



# UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

**ABEL FELIPE DE OLIVEIRA QUEIROZ**

**Comportamento Sexual de *Atheloca bondari* Heinrich, 1956 (Lepidoptera:  
Pyralidae): Descrição e Mediação por Feromônios.**

**Universidade Federal de Alagoas**

**Campus A. C. Simões  
Tabuleiro do Martins  
57072-970 - Maceió-AL**

**ABEL FELIPE DE OLIVEIRA QUEIROZ**

**Comportamento Sexual de *Atheloca bondari* Heinrich, 1956 (Lepidoptera:  
Pyralidae): Descrição e Mediação por Feromônios.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutor.

**Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana**

**Coorientador: Prof. Dr. Henrique Fonseca Goulart**

**MACEIÓ – AL**

**2019**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

Q3c Queiroz, Abel Felipe de Oliveira.

Comportamento sexual de *Atheloca bondari* Heinrich, 1956 (Lepidoptera: Pyralidae): descrição e mediação por feromônios / Abel Felipe de Oliveira Queiroz. – 2019.

104 f. : il. color.

Orientador: Antônio Euzébio Goulart Santana.

Coorientador: Henrique Fonseca Goulart.

Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 76-85.

Anexos: f. 86-104.

1. Coco. 2. Semioquímicos. 3. Lepidópteros. 4. Cópulas (Estatística matemática). 5. Feromônios. I. Título.

CDU: 577.19



# PPGQB

Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia



## FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Doutorando **ABEL FELIPE DE OLIVEIRA QUEIROZ** intitulada: “Comportamento Sexual de *Atheloca bondari* Heinrich, 1956 (Lepidoptera: Pyralidae): Descrição e Mediação por Feromônios”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, no dia 18 de outubro de 2019, às 13h, no Auditório do Núcleo de Pesquisa Multidisciplinar (Antigo Severinão) – UFAL – Campus A. C. Simões.

### COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana  
(Orientador – PPGQB/UFAL)

Prof. Dr. Henrique Fonseca Goulart  
(Coorientador - CECA/UFAL)

Profa. Dra. Ruth Rufino do Nascimento  
(PPGQB/UFAL)

Profa. Dra. Mariana Oliveira Breda  
(CECA/UFAL)

Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo  
(ESENFAR/UFAL)

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana, por me proporcionar realizar o doutorado abrindo as portas de seu laboratório, pela confiança, apoio e motivação ao meu trabalho.

Aos Drs. Jakeline Maria, Mariana Breda e Henrique Goulart por suas coorientações, ajudas e sugestões ao meu trabalho.

A todos os integrantes e ex-integrantes do laboratório de pesquisa em recursos naturais (LPQRN) da Universidade Federal de Alagoas, por sua ajuda e contribuição a minha pessoa e ao trabalho durante todo meu doutorado.

Ao Programa de Pós-graduação em química e biotecnologia e todos os seus integrantes, professores, alunos e funcionários.

Ao Dr. Johnnatan Freitas e Jeniffer Freitas, do laboratório de microscopia do Instituto Federal de Alagoas, pelo apoio na microscopia eletrônica de varredura das antenas de *Atheloca bondari*.

Ao Sr. Pituca por disponibilizar sua propriedade como local de coleta e sempre me receber bem e de maneira atenciosa.

A coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) por financiar o desenvolvimento desta pesquisa

A toda minha família e amigos de fora da Universidade por sempre estarem ao meu lado e me apoiarem durante meu doutorado em especial a Everton, Aldair, Larissa, Yasmin e Paula.

Ao Dr. Jan Bergmann por me receber em seu laboratório na Pontificia Universidad Católica de Valparaíso e por todo o apoio e ensino durante este período. Também gostaria de agradecer a todos os amigos que fiz durante este período e por todo o apoio e parceria.

A Universidade Federal de Alagoas.

## RESUMO

O coqueiro, *Cocos nucifera*, é cultivado em todas as regiões do Brasil, predominante no Nordeste, e é uma espécie socioeconomicamente importante. Além de ser uma importante renda econômica, *C. nucifera* é utilizado como recurso por vários insetos, o que afeta seu crescimento e causa prejuízos econômicos aos produtores. Dentre estes insetos, a traça-do-coco, *Atheloca bondari* Heinrich, 1956 (Lepidoptera: Pyralidae) apresenta grande importância na cultura do coco, porque seu controle é dificultado pelo hábito endofítico das lagartas. O presente estudo objetivou extrair e identificar compostos feromoniais emitidos por fêmeas da traça-do-coco. Extrações de DNA da traça-do-coco foram realizadas para confirmar a identidade desta espécie, e análises de microscopia de varredura eletrônica (MEV) das antenas dos adultos foram conduzidas para investigar a comunicação química nesta espécie. Para estudar o comportamento de acasalamento de adultos da traça-do-coco, bioensaios comportamentais de corte e cópula em arena foram feitos. Extratos da genitália das fêmeas e de corpo inteiro de machos e fêmeas foram obtidos utilizando hexano como solvente. Os extratos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia gasosa acoplada a detector por ionização em chama (CG-DIC). As respostas das antenas dos adultos aos extratos obtidos e a compostos sintéticos foi testada por meio de eletroantenografia (EAG) e cromatografia gasosa acoplada a eletroantenografia (CG-EAG). Através da extração, amplificação e sequenciamento do DNA uma sequência final com 678 pb foi obtida. As análises no MEV resultaram na identificação de 6 tipos de sensilas: Cerdas de Böhm, tricóide, caética, coelocônica, estilocônica e aurilicas. Os bioensaios comportamentais revelaram padrões de corte e cópula realizados pelos machos e fêmeas da traça-do-coco. Através das análises dos extratos foi possível identificar 23 compostos na genitália das fêmeas, e 39 compostos nos perfis cuticulares de machos e fêmeas. As análises eletroantegráficas revelaram que as antenas dos machos são ativadas pelos extratos cuticulares e genitais das fêmeas e por 3 compostos identificados como feromônios de espécies de Pyralidae. Baseando-se nos resultados desta pesquisa conclui-se que o acasalamento em *A. bondari* é mediado por compostos feromoniais.

**Palavras-chave:** *Cocos nucifera*, traça do coco, semioquímicos, cópula.

## ABSTRACT

The coconut tree, *Cocos nucifera*, is grown in all regions of Brazil, predominantly in the northeast, and is a socioeconomically important species. In addition to be a major source of economic income, *C. nucifera* is used as a resource by several insects, which affects its growth and causes economic losses to producers. Among these insects, the coconut moth, *Atheloca bondari* Heinrich, 1956 (Lepidoptera: Pyralidae) presents a great importance in the coconut culture, because its control is hampered by the endophytic habit of its caterpillars. The present work aimed to extract and identify pheromonal compounds emitted by coconut moth females. DNA extractions from the coconut moth were performed to confirm the identity of this species, and scanning electron microscopy (SEM) analysis of the adults antennae was conducted to investigate chemical communication in this species. To study the mating behaviour of the coconut moth adults, behavioural bioassays of courtship and copula in arena were accomplished. Female genitalia extracts and whole-body extracts of males and females were obtained using hexane as the solvent. The extracts were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography coupled to flame ionization detector (GC-FID). The responses of the adult antennae to the extracts and synthetic compounds was tested by means electroantennography (EAG) and gas chromatography coupled to electroantennography detector (GC-EAD). Through the DNA extraction, amplification and sequencing a final sequence with 678 bp was obtained. The SEM analyses resulted in the identification of 6 types of sensilla: Böhm's bristles, trichoidea, chaetica, coeloconica, auricillica, chaetica, and styloconica. The behaviour bioassays revealed courtship and copula patterns performed by males and females of the coconut moth. Through the analysis of the extracts, it was possible to identify 23 compounds present in the female genitalia and 39 compounds present in the male and female cuticular profile. The electroantennographic analyses revealed that male antennae are activated by the cuticular and genital extracts of female and by 3 compounds identified as pheromone to Pyralidae species. Based on the results of this research it is possible to conclude that mating in *A. bondari* is mediated by pheromonal compounds.

**Keywords:** *Cocos nucifera*, coconut moth, semiochemicals, copula.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Tufo de cerdas amarelas presente na parte externa da tíbia do terceiro par de perna de um macho de <i>A. bondari</i> . .....	16
Figura 2 – Adulto de <i>A. subrufella</i> (= <i>A. bondari</i> ), lagartas de <i>A. subrufella</i> (= <i>A. bondari</i> ) no fruto e excrementos fecais unidos por fios de seda na parte externa do coco.....	17
Figura 3 - Sexagem de adultos pela extremidade do abdome. ....	18
Figura 4 – Classificação dos semioquímicos.....	21
Figura 5 – Criação de lagartas de <i>A. bondari</i> em cubo de mesocarpo de aproximadamente 2cm.....	28
Figura 6 - Dimorfismo sexual em pupas de <i>A. bondari</i> : (a) Pupa de fêmea, (b) pupa de macho.....	28
Figura 7 – Metalizador Q150R ES, Quoron® (A), Interior do metalizador com amostras montadas para serem metalizadas (B).....	33
Figura 8 – Microscópio eletrônico de varredura INCAx-act, Oxford-instruments® (A), Interior do microscópio com amostras montadas já metalizadas para serem analisadas (B). ....	33
Figura 9 - Processo de extração de corpo inteiro de adultos de <i>A. bondari</i> : à direita vial contendo adultos imersos no solvente e à esquerda vials contendo solvente sobrenadante (a); pipeta com lã de vidro utilizada para filtração dos extratos de corpo inteiro dos adultos de <i>A. bondari</i> (b).....	35
Figura 10 – Gravação da resposta da antena de macho de <i>A. bondari</i> no momento da realização de um puff contendo como fonte de odor extrato da porção final do abdômen de fêmeas de <i>A. bondari</i> . ....	36
Figura 11 – Resultado da eletroforese em placa de gel de agarose contendo as amostras de <i>Atheloca</i> sp. amplificadas neste trabalho (b) e marcador de peso molecular 1kb utilizado como padrão (a).....	40
Figura 12 – Sequência final de <i>Atheloca</i> sp. com 678pb obtidas neste trabalho. ....	
Figura 13 – Árvore filogenética construída utilizando o método Neighbor-joining (agrupamentos vizinhos, NJ).....	42

Figura 14 – Etograma do comportamento de corte de <i>Atheloca subrufella</i> Hulst, 1887 (Lepidoptera: Pyralidae) (n=10).....	45
Figura 15 – Etograma do comportamento de cópula de <i>Atheloca subrufella</i> Hulst, 1887 (Lepidoptera: Pyralidae). macho e fêmea antenando (A), fêmea realizando comportamento de chamamento (B, C), Rotação do corpo de macho e fêmea (D, E), Macho e fêmea tocando as antenas (F), macho levantando as asas e exibindo o hairpencil (G), macho saltando sobre a fêmea e em seguida parado com seu abdômen em posição oposta ao abdômen da fêmea (H, I), posição de cópula (J)...	46
Figura 16 – Antena de <i>A. bondari</i> dividida em escapo, pedicelo, flagelo e antenômero (d); região do pedicelo não recoberta por escamas com presença de sensilas (a); pedicelo com escamas removidas (b) regiões do escapo e pedicelo com presença de sensilas (c). .....	48
Figura 17 – Face ventral de um antenômero de uma antena de fêmea de <i>A. bondari</i> recobertos por sensilas. ....	49
Figura 18 – Face dorsal das antenas de <i>A. bondari</i> com a presença de algumas sensilas emergindo entre as escamas. ....	50
Figura 19 – Escapo da antena de <i>A. bondari</i> com a presença das cerdas de Böhm. ....	50
Figura 20 - Face dorsal de um antenômero de macho de <i>A. bondari</i> com a presença de sensilas tipo tricóide (Tc) (a), ranhuras transversais presentes na sensila tricóide (b).....	52
Figura 21 – Face dorsal de um antenômero de macho de <i>A. bondari</i> com a presença de sensila tipo Caética (Ch). ....	52
Figura 22 – Face ventral do antenômero de <i>A. bondari</i> com a presença de sensila coleocônica subtipo 1 (Cc - I).....	53
Figura 23 - Face dorsal do antenômero de um macho de <i>A. bondari</i> com a presença de sensilas coleocônicas subtipo 1 (Cc – I) e subtipo 2 (Cc - II) (a), sensila coelocônica subtipo 2 (b). ....	54
Figura 24 - Face ventral de antenômeros de <i>A. bondari</i> com a presença de sensilas tipo estilocônica (Ec) em sua região terminal (a,b,d) e último antenômero com a presença de sensila tipo estilocônica (c).....	55

Figura 25 – Face dorsal do antenômero de <i>A. bondari</i> com escamas removidas, sendo possível a visualização de sensilas tipo aurículas (Ac).....	56
Figura 26 – Expansão do cromatograma de extrato da porção final do abdômen de fêmeas de <i>A. bondari</i> onde estas estruturas foram mantidas no vial.....	59
Figura 27 - Comparação entre cromatogramas de extrato da porção final do abdômen de fêmeas de <i>A. bondari</i> filtrado em sílica (A) e antes de ser filtrado em sílica (B). .....	60
Figura 28 – Expansão do cromatograma do extrato da genitália de fêmeas de <i>A. bondari</i> onde estas estruturas foram mantidas 20 minutos no vial e posteriormente todo solvente sobrenadante foi removido e acumulado em um único vial. ....	61
Figura 29 – Expansão dos cromatogramas dos extratos cuticulares de machos (A) e fêmeas (B) de <i>A. bondari</i> . .....	63
Figura 30 – Resultado da análise de componentes principais, feita com os valores das quantificações dos compostos cutilares de machos e fêmeas, evidenciando a separação dos grupos.....	67
Figura 31 - Boxplot dos valores das respostas em volts (V) das antenas dos adultos de <i>A. bondari</i> obtidas no EAG, mediante aos puffs dos tratamentos controle, extratos de adultos e padrões analíticos: Padrões analíticos para antena de macho (I); Extrato de genitália de fêmea para antena de macho (II); Extrato cuticular de fêmea para antena de macho (III); Extrato cuticular de macho para antena de fêmea (IV). 70	
Figura 32 – Expansão da resposta eletroantenográfica de antena de fêmea de <i>A. bondari</i> para mistura de padrões sintéticos (disponíveis no LPqRN) de compostos identificados como feromônios de espécies de Pyralidae. ....	71
Figura 33 – Expansão da resposta eletroantenográfica de antena de macho de <i>A. bondari</i> para mistura de padrões sintéticos (disponíveis no LPqRN) de compostos identificados como feromônios de espécies de Pyralidae. ....	72
Figura 34 – Expansão da resposta eletroantenográfica de antena de macho de <i>A. bondari</i> para composto presente no padrão Z9,E12-14:OAc (2).....	73
Figura 35 – Expansão da resposta eletroantenográfica de antena de macho de <i>A. bondari</i> para o padrão Z9-14:OAc (5). .....	73

Figura 36 – Expansão da resposta eletroantenográfica de antena de macho de *A. bondari* para o composto Z9-14:Ald (4), para um composto presente no padrão de Z9-14:Ald (3) e para o composto Z9-16:OH (6).....74

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção dos principais países produtores de coco em 2017. ....	14
Tabela 2- Espécies de Phycitnae com feromônio sexual identificado e a classe de compostos que pertence os componentes da mistura feromonal. ....	23
Tabela 3 – Informações das sequências de <i>Atheloca</i> , disponíveis no GenBank e no BoldSystems, utilizadas neste estudo. ....	30
Tabela 4 – Distâncias genéticas entre as sequências das espécies de <i>Atheloca</i> utilizando o modelo Kimura 2-p. ....	43
Tabela 5 - Compostos identificados nos extratos da porção final do abdômen de fêmeas de <i>A. bondari</i> onde estas estruturas foram mantidas no vial. ....	58
Tabela 6 – Compostos identificados nos extratos da porção final do abdômen das fêmeas de <i>A. bondari</i> onde estas estruturas foram imersas no hexano por 20 minutos e posteriormente todo solvente sobrenadante foi removido e acumulado em um único vial. ....	60
Tabela 7 – Diferença entre os hidrocarbonetos lineares e ramificados identificados nos extratos da genitália de <i>A. bondari</i> utilizando duas metodologias diferentes.....	62
Tabela 8 - Compostos quantificados e identificados nos extratos cuticulares de machos e fêmeas de <i>A. bondari</i> com seus KI's calculados. ....	64
Tabela 9 – Contribuição dos compostos identificados nos extratos cuticulares de machos e fêmeas de <i>A. bondari</i> com seus KI's calculados. ....	65
Tabela 10 – Compostos que elicitaram respostas nas antenas de machos e fêmeas de <i>A. bondari</i> . ....	72

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

- CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
- CG-DIC – Cromatografia gasosa acoplada a um detector por ionização de chama
- CG-EAG – Cromatografia gasosa acoplada à eletroantenografia
- EAG – Eletroantenografia
- FAO – Food and Agriculture Organization
- GC-MS – Gas chromatography coupled to mass espectrometry
- GC-FID – Gas chromatography coupled to flame ionization detector
- GC-EAD – Gas chromatography coupled to eletroantennographic detector
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- LPQRN – Laboratório de pesquisa em recursos naturais
- MIP – Manejo integrado de pragas
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura
- PCR - Polymerase Chain Reaction
- PUCV – Pontifícia Universidade Católica de Valparaiso
- PVC – Policloreto de vinila
- SEM – Scanning electron microscopy
- V - Volts

## SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA .....	14
1.1 A cultura do coqueiro .....	14
1.2 A traça-do-coco, <i>Atheloca</i> spp. (Lepidoptera: Pyralidae) .....	15
1.3 Identificação molecular .....	19
1.4 Controle comportamental .....	20
1.5 Controle comportamental em Lepidópteros .....	22
1.6 Caracterização de sensilas via Microscopia eletrônica de varredura (MEV) ....	24
2. OBJETIVOS .....	26
2.1 Objetivo geral .....	26
2.2 Objetivos específicos .....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	27
3.1 Manutenção de <i>Atheloca bondari</i> em laboratório .....	27
3.1.1 Coleta de <i>A. bondari</i> .....	27
3.1.2 Criação de <i>A. bondari</i> .....	27
3.2 Identificação de <i>A. bondari</i> .....	29
3.3 Bioensaios comportamentais de corte e cópula de <i>A. bondari</i> .....	31
3.4 Microscopia eletrônica de varredura das antenas de <i>A. bondari</i> .....	32
3.5 Extração de compostos feromoniais de <i>A. bondari</i> .....	34
3.5.1 Extração por solvente da genitália de <i>A. bondari</i> .....	34
3.5.2 Extração por solvente de compostos cuticulares de <i>A. bondari</i> .....	34
3.6 Eletroantenografia .....	35
3.7 Cromatografia gasosa acoplada a eletroantenografia .....	36
3.8 Análises químicas e identificação de compostos feromoniais de <i>A. bondari</i> .....	37
3.8.1 Identificação dos compostos feromoniais de <i>A. bondari</i> .....	37
3.8.2 Quantificação dos compostos cuticulares de <i>A. bondari</i> .....	38
3.9 Padrões analíticos .....	38
3.10 Análises estatísticas .....	39
4. RESULTADOS .....	39
4.1 Análise molecular .....	39
4.2 Bioensaios comportamentais de corte e cópula .....	44
4.3 Microscopia de varredura eletrônica das antenas .....	47

4.4	Extração de compostos feromonais de <i>A. bondari</i> .....	57
4.4.1	Extração por solvente da genitália de <i>A. bondari</i> .....	57
4.4.2	Extração por solvente de compostos cuticulares de <i>A. bondari</i> .....	63
4.5	Eletroantenografia.....	69
4.6	Cromatografia gasosa acoplada a eletroantenografia .....	71
5.	CONCLUSÃO .....	75
6.	REFERÊNCIAS.....	76
	APÊNDICES.....	86

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 A cultura do coqueiro

O coqueiro, *Cocus nucifera* Linnaeus, é uma planta pertencente à família Arecaceae, com cultivo distribuído por quase todo o território nacional, apresentando uma grande importância social e econômica para o Brasil (Martins e Jesus Junior, 2014).

O coqueiro é uma frutífera com ampla distribuição mundial, ocorrendo em quase todos os continentes. Dentre os países produtores de coco, o Brasil apresenta destaque (tabela 1). Em 2017, o Brasil alcançou aproximadamente uma produção de 2,4 milhões de toneladas em uma área aproximada de 216 mil ha, apresentando uma produtividade média de 10,86 mil t/ha. Quando levada em consideração a produção em toneladas, o Brasil ocupou a 5ª colocação entre os principais produtores mundiais (tabela 1), sendo o único país da América do Sul entre os cinco primeiros (FAO, 2017).

**Tabela 1 – Produção dos principais países produtores de coco em 2017.**

País	Produção (t)
Indonésia	18.983.378
Filipinas	14.049.131
Índia	11.469.837
Sri Lanka	2.575.230
Brasil	2.342.942

Fonte: FAO 2017

A Região Nordeste apresenta destaque entre os principais produtores nacionais. De acordo com o IBGE (2017), esta região foi responsável por 74,5% da produção nacional. O estado da Bahia foi o maior produtor, com 542,5 mil toneladas o que correspondeu a 30,3% da produção nacional, seguido de Sergipe (237,3 mil ton), Ceará (186,7 mil ton) e Pernambuco (144,5 mil ton).

Além da renda gerada pela produção de coco verde, no Brasil em 2013 foram gerados pelo menos 772.386 empregos de maneira direta e 3.089.544 de empregos de maneira indireta. (Cuenca, 2016).

Apesar de ser uma ótima fonte de renda para a população, o coqueiro também oferece uma diversa fonte de recursos para vários insetos de importância agrícola, tais como, *Rhinostomus barbirostris* Fabricius, 1775 e *Rhynchophorus palmarum* Linnaeus, 1764 (Coleoptera: Curculionidae), cujas larvas se alimentam do estipe do coqueiro; *Cerataphis lataniae* Boisduval, 1867 (Heteroptera: Aphididae), cujos adultos e ninfas atacam as folhas do coqueiro, sugando a seiva da planta; *Brassolis sophorae* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Nymphalidae) cujas larvas (lagartas) atacam a folha do coqueiro, causando intenso desfolhamento; *Coralimela brunnea* Thunberg, 1821 (Coleoptera: Chrysomelidae), cujos adultos causam injúrias nas folhas de plantas geralmente jovens e suas larvas migram para a folha central (flecha) onde se alimentam, dentre outras pragas (Ferreira e Lins, 2006).

Estes organismos podem causar sérios problemas, que variam desde o atraso no desenvolvimento, perda na produção e até a morte da planta. Eles se alojam e se alimentam praticamente em todas as partes da planta desde a fase jovem até as fases mais velhas (Ferreira e Filho, 2016).

## 1.2 A traça-do-coco, *Atheloca* spp. (Lepidoptera: Pyralidae)

Dentre as diversas pragas que atacam o coqueiro, a traça-das-flores-e-frutos-novos ou traça-do-coco, *Atheloca subrufella* Hulst, 1887 (Lepidoptera: Phycitidae) tem requerido atenção nesta cultura. A traça-do-coco, pode ser encontrada na literatura sendo citada como *Hyalospila ptychis* Dyar, 1919, *Atheloca subrufella* Hulst, 1887 e *Atheloca bondari* Heinrich, 1956. De acordo com Cock e Burris (2013) a espécie *A. subrufella* é uma sinonímia de *H. ptychis* e tem sua ocorrência na Flórida (EUA), Cuba, Ilhas Virgens e Guiana Francesa. Já a espécie *A. bondari* tem ocorrência no Brasil e Trinidad.

De acordo com Heinrich (1956) a diferença entre estas espécies é um tufo de cerdas amarelas na parte externa da tíbia do último par de pernas dos machos (Figura 1), presente somente em *A. bondari*. Assim, estudos realizados por Bento et al. (2006), Santana et al. (2009; 2010; 2011), Queiroz et al. (2015) e Nascimento et

al. (2016) que descrevem a ocorrência de *A. subrufella* no Brasil nos estados de Pernambuco e Sergipe, podem ter tratado *A. bondari* como sendo *A. subrufella*.

Em seu estudo Paz-Neto et al. (2019) realizaram a identificação molecular e morfológica de espécimes coletados no nordeste brasileiro. Para a identificação molecular foram utilizados 5 espécimes coletados no estado de Pernambuco e para a identificação morfológica foram utilizados espécimes coletados em 5 estados da região nordeste do Brasil. Os resultados das análises molecular e morfológica enriquecem os fatos apresentados pela literatura, sugerindo que os espécimes da traça-do-coco que ocorrem no Brasil são *A. bondari*.

**Figura 1- Tufo de cerdas amarelas presente na parte externa da tíbia do terceiro par de perna de um macho de *A. bondari*.**



*A. bondari* foi descrita por Heinrich (1956) em uma revisão de espécimes da subfamília Phycitinae depositados por Bondar no Museu Nacional dos Estados Unidos. No Brasil, a primeira ocorrência de *A. subrufella* foi descrita em plantações de coco nos estados Bahia e Pernambuco, desde então algumas pesquisas realizadas no Brasil têm referido a traça-do-coco como sendo *A. subrufella*, os espécimes utilizados nesta pesquisa apresentavam um tufo de cerdas amarelas na parte externa da tíbia do último par de pernas dos machos (Figura 1), devido aos

fatos expostos na revisão de literatura, nesta pesquisa trataremos os espécimes como sendo *A. bondari*.

A infestação causada por *A. subrufella* é caracterizada pelas injúrias de suas lagartas nas inflorescências e frutos do coqueiro. Essas lagartas se desenvolvem no interior das inflorescências, se alimentando do carpelo, ou no interior dos frutos novos, se alimentando do mesocarpo. É possível identificar a infestação de lagartas de *A. subrufella* pela presença de fezes ligados por fios de seda na parte externa do fruto (Figura 2). Os frutos e inflorescências infestados são abortados e os que não caem da planta tornam-se deformados e tem seu valor comercial reduzido (Bondar, 1940 apud Santana et al. 2009; 2010; 2011; Ferreira et al. 1998; 2002) Seus requisitos térmicos favorecem a infestação desta praga ao longo de todo o ano na região norte e nordeste do Brasil (Santana et al. 2010).

**Figura 2 – Adulto de *A. subrufella* (= *A. bondari*), lagartas de *A. subrufella* (= *A. bondari*) no fruto e excrementos fecais unidos por fios de seda na parte externa do coco.**



Nascimento (2013).

A duração do ciclo de vida de uma geração de de *A. subrufella* dura aproximadamente 43 dias. Sendo a duração das fases de ovo, lagarta, pupa e adultos respectivamente de 3 dias, 14 dias, 11 dias e 15 dias. Uma única fêmea de

deste inseto é capaz de ovipositar 216 ovos durante seu ciclo de vida (Bento et al., 2006). Os adultos de *A. subrufella* são pequenos, tendo uma envergadura de 1,4 a 1,8 cm e apresentam uma coloração acastanhada (Bondar, 1940 apud Bento et al., 2006). Nesta espécie o macho pode ser diferenciado da fêmea na extremidade do abdome na fase adulta, sendo a extremidade da fêmea mais aberta e arredonda em relação ao macho (figura 3) (Santana et al., 2010).

**Figura 3 - Sexagem de adultos pela extremidade do abdome.**



Santana et al., 2010.

Moura et al. (2006) realizou uma avaliação mensal de perdas de frutos do coqueiro entre o período de abril de 1997 a março de 1998. Nesta avaliação foram observadas as inflorescências de 100 árvores, sendo registrados o número de frutos por inflorescência, os frutos atacados por *H. ptychis* e os frutos perdidos por outras causas. Do total de inflorescências avaliadas foi possível observar que a média de perda de frutos causadas pelo ataque de *H. ptychis* foi de 2,3%. Levando em consideração que a produção estimada na área do estudo seria de 18.360 cocos por ha/ano, as perdas por ataque de *H. ptychis* seria de 367 frutos por ha/ano.

Devido ao fato das lagartas de *A. subrufella* (= *A. bondari*) apresentarem hábito endofítico, seu controle por meio de inseticidas é dificultado, pois não existe um contato direto da substância com o inseto. Pelo fato de não apresentar nenhum inseticida registrado para o controle específico de *Atheloca* spp. (Agrofit, 2003)

atualmente o método de controle utilizado é realizar a limpeza dos cachos e manter o coroamento do solo ao redor da planta sempre limpo, retirando e destruindo, através da queima ou enterrio, todos os frutos com sinais de infestação e/ou abortados. (Fontes et al., 2002)

Em estudos realizados por Ferreira et al., (2002) em casos de alta infestação da praga um método de controle que tem sido realizado e mostra certa é a pulverização das plantas com o produto carbosulfano a 0,1% (1 mL do p.c./L de água) em mistura com o óleo de algodão a 1,5% (15 mL/L de água + detergente neutro a 1% (10 mL/L de água).

Apesar da importância de *Atheloca* na cultura do coco, pouco é conhecido sobre seu comportamento sexual. Estudos realizados com *A. subrufella* (= *A. bondari*) mostram que os adultos deste inseto apresentam comportamento sexual noturno, e atingem maturidade sexual a partir do 1º dia de vida. (Bento et al., 2006).

De acordo com Nascimento et al. (2016) fêmeas virgens de *A. subrufella* (= *A. bondari*) realizam comportamento de chamamento expondo a porção final do abdômen. Este comportamento é dependente da idade, de maneira que fêmeas virgens mais novas realizam este comportamento em horário diferente de fêmeas virgens mais velhas.

Ainda assim pouco se sabe sobre os compostos que estão envolvidos neste comportamento sexual, bem como as estruturas envolvidas na sua percepção. Portanto, estratégias complementares e alternativas de controle devem ser avaliadas e estudadas para conter as infestações esta praga de maneira eficiente.

### **1.3 Identificação molecular**

A identificação utilizando caracteres morfológicos é eficiente, porém podem acontecer algumas dúvidas durante este processo, por exemplo o caso citado neste trabalho.

A dificuldade na identificação pode se dar por alguns fatores, dentre eles, o fato de que alguns insetos são muito pequenos, outro fator é que alguns insetos podem apresentar características morfológicas muito semelhantes, como no caso das espécies do gênero *Sclerodermus* (Hymenoptera: Bethylidae) (Jiang et al., 2015).

Recentemente algumas pesquisas têm utilizado a codificação do DNA como uma eficaz ferramenta para realizar a identificação taxonômica de espécies de insetos já descritas ou não (Ball e Armstrong, 2006; Jiang et al., 2015; Mitchell e Gopurenko, 2016).

As sequências de DNA já descritas e depositadas em bancos de dados estão sendo bastante utilizadas para identificação, juntamente com informações adicionais dos espécimes como local de coleta, fotos de aspectos morfológicos, local de depósito e nome científico (Wilson, 2012).

Um dos principais bancos de dados de depósito de sequências de DNA cruzadas com informações adicionais é o BOLD SYSTEMS. Neste banco estão disponíveis para consulta aproximadamente 10 milhões de espécimes registrados, sendo 5.891.751,00 espécimes de insetos, distribuídos em 269.262,00 espécies. Dentre as espécies de insetos depositados no BOLD SYSTEMS, 92.485,00 pertencem a ordem Lepidoptera.

No BOLD SYSTEMS existem apenas 2 registros de espécies com sequência de DNA para *Atheloca*, *Atheloca subrufella* e *Atheloca bondari*, sendo 17 registros para *A. subrufella* e 6 para *A. bondari* disponíveis no portal de dados públicos.

#### **1.4 Controle comportamental**

Um método eficiente e atual para o manejo integrado de pragas em culturas agrícolas é o controle comportamental utilizando semioquímicos. Os semioquímicos são compostos que mediam as relações ecológicas entre os organismos e o meio ambiente.

Os semioquímicos são classificados de acordo com os indivíduos envolvidos nas interações que mediam (Figura 4), quando os semioquímicos estão envolvidos em relações interespecíficas são denominados aleloquímicos e quando os semioquímicos estão envolvidos em relações intraespecíficas são denominados feromônios (Karlson e Luscher, 1959; Zarbin et al., 2009).

Os aleloquímicos são classificados de acordo com o benefício causado para os indivíduos, emissores e receptores, envolvidos em uma interação. O cairomônio é um aleloquímico que traz benefício apenas para o indivíduo receptor do sinal, o alomônio é um aleloquímico que traz benefício apenas para o indivíduo emissor do

sinal e o sinomônio é um aleloquímico que traz benefício para ambos indivíduos, emissor e receptor (Dicke e Sabelis, 1988).

Os semioquímicos são utilizados como uma ferramenta eficaz no manejo integrado de pragas (MIP) (Hansen et al., 2019; Fataar et al., 2019; Stevens et al., 2019), dentre os semioquímicos utilizados, o feromônio é considerado viável ao ser utilizado no MIP por 3 motivos: eles são específicos, são ativos em pequenas quantidades e a maioria não apresenta toxicidade para animais (Witzgall et al., 2010).

**Figura 4 – Classificação dos semioquímicos.**



Zarbin et al. (2009)

Os feromônios podem ser classificados de maneiras diferentes a depender do autor, de acordo com Butler (1967) os feromônios utilizados pelos insetos são classificados de acordo com sua função biológica, dentre os feromônios de ação olfativa podem ser citados o feromônio de marcação, feromônio sexual, feromônio afrodisíaco, feromônio de alarme e feromônio de agregação.

O controle comportamental com feromônios pode ser utilizado para dificultar a localização do inseto ou atraindo o inseto para uma fonte específica de odor e pode ser realizado de diferentes maneiras de acordo com sua ação e finalidade.

De acordo com Zarbin et al. (2009) os feromônios podem ser utilizados no MIP para o monitoramento, a coleta em massa e a confusão sexual, já de acordo com Arioli et al. (2013) os feromônios podem ser utilizados no MIP com a função de monitoramento, coleta massal, confusão sexual, autoconfusão, atraindo e mata e atração competitiva.

Dentre exemplos de controle comportamental bem-sucedidos utilizando feromônios podem ser citados o controle de *Oryctes rhinoceros* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Scarabaeidae) em plantios coco, *Cocus nucifera* Linnaeus (Arecaceae) e o controle de *R. palmarum* em culturas de dendê, *Elaeis guineensis* Jacq. (Arecaceae) (Indriyanti et al., 2018; Oehlschlager et al., 2002).

No caso de *O. rhinoceros* foi utilizado feromônio de agregação para a técnica de monitoramento, já no caso do *R. palmarum* foi utilizado o feromônio de agregação para a técnica de controle massal.

O monitoramento populacional consiste na utilização de armadilhas com feromônio para avaliar a presença e sazonalidade de um inseto indicando adequadamente o tempo de utilização de inseticidas. A confusão sexual causa desorientação e falha na comunicação entre os sexos, atrasando, diminuindo ou impedindo a fertilização de fêmeas. Já o controle por captura massal atrai insetos de ambos os sexos de uma espécie para uma armadilha com grande capacidade (Witzgall et al., 2010).

### **1.5 Controle comportamental em Lepidópteros**

O primeiro feromônio identificado para o controle de uma praga foi o Bombicol (Butenandt et al., 1959), isolado e identificado da mariposa *Bombyx mori* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Bombycidae), desde este acontecimento tem se intensificado os estudos realizados com o objetivo de isolar, identificar e sintetizar moléculas para serem utilizadas no controle de pragas (Millar et al., 2017; Lubes e Cabrera, 2018; Yan et al., 2018). Dentre os feromônios produzidos pelos insetos, o feromônio sexual tem sido alvo de muitos estudos e está sendo bastante utilizado como isca para o

controle de pragas pertencentes a ordem Lepidoptera (Miller et al., 2019; Svensson et al., 2019; Takeuchi et al., 2019).

Dentre os lepidópteros considerados pragas de importância econômica, os insetos pertencentes a Pyralidae tem sido foco de diversos estudos com o objetivo de isolar e identificar o seu feromônio sexual (Coffelt e Vick, 1987; Harris et al., 2008; Kuenen et al., 2010; Ma et al., 2015).

Entre as subfamílias de Pyralidae, a Phycitinae é uma das mais abundantes, compreendendo aproximadamente 5,000 espécies distribuídas por todo mundo (Li e Ren, 2009). No entanto, somente 35 feromônios sexuais de fêmeas foram identificados nesta subfamília. As misturas feromonais identificadas para as espécies de Phycitinae são caracterizadas pela presença de aldeídos, acetatos, álcoois e hidrocarbonetos (tabela 2) (Ando e Yamamoto, 2018).

**Tabela 2- Espécies de Phycitinae com feromônio sexual identificado e a classe de compostos que pertence os componentes da mistura feromonal.**

Espécie	Classe de composto	Espécie	Classe de composto
<i>Acrobasis nuxvorella</i>	Ald / OAc	<i>Ephestia (= Anagasta) kuehniella</i>	OAc / OH
<i>Acrobasis pyrivorella</i>	OAc	<i>Etiella behrii</i>	OAc + a.c.
<i>Acrobasis vaccinii</i>	OAc + o.c.	<i>Etiella zinckenella</i>	OAc + o.c.
<i>Amyelois transitella</i>	Ald / H / OH + o.c.	<i>Euzophera batangensis</i>	OH + a.c.
<i>Cadra (= Ephestia) cautella</i>	OAc + a.c.	<i>Euzophera punicaella</i>	AOc / OH
<i>Cadra figulilella</i>	OAc	<i>Euzophera pyriella</i>	OH
<i>Cryptoblabes gnidiella</i>	Ald	<i>Euzophera semifuneralis</i>	Ald / OH
<i>Dioryctria abietella</i>	OAc / H + a.c.	<i>Homoeosoma electellum</i>	OH
<i>Dioryctria abietivorella</i>	OAc / H	<i>Homoeosoma nebulellum</i>	Ald
<i>Dioryctria amatella</i>	OAc / H	<i>Hulstia undulatella</i>	AOc / OH
<i>Dioryctria clarioralis</i>	OAc	<i>Hypsipyra grandella</i>	OH + o.c.
<i>Dioryctria disclusa</i>	OAc	<i>Hypsipyra robusta</i>	AOc / OH
<i>Dioryctria mendacella</i>	OAc / H	<i>Maliarpha separatella separatella</i>	OH + o.c.
<i>Dioryctria reniculelloides</i>	OAc	<i>Maliarpha separatella vectiferella</i>	Ald / OH
<i>Dioryctria resinosella</i>	OAc / OH	<i>Myelois cribrella</i>	AOc
<i>Ectomyelois ceratoniae</i>	Ald	<i>Plodia interpunctella</i>	AOc / OH / Ald + a.c.
<i>Elasmopalpus lignosellus</i>	OAc / OH + o.c.	<i>Vitula edmandase serratilineella</i>	Ald / OH + o.c.
<i>Ephestia elutella</i>	OAc / OH		

Ald - aldeído; AOc – acetato; OH – Álcool; H – hidrocarboneto; o.c. – outros componentes; a.c. – outro componente.

O uso de feromônios sexuais como estratégia de controle comportamental oferece uma prática ambientalmente favorável e aplicado com sucesso. O baixo número de feromônios identificados comparado ao alto número de espécies em Phycitinae reforça a necessidade e importância deste estudo que busca elucidar o comportamento sexual de *A. bondari*, servindo como base para o desenvolvimento de técnicas de controle comportamental desta espécie.

### **1.6 Caracterização de sensilas via Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Os insetos possuem um sistema sensorial capaz de detectar compostos que mediam as interações entre os insetos e outros organismos, tais como, a localização de parceiros para acasalamento, locais para realizar oviposição, fonte de alimentação, entre outras interações (Morawo e Fadamiro, 2019; Thöming et al., 2014; Zongxiu et al., 2019).

As estruturas responsáveis pela detecção destes compostos químicos são as sensilas, e podem estar encontradas em diversas regiões da superfície do corpo como por exemplo, nas antenas, pernas, aparelho bucal e ovipositor (Altner e Prillinger, 1980). Callahan (1975) sugere que a antena seja o principal órgão do sistema olfativo do inseto, desta maneira a caracterização das sensilas antenais em *A. bondari* irá auxiliar na compreensão dos mecanismos de olfação para esta espécie.

Dois técnicas que são utilizadas para realizar o estudo destas estruturas em várias espécies de insetos são a microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Através destas técnicas, é possível de realizar estudos qualitativos e quantitativos das sensilas, classificar as sensilas de acordo com sua porosidade, analisar a morfologia interna das sensilas, entre outros estudos. (Huang et al., 2019; Alliaume et al., 2018; Romani et al., 2018; Yan et al., 2017).

A análise por MEV é uma técnica que consiste na emissão de um feixe de elétrons para explorar a superfície de uma amostra. O feixe de elétrons pode ser

guiado, permitindo desta maneira a varredura de toda a superfície das amostras, a interação entre os elétrons e a amostra geram sinais que ao serem captados pelo detector são responsáveis pela formação de imagens tridimensionais (Dedavid et al., 2007).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Extrair e identificar compostos feromonais emitidos por fêmeas virgens de *Atheloca bondari*.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Confirmar a identificação da espécie *A. bondari*;
- Estudar o comportamento sexual (corte e cópula) dos adultos (machos e fêmeas) de *A. bondari*;
- Verificar a composição do perfil de compostos cuticulares dos adultos machos e fêmeas) de *A. bondari*;
- Comprovar a resposta das antenas dos machos mediante aos extratos das fêmeas de *A. bondari*;
- Realizar a análise de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das antenas dos adultos de *A. bondari*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Manutenção de *Atheloca bondari* em laboratório

##### 3.1.1 Coleta de *A. bondari*

Cocos infestados por lagartas coletados periodicamente em plantios de coco nos municípios de Aracaju e Pirambu (SE) e Marechal Deodoro (AL). Os cocos foram transportados até o Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LPqRN) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) onde foram mantidos em potes plásticos (1L) sob temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa média de 80% e um fotoperíodo de 14L: 10E até as lagartas atingirem a fase de pupa. As pupas foram mantidas em potes plásticos (150mL), com papel filtro umedecido, até a emergência dos adultos.

##### 3.1.2 Criação de *A. bondari*

A criação e manutenção foram adaptadas a partir da metodologia de Santana et al. (2011). Após a emergência dos adultos, foram mantidos juntos no mínimo um macho e uma fêmea em gaiolas de reprodução (1L) e alimentados com uma solução de mel diluído a 10%.

As gaiolas foram revestidas internamente por papel toalha e utilizado como tampa uma fina tela de voil. Após o acasalamento e posterior postura no papel toalha, os ovos foram retirados e mantidos em potes plásticos (150mL) com papel filtro umedecido com água destilada e cobertos com filme de PVC.

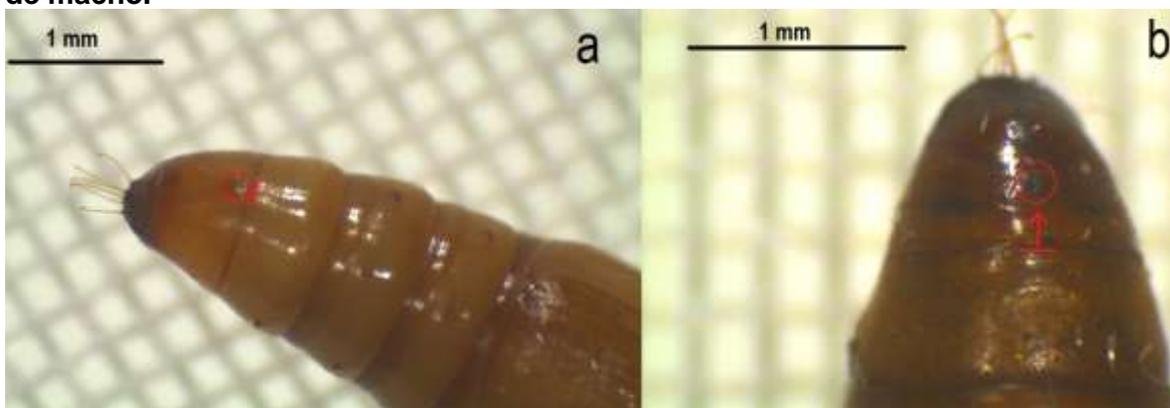
Após a eclosão dos ovos, as lagartas foram individualizadas e colocadas em potes plásticos (150mL) contendo pedaços do mesocarpo do coco cortados em cubos de aproximadamente 2cm (Figura 5) e uma folha de papel filtro no fundo do pote para reter o excesso de umidade, os potes foram cobertos com tecido do tipo voil.

**Figura 5 – Criação de lagartas de *A. bondari* em cubo de mesocarpo de aproximadamente 2cm.**



As lagartas foram removidas dos cubos de mesocarpo e colocados em novos pedaços entre 2 a 3 vezes por semana, sempre que os cubos apresentassem sinal avançado de degradação. Quando as lagartas atingiam o último instar eram colocadas folhas de papel toalha para servir de substrato para formação de pupas. As pupas oriundas da criação foram sexadas de acordo com características do último segmento abdominal (figura 6) e individualizadas em potes plásticos com a finalidade de utilizar os adultos virgens recém-emergidos nos experimentos.

**Figura 6 - Dimorfismo sexual em pupas de *A. bondari*: (a) Pupa de fêmea, (b) pupa de macho.**



### 3.2 Identificação de *A. bondari*

De acordo com Heinrich (1956) os machos de *A. bondari* apresentam um tufo de cerdas amarelas na parte externa da tíbia do último par de pernas, sendo este tufo não encontrado em *A. subrufella*. Para a confirmação da espécie de *Atheloca* que foi estudada neste trabalho foi observada a presença desta característica morfológica nos espécimes adultos e também foi realizada uma identificação molecular.

Para os experimentos de extração e amplificação de DNA foi utilizada uma adaptação baseada no protocolo proposto por Folmer et al. (1994). As amostras de DNA foram extraídas a partir de 4 indivíduos na fase de lagarta e 4 indivíduos na fase adulta, sendo que para cada fase de vida foram utilizados 2 da população de Sergipe e 2 da população de Alagoas.

Os indivíduos foram macerados separadamente em um eppendorf de 1,5 mL contendo 100 µl de uma solução de chelex 100 a 6% (diluído em H<sub>2</sub>O), em seguida o material resultante foi agitado em vortex e centrifugado a 5°C até atingir 13.000 rpm. Logo após o material foi incubado em banho maria a 57°C por 15 min, agitado em vortex e centrifugado a 5°C até atingir 13.000 rpm, foi incubado em banho maria a 99°C por 8 min e novamente agitado em vortex. Por fim o material foi centrifugado a 5°C e 13.000 rpm por 5 min, a fase intermediária foi coletada e conservada no freezer a -20°C.

Para a amplificação do fragmento de Citocromo c oxidase subunidade I (COI) do DNA mitocondrial foram utilizados primers específicos para insetos, nomeados LCO1490 forward GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG e HCO2198 reverse TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA.

Para tanto, em um eppendorf de 0,2 mL foi adicionado 15µl de AMPLIQON (Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED / 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> final concentration) juntamente com 1µl do DNA de cada amostra. A reação de amplificação foi realizada em um termociclador (MaxyGene II, Axygen®), onde os ciclos de temperatura consistiram de desnaturação inicial de 94°C/3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C/30 segundos, anelamento a 50°C/30 segundos e extensão a 72°C/1 minuto, seguidos de extensão final a 72°C/10 minutos.

Após a amplificação uma alíquota foi removida ser analisado por eletroforese e o restante foi acondicionado para futuro sequenciamento. A eletroforese foi realizada em gel agarose a 1,2%, e foi adicionado na placa uma mistura contendo 5 µl da amostra com 2 µl de azul de bromofenol. O marcador de peso molecular 1 kb foi utilizado como padrão.

As amostras com boa qualidade de amplificação foram enviadas para a MacroGen na Coreia do sul, onde foi realizado o sequenciamento. As sequências obtidas foram limpas e alinhadas utilizando o CodonCode Aligner 8.0.2.

As sequências obtidas no CodonCode Aligner foram comparadas com outras sequências depositadas no GenBank e no BoldSystems. Para realizar a comparação das sequências obtidas neste trabalho com as disponíveis nos bancos de dados online, foram utilizadas somente sequências depositadas para *Atheloca*.

Após utilizar a ferramenta BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide) versão 2.10.0 (Zhang et al., 2000) e realizar a busca pelo termo "Atheloca" no BoldSystems foi possível encontrar 12 sequências para o gênero *Atheloca* (Tabela 3).

**Tabela 3 – Informações das sequências de *Atheloca*, disponíveis no GenBank e no BoldSystems, utilizadas neste estudo.**

Identificação / espécie	Base de dados	País de depósito
<i>Atheloca sp.*</i>	ND	Brasil
CCDB-28560-D10 / <i>Atheloca bondari</i>	BoldSystems	Colômbia
MF973050 / <i>Atheloca bondari</i>	GenBank	Brasil
MF973051 / <i>Atheloca bondari</i>	GenBank	Brasil
MF973052 / <i>Atheloca bondari</i>	GenBank	Brasil
MF973053 / <i>Atheloca bondari</i>	GenBank	Brasil
MF973054 / <i>Atheloca bondari</i>	GenBank	Brasil
BIOUG01396-C08 / <i>Atheloca subrufella</i>	BoldSystems	EUA
BIOUG01396-D03 / <i>Atheloca subrufella</i>	BoldSystems	EUA
BIOUG01396-D09 / <i>Atheloca subrufella</i>	BoldSystems	EUA
CCDB-28560-D09 / <i>Atheloca subrufella</i>	BoldSystems	EUA
KP693949 / <i>Atheloca subrufella</i>	GenBank	EUA
BIOUG01396-D10 / <i>Atheloca subrufella</i>	BoldSystems	EUA

\* - Sequência obtida neste estudo, ND - ainda não foi realizado depósito em nenhum banco de dados.

O software MEGA versão 6.0 foi utilizado para realizar o alinhamento (Clustal W) das sequências, para calcular a distância par-a-par das sequências, e para construir uma árvore filogenética (Neighbor-Joining). Foi utilizado o modelo Kimura 2-p (Kimura, 1980) para calcular a distância par-a-par e para a construção da árvore filogenética.

### **3.3 Bioensaios comportamentais de corte e cópula de *A. bondari***

O comportamento de corte dos machos de *A. bondari* foi observado diretamente através de bioensaios utilizando uma arena de vidro retangular (20x10x15cm) contendo uma fêmea realizando comportamento de chamamento aprisionada em uma gaiola (modelador de cacho para cabelo de 5cm).

A gaiola contendo a fêmea de *A. bondari* estava coberta por um pedaço de tecido voil para permitir a liberação de compostos e contato físico entre o macho e a fêmea, mas prevenindo a cópula.

Foram realizadas dez repetições, sendo cada repetição formada por um casal diferente de adultos. Para realização do bioensaio, quatro pontos foram demarcados na arena e a cada repetição a fêmea foi alocada em um ponto diferente, objetivando a eliminação de qualquer fator externo físico, químico ou visual. Nos bioensaios foram utilizados adultos de *A. bondari* com no mínimo 24 horas de idade, assegurando a maturidade sexual (Bento et al., 2006).

Os bioensaios de corte foram realizados a partir da primeira hora da escotofase, de acordo com o período do comportamento de chamamento da fêmea (Nascimento et al., 2016) sob condições laboratoriais de  $25 \pm 2$  °C e 60% RH. Os casais foram observados durante um período de 10 minutos.

O comportamento de cópula foi observado diretamente em potes plásticos (250mL) contendo um casal virgem de *A. bondari*. Foram realizadas três repetições, para cada repetição foi utilizado um casal diferente de adultos. O comportamento de cópula foi observado a partir da primeira hora da escotofase, de acordo com o período do comportamento de chamamento da fêmea (Nascimento et al., 2016). A descrição do comportamento de cópula foi realizada através da análise de vídeos.

### **3.4 Microscopia eletrônica de varredura das antenas de *A. bondari***

A Microscopia eletrônica de varredura das antenas foi realizada no Laboratório de análise instrumental do departamento de química do Instituto Federal de Alagoas (IFAL). Foram utilizadas antenas de adultos de *A. bondari* provenientes da criação estoque, a partir de insetos coletados em Sergipe. As antenas utilizadas para a análise no MEV foram removidas de 3 machos e 3 fêmeas de *A. bondari*, acondicionados em etanol (70%), ainda vivos, no seu primeiro dia de emergência (aproximadamente 24h de idade).

Após serem removidas dos adultos as antenas foram desidratadas sendo imersas numa série de soluções de etanol diluído em água destilada com concentrações de 50%, 70%, 80% e 90%. As antenas permaneciam imersas durante 2 minutos em cada solução, e logo após acondicionadas em etanol P.A..

Para uma melhor visualização das sensilas, as escamas da face dorsal das antenas foram removidas com o auxílio de uma fita adesiva. Após a remoção das escamas, as antenas foram montadas sobre fita adesiva elétrica de sulfato de carbono, em suportes de alumínio. As antenas montadas nos suportes foram mantidas por 1h no vácuo em dessecador com sílica, para garantir que toda a umidade fosse removida.

Após serem removidas do dessecador as antenas foram levadas para o Laboratório de análise instrumental do departamento de química do Instituto Federal de Alagoas, onde foram metalizadas em um metalizador (Q150R ES, Quoron®) (Figura 7). A corrente durante o processo de metalização com alvo de ouro foi de 45 mA durante 4 minutos. As antenas foram analisadas usando um microscópio eletrônico de varredura (INCAx-act, Oxford-instruments®) (Figura 8) a 20 ou 10kV.

**Figura 7 – Metalizador Q150R ES, Quoron® (A), Interior do metalizador com amostras montadas para serem metalizadas (B).**



**Figura 8 – Microscópio eletrônico de varredura INCAx-act, Oxford-instruments® (A), Interior do microscópio com amostras montadas já metalizadas para serem analisadas (B).**



### 3.5 Extração de compostos feromonais de *A. bondari*

#### 3.5.1 Extração por solvente da genitália de *A. bondari*

Os extratos da glândula produtora de feromônio de fêmeas de *A. bondari* foram realizados através da retirada da porção final do abdômen de fêmeas virgens, entre o terceiro e quinto dia de idade, durante o período que houve um maior número de fêmeas realizando o comportamento de chamamento e durante um maior intervalo de duração, entre o início da terceira hora e fim da sétima hora da escotofase (Nascimento et al., 2016).

Durante o comportamento de chamamento, as fêmeas de *A. bondari* exibem a estrutura genital, onde possivelmente está localizada a glândula produtora de feromônio. Assim, através de uma pequena pressão na região terminal do abdômen, tais estruturas foram retiradas com o auxílio de tesoura microcirúrgica esterilizada e posteriormente imersas em n-hexano grau HPLC bidestilado (Vetec®).

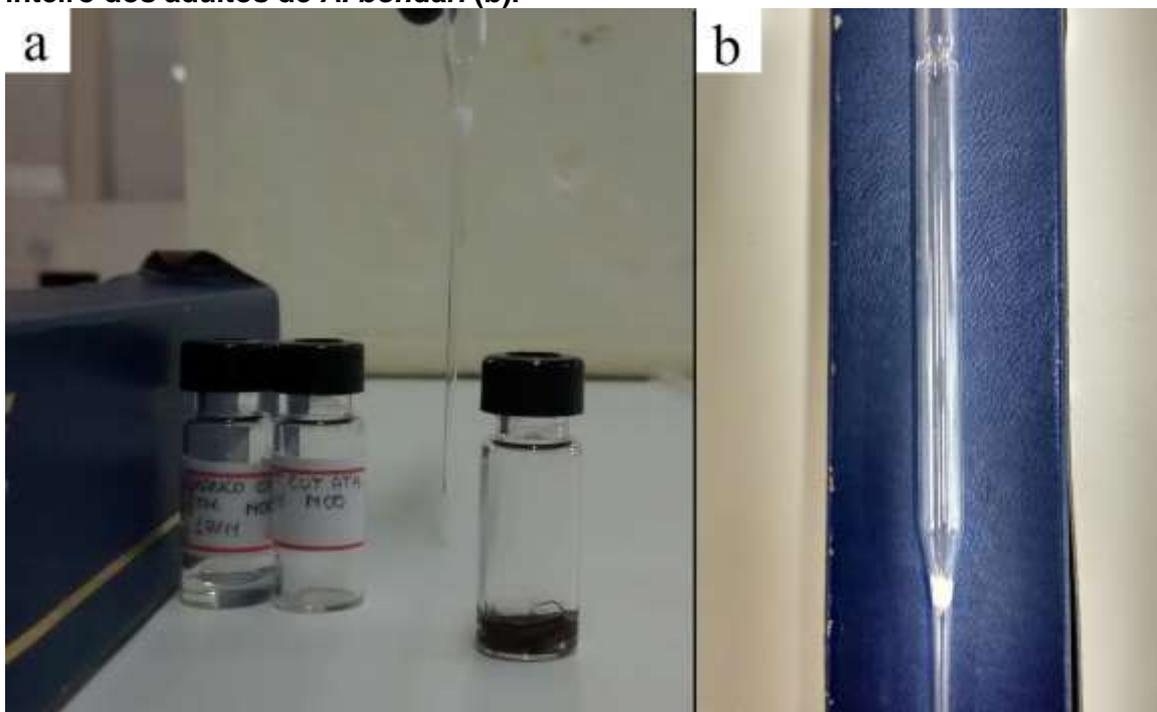
A extrações de glândulas abdominais de *A. bondari* foram realizadas através de três metodologias: 1) Na primeira metodologia, as porções finais do abdômen das fêmeas foram mantidas imersas no hexano, na proporção de 5µL por genitália, em frascos de vidro de 2 mL e o extrato obtido foi posteriormente estocado a -20°C para futuras análises químicas e bioensaios; 2) Na segunda metodologia, as porções finais do abdômen foram mantidas imersas no hexano, na proporção de 5µL por genitália, em frascos de vidro de 2 mL e o extrato obtido após 24h foi filtrado em pipetas de pasteur contendo uma pequena quantidade de sílica e posteriormente estocado a -20°C; 3) Na terceira metodologia, as porções finais do abdômen foram mantidas imersas no hexano, na proporção de 5µL por genitália, em frascos de vidro de 2 mL por 20 minutos e posteriormente todo solvente sobrenadante foi removido e acumulado em um único frasco de vidro de 2mL até atingir uma alta quantidade de genitálias extraídas e o extrato obtido foi posteriormente estocado a -20°C.

#### 3.5.2 Extração por solvente de compostos cuticulares de *A. bondari*

Os compostos cuticulares foram extraídos por meio da imersão do corpo inteiro de adultos de *A. bondari*, utilizando uma quantidade suficiente para cobrir os insetos, os insetos e mantidos por 15 minutos (Figura 9). O solvente utilizado foi n-hexano grau HPLC bidestilado (Vetec®).

O solvente sobrenadante foi coletado e filtrado em uma pipeta de pasteur contendo lã de vidro, para remover resíduos sólidos. Os extratos obtidos foram concentrados em um fluxo de N<sub>2</sub> até atingir a concentração final de 10µL por inseto. A extração foi realizada durante a escotofase e foram utilizados machos e fêmeas virgens com no mínimo 24h de idade.

**Figura 9 - Processo de extração de corpo inteiro de adultos de *A. bondari*: à direita vial contendo adultos imersos no solvente e à esquerda vials contendo solvente sobrenadante (a); pipeta com lã de vidro utilizada para filtração dos extratos de corpo inteiro dos adultos de *A. bondari* (b).**



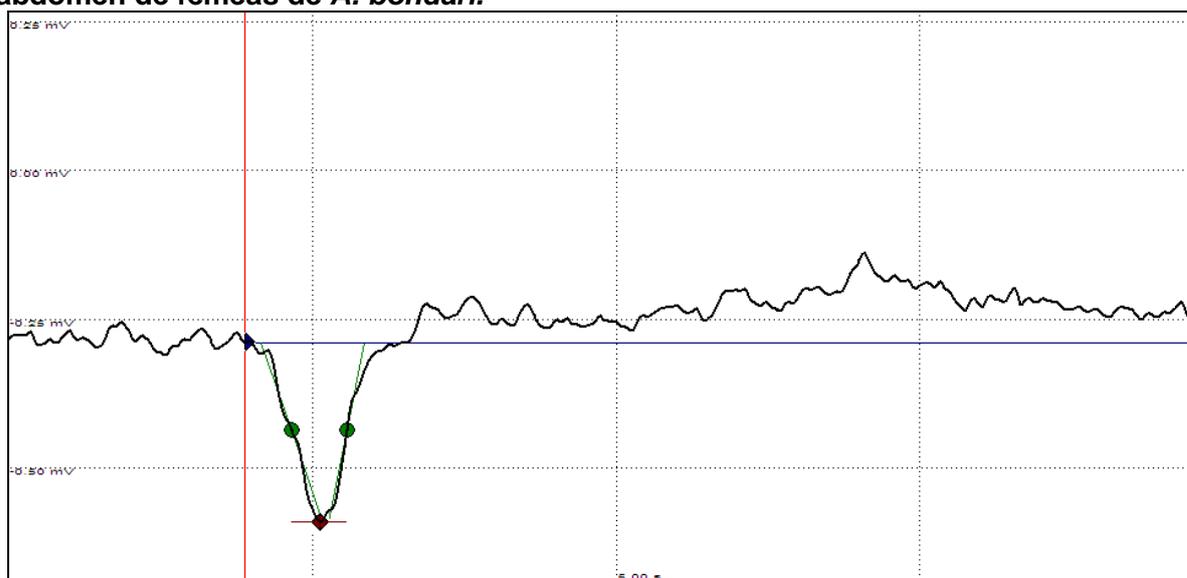
### 3.6 Eletroantenografia

A resposta das antenas dos machos e das fêmeas de *A. bondari* para os extratos obtidos neste trabalho e para padrões analíticos foi avaliada por meio de “puff”. Para tanto, foi utilizado como fonte de odor os extratos de corpo inteiro de fêmeas de *A. bondari*, extrato de corpo inteiro de machos de *A. bondari*, extrato da genitália de fêmeas de *A. bondari* e n-hexano grau HPLC bidestilado submetido sob as mesmas condições para cada tratamento (controle). A resposta das antenas dos adultos de *A. bondari* também foram submetidas a padrões analíticos de ácidos, ésteres e alcanos, com concentração de 50ppm.

Para testar as respostas das antenas dos machos de *A. bondari* foram utilizados como fonte de odor, os extratos de corpo inteiro de fêmeas, extrato da genitália de fêmeas e os padrões analíticos de ácidos, ésteres e alcanos. Para testar as respostas das antenas das fêmeas de *A. bondari* foi utilizado como fonte de odor apenas o extrato de corpo inteiro de macho.

Uma alíquota de 10 $\mu$ L de cada tratamento foi utilizada para realização de cada puff. Um sistema gerador de pulsos de ar (Stimulus Controller CS 55, Syntech®) foi programado para gerar um puff com duração de 0,5s, submetendo as antenas aos respectivos tratamentos, individualmente. A gravação da resposta da antena foi obtida através do software EAGPro versão 2.0.2 (Figura 10).

**Figura 10 – Gravação da resposta da antena de macho de *A. bondari* no momento da realização de um puff contendo como fonte de odor extrato da porção final do abdômen de fêmeas de *A. bondari*.**



### 3.7 Cromatografia gasosa acoplada a eletroantenografia

Os compostos que compõem a mistura feromonal das espécies de Pyralidae, apresentam algumas características estruturais em comum. Por exemplo, dentre as 35 espécies de Phycitinae com mistura feromonal identificadas, 32 apresentam pelo menos em sua mistura feromonal um álcool, aldeído ou Acetato com insaturação na posição 9 (Ando e Yamamoto, 2018).

Com o intuito realizar um estudo exploratório e de identificar características estruturais de possíveis compostos feromonais em *A. bondari*, foram realizadas análises de cromatografia gasosa acoplada a eletroantenografia (CG-EAG). Para isto, as antenas dos machos e das fêmeas de *A. bondari*, foram testadas utilizando como fonte de odor compostos identificados como atrativos para adultos de espécies pertencentes à Pyralidae disponíveis no LPQRN da UFAL.

A mistura contendo os padrões disponíveis no LPQRN foi injetada no CG-EAG (Shimadzu-GC2010) equipado com colunas RTX-5 (30 m, 0,25 mm d.i.; Restek®, Bellefonte, PA, USA). O volume de injeção foi de 2 ou 4µL no modo “splitless”, a temperatura do injetor foi de 250°C, e hidrogênio foi utilizado como gás de arraste.

A programação da temperatura da coluna foi de 50°C inicial, com velocidade de aquecimento de 8°C por minuto até atingir 280°C. As respostas das antenas dos machos e das fêmeas de *A. bondari* para a mistura dos padrões analíticos foram registradas utilizando o software GcEad32 versão 4.6.

### **3.8 Análises químicas e identificação de compostos feromonais de *A. bondari***

As amostras obtidas foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia gasosa acoplada a detector por ionização de chama (CG-DIC) na Pontifícia Universidade Católica de Valparaíso (PUCV) e na UFAL.

#### **3.8.1 Identificação dos compostos feromonais de *A. bondari***

A identificação dos compostos foi realizada na PUCV e na UFAL em um CG-EM Shimadzu QP2010 Ultra equipado com uma coluna RTX-5 ou RTX-1 (30m, 0,25mm, 0,25µm; Restek, Bellefonte, PA, USA). O volume de injeção foi de 1µL no modo “splitless”, a temperatura do injetor foi de 200°C, a temperatura da fonte de íons foi de 200°C e o feixe de elétrons foi de 70eV. Hélio foi utilizado como gás de arraste.

A programação da temperatura da coluna foi diferente para cada tipo de análise. A programação utilizada para analisar os extratos de glândulas na UFAL foi de 50°C por 5min, 5°C por minuto até atingir 250°C, e finalmente foi mantida a 250°C

por 10min, já a programação para analisar os extratos de corpo inteiro na UFAL foi de 50°C por 1min, 8°C por minuto até atingir 280°C, e finalmente foi mantida a 280°C por 10min. A programação utilizada para analisar os extratos de corpo inteiro na PUCV foi de 50°C por 1min, 8°C por minuto até atingir 270°C, e finalmente foi mantida a 270°C por 30min.

A identificação dos compostos foi confirmada por comparação do índice de Kovats calculado, análise da fragmentação de cada composto, comparação do espectro de massas de cada composto com as bibliotecas de referência (FFNSC 1.3; NIST 08s; NIST 27; NIST 147 e WILEY 229) e com a literatura, e quando disponível foi realizada a coinjeção de padrões de compostos sintéticos.

### 3.8.2 Quantificação dos compostos cuticulares de *A. bondari*

A quantificação dos compostos foi realizada na UFAL em um CG-DIC Shimadzu GC2010 equipado com uma coluna RTX-5 (30m, 0,25mm. 0,25µm; Restek, Bellefonte, PA, USA). O volume de injeção foi de 1µL, sendo 0,5µL da amostra e 0,5µL do padrão interno, no modo "splitless". Nitrogênio foi utilizado como gás de arraste. A programação da temperatura da coluna foi de 50°C por 1min, 8°C por minuto até atingir 280°C, e finalmente foi mantida a 280°C por 10min.

A quantificação dos compostos foi realizada por meio do método de normalização de áreas e o tridecano (C<sub>13</sub>) foi utilizado como padrão interno. Além da quantificação dos compostos realizada por normalização de áreas no CG-DIC, também foi realizada a contribuição dos compostos presentes nos extratos cuticulares de machos e fêmeas de *A. bondari*. A contribuição foi calculada como uma porcentagem de acordo com a metodologia seguida por Geervliet et al. (1997), dividindo a área do pico de cada composto pela área total dos picos dos compostos identificados na amostra.

## 3.9 Padrões analíticos

Para confirmar a identificação dos compostos presentes nos extratos de *A. bondari* foram preparadas soluções de padrões analíticos comerciais (Sigma-Aldrich®), os padrões foram preparados na concentração de 50ppm em solvente orgânico hexano HPLC bidestilado (Vetec®). Quando não foi possível a obtenção de padrões

comerciais, foi realizada a síntese em laboratório. Para obtenção dos padrões linoleato de etila, oleato de etila e palmitato de etila, foi realizada uma reação de esterificação dos ácidos linoleico, oleico e palmítico respectivamente.

Para a reação de esterificação foi utilizado uma alíquota desejada do ácido desejado em etanol ao qual foi adicionado  $H_2SO_4$  como catalisador e deixado em refluxo a  $85^\circ C$  por 4h. Após esse período o material reacional foi neutralizado com solução diluída de NaOH. O material foi adicionado em um funil de separação e foi feita a extração com acetato de etila ( $C_4H_8O_2$ ), em seguida a solução em acetato de etila foi lavada com solução salina saturada. A fase orgânica foi seca em  $Na_2SO_4$  por 2h e em seguida foi filtrada em papel filtro e concentrada no rotaevaporador.

### **3.10 Análises estatísticas**

As análises estatísticas dos dados foram realizadas no software R (versão 3.4.1). Para verificar diferença significativa entre os perfis de compostos cuticulares de machos e fêmeas de *A. bondari* foi realizada uma Análise de Componentes Principais (ACP), em seguida foi realizada uma análise de variância para verificar se os valores do 1º componente principal (PC1) variavam de acordo com o sexo. Para elucidar diferença significativa na resposta das antenas de machos e fêmeas entre os extratos obtidos neste trabalho e o tratamento controle foram utilizados teste T e teste de Wilcoxon.

## **4. RESULTADOS**

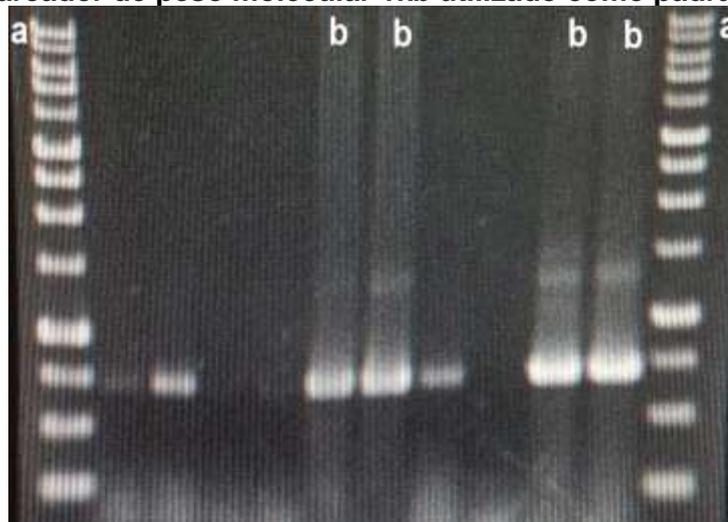
### **4.1 Análise molecular**

O resultado da eletroforese mostrou que o protocolo utilizado para realizar a extração e amplificação do DNA mitocondrial foi satisfatório (figura 11). Dentre as 8 amostras de DNA extraídas, 4 amostras extraídas de adultos ainda serão enviadas para sequenciamento e 4 amostras extraídas de lagartas foram enviadas para sequenciamento.

A partir das amostras enviadas para sequenciamento, 3 foram excluídas por apresentarem uma baixa qualidade, a partir da amostra restante foi obtida uma sequência final que apresentou 678pb (figura 12), após a comparação desta sequência com as sequências encontradas no GenBank e no BoldSystems

depositadas para o *Atheloca*, constatou-se que a espécie em questão é *Atheloca bondari*.

**Figura 11 – Resultado da eletroforese em placa de gel de agarose contendo as amostras de *Atheloca* sp. amplificadas neste trabalho (b) e marcador de peso molecular 1kb utilizado como padrão (a).**



**Figura 12 – Sequência final de *Atheloca* sp. com 678pb obtidas neste trabalho.**

```
AAGATATTGGAAC TTTATATTTATTTTCGGAATTTGATCTGGAATAGTTGGAA
CTTCTTTAAGTCTTTAATTCGTGCTGAATTAGGAACTCCAGGATCATAATTG
GAGATGATCAAATTTACAATACTATTGTAAGTGGACATGCATTTATTATAATTT
TTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTACCATA
ATACTAGGTGCCCCAGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGA
ATATTACCCCTTCTCTTACATTATTAATTTCAAGCAGAATTGTAGAAAATGGA
GCAGGAACTGGTTGAACTGTTACCCCCCTTTCATCTAATATTGCCCATGG
TGGAAGATCAGTTGATTTAGCTATTTCTCTCTACATTTAGCAGGAATTTTCATC
AATTTTAGGAGCTATTAATTTATTACAATATTATTAATATAAAATTAATGGA
TTATCTTTTGATCAAATACCTTTATTTGTTGAGCTGTTGGTATTACAGCTTTAT
TATACTTCTATCTTTACCTGTACTAGCTGGAGCTATTACTATATTACTAAGTAT
CGAAACTTAAATACATCTTTTTTTGACCCTGCGGGAGGAGGAGATCCAATCT
TATATCAACATTTATTTTGATTTTTTG
```

Dentre as sequências utilizadas para construir a matriz de distância genética e a árvore filogenética neste trabalho, foram utilizadas 5 sequências de uma pesquisa realizada recentemente Paz-Neto et al. (2019), nesta pesquisa foram

coletados espécimes de *A. bondari* em estados do nordeste brasileiro e realizaram uma identificação taxonômica destes através de análises morfológica e molecular.

Os espécimes utilizados para análise molecular foram coletados no estado de Pernambuco, e as sequências obtidas na pesquisa foram comparadas com sequências de *A. subrufella* e *A. bondari*. Os resultados destas análises revelaram que a distância Interespecífica (0.030–0.034) foi maior que a distância intraespecífica (0.000–0.002).

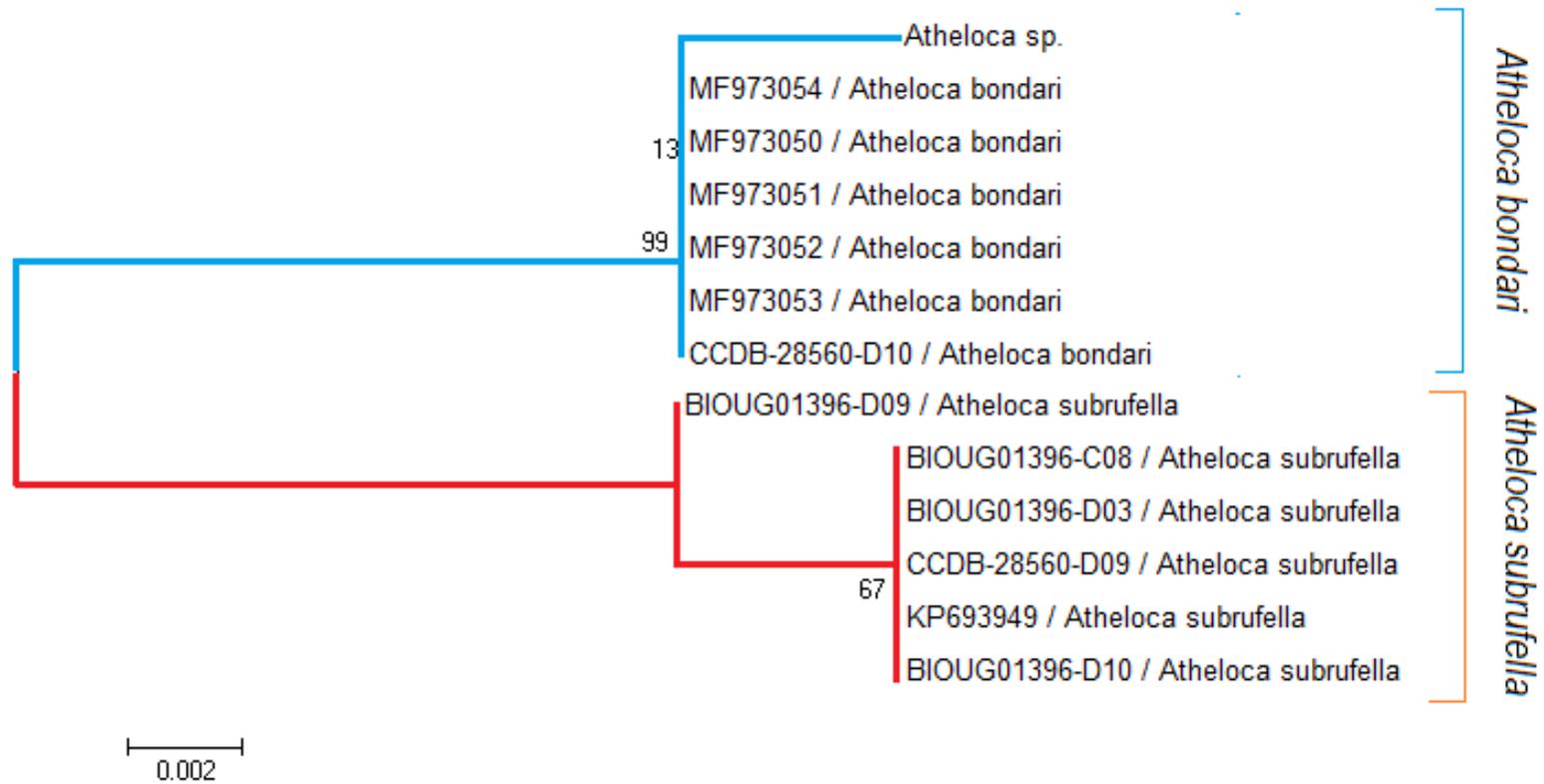
Os resultados encontrados por Paz-Neto et al. (2019) corroboraram com os resultados encontrados nesta pesquisa, onde a matriz de distância genética entre as espécies (tabela 4) mostrou que os valores são maiores quando a sequência obtida neste estudo foi comparada com as sequências de *A. subrufella* (0,027 – 0,031) do que quando comparada com as sequências de *A. bondari* (0,004).

Além disso a construção da árvore filogenética revelou a formação de dois grupos (Figura 13), sendo um grupo formado por sequências de *A. subrufella* e o outro grupo por sequências de *A. bondari*, de maneira que a sequência obtida neste trabalho apresentou maior proximidade com as sequências de *A. bondari*, apresentado similaridade com os resultados obtidos por Paz-Neto et al. (2019).

Além da identificação molecular Paz-Neto et al. (2019) enviaram espécimes coletados no estado de Pernambuco para serem identificados morfológicamente por um taxonomista, que identificou os exemplares como *A. bondari*. Em seguida foram coletados espécimes de mais 4 estados do nordeste brasileiro (Paraíba, Sergipe, Alagoas e Rio Grande do Norte) e por comparação concluíram que os espécimes se tratavam de adultos *A. bondari*.

Estes fatos reforçam os resultados obtidos nesta pesquisa já que os exemplares aqui utilizados também foram coletados nos estados de Sergipe e Alagoas e apresentaram o tufo de cerdas amarelas na parte externa da tíbia do último par de pernas dos machos, que foi descrito por Heinrich (1956) como sendo encontrado apenas em *A. bondari*.

Figura 13 – Árvore filogenética construída utilizando o método Neighbor-joining (agrupamentos vizinhos, NJ).



**Tabela 4 – Distâncias genéticas entre as sequências das espécies de *Atheloca* utilizando o modelo Kimura 2-p.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 <i>Atheloca</i> sp.													
2 <i>Atheloca subrufella</i>	0,031												
3 <i>Atheloca subrufella</i>	0,031	0,000											
4 <i>Atheloca subrufella</i>	0,027	0,004	0,004										
5 <i>Atheloca subrufella</i>	0,031	0,000	0,000	0,004									
6 <i>Atheloca subrufella</i>	0,031	0,000	0,000	0,004	0,000								
7 <i>Atheloca subrufella</i>	0,031	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000							
8 <i>Atheloca bondari</i>	0,004	0,027	0,027	0,023	0,027	0,027	0,027						
9 <i>Atheloca bondari</i>	0,004	0,027	0,027	0,023	0,027	0,027	0,027	0,000					
10 <i>Atheloca bondari</i>	0,004	0,027	0,027	0,023	0,027	0,027	0,027	0,000	0,000				
11 <i>Atheloca bondari</i>	0,004	0,027	0,027	0,023	0,027	0,027	0,027	0,000	0,000	0,000			
12 <i>Atheloca bondari</i>	0,004	0,027	0,027	0,023	0,027	0,027	0,027	0,000	0,000	0,000	0,000		
13 <i>Atheloca bondari</i>	0,004	0,027	0,027	0,023	0,027	0,027	0,027	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	

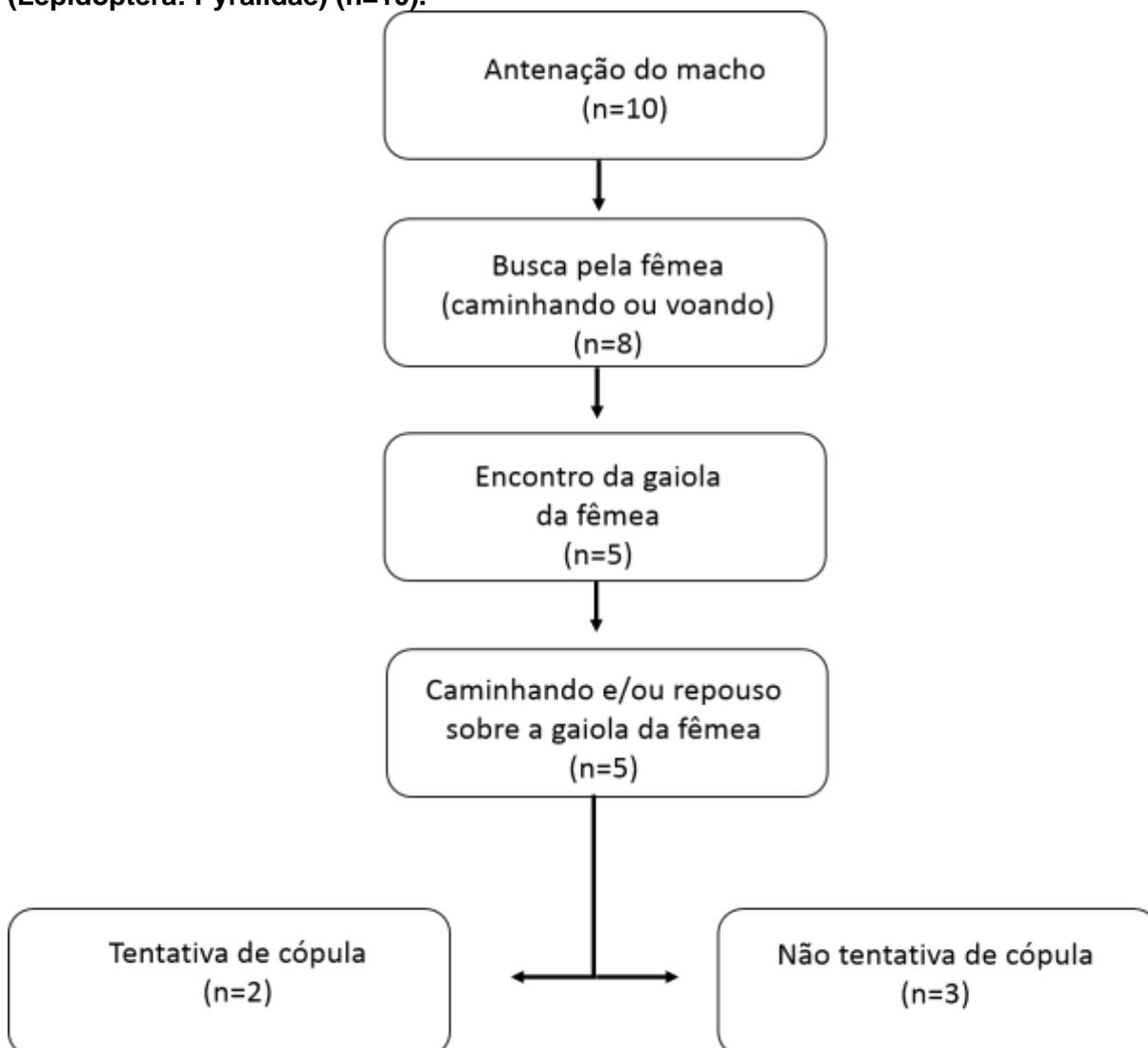
## 4.2 Bioensaios comportamentais de corte e cópula

Durante o período de observação dos bioensaios foi possível identificar alguns padrões comportamentais de machos de *A. bondari*, classificados como: antenação, busca pela fêmea (caminhando e/ou voando pela arena); encontro da fêmea; caminhar sobre a gaiola da fêmea; repouso sobre a gaiola da fêmea; antenando a superfície da gaiola da fêmea; tentativa de cópula (batendo as asas e arqueando o abdômen); não tentativa de cópula (Figura 14).

As fêmeas realizaram o comportamento de chamamento durante todo o período de observação do bioensaio. Além disso, ambos os sexos, machos e fêmeas, apresentaram comportamento de antenação contínua durante toda a corte.

Os padrões de comportamento de cópula são apresentados na Figura 15 e descritos da seguinte maneira: macho e fêmea apresentam comportamento de antenação; a fêmea apresenta o comportamento de chamamento, com as asas ligeiramente separadas, expondo a glândula de feromônio na porção final do abdome arqueado; a fêmea gira em 360° a porção final do abdômen juntamente com a glândula de feromônio; o macho realiza um giro de 360°; a fêmea rotaciona seu corpo em 360° em torno de seu próprio eixo em ambos sentidos (horário e anti-horário); o macho se aproxima da fêmea; macho e fêmea apresentam o comportamento de antenação um em frente ao outro e tocando suas antenas; o macho levanta as asas exibindo o hairpencil na porção final do abdômen e efetua o batimento das asas tentando realizar a cópula; o macho salta sobre a fêmea enquanto mantém suas antenas tocando as antenas da fêmea e em seguida repousa com seu abdômen na posição oposta do abdômen da fêmea; macho e fêmea iniciam a cópula.

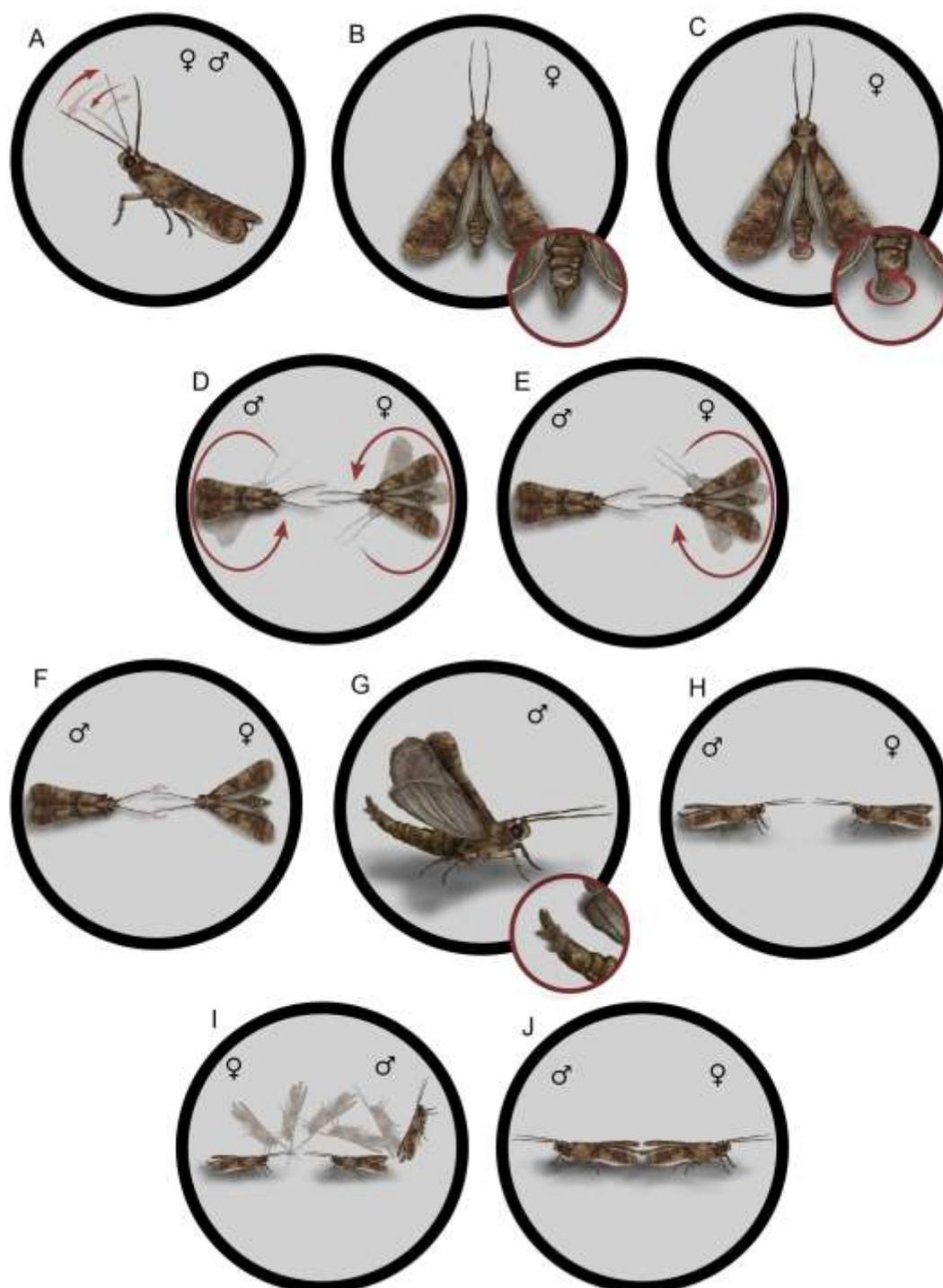
Figura 14 – Etograma do comportamento de corte de *Atheloca subrufella* Hulst, 1887 (Lepidoptera: Pyralidae) (n=10).



Baseado nos resultados e nos padrões comportamentais apresentados pelos adultos de *A. bondari* no presente estudo é possível assumir que a corte e a cópula nesta espécie é mediado pela presença de um feromônio sexual.

Os resultados sugerem que as fêmeas de *A. bondari* liberam um feromônio de longa distância para atrair os machos, os quais reconhecem a fêmea através do contato físico, provavelmente este reconhecimento pode ser mediado por um feromônio de curta distância e/ou por hidrocarbonetos cuticulares.

Figura 15 – Etograma do comportamento de cópula de *Atheloca subrufella* Hulst, 1887 (Lepidoptera: Pyralidae). macho e fêmea antenando (A), fêmea realizando comportamento de chamamento (B, C), Rotação do corpo de macho e fêmea (D, E), Macho e fêmea tocando as antenas (F), macho levantando as asas e exibindo o hairpencil (G), macho saltando sobre a fêmea e em seguida parado com seu abdômen em posição oposta ao abdômen da fêmea (H, I), posição de cópula (J).



O padrão de reconhecimento observado em *A. bondari* também pode ser observado em outras espécies de mariposas Pyralidae, a mariposa *Amyelois transitella* Walker, 1863 (Lepidoptera: Pyralidae: Phycitinae), exibiu padrões comportamentais similares tais como, antenação durante toda a escotofase indicando uma atividade sexual de machos e fêmeas, a exposição da porção final do abdômen da fêmea e o reconhecimento da fêmea que o macho realiza através da antenação (Parra-Pedrazzoli e Leal, 2006).

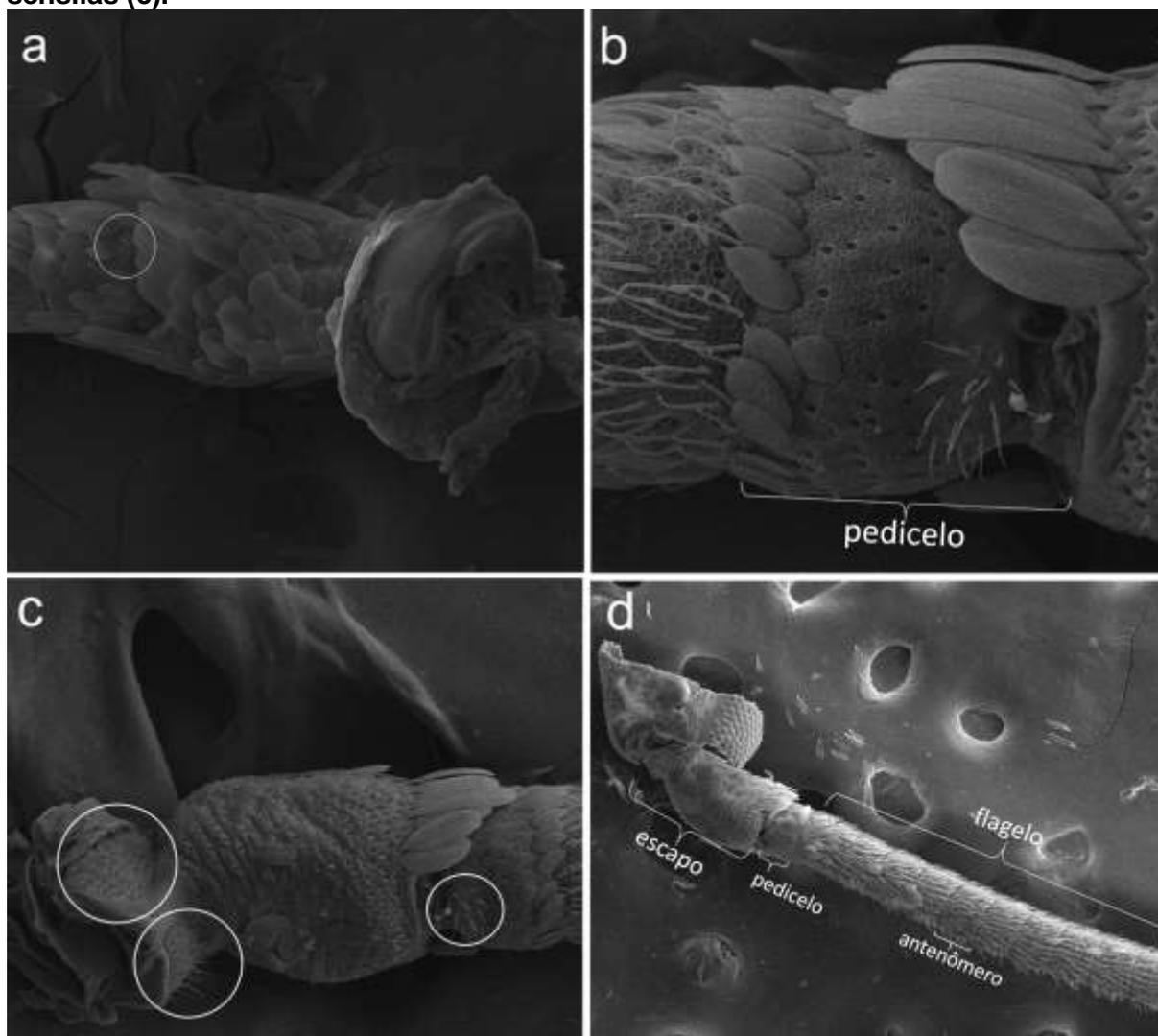
A mariposa *Dioryctria abietella* (Lepidoptera: Pyralidae: Phycitinae) também apresentou um comportamento muito similar a *A. bondari*, tais como: 1) o padrão de comportamento de chamamento apresentado pela fêmea; 2) o comportamento do macho e da fêmea tocarem um a antena do outro assumindo a posição frontal; 3) a tentativa de copula do macho, onde o mesmo levanta suas asas exibindo o hairpencil na porção final do abdômen e efetua o batimento das asas tentando realizar a cópula, em seguida o macho salta sobre a fêmea enquanto mantém suas antenas tocando as antenas da fêmea e depois repousa com seu abdômen na posição oposta do abdômen da fêmea (Fatzinger e Asher, 1971).

Estes padrões comportamentais observados nos estudos do comportamento reprodutivo com *A. bondari* embasam o fato de que o acasalamento é mediado por compostos feromonais. Além disso a descrição deste comportamento será importante em estudos futuros para que objetivarem isolar, identificar e utilizar os compostos feromonais de *A. bondari* como medida de controle comportamental desta praga.

### **4.3 Microscopia de varredura eletrônica das antenas**

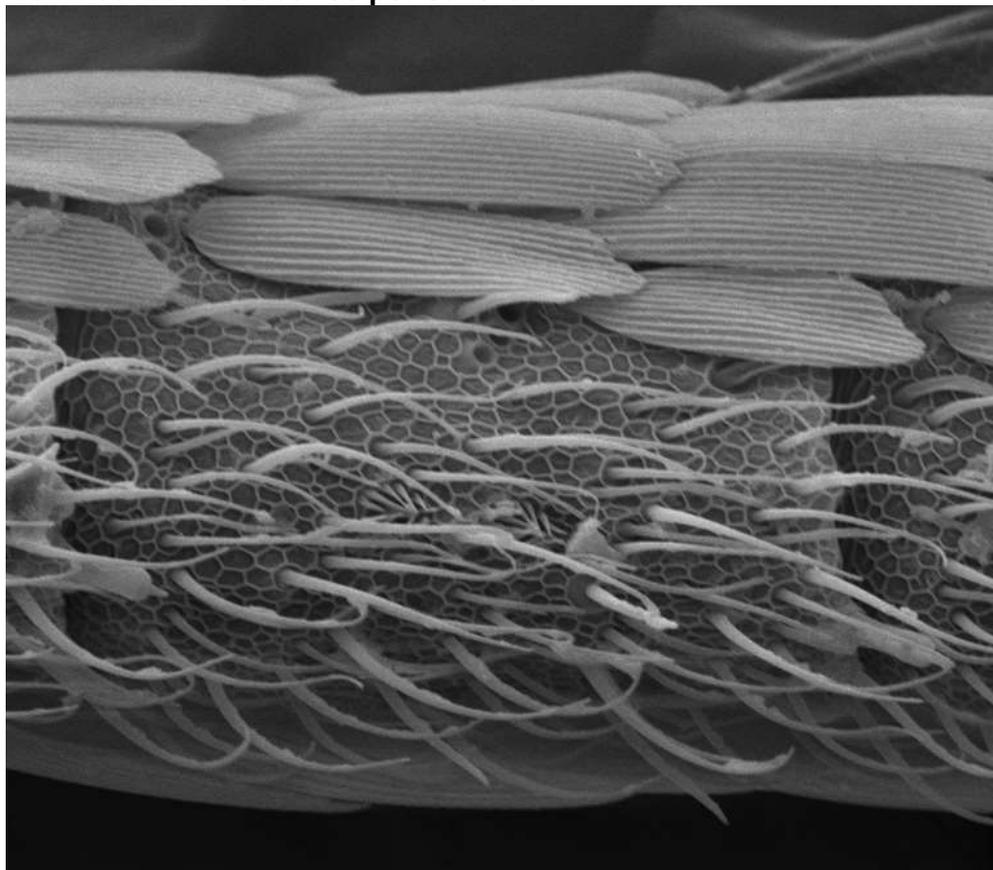
As antenas de *A. bondari* em ambos os sexos são filiformes e segmentadas. Cada antena é constituída por 3 segmentos: escapo, pedicelo e flagelo (Figura 16). Através da MEV foi possível observar que o escapo e o pedicelo são recobertos por escamas em sua maior parte, e a região não recoberta por escamas apresenta a presença de algumas sensilas (Figura 16).

Figura 16 – Antena de *A. bondari* dividida em escapo, pedicelo, flagelo e antenômero (d); região do pedicelo não recoberta por escamas com presença de sensilas (a); pedicelo com escamas removidas (b) regiões do escapo e pedicelo com presença de sensilas (c).



O flagelo é constituído por diversos segmentos denominados antenômeros, estes apresentam um formato cilíndrico e são constituídos por duas áreas: superfície dorsal e superfície ventral. A superfície dorsal foi caracterizada pela presença de escamas, diferente da superfície ventral que não apresentou escamas (Figura 17).

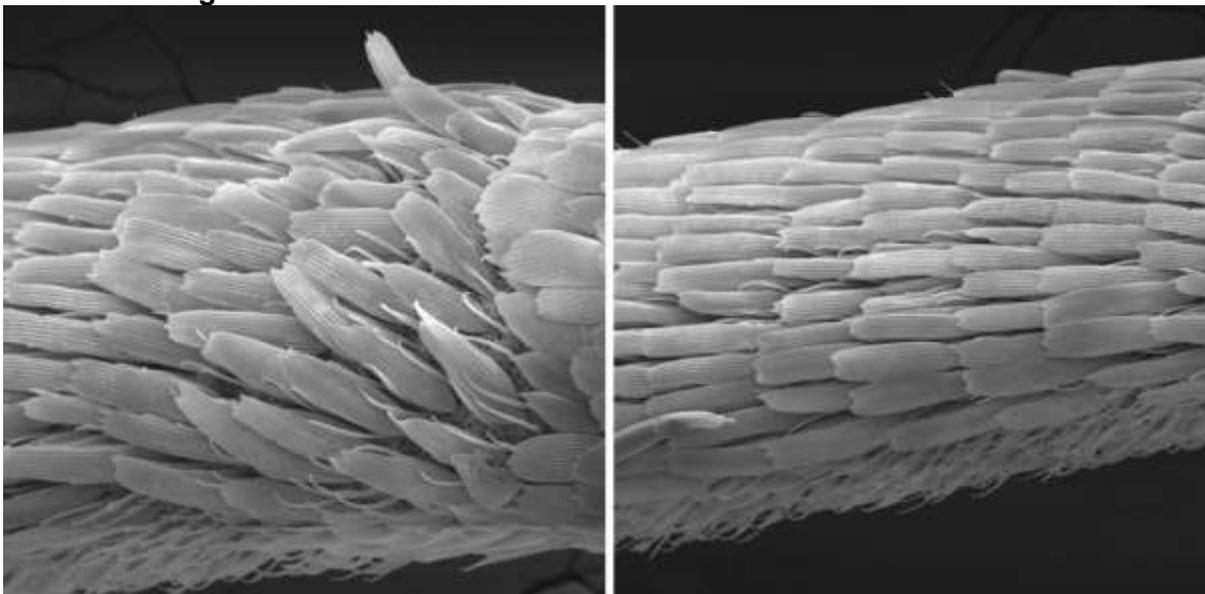
**Figura 17 – Face ventral de um antenômero de uma antena de fêmea de *A. bondari* recobertos por sensilas.**



Foi possível observar a presença de algumas sensilas emergindo entre as escamas na superfície dorsal (Figura 18). Em áreas em que as escamas da superfície dorsal foram removidas antes do processo de montagem das antenas, também foi possível observar a presença de sensilas.

Em *Spodoptera frugiperda* Smith, J.E., 1797 (Lepidoptera: Noctuidae) na superfície dorsal dos antenômeros também foi possível observar a presença de sensilas, além da presença de escamas (Malo et al., 2004).

**Figura 18 – Face dorsal das antenas de *A. bondari* com a presença de algumas sensilas emergindo entre as escamas.**



Foi possível identificar 6 tipos de sensilas nas antenas de *A. bondari*, sendo elas: Cerdas de Böhm, Tricóide, caética, coelocônica, estilocônica e auricilicas. Os pêlos ou cerdas de Böhm (Böhm's bristles - BB) (Figura 19) foram encontrados na base do escapo e em uma pequena região do pedicelo, próximo ao escapo. Este tipo de sensilas são caracterizadas por apresentar aparência semelhante a um espinho.

**Figura 19 – Escapo da antena de *A. bondari* com a presença das cerdas de Böhm.**



As cerdas de Böhm (Böhm's bristles - BB) também foram identificadas no escapo de *Cnaphalocrocis medinalis* Guenée, 1854 (Lepidoptera: Pyralidae) e *Plodia interpunctella* Hübner, [1813] (Lepidoptera: Pyralidae), de acordo com Sun et al. (2011) e Ndomo-Moualeu et al. (2014) estas sensilas são não-porosas, o que sugere que elas não apresentem um papel olfativo e sim mecanorreceptor.

As sensilas tricóides (Figura 20) foram as mais numerosas dentre os tipos de sensilas identificadas nas antenas dos adultos de *A. bondari*, a presença destas sensilas foi observada somente no flagelo.

As sensilas tricóides também apresentam uma aparência semelhante a um espinho, assim como as cerdas de Böhm, no entanto diferiram destas por serem mais longas e apresentarem uma acentuada inclinação. Além disto as sensilas tricóides também foram caracterizadas por apresentarem ranhuras transversais (Figura 20).

De acordo com Faucheux et al. (2006) em alguns lepidópteros da família Neopseustidae as sensilas tricóides são uniporosas e possivelmente estão envolvidas na percepção de feromônio sexual.

As sensilas caéticas apresentam uma forma similar às tricóides, no entanto aparentam ser menores que as tricóides e a maior diferença é que as caéticas possuem sua base apoiadas em uma estrutura circular (Figura 21). As sensilas caéticas também foram caracterizadas por apresentarem ranhuras transversais.

O formato das sensilas caéticas deste trabalho foi similar ao formato descrito por Ndomo-Moualeu et al. (2014) em *P. interpunctella*. Nas antenas de *Ephestia kuehniella* Zeller, 1879 (Lepidoptera: Pyralidae: Phycitinae) as sensilas caéticas foram descritas como sensilas de gosto e táteis (Anderson e Hallberg, 1990).

Figura 20 - Face dorsal de um antenômero de macho de *A. bondari* com a presença de sensilas tipo tricóide (Tc) (a), ranhuras transversais presentes na sensila tricóide (b).

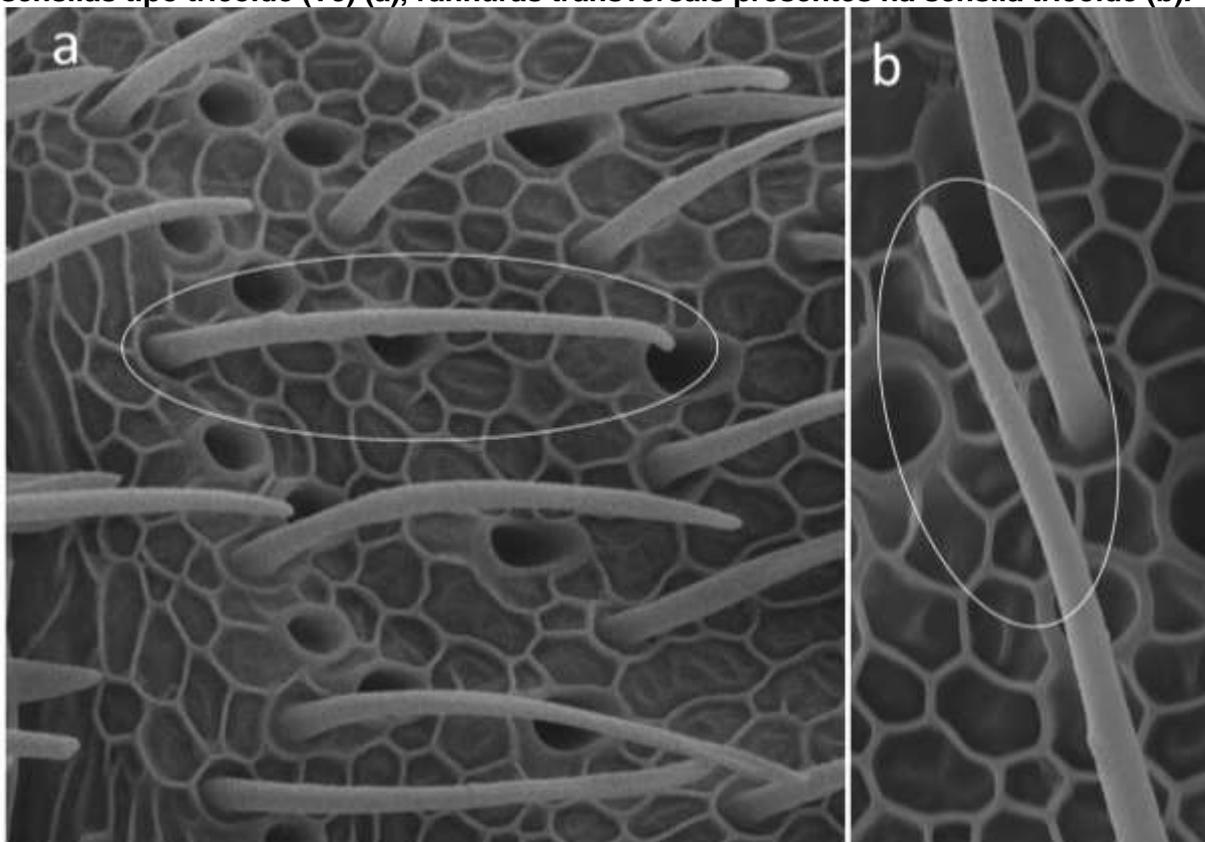
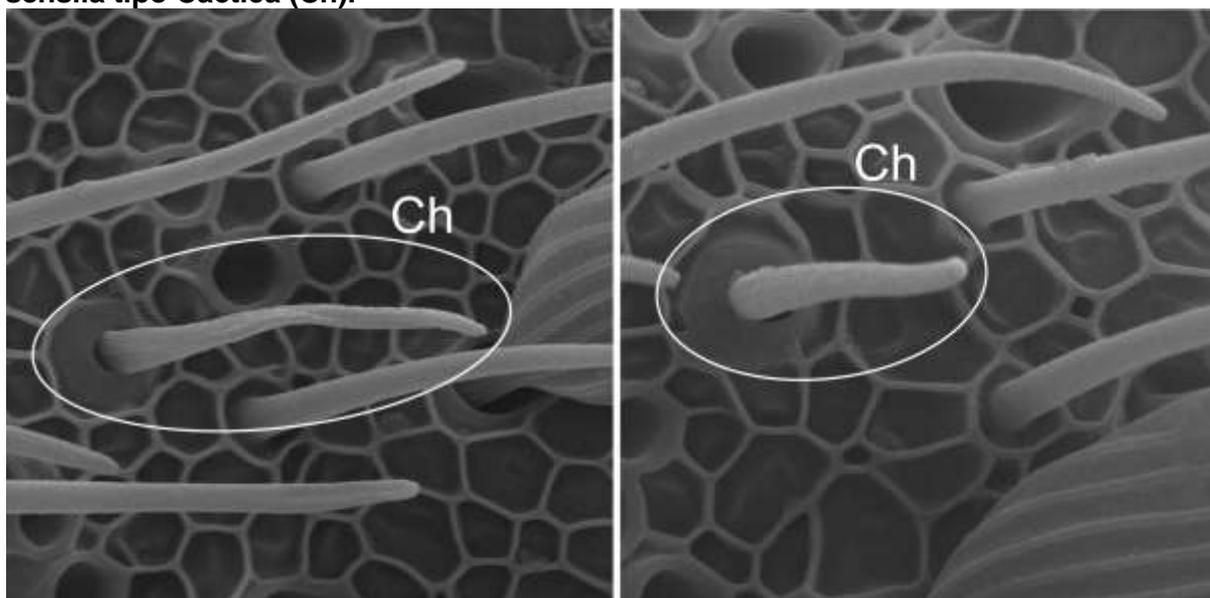


Figura 21 - Face dorsal de um antenômero de macho de *A. bondari* com a presença de sensila tipo Caética (Ch).



As sensilas coelocônicas são estruturas com base circular formadas por pequenas cerdas distribuídas em conjunto ao redor de uma cerda central (Figura 22). Apesar de serem classificadas como sensilas olfativas, as sensilas clelocônicas não são porosas, no entanto estas apresentam ranhuras longitudinais na sua cerda sensorial (Faucheux et al., 2006; Diongue et al., 2013; Roh et al., 2016; Roh et al., 2018).

Além da sensila coelocônica com diversas cerdas ao redor de uma central, em uma antena de macho de *A. bondari* foram encontradas 2 sensilas com a forma similar à descrita para coelocônica, porém com apenas uma cerda central (Figura 23). Estas sensilas foram encontradas na superfície dorsal da antena, em uma área onde as escamas foram removidas.

Em *Epiphyas postvittana* Walker F., 1863 (Lepidoptera: Tortricidae) e *Planotortrix octo* Dugdale, 1990 (Lepidoptera: Tortricidae) foram identificados 2 tipos de sensilas coelocônicas e foram classificadas em 2 subtipos: coelocônicas subtipo I e subtipo II. As coelocônicas subtipo I foram mais abundantes que a subtipo II em ambas espécies (Roh et al., 2018).

Estudos com *Bombyx mori* sugerem que este tipo de sensila está envolvida na percepção de voláteis liberados por plantas (Hunger e Steinbrecht, 1998).

**Figura 22 – Face ventral do antenômero de *A. bondari* com a presença de sensila coleocônica subtipo 1 (Cc - I).**

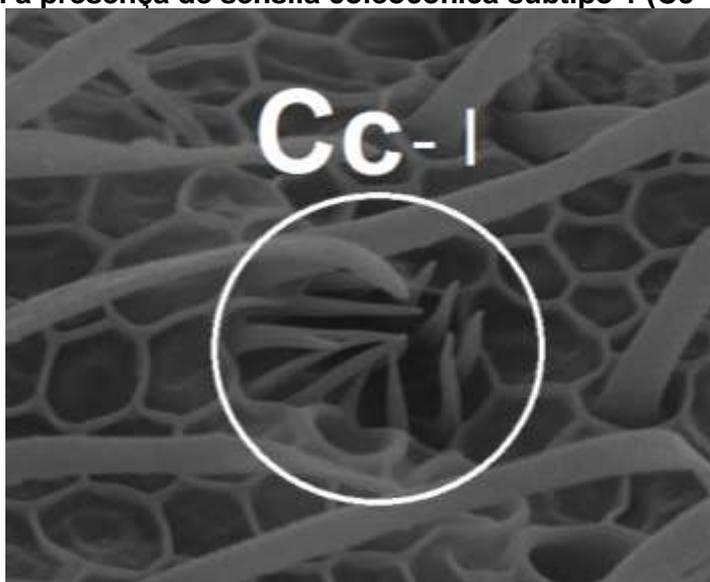
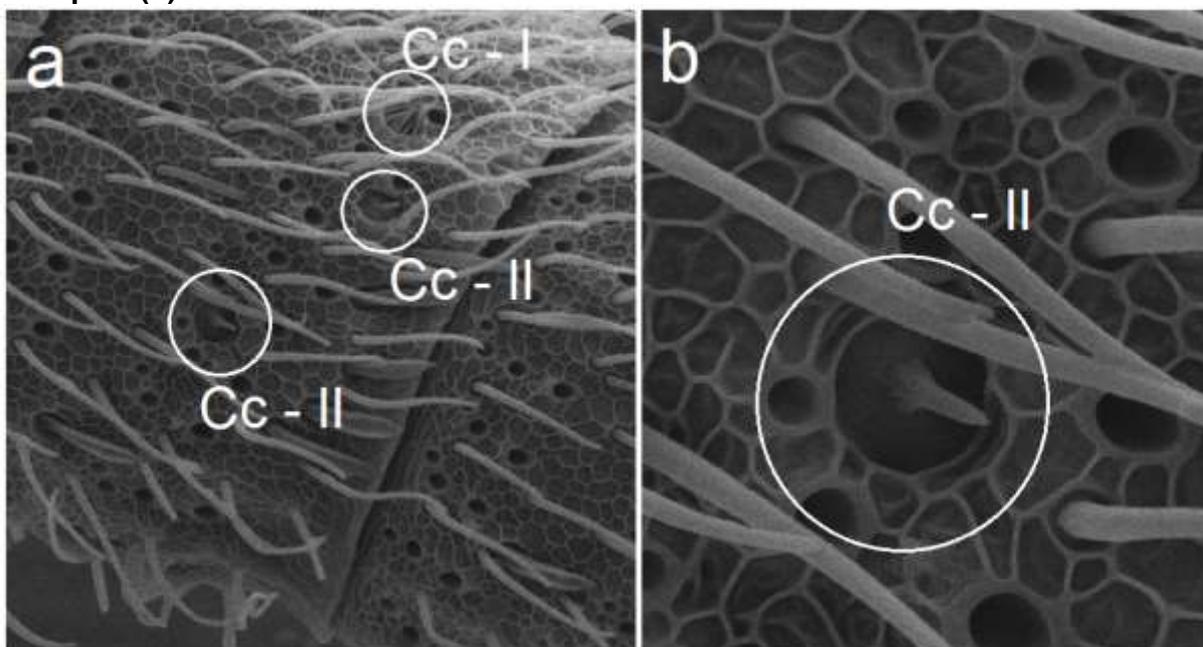


Figura 23 - Face dorsal do antenômero de um macho de *A. bondari* com a presença de sensilas coleocônicas subtipo 1 (Cc - I) e subtipo 2 (Cc - II) (a), sensila coelôconica subtipo 2 (b).



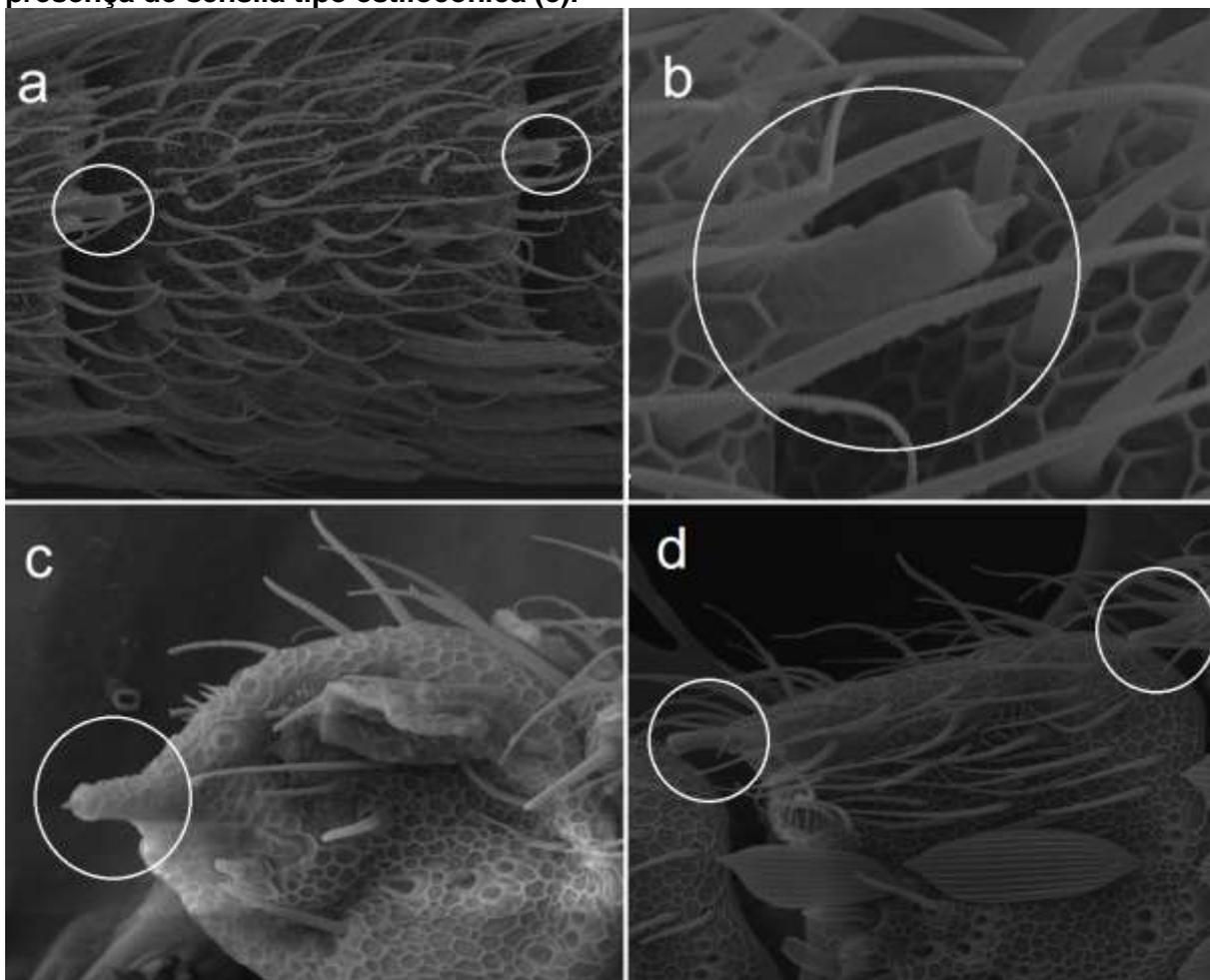
As sensilas estilocônicas apresentam uma forma cilíndrica e são largas em relação as tricóides, caéticas e cerdas de böhm e possuem uma estrutura proeminente em sua ponta em forma de cone. Estas sensilas quando encontradas, estavam sempre localizadas na porção final do antenômero (Figura 24).

Quando presente, foi encontrada somente uma sensila estilocônica por antenômero, a localização e quantidade deste tipo de sensila nas antenas de *A. bondari* foi similar em *P. interpunctella* (Ndomo-Moualeu et al., 2014).

Nas antenas de *E. postvittana* e *P. octo* as sensilas estilocônicas não apresentaram poros em sua superfície, sendo caracterizada como sensilas não olfativas (Roh et al., 2018). No entanto, estudos sugerem que estas sensilas apresentam ranhuras em sua superfície por onde as moléculas odoríferas entram na sensila e também apresentam muitos neurônios (Ameismeier, 1985; Hunger e Steinbrecht, 1998).

De acordo com Hallberg et al. (1994) as sensilas estilocônicas presentes nas antes de *Ostrinia nubilalis* Hübner, 1796 (Lepidoptera: Crambidae) devem apresentar função na percepção de calor e umidade.

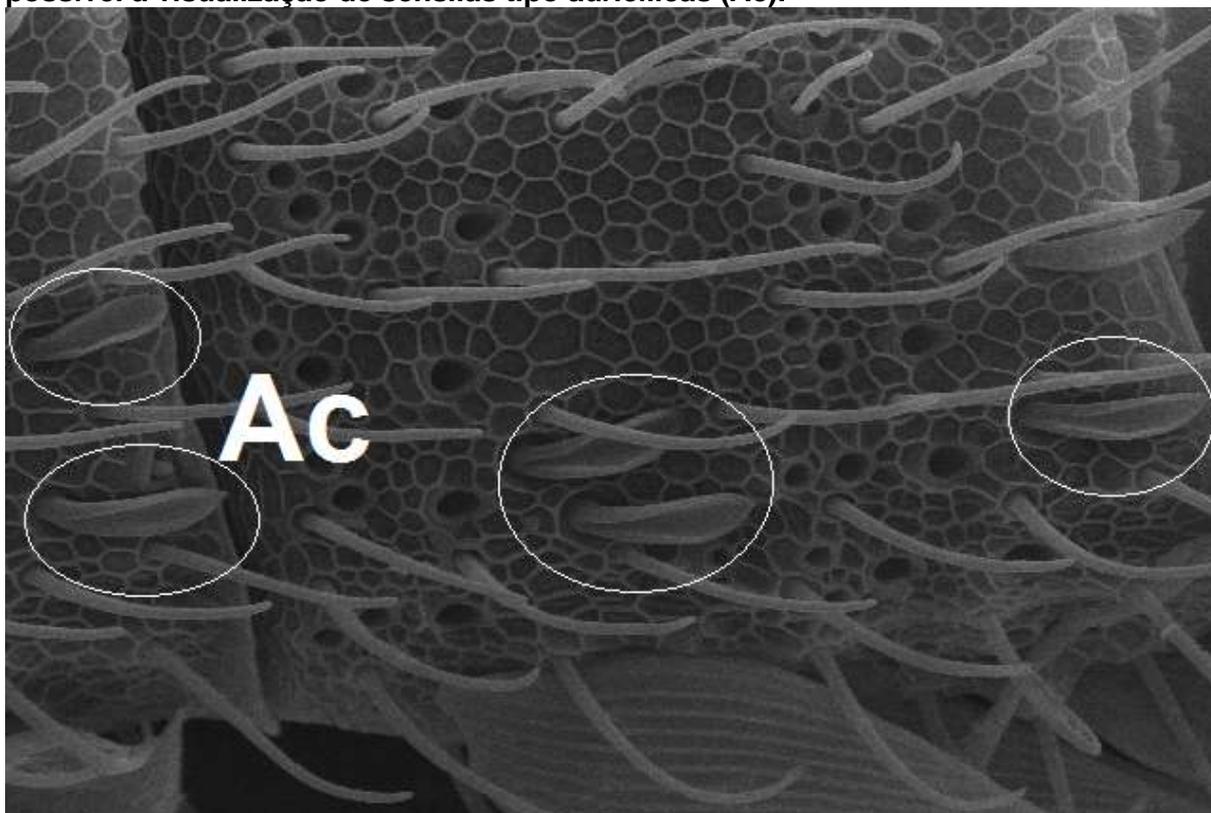
Figura 24 - Face ventral de antenômeros de *A. bondari* com a presença de sensilas tipo estilocônica (Ec) em sua região terminal (a,b,d) e último antenômero com a presença de sensila tipo estilocônica (c).



