômetro. As fêmeas foram testadas individualmente no olfatômetro, totalizando 20 por repetição, com 4 repetições por tratamento. Todas as fêmeas foram testadas com o olfatômetro limpo previamente com álcool. A cada cinco fêmeas testadas, as posições das fontes de odores foram invertidas. Ao final de cada repetição as folhas de café foram trocadas.

Influência dos voláteis da planta hospedeira na proporção de acasalamento, tempo de início e duração da cópula

O objetivo deste experimento foi avaliar se a presença de voláteis da planta hospedeira altera a proporção de acasalamento, tempo para o início da cópula e duração da cópula. Casais virgens de *L. coffeella* com dois dias de idade foram formados em gaiolas plásticas (2,5 cm de Ø x 6,0 cm de altura) com a presença ou ausência de voláteis da folhas de café (n = 25). Nas duas condições experimentais avaliou-se a proporção de acasalamento, o tempo para o início de cada cópula e sua duração. Nos dois tratamentos foram usados duas gaiolas unidas pela aberturas e

separadas com um tecido do tipo organza (Figura 1). Para que no tratamento com as folhas, os casais não tivessem contato direto com a folha de café. As observações, foram feitas numa sala sob o regime de 12L:12E, a $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $70 \pm 2\%$ UR. As observações do acasalamento foram feitas a partir da 2h até as 7h da fotofase, sendo o início da fotofase às 6:00h. As medidas de tempo foram avaliadas utilizando um cronômetro e foi marcados o início e fim da cópula em minuto. Os casais foram alimentados com algodão umedecido em água com mel a 10%.

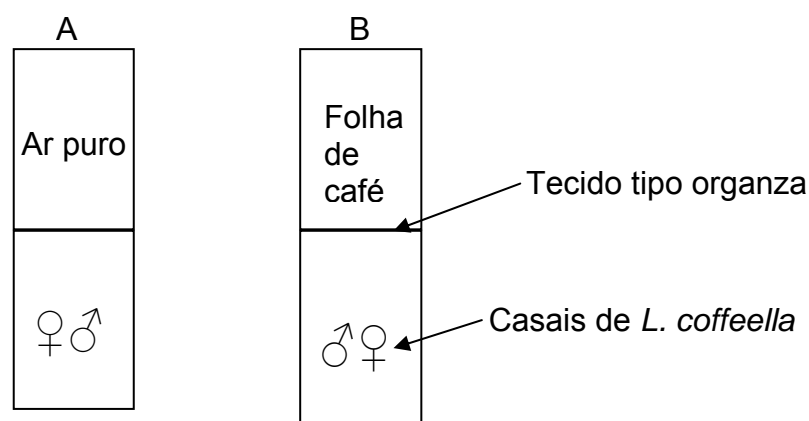


Figura 1. Representação esquemática da condição experimental dos tratamentos: A-casais virgens de *L. coffeella* em duas gaiolas plásticas (2,5 cm de Ø x 6,0 cm de altura) unidas pela boca e separadas com tecido tipo organza e na presença de ar puro e B- Casais virgens de *L. coffeella* em duas gaiolas plásticas (2,5 cm de Ø x 6,0 cm de altura) unidas pela boca e separadas com tecido tipo organza e na presença de voláteis da folha de café.

Oviposição em folha da planta hospedeira e não-hospedeira

O objetivo do experimento foi avaliar se fêmeas de *L. coffeella*, em condições de não escolha, podem ovipositar em outro hospedeiro da mesma família do cafeeiro. Oitenta casais com dois dias de idade foram acasalados durante o período de 2 h às 7 h da fotofase, sendo o início da fotofase as 6:00 h. Após a cópula, machos foram descartados do experimento. As fêmeas acasaladas foram colocadas em gaiolas plásticas (2,5 cm de Ø x 6,0 cm de altura) individualizadas e foi oferecida a quarenta fêmeas, escolhidas ao acaso, folhas de *Coffea arabica* (var. catuaí) e as outras quarenta fêmeas folhas de jenipapo (*Genipa americana*) (Figura 2). O experimento foi mantido em sala sob o regime de 12L:12E, a $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $70 \pm 2\%$ UR. As fêmeas foram alimentadas com algodão umedecido em água com mel a 10% durante todo o experimento. O número de ovos foi avaliado no final da fotofase de cada dia, quando eram trocadas as folhas. O alimento foi trocado a cada dois dias. A contagem de ovos foi feita até a

morte das fêmeas. Para a análise foi considerado o número de ovos por fêmea durante toda a sua vida.

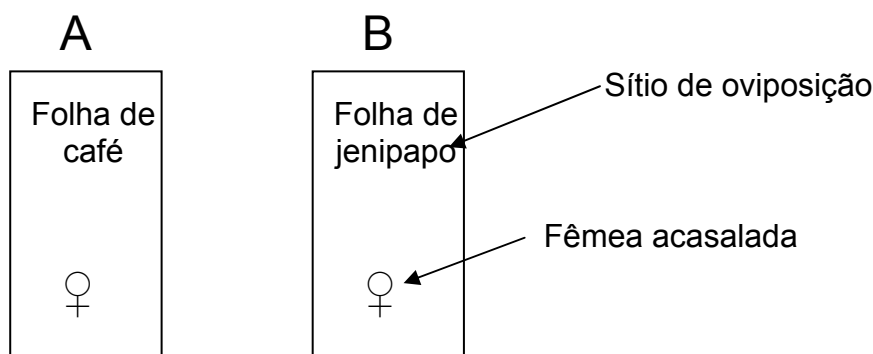


Figura 2. Representação esquemática da condição experimental dos tratamentos para oviposição. Gaiolas plásticas (2,5 cm de Ø x 6,0 cm de altura): A- Fêmea acasalada mais folha de café; B- Fêmea acasalada mais folha de jenipapo como sítio de oviposição.

Análises Estatísticas

Para testar a hipótese do efeito da condição reprodutiva das fêmeas de *L. coffeella* (virgem e acasalada) em resposta aos voláteis da planta hospedeira, foi feita a proporção do número de fêmeas que escolheram qualquer uma das fontes de odor (folhas de café e ar) e foram testadas usando o teste G (Sokal & Rohlf 1995) analisado no programa excel.

As outras análises foram processadas pelo software R (R Development Core Team, 2005) e seguidas pelas análises de resíduos para verificar a distribuição de erros e a aceitabilidade dos modelos utilizados.

Para testar a hipótese de que os voláteis da planta hospedeira aumentam a proporção de acasalamentos e alteram o início da cópula, foi feita uma análise de regressão usando a distribuição de Weibull (Crawley 2002). Criou-se um modelo completo composto pela proporção de acasalamentos (variável resposta) e pelas seguintes variáveis explicativas: tempo para início de cópula (x_1), tratamento (com folha + sem contato e sem folha) (x_2) e a interação entre os fatores. Foram mantidas no modelo apenas as variáveis significativas a pelo menos 5% de probabilidade.

Para testar a hipótese que voláteis da planta hospedeira alteram o tempo de duração da cópula, foi feita uma análise utilizando modelos lineares generalizados (Crawley 2002), em que

se avaliou a duração da cópula (variável resposta) e o tratamento (com folha + sem contato e sem folha) (x). Foi utilizada a distribuição de erro quasipoisson corrigida para sobre-dispersão.

Para testar a hipótese de que fêmeas de *L. coffeella*, em condições de não escolha, podem ovipositar em outro hospedeiro alternativo, foi feita uma análise utilizando modelos lineares generalizados (Crawley 2002), em que se avaliou o número de ovos por fêmea (variável resposta) e o tratamento (café e jenipapo) (x_1) e com a longevidade da fêmea (x_2) e a interação entre os fatores. Foi utilizada a distribuição de erro quasipoisson corrigida para sobre-dispersão.

Resultados

Condição reprodutiva das fêmeas em resposta aos voláteis da folha do cafeeiro

Todas as fêmeas acasaladas testadas ($n = 80$) permaneceram imóveis no local de liberação no olfatômetro durante o tempo concedido para a escolha (5 min). Um comportamento que foi freqüente em todas as fêmeas acasaladas foi à movimentação permanente das antenas em direção contrária ao fluxo de ar. No caso das virgens testadas elas apresentaram movimentação, porém não foram capazes de discriminar entre folhas de café e ar puro ($G_p = 2,46$; g.l. = 1; $p = 0,1165$), Figura 1.

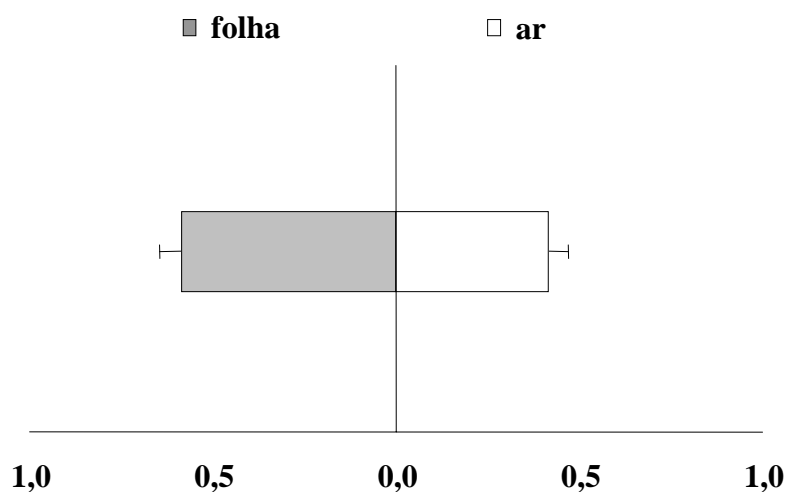


Figura 1. Resposta olfativa de fêmeas virgens de *Leucoptera coffeella* aos odores de folhas de cafeeiro *versus* ar em olfatômetro tipo "Y". A barra corresponde à média de quatro repetições (repetição = 20 fêmeas virgens). (Teste G, $G_p = 2,4627$; g.l. = 1; $p = 0,1165$).

Influência dos voláteis da planta hospedeira na proporção de acasalamento, tempo de início e duração da cópula

O comportamento de acasalamento de *L. coffeella* foi alterado quando macho e fêmea permaneceram em um ambiente com a presença de voláteis da folha de café. A proporção de acasalamentos foi significativamente maior na presença dos voláteis que nos controles. Enquanto cerca de 90% dos casais se acasalaram na presença dos voláteis da folha de café, apenas 65% o fizeram na presença de ar puro. Na presença dos voláteis, aos 160 minutos após o início do experimento 50% dos casais já haviam copulado, enquanto na ausência dos voláteis esta freqüência só foi atingida aos 240 minutos ($F_{(2,72)} = 700,67$ e $\chi^2 = 0,003$) (Figura 2). Além disto,

observou-se que os casais, na presença dos voláteis da folha de café, tiveram maior duração na cópula que o controle ($F_{2,47} = 4,9472$ e $P = 0,012$) (Figura 3).

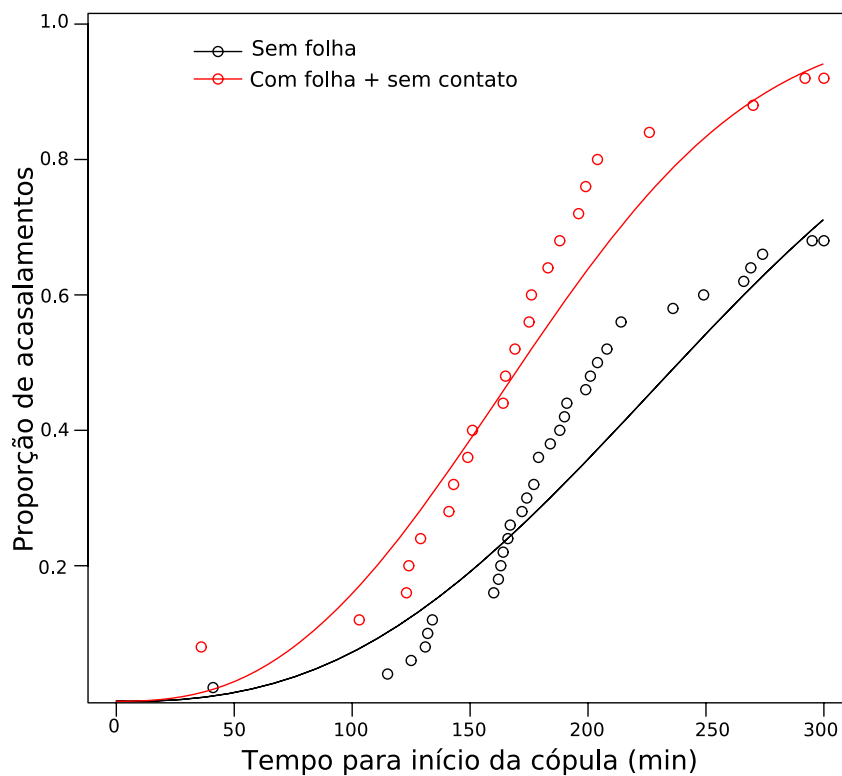


Figura 2. Proporção de acasalamento e tempo para início da cópula de casais de *Leucoptera coffeella* na presença e ausência de voláteis da planta hospedeira, ($F_{2,72} = 700,67$ e $\chi^2 = 0,003$).

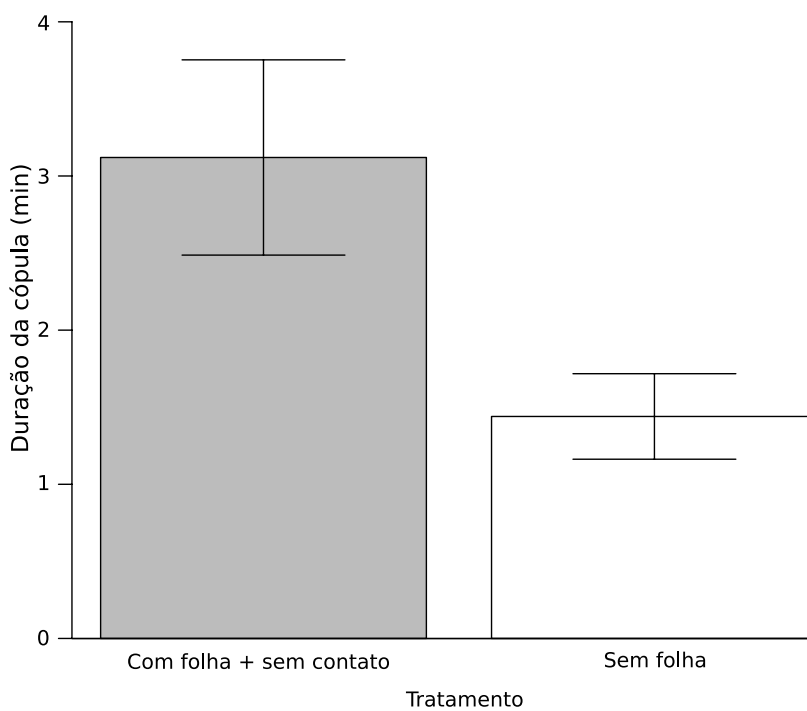


Figura 3. Duração da cópula dos casais de *L. coffeella* na presença e ausência de voláteis da planta hospedeira, ($F_{2,47} = 4,9472$ e $P = 0,012$).

Comportamento de oviposição em planta hospedeira e não hospedeira

O número total de ovos/fêmea depositados nas folhas de café foi significativamente superior aos depositados no jenipapo ($F_{(1,78)} = 137,10$ e $P < 0,001$), Figura 4. A longevidade das fêmeas não afetou o número de ovos ($F_{(1,77)} = 1,49$ e $P = 0,225$).

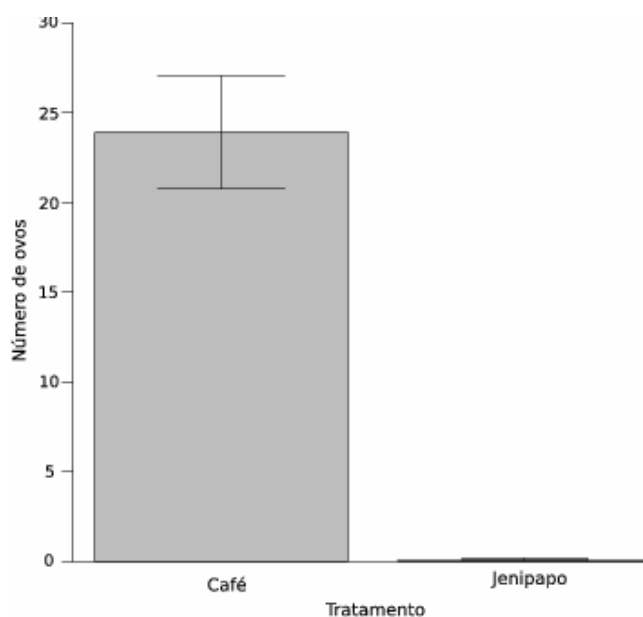


Figura 4. Número de ovos acumulados depositados por fêmea de *L. coffeella* na presença da folha de café e folha de jenipapo, ($F_{1,78} = 137,10$ e $P < 0,001$).

Discussão

Fêmeas de *L. coffeella* não mostraram nenhum tipo de preferência pelos voláteis emanados pelas folhas de sua planta hospedeira, *Coffea arábica* quando testadas em olfatômetro em “Y”. No entanto, o estado reprodutivo da fêmea gerou diferentes comportamentos quando estas foram testadas contra os voláteis das folhas de cafeeiro. Embora as fêmeas virgens não tenham sido atraídas pelos odores produzidos pelas folhas e o ar limpo, estas tiveram grande mobilidade; ao contrário, fêmeas acasaladas permaneceram imóveis o tempo todo. Fêmeas virgens naturalmente devem procurar por um parceiro sexual e, portanto, apresentam certa mobilidade, enquanto fêmeas acasaladas devem se concentrar no comportamento de oviposição, o que provavelmente as leva a ficar parada.

Fêmeas de alguns lepidoptera tais como, *Spodoptera frugiperda* (Rojas et al. 2003), *Helicoverpa virescens* (Ramaswamy et al. 1987) e *Ethiella zinckella* (Hattori 1988) não dependem de voláteis para localizar a planta hospedeira. No entanto, vários outros estudos mostraram que estes voláteis são determinantes para a orientação da fêmea de lepidoptera para sua planta hospedeira (Landolt 1989, Tingle et al. 1990, Rembold et al. 1991, Phillips & Strand 1994 e Rojas 1999). Landolt (1989) mostrou que fêmeas *Trichoplusia ni* (Hubner) acasaladas foram atraídas às plantas hospedeiras em resposta aos voláteis. Fêmeas virgens e acasaladas de *Cydia pomonella* responderam a voláteis de maçã quando testadas em olfatômetro em Y (Yan et al. 1999, Vallat & Dorn 2005). No caso de um inseto altamente especializado numa planta hospedeira como *L. coffeella* e, considerando seu ciclo de desenvolvimento onde as crisálidas são formadas na planta hospedeira ou nas folhas que caem próximas, é fácil imaginar que a emergência dos adultos se dê na planta ou próximo a ela. Neste caso, apenas o valor do semioquímico como sinal para as fêmeas não seria determinante para a localização do hospedeiro. Temos que ressaltar que esse foi o primeiro estudo feito com olfatômetro em “Y” para avaliar a atratividade da fêmea de *L. coffeella* aos voláteis das folhas do cafeeiro. Outros estudos são necessários, usando outros tipos de olfatômetro, como exemplo, o túnel de vento para que se possa confirmar a não atratividade das fêmeas aos voláteis emanados das folhas do cafeeiro.

Por outro lado, voláteis da planta hospedeira tiveram um papel relevante durante as atividades de cópula de *L. coffeella*. Os resultados mostraram uma forte evidência de que voláteis da planta hospedeira influenciaram na comunicação entre os parceiros de *L. coffeella*. Os casais, quando na presença de voláteis da planta iniciaram a cópula mais cedo e mais rápido que

os casais controles e tiveram maior sucesso na cópula (Figura 2). Uma explicação para esse fato é que a planta hospedeira influenciou a fêmea a produzir e liberar feromônio mais cedo e tornar-se mais atrativa e obter maior sucesso no acasalamento. O estímulo da planta hospedeira na produção do feromônio pelas fêmeas tem sido bem documentado em mariposa do gênero *Helicoverpa* (Landolt & Phillips 1997). A produção do feromônio pelas fêmeas de *Helicoverpa zea* é induzida pela presença da planta hospedeira (Raina et al. 1992). Um fenômeno similar foi demonstrado também em fêmeas de *Helicoverpa phloxiphaga*, que requer a presença da planta hospedeira para produção do feromônio (Raina 1988). Isso pode ser devido também ao sinergismo, onde a planta hospedeira em combinação com o feromônio sexual da fêmea torna-se mais atrativa aos machos. Estudos com *C. pomonella* (Light et al. 2001, Coracini et al. 2004, Yang et al. 2004, Ansebo et al. 2005) mostraram que machos e fêmeas foram estimulados pelos mesmos compostos presentes no hospedeiro, e que esses compostos estimulam a atração do macho para o feromônio da fêmea. Quando testes foram feitos em campo usando armadilhas com septos contendo compostos da planta hospedeira, machos de *C. pomonella* foram capturados em maior quantidade. Essa atração foi confirmada em estudos no túnel de vento (Ansebo et al. 2004). É provável, neste caso, que os machos usem voláteis da planta para distinguir ambientes onde é provável encontrarem fêmeas (Ansebo et al. 2004). Neste estudo com *L. coffeella*, não se sabe se é o macho ou a fêmea ou ambos que respondem aos voláteis da planta de café para otimizar o sucesso do acasalamento.

O alto grau de especialização de *L. coffeella* em *C. arabica* ficou evidenciado no comportamento de oviposição das fêmeas (Figura 4). Raramente a oviposição foi feita em folhas de *G. americana*, em situação de não escolha. Em outra mariposa, *Yponomeuta cagnagellus* que é também altamente especializada, as fêmeas somente são capazes de discriminar a planta hospedeira por pistas de contato presentes na superfície das folhas (Hora & Roessingh 1999). É provável que pistas de contato presentes na superfície da folha foram responsáveis pela diferença no comportamento de oviposição das fêmeas de *L. coffeella*. O jenipapo é uma Rubiaceae tal como *C. arabica* e, portanto, deve possuir vários compostos em comum. No entanto, em folhas de café, devem estar presentes compostos específicos que a fêmea de *L. coffeella* reconhece como hospedeiro apropriado para oviposição. Magalhães (2005) determinou que a cafeína foi importante na oviposição de fêmeas de *L. coffeella* em diferentes genótipos do cafeeiro, o que indica ser este composto a pista para a discriminação pelas fêmeas. É claro que outros fatores como a textura das folhas podem ter influenciado as fêmeas de *L. coffeella* durante a oviposição.

Outros estímulos não foram considerados no presente trabalho, mas sendo *L. coffeella* um inseto de hábitos diurnos, é possível que a percepção visual desempenhe um papel relevante individualmente ou integrando-se aos voláteis para a localização da planta hospedeira.

Estes resultados permitem afirmar que os voláteis da folha do cafeeiro têm um papel relevante na otimização do acasalamento de *L. coffeella*. No entanto, os voláteis da planta não parecem ter importância direta para a localização da planta hospedeira quando testado em olfatômetro em “Y”. É provável que pistas quimio-táteis e a cor da planta sejam importantes para a oviposição, o que permite que fêmeas de *L. coffeella* possam discriminar entre a planta hospedeira e outras plantas.

Referências bibliográficas

- Ansebo, L., Coracini, M. D. A., Bengtsson, M., Liblikas, I., Ramírez, M., Borg-Karlson, A. K., Tarsin, M., & Witzgall, P. 2004. Antennal and behavioural response of codling moth *Cydia pomonella* to plant volatiles. *Journal of Applied Entomology* 128: 488-493.
- Ansebo, L., Ignell, R., Löfqvist, J., & Hansson, B. S. 2005. Responses to sex pheromone and plant odours by olfactory receptor neurons housed in sensilla auricillica of the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Insect Physiology* 51: 1066-1074.
- Coracini, M., Bengtsson, M., Liblikas, I., & Witzgall, P. 2004. Attraction of codling moth males to apple volatiles. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 110: 1-10.
- Crawley, M. 2002. *Statistical Computing. An introduction to data analysis using S-plus*. London: Blacwell Scientific Publications.
- Geier, P. 1963. The life history of codling moth *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera, Tortricidae) in the Australia capital territory. *Australian Journal of Zoology* 11: 323-367.
- Hattori, M. 1988. Host-plant factors responsible for oviposition behaviour in the limabean pod borer, *Etiella zincknella* Treitschke. *Journal of Insect Physiology* 34: 191-196.
- Honda, K. 1995. Chemical basis of differential oviposition by lepidopterous insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 30: 1-23.
- Hora, K. H., & Roessingh, P. 1999. Oviposition in *Yponomeuta cagnagellus*: the importance of contact cues for host plant acceptance. *Physiological Entomology*. 24: 109-120.
- Jackson, D. M. 1979. Codling moth egg distribution on undamaged apple trees. *Annals of the Entomological Society of America*. 72: 361-368.
- Landolt, P. J. 1989. Attraction of the cabbage looper moth to host plants and odor in the laboratory. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 53: 117-124.
- Landolt, P. J., & Philips, T. W. 1997. Host plant influences on sex pheromone behavior of phytophagous insects. *Annual Review of Entomology* 42: 371-391.
- Light, D. M., Knight, A. L., Henrick, C. A., Rajapaska, D., Lingren, B., Dickens, J. C., Reynolds, K. M., Buttery, R. G., Merrilli, G., Roitman, J., & Campbell, B. C. 2001. A pear-derived kairomone with pheromonal potency that attracts male and female codling moth, *Cydia pomonella* (L.). *Naturwiss* 88: 333-338.
- Magalhães, S. T. V. 2005. Fitoquímicos na interação de bicho-mineiro com cafeeiros. Viçosa, MG: UFV. 71p. Tese (Doutorado em Entomologia)- Universidade Federal de Viçosa.

- Phillips, W. T., & Strand, M. R. 1994. Larval secretions and food odours affect orientation in female *Plodia interpunctella*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 71: 185-192.
- R Development Core Team. 2005. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, v. Vienna, Austria.
- Raina AK. 1988. Selected factors influencing neurohormonal regulation of sex pheromone production in *Heliothis species*. *Journal of Chemical Ecology* 14:2063–69.
- Raina, A. K., Kingan, T. G., & Mattoo, A. K. 1992. Chemical signals from host plant and sexual behavior in a moth. *Science* 94: 255: 592.
- Ramaswamy, S. B. 1988. Host finding by moths: sensory modalities and behaviours. *Journal of Insect Physiology* 34: 235-249.
- Ramaswamy, S. B., Wa, W. K., & Baker, G. T. 1987. Sensory cues and receptors for oviposition by *Heliothis virescens*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 43: 15-18.
- Reed, H. C., & Landolt, P. J. 2002. Attraction of mated female codling moths (Lepidoptera: Tortricidae) to apples and apple odour in a flight tunnel. *Florida Entomologist* 85: 324-329.
- Reis, R. Jr., Lima, E. R., Vilela, E. F. & Barros, R. S. 2000. Method for maintenance of coffee leaves in vitro for mass rearing of *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 29: 849-854.
- Rembold, H., Kohne, A. C., & Schroth, A. 1991. Behavioral response of *Heliothis armigera* Hb. (Lepidoptera: Noctuidae) moths on a synthetic chickpea (*Cicer arietinum* L.) kairomone. *Journal of Applied Entomology* 112: 254-262.
- Renwick, J. A. A., & Chew, F. S. 1994. Oviposition behaviour in Lepidoptera. *Annual Review of Entomology* 39: 377-400.
- Rojas, J. C. 1999. Electrophysiological and behavioral responses of the cabbage moth to plant volatiles. *Journal of Chemical Ecology* 25: 1867-1883.
- Rojas, J. C., Virgen, A., & Cruz-López, L. 2003. Chemical and tactile cues influencing oviposition of a generalist moth, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology* 32: 1386-1392.
- Sokal, R. R., & Rohlf, F. J. 1995. *Biometry*, 3 rd ed. New York, USA: Freeman.
- Souza, J.C., & Reis, P.R. 1992. Bicho-mineiro: biologia, danos e manejo integrado. Belo Horizonte: EPAMIG. 67p. (Boletim Técnico, 37).
- Tingle, F. C., Mitchell, E. R., & Heath, R. R. 1990. Preferences of mated *Heliothis virescens* and *H. subflexa* females for host and nonhost volatiles in a flight tunnel. *Journal of Chemical Ecology* 16: 2889-2898.
- Vallat, A., & Dorn, S. 2005. Changes in volatile emissions from apple trees and associated response of adult female codling moths over the fruit-growing season. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4083-4090.

- Witzgall, P., Ansebo, L., Yang, Z. H., Angeli, G., Sauphanor, B., & Bengtsson, M. 2005. Plant volatiles affect oviposition by codling moths. *Chemoecology* 15: 77-83.
- Yan, F., Bengtsson, M., & Witzgall, P. 1999. Behavioral response of female codling moths, *Cydia pomonella*, to apple volatiles. *Journal of Chemical Ecology* 25: 1343- 1351.
- Yang, Z., Bengtsson, M., & Witzgall, P. 2004. Host plant volatiles synergize response to sex pheromone in codling moth, *Cydia pomonella*. *Journal of Chemical Ecology* 30 (3): 619-629.

Capítulo 2

Emprego do feromônio sexual sintético do bicho mineiro do café, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Méneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae) para a confusão sexual de macho

Resumo

Neste trabalho avaliou-se o potencial do componente principal sintético do feromônio sexual, 5,9 dimetil-pentadecano, para o controle de *Leucoptera coffeella* através da técnica de confusão sexual de machos. A eficiência da técnica de confusão sexual de macho de *L. coffeella* foi avaliada pelo monitoramento da população com armadilhas tipo Delta, com septos de borracha contendo 0,5 mg de feromônio sexual sintético, bem como pela amostragem de folhas minadas e folhas com ovos, para registrar o dano no campo de café de 3/8/2004 a 16/2/2005 em Patrocínio, Triângulo Mineiro. Os liberadores PB-rope usados para saturar o ambiente com feromônio sexual sintético consistem de um tubo afilado de polietileno contendo 200 mg de 5,9-dimetilpentadecano, fabricados pela Shin-Etsu Chemical Co. Ltda (Tóquio, Japão). Foram usados em uma razão de 606 liberadores/ha em áreas tratadas para a confusão sexual. Os tratamentos estudados foram: (A) Confusão sexual- Saturação da área com feromônio sexual sintético e (B) branco- sem aplicação do feromônio sexual sintético. A área experimental constituiu-se de duas áreas (A e B) de 2,4 ha cada, separadas por uma distância de 200 m. Cada área foi subdividida em duas sub-áreas (A₁, A₂ e B₁, B₂) de 1,2 ha separadas por uma distância de 10 m. Neste trabalho, o número de machos capturados nas armadilhas de feromônio nas áreas tratadas foi reduzido em relação às áreas controles, mas, o dano deste inseto à lavoura não mostrou diferença entre as áreas tratadas e áreas controles. Nos dois tratamentos houve redução no número de folhas minadas e ovos amostrados durante o experimento. Neste caso, não foi possível quantificar a eficiência da técnica porque os mesmos níveis de folhas minadas e ovos foram encontrados na área tratada e controle.

Palavras-chave: feromônio sexual, café, armadilha, ecologia química, comportamento.

Introdução

Os feromônios sexuais são substâncias químicas que mediam a comunicação entre os sexos de uma mesma espécie (Karlson & Luscher 1959). Normalmente, em Lepidoptera, essas substâncias são liberadas pela fêmea em pequenas quantidades e atraem o macho a longas distâncias (Cardé & Minks 1995).

A liberação de elevadas doses de feromônio sexual sintético no ambiente para a confusão sexual provoca modificações no comportamento de acasalamento da espécie-alvo e a interrupção da comunicação olfativa entre os parceiros sexuais, reduzindo a probabilidade de encontros e acasalamentos. Como consequência, são obtidas reduções nas populações da praga e, portanto, nos seus danos ao longo das gerações (Cardé & Minks 1995).

O processo da confusão sexual em machos ainda não está completamente esclarecido, podendo ser induzido por vários mecanismos, como a adaptação sensorial e habituação do sistema nervoso central dos machos, a camuflagem da pluma de feromônio natural, a formação de falsas trilhas de feromônio, a modificação no ritmo diário de atração (Bartell 1982, Renou 1991, Cardé & Minks 1995). A atuação de cada mecanismo e sua eficiência na confusão sexual de macho da espécie-alvo depende basicamente da composição do feromônio sexual sintético utilizado, da dose aplicada e da taxa de liberação na atmosfera, além do padrão de distribuição dos liberadores no campo (Cardé et al. 1993, Sanders 1995).

O controle direto de insetos-praga pela técnica de confusão sexual de macho tem apresentado resultados satisfatórios em alguns casos. A mariposa das frutas, *Grapholita molesta* é controlada pela técnica de confusão sexual na França, Espanha, Itália, Austrália, Brasil (Cardé & Minks 1995), e Austrália (Il'ichev et al. 2004). Populações da praga lagarta rosada do algodoeiro, *Pectinophora gossypiella* tem sido reduzida com sucesso com a técnica de confusão sexual de machos nos Estados Unidos (Stanten et al. 1987) e estudos com essa praga também estão sendo feitos na Grécia (Lykouressis 2005).

Existem também casos onde a técnica de confusão sexual de machos não obteve o êxito esperado, como por exemplo, para *Lobesia botrana* (Lepidoptera : Tortricidae) em vinhedos da Sardenha (Nannini & Delrio 1993) e para *Tuta absoluta* na cultura do tomate no Brasil (Michereff Filho et al. 2000) por diversas razões.

Leucoptera coffeella é considerada uma das principais pragas desta cultura no Brasil, mais especificamente em Minas Gerais, Paraná e São Paulo, devido à sua ocorrência generalizada nos

cafezais e aos prejuízos econômicos causados (Reis & Souza 1996). *L. coffeella* frequentemente alcança os níveis de dano em várias regiões do País, dependendo da época do ano, da variedade de café e dos tratamentos culturais e fitotécnicos utilizados nesta cultura. O controle químico, através de inseticidas, tem sido a forma de controle mais utilizada para impedir o ataque deste inseto. Devido a isto, as aplicações de agrotóxicos contra esta praga vêm aumentando, causando poluição ao meio ambiente, onerando o custo de produção, diminuindo os inimigos naturais e causando o surgimento de populações resistentes (Fragoso et al. 2002, 2003, Guedes & Oliveira 2002). A melhoria da qualidade do processo produtivo, com conseqüente diminuição dos custos de produção e da poluição agrícola exige, atualmente, o desenvolvimento de novas técnicas de manejo das pragas que atacam esta cultura.

O feromônio sexual de *L. coffeella*, 5,9-dimetil-pentadecano (Francke et al. 1998), pode ser empregado tanto para monitorar a densidade populacional de *L. coffeella* como para controlá-lo. O feromônio sintético 5,9-dimetil-pentadecano é utilizado com sucesso para o monitoramento desta praga (Lima 2001, Bacca 2006).

A técnica de confusão sexual foi testada anteriormente para o bicho mineiro sem sucesso, principalmente por ter sido usada quando a população de adultos no campo era alta (Ambrogio 2004), fato este que também gerou insucesso em outro estudo (Charmillot & Vickers 1991).

Este trabalho teve como objetivo testar a técnica de confusão sexual de machos em condições de baixa população de adultos em campo. Para isto testou-se as hipóteses: (i) de que nas áreas saturadas com feromônio sexual sintético provoca desorientação nos machos de *L. coffeella* e (ii) que a confusão sexual leva a redução das injúrias causadas ao cafeeiro por *L. coffeella*.

Materiais e Métodos

Localização e descrição da área

Este trabalho foi conduzido em lavouras de café na fazenda DATERRA, localizada no município de Patrocínio-MG, latitude 18° 17' 00" S, longitude 46° 59' 36" N, altitude de 870 m, temperatura anual média de 21°C e precipitação anual média de 1500 mm.

O experimento foi desenvolvido em um talhão de café, *var.* Mundo Novo, com espaçamento de 4,0 entre fileiras e 0,5 m entre covas, sendo 2 plantas por cova com idade de 6 anos, plantadas em dezembro de 1999, com aproximadamente 5.000 plantas/ha. A área experimental constituiu de duas áreas (A e B) de 2,4 ha separadas por uma distância de 200 m. Cada área foi subdividida em duas sub-áreas (A₁, A₂ e B₁, B₂) de 1,2 ha separadas por uma distância de 10 m.

Procedimento experimental

As sub-áreas, A₁, A₂ e B₁, B₂ foram monitoradas com armadilhas tipo Delta, com septos de borracha contendo 0,5 mg de feromônio sexual. Em cada sub-área foram posicionadas 5 armadilhas, sendo 3 centrais e as duas na borda (Figura 1), devidamente identificadas. As armadilhas foram instaladas nos galhos da planta a 5 cm do solo, no dia 3 de agosto de 2004 e vistoriadas a cada 3 dias, onde foi computado o número de machos em cada uma delas, visando ter uma medida da flutuação populacional antes da aplicação do feromônio sexual para confusão sexual. Os septos de borracha foram trocados a cada quatro semanas e as placas de cola a cada mês.

No dia 13 de agosto, após terem sido feitas três avaliações do número de machos capturados, procedeu-se a instalação do tratamento. Os liberadores para confusão sexual do tipo PB-Rope (Shin-Etsu Co., Ltda - Tóquio, Japão) consistem de um tubo afilado de polietileno contendo 200 mg de 5,9-dimetilpentadecano. Somente nas sub-áreas A₁ e A₂ foram aplicados 606 liberadores PB-Rope/ha, ou seja, uma dose de 121,2 g/ha. Nas bordas das sub-áreas tratadas os liberadores PB-rope foram colocados em dobro para controlar o efeito de bordadura. Os liberadores foram colocados no ramo da planta, a 1,5 m do solo. As sub-áreas B₁ e B₂ permaneceram como área controle. Os liberadores PB-Rope foram posicionados de forma

regular no campo afastado aproximadamente 5 metros, enquanto nas bordas das sub-áreas o espaçamento foi de 2,5 metros.

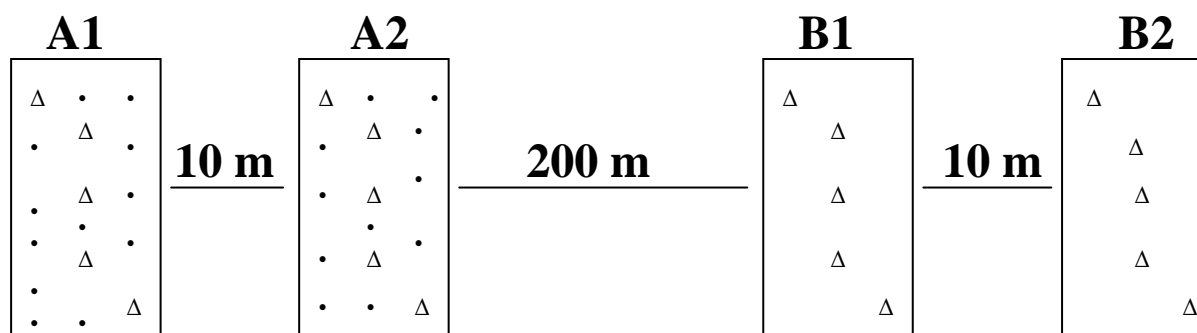


Figura 1. Croqui da área experimental dividida em quatro sub-áreas experimentais com seus respectivos tratamentos e disposição das armadilhas Delta. Os triângulos representam as armadilhas Delta e os pontos pretos é uma representação esquemática dos liberadores de feromônio PB-Rope e não indica a quantidade real utilizada. A1 e A2- sub-áreas tratadas com feromônio para confusão sexual, B1 e B2- sub-áreas controles. Fazenda DATERRA Patrocínio-MG.

Avaliação

A intensidade de confusão sexual dos machos de *L. coffeella* foi avaliada por meio do monitoramento do número de machos capturados nas armadilhas tipo Delta, comparando-se as capturas nas sub-áreas tratadas (A₁, A₂) e não tratadas (B₁, B₂). Os machos capturados nas armadilhas foram registrados em intervalos de três dias, do dia 3/8/04 a 16/2/05, quando terminou o experimento.

Para determinar o nível de dano do bicho mineiro, fez-se a amostragem convencional que consiste em avaliar a proporção de folhas minadas. Foi considerada para a coleta as folhas do terceiro ao quinto pares de ramos localizados no terço superior e no terço médio da planta em plantas escolhidas aleatoriamente. Coletou-se 10 folhas/árvore, no total de 200 folhas/sub-área. A avaliação do número de ovos foi feita através da coleta de cinco folhas das plantas em que estavam posicionadas as armadilhas (uma do centro e uma da borda) em cada sub-área. As plantas eram amostradas para verificar o dano nas folhas e presença de ovos no intervalo de quinze dias do início ao término do experimento.

No dia 04/07/04 foi feita uma pulverização com produto trans-laminar com efeito residual de aproximadamente 30 dias em toda a área (tratada e não tratada com o feromônio para a confusão sexual) visando o controle do bicho-mineiro, um mês antes da instalação do experimento.

Análises estatísticas

Todas as análises foram realizadas no sistema estatístico R (R Development Core Team 2005). Foi utilizado o método dos modelos lineares generalizados mistos para dados longitudinais. Para avaliar o efeito dos tratamentos: i) na confusão de machos, ii) na percentagem de folhas minadas e iii) no número de ovos por folha, os seguintes modelos de efeito fixo foram testados respectivamente.

$$\begin{aligned} \text{Número de machos} = & \text{Tempo} + \text{Tratamento} + \text{Posição} + \text{Tempo}^2 + \text{Tempo: Tratamento} \\ & + \text{Tempo: Posição} + \text{Tratamento: Posição} + \text{Tratamento: tempo}^2 \\ & + \text{Posição: Tempo}^2 + \text{Tempo: Tratamento: Posição} \\ & + \text{Tratamento: Posição: Tempo}^2 \end{aligned} \quad (1)$$

$$\begin{aligned} \% \text{ de Folhas Minadas} = & \text{Tempo} + \text{Tratamento} + \text{Tempo}^2 + \text{Tempo: Tratamento} \\ & + \text{Tratamento: Tempo}^2 \end{aligned} \quad (2)$$

$$\begin{aligned} \text{Número de ovos} = & \text{Tempo} + \text{Tratamento} + \text{Posição} + \text{Tempo}^2 + \text{Tempo: Tratamento} \\ & + \text{Tempo: Posição} + \text{Tratamento: Posição} + \text{Tratamento: Tempo}^2 \\ & + \text{Posição: Tempo}^2 + \text{Tempo: tratamento: Posição} \\ & + \text{Tratamento: Posição: Tempo}^2 \end{aligned} \quad (3)$$

Aonde: Número de Machos é uma variável de contagem do número de machos capturados por armadilha, % de Folhas Minadas é a razão entre o número de folhas minadas e o total de folhas amostradas multiplicados por 100, Número de Ovos é a soma dos ovos encontrados nas 5 folhas por armadilha, Tempo é uma variável contínua relativa à data da aplicação do tratamento, Tratamento é uma variável qualitativa contendo os níveis confundimento e controle, Posição é uma variável qualitativa que define o local onde a armadilha foi colocada contendo os níveis centro e borda, que: define interação entre as variáveis. Para os modelos citados acima, foram utilizados, respectivamente, os seguintes efeitos aleatórios e distribuições de probabilidade: i) agrupamento Armadilha dentro de Posição dentro da Área para cada tempo amostral (\sim Tempo|Área/Posição/Armadilha) com distribuição de poisson e função de ligação \log_e , ii) agrupamento de Área para cada tempo amostral (\sim Tempo|Área) com distribuição binomial e função de ligação logit e iii) agrupamento de Posição dentro de Área para cada tempo amostral (\sim Tempo|Área/Posição) com distribuição de poisson e função de ligação \log_e . Para cada modelo foram analisadas as estimativas dos parâmetros das variáveis explicativas pelo teste t. Foram

mantidas no modelo apenas as variáveis cuja estimativa fossem significativas a 5% ou as variáveis que participassem de uma interação significativa (Crawley, 2002). Foi utilizada a função `glmmPQL` do pacote MASS.

Resultados

Nos 10 dias que antecederam a aplicação dos liberadores PB-Rope, a quantidade média de machos capturados nas armadilhas foi equivalente, indicando que as duas áreas possuíam a mesma densidade populacional de adultos (Tabela 1). Da mesma maneira, as armadilhas posicionadas no centro e bordas de cada sub-área também coletaram número equivalente de machos nos 10 dias e depois da instalação dos liberadores PB-Rope até o final do experimento (Tabela 1).

Verificou-se que altas doses do feromônio sexual sintético, 5,9-dimetil-pentadecano usado para a confusão sexual de machos de *L. coffeella* provocaram redução no número médio de machos capturados nas armadilhas da área tratada com liberadores PB-Rope em comparação com os da área controle (Figura 1; Tabela 1). No entanto, não houve diferença no dano (percentagem de folhas minadas) e na quantidade de ovos entre a área tratada com liberadores PB-Rope e a área controle (Tabelas 2 e 3).

A captura média de machos nas armadilhas das áreas controle foi significativamente maior que nas áreas onde se aplicou os liberadores PB-Rope nos 90 dias que se seguiram à aplicação (Figura 1). Esta situação modificou-se consideravelmente quando, após os 90 dias, a população de machos capturados nas armadilhas da área tratada foi superior à da área controle (Figura 1).

A percentagem de folhas minadas e o número médio de ovos foram equivalentes nas áreas tratadas e controle. (Tabela 2 e 3). No entanto, houve nas duas áreas, um decréscimo na percentagem de folhas minadas e no número médio de ovos, em relação ao tempo (Figuras 2 e 3).

Tabela 1. Estimativas dos parâmetros do modelo mínimo adequado para a captura de machos em armadilhas de feromônio. Estimativas obtidas via glmmPQL com distribuição de probabilidades Poisson e função de ligação \log_e . As variáveis não significativas foram retiradas do modelo completo definido na equação 1.

Parâmetros	Estimativas	EP	GL	t	p
Intercepto do Confundimento	0,6472	0,1105	2	5,8550	0,0000
Intecepto da Testemunha	0,1814	0,1568	2	1,1567	0,3669
Confundimento: Tempo	-0,1098	0,0067	856	-16,2678	0,0000
Testemunha: Tempo	0,0966	0,0086	856	11,2057	0,0000
Confundimento: Tempo ²	0,0013	0,0006	856	19,7883	0,0000
Testemunha: Tempo ²	-0,0010	0,00008	856	-12,9167	0,0000

Tabela 2. Estimativas dos parâmetros do modelo mínimo adequado para percentagem de folhas minadas. Estimativas obtidas via glmmPQL com distribuição de probabilidades binomial e função de ligação logit . As variáveis não significativas foram retiradas do modelo completo definido na equação 2.

Parâmetros	Estimativas	EP	GL	t	p
Intercepto	-3,6739	0,1825	47	-20,1256	<0,0001
Tempo ²	-0,000077	0,000018	47	-4,1636	0,0001

Tabela 3. Estimativas dos parâmetros do modelo mínimo adequado para o número de ovos. Estimativas obtidas via glmmPQL com distribuição de probabilidades Poisson e função de ligação \log_e . As variáveis não significativas foram retiradas do modelo completo definido na equação3.

Parâmetros	Estimativas	EP	GL	t	p
Intercepto	0,6453	0,2934	90	2,1995	0,0304
Tempo	-0,0112	0,0036	90	-3,1056	0,0025

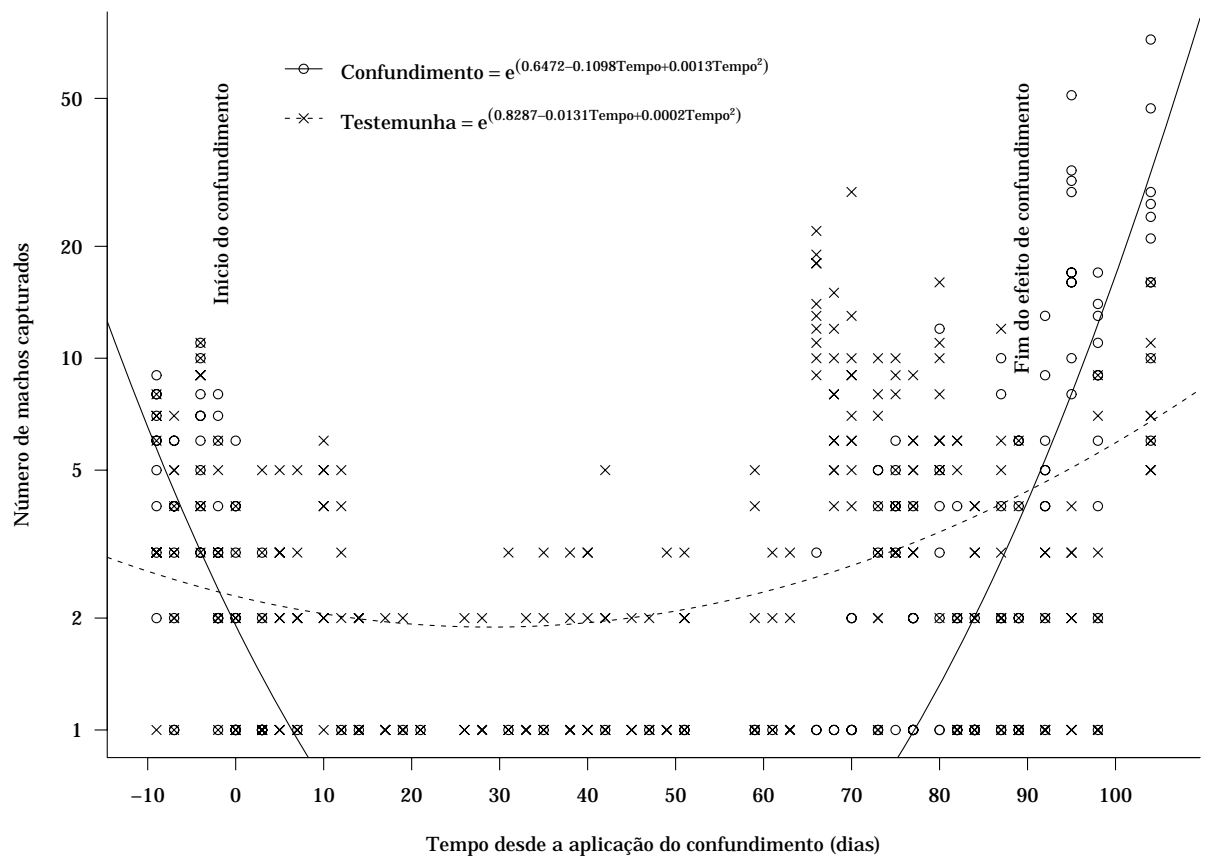


Figura 1. Efeito dos tratamentos no número de machos de *Leucoptera coffeella* capturados por armadilha antes e após a aplicação do feromônio para a confusão sexual de machos, durante os 6 meses.

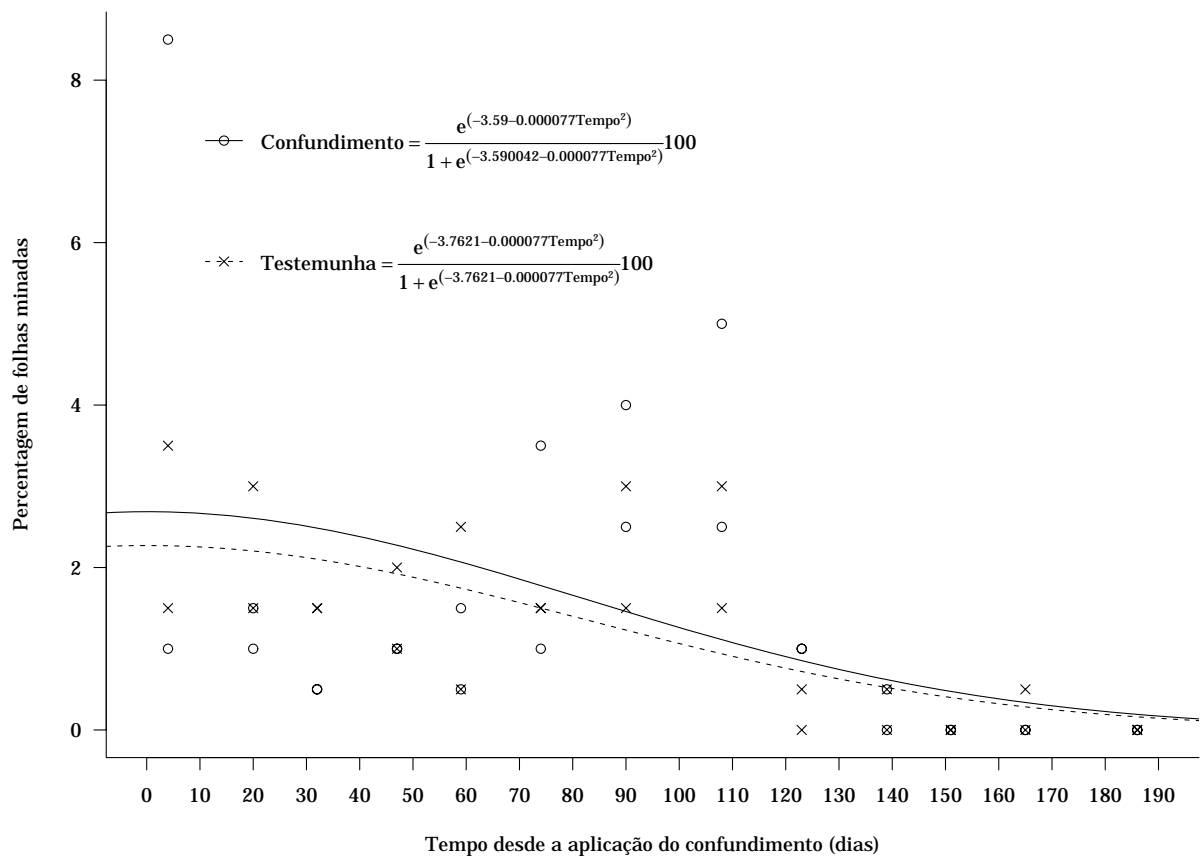


Figura 2. Efeito dos tratamentos na porcentagem de folhas minadas após a aplicação do feromônio para a confusão sexual de macho de *L. coffeella*, durante os 6 meses.

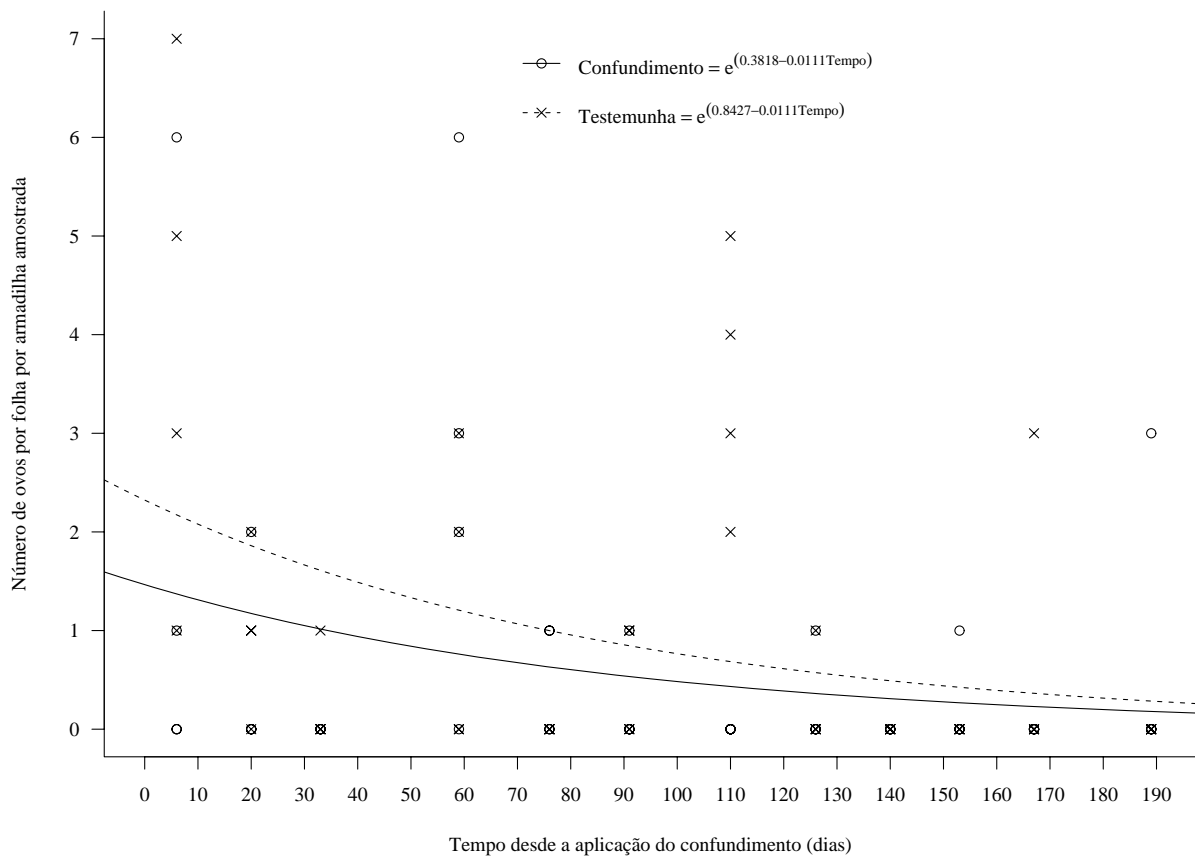


Figura 3. Efeito dos tratamentos no número de ovos de *L. coffeella* por armadilha após a aplicação do feromônio para a interrupção do acasalamento, durante os 6 meses.

Discussão

O monitoramento durante os 10 dias antes da instalação dos liberadores PB-Rope para a confusão sexual mostrou que o número de machos capturados foi equivalente em ambas às áreas. Isso foi uma informação importante, pois indicou que os níveis populacionais dentro das áreas eram semelhantes no início do experimento. Após a instalação dos liberadores PB-Rope na área tratada para a confusão sexual provocou diminuição no número médio de machos capturados nas 10 armadilhas posicionadas na área tratada para a confusão sexual quando comparadas às 10 armadilhas controle. A medida deste efeito pode ser observada na Figura 1 onde a captura nas armadilhas da área tratada pós-tratamento permaneceram sem capturar nenhum macho durante 70 dias. Este fato evidencia a ação do feromônio sexual aplicado na área tratada. Esta diminuição numérica de captura é denominada “shut-down” que indica a intensidade da supressão do acasalamento, e é o efeito desejado em áreas tratadas com feromônio sexual. Este efeito foi observado em *Helicoverpa armigera* onde houve uma redução de 96% de captura de machos em área tratada com feromônio sexual (Chamberlain et al. 2000).

É importante ressaltar que em um estudo com *C. pomonella* (Witzgall et al. 1997), houve aumento no número de machos capturados em áreas tratadas para confusão sexual porque houve entrada de machos de áreas vizinhas não tratadas. No presente estudo, não se observou tal efeito, provavelmente pela eficiência das bordas que foi feito com a duplicação da dose do feromônio para evitar a entrada de machos das áreas limites. O fato de não haver diferenças nas capturas de machos das armadilhas colocadas no centro e bordas nas áreas tratadas sugere que não houve entrada de machos vizinhos.

Na área tratada houve uma liberação de feromônio sexual muito superior àquela liberada pelas fêmeas presentes na área. Neste caso, estima-se que os machos presentes nesta área tiveram dificuldade de encontrar o feromônio liberado pelos septos de feromônio nas armadilhas, o que explica a menor captura. Assim, da mesma forma que os machos tiveram dificuldade de encontrar as armadilhas, o mesmo deve ter ocorrido para encontrar as fêmeas. O modo pelo qual os liberadores de feromônio PB-Rope foram posicionados no campo pode estar diretamente associado a um dos mecanismos prováveis que explicam a confusão sexual observado nesse experimento. Considerando que os liberadores eram fontes pontuais de feromônio os machos podem ter sido atraídos a estas fontes e perderam tempo voando desorientados em resposta a estas plumas, resultando em uma competição direta entre fêmeas chamando e os liberadores PB-Rope (Cardé e Minks 1995). Por outro lado, com a quantidade individual de cada liberador sendo

alta, pode ter sido formada uma nuvem de feromônio no campo e neste caso, o processo envolvido pode ter sido a adaptação sensorial onde os machos permaneceram com a sensibilidade reduzida após o contato prolongado com o feromônio (Cardé et al. 1993, Cardé & Minks 1995).

Ao longo do tempo em que a área tratada permaneceu com os liberadores PB-Rope, e capturando menos machos nas armadilhas, esperava-se que isto tivesse um impacto negativo na intensidade de danos e no número ovos na área tratada. No entanto, a proporção de folhas minadas e o número de ovos não diferiram nos dois tratamentos (Tabelas 2 e 3). A análise destes dois parâmetros é fundamental para quantificar a eficiência da técnica, pois reflete diretamente o impacto da confusão sexual na diminuição populacional do inseto. No caso deste experimento observou-se uma diminuição gradativa na proporção de folhas minadas e no número de ovos em ambas as áreas ao longo do tempo (Figuras 2 e 3). No entanto, não foi possível quantificar a eficiência da técnica porque os mesmos níveis de folhas minadas e ovos foram encontrados na área tratada e controle. Este fato não elimina a possibilidade de que a técnica não tenha funcionado. O talhão destinado ao experimento constituía de uma área de cultivo comercial e, portanto sujeita aos tratamentos culturais rotineiros. Aproximadamente um mês antes da instalação do experimento foi feito o controle do bicho mineiro com um produto trans-laminar com efeito residual de aproximadamente 30 dias em todo o talhão, que incluía a área tratada e não tratada. No decorrer do tempo (3 meses) não ocorreu aumento populacional em ambas as áreas que permitisse avaliar o efeito do tratamento com feromônio. Tudo indica que esse inseticida utilizado proporcionou controle efetivo dos danos nos dois tratamentos, dificultando dessa forma, quantificar a eficiência da técnica de confusão sexual de machos neste trabalho.

Um dos fatores-chaves para o sucesso da técnica é que a população inicial no momento da aplicação do feromônio esteja baixa (Sanders 1989). Quando a população do bicho mineiro foi alta e a área foi tratada com feromônio sexual, a técnica não foi bem sucedida, provavelmente pela alta densidade de fêmeas que aumentam as chances dos machos de encontrá-las (Ambrogio 2004). Sendo assim, o presente experimento foi iniciado em condições adequadas, mas, não foi possível avaliar a eficiência. Neste caso, a densidade populacional se manteve baixa nas áreas controles durante todo o experimento, dificultando uma comparação dos dados com a área tratada com feromônio para a confusão sexual de machos.

Mesmo que não tenha sido possível avaliar a eficiência, alguns aspectos do experimento merecem consideração. Outro aspecto importante da técnica e que já foi constatado em outros estudos é o problema da migração de fêmeas grávidas para o interior da área tratada

(Chamberlain et al. 2000). Este fato não foi observado no presente experimento porque se houvesse migração de fêmeas grávidas a quantidade de ovos não diminuiria com o tempo. De fato, fêmeas grávidas de *L. coffeella* são pouco móveis em relação às fêmeas virgens (Magalhães 2005, Capítulo 1 desta tese).

Os liberadores PB-Rope parecem ter sido efetivos, liberando altas taxas de feromônio, até 90 dias a partir do início do experimento (Figura 1). Após esta data, quando os liberadores PB-Rope continham menos feromônio a taxa de liberação passou a ser como a de um septo de borracha impregnado com feromônio sexual sintético que se usa na armadilha. A evidência deste fato é mostrada pelos altos níveis de captura observada na área tratada e não na área controle (Figura 1). Neste caso deve ter havido atração de machos das áreas vizinhas, pois se fosse um aumento populacional gerado por um fator ambiental o mesmo teria ocorrido na área controle.

Com as informações obtidas no presente estudo, é possível afirmar que os liberadores de feromônio PB-Rope foi eficiente na competição atrativa sobre as armadilhas. Considerando as armadilhas como “fêmeas artificiais” e a redução na captura de machos como resultado da interrupção na comunicação sexual devido à dose de feromônio aplicado na área, constatou-se que a orientação dos machos de *L. coffeella* foram afetados pelas altas doses do feromônio sexual sintético 5,9- dimetil-pentadecano.

Referências Bibliográficas

- Ambrogi, B. G. 2004. Viability of mating disruption techniques for the control of the coffee leaf miner *Leucoptera coffeella* (Guérin-Méneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae). Viçosa, MG: UFV. 32p. Tese (Mestrado em Entomologia)-Universidade Federal de Viçosa.
- Bacca, R. T. 2006. Monitoramento de *Leucoptera coffeella* com armadilha de feromônio sexual. Viçosa, MG: UFV. 89p. Tese (Doutorado em Entomologia)- Universidade Federal de Viçosa.
- Batell, R. J. 1982. Mechanisms of communication disruption by pheromone in the control of Lepidoptera : a review. *Physiology Entomology* 7: 353-364.
- Cardé, R.T. & Minks, A.K. 1995. Insect pheromone research: new directions. Chapman & Hall, New York. 684p.
- Cardé, R.T., Mafra-Neto, A., Staten, R.T. et al. 1993. Evaluation of communication disruption in the pink bollworm in field wind tunnels. *IOBC wprs Bulletin*, v.16,n.10,p.23-28,1993.
- Cardé, R.T., Mafra-Neto, A., Staten, R.T., Koch, U. & Farbert, P. 1993. Evaluation of communication disruption in the pink bollworm in field wind tunnels. *IOBC wprs Bulletin* 16(10), 23-28.
- Charmillot, P.J. & Vickers, R.A. 1991. Use of sex pheromones for control of tortricid pest in pome and stone fruits. In: Van Der Gueest, L.P.S., Evenhuis, H.H. (eds.), *Tortricid pest, their biology, natural enemies and control*. Amsterdam: Elsevier Science. p. 487-496.
- Chamberlain, D. J; Brown, N. J; Jones, O.T & Casagrande, E. 2000. Field evaluation of a slow release pheromone formulation to control the Americam bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Pakistan. *Bulletin of Entomological Research* 90: 183-190.
- Crawley, M. 2002. *Statistical Computing. An introduction to data analysis using S-plus*. London: Blacwell Scientific Plublications
- Fragoso, D.B., Guedes, R.N.C. & Ladeira, J.A. 2003. Selection in the evolution of resistance to organophosphates in *Leucoptera coffeella* (Guérin-Méneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae). *Neotropical Entomology*. 32: 329-334.
- Fragoso, D.B., Guedes, R.N.C., Picanço, M.C. & Zambolim, L. 2002. Insecticide use and organophosphate resistance in the coffee leaf miner *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). *Bull. Entomol. Res.* 92: 203-212.
- Francke, W., Tóth, M., Szocs, G., Krieg, W., Ernest, H., Buschmann, E. 1988. Identifizierung and synthese von Dimethylalkanen als sexuallockstoffe weiblicher miniermotten (Lyonetiidae). *Zeitschrift fur Naturforschung, Berlim*, v. 43, n. 4,p 787-789.

- Guedes, R.N.C. & Oliveira, E.E. 2002. Resistência a inseticidas-pragas do cafeeiro: Situação e perspectivas. In: L. Zambolim (ed.), O estado da arte de tecnologias na produção de café. Viçosa, UFV, p. 471-497.
- Il'ichev, A.L., Willians, D.G. & Milner, A.D. 2004. Mating disruption barriers in pome fruit for improved control of oriental fruit moth *Grapholita molesta* Busck (Lep., Tortricidae) in stone fruit under mating disruption. J. Appl. Ent. 128: 126- 132.
- Karlson, P. & Luscher, M. 1959. Pheromones, a new term for a class of biologically active substances. Nature 183: 55-56.
- Lima, E.R. 2001. Feromônio sexual do bicho-mineiro do café *Leucoptera coffeella*: Avaliação para uso em programas de manejo integrado. Viçosa, MG: UFV. 82p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa.
- Lykouressis, D; Perdikis, D; Samartzis, D; Fantinou, A. & Toutouzas, S. 2005. Management of the pink bollworm *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae) by mating disruption in cotton field. Crop Protection 24: 177-183.
- Magalhães. 2005. Fitoquímicos na interação de bicho-mineiro com cafeeiros. Viçosa, MG: UFV. 71p. Tese (Doutorado em entomologia)- Universidade Federal de viçosa.
- Michereff Filho, M., Vilela, E.F., Jham, G.N., Attygalle, A., Svatos, A. & Meinwald, J. 2000. Initial studies of mating disruption of the tomato moth, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) using synthetic sex pheromone. J. Braz. Chem. Soc. 11: 621-628.
- Nanini, M. & Delrio, G. 1993. Experiments on mating disruption of grape vine moth, *Lobesia botrana* in Sardinian vineyards. IOBC/WPRS Bulletin 16: 163- 168.
- R Development Core Team. 2005. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, v. Vienna, Austria.
- Reis, P.R. & Souza, J.C. 1996. Manejo integrado do bicho-mineiro *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Menevelli, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae), e seus reflexos na produção de café. An. Soc. Ent. Brasil 25: 77-82.
- Renou, M. 1991. Utilisation des pheromones dans la lutte contre les insects: les bases physiologiques de la confusion Bulletin de la Societé Zoologique de France 116: 339-344.
- Sanders, C.J. 1989. The further understanding of pheromones: Biological and chemical research for the future. In: Jutsum, A.R. & Gordon R.F.S. (eds.), Insect pheromone in plant protection. John Wiley & Sons, New York, p. 325-351.
- Sanders, C.J. 1995. Disruption of male spruce budworm orientation to female moths by pheromone and pheromone analogues in a wind tunnel. Physiological Entomology, Oxford, v.89, p.71-80.
- Staten, R. T., Flint, H.M., Weddle, R. C., Hernandez, E., & Yamamoto, A. 1987. Pink boll worm (Lepidoptera: Gelechiidae): Large-scale field trials with a high-rate gossyplure formulation. Journal of Economic Entomology 80:1267-1271.

Witzgall, P., Unelius, C.R., Rama, F., Chambon, J.P. & Bengtsson, M. 1997. Mating disruption of pea moth *Cydia nigricana*, and attraction antagonists. IOBC/ WPRS Bulletin 20: 207-215.

Conclusões gerais

Avaliando todos os resultados obtidos, podemos dizer que neste trabalho a planta hospedeira teve um papel relevante no comportamento reprodutivo de *L.coffeella*. Ficou evidenciado que os voláteis emitidos pela planta parece não constituir pista relevante para as fêmeas localizarem seu hospedeiro quando testadas em olfatômetro “Y”, porém têm um papel relevante durante a comunicação entre os parceiros. Onde os casais na presença dos voláteis da folha do cafeeiro iniciaram a cópula mais cedo e acasalaram mais que os casais na ausência dos voláteis da folha do cafeeiro.

Ficou evidenciado também que o feromônio sexual sintético usado para a confusão sexual de macho de *L. coffeella* foi efetivo na competição exercida pelos liberadores sobre as armadilhas. Provocando uma redução no número médio de machos capturados nas armadilhas da área tratada para confusão sexual, com relação à área controle.

No entanto, não houve diferença na intensidade de injúrias (percentagem de folhas minadas) e na quantidade de ovos entre as duas áreas. Esses dois parâmetros são fundamentais para quantificar a eficiência da técnica de confusão sexual de machos. Com isso, não foi possível quantificar a eficiência da técnica de confusão de macho neste trabalho.

A dificuldade na definição da importância relativa dos fatores que interferiram na orientação sexual de machos e nos acasalamentos de *L. coffeella* exige a realização de novos estudos para melhores esclarecimentos sobre a compatibilidade da técnica de confusão sexual com as características da praga, gerando maiores informações a respeito da biologia reprodutiva e comportamental de *L. coffeella*.