

Metodologias para estudo da comunicação vibracional de insetos e sua aplicação ao manejo de pragas

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Ernesto Paterniani
Helio Tollini
Marcelo Barbosa Saintive
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Silvio Crestana
Diretor Presidente

José Geraldo Eugênio de França
Kepler Euclides Filho
Tatiana Deane de Abreu Sá
Diretores Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Sousa Dias
Chefe-Geral

Maurício Antônio Lopes
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Sérgio Folle
Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes
Chefe-Adjunto de Administração

Documentos 152

Metodologias para estudo da comunicação vibracional de insetos e sua aplicação ao manejo de pragas

**Raúl Laumann
Maria Carolina Blassioli Moraes
Andrej Čokl
Miguel Borges**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 3348-4739 Fax:
(61) 3340-3666 <http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Maria Isabel de Oliveira Penteado*
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*
Membros: *Arthur da Silva Mariante*
Maria Alice Bianchi
Maria de Fátima Batista
Maurício Machain Franco
Regina Maria Dechechi Carneiro
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares de Campos Carneiro
Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*
Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*
Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2005):

M 593 Metodologias para estudo da comunicação vibracional de insetos e sua aplicação ao manejo de pragas. / Raúl Laumann et al... Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 30p. : il. – (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos ; ISSN 0102-0110 ; 152)

1. Insetos. 2. Comunicação. 3. Pragas. 4. Manejo. I. Moraes, Maria Carolina Blassiolo. II. Čokl, Andrej. III. Borges, Miguel. IV. Série.

595.7 – CDD 21

Autores

Raúl Laumann

Biólogo, Dr., Laboratório de Bioecologia e Semioquímicos de Insectos, Núcleo de Controle Biológico, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Maria Carolina Blassioli Moraes

Química, Dra. Laboratório de Bioecologia e Semioquímicos de Insectos, Núcleo de Controle Biológico, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Andrej Čokl

Biólogo, PhD, National Institute of Biology, Ljubljana, Slovenia

Miguel Borges

Biólogo, PhD, Laboratório de Bioecologia e Semioquímicos de Insectos, Núcleo de Controle Biológico, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Resumo

A comunicação vibracional de insetos pode ser definida como a comunicação através de sinais vibracionais transmitidos através de um substrato. Este tipo de comunicação é um fato conhecido no mundo acadêmico e relativamente bem estudado para insetos de várias Ordens. Os Pentatomidae utilizam a comunicação vibracional durante o comportamento reprodutivo, emitindo sinais que transmitem informação de espécie, localização, sexo e disponibilidade para o acasalamento dos parceiros. Até o momento os estudos da comunicação vibracional de Pentatomidae têm abordado principalmente aspectos básicos como: identificação do repertório de sinais de cada espécie, comparação de sinais entre espécies e populações de diferentes regiões geográficas, funções biológicas de cada tipo de sinal e utilização dos sinais para movimentação direcionada pelos insetos. Contudo, a total compreensão da comunicação vibracional oferece grande perspectiva para sua aplicação no manejo de pragas através do desenvolvimento de metodologias e técnicas para monitoramento e/ou controle de pragas. Neste trabalho apresentam-se os aspectos básicos do estudo da comunicação vibracional de pentatomídeos, descrevendo técnicas, equipamentos, procedimentos experimentais e metodologias de análise desenvolvidos, adaptados e utilizados no Laboratório de Bioecologia e Semioquímicos de insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Abstract

Vibratoional communication in insects can be defined as communication through vibratory signals propagated by substrate. This kind of communication is well known in academic world and has been used for studies of several insect's orders. The true bugs (Heteroptera: Pentatomidae), use vibratory communication in reproductive behaviour emitting signals that carry information about species, mate location, sex and receptivity. Until now studies of vibratory communication of Pentatomidae has been oriented, principally, to basic aspect like: species signal repertory identification, comparison of signals of different species or populations from different geographic regions, identification of biological functions of each signal and mechanisms of directional movements of bugs mediated by signals. However, total comprehension of vibratory communication offer great perspective for their utilization in pest management through the development of methodologies and techniques for monitoring and/or pest control. This work reports all basic aspects of vibratory communication in pentatomids focusing techniques, equipments, experimental procedures and methodologies, adapted for studies of insect behaviours and used in the Laboratory of Bioecology and Semiochemicals of Insects of Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Sumário

Metodologias para estudo da comunicação vibracional de insetos e sua aplicação ao manejo de pragas	9
Introdução	9
Metodologias Aplicadas	11
Insetos	11
Condições da sala de trabalho	11
Registro dos sinais vibracionais.....	12
Procedimentos experimentais	14
Análise dos sinais registrados	15
Reprodução de sinais.....	21
Conclusões e perspectivas.....	27
Agradecimentos.....	28
Referências Bibliográficas	28

Metodologias para estudo da comunicação vibracional de insetos e sua aplicação ao manejo de pragas

Raúl Laumann
Maria Carolina Blassioli Moraes
Andrej Čokl
Miguel Borges

Introdução

A emissão de sinais vibracionais através de substratos pelos insetos já é conhecida há muito tempo (início da década de 1960). Mas somente a partir do final da década de 1980, com os primeiros relacionando sinais vibracionais e comportamentos específicos de insetos, percebeu-se que esses sinais poderiam ter uma importante função desencadeando ou modulando comportamentos dos insetos Čokl e Virant-Doberlet (2003).

Estes sinais são produzidos pela vibração de alguma parte do corpo do inseto e é propagada pelo substrato, geralmente plantas. O sinal é recebido e detectado por receptores localizados nas patas, chamados de scolopidia.

Nos insetos, os sinais vibracionais, assim como a comunicação sonora, têm diversas funções como, por exemplo, comunicação de parceiros durante a etapa reprodutiva, marcação de território ou defesa (VIRANT-DOBERLET e ČOKL, 2003).

Entre os insetos que se comunicam através de sinais vibracionais encontram-se os percevejos (Pentatomidae). Para estes insetos a função proposta para a comunicação vibracional é a de intervir durante a etapa reprodutiva onde atuam na troca de informação entre os indivíduos, quando estes se encontram a distâncias moderadas (1 a 2 metros) ou curtas (poucos centímetros ou contatos físicos). Os insetos recebem e enviam informação a respeito do sexo do inseto que está “cantando”, receptividade para a cópula e localização (ČOKL e VIRANT-DOBERLET, 2003).

Em geral, os sinais vibracionais de percevejos são produzidos por vibração dos primeiros escleritos abdominais, movimentados por músculos especiais. Esta vibração se transmite através das patas, que atuam como “molas”, para propagar o sinal para as plantas. Os sinais gerados, por este mecanismo, são de baixa frequência, na faixa de 50 a 200 Hz, com a maior parte dos sinais ficando em torno de 100 Hz (ČOKL e VIRANT-DOBERLET, 2003).

Estudos têm mostrado que as frequências e as propriedades espectrais, na quais são emitidos os sinais, estão precisamente ajustadas para uma ótima transmissão dos mesmos através dos tecidos das plantas (MIKLAS et al., 2001).

Čokl e Virant-Doberlet (2003) demonstraram que sinais de fêmeas podem transmitir-se, sem atenuação, por distâncias maiores que 2 metros e, ainda nestas distâncias, os machos podem responder a estes sinais, garantindo uma perfeita comunicação em distâncias consideráveis.

O tipo de vibração que os pentatomídeos emitem pode ser dividido em duas categorias 1- sinais de chamamento para comunicação de médio-alcance, através dos quais machos e fêmeas iniciam a comunicação e 2- sinais de acasalamento para reconhecimento e atração a curta distância (MIKLAS et al, 2003). Existem também sinais de rivalidade que são produzidos quando dois machos disputam uma fêmea.

Outro aspecto fundamental da comunicação vibracional em percevejos é o alto grau de especificidade dos sinais emitidos. A partir dos trabalhos pioneiros de Cokl et al. (1972, 1978), a comunicação por este tipo de sinais tem sido descrita para várias espécies de percevejos e para diferentes populações da mesma espécie (ver referências em ČOKL e VIRANT-DOBERLET, 2003 e VIRANT-DOBERLET e ČOKL, 2004). Recentemente, Moraes et al. (2005a) descreveram os sinais vibracionais de quatro espécies que ocorrem no Brasil, *Thyanta perditor* (F.), *Acrosternum impicticorne* (Stål), *Piezodorus guildinii* (Westwood) e *Euschistus heros* (F.).

A informação disponível até o momento permite indicar que cada espécie analisada emite um padrão característico de sinais reconhecíveis pelas suas variações físicas (frequência dominante e subdominantes, amplitude dos picos de frequência, etc.) e, principalmente, temporais (duração dos pulsos, tempo de repetição, número de pulsos numa seqüência, etc.). Esta especificidade pode estender-se até para populações da mesma espécie. MIKLAS et al. (2003), mostraram que machos de *N. viridula* de populações da França e de Guadalupe preferem os sons emitidos pelas fêmeas da mesma região geográfica. Esta espécie apresenta um amplo padrão de variação nos sinais emitidos por indivíduos de populações de diferentes regiões (VIRANT-DOBERLET e ČOKL, 2004).

Esta elevada especificidade na comunicação vibracional pode ser um dos pontos chave na comunicação reprodutiva de percevejos e tem sido proposto como mecanismo de isolamento reprodutivo em *Thyanta pallidovirens* e *Thyanta custator acerra* (MCBRIEN et al., 2002). Estas duas espécies neárticas apresentam a mesma mistura feromonal, inclusive quantitativamente, mas emitem um complexo de sinais vibracionais diferente.

A despeito dos avanços realizados nesta área, ainda existem vários aspectos da comunicação vibracional que precisam ser estudados, especialmente aqueles orientados a estabelecer a relação entre: os comportamentos de atração, acasalamento e cópula com os diferentes sinais vibracionais observados, a interação entre feromônios sexuais e sinais vibracionais e a importância relativa de cada um destes sinais (químicos e físicos) nas diferentes etapas do comportamento reprodutivo de pentatomídeos.

Essas informações são importantes para uma completa compreensão da reprodução de percevejos e dos sinais envolvidos, o que pode auxiliar no desenvolvimento de novas metodologias de manejo de pragas através da

utilização de sinais químicos (feromônios) e físicos (sons vibracionais) para monitoramento e/ou controle.

Neste trabalho serão apresentadas as metodologias adaptadas e desenvolvidas no Laboratório de Bioecologia e Semioquímicos de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, para registro e análise da comunicação vibracional de insetos, equipamentos utilizados e alguns exemplos dos resultados dos estudos desenvolvidos até o momento.

Metodologias Aplicadas

Insetos

Para estudo dos sinais vibracionais é importante dispor de insetos com idade conhecida e no mesmo estado fisiológico. Desta maneira, o material biológico será homogêneo, excluindo variáveis que podem complicar a análise posterior dos sinais registrados. No presente estudo os insetos utilizados provem de colônias de laboratório mantidas em salas climatizadas a 26.0 ± 0.5 °C e 65 ± 10 % UR.

Os insetos são alimentados com sementes de girassol (*Helianthus annuus* (L.)), grãos soja (*Glycine max* (L.) Merrill.), amendoim cru (*Arachis hypogaea* (L.)) e vagem (*Phaseolus vulgaris* (L.)). Para algumas espécies, a dieta é complementada com buquê de ramos com flores e frutos de plantas “invasoras”, picão (*Bidens pilosa*), falso boldo (*Boldea fragans*) e soja perene (*Glycine wightii*).

Estudos anteriores sobre o comportamento de pentatomídeos, como por exemplo, *E. heros*, mostraram que estes apresentam comportamento reprodutivo durante todo o período de fotofase (8:00 às 18:00 hs) (BORGES et al. 1998a, COSTA et al. 1998, 2000). Mas os maiores índices de acasalamento e cópula ocorrem no final da tarde, após às 15:00 horas. Dessa maneira os experimentos para registro de sinais vibracionais são conduzidos neste período, ou bem os insetos são pré-condicionados através de inversão do ciclo fotofase/ escotofase.

Os insetos utilizados são sexualmente maduros (10 a 15 dias de idade adulta, dependendo da espécie) e virgens. Para evitar qualquer interferência de outros sinais, após atingirem a idade adulta, os insetos são separados por sexo e mantidos em salas de criação diferentes até o momento de serem utilizados nos experimentos.

Condições da sala de trabalho

Para registro de sinais de baixa frequência é muito importante dispor de uma sala com isolamento acústico e livre de sinais (elétricas ou magnéticas) que possam interferir durante o processo de captura e gravação. Desta maneira, é importante que a sala esteja isolada de quadros de luz, centrais telefônicas, redes de computadores, entre outros.

No nosso laboratório, além destas precauções, as arenas para registro dos sinais vibracionais são colocadas numa caixa de madeira (80 x 80 x 80 cm) revestida internamente de espuma (espessura de 3 cm) (Figura 1).

A situação ideal para captura de sinais vibracionais sem interferências é a localização das arenas, onde os insetos serão colocados sobre uma superfície rígida (prancha de concreto ou granito), apoiada sobre câmaras de pneus com ar¹, este sistema está em fase de adaptação no Laboratório de Bioecologia e Semioquímicos de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

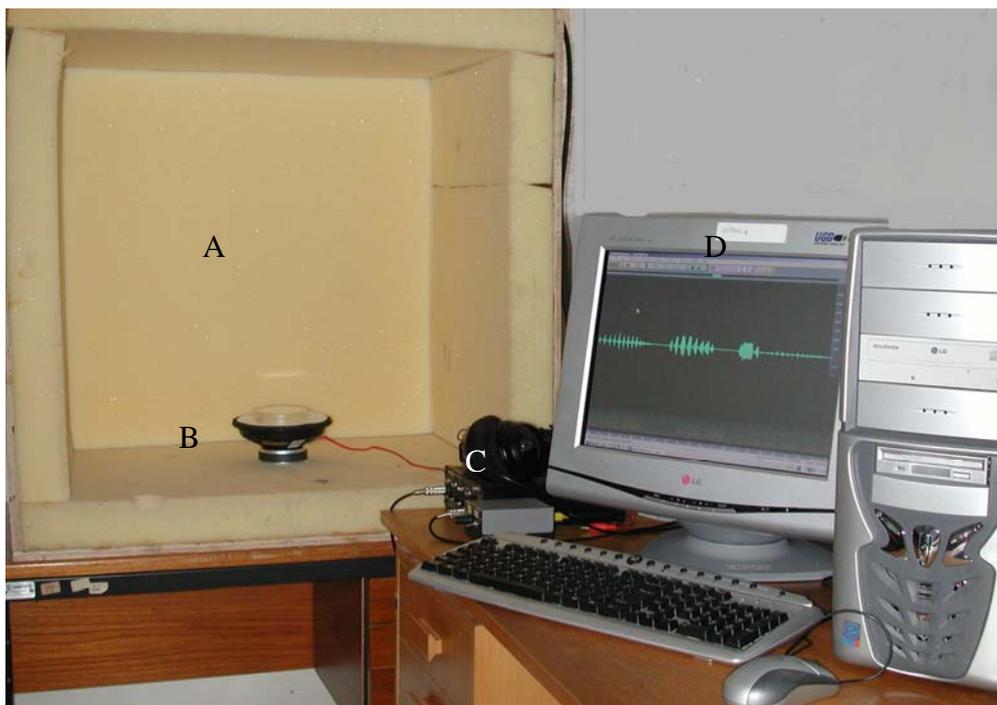


Figura 1. Aspecto Geral da sala de registro de sinais vibracionais do Laboratório de Bioecologia e Semioquímicos de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A- caixa para isolamento acústico, B- Arena de gravação, C- Amplificador e consola da placa de captura de som, D- Computador com placa de captura para digitalização dos sinais capturados, pode observar-se na tela o oscilograma de um sinal capturado e digitalizado.

Registro dos sinais vibracionais

Para capturar os sinais vibracionais, os insetos são colocados em arenas de estudo formadas por uma cápsula plástica (no caso de percevejos pode ser o fundo de uma placa de Petri plástica de 9 cm de diâmetro) que possui um dos seus extremos abertos. Este extremo é colocado, invertido, acima de uma membrana formada por papel de filtro e a arena é apoiada sobre um alto-falante, que atua como receptor das vibrações emitidas (Figura 2). Para evitar que o inseto se movimente pelas paredes laterais da arena, pode-se colocar vaselina inodora.

¹ A. Cokl, comunicação pessoal, 2005.



Figura 2. Arena para registro de sinais vibracionais. A- Vista lateral da arena montada sobre um alto-falante (1- membrana de papel filtro, 2- base de uma placa de Petri plástica de 9 cm de diâmetro. B- Vista superior da arena contendo dois indivíduos de *Acrosternum impicticorne*. Ao lado, detalhe do amplificador “home-made”.

Os insetos são liberados na arena que apresenta a vantagem de, além de permitir o registro das vibrações emitidas, possibilitar a observação e registro dos comportamentos desenvolvidos pelos insetos.

O alto-falante utilizado na captura de sinais de percevejos, e que melhor tem funcionado nas condições de estudo, é um de baixa frequência de resposta 40-1.200 Hz, impedância de 8 Ω , diâmetro da membrana 10 cm (Radioshack, Taiwan).

Os sinais emitidos pelos insetos são capturados na membrana do alto-falante, amplificados por um amplificador “home-made” (Figura 2B), que funciona com um amplificador operacional TL081CN (STMicroelectronics) e uma bateria de 9V, digitalizados por uma placa de som (Aardvark-Direct Pro 24/96) e armazenados num computador através do software Coll Edit Pro (Syntrillium Software 2001). Durante este processo, os sinais podem ser monitorados em tempo real, após a amplificação, através de fones de ouvido e, visualmente, através do registro no computador dos oscilogramas dos sinais emitidos (Figura 3)

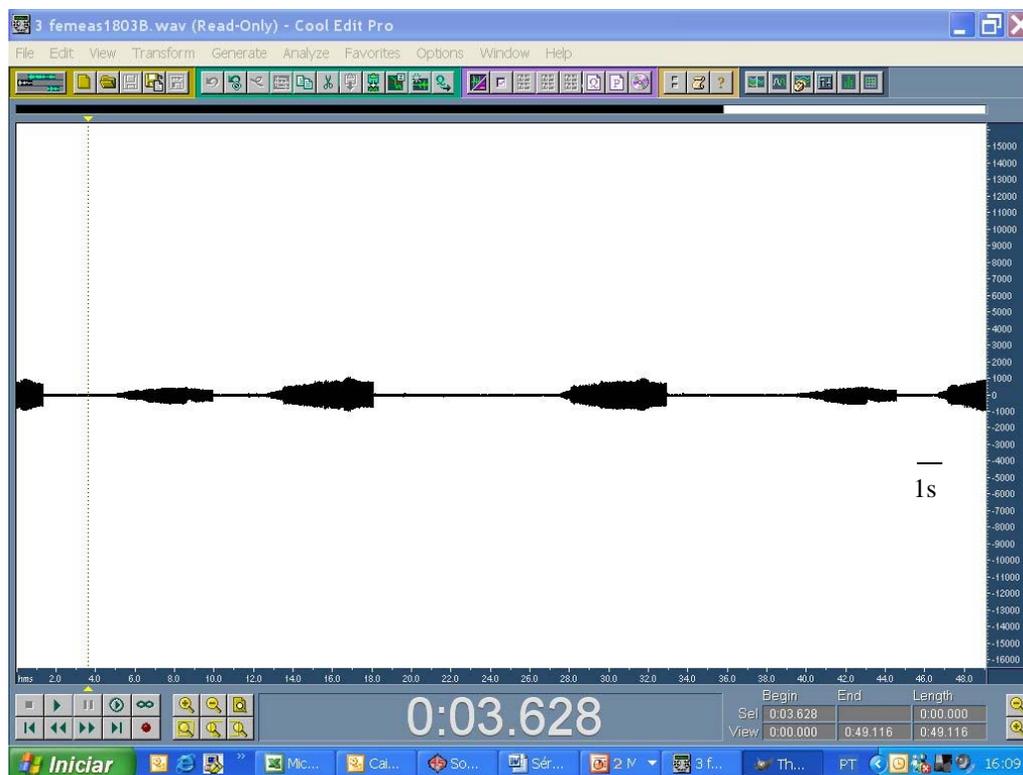


Figura 3. Acompanhamento em tempo real dos sinais vibracionais de uma fêmea de *Piezodorus guildinii*. Na figura se observa o oscilograma de quatro pulsos completos do Canto 1 (CF1) (MORAES et al., 2005a) da forma como aparecem na tela do computador ao serem registrados pelo programa Cool Edit Pro. A linha indica a escala temporal (1 segundo) e a janela central inferior o tempo total do registro na tela.

Os sinais assim registrados são armazenados em arquivos sonoros (wav) os que podem ser reproduzidos posteriormente com diferentes softwares comerciais, no nosso caso é utilizado o software Sound Forge 4.5 (Sonic Foundry 2000) tanto para reprodução como para análise de diferentes parâmetros físico-temporais dos sinais.

Durante a etapa de registro dos sinais vibracionais, é muito importante a observação e caracterização dos comportamentos que os insetos desenvolvem. Desta maneira é possível estabelecer a correlação entre o sinal emitido e um comportamento específico, e assim desvendar a sua função biológica. Para isto durante o processo de captura de sinais os insetos são acompanhados e todos os seus comportamentos registrados em um caderno de laboratório. No caso específico do comportamento reprodutivo de percevejos os comportamentos são caracterizados seguindo o trabalho de Borges et al. (1987).

Procedimentos experimentais

Os insetos são introduzidos seguindo uma seqüência previamente estabelecida, que consiste em manter inicialmente uma fêmea e posteriormente

um macho, em forma individual, na arena, por um período de 10 minutos. Nesta etapa é possível registrar os sinais vibracionais de cada sexo, sem interferência de outros sinais como químicos e visuais. Posteriormente, macho e fêmea são colocados juntos na arena, impossibilitados de ter contato físico ou visual através de uma membrana de papel cartolina que divide a arena em duas partes.

Após o registro dos sinais emitidos nestas condições a membrana é retirada para permitir o contato físico e visual entre os insetos. Os insetos são mantidos na arena até que realizam a cópula, aqueles insetos que não copulam são retirados da arena após um período de 10 minutos sem emissão de sinais e/ou sem comportamentos de acasalamento ou cópula evidentes. Estes procedimentos podem variar segundo a biologia da espécie considerada e o objetivo geral do experimento a ser desenvolvido.

Análise dos sinais registrados

Os arquivos sonoros digitais são analisados utilizando o software Sound Forge. Previamente à análise, os sinais são depurados utilizando o equalizador gráfico ou paramétrico do programa ou uma das opções de filtros, FFT ou similar, para retirar qualquer sinal indesejado (por exemplo ruído de 60 Hz originado por redes elétricas)

Os sinais emitidos pelos insetos podem ser analisados considerando: pulsos, cadeias de pulsos e canções. Um **pulso** é definido como uma unidade dentro de uma série de unidades similares, uma **cadeia de pulsos** é um grupo de pulsos com características específicas de forma e seqüência e uma **canção** é constituída de uma seqüência de pulsos ou cadeias de pulsos com início e fim. (COKL e VIRANT-DOBERLET, 2003) (Figura 4).

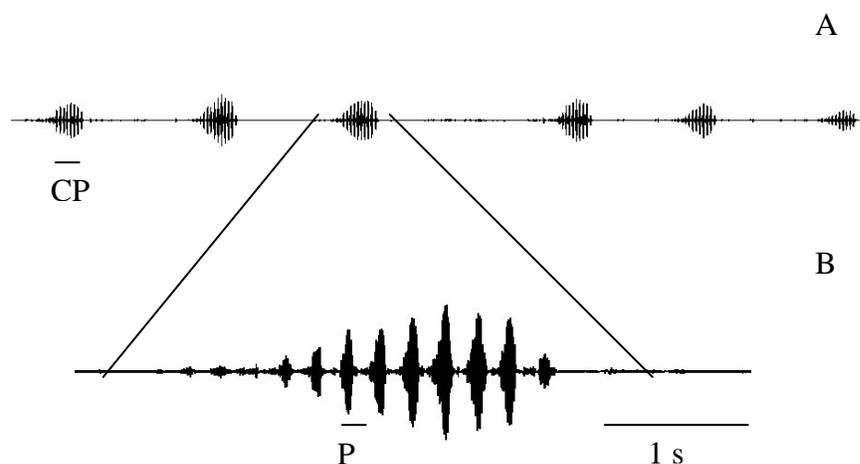


Figura 4. Oscilogramas do canto 2 do macho (CM-2) de *Acrosternum impicticorne* (segundo MORAES et al., 2005a). A- seqüência de cadeias de pulsos numa canção. B- detalhe de uma cadeia de pulsos onde podem individualizar-se 9 pulsos. A linha indica a escala temporal da figura B. CP= cadeia de pulsos, P= pulso individual.

Utilizando o software acima citado podem-se gerar espectros de frequência e sonogramas que permitem obter os parâmetros físicos de pulsos e cadeias de pulsos como: frequência dominante, picos de frequências subdominantes, largura espectral com 20 dB abaixo do valor de frequência dominante e modulação de frequência (diferença de frequência por tempo do sinal, Hz/s) (Figura 5) (Tabela 1). As características temporais dos pulsos/cadeias de pulsos como duração e tempo de repetição (tempo entre o início de um pulso ou cadeia de pulsos e o início do pulso/cadeia de pulsos seguinte) e duração de uma cadeia e/ou canção também são consideradas para caracterizar os sinais emitidos (Tabela 1).

As canções são classificadas na seqüência em que foram registradas como canções da fêmea 1, 2. (CF-1, CF-2,...), canções do macho (CM-1, CM-2, ...) e canções de rivalidade MRS (Figura 5)

Os dados são apresentados como médias e desvio-padrão dos parâmetros avaliados junto com o número de sinais analisados (n) e o número de indivíduos (N) dos quais os sinais foram obtidos.

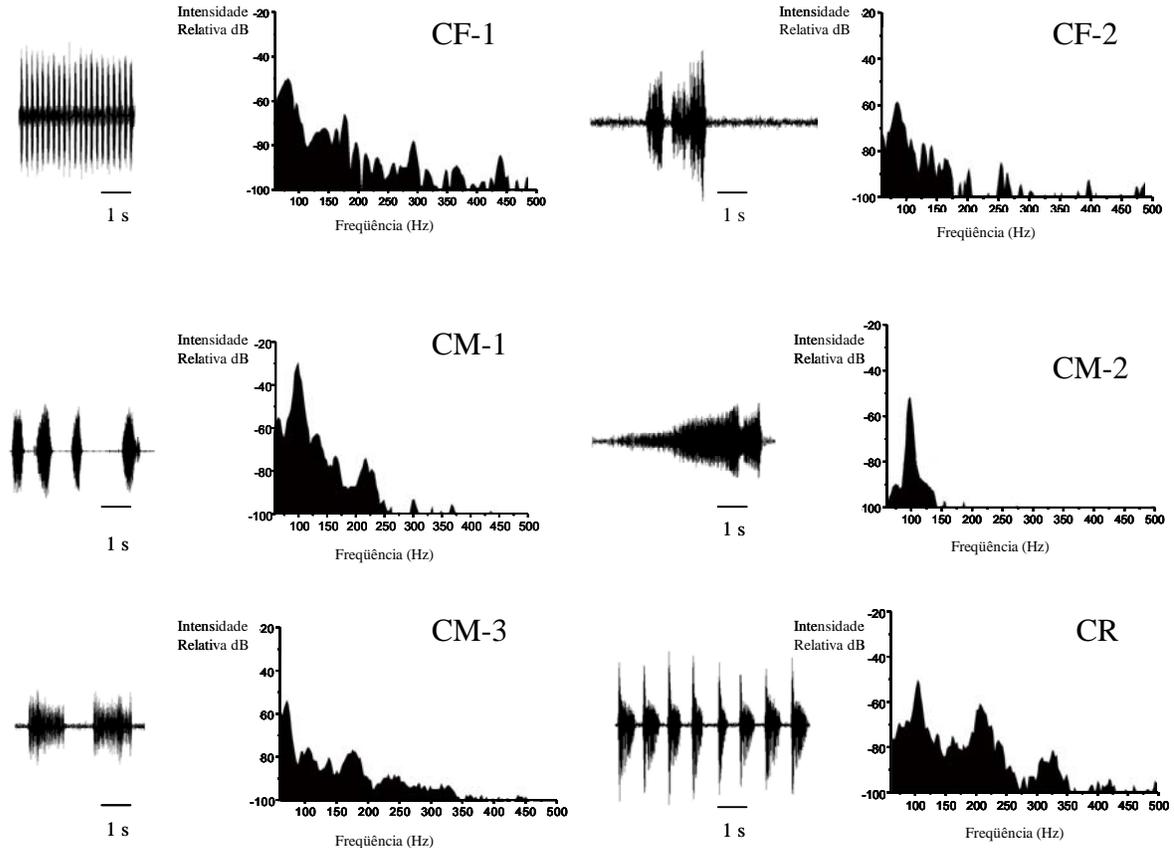


Figura 5. Oscilogramas e espectros de frequências de canções emitidas durante o comportamento reprodutivo de *Thyanta perditor*. CF= canção da fêmea, CM= canção do macho, CR= canção de rivalidade. Notar a clara diferenciação temporal e dos espectros de frequência dos pulsos emitidos.

Tabela 1. Duração, Tempo de repetição, Pulsos por cadeia de pulsos e frequência dominante dos pulsos das canções emitidas por *Thyanta perditor* durante seu comportamento reprodutivo.

Canção		Duração (ms)	Tempo de Repetição (ms)	P/CP	Frequência dominante dos Pulsos (Hz)
CF-1	CP	13410±1944 (52/7)	18810±2343 (52/7)	34±21 (52/7)	-
CF-2	P	210±40 (117/7)	370±50 (100/6)	-	79±6 (117/7)
	P	710±290 (73/4) ^C A	1897±1102 (44/4) ^C A		83±4 (81/4) ^C A
		1462±630 (14/4) ^L B	3166±1762 (14/4) ^L B		84±4 (14/4) ^L A
CM-1	CP	7100±696 (27/7)			
	P	534±210 (106/6)	959±110 (106/6)		110±11 (106/6)* A 122±15 (21/1)** B
CM-2	P	3390±990 (40/7)* A 4490±1290 (8/1)** B			109±12 (40/8)
CM-3	CP	2110±460 (138/12)	5290±1380 (138/12)		70±7 (138/12)
CR	P	680±50 (53/4)	1250±360 (53/4)		102±6 (53/4)

Referências: ms= milissegundos, C: pulso curto, L=pulso longo, * inseto emitindo sinais vibracionais sozinho, ** inseto emitindo sinais vibracionais em dueto com um indivíduo de outro sexo, CF= canção de fêmea, CM=canção de macho, CR= canção de rivalidade, CP= cadeia de pulsos, P= pulso. Os números entre parênteses indicam o número de pulsos ou cadeias de pulsos considerados/número de indivíduos considerados. Os valores seguidos por letras maiúsculas diferentes, em cada canto e parâmetro considerado, são significativamente diferentes (Teste de Mann-Whitney $p < 0,05$).

Além de caracterizar os sinais emitidos, a observação simultânea dos insetos durante o registro permite relaciona-los com os diferentes comportamentos, o que permite identificar a função biológica dos mesmos. Na Figura 6 observa-se um etograma do comportamento reprodutivo de *Thynata perditor* no qual foram inseridos os sinais vibracionais emitidos por machos e fêmeas em cada etapa. A Tabela 2 apresenta uma análise quantitativa da emissão destes sinais.

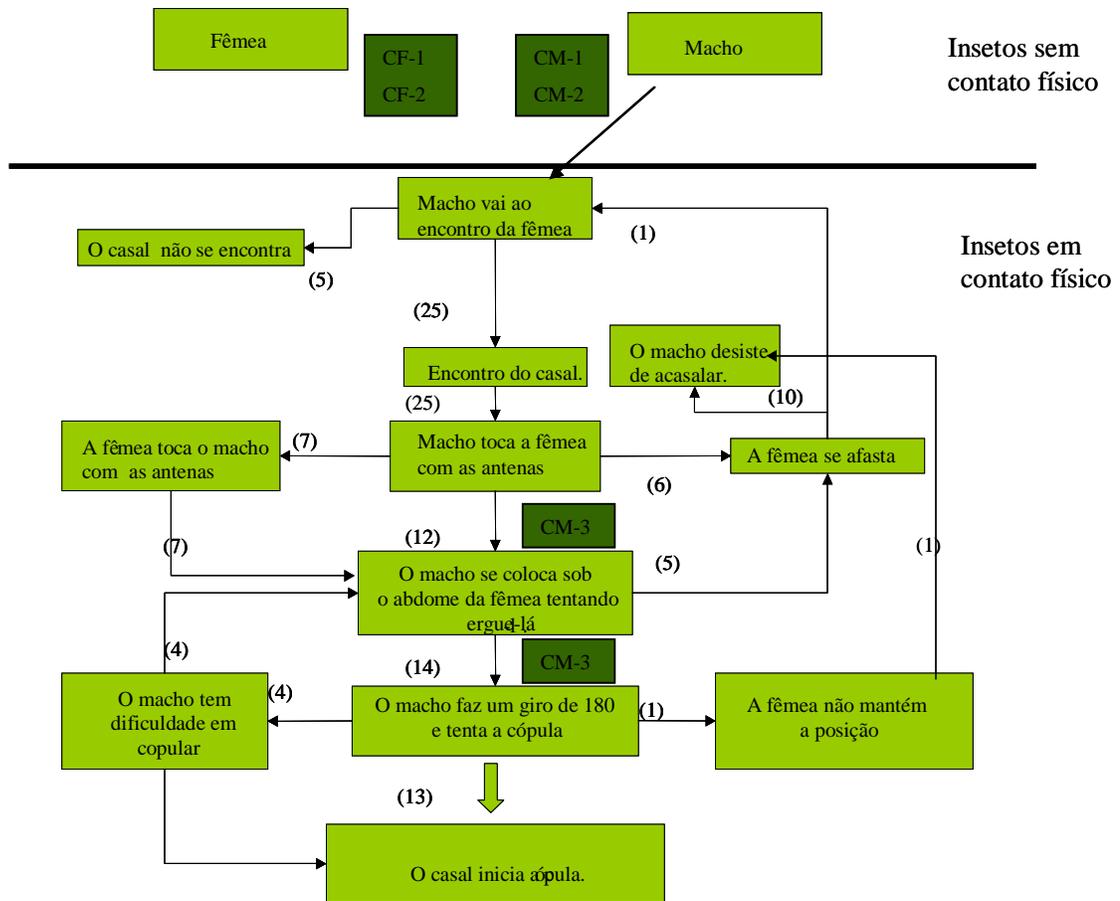


Figura 6. Etiograma dos comportamentos reprodutivos de machos e fêmeas de *T. perditor* (os valores entre parênteses representam o número de insetos que desempenharam cada atividade, n= 30 casais observados). Os quadros em verde escuro indicam o tipo de sinal vibracional emitido pelos insetos de cada sexo durante a seqüência de comportamentos.

Tabela 2. Comportamento de cópula do *T. perditor* correlacionado com os estímulos vibracionais.

Estimulo Vibracional	Número Total (N=30 casais)	Corte	Cópula
Casais que não emitiram estímulos	07	0	0
Casais que emitiram estímulos	23	15	13
Canto seqüenciado (chamamento + acasalamento).	08	07	06
Somente chamamento.	09	03	01
Somente acasalamento	06	05	06

Esta análise permite caracterizar os cantos CF-1, CF-2, CF-3 e CF-4, emitidos durante a fase em que os insetos estão separados fisicamente, como cantos de chamamento, com função de transmitir informação sobre localização física, sexo, espécie e receptividade para a cópula do emissor. O canto CF-3 pode ser caracterizado como canto de acasalamento, emitido pelo macho durante o comportamento de acasalamento prévio à cópula.

Além disto, a informação da Tabela 2 mostra que, para um completo sucesso reprodutivo, os insetos precisam emitir os dois tipos de canto, sendo o de acasalamento fundamental para atingirem a cópula. Os casais que não emitiram nenhum tipo de sinal vibracional ou que somente emitiram o sinal de chamamento mostraram freqüência de acasalamento extremamente baixa (0/7 sem emissão de sinais e 1/9 emitindo somente cantos de chamamento).

Em muitos casos as canções podem ser emitidas em duetos (machos com fêmeas ou machos com machos) e, nestes casos, pulsos ou cadeias de pulsos típicos de cada canção podem ser emitidos intercalados com pulsos ou cadeias de pulsos de outras canções ou de canções do outro indivíduo participando do dueto (Figura 7).

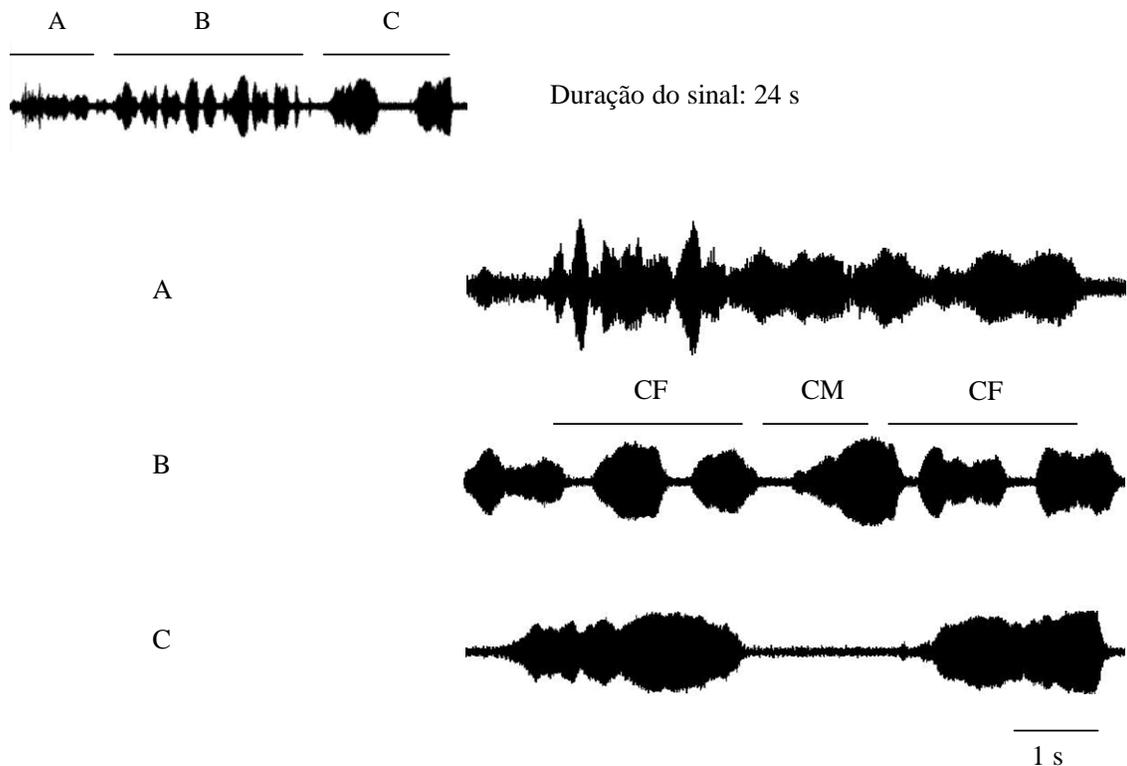


Figura 7. Sinais vibracionais em dueto de macho e fêmea de *Euschistus heros*. A= parte do sinal com macho e fêmea cantando juntos. B= parte do sinal com pulsos de macho e fêmea intercalados, C= parte final do sinal com pulsos do macho (CM-2, segundo MORAES et al, 2005a). CF= canto da fêmea, CM= canto do macho.

Os parâmetros obtidos podem ser submetidos a análises estatísticas padrão como testes de comparação de médias ou análise de variância (ANOVA), entre outros, para estabelecer o nível de significância entre os diferentes cantos de um indivíduo, entre cantos de diferentes indivíduos, entre cantos de indivíduos em diferentes situações (por exemplo, cantando sozinho ou em dueto, ver Tabela 1) ou entre cantos de diferentes espécies de insetos (Tabela 3). A análise da Tabela 3 mostra que os sinais podem ser facilmente caracterizados através da comparação destes parâmetros, indicando elevada especificidade na comunicação vibracional dos Pentatomidae.

Tabela 3. Exemplo de comparação intraespecífica (fêmea e macho) e interespecífica (diferentes espécies) de diferentes sinais vibracionais de Pentatomidae. Média dos parâmetros \pm DP.

Espécie	Canção	Duração do Pulso (ms)	Tempo de repetição (ms)	Frequência Dominante (Hz)
<i>Acrosternum impicticorne</i>				
	CF-1	112 \pm 11 A n=159	960 \pm 79 A n=89	100 \pm 5 A n=78
	CM-1	280,00 \pm 12,00 B n=50	410 \pm 23 B n=50	94 \pm 6 C n=57
<i>Piezodorus guildinii</i>				
	CF-1	4908 \pm 641 C n=70	NM	168 \pm 10 D n=35
	CM-1	24 \pm 5 D n=45	30 \pm 8 C n=45	117 \pm 10 E n=45
<i>Thyanta perditor</i>				
	CF-1	210 \pm 40 B n=117	370 \pm 50 D n=100,00	79 \pm 6 F n=117,00
	CM-1	522 \pm 176 E n=127	959 \pm 411 A n=90	122 \pm 15 G n=21

Referências: CF= canção de fêmea, CM=canção de macho, NM= parâmetro não medido. Os valores médios em cada coluna seguidos por diferente letra maiúscula indicam diferenças significativas (ANOVA $F_{5,562}= 4664,0$ $p<0,001$ para Duração do pulso, $F_{4,369}=260,28$ $p<0,001$ para tempo de repetição e $F_{5,347}=804,9$ $p<0,001$ para Frequência dominante, comparação de médias Teste Student Newman-Kuels $p<0,05$). Todos os parâmetros considerados são de pulsos individuais e emitidos por insetos colocados em forma individual na arena de registro de sinais vibracionais. Nos casos nos que os cantos apresentam pulsos longos e curtos, foram considerados somente os parâmetros de pulsos curtos.

Reprodução de sinais

A reprodução dos sinais vibracionais registrados pode ser necessária para diferentes experimentos, como por exemplo, investigar a influência de uma canção na emissão de canções por outros indivíduos ou determinar a maneira como um sinal pode influenciar na movimentação dos insetos.

Para isto, é necessário reproduzir os sinais com as mesmas características físicas com que o sinal é emitido pelo inseto, isto é, mesma frequência, intensidade e temporalidade evitando distorções. Para reprodução dos arquivos sonoros, é utilizado o software Sound Forge. Os sinais reproduzidos são amplificados, para poder controlar precisamente a intensidade do sinal emitido, e

posteriormente, emitidos através de um alto-falante, com as mesmas especificações que as descritas acima.

Tratando-se de sinais vibracionais, a reprodução dos mesmos requer a transmissão destas vibrações para as superfícies a serem utilizadas durante os experimentos. Para isto podem ser utilizados diferentes materiais acoplados a alto-falantes para transmitir as vibrações. No trabalho que vem sendo desenvolvido no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia, após experimentação com diferentes materiais tem se optado por cones de polietileno (50 mm altura x 5.5 mm base) e arames de aço-carbono. Os cones plásticos são colados no centro do alto-falante utilizando adesivo instantâneo ou massa de modelar, os arames de aço carbono são encaixados na membrana do alto-falante ou se aderem utilizando fita crepe. Com estes materiais e disposição é possível obter excelentes resultados na transmissão dos sinais (Figura 8 e Figura 9).

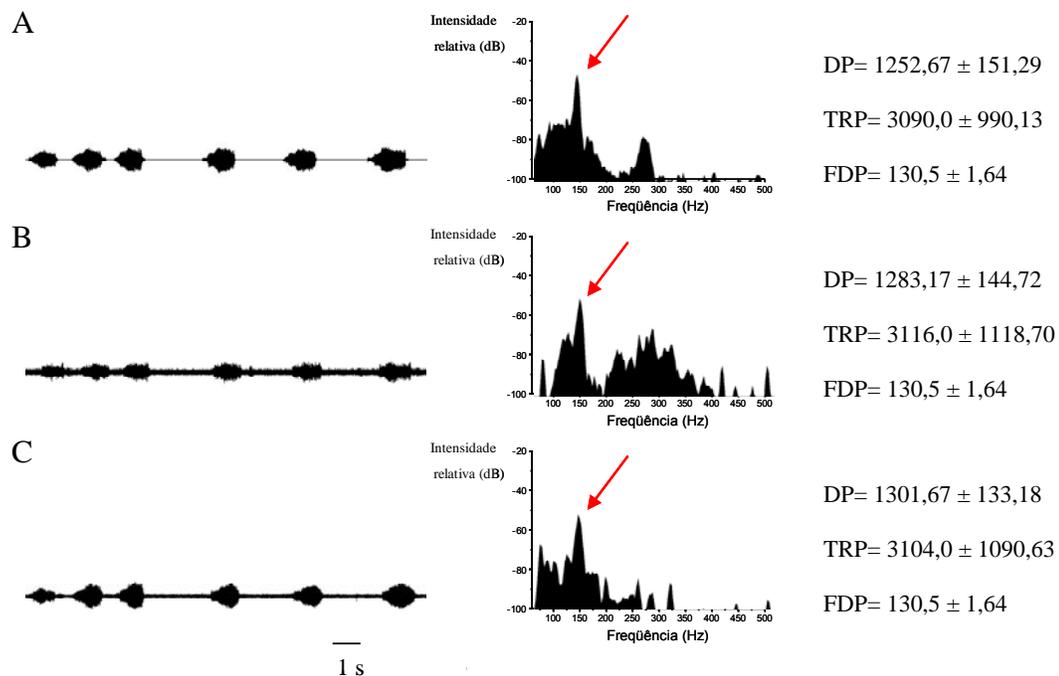


Figura 8. Oscilogramas, espectro de freqüências de um pulso e parâmetros ($X \pm DP$) do canto 1 (CF – 1 segundo Moraes et al., 2005a) de *Euschistus heros* transmitido por um alto-falante e um cone de plástico (B) e por um alto-falante e um fio de aço-carbono (C) para a membrana de um alto-falante a partir do qual foram registrados. As características físicas e temporais do registro original se mostram em A. DP= Duração do pulso (em milisegundos), TRP= tempo e repetição dos pulsos (em milisegundos), FDP= freqüência dominante do pulso (em Hz). As setas vermelhas nos espectros de freqüência mostram o pico de freqüência dominante. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os parâmetros considerados (ANOVA $F_{2,15}=0,18$ $p_{0,84}$ para DP e $F_{2,12}=0,00074$ $p=0,99$ para TRP).

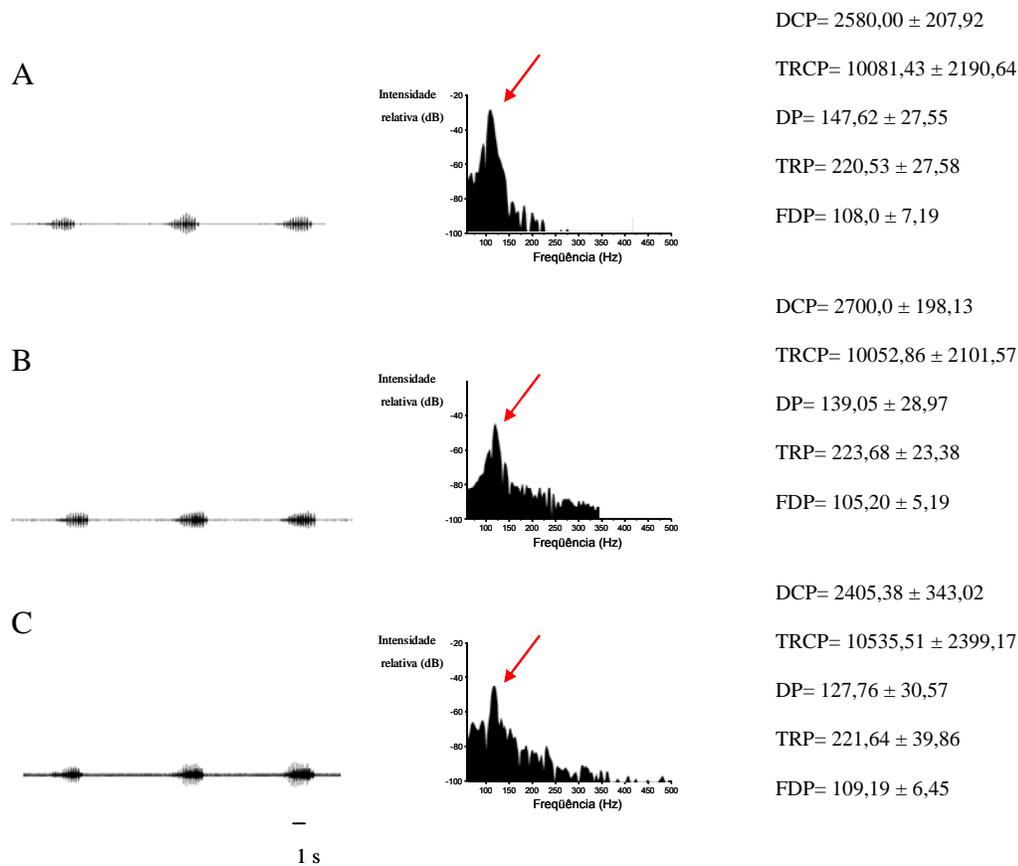


Figura 9. Oscilogramas, espectro de freqüências de um pulso e parâmetros ($X \pm DP$) do canto 1 (CM – 2 segundo MORAES et al., 2005a) de *Acrosternum impicticonre* transmitido por um alto-falante e um cone de plástico (B) e por um alto-falante e um fio de aço-carbono (C) para a membrana de um alto-falante, a partir do qual foram registrados. As características físicas e temporais do registro original se mostram em A. DCP= Duração da cadeia de pulsos (em milisegundos), TRCP= tempo de repetição da cadeia de pulsos (em milisegundos), DP= duração do pulso (em milisegundos), TRP= tempo de repetição dos pulsos (em milisegundos) FDP= freqüência dominante do pulso (em Hz). As setas vermelhas nos espectros de freqüência mostram o pico de freqüência dominante. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os parâmetros considerados (Kruskal-Wallis $H=4,66$ $gl=2$ $p=0,10$ para DCP, Kruskal-Wallis $H=0,36$ $gl=2$ $p=0,84$ para TRCP, ANOVA $F_{2,94}=2,94$ $p=0,06$ para DP, ANOVA $F_{2,54}=0,05$ $p=0,95$ para TRP e ANOVA $F_{2,60}=2,21$ $p=0,12$ para FDP).

Simultaneamente à reprodução do som, é possível gravar a emissão destes sinais e/ ou a resposta emitida pelo inseto, utilizando um dispositivo similar colocado em outra parte das superfícies em teste. Os sinais reproduzidos e os emitidos pelos insetos podem ser registrados, o que permite avaliar a maneira como estes sinais se modificam na passagem pelas superfícies e/ou a resposta de um inseto ao som reproduzido.

A reprodução de sinais vibracionais pode ser utilizada em duas situações: 1- para transmitir sinais através de plantas e 2- para transmitir sinais através de superfícies artificiais em arenas de experimentação.

Os sinais retransmitidos através de plantas se utilizam para estudar a forma em que estes se propagam pelo substrato e como estes modificam os comportamentos de insetos nelas presentes.

A retransmissão de sinais através de plantas esta sendo utilizada, também, para estudar a influência de sinais vibracionais no comportamento de busca de hospedeiros do parasitóide *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae). Neste caso foi estudada a influência de sinais vibracionais do repertório de canções do percevejo-marrom *E. heros*. Os sinais previamente registrados foram reproduzidos, com a metodologia acima descrita, em plantas de feijão com duas folhas verdadeiras totalmente expandidas (Figura 10). Estas plantas fornecem um excelente sistema de experimentação, já que permitem emitir sinais numa das folhas (tratamento) deixando a folha oposta como controle. Na área de ramificação no caule principal se estabelece uma área de escolha para a movimentação dos insetos.

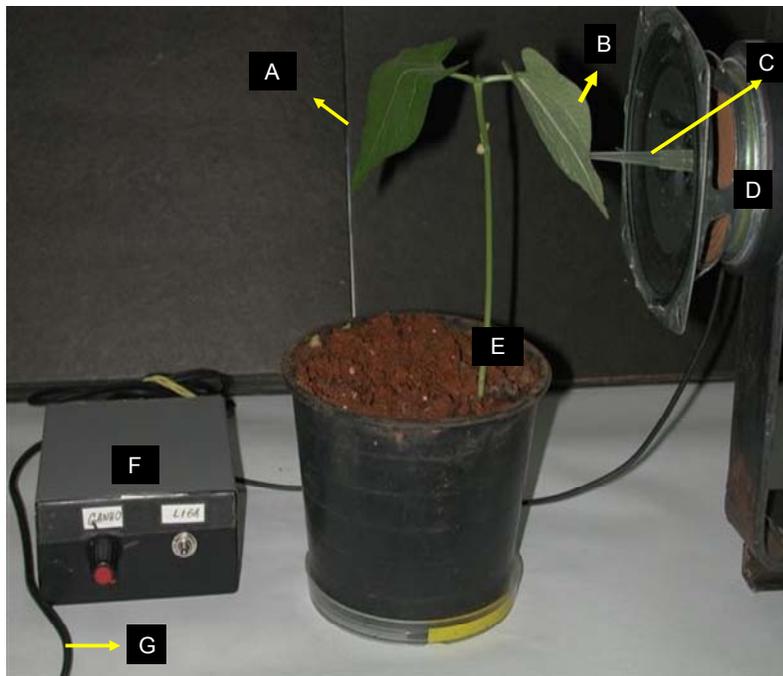


Figura 10. Dispositivo utilizado para bioensaios em plantas com transmissão de sinais vibracionais. A- folha da planta sem vibrações (area controle), B- folha da planta recebendo vibrações (area tratamento), C- cone de plástico, D- alto-falante para reprodução dos sinais, F- amplificador, G- conexão para o computador.

Fêmeas de *T. podisi* (24-48 hs. de idade adulta e sem experiência de oviposição) foram colocadas no base do caule das plantas e seus movimentos observados e registrados durante um período de 10 minutos. Os resultados dos experimentos realizados até o momento permitem indicar que o parasitóide é atraído preferencialmente pelos sinais vibracionais das fêmeas (Figura 12 A e B). Os mesmos procedimentos experimentais foram utilizados para estudar o comportamento do parasitóide em uma arena de dupla escolha construída com uma prancha de acrílico em formato de “Y”. Para reproduzir os sinais, o piso da arena foi revestido com uma base de isopor (4 mm) sobre o qual é adaptada uma membrana de polipropileno a que é ligada, através de fios de cobre, à membrana de um alto falante (Figura 11). Os resultados dos experimentos com *T. podisi* nesta arena mostram a mesma tendência que os resultados obtidos em plantas (Figura 12 A e B).

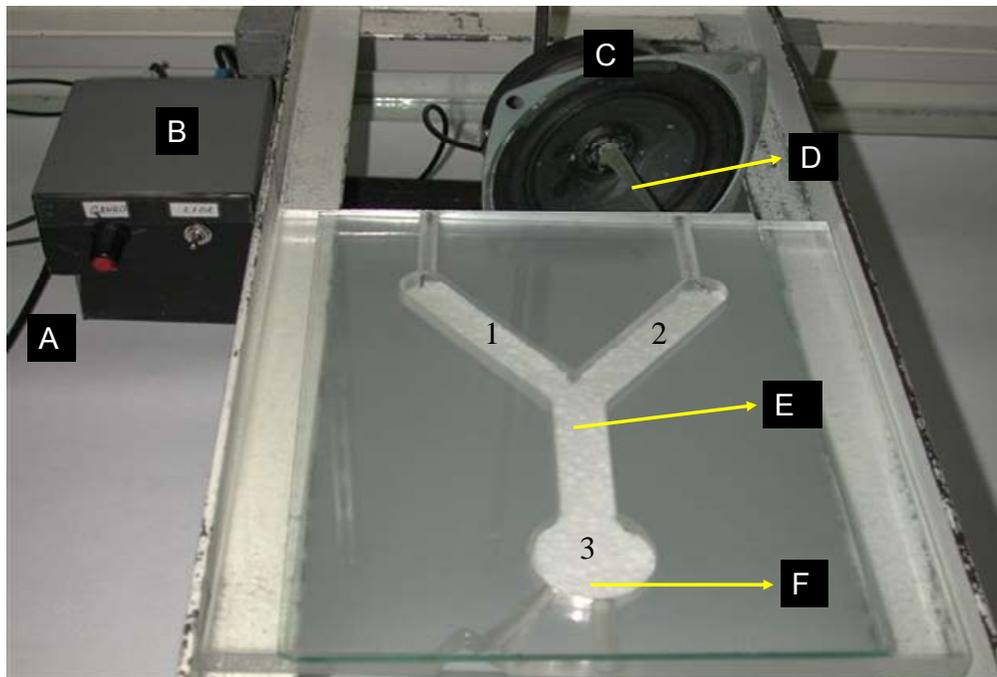


Figura 11. Dispositivo utilizado para bioensaios em arena com transmissão de sinais vibracionais. A- conexão para o computador, B- amplificador, C- alto-falante, D- cone de plástico, E- membrana de polipropileno, F- base de isopor, 1- Área controle (sem vibração), 2- área tratamento (com vibração), 3- Área de liberação dos insetos.

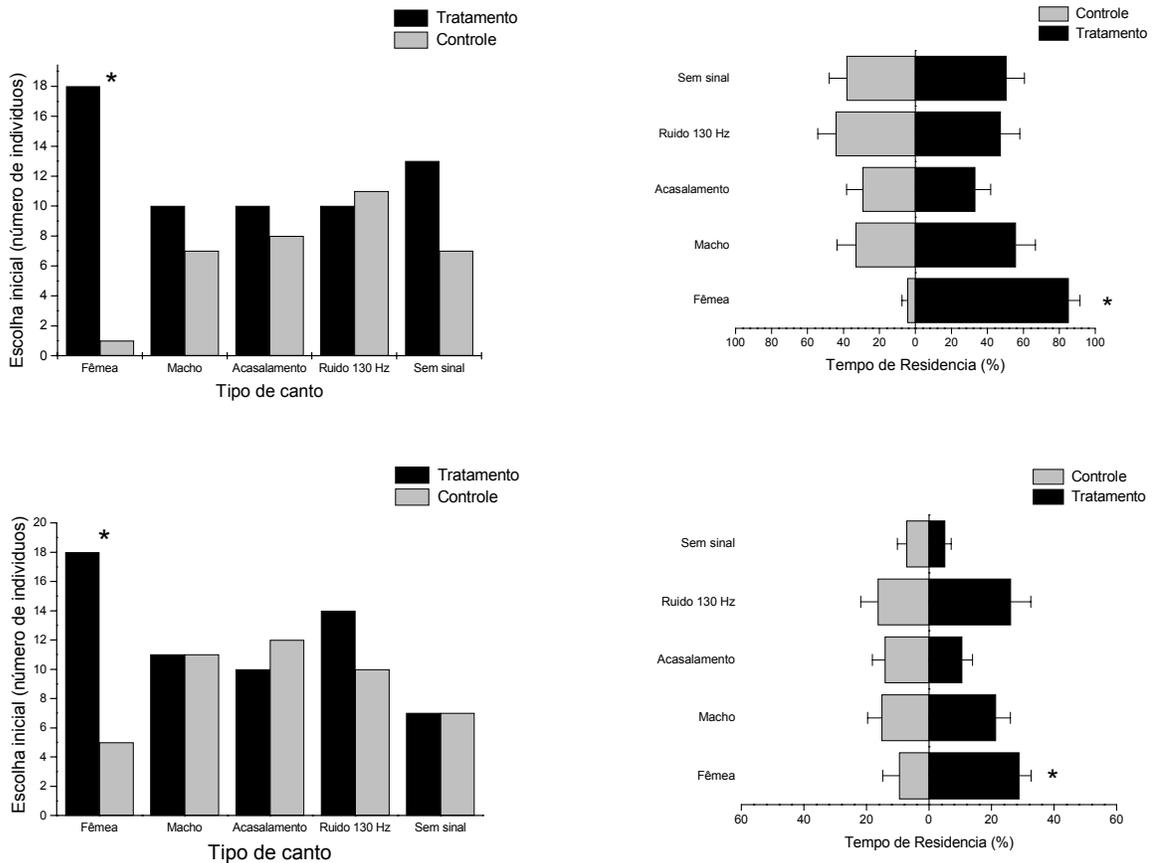


Figura 12. Escolha inicial (A) e Tempo de Residência (B) de fêmeas de *T. podisi* em áreas de plantas de feijão com sinais vibracionais (tratamento) e sem sinais vibracionais (controle). Escolha inicial (C) e Tempo de Residência (D) de fêmeas de *T. podisi* em áreas de uma arena com sinais com sinais vibracionais (tratamento) e sem sinais vibracionais (controle). * indica diferenças significativas entre áreas Tratamento e Controle (Teste de Wilcoxon $p < 0,05$).

Conclusões e perspectivas

Os trabalhos realizados, até o momento, permitem concluir que, tanto as metodologias adaptadas às condições locais como as desenvolvidas para o estudo de comunicação vibracional são eficientes e permitem uma análise precisa e pormenorizada de comportamentos e sinais envolvidos.

Os resultados obtidos mostram claramente que a comunicação vibracional em percevejos é extremamente importante durante o comportamento reprodutivo, e constitui um dos fatores que possibilita o isolamento reprodutivo entre as espécies.

Os estudos com espécies que ocorrem no Brasil mostram, em coincidência com resultados de outros autores (por exemplo, COKL et al., 1972, 1978, 2000 e MCBRIEN et al., 2002), que cada espécie possui um repertório característico de sinais vibracionais que difere significativamente de outras espécies simpátricas (para detalhes de algumas espécies brasileiras ver MORAES et al., 2005a).

O estudo da comunicação vibracional de pentatomídeos oferece assim importantes perspectivas para o total entendimento do comportamento reprodutivo destes insetos. Até o momento, a maior parte dos estudos tem sido orientada à análise e compreensão da função dos sinais químicos emitidos pelos insetos (feromônios), considerados como a principal fonte de informação entre parceiros durante a reprodução (ALDRICH et al., 1987; BORGES et al., 1987; BRÉZOT et al., 1994). Contudo, as pesquisas com sinais vibracionais mostram que, além de feromônios, estes são de grande importância para o sucesso reprodutivo destes insetos.

Assim sendo, a localização precisa dos machos e fêmeas parece não ocorrer somente através de dicas químicas. Este fato pode explicar porque em alguns experimentos de campo feromônios, com comprovada eficiência no laboratório, falham na captura do inseto alvo. Provavelmente, algum fator da comunicação não está presente, e os sinais vibracionais podem ser um dos fatores a serem considerados.

Desta maneira, além da importância científica, o conhecimento da comunicação vibracional pode ter influência no desenvolvimento de tecnologias para serem aplicadas em manejo de pragas. Possivelmente, no futuro, com auxílio do desenvolvimento tecnológico, possa se contar com uma armadilha multi-sinal, para ser utilizada no monitoramento ou controle de populações de percevejos praga.

Na atualidade,

o grupo de pesquisas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia está trabalhando, em parceria com a Embrapa Instrumentação Agropecuária e com um pesquisador da USP, no desenvolvimento de um sistema com membranas de PDVF para registro de sinais vibracionais e de um reprodutor de sons microcontrolado. Esta tecnologia representa o passo inicial para o desenvolvimento de uma armadilha sonora para percevejos.

Os resultados obtidos no estudo da influência de sinais vibracionais no comportamento de busca de hospedeiros do parasitóide de ovos *T. podisi* também

resultam de extremo interesse, já que constituem o primeiro registro de um parasitóide, que não ataca hospedeiros que vivem em condições crípticas, utilizando sinais vibracionais para orientar-se. Além disto, os sinais relacionados com o comportamento de busca, em parasitóides da Família Scelionidae, até o momento tem sido sinomônios de plantas (COLAZZA et al., 2004; MORAES et al., 2005b) ou componentes de feromônios sexuais ou de alarme de percevejos (BORGES et al., 1998b, 1999; BORGES e Aldrich, 2001; Pires et al., 2001). Assim o estudo da comunicação vibracional de percevejos poderá ter aplicações, também, no controle biológico.

Agradecimentos

Aos técnicos de laboratório Hélio Santos e Diva Tiburcio pela colaboração na manutenção das colônias de insetos que são utilizadas nos trabalhos de pesquisa do Laboratório de Bioecologia e Semioquímicos de Insetos. Aos bolsistas de iniciação científica Rodrigo S. F. Pasos, Danielle Moura Cordeiro e Ana Paula Silva Lopes pelo auxílio durante a execução de experimentos. Este trabalho foi desenvolvido com recursos da Embrapa, CNPq e FAP-DF.

Referências Bibliográficas

ALDRICH, J. R.; OLIVER, J. E.; LUSBY, W. R.; KOCHANSKY, J. P.; LOCKWOOD, J. A. Pheromone strains of the cosmopolitan pest, *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae). **Journal of Experimental Zoology**, Muzaffarnagar, India, v.244, p. 171-175, 1987.

BORGES, M.; ALDRICH, J. R. Feromônios de Heteroptera: Oportunidades para o manejo de Insetos benéficos. In: VILELA, E. F.; DELLA LÚCIA, T. M. C. (Ed.). **Feromônios de Insetos: Biologia, química e emprego no manejo de pragas**. 2. ed. Ribeirao Preto-SP: Holos Editora, 2001. p. 93-98.

BORGES, M.; COSTA, M. L. M.; SUJII, E. R.; CAVALCANTI, M. das G.; REDÍGOLO, G. F.; RESCK, I. S.; VILELA, E. F. Semiochemical and physical stimuli involved in host recognition by *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae) toward *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). **Physiological Entomology**, Oxford, v. 24, p. 227-233, 1999.

BORGES, M.; JEPSON, P. C.; HOWSE, P. E. Long-range mate location and close-range courtship behaviour of the green stink bug, *Nezara viridula* and its mediation by sex pheromones. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Oxford, v. 44, p.205-212, 1987.

BORGES, M.; MORI, K.; COSTA, M. L. M.; SUJII, E. R. Behavioural evidence of methyl-2,6,10-trimethyltridecanoate as a sex pheromone of *Euschistus heros*

(Heteroptera: Pentatomidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 22, n. 6, p. 335-338, 1998a

BORGES, M.; SCHMIDT, F. V. G.; SUJII, E. R.; MEDEIROS, M. A.; MORI, K.; GORGATTI, P. H.; FERREIRA, J. T. B. Field responses of stink bugs to the natural and synthetic pheromone of the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, (Heteroptera: Pentatomidae). **Physiological Entomology**, Oxford, v. 23, p.202-207, 1998b.

BRÉZOT, P.; MALOSSSE, C.; MORI, K.; RENO, M. Bisabolene epoxides in sex pheromone in *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae): role of cis isomere and relation to specificity of pheromone. **Journal of Chemical Ecology**, Dordrecht, v. 20, p. 3133-3147, 1994.

ÇOKL, A.; GOGALA, M.; BLAZEVIĆ, A. Principles of sound recognition in three pentatomidae bug species (Heteroptera) **Biol. Vestn.**, v. 26, p. 81-94, 1978.

ÇOKL, A.; GOGALA, M.; JEZ, M. The analysis of the acoustic signals of bug *Nezara viridula* (L.) **Biol. Vestnic.**, v. 20, p. 47-53, 1972.

ÇOKL, A.; VIRANT-DOBERLET, M. Communication with substrate-Borne Signals in Small Plant-Dwelling insects. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, USA, v. 48, n. 29-50, 2003.

ÇOKL, A.; VIRANT-DORBELET, M.; STRITIH, N. The structure and function of songs emitted by southern green stink bug from Brazil, Florida, Italy and Slovenia. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 25, p. 1277-1283, 2000.

COLAZZA, S.; FUCARINO, A.; PERI, E.; SALERNO, G.; CONTI, E.; BIN, F. Insect oviposition induces volatile emission in herbaceous plants that attracts egg parasitoids. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 207, p. 47-53, 2004.

COSTA, M. L. M.; BORGES, M.; VILELA, E. F. Biologia reprodutiva de *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, SP, v. 27, n. 4, p. 559-568, 1998.

COSTA, M. L. M.; BORGES, M.; VILELA, E. F. Effect of stereoisomers of the main component of the sex pheromone of *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) in the attractiveness of female. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, SP, v. 9, n. 3, p. 413- 422, 2000.

MCBRIEN, H. L.; ČOKL, A.; MILLAR, J. G. Comparison of Substrate-borne Signals of two congeneric Stink Bug Species, *Thyanta pallidovirens* and *T. castaneor accerra* (Heteroptera: pentatomidae). **Journal of Insect Behaviour**, London, v. 15, p. 715-738, 2002.

MIKLAS, N.; ČOKL, A.; RENO, M.; VIRANT-DOBERLET, M. Variability of vibratory signals and mate choice selectivity in the southern green stink bug. **Behavioural Process**, Cambridge, v. 61, n. 2, p. 131-142, 2003.

MIKLAS, N.; STRITIH, N.; ČOKL, A.; VIRANT-DOBERLET, M.; RENO, M. The influence of substrate on male responsiveness to the female calling song in *Nezara viridula*. **Journal of Insect Behaviour**, London, v. 1213, p. 1-12, 2001.

MORAES, M. C. B.; LAUMANN, R. A.; ČOKL, A.; BORGES, M. Vibratory signals of four Neotropical stink bug species. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 175-188, 2005a.

MORAES, M. C. B.; LAUMANN, R.; SUJII, E. R.; PIRES C.; BORGES, M. Induced Volatiles in Soybean and Pigeon Pea Plants Artificially Infested with the Neotropical Brown Stink Bug, *Euschistus heros*, and their effect on the Egg Parasitoid, *Telenomus podisi*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Oxford, v. 115, n. 1, p. 175-188, 2005b.

PIRES, C. S. S.; SUJII, E. R.; BORGES, M.; SCHMIDT, F.; ZARBIN, P. H. G.; AZEVEDO, V. C. R.; LACERDA, A. L.; PANTALEÃO, D. **Ação cairomonal de componentes do feromônio de alarme do percevejos verde pequeno da soja, *Piezodorus guildinii*, sobre o parasitóide de ovos *Telenomus podisi***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n. 19).

VIRANT-DOBERLET, M.; ČOKL, A. Vibrational communication in insects. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 121-134, 2004.