As sensilas do tipo auricúlicas são caracterizadas por apresentarem uma forma foliar, sendo ligeiramente dobradas ao meio, a forma destas sensilas também é similar a uma orelha de coelho (Figura 25).

Este tipo de sensila apresenta poros em sua superfície o que deve indicar que esta sensila desempenha uma função olfativa (Hallberg et al., 1994; Roh et al., 2018). Sua ocorrência tem sido descrita para algumas espécies de lepidópteros em ambos os sexos, e devem apresentar uma possível função na detecção de voláteis de plantas (Anderson et al., 2000; Roh et al., 2016; Roh et al., 2018).

Figura 25 – Face dorsal do antenômero de *A. bondari* com escamas removidas, sendo possível a visualização de sensilas tipo auricílicas (Ac).



Foi possível observar a presença de sensilas tricóides, caéticas e coelocônicas nas superfícies ventral e dorsal dos flagelos. As sensilas estilocônicas foram observadas somente na superfície ventral dos flagelos e as sensilas auricílicas foram visualizadas somente na superfície dorsal.

A presença das sensilas em um dos sexos pode ser indicativo de percepção e reconhecimento de moléculas liberadas pelo sexo oposto, no presente estudo todas as sensilas foram encontradas em ambos os sexos e sendo necessário realizar uma análise quantitativa para verificar a presença de algum dimorfismo sexual.

O dimorfismo sexual entre as antenas nem sempre é observado por machos e fêmeas apresentarem tipos distintos de sensila, por exemplo, o caso da mariposa *P. interpunctella*, em que ambos os sexos apresentaram sensilas tricóides, no entanto estas apresentaram variação na quantidade e tamanho (Ndomo-Moualeu et al., 2014).

Neste trabalho para caracterizar as sensilas encontradas nas antenas de adultos de *A. bondari*, foi utilizada a diferença de forma entre elas. Além de apresentarem diferentes formas, as sensilas olfativas de diversos insetos têm apresentado diferenças na ausência, presença e/ou no número de poros (Onagbola e Fadamiro, 2008; Kim et al., 2016; Roh et al., 2016; Wee et al., 2016).

No presente estudo não foi possível a visualização da presença, ausência e/ou número de poros nas sensilas antenais dos adultos de *A. bondari*, sendo necessário maiores análises.

Esta característica deve estar diretamente relacionada com a função que a sensila pode desempenhar, devido ao fato que é através destes poros que as moléculas odoríferas entram nas sensilas (Steinbrecht, 1997).

#### **4.4 Extração de compostos feromonais de *A. bondari***

##### **4.4.1 Extração por solvente da genitália de *A. bondari***

Através das análises em CG-EM dos extratos obtidos mantendo as glândulas das fêmeas de *A. bondari* no solvente, foi possível identificar um total de 23 compostos (tabela 5). O perfil dos extratos foi caracterizado pela presença de ácidos graxos, ésteres e alcanos (Figura 26).

Dentre os 23 compostos identificados 15 foram hidrocarbonetos, estes compostos correspondem a 65% do número total dos compostos identificados nos extratos da porção final do abdômen das fêmeas.

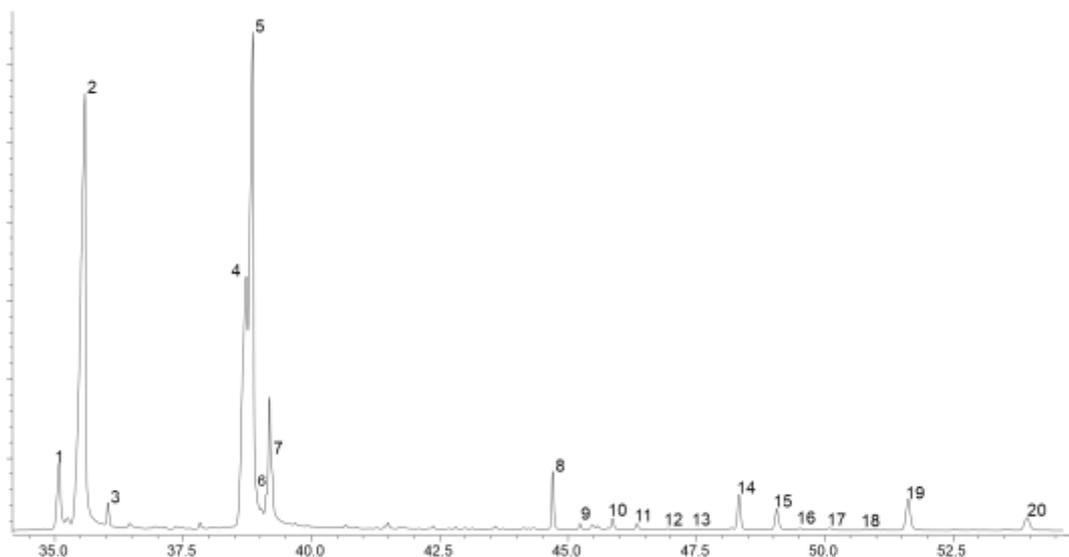
Dentre os 15 hidrocarbonetos identificados na amostra, foi possível identificar 5 hidrocarbonetos lineares (pentacosano, hexacosano, heptacosano, octacosano e nonacosano) e 10 hidrocarbonetos ramificados (13-metilpentacosano, 11-metilpentacosano, 3-metilpentacosano, 13-metilhexacosano, 12-metilhexacosano, 4-metilhexacosano, 2-metilhexacosano, 13-metilheptacosano, 5-metilheptacosano e 3-metilheptacosano).

**Tabela 5 - Compostos identificados nos extratos da porção final do abdômen de fêmeas de *A. bondari* onde estas estruturas foram mantidas no vial.**

	Composto	K.I. calculado	Contribuição média (%) (n=3)
1	Ácido palmitoléico	1943	4,42
2	Ácido palmítico	1968	34,94
3	Palmitato de etila	1993	1,58
4	Ácido linoleico	2139	16,77
5	Ácido oleico	2146	26,16
6	Linoleato de etila	2161	1,64
7	Oleato de etila	2167	3,38
8	Pentacosano	2500	2,35
9	13-metilpentacosano 11-metilpentacosano	2532	0,21
10	3-metilpentacosano	2571	0,54
11	Hexacosano	2600	0,40
12	13-metilhexacosano 12-metilhexacosano	2631	0,10
13	4-metilhexacosano 2-metilhexacosano	2660	0,04
14	Heptacosano	2700	2,16
15	13-metilheptacosano	2730	1,50
16	5-metilheptacosano	2748	0,08
17	3-metilheptacosano	2771	0,15
18	Octacosano	2800	0,18
19	Esqualeno	2826	1,90
20	Nonacosano	2900	1,51

Os ácidos palmítico e oleico foram os 2 compostos majoritários dentre os compostos identificados, e a área de seus picos juntos apresentaram uma contribuição média de aproximadamente 61 % (N=3) nos extratos da porção final do abdômen da fêmea.

**Figura 26 – Expansão do cromatograma de extrato da porção final do abdômen de fêmeas de *A. bondari* onde estas estruturas foram mantidas no vial.**



Os resultados das análises dos extratos em que o solvente sobrenadante foi filtrado em sílica, apresentaram algumas diferenças em relação aos extratos em que as porções finais do abdômen das fêmeas foram mantidas no solvente.

Após serem filtrados houve uma redução na contribuição dos ácidos graxos nos perfis das amostras como também houve a aparição de compostos oriundas do processo de filtração na sílica. Um extrato de genitália em que as porções finais do abdome foram mantidas por 24h no solvente e depois filtradas foi injetado no CG-DIC antes e depois do processo de filtração (Figura 27) e foi possível observar as diferenças descritas acima.

Os resultados das análises dos extratos em que o solvente sobrenadante foi removido e acumulado em um único frasco de vidro revelou a presença apenas de alcanos lineares e ramificados (tabela 6). Também foi possível observar que através deste método não foram extraídos, ou foram extraídos em baixa concentrações incapazes de serem detectados pelo detector, compostos como ácidos e ésteres. Também não foi possível identificar o esqualeno neste tipo de extração.

Figura 27 - Comparação entre cromatogramas de extrato da porção final do abdômen de fêmeas de *A. bondari* filtrado em sílica (A) e antes de ser filtrado em sílica (B).

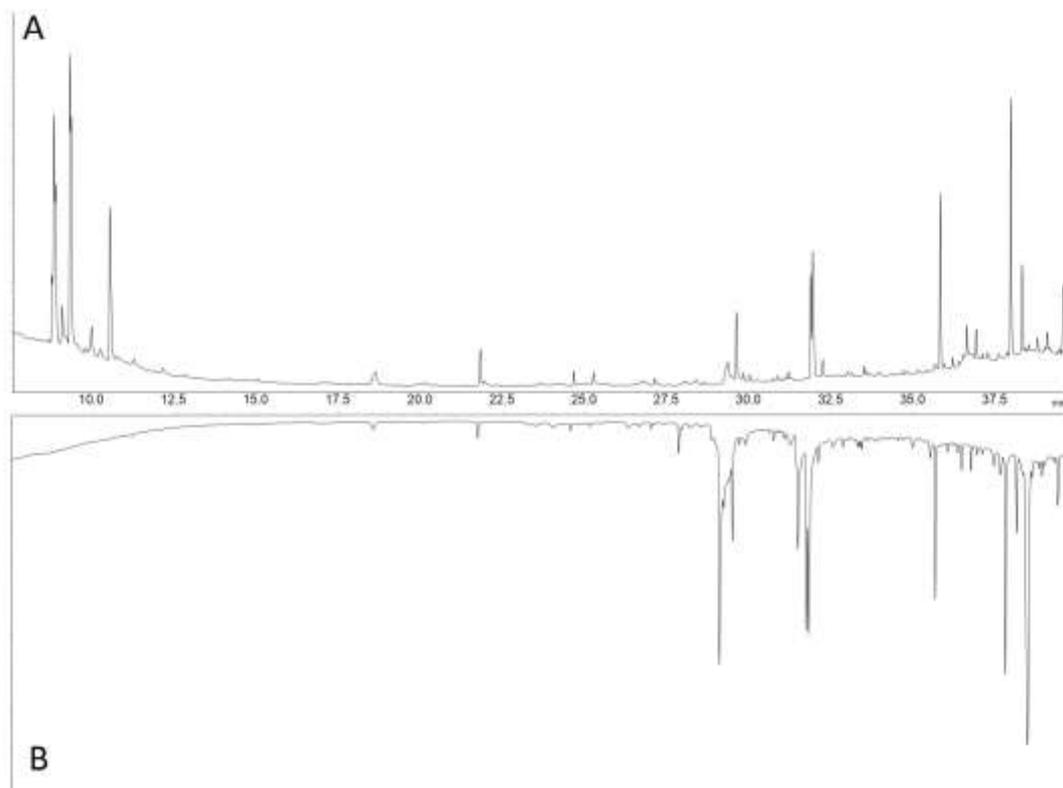


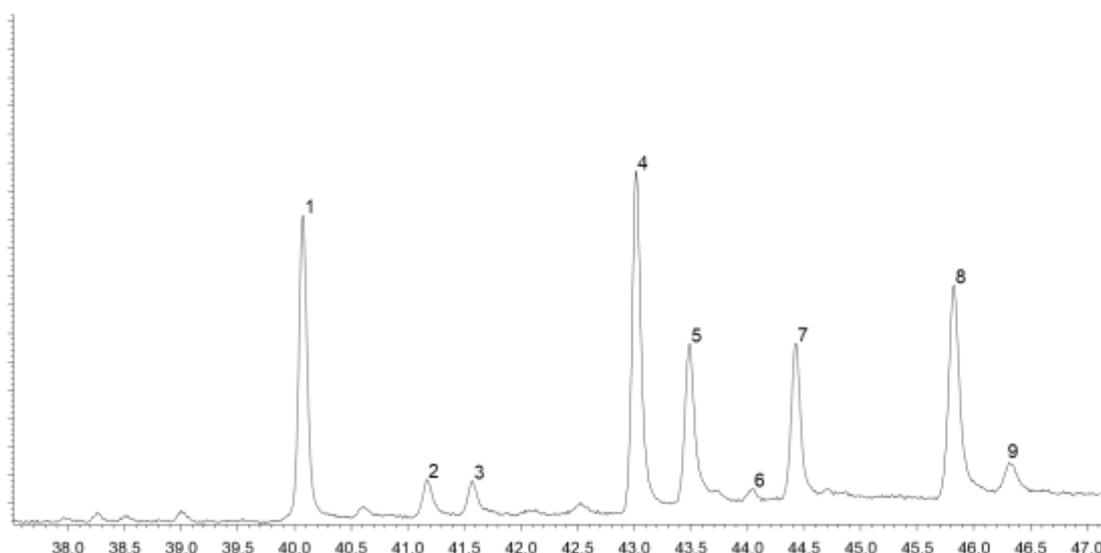
Tabela 6 – Compostos identificados nos extratos da porção final do abdômen das fêmeas de *A. bondari* onde estas estruturas foram imersas no hexano por 20 minutos e posteriormente todo solvente sobrenadante foi removido e acumulado em um único vial.

	Composto	K.I. calculado	Contribuição (%) (n=1)
1	Pentacosano	2500	20,45
2	3-metilpentacosano	2573	3,16
3	Hexacosano	2600	2,34
4	Heptacosano	2700	25,72
5	13-metilheptacosano	2733	13,04
6	3-metilheptacosano	2773	0,94
7	Octacosano	2800	12,20
8	Nonacosano	2900	19,45
9	15-metilnonacosano	2943	2,70
	13-metilnonacosano		
	11-metilnonacosano		

Dentre os 11 hidrocarbonetos identificados (Figura 28), foi possível identificar 5 hidrocarbonetos lineares (pentacosano, hexacosano, heptacosano, octacosano e nonacosano) e 6 hidrocarbonetos ramificados (3-metilpentacosano, 13-metilheptacosano, 3-metilheptacosano, 15-metilnonacosano, 13-metilnonacosano e 11-metilnonacosano).

Dentre os alcanos ramificados identificados, o 13-metilheptacosano foi o majoritário, e a área de seu pico apresentou uma contribuição de aproximadamente 13% no extrato da genitália em que a porção final foi removida.

**Figura 28 – Expansão do cromatograma do extrato da genitália de fêmeas de *A. bondari* onde estas estruturas foram mantidas 20 minutos no vial e posteriormente todo solvente sobrenadante foi removido e acumulado em um único vial.**



Os hidrocarbonetos lineares presentes nos extratos em que a genitália foi mantida no vial, também foram identificados nos extratos em que o sobrenadante foi removido. Já os hidrocarbonetos ramificados apresentaram diferenças para os 2 tipos de extração (tabela 7).

Os ácidos e ésteres identificados nos extratos hexânicos mantendo a porção final do abdômen das fêmeas no solvente e removendo o sobrenadante após 24h e realizando a filtração em sílica são comumente encontrados em tecidos de insetos (Rumpold e Schlüter, 2013; Cito et al., 2017), assim como em genitália de fêmeas (Rebouças et al., 1999, Leal et al., 2005).

No entanto, as antenas de machos de *A. bondari* não apresentaram atividade significativa na eletroantenografia quando expostas para os compostos destas classes.

**Tabela 7 – Diferença entre os hidrocarbonetos lineares e ramificados identificados nos extratos da genitália de *A. bondari* utilizando duas metodologias diferentes.**

Composto	Extração tipo I	Extração tipo III
Pentacosano	+	+
13-metilpentacosano	+	-
11-metilpentacosano		
3-metilpentacosano	+	+
Hexacosano	+	+
13-metilhexacosano	+	-
12-metilhexacosano		
4-metilhexacosano	+	-
2-metilhexacosano		
Heptacosano	+	+
13-metilheptacosano	+	+
5-metilheptacosano	+	-
3-metilheptacosano	+	+
Octacosano	+	+
Nonacosano	+	+
15-metilnonacosano		
13-metilnonacosano	-	+
11-metilnonacosano		

Extração tipo I: mantendo as genitálias no vial, Extração tipo III: removendo o solvente sobrenadante.

De acordo com Malo et al. (2009) foram identificados dois hidrocarbonetos ramificados, 5,9-dimetilpentadecano e 5,9-dimetilhexadecano, em extratos de aeração de *Leucoptera coffeella* Guérin-Mèneville, 1842 (Lepidoptera: Lyonetiidae).

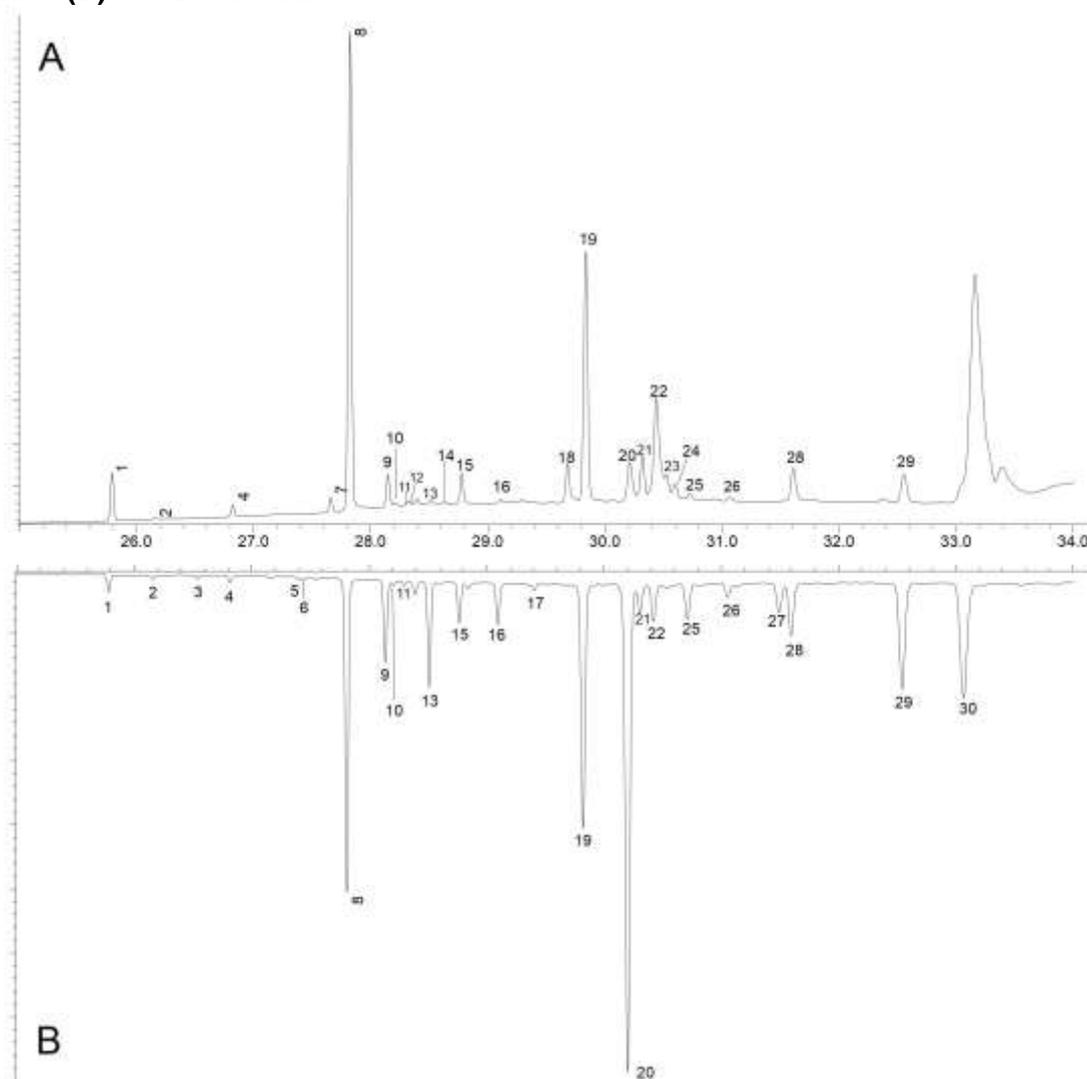
Por meio de testes de campo foi confirmado que os machos de *L. coffeella* são atraídos pelo composto 5,9-dimetilpentadecano, que foi identificado como composto majoritário dos extratos de aeração das fêmeas.

Em *A. bondari* foram identificados diversos hidrocarbonetos ramificados na genitália das fêmeas e nos extratos de corpo inteiro. Este fato pode indicar de que esta classe de compostos esteja envolvida na comunicação intraespecífica de *A. bondari*.

#### 4.4.2 Extração por solvente de compostos cuticulares de *A. bondari*

Foram analisados um total de 6 extratos cuticulares de 24 adultos (cada extrato contendo 4 adultos) de *A. bondari*, sendo 3 extratos de fêmeas e 3 extratos de machos. Os perfis dos compostos cuticulares dos adultos de *A. bondari* (Figura 29) foram principalmente caracterizados pela presença de hidrocarbonetos variando de C<sub>23</sub> a C<sub>29</sub>, sendo estes lineares e ramificados, além dos hidrocarbonetos também foi possível identificar a presença de cetonas e aldeídos.

**Figura 29 – Expansão dos cromatogramas dos extratos cuticulares de machos (A) e fêmeas (B) de *A. bondari*.**



As análises dos cromatogramas obtidos no CG-EM permitiram identificar um total de 39 compostos (tabela 8) e revelaram a existência de diferenças qualitativas entre os perfis de compostos de machos e fêmeas.

As análises dos cromatogramas obtidos no CG-DIC permitiram realizar a quantificação de 36 compostos e revelaram que existem diferenças quantitativas entre os perfis de compostos de machos e fêmeas.

**Tabela 8 - Compostos quantificados e identificados nos extratos cuticulares de machos e fêmeas de *A. bondari* com seus KI's calculados.**

	Composto	KI	Fêmeas de <i>A. bondari</i> (ng/insect)	Machos de <i>A. bondari</i> (ng/insect)
A	Tricosano	2300	1,15	6,46
B	11-metiltricosano	2336	0,18	0,58
C	3-metiltricosano	2373	0,32	-
D	Tetracosano	2400	0,41	1,5
E	4-metiltetracosano	2459	0,36	-
F	2-metiltetracosano	2463	0,35	-
G	10-tricosanona	2484	-	6,1
H	Pentacosano	2500	24,04	75,37
I	13-metilpentacosano 11-metilpentacosano	2534	4,92	7,87
J	7-metilpentacosano 5-metilpentacosano	2541 2551	0,13 0,35	0,22 +
	Acetato	2553	-	+
K	3-metilpentacosano 11-tetracosanona 10-tetracosanona	2573 2584	9,25 -	0,41 +
L	Hexacosano	2600	2,67	3,41
M	13-metilhexacosano 12- metilhexacosano	2631	2,71	1,54
N	4-metilhexacosano 2-metilhexacosano	2661	0,92	-
O	11-pentacosanona 10- pentacosanona	2684	-	10,88
P	Heptacosano	2700	22,89	38,81
Q	13-metilheptacosano 11-metilheptacosano	2731	51,97	22,59
R	7-metilheptacosano	2739	1,70	12,35
S	5-metilheptacosano	2749	2,98	19,29
T	Acetato	2756	-	5,41

U	Acetato	2762	-	4,45
W	3-metilheptacosano	2772	4,38	1,12
V	Octacosano	2800	1,45	0,7
X	14-metiloctacosano	2829	11,77	-
	13-metiloctacosano			
	12-metiloctacosano			
	Esqualeno	2836	+	+
Y	Nonacosano	2900	14,03	4,67
Z	15-metilnonacosano	2929	4,93	-
	13-metilnonacosano			

O resultado da contribuição dos compostos realizados na CG-EM (tabela 9) corroborou os resultados obtidos na quantificação realizada na CG-DIC, de maneira que os compostos apresentaram semelhança de proporção entre as amostras analisadas na CG-EM e na CG-DIC.

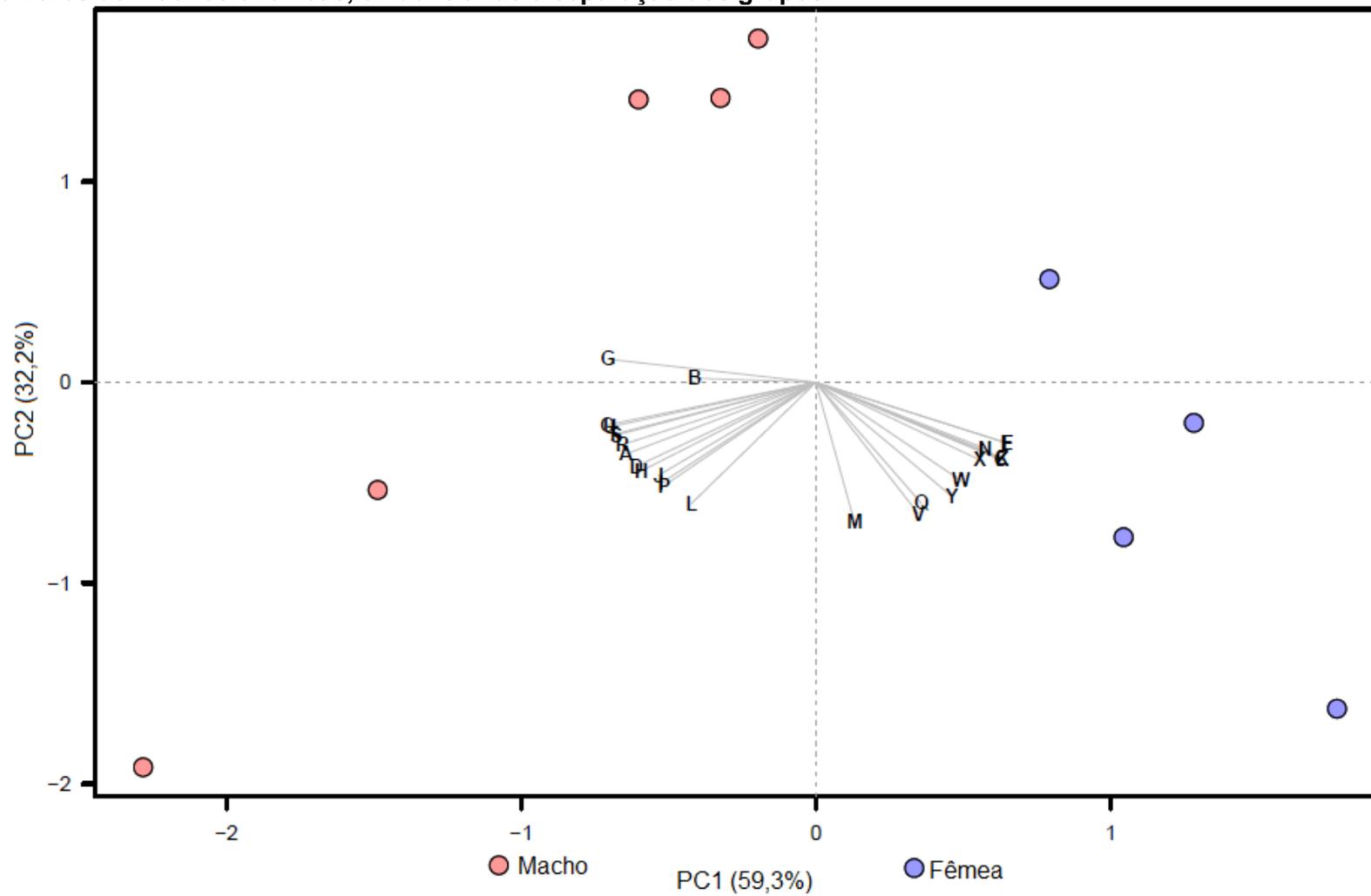
**Tabela 9 – Contribuição dos compostos identificados nos extratos cuticulares de machos e fêmeas de *A. bondari* com seus KI's calculados.**

	Composto	KI	Fêmeas de <i>A. bondari</i> (%)	Machos de <i>A. bondari</i> (%)
1	Tricosano	2300	0,757	3,393
2	11-metiltricosano	2336	0,210	0,167
3	3-metiltricosano	2373	0,177	-
4	Tetracosano	2400	0,450	0,690
5	4-metiltetracosano	2459	0,150	-
6	2-metiltetracosano	2463	0,170	-
7	10-tricosanona	2484	-	2,217
8	Pentacosano	2500	12,197	31,960
9	13-metilpentacosano	2534	2,597	2,957
	11-metilpentacosano			
10	7-metilpentacosano	2541	0,110	0,227
11	5-metilpentacosano	2551	0,170	0,187
12	Acetato	2553	-	0,277
13	3-metilpentacosano	2573	5,533	0,290
14	11-tetracosanona	2584	-	0,240
	10-tetracosanona			
15	Hexacosano	2600	1,793	1,643
16	13-metilhexacosano	2631	1,477	0,300
	12-metilhexacosano			
17	4-metilhexacosano	2661	0,640	-
	2-metilhexacosano			

18	11-pentacosanona 10- pentacosanona	2684	-	3,727
19	Heptacosano	2700	12,993	18,007
20	13-metilheptacosano 11-metilheptacosano	2731	28,957	6,787
21	7-metilheptacosano	2739	1,003	4,917
22	5-metilheptacosano	2749	1,767	11,837
23	Acetato	2756	-	2,363
24	Acetato	2762	-	1,387
25	3-metilheptacosano	2772	2,907	0,357
26	Octacosano	2800	1,007	0,157
27	14-metiloctacosano 13-metiloctacosano 12-metiloctacosano	2829	1,773	-
28	Esqualeno	2836	2,977	2,693
29	Nonacosano	2900	9,743	3.,223
30	15-metilnonacosano 13-metilnonacosano	2929	10,443	-

A análise de componentes principais utilizando os valores da quantificação dos compostos em CG-DIC juntamente com a ANOVA do PC1 em relação ao sexo ( $P < 0,05$ ), mostra que existe uma diferença quantitativa entre os perfis de compostos cuticulares de machos e fêmeas. O PC1 e o PC2 explicaram 91,5% a separação dos grupos (Figura 30).

Figura 30 – Resultado da análise de componentes principais, feita com os valores das quantificações dos compostos cutilares de machos e fêmeas, evidenciando a separação dos grupos.



Os compostos 10-tricosanona, 11-tetracosanona, 10-tetracosanona, 11-pentacosanona, 10-pentacosanona foram identificados somente em extratos de machos de *A. bondari*. Além das cetonas identificadas exclusivamente nos extratos de machos também foi possível identificar a presença de outros 3 compostos macho específicos, a presença dos fragmentos  $m/z$  61 e  $m/z$  43 no espectro de massas destes compostos indicam que eles sejam acetatos. Possivelmente estes acetatos apresentam insaturações devido ao fato de que seus espectros de massas apresentam o fragmento  $m/z$  61 em baixa intensidade.

Os compostos 3-metiltricosano, 4-metiltetracosano, 2-metiltetracosano, 4-metilhexacosano, 14-metiloctacosano, 13-metiloctacosano, 12-metiloctacosano, 15-metilnonacosano e 13-metilnonacosano foram identificados somente nos extratos de fêmeas de *A. bondari*.

O pico número 20 da tabela 9 (13-Metilheptacosano e 11- Metilheptacosano) foi o pico majoritário dos extratos de fêmeas e apresentou uma concentração maior do que nos extratos dos machos.

Os resultados do presente estudo sugerem que o acasalamento em *A. bondari* deve ser mediado por uma mistura primária de compostos que atua como feromônio de longa distância e também por uma mistura secundária de compostos que atua como feromônio de longa distância.

Desta mesma maneira, o a mistura fermonal primária de *Choristoneura fumiferana* Clemens, 1865 (Lepidoptera: Tortricidae) é composta de (*E*)- e (*Z*)-11-tetradecenal, produzido por fêmeas e sendo eficiente na captura de machos virgens quando utilizada em armadilhas iscadas em uma proporção de 95: 5 (Sanders e Weatherston, 1976; Silk et al., 1980). Depois de análises de compostos cuticulares, a presença de alcanos insaturados foi notada em ambos os sexos, mas os compostos (*Z,Z,Z*)-3,6,9-tricosatrieno e (*Z,Z,Z*)-3,6,9-pentacosatrieno foram identificados apenas em fêmeas. Bioensaios em arena e túnel de utilizando adultos de *C. fumiferana* mostraram que machos exibem padrões comportamentais como bater as asas e arquear o abdômem na presença de extratos de partes de fêmeas e dos alcanos insaturados identificados somente nas fêmeas. Além disso, dois compostos cuticulares de fêmeas, (*Z*)-5-tricosano e (*Z,Z,Z*)-3,6,9-tricosatrieno,

aumentaram a resposta dos machos para a mistura feromonal primária, atuando na orientação dos machos e na corte a curta distância (Silk et al., 2017).

Alguns dos hidrocarbonetos lineares (pentacosano, hexacosano, heptacosano, octacosano e nonacosano) e ramificados (3-metilpentacosano, 13-metilheptacosano, 3-metilheptacosano, 15-metilnonacosano e 13-metilnonacosano) presentes nos extratos hexânicos de corpo inteiro de *A. bondari*, também foram identificados nos extratos hexânicos da genitália de *A. bondari*.

O composto 13-metilheptacosano que foi o composto majoritário dentre os hidrocarbonetos ramificados do extrato da genitália de fêmeas de *A. bondari*, também foi o composto majoritário nos extratos de corpo inteiro de fêmeas de *A. bondari*.

A ocorrência de alcanos ramificados como feromônios e/ou com efeito sinérgico à mistura feromonal não é algo desconhecido. Em duas espécies de mariposas pertencentes a Lyonetiidae, os compostos 5,9-dimetilpentadecano e 5,9-dimetilheptadecano, foram identificados como feromônios sexuais emitidos pelas fêmeas (Francke e Franke, 1987; Malo et al., 2009).

Além da família Lyonetiidae, as famílias Geometridae, Noctuidae, Lymantriidae e Arctiidae também apresentam espécies em que hidrocarbonetos ramificados foram identificados como feromônio sexual (Ando et al., 2004).

Apesar de nenhum hidrocarboneto ramificado ainda ter sido descrito como componente feromonal para espécies de Pyralidae, as evidências apresentadas nesta pesquisa reforçam que os hidrocarbonetos ramificados devem estar envolvidos na comunicação intraespecífica de *A. bondari*.

#### 4.5 Eletroantenografia

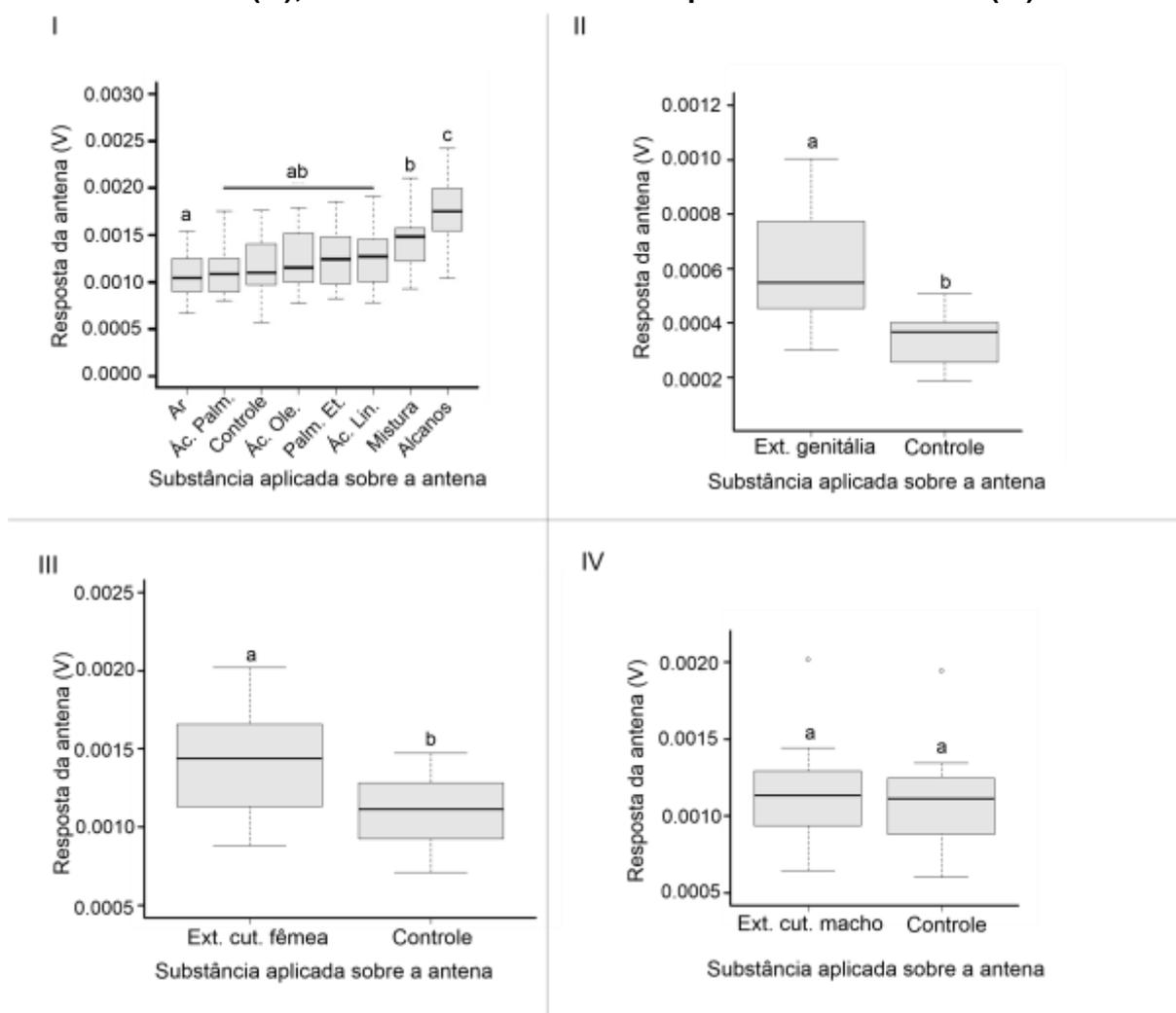
Os resultados dos estudos eletroantegráficos das antenas dos machos de *A. bondari* quando submetidas aos compostos sintéticos identificados nos extratos da porção final do abdômen das fêmeas revelaram que os machos de *A. bondari* apresentaram respostas para o padrão contendo uma mistura de alcanos do C<sub>7</sub> ao C<sub>30</sub>.

Os valores das respostas em volts (V) obtidas das antenas quando submetidas aos puffs da mistura de padrões de alcanos, foi significativamente

diferente do restante das respostas ( $P < 0,05$ ) das antenas quando submetidas aos puffs dos outros padrões e do controle (Figura 31).

As respostas das antenas dos machos de *A. bondari* para os extratos cuticulares das fêmeas e para o tratamento controle, demonstraram que as antenas dos machos apresentaram uma resposta ativa significativa (Figura 31) para os extratos das fêmeas ( $P < 0,05$ ).

**Figura 31 - Boxplot dos valores das respostas em volts (V) das antenas dos adultos de *A. bondari* obtidas no EAG, mediante aos puffs dos tratamentos controle, extratos de adultos e padrões analíticos: Padrões analíticos para antena de macho (I); Extrato de genitália de fêmea para antena de macho (II); Extrato cuticular de fêmea para antena de macho (III); Extrato cuticular de macho para antena de fêmea (IV).**



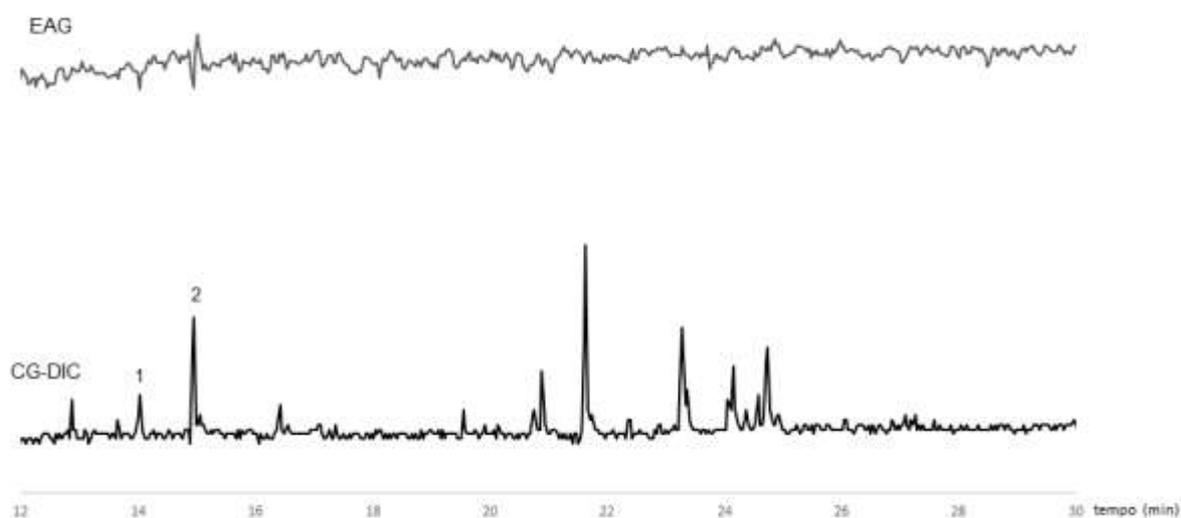
Já as respostas das antenas das fêmeas de *A. bondari* para os extratos cuticulares dos machos e para o tratamento controle, demonstraram que as antenas das fêmeas não apresentaram uma resposta ativa significativa (Figura 31) para os extratos dos machos ( $P > 0,05$ ).

Quando submetidas ao extrato da genitália da fêmea e para o tratamento controle (Figura 31), as antenas dos machos apresentaram uma resposta ativa significativa para o extrato da genitália da fêmea ( $P < 0,05$ ).

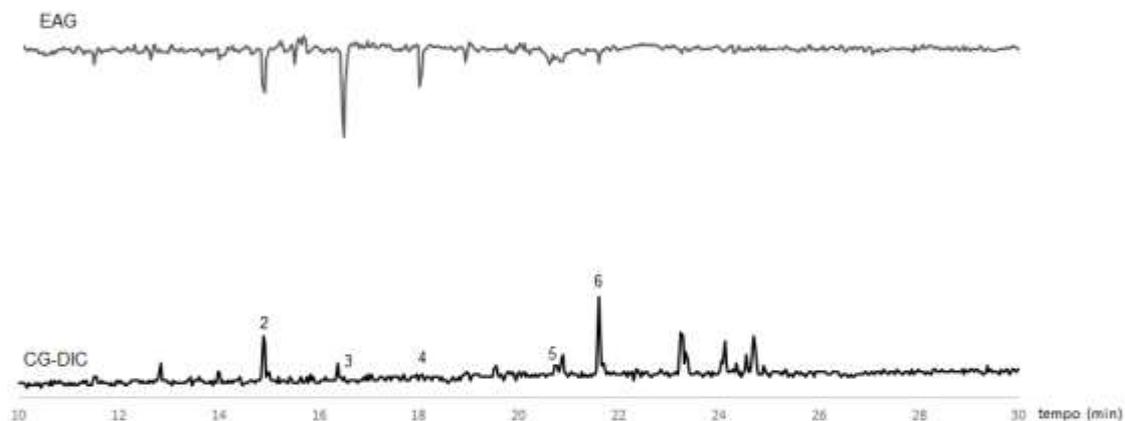
#### 4.6 Cromatografia gasosa acoplada a eletroantenografia

A partir dos resultados do CG-EAG realizados com alguns padrões sintéticos (disponíveis no LPqRN) de compostos identificados como feromônios de espécies de Pyralidae, foi possível observar respostas das antenas de machos e de fêmeas. As antenas de fêmeas (Figura 32) apresentaram resposta para 2 compostos, já as antenas dos machos (Figura 33) apresentaram respostas para 5 compostos (tabela 10).

**Figura 32 – Expansão da resposta eletroantenográfica de antena de fêmea de *A. bondari* para mistura de padrões sintéticos (disponíveis no LPqRN) de compostos identificados como feromônios de espécies de Pyralidae.**



**Figura 33 – Expansão da resposta eletroantegráfica de antena de macho de *A. bondari* para mistura de padrões sintéticos (disponíveis no LPqRN) de compostos identificados como feromônios de espécies de Pyralidae.**

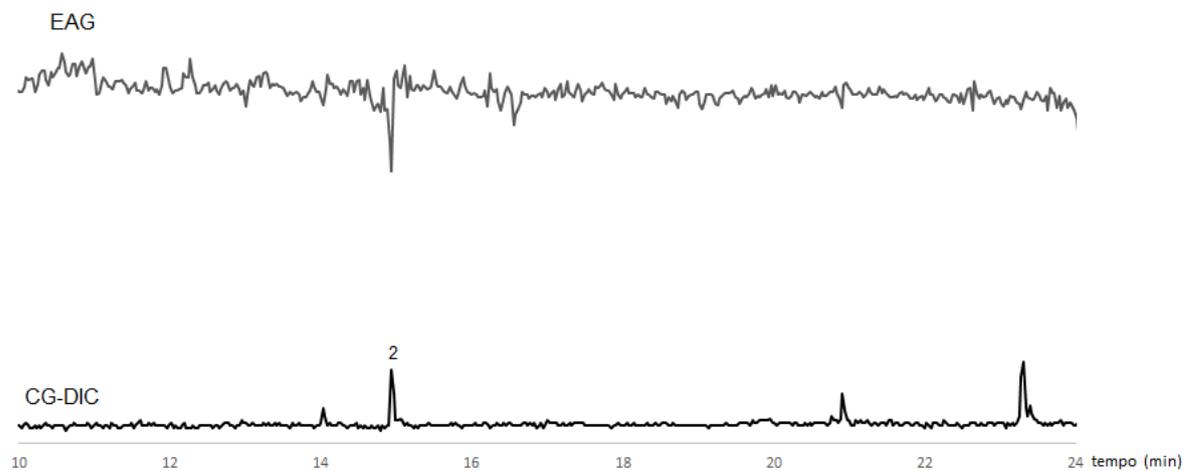


**Tabela 10 – Compostos que elicitaram respostas nas antenas de machos e fêmeas de *A. bondari*.**

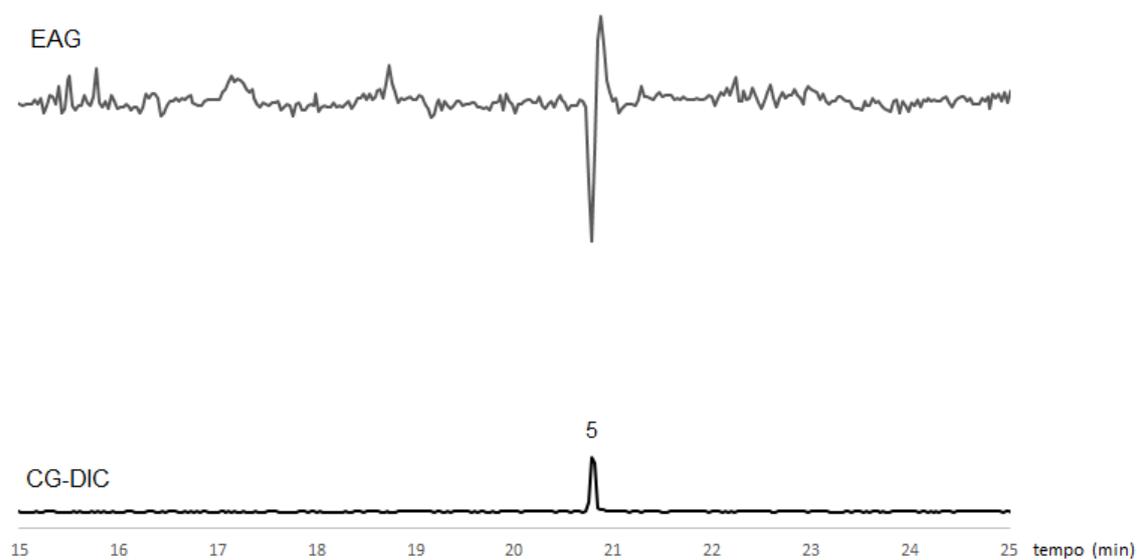
Nº	Composto
1	Subproduto do padrão Z9,E12-14:OAc
2	Subproduto do padrão Z9,E12-14:OAc
3	Subproduto do padrão(Z)-9-tetradecenal
4	(Z)-9-tetradecenal
5	Acetato de (Z)-9-tetradecenila
6	Z9-16:OH

As antenas das fêmeas não apresentaram resposta para o composto acetato de (Z,E)-9,12-tetradecadienila (Z9,E12-14:OAc), no entanto apresentaram respostas para 2 compostos presentes neste padrão, já as antenas dos machos apresentaram respostas para um dos composto presente no padrão Z9,E12-14:OAc (Figura 34), para o padrão acetato de (Z)-9-tetradecenila (Z9-14:OAc) (Figura 35), para o padrão (Z)-9-tetradecenal (Z9-14:Ald), para um composto presente no padrão Z9-14:Ald e para o padrão (Z)-9-hexadecen-1-ol (Z9-16:OH) (Figura 36).

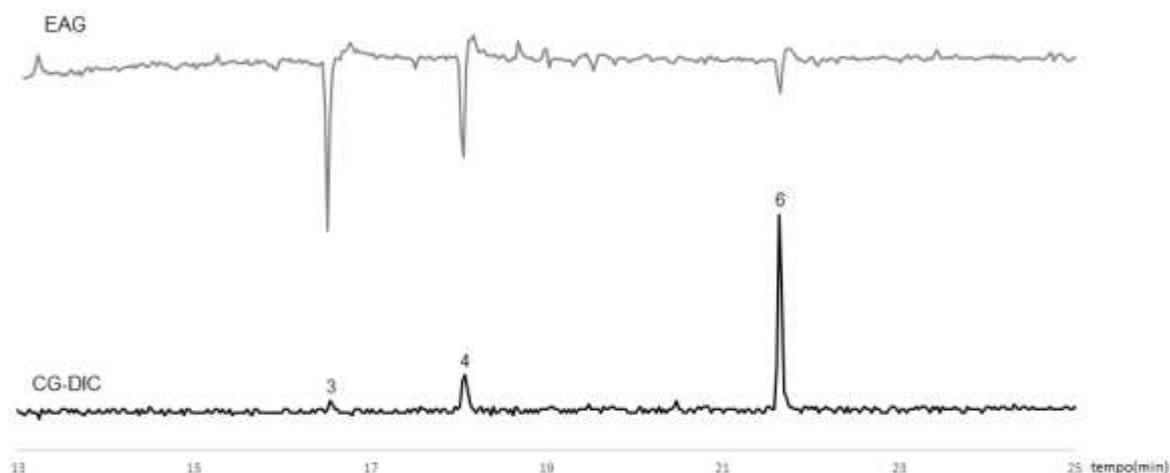
**Figura 34 – Expansão da resposta eletroantenográfica de antena de macho de *A. bondari* para composto presente no padrão Z9,E12-14:OAc (2).**



**Figura 35 – Expansão da resposta eletroantenográfica de antena de macho de *A. bondari* para o padrão Z9-14:OAc (5).**



**Figura 36 – Expansão da resposta eletroantegráfica de antena de macho de *A. bondari* para o composto Z9-14:Ald (4), para um composto presente no padrão de Z9-14:Ald (3) e para o composto Z9-16:OH (6).**



Ao total 6 picos elicitaram respostas nas antenas de machos e fêmeas de *A. bondari*, os dois compostos para os quais as antenas das fêmeas apresentaram resposta são subprodutos presentes no padrão Z9,E12-14:OAc, sendo necessário uma posterior análise e identificação.

Dentre os 5 compostos para os quais as antenas dos machos apresentaram respostas, 2 são subprodutos dos padrões Z9,E12-14:OAc e Z9-14:Ald, também sendo necessário uma posterior análise e identificação. Os outros 3 compostos que elicitaram respostas nas antenas dos machos são os padrões Z9-14:OAc, Z9-14:Ald e Z9-16:OH.

Apesar de não ser possível visualizar nenhum destes compostos que elicitaram respostas nas antenas dos machos nos extratos das fêmeas de *A. bondari*, os resultados desta pesquisa possibilitaram observar que as antenas dos machos de *A. bondari* apresentam uma atividade para compostos com cadeia entre 12 e 16 carbonos e com uma insaturação na posição n<sup>o</sup>9.

Através das análises de CG-EAG também foi possível observar que as respostas eletroantegráficas das antenas dos machos foram mais fortes para o Z9-tetradecenal e para o composto presente neste padrão, sendo necessário maiores estudos eletroantegráficos para inferir este fato.

Possivelmente o feromônio sexual de *A. bondari* deve possuir como componente algum composto estruturalmente relacionado aos compostos para qual as antenas dos machos apresentaram resposta no CG-EAG.

O fato de não ter sido visualizado nas análises em CG-DIC e CG-EM nenhum dos compostos que foram ativos nas antenas dos machos, não significa que nenhum deles ou compostos estruturalmente relacionados a eles não estejam presentes nos extratos de fêmeas de *A. bondari*, apenas que eles podem estar presentes em concentrações abaixo do limite de detecção destes aparelhos.

Por exemplo em *Acrobasis nuxvorella* (Lepidoptera: Pyralidae) que apresenta como feromônio sexual 3 compostos (*E9,Z11-16:Ac*, *E9,Z11-16:Ald* e *E9,Z11-16:OH*) e nenhum destes pôde ser visualizado por CG-DIC e a identificação foi realizada baseando-se nas correspondências dos tempos de retenção em colunas polares e não polares de CG juntamente com as respostas elicitadas no CG-EAG a partir dos extratos das fêmeas (Harris et al., 2008).

## 5. CONCLUSÃO

Após as análises de identificação realizadas neste trabalho foi possível concluir que a espécie em questão é *A. bondari*.

A partir dos extratos de genitália de fêmeas *A. bondari* analisados no presente estudo, conclui-se que o melhor método dentro os utilizados, é mantendo a porção final do abdômen das fêmeas imersas no hexano por 20 minutos e retirando o solvente sobrenadante e estocando em um único vial até conseguir um extrato com alto número de genitálias.

Através da análise dos perfis cuticulares de adultos de *A. bondari* foi possível observar que existem diferenças tanto qualitativas como quantitativas entre os perfis de machos e fêmeas.

Quando analisadas em EAG as antenas dos machos de *A. bondari* apresentaram atividade significativa para os extratos cuticulares de fêmeas, assim como para os extratos de genitália de fêmea, quando comparados ao controle. Além disto as antenas dos machos de *A. bondari* quando analisadas em CG-EAG apresentaram respostas para compostos identificados como feromônios de fêmeas de espécies pertencentes a Phycitinae.

Desta maneira baseando-se nos resultados desta pesquisa conclui-se que o acasalamento de adultos de *A. bondari* é mediado por compostos feromonais, estes compostos são utilizados para atração e reconhecimento entre machos e fêmeas. Desta maneira o acasalamento em *A. bondari* deve ser mediado por uma mistura primária de compostos que atua como feromônio de longa distância e também por uma mistura secundária de compostos que atua como feromônio de longa distância.

## 6. REFERÊNCIAS

AGROFIT. Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. 2013. Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 15/02/2018

ALLIAUME, A. et al. Mouthparts morphology of the mealybug *Phenacoccus aceris*. Bulletin of Insectology, 71 (1): 1-9. 2018.

ALTNER, H.; PRILLINGER, L. Ultrastructure of Invertebrate Chemo., Thermo., and Hygroreceptors and Its Functional Significance. International Review of Cytology, 67: 69-139. 1980.

ANDERSON, P.; HALLBERG, E.; SUBCHEV, M. Morphology of antennal sensilla auricillica and their detection of plant volatiles in the Herald moth, *Scoliopteryx libatrix* L. (Lepidoptera: Noctuidae). Arthropod Structure and Development, 29: 33 - 41. 2000.

AMEISMEIER, F. Embryonic development and molting of the antennal coeloconic no pore-and double-walled wall pore sensilla in *Locusta migratoria* (Insecta. Orthopteroidea). Zoomorphology, 105: 356 – 366. 1985.

ANDERSON, P.; HALLBERG, E. Structure and distribution of tactile and bimodal taste/tactile sensilla on the ovipositor, tarsi and antennae of the flour moth, *Ephesia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae). International Journal of Insect Morphology and Embryology, 19: 13 - 23. 1990.

ANDO, T.; INOMATA, S.; YAMAMOTO, M. Lepidopteran sex pheromones. Topics in Current Chemistry, 239: 51–96. 2004.

ANDO, T.; YAMAMOTO, M. The List of Lepidopteran Sex Pheromones and Attractants. Internet Database, 2018. Available in: <[https://lepipheromone.sakura.ne.jp/lepi\\_phero\\_list.html](https://lepipheromone.sakura.ne.jp/lepi_phero_list.html)>. Access in: 28 de Abril de 2019.

ARIOLI, C.J. et al. Feromônios sexuais no manejo de insetos-praga na fruticultura de clima temperado. Florianópolis: Epagri, 58 p. (Epagri. Boletim Técnico, 159). 2013.

BALL, S.L.; ARMSTRONG, K.F. DNA barcodes for insect pest identification: a test case with tussock moths (Lepidoptera: Lymantriidae). Canadian Journal of Forest Research, 36: 337–350. 2006.

BENTO, J.M.S. et al. Biology and mating behavior of the coconut moth *Atheloca subrufella* (Lepidoptera: Phycitidae). Florida Entomologist, 89(2): 199-203. 2006.

BUTENANDT, A. et al. Über den sexuallockstoff des seidenspinners *Bombyx mori*. Reindarstellung und Konstitution. Zeitschrift für Naturforschung, 14(B): 283-284. 1959.

BUTLER, C.G. Insects Pheromones. Biological Reviews, 42(1): 42 – 84. 1967.

CALLAHAN, P.S. Insect antennae with special reference to the mechanism of scent detection and the evolution of sensilla. International Journal of Insect Morphology and Embryology. 4 (5): 381 - 430. 1975.

CITO, A. et al. The potential beneficial effects of *Tenebrio molitor* (coleoptera tenebrionidae) and *Galleria mellonella* (lepidoptera pyralidae) on human health. REDIA, 100: 125-133. 2017.

COCK, M.J.W.; BURRIS, D.H. Neotropical palm-inflorescence feeding moths (Lepidoptera: Batrachedridae, Blastobasidae, Cosmopterigidae, Gelechiidae, Pyralidae, Tineidae): a review of the literature and new records from Trinidad, West Indies. The Journal of Research on the Lepidoptera, 46: 1-21. 2013.

COFFELT, J.A.; VICK, K.W. Sex pheromones of *Ephestia cautella* (Walker) (Lepidoptera pyralidae): Influence of mating on pheromone titer and release rate. Journal of Stored Products Research, 23 (2): 119-123. 1987.

CUENCA, M.A.G. A Cultura do Coqueiro: Importância econômica da cocoicultura no Brasil. 2 ed. Embrapa Tabuleiros Costeiros, Versão eletrônica: ISSN 1678-197X. 2016. Disponível em: <[https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p\\_p\\_id=conteudoportlet\\_WAR\\_sistemaasdeproducaolf6\\_1ga1ceportlet&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=normal&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-1&p\\_p\\_col\\_count=1&p\\_r\\_p\\_-76293187\\_sistemaProducaold=7703&p\\_r\\_p\\_-996514994\\_topicold=7829](https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemaasdeproducaolf6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaold=7703&p_r_p_-996514994_topicold=7829)>. Acesso em: 15/02/2018

DEDAVID, B.A.; GOMES, C.I.; MACHADO, G. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: EDIPUCRS. 2007.

DICKE, M.; SABELIS, M. W. Infochemical terminology: should it be based on cost-benefit analysis rather than origin of compound? *Functional Ecology*, 2: 131-139. 1988.

DIONGUE, A.; YANG, J.T.; LAI, P.Y. Biomorphometric characteristics of different types of sensilla detected on the antenna of *Helicoverpa armigera* by scanning electron microscopy. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 16: 23 – 28. 2013.

FAO. Crops. 2017. Available in: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Access in: 23 de Abril de 2019.

FATAAR, S.; KAHMEN, A.; LUKA, H. Innate and learned olfactory attraction to flowering plants by the parasitoid *Cotesia rubecula* (Marshall, 1885) (Hymenoptera: Braconidae): Potential impacts on conservation biological control. *Biological Control*. 132: 16-22. 2019

FATZINGER, C. W.; ASHER, W. C. Mating Behavior and Evidence for a Sex Pheromone of *Dioryctria abietella* (Lepidoptera: Pyralidae (Phycitinae)). *Annals of the Entomological Society of America*, 64 (3): 612 - 620. 1971.

FAUCHEUX, M.J.; KRISTENSEN, N.P.; YEN, S.H. The antennae of neopseustid moths: Morphology and phylogenetic implications, with special reference to the sensilla (Insecta. Lepidoptera, Neopseustidae). *Zoologischer Anzeiger*, 245: 131–142. 2006.

FERREIRA, J.M.S.; FILHO, M.M. A cultura do coqueiro – Pragas e métodos de controle. 2 ed. Embrapa Tabuleiros Costeiros, Versão eletrônica: ISSN 1678-197X. 2016. Disponível em: <[https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p\\_p\\_id=conteudoportlet\\_WAR\\_sistemaasdeproducaolf6\\_1ga1ceportlet&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=normal&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-1&p\\_p\\_col\\_count=1&p\\_r\\_p\\_-76293187\\_sistemaProducaold=7703&p\\_r\\_p\\_-996514994\\_topicoid=1314](https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemaasdeproducaolf6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaold=7703&p_r_p_-996514994_topicoid=1314)>. Acesso em: 16/02/2018

FERREIRA, J. M. S.; LINS, P. M. P. Pragas do coqueiro. In: FERREIRA, J. M. S.; FONTES H. R. Produção integrada de coco: identificação de pragas, doenças e desordens nutricionais e fisiológicas. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, p. 13-68. 2006.

FERREIRA, J.M.S. et al. Pragas do coqueiro, p. 189-268. In: Ferreira, J.M.S., D.R.N. Warwick & L.A. Siqueira (Eds.). A cultura do coqueiro no Brasil, 2nd Ed. Brasília, Embrapa-SPI, 292 p. 1998.

FERREIRA, J.M.S. et al. Insetos e ácaros, p. 10 – 40. In: Ferreira, J.M.S. (Ed.). Coco: fitossanidade (Serie Frutas do Brasil, 28), Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, 136 p. 2002.

FERREIRA, J.M.S. et al. Traças-das-flores-e-frutos-novos. Disponível em:<<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/coco/arvore/CONT000gnte5gej02wx5ok0cdjvscw4ky5ln.html#>>. Acesso em: 10/02/2018

FOLMER, O. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294-299. 1994

FONTES, H.R.; FERREIRA, J.M.S.; SIQUEIRA, L.A. Sistema de Produção para a Cultura do Coqueiro. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002.

HALLBERG, E.; HANSSON, B.S.; STEINBRECHT, R.A. Morphological characteristics of antennal sensilla in the European corn borer *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Tissue Cell*, 26: 489 - 502. 1994.

HANSEN, E.M. et al. Advances in Semiochemical Repellents to Mitigate Host Mortality From the Spruce Beetle (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology*. 112 (5): 2253-2261. 2019.

HARRIS, M.K. et al. A new pheromone race of *Acrobasis nuxvorella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology*, 101(3): 769-76. 2008.

HEINRICH, C. American moths of the family Phycitinae. United States National Museum Bulletin, 207: viii, 581 pp. 1956. Disponível em: <<https://archive.org/stream/bulletinunited2071956unit#page/82/mode/2up>>. Acesso em: 01/03/2018

HUANG Z.-Y. et al. Structure and Sense Organs of Ovipositors of an Endoparasitoid *Aprostocetus causalis* and an Ectoparasitoid *Quadrastichus mendeli* in *Leptocybe* spp. *Microscopy and Microanalysis*, 25: 250–256. 2019.

HUNGER, T.; STEINBRECHT, R.A. Functional morphology of a double-walled multiparous olfactory sensillum: the sensillum coeloconicum of *Bombyx mori* (Insecta, Lepidoptera). *Tissue Cell*, 30: 14–29. 1998.

INDRIYANTI, D.R. et al. Aggregation pheromones for monitoring the coconut rhinoceros beetle (*Oryctes rhinoceros*) in Jerukwangi Village, Jepara, Indonesia. *Journal of Physics Conference Series*, 983. 2018.

JIANG, Y. et al. Molecular Identification of Sibling Species of *Sclerodermus* (Hymenoptera: Bethyridae) That Parasitize Buprestid and Cerambycid Beetles by Using Partial Sequences of Mitochondrial DNA Cytochrome Oxidase Subunit 1 and 28S Ribosomal RNA Gene. *PLoS ONE*, 10(3): 1 -15. 2015.

KIM, J. et al. Morphology and distribution of antennal sensilla of the bean bug *Riptortus pedestris* (Hemiptera: Alydidae). *Micron*, 79: 501–511. 2016.

KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16:111-120. 1980.

KUENEN, L.P.; MCELFRISH, J.S.; MILLAR, J.G. Identification of critical secondary components of the sex pheromone of the navel orangeworm (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology*, 103(2):314-30. 2010.

KHUHRO, S.A. et al. Two general odorant binding proteins display high bindings to both host plant volatiles and sex pheromones in a pyralid moth *Chilo suppressal* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20: 521–528. 2017.

LEAL, W.S. et al. Unusual pheromone chemistry in the navel orangeworm: novel sex attractants and a behavioral antagonist. *Naturwissenschaften*, 92: 139-146. 2005.

LI, H. H.; REN, Y. D. Insect fauna of Henan (Lepidoptera: Pyraloidea). Beijing: Science Press, 2009. 440 p.

LUBES, G.; CABRERA, A. Identification and evaluation of (3Z,6Z,8E)-dodeca-3,6,8-trien-1-ol as the trail following pheromone on *Microcerotermes exiguus* (Isoptera: Termitidae). *Revista de Biologia Tropical*, 66: 303-311. 2018

MA, T. et al. A key compound: (Z)-9-tetradecen-1-ol as sex pheromone active component of *Hypsipyla robusta* (Lepidoptera: Pyralidae). *Chemoecology*, 25 (6): 325–330. 2015.

MALO, E.A; et al. Antennal Sensilla and Electrophysiological Response of Male and Female *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to Conspecific Sex Pheromone and Plant Odors. *Annals of the Entomological Society of America*, 97(6):1273-1284. 2004.

MALO, E.A. et al. Chemical Analysis of Female Volatiles and Field Response of the Coffee Leafminer Moth (Lepidoptera: Lyonetiidae) to Stereoisomers of Its Major Sex Pheromone Component. *Florida Entomologist*, 92(4): 548-553. 2009.

MARTINS, C.R; JÚNIOR, L.A. Produção e comercialização de coco no Brasil frente ao comércio internacional: Panorama 2014. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros. 2014. Disponível em: <  
<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/122994/1/Producao-e-comercializacao-Doc-184.pdf>>. Acesso em: 16/02/2018.

MILLAR, J.G. et al. (2E,6Z,9Z)-2,6,9-Pentadecatrienal as a Male-Produced Aggregation-Sex Pheromone of the Cerambycid Beetle *Elaphidion mucronatum*. *Journal of Chemical Ecology*, 43 (11–12): 1056–1065. 2017.

MITCHELL, A.; GOPURENKO, D. DNA Barcoding the Heliiothinae (Lepidoptera: Noctuidae) of Australia and Utility of DNA Barcodes for Pest Identification in *Helicoverpa* and Relatives. *PLoS ONE*, 11(8): 1 – 18. 2016

MILLER, B. et al. Use of filbertworm (*Cydia latiferreana*) mating disruption within a hazelnut IPM program. *Crop Protection*, 122: 118-124. 2019.

MORAWO, T; FADAMIRO, H. The role of herbivore- and plant-related experiences in intraspecific host preference of a relatively specialized parasitoid. *Insect Science*, 26 (2): 341 - 350. 2019.

MOURA, J.I.L. et al. Avaliação dos Danos de *Hyalospila ptychis* (Dyar) (Lepidoptera: Phycitidae) em Coqueiro. *Neotropical Entomology*, 35(4): 511-516. 2006.

NASCIMENTO, E.S. et al. Age-dependent pattern of calling behavior in *Atheloca subrufella* (Hulst) (Lepidoptera: Phycitidae). *Journal of Insect Behavior*, 29(2): 190-198. 2016.

NDOMO-MOUALEU, A.F. et al. Structure and distribution of antennal sensilla in the Indianmeal moth, *Plodia interpunctella* (Hübner, 1813) (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Stored Products Research*, 59: 66 - 75. 2014.

OEHLSCHLAGER, A.C. et al. Control of red ring disease by mass trapping of *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae). *Florida Entomologist*, 85(3):507-513. 2002.

ONAGBOLA, E.O.; FADAMIRO, H.Y. Scanning electron microscopy studies of antennal sensilla of *Pteromalus cerealellae* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Micron*, 39: 526–535. 2008.

PARRA-PEDRAZZOLI, A.L.; LEAL W.S. Sexual Behavior of the Navel Orangeworm, *Amyelois transitella* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). *Neotropical Entomology*, 35(6):769-774. 2006.

QUEIROZ, A.F.O. et al. First Record of *Venturia* sp. Parasitizing the Coconut Moth. *Entomobrasilis*, 8(2): 165-167. 2015

ROMANI, R. et al. Transmission and scanning electron microscopic observations on antennal apical pegs in the wasp species *Pimplinae* (Insecta: Hymenoptera). *Micron*, 107: 72–78. 2018.

REBOUÇAS, L.M.C.; CARACIOLO, M.S.B.; SANT'ANA, A.E.G. Composição química da glândula abdominal da fêmea da mariposa *Castnia licus* (Drury) (Lepidoptera:Castniidae): possíveis feromônios e precursores. *Química Nova*, vol.22 (5): 645-648. 1999.

ROH, H.S. et al. Morphology and distribution of antennal sensilla of two tortricid moths, *Cydia pomonella* and *C. succedana* (Lepidoptera). *Microscopy Research and Technique*, 79: 1069-1081. 2016.

ROH, G.H. et al. Species- and sex-specific distribution of antennal olfactory sensilla in two tortricid moths, *Epiphyas postvittana* and *Planotortrix octo*. *Micron*, 106: 7-20. 2018.

RUMPOLD, B.A.; SCHLÜTER, K.O. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57: 802–823. 2013.

SANDERS, C.J.; WEATHERSTON, J. Sex pheromone of the eastern spruce budworm (Lepidoptera:Tortricidae): optimum blend of trans- and cis-11-tetradecenal. *The Canadian Entomologist*, 108: 1285–1290. 1976.

SANTANA, S.W.J. et al. Infestation of coconut fruits by *Aceria guerreronis* enhances the pest status of the coconut moth *Atheloca subrufella*. *Annals of Applied Biology*, 155: 277–284. 2009.

SANTANA, S.W.J.S. et al. Exigências térmicas da praga do coqueiro *Atheloca subrufella* (Hulst) (Lepidoptera: Phycitidae). *Neotropical Entomology*, 39: 181-186. 2010.

SANTANA, et al. Técnica de criação e aspectos biológicos de *Atheloca subrufella* (Hulst) (Lepidoptera: Phycitidae) em frutos de coqueiro. *Neotropical Entomology*, 40: 14–19. 2011.

SILK, P.J. et al. Sex pheromone chemistry of the eastern spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Environmental Entomology*, 9: 640–644. 1980.

SILK, P.J. et al. Unsaturated Cuticular Hydrocarbons Enhance Responses to Sex Pheromone in Spruce Budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Journal of Chemical Ecology*, 43:753–762. 2017.

SUN, X.; Wang, M.Q.; Zhang, G. Ultrastructural Observations on Antennal Sensilla of *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Microscopy research and Technique*, 74:113–121. 2011.

STEINBRECHT, R.A. Pore structures in insect olfactory sensilla: a review of data and concepts. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 26 (3-4): 229–245. 1997.

STEVENS, M.M.; WOOD, R.M.; MO, J.H. Monitoring flight activity of *Cryptolestes ferrugineus* (Coleoptera: Laemophloeidae) in outdoor environments using a commercial pheromone lure and the kairomone 1-octen-3-ol. *Journal of Stored Products Research*, 83: 227-235. 2019.

SVENSSON, G.R.; TONNBERG, V.; SIGSGAARD, L. Identification and field evaluation of (E)-11,13-tetradecadienal as sex pheromone of the strawberry tortrix (*Acleris comariana*). *Journal of Applied Entomology*, 143 (5): 535-541. 2019.

TAKEUCHI, H.; NOBUYUKI, E.; KOHJI, Y. Estimation of dispersal distance of the soybean pod borer *Leguminivora glycinivorella* (Lepidoptera: Tortricidae) by mark-recapture experiments. *Applied Entomology and Zoology*, 54 (3): 285-296. 2019.

THÖMING, G. et al. Pea plant volatiles guide host location behaviour in the pea moth. *Arthropod-Plant Interactions*, 8 (2): 109 - 122. 2014.

WEE, S.L.; OH, H.W.; PARK, K.C. Antennal sensillum morphology and electrophysiological responses of olfactory receptor neurons in trichoid sensilla in

diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). Florida Entomologist, 99: 46–158. 2016.

WITZGALL, P.; KIRSCH, P.; CORK, A. Sex Pheromones and Their Impact on Pest Management. Journal of Chemical Ecology, 36: 80 - 100. 2010.

WILSON J.J. DNA Barcodes for Insects. In: Kress W., Erickson D. (eds) DNA Barcodes. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 858. Humana Press, Totowa, NJ. 2012.

YAN, Q. et al. Female sex pheromone of *Athetis lepigone* (Lepidoptera: Noctuidae): Identification and field evaluation. Journal of Applied Entomology, 142 (1-2): 125-130. 2018.

YAN, X.Z. et al. Distribution patterns and morphology of sensilla on the antennae of *Plutella xylostella* (L.) - a scanning and transmission electron microscopic study. Micron, 103: 1-11. 2017.

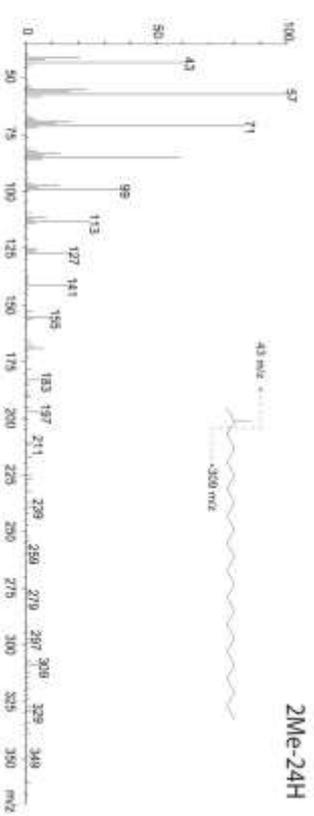
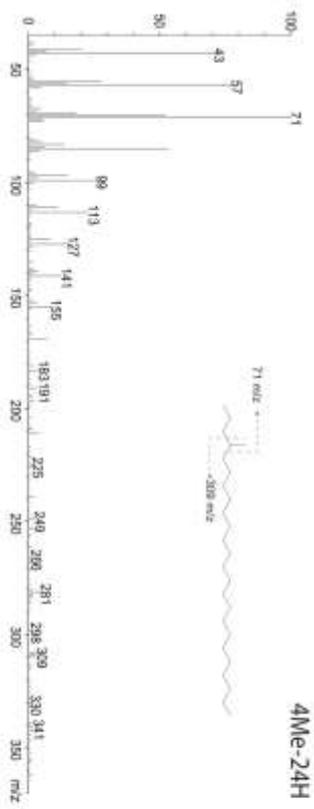
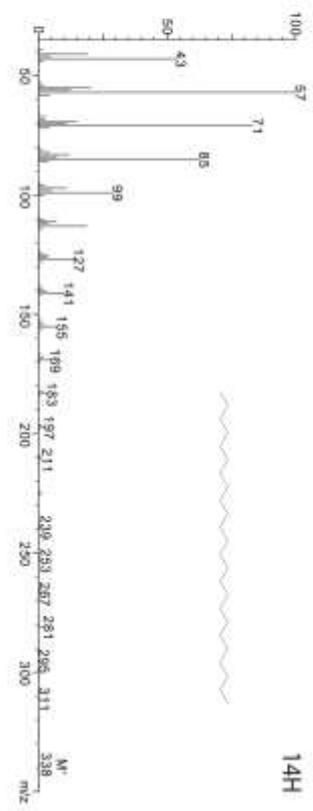
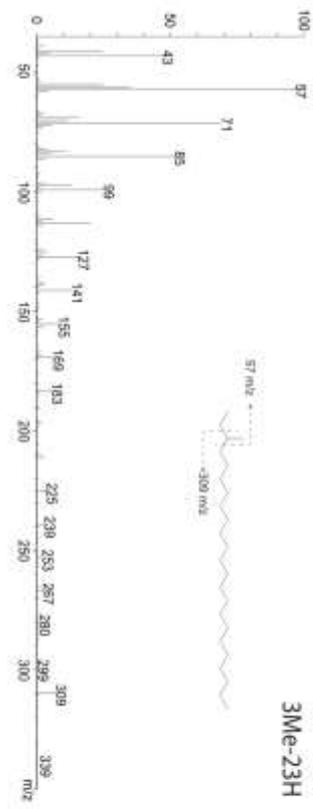
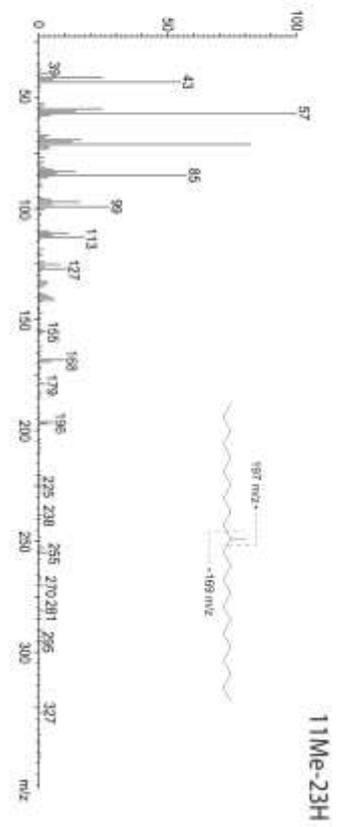
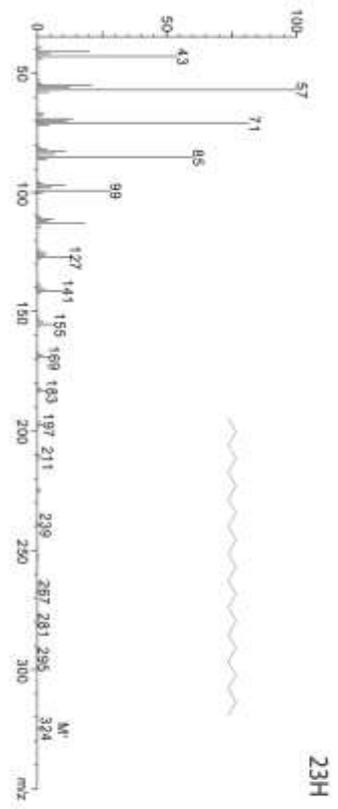
ZARBIN, P.H.G.; RODRIGUES, M.A.C.M.; LIMA, E.R. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. Química Nova, 32: 722-731. 2009.

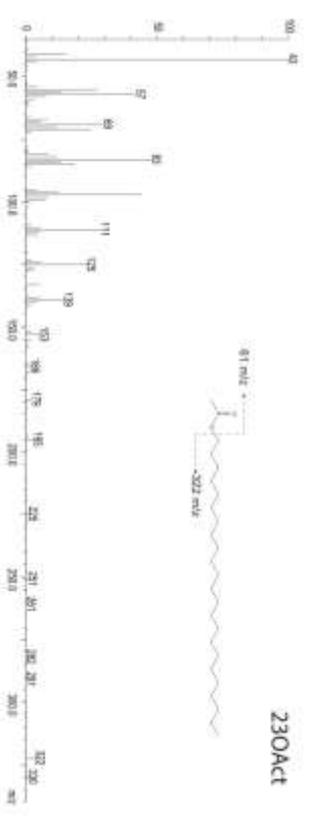
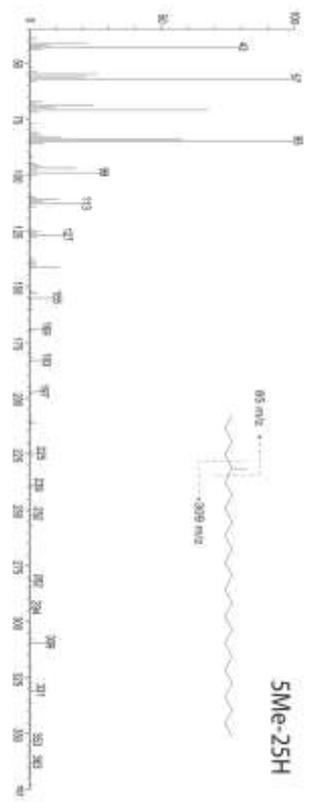
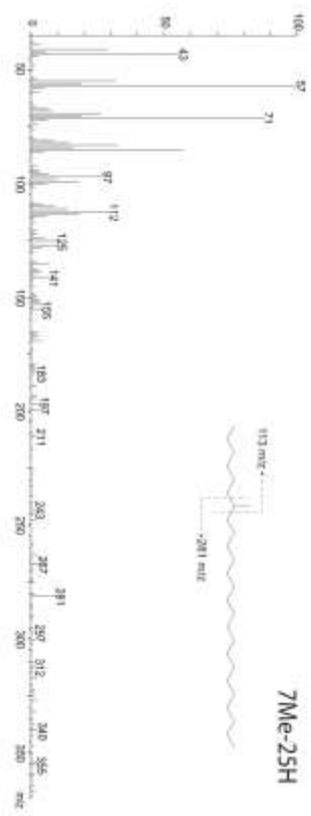
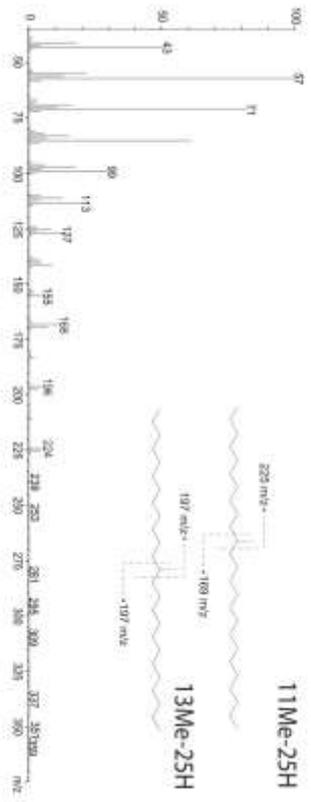
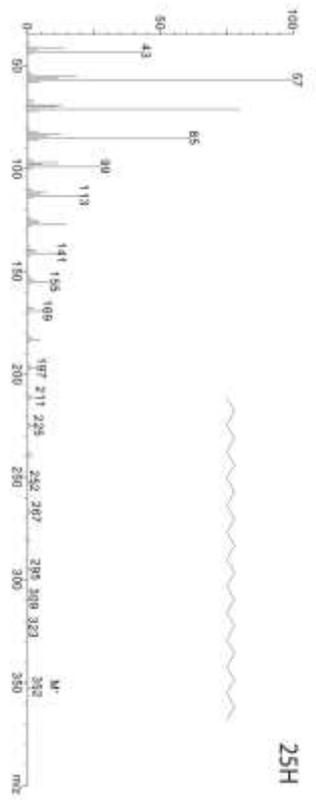
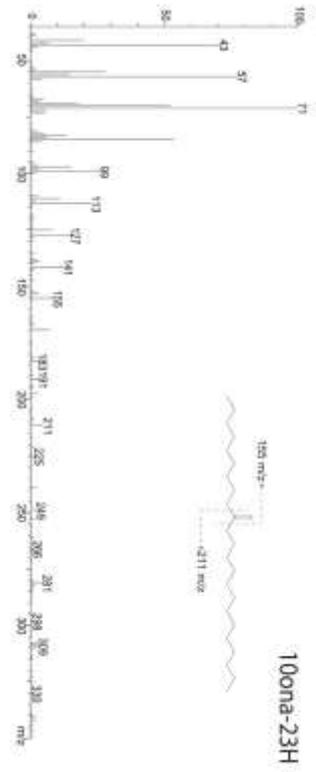
Zhang, Z. et al. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. Journal of Computational Biology, 7(1-2):203-14. 2000.

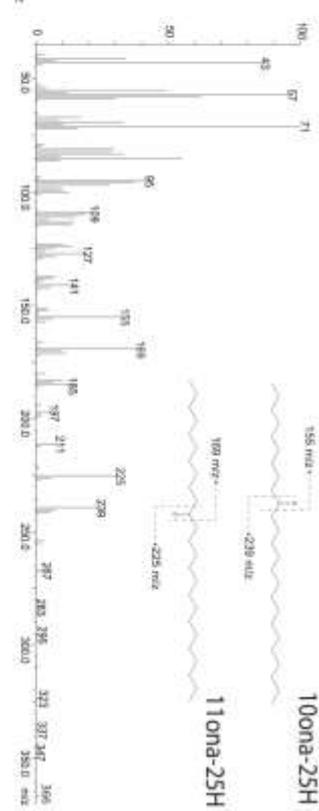
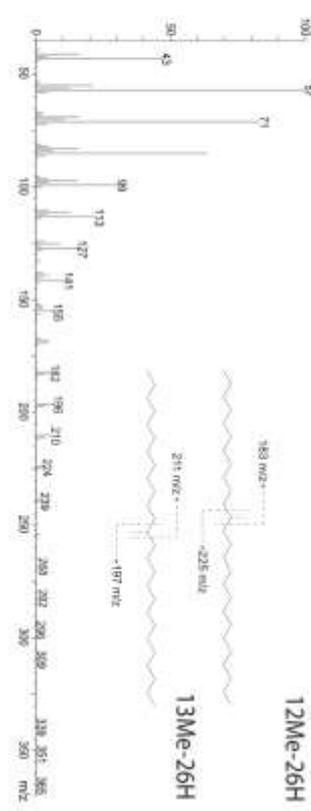
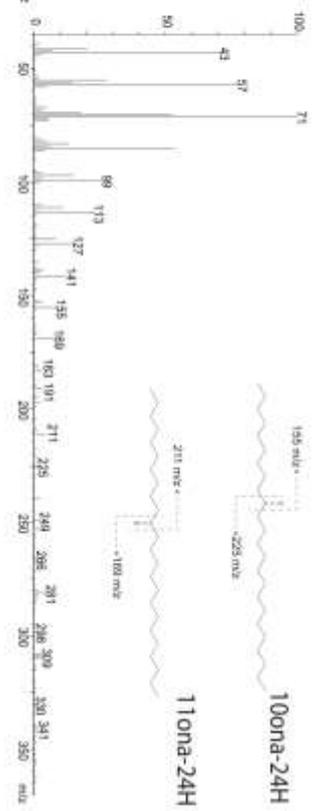
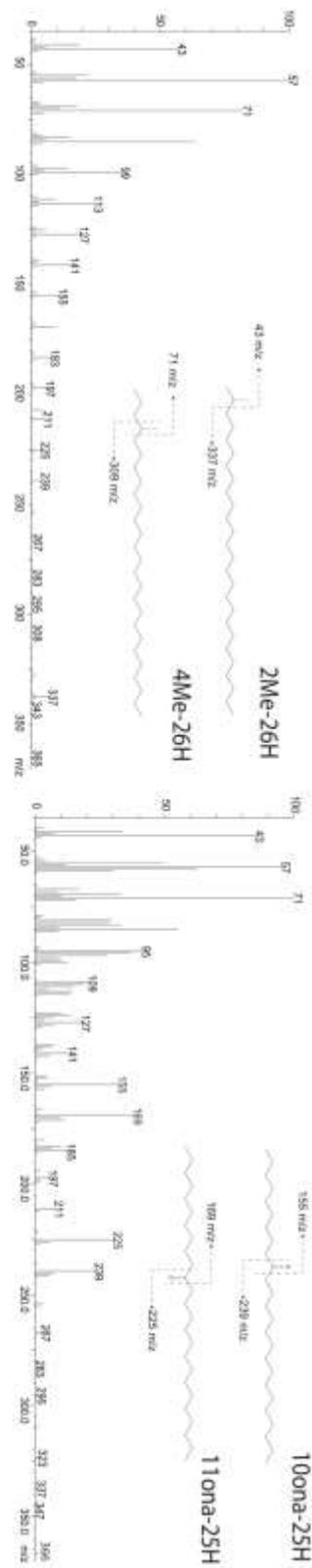
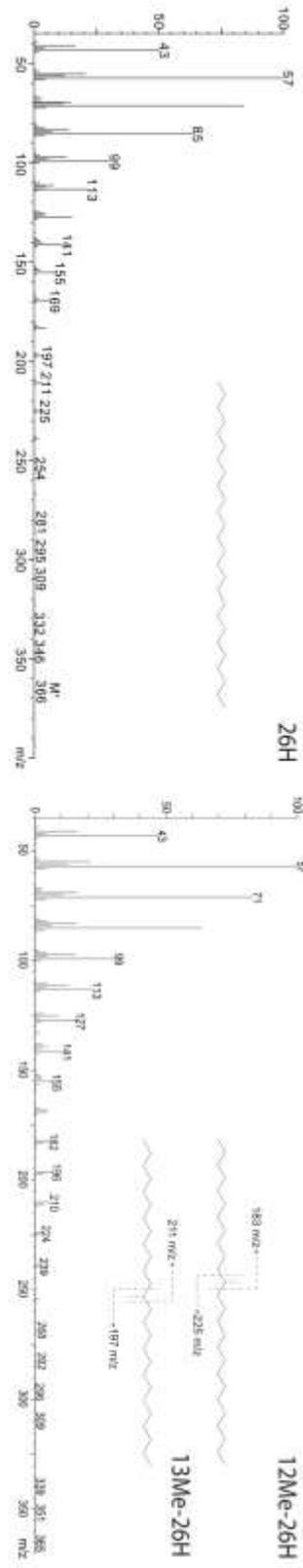
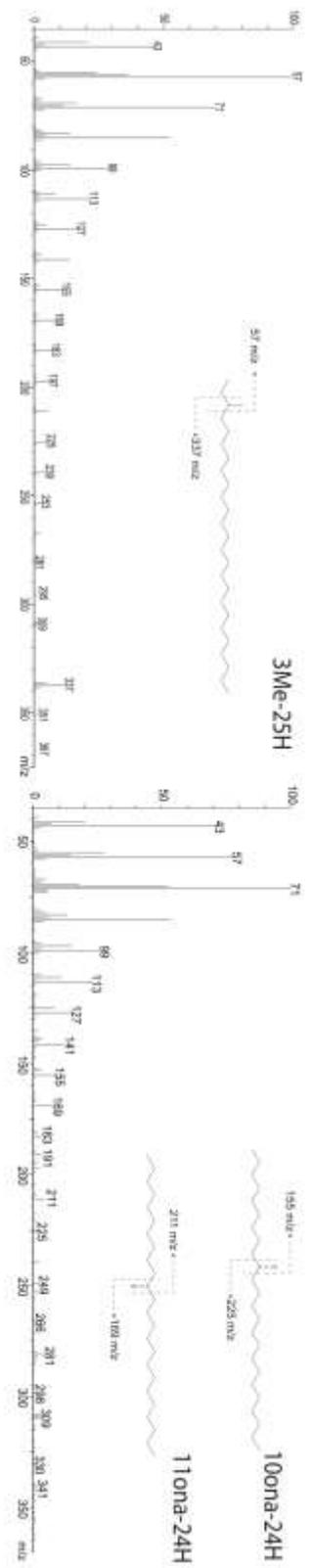
ZONGXIU, L. et al. Identification of Sex Pheromone of *Mitochondria striata* (Lepidoptera: Arctiidae). Journal of Economic Entomology, 112 (2): 665 - 670. 2019.

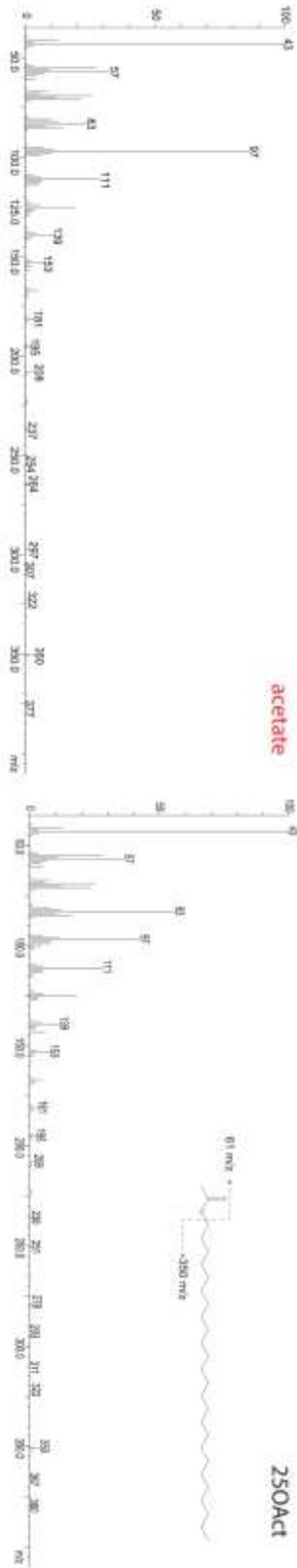
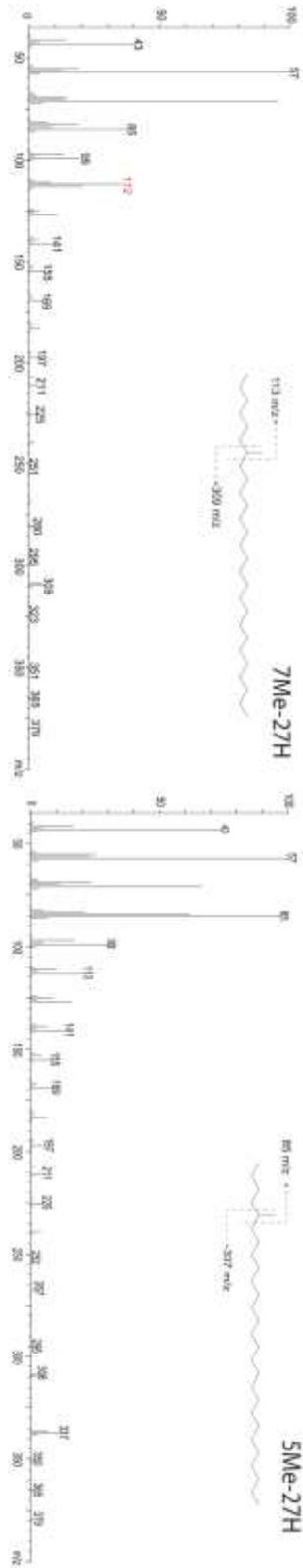
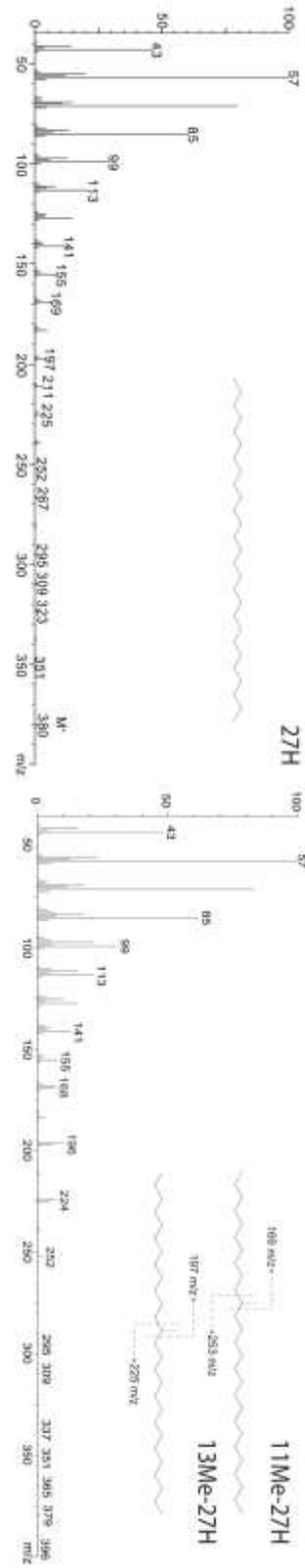
## APÊNDICES

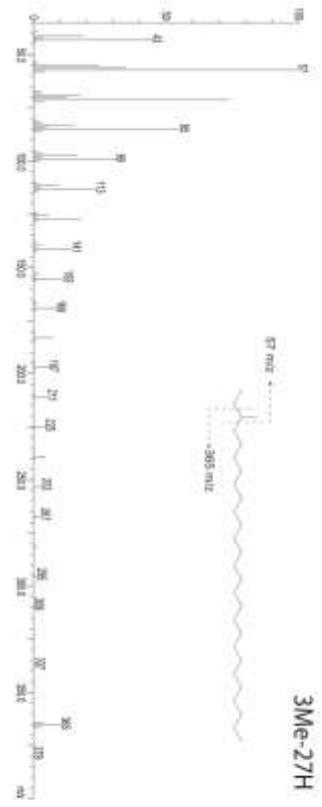
APÊNDICE A – Espectros de Massas dos compostos identificados nos perfis cuticulares de machos e fêmeas de *A. bondari* por meio de sua fragmentação.











APÊNDICE B – Artigo “**Mating behavior in *Atheloca subrufella* Hulst, 1887 (Lepidoptera: Pyralidae: Phycitinae)**” aceito para publicação na Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável (ISSN 1981-8203).

**Comportamento de acasalamento em *Atheloca subrufella* Hulst, 1887  
(Lepidoptera: Pyralidae: Phycitinae)**

**Mating behavior in *Atheloca subrufella* Hulst, 1887 (Lepidoptera: Pyralidae:  
Phycitinae)**

**Abel Felipe de Oliveira Queiroz<sup>1</sup>, Jakeline Maria dos Santos<sup>2</sup>, Mariana Oliveira Breda<sup>3</sup>, Antônio Euzébio Goulart Santana<sup>4</sup>**

1 - Doutor em Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, abelfelipi@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7265-0374>

2 - Pós-doutoranda PNPd na Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, jackbilu@hotmail.com, <http://orcid.org/0000-0001-5935-8347>

3 - Professora Doutora do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, breda.mariana@hotmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1265-957X>

4 - Professor Doutor do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, aegs@ceca.ufal.br, <https://orcid.org/0000-0001-5025-9107>

**– ARTIGO –**

**Resumo:** O comportamento de acasalamento da mariposa *Atheloca subrufella* Hulst, 1887 (Lepidoptera: Pyralidae) foi investigado em arenas de laboratório. As descrições de corte e cópula em machos e fêmeas foram baseadas em observações diretas de casais virgens. Os resultados dos bioensaios de corte e cópula compreendem diversos padrões comportamentais tais como, antenação, busca pela fêmea (caminhando e/ou voando), encontro da fêmea, comportamento de chamamento da fêmea, exibição da glândula de feromônio, tentativa de cópula e cópula. Para isso, foram apresentados etogramas comportamentais de corte e cópula. Os resultados também sugerem que o comportamento de acasalamento em *A. subrufella* é mediado por um feromônio de longa distância e pela presença de um feromônio de curta distância. De maneira geral, esta pesquisa apresenta-se como estudo base para futuras investigações sobre o feromônio sexual de *A. subrufella* e desenvolvimento de novas estratégias de controle comportamental.

**Palavras-chave:** *Cocos nucifera*, traça do coco, comportamento de corte.

**Abstract:** The mating behavior of the moth *Atheloca subrufella* Hulst, 1887 (Lepidoptera: Pyralidae) was investigated in laboratory arenas. The descriptions of courtship and copulation in males and females were based on direct observations of virgin couples. The courtship and copulation bioassays results comprise several behavior patterns such as antennation, female searching (walking and/or flying); female encounter; female calling behavior; exhibition of pheromone gland; male approach and copulation. For that, courtship and copulation behavior ethograms were presented. The results also suggest that the mating behavior in *A. subrufella* is mediated by a long-range pheromone and the presence of a short-range pheromone. In overall, this research presents itself as a basis study to further investigations upon *A. subrufella* sex pheromone and to improve the development of new strategies of behavioral control.

**Key words:** *Cocos nucifera*, coconut moth, courtship behavior.

## INTRODUCTION

The study of mating behavior in insects is the first step for the development of sexual behavioral control strategies. Researches regarding calling behavior, presence or absence of pheromone gland, courtship and copulation patterns are being developed and stand as important tools to allow a better understanding and more accurate application of Lepidoptera control techniques (BARRADAS-JUAN et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2016; SHI et al., 2018). According to Parra-Pedrazolli and Leal (2006), female moths produce a mixture of pheromone compounds and the complete bouquet is responsible for male attraction. Nevertheless, control by sex pheromone may be achieved by the use of a single major constituent or by the use of a partial mixture.

The coconut moth *Atheloca subrufella* (Hulst, 1887) [= *Hyalospila ptychis* (Dyar, 1919)] (Lepidoptera: Pyralidae) is an important coconut pests, presenting wide distribution in Brazil (FERREIRA et al. 2002), it was also reported in other countries such as the USA, Mexico, Cuba, and the Virgin Islands (BONDAR, 1940; HEINRICH,

1956; KIMBAL, 1965; HABECK and NICKERSON, 1982; HODGES et al., 1983; MOORE, 2001). According to FAO (2017) Brazil is the world's fifth largest producer of coconuts, reaching approximately a production of 2.4 million of tonnes in an area of 108,629.00 ha.

The *A. subrufella* damage is performed by the caterpillars that develop inside of the coconut inflorescences and fruits, they feed on the mesocarp and blocking the flow of the sap. Infested fruits and inflorescences are aborted and those that do not fall from the coconut palm tree become deformed and commercially depreciated. The management of this pest by traditional methods is restricted to the collection of infested coconut fruits and the use of chemical insecticides (FONTES and FERREIRA, 2006). Nevertheless, these techniques are often hampered by the caterpillars endophytic habit consequently, studies of new and efficient control measures are required.

Behavioral control strategies are not used for *A. subrufella*. However, some studies were developed to describe biological aspects and calling behavior of this moth (BENTO et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2016). In order to contribute as basis to the development of new behavioral management techniques, the objective of this study is to describe the courtship and copulation behavior of *A. subrufella*.

## **MATERIAL AND METHODS**

### ***A. subrufella* rearing**

The *A. subrufella* rearing was kept in the Natural Resources Research Laboratory of Federal University of Alagoas (LPQRN/UFAL) under laboratory conditions at  $25 \pm 2$  °C, 80% RH and photoperiod 14L: 10D. The insects were collected in the field, from coconut fruits with signs of infestation by *A. subrufella* caterpillars. The collections were performed in the states of Sergipe and Alagoas, Brazil. The coconut fruits were kept in plastic containers (10 L) covered with voile fabric until the caterpillars reached the pupal stage. Pupae were sexed and after adult emergence, couples were kept in plastic cages (1 L) lined inside with paper towel as oviposition substrate. Eggs were daily collected and kept in Petri dishes with moistened filter paper. The caterpillars were daily fed with mesocarp coconut fruit cube of 2x2cm until reached pupal stage.

### **Courtship bioassays**

The courtship male behavior was directly observed through bioassays using a rectangular shaped glass arena (20 x 10 x 15 cm) containing a female trapped in a cage (hair roller of 5 cm) exhibiting calling behavior. The cage containing the female was covered by voile fabric to allow the compounds release and physical contact of male and female, but preventing the mating. Ten replicates were performed. For each replicate a different couple of adults was used. Four points were demarcated in the arena and in each replicate the female was allocated at a different point, aiming the elimination of any external physical, chemical or visual influence. *A. subrufella* adults with at least 24 hours age were used in the bioassays, ensuring sexual maturity (BENTO et al., 2006). The bioassays were performed from the first hour of scotophase, according to the period of *A. subrufella* female calling behavior (NASCIMENTO et al., 2016) under laboratory conditions of  $25 \pm 2$  ° C and 60% RH. The couples were observed during 10 min.

### **Copulation behavior**

The copulation behavior was directly observed in plastic containers cages (250 mL) containing a virgin couple, the adults used in the bioassays were 24h to 96h of aged. Three replicates were performed. For each replicate a different couple of adults was used. The couple behavior was recorded during the female first scotophase period, according to the female calling behavior (NASCIMENTO et al., 2016). The description of the copulation behavior was performed through a video analyses made under red light conditions. The virgin couple was observed since the moment that the female exhibited the calling behavior until the moment of the copula.

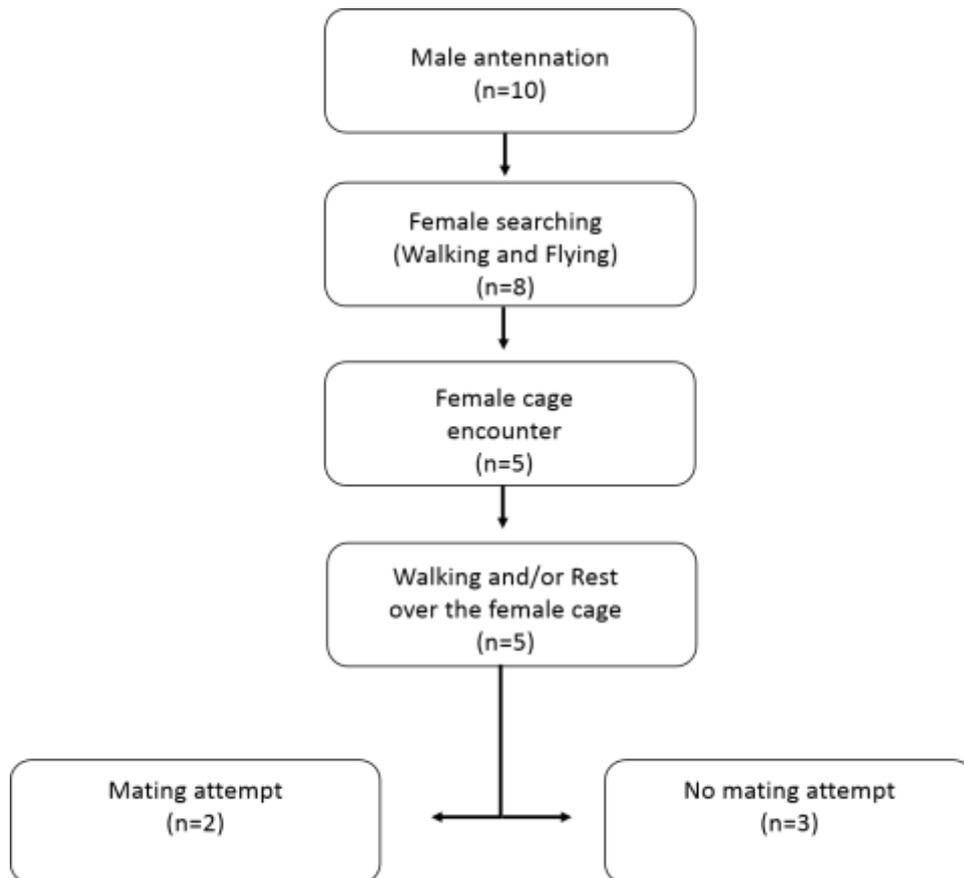
## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Courtship bioassays**

During the arena bioassays was observed some behavioral patterns presented by *A. subrufella* adults. Both, males and females showed continuous antennation during courtship. The females performed the calling behavior throughout all the bioassay period. The male courtship behavioral patterns were classified as:

antennation, female searching (walking and/or flying on the arena); female encounter; walking over the female cage surface, resting over the female cage surface; antennation on the female cage; mating attempt (flapping wings and arched abdomen); no mating attempt (Figure 1).

**Figure 1.** Courtship bioassays ethogram of *Atheloca subrufella* Hulst, 1887 (Lepidoptera: Pyralidae) (n=10).

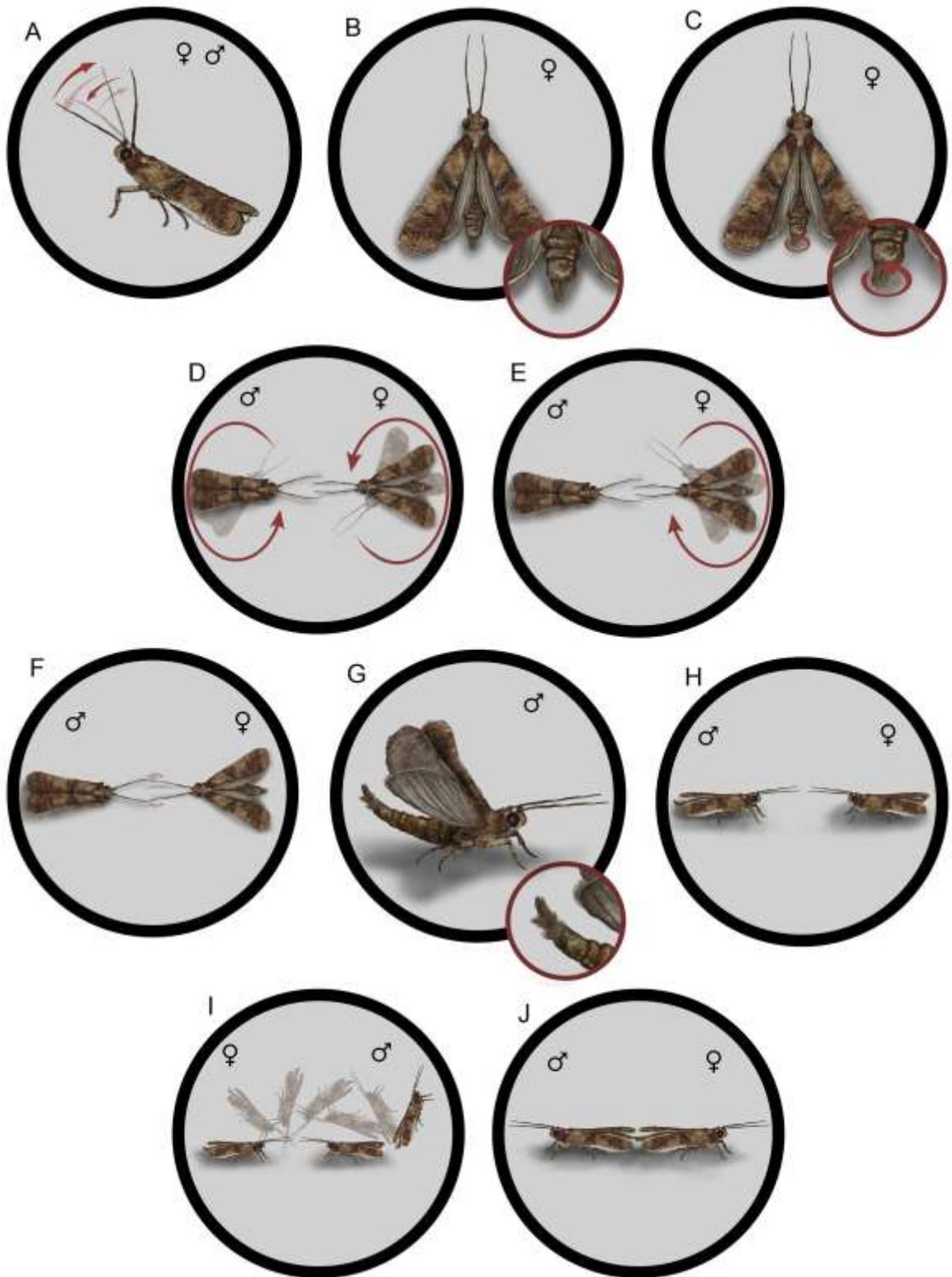


### Copulation behavior

The copulation behavior patterns are described as follow: male and female presented antennation behavior; the female exhibited the calling behavior, with wings slightly apart exposing the pheromone gland at the final portion of the arched abdomen; the female rotated the final portion of the abdomen spinning the pheromone gland 360°; the male rotated its body 360°; the female rotated its body

360° in both directions (clockwise and anticlockwise); the male approached the female; male and female showed antennation behavior facing each other and touching their antennae; the male lifted its wings exhibiting the hairpencil on the final portion of the abdomen; the male jumped over the female in a backflip resting on the ground with its abdomen opposite to the female abdomen; finally male and female initiated the copulation (Figure 2).

**Figure 2.** Mating behavior ethogram of *Atheloca subrufella* Hulst, 1887 (Lepidoptera: Pyralidae). Male and female antennation (A), female calling behavior (B, C), male and female body rotation (D, E), male and female touching antennae (F), male lifted its wings exhibiting the hairpencil (G), male jumped over the female in a backflip resting on the ground with its abdomen opposite to the female abdomen (H, I), mating position (J).



Based on the behavioral patterns showed by *A. subrufella* adults in the present study it is possible to assume that courtship and copulation in this species may be mediated by the presence of sex pheromone. *A. subrufella* females seems to release a long-range pheromone to attract the males, which recognize the females through contact, probably mediated by a short-range pheromone and/or cuticular hydrocarbons. This pattern of short distance recognition was also observed in other Pyralidae moth species, the *Amyelois transitella* Walker, 1863 (Lepidoptera: Pyralidae: Phycitinae), which exhibited similar behavior patterns such as antennation indicating a major characteristic of male and female sexual activity, the extrudation of a female abdominal (pheromone) gland and male recognition of female through antennation (PARRA-PEDRAZZOLI and LEAL 2006).

The *Dioryctria abietella* [Denis & Schiffermüller], 1775 (Lepidoptera: Pyralidae: Phycitinae) also presented a very similar behavior to *A. subrufella*, such as the same pattern of female calling behavior; the behavior of the male and female of touching the antennae after assuming the frontal position; and the attempt of male copulation, where the male lifted its wings exhibiting the hairpencil on the final portion of the abdomen and jumped over the female in a backflip resting on the ground with its abdomen opposite to the female abdomen (FATZINGER and ASHER, 1971).

The results of the present study suggest that mating behavior in *A. subrufella* may be mediated by a primary mixture of compounds which acts as long-range sex pheromone and also by a secondary mixture of compounds which acts as a short-range pheromone.

Same as that, the primary sex pheromone of *Choristoneura fumiferana* Clemens, 1865 (Lepidoptera: Tortricidae) is composed of (*E*)- and (*Z*)-11-tetradecenal, produced by the females and are efficient capturing virgin males on baited traps in a ratio 95: 5 (SANDERS and WEATHERSTON 1976; SILK et al., 1980). After cuticular compounds analyses, the presence of unsaturated alkanes in both sexes was noted, but the compounds (*Z,Z,Z*)-3,6,9-tricosatriene and (*Z,Z,Z*)-3,6,9-pentacosatriene were identified only in females. Arena and wind tunnel bioassays using *C. fumiferana* adults showed that males exhibit patterns behavior as flapping wings and arched abdomen in the presence of female body parts extracts and the female unsaturated alkanes. In addition, two female cuticular compounds, (*Z*)-5-tricosene and (*Z,Z,Z*)-

3,6,9-tricosatriene, enhanced male responses to the primary sex pheromone components, acting in the male orientation and short-range courtship. (SILK et al., 2017).

Among the subfamilies of Pyralidae, the Phycitinae is one of the most abundant, comprising about 5,000 species distributed throughout the world (LI and REN, 2009). However, only 35 female sex pheromones were identified in this subfamily. The pheromonal mixtures identified to the Phycitinae species are characterized by the presence of aldehydes, acetates, alcohols and hydrocarbons (ANDO and YAMAMOTO, 2018). The number of identified pheromones compared to the number of species in Phycitinae reinforces the requirement and importance of this study.

The use of sex pheromones as a behavioral control strategy offer an environmentally friendly practice, successfully applied in several techniques such as monitoring, mass control and mating disruption. Nevertheless, for *A. subrufella*, there is no sex pheromone identification until this moment and the control strategies are restricted to collection of infested coconut fruits and the use of chemical insecticides.

In overall, this research shows itself as a basis study to improve the development of new strategies of control, allowing further investigations upon *A. subrufella* sex pheromone, cuticular hydrocarbons and behavioral management techniques, within the principles of the Integrated Pest Management (IPM).

## **CONCLUSIONS**

Based at the results of this research it is possible to conclude that in the mating behavior of *A. subrufella*, the female produces compounds to attract the male, and the male is responsible by the search, recognition of the female and attempted copulation. This knowledge is essential to apply techniques of population control using pheromone.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors would like to thank the research funding agency CAPES for the scholarships (protocol number: 1538957) granted to the post-graduate students participating in the study.

## REFERENCES

ANDO, T.; YAMAMOTO, M. The List of Lepidopteran Sex Pheromones and Attractants. Internet Database, 2018. Available in: <[https://lepipheromone.sakura.ne.jp/lepi\\_phero\\_list.html](https://lepipheromone.sakura.ne.jp/lepi_phero_list.html)>. Access in: 28 de Abril de 2019.

BARRADAS-JUANZ, N.; DÍAZ-FLEISCHER, F.; PÉREZ-STAPLES, D. Mating Behavior of *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) under Laboratory Conditions. *Annals of the Entomological Society of America*, v.109, n.3, p. 377–383, 2016.

BENTO, J. M.; NAVA, D. E.; CHAGAS, M. C. M.; COSTA, A. H.; LIBARDI, D. J.; PARRA, J. R. P. Biology and Mating Behavior of the Coconut Moth *Atheloca subrufella* (Lepidoptera: Phycitidae). *Florida Entomologist*, v.89, n.2, p. 199-203, 2006.

BONDAR, G. Insetos nocivos e moléstias do coqueiro (*Cocos nucifera* L.) no Brasil. Salvador: Tipografia Naval, 1940. 156 p.

FAO. Crops. 2017. Available in: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Access in: 23 de Abril de 2019.

FATZINGER, C. W.; ASHER, W. C. Mating Behavior and Evidence for a Sex Pheromone of *Dioryctria abietella* (Lepidoptera: Pyralidae (Phycitinae)). *Annals of the Entomological Society of America* v.64, n.3, p. 612-620, 1971.

FERREIRA, J. M. S.; ARAÚJO, R. P. C.; SARRO, F. B. Insetos e ácaros, *In*: FERREIRA, J. M. S. (Ed.). *Coco: fitossanidade*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002. 136 p.

FONTES, H. R.; FERREIRA, J. M. S. A cultura do coqueiro. 1.ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 101 p.

HABECK, D. H.; NICKERSON, J. C. *Atheloca subrufella* (Hulst), a pest of coconuts (Lepidoptera: Pyralidae: Phycitinae). Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, Entomology Circular, n.241, p. 1-2, 1982.

HEINRICH, C. American moths of the family Phycitinae. United States National Museum Bulletin, 207: viii, 581 pp. 1956. Available in: <<https://archive.org/stream/bulletinunited2071956unit#page/82/mode/2up>>. Access in: 26 de Abril de 2019.

HODGES, R. W.; DOMINICK, T.; DAVIS, D. R.; FERGUSON, D. C.; FRANCLEMONT, J. G.; MONROE, E. G.; POWELL, J. A. Check List of the Lepidoptera of America North of Mexico. E. W. Classey Ltd. & The Wedge Entomological Research Foundation, London. 1983, 284 p.

KIMBALL, C. P. The Lepidoptera of Florida. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, Arthropods of Florida and Neighboring Land Areas v.1, p. 1-363. 1965.

LI, H. H.; RE, Y. D. Insect fauna of Henan (Lepidoptera: Pyraloidea). Beijing: Science Press, 2009. 440 p.

MOORE, D. Insects of palm flowers and fruits, *In*: Howard, F. W.; Moore, D.; Giblin-Davis, R. M.; Abad, R. G. (Ed), Insects on Palms. Wallingford: CAB International, 2001. 400 p.

NASCIMENTO, E. S.; AMBROGI, B. G.; PINTO-ZEVALLOS, D. M.; SOUSA-SOUTO, L. Age-dependent pattern of calling behavior in *Atheloca subrufella* (Hulst) (Lepidoptera: Phycitidae). Journal of Insect Behavior, v.29, n.2, p. 190-198, 2016.

PARRA-PEDRAZZOLI, A. L.; LEAL, W. S. Sexual Behavior of the Navel Orangeworm, *Amyelois transitella* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). Neotropical Entomology v.35, n.6, p.769-774, 2006.

SANDERS, C. J.; WEATHERSTON, J. Sex pheromone of the eastern spruce budworm (Lepidoptera:Tortricidae): optimum blend of trans- and cis-11-tetradecenal. The Canadian Entomologist, v.108, p. 1285–1290, 1976.

SHI, X. H.; MA, T.; ZHANG, S. N.; SUN, Z. H.; CHEN, X. Y.; WANG, C. L.; JIA, C. J.; LIANG, Y. C.; ZHU, Y.; HE, Y. R.; WEN, X. J. Calling and mating behavior of *Diaphania angustalis* (Lepidoptera: Crambidae). Journal of Economic Entomology, v.111, n.5, p. 2250-2254, 2018.

SILK, P. J.; EVELEIGH, E.; ROSCOE, L.; BURGESS, K.; WEATHERBY, S.; LECLAIR, G.; MAYO, P.; BROPHY, M. Unsaturated Cuticular Hydrocarbons Enhance Responses to Sex Pheromone in Spruce Budworm, *Choristoneura fumiferana*. Journal of Chemical Ecology, v.43, p. 753–762, 2017.

SILK P. J.; TAN, S. H.; WIESNER, C. J.; ROSS, R. J.; LONERGAN, G. C. Sex pheromone chemistry of the eastern spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. Environmental Entomology, v.9, p. 640–644, 1980.