



**Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Zoologia**

**COMUNICAÇÃO VIBRACIONAL EM PENTATOMIDAE: INTERAÇÕES
BIÓTICAS, ABIÓTICAS E APLICAÇÃO NO MANEJO DE PRAGAS**

Aline Moreira Dias Martinez

**Brasília-DF
2021**



**Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Zoologia**

**COMUNICAÇÃO VIBRACIONAL EM PENTATOMIDAE: INTERAÇÕES
BIÓTICAS, ABIÓTICAS E APLICAÇÃO NO MANEJO DE PRAGAS**

Aline Moreira Dias Martinez
Linha de pesquisa Zoologia Aplicada

Orientador: Dr. Raúl Alberto Laumann

Tese apresentada a Universidade de Brasília como requisito para a obtenção
do título de Doutor em Zoologia

**Brasília-DF
2021**

Ao meu Deus

Aos meus pais, meu exemplo de vida

Ao meu marido Pedro e minha filha Elisa, os amores da minha vida

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Raúl Laumann por me ensinar de forma tão especial como ser um excelente profissional, e pela pessoa incrível, acolhedora e compreensível que sempre foi durante esses 10 anos de convivência. Meus amigos do laboratório, Ana Lagôa, Diego Magalhães, Marla Juliane, Michely Aquino, Mirian Michereff, Izabela Thais e Samantha da Silveira, pela amizade, e conversas científicas. Ao Mathues Lorrán por me ajudar com os experimentos de forma tão responsável e dedicada. A Dr. Maria Carolina Blassioli Moraes, por todo apoio, conselhos e ajuda principalmente nos experimentos relacionados a química. Aos Dr. Miguel Borges, e Celonor Silva pela ajuda e conselhos durante minha caminhada científica. Ao Dr. Andrej Čolk, pela parceria com o laboratório e ensinamentos durante suas visitas ao laboratório de Semioquímico da Embrapa Cenargen e minha visita técnica ao laboratório do Instituto Nacional de Biologia em Ljubljana, Eslovênia. Aos meus pais por toda ajuda, cuidando da minha bebê, e dando todo suporte físico, psicológico e espiritual durante toda minha caminhada, meus irmãos Joyce e David, os melhores companheiros do mundo, meu cunhado Geovane e meu sobrinho Heitor que fazem minha vida muito mais feliz, eu amo vocês de todo meu coração. As minhas amigas Aline Palmeira, Dicla Aranha e Suheid Cruz pelo apoio e orações nos momentos difíceis. Ao meu amado marido Pedro, que me suportou de forma tão amorosa durante todo doutorado. A minha filha Elisa, maior presente que Deus me deu durante o doutorado. Agradeço a Deus por sempre me amar, e nunca me deixar só. Aos Doutores Marina Frizzas, Douglas Maccagnan, Raul Guedes e Felipe Gawryszewski, por aceitarem o convite de compor minha banca de defesa. A todos, muito obrigada, que Deus os abençoe!

Tudo o que não é eterno, é eternamente inútil.

C.S. Lewis

SUMÁRIO

| | |
|---|------------|
| RESUMO..... | 2 |
| ABSTRACT..... | 4 |
| LISTA DE FIGURAS..... | 6 |
| LISTA DE TABELAS..... | 13 |
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 15 |
| PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS GERAIS..... | 31 |
| | |
| <i>CAPÍTULO I: INTERAÇÕES INTRAESPECÍFICAS, RIVALIDADE ENTRE FÊMEAS E SEUS EFEITOS NA COMUNICAÇÃO VIBRACIONAL DE PERCEVEJOS.....</i> | <i>49</i> |
| | |
| <i>CAPÍTULO II: RELAÇÕES INTERESPECÍFICAS, INTERAÇÕES ENTRE PERCEVEJOS HERBÍVOROS E PREDADORES E SEUS EFEITOS NA COMUNICAÇÃO VIBRACIONAL DE PERCEVEJOS.....</i> | <i>98</i> |
| | |
| <i>CAPÍTULO III: COMUNICAÇÃO MULTIMODAL, INTERAÇÕES ENTRE SINAIS QUÍMICOS E SINAIS VIBRATÓRIOS E SEUS EFEITOS NA COMUNICAÇÃO SEXUAL DE PERCEVEJOS.....</i> | <i>125</i> |
| | |
| <i>CAPÍTULO IV: INFLUÊNCIA DE FATORES ABIÓTICOS NA COMUNICAÇÃO VIBRACIONAL DE PERCEVEJOS.....</i> | <i>168</i> |
| | |
| <i>CAPÍTULO V: POTENCIAL DE SINAIS DE CHAMAMENTO DE E. HEROS PARA ATRAÇÃO DE COESPECÍFICOS PARA APLICAÇÃO NO MONITORAMENTO DE POPULAÇÕES.....</i> | <i>187</i> |
| | |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 209 |
| APÊNDICES..... | 211 |

RESUMO

Esta tese apresenta o estudo da comunicação vibracional em percevejos em aspectos básicos e aplicados ao manejo de pragas. Tomando como modelo de estudo os percevejos *Euschistus heros*, *Chinavia ubica* e *Chinavia impicticornis* (Hemiptera: Pentatomidae), foram desenvolvidas atividades de pesquisa para estabelecer a influência de fatores bióticos e abióticos na comunicação vibracional dos insetos. Também foram estudadas as interações entre sinais de diferentes modalidades (químicos e vibratórios) no comportamento reprodutivo destes insetos. Em experimentos utilizando grupos de fêmeas junto a um macho foram estudadas as interações competitivas entre as fêmeas. Foi demonstrado pela primeira vez para Pentatomidae que quando as fêmeas disputam o acesso aos machos desenvolvem interações de rivalidade com emissão de sinais vibratórios específicos no caso de *E. heros* e *C. ubica* ou com troca de sinais de chamamento num padrão característico no caso de *C. impicticornis*. A reprodução destes sinais para casais de coespecíficos tem um claro efeito inibidor da comunicação vibracional e do comportamento de cópula, as chances de copular aumentam 29,41 vezes em *E. heros*, 4,6 vezes em *C. ubica* e 1,71 vezes em *C. impicticornis* quando os insetos foram colocados em plantas sem os sinais de rivalidade. O mesmo foi comprovado em experimentos onde se reproduziram os sinais de rivalidade de machos de *E. heros* para seus coespecíficos. Também foram estudadas as interações heteroespecíficas em experimentos onde se reproduziram sinais de diferentes espécies para machos e fêmeas de *E. heros* e *C. impicticornis*. A presença de sinais de heteroespecíficos não mostrou efeitos significativos no comportamento reprodutivo de *E. heros*. Para *C. impicticornis* os sinais vibratórios reproduzidos (sinais de *C. ubica* e de *E. heros*) alteraram fortemente tanto o comportamento reprodutivo, como a comunicação vibracional, incidindo negativamente na formação de casais e cópula e na emissão de sinais vibratórios. Adicionalmente foi demonstrado que o percevejo predador *Podisus nigrispinus* respondeu positivamente aos sinais vibratórios de *E. heros* mostrando que o predador pode utilizar esses sinais para identificar locais onde existem presas potenciais. A avaliação de sinais multimodais (rastros químicos e feromônio sexual) no comportamento vibracional de *E. heros*, demonstrou que os rastros causam efeito atrativo em machos e aumentam a emissão de sinais vibratórios de insetos de ambos sexos. A presença de sinais vibratórios de fêmeas provoca o aumento da emissão de feromônio sexuais de machos, e, por último a presença de feromônio sexuais causa efeito antagônico em machos e fêmeas, inibindo o comportamento vibracional nos machos e estimulando-o nas fêmeas. Foi testada a interferência de ruídos abióticos (vibrações originadas por vento ou chuva) no comportamento sexual dos percevejos *E. heros*. A presença da vibração do vento não causou interrupção no comportamento de cópula dos percevejos, já a massa de ar projetada nas plantas, por meio de um túnel de vento, com a mesma intensidade do sinal, assim como a presença do ruído de chuva, provocou uma diminuição do comportamento sexual e proporção de cópulas dos casais. Foi avaliada a eficiência de incorporação de sinais vibratórios em armadilhas, resultando numa maior captura de percevejos em armadilhas com sinal de chamamento das fêmeas coespecíficas. Os resultados deste trabalho apresentam várias informações inéditas que, junto à avaliação da aplicação de alguns dos aspectos da comunicação vibracional para o manejo de percevejos

praga, abre novas perspectivas para o desenvolvimento de métodos sustentáveis de manejo de pragas.

Palavras-chave: biotremologia, percevejos, ruídos bióticos, coespecíficos, heteroespecíficos, comunicação multimodal, ruídos abióticos, pragas da soja.

ABSTRACT

This thesis presents the study of basic aspects of the vibrational communication of stink bugs and their application to pest management. Taking as a study model three stink bug species, *Euschistus heros*, *Chinavia ubica* and *Chinavia impicticornis* (Hemiptera: Pentatomidae). Research activities were developed to establish the influence of biotic and abiotic factors on the vibrational communication of insects. The interactions between signals of different modalities (chemical and vibratory) on the reproductive behaviour of these insects were also studied. In experiments using groups of females with a male, the competitive interactions between females were studied. It was demonstrated at first that, when females compete for access to males, they develop rivalry interactions with the emission of specific vibratory signals in the case of *E. heros* and *C. ubica* or with the exchange of calling signals in a characteristic pattern in the case of *C. impicticornis*. The reproduction of these signals for conspecifics pairs has a clear inhibitory effect on vibrational communication and copulation behaviour, the chances of copulating increased 29.41 times in *E. heros*, 4.6 times in *C. ubica* and 1.71 times in *C. impicticornis* when the insects were placed on plants without the rivalry signals. The same was proven in experiments where the rivalry signals of *E. heros* males were reproduced for their conspecifics. Heterospecific interactions were also studied in experiments where signals of different species were reproduced for males and females of *E. heros* and *C. impicticornis*. The presence of heterospecific signals showed no significant effects on the reproductive behaviour of *E. heros*. For *C. impicticornis* the reproduced vibratory signals (signals from *C. ubica* and *E. heros*) strongly altered both the reproductive behaviour and the vibratory communication, influencing negatively the pair formation and copulation and the emission of vibratory signals. Additionally, it was demonstrated that the predatory bug *Podisus nigrispinus* responded positively to the vibratory signals of *E. heros* showing that the predator can use these signals to identify locations with potential prey. The evaluation of multimodal signals (chemical footprints and sexual pheromone) in the vibrational behavior of *E. heros*, showed that the footprints cause an attractive effect in males and increase the emission of vibrational signals from insects of both sexes. The presence of vibratory signals of females causes an increase in the emission of sex pheromones by males and, finally, the presence of sex pheromones causes an antagonistic effect in males and females, inhibiting the vibrational behaviour in males and stimulating it in females. The interference of abiotic noises (vibrations originated by wind or rain) on the sexual behaviour of *E. heros* was tested. The presence of wind vibration did not cause disruption of vibratory communication and in copulation behaviour in *E. heros*, whereas the air mass projected onto the plants, by means of a wind tunnel, with the same signal intensity, as well as the presence of rain noise, caused a decrease in the sexual behaviour and copulation proportion of the pairs. The efficiency of incorporating vibratory signals in traps was evaluated, resulting in a greater capture of stinkbugs in traps with a call signal from conspecifics females. The results of this work present several new information that, together with the evaluation of the application of some of the aspects of vibrational communication for the management of stink bugs, opening new perspectives for the development of sustainable pest management methods.

Keywords: biotremology, stink bugs, biotic noise, conspecifics, heterospecifics, multimodal communication, abiotic noise, soybean pests.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Sequência da comunicação no comportamento reprodutivo de percevejo. Sinais envolvidos, características, canal de transmissão e interações (Adaptado de Cokl et al., 2020). Desenhado por Júlia Dias Laumann.....18
- Figura 2. Oscilogramas e espectro de frequências do som de chamamento de três espécies de percevejos mostrando a clara diferença na estrutura temporal e espectral dos sinais. Fotos: *Chinavia impicticornis* e *Euschistus heros* (Cecilia Vieira), *Thyanta perditor* (Raúl Laumann).....23
- Figura 3. Fotos demonstrando aspectos físicos das espécies de percevejo *Euschistus heros*, *Chinavia ubica* e *Chinavia impicticornis*. Fotos de Cecília Vieira.....27
- Figura 4. Repertório de sinais das espécies utilizadas neste trabalho mostrando oscilogramas de sequências de pulsos ou trem de pulsos e detalhes de pulsos ou trêm de pulsos. FS= sinal de fêmea, MS= sinal de macho.....29
- Figura 5. Sala de manutenção do percevejo com vista parcial da colônia de *E. heros*. Laboratório de Semioquímicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.....33
- Figura 6. Sala com isolamento acústico e equipamentos utilizados nos experimentos. Laboratório de Semioquímicos, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Foto: Sá Silveira.....35
- Figura 7. Esquema do arranjo para captação e armazenamento de sinais vibratórios de percevejos.....36
- Figura 8. Representação dos parâmetros temporais de sinais vibratórios de percevejos e os critérios utilizados para quantificá-los. Na figura se observa o canto de chamamento (FS-1a) de fêmeas de *Chinavia ubica* segundo descrito em Laumann et al (2016).....38
- Figura 9. Desenho experimental de bioensaios de reprodução de arquivos de sinais vibratórios (experimentos de playback) em plantas de feijão. Para retransmitir os sinais utilizou-se um mini Shaker e para registro dos sinais emitidos pelos insetos por meio de um Vibrômetro a laser.....40
- Figura 1.1. Resposta de fêmeas e machos de *E. heros* em plantas vibradas com sinal de rivalidade de fêmeas (Tratamento) ou não vibradas (Controle). A) Latência (média do tempo em segundos no qual o inseto emite primeiro canto)

e B) Tempo de resposta (média do tempo em segundos no qual o inseto permaneceu cantando). As barras representam o número médio dos parâmetros e as linhas acima das barras representam o erro padrão. *acima das linhas das barras representam diferença estatística entre os tratamentos.89

Figura 1.2. Parâmetros dos sinais emitidos por fêmeas e machos de *E. heros* em plantas vibradas com sinal de rivalidade de fêmeas (Tratamento) ou não vibradas (Controle). A) Duração do pulso (média do tempo em milissegundos). B) Intervalo entre os pulsos (média do tempo, em milissegundos, do final de um pulso ao início do próximo).C) Média do número de pulsos. D) Frequência dominante (média da frequência dominante em um pulso, em Hz). As barras representam o número médio dos parâmetros e as linhas acima das barras representam o erro padrão. *acima das linhas das barras representam diferença estatística entre os tratamentos.....90

Figura 1.3. Resposta de fêmeas e machos de *E. heros* quando colocados em forma individual ou em casais (uma fêmea e um macho) em plantas vibradas com sinal de rivalidade de fêmeas (Tratamento) ou não vibradas (Controle). A) Latência (média do tempo em segundos no qual o inseto emite primeiro canto) e B) Tempo de resposta (média do tempo em segundos no qual o inseto permaneceu cantando). As barras representam o número médio dos parâmetros e as linhas acima das barras representam o erro padrão. *acima das linhas das barras representam diferença estatística entre os tratamentos.....93

Figura 1.4. Proporção de bioensaios que terminaram com a cópula dos casais de *E. heros* em plantas com sinal vibratório de rivalidade de machos de *E. heros* (Tratamento, barra azul) e plantas sem sinal (Controle, barra laranja). *acima das barras representam diferença estatística entre os tratamentos ($P < 0,05$).....93

Figura 1.5. Parâmetros dos sinais emitidos por fêmeas e machos de *E. heros* quando colocados em forma individual ou em casais (uma fêmea e um macho) em plantas vibradas com sinal de rivalidade de fêmeas (Tratamento) ou não vibradas (Controle). A) Duração do pulso (média do tempo em milissegundos) B) Intervalo entre os pulsos (média do tempo, em milissegundos, do final de um pulso ao início do próximo), C) Média do número de pulsos e D) Frequência dominante (média da frequência dominante em um pulso, em Hz). As barras representam o número médio dos parâmetros e as linhas acima das barras representam o erro padrão. *acima das linhas das barras representam diferença estatística entre os tratamentos.....94

Figura 2.1. A) Arena de dupla escolha em formato de Y. B) Desenho esquemático do bioensaio.....106

Figura 2.2. Proporção de bioensaios que terminaram com a cópula dos casais de *E. Heros* (Eh) e *C. impicticornis* (Ci) em plantas vibradas com sinais vibratórios de heteroespecíficos ou plantas sem vibrações (controle). C Controle, plantas em vibração; SCi: planas vibradas com sinal FS-1a de

Chinavia impicticornis; SCu: planas vibradas com sinal de FS-1a de *C. ubica*; SPn: planas vibradas com MS-1: sinal MS1 de *P. nigrispinus*. As letras acima das linhas representam diferença estatística entre os tratamentos (Análise de Regressão logística $P < 0,05$).....110

Figura 2.3. Efeito de sinais de heteroespecíficos na dinâmica de emissão de sinais vibratórios de fêmeas (F) e machos (M) de *Euschistus heros*. A) Latência (tempo desde o início do bioensaio até que o inseto emite o primeiro sinal vibratório). B) Tempo de resposta (média do tempo em segundos no qual o inseto permececeu cantando) C) Número de pulsos emitidos. C Controle, plantas em vibração; SCi: planas vibradas com sinal FS-1a de *Chinavia impicticornis*; SCu: planas vibradas com sinal de FS-1a de *C. ubica*; SPn: planas vibradas com MS-1: sinal MS1 de *P. nigrispinus*. As Barras representam os valores médios dos parâmetros e linhas EP. As letras acima das linhas representam diferença estatística entre os tratamentos (teste de contrastes, $P < 0,05$).....112

Figura 2.4. Efeito de sinais de heteroespecíficos na dinâmica de emissão de sinais vibratórios de fêmeas (F) e machos (M) de *Chinvia impicticornis*. A) Latência (tempo desde o início do bioensaio até que o inseto emite o primeiro sinal vibratório), B) Tempo de resposta (média do tempo em segundos no qual o inseto permececeu cantando) e C) Número de pulsos emitidos. C Controle, plantas sem vibração; SEh: planas vibradas com sinal FS1 de *Euschistus heros*; SCu: plantas vibradas com sinal de FS-1a de *C. ubica*. As barras representam os valores médios dos parâmetros e linhas EP. As letras acima das linhas representam diferença estatística entre os tratamentos (teste de contrastes, $P < 0,05$).....113

Figura 2.5. Resposta de fêmeas de *P. nigrispinus* ao sinal vibratório de fêmeas de *E. heros* (FS1) em arenas de dupla escolha. A) e B) Escolha inicial (proporção), C) Tempo de residência (s) C: controle, braços da arena sem vibrações, T: tratamento, braços da arena vibrados com o sinal FS1 de fêmeas de *E. heros*. As barras em A e B, indicam a proporção média de resposta calculada a partir da regressão logística e as linhas o IC de 95%, e em C, o tempo de residência médio \pm EP * indica diferenças significativas ($P < 0,05$), teste χ^2 para escolha inicial e teste de Wilcoxon para tempo de residência....114

Figura 2.6. Resposta de machos de *P. nigrispinus* ao sinal vibratório de fêmeas de *E. heros* (FS1) em arenas de dupla escolha. A) e B) Escolha inicial (proporção), C) Tempo de residência (s) de machos de *P. nigrispinus* em arenas de dupla escolha. C: controle, braços da arena sem vibrações, T: tratamento, braços da arena vibrados com o sinal FS1 de fêmeas de *E. heros*. As barras em A, indicam a proporção média de resposta calculada a partir da regressão logística e as linhas o IC de 95%, e em B, o tempo de residência médio \pm EP * indica diferenças significativas ($P < 0,05$), teste χ^2 para escolha inicial e teste de Wilcoxon para tempo de residência.....115

Figura 3.1. Sequência dos procedimentos experimentais para avaliação da influência de rastros químicos na comunicação vibracional de *E. heros* em substratos artificiais. A) Percevejo *E. heros* em placas de Petri de vidro para coleta de rastros químicos. B) Esquema do bioensaio com rastros 1-vibrometro laser, 2- arena experimental. C) esquema de capatão e armazenamento dos dados: 1-vibrometro laser, capatação dos sinais vibratórios, 2-Placa de digitalização externa, 3-fone de ouvido para monitoramento em tempo real e 4- Notebook para armazenamento dos dados.....132

Figura 3.2. Sequência dos procedimentos experimentais para avaliação da influencia de rastros químicos na comunicação vibracional de *E. heros* em substratos naturais (plantas). 1-Planta de feijão em estágio V3; 2-Saco de plástico Microperfurado retendo os adultos de *E. heros* nos locais de contaminação com rastros; 3- ponto de liberação do inseto avaliado; 4- vibrometro laser; registro dos sinais vibratórios; 5-Placa de digitalização externa; 6-fone de ouvidopara monitoramento em tempo real; 7-Notebook para armazenamento dos dados..... 134

Figura 3.3. Sequência de procedimentos experimentais para extração de hidrocarbonetos cuticulares de rastros de *E. heros* e preparação para análises químicas. A) Adultos de *E. heros* do mesmo sexo em potes de plástico tampados com uma placa de Petri de vidro (foto superior vista geral, foto inferior vista da parte superior com a placa de Petri). B) 1-Placa de Petri 9 cm de diâmetro; 2-Pipeta de vidro; 3-Vial de 2 mL. C) 1- Vial de 2 mL; 2- Representação do sistema de fluxo de gás N₂ para pré-concentrar amostras. CG-EM: Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas..... 136

Figura 3.4. Sequência de procedimentos para os experimentos de influência dos sinais vibratórios na comunicação química de machos de *E. heros*. 1- Notebook com programa de reprodução do sinal; 2-Minishaker para reprodução do programa de estimulação; 3-Arena de vidro fechada para coletar voláteis.....137

Figura 3.5. Procedimentos experimentais para coleta de voláteis para construção de curva de calibração para quantificação do feromônio de *Euschistus heros* em fibra de SMPE, em uma vidraria de conexão de 3 saídas. 1- Conexão a bomba de vácuo para manter o fluxo; 2-papel filtro impregnado com o composto padrão; 3-Carvão ativado para purificação do ar; 4-Fibra SPME..... 139

Figura 3.6. Efeito de rastros químicos de fêmeas e machos de *E. heros* na dinâmica de emissão e nos parâmetros dos sinais emitidos por machos de *E. heros* quando avaliados individualmente ou em casais. A) Tempo de latência (média do tempo em segundos no qual o inseto emite primeiro sinal vibratório), B) Tempo de resposta (média do tempo em segundos no qual o inseto permaneceu emitindo sinais vibratórios) C) Duração do pulso (média do tempo em milissegundos), D) Intervalo entre os pulsos (média do tempo, em milissegundos, do final de um pulso ao início do próximo), E) Média do número de pulsos dos sinais F) Frequência dominante (média da frequênciadominante

em um pulso, em Hertz). Os insetos foram expostos a placas de Petri de vidro tratadas com rastro de macho (barra cinzas), rastro de fêmea (barra laranjas) e controle, placas sem rastros (barras azuis). As linhas acima das barras representam o erro padrão. As letras acima das barras representam diferença estatística entre os tratamentos (teste de contrastes $P < 0,05$)..... 145

Figura 3.7. Efeito de rastros químicos de fêmeas e machos de *E. heros* na proporção de casais de *E. heros* que copularam quando expostos a placas tratadas com rastros de fêmeas, rastros de machos ou controle (sem rastros). As barras horizontais indicam a proporção média de resposta calculada a partir da regressão logística e as linhas o IC de 95%. * representa efeito significativo do tratamento na proporção de cópula ($P < 0,05$)..... 146

Figura 3.8. Resposta de fêmeas e machos de *E. heros* em plantas de soja com uma das folhas contaminadas com rastros químicos de coespecíficos a outra sem rastros ou em plantas de soja sem rastros. Proporção de fêmeas de *E. heros* que escolheram primeiramente uma das folhas de plantas controle ou uma das folhas das plantas tratadas com rastros químicos de coespecíficos do sexo oposto. E: folha do lado esquerdo da planta, D: folha do lado direito da planta, T: folha da planta com rastros de machos (resposta de fêmeas) ou fêmeas (resposta de machos), C: folha controle (sem rastros). As barras horizontais indicam a proporção média de resposta calculada a partir da regressão logística e as linhas o IC de 95%. * representa diferença estatística entre os tratamentos (teste X^2 de Wald, $P < 0,05$)..... 148

Figura 3.9. Tempo de residência (média do tempo em segundos, em que o inseto permaneceu em uma das folhas escolhida) de fêmeas (acima) e machos (abaixo) de *E. heros* nas folhas do lado esquerdo ou direito de plantas de feijão sem tratamento (Plantas controle) ou nas folhas de plantas tratadas, onde uma das folhas tinha rastros químicos de macho (para fêmeas) ou fêmeas (para machos) (Tratamento) e a outra permaneceu sem rastros (Controle). As linhas acima das barras representam o erro padrão. * representa diferença estatística entre os tratamentos (teste de Wilcoxon $P < 0,05$)..... 149

Figura 3.10. Dinâmica da emissão e parâmetros dos sinais vibratórios emitidos por machos de *E. heros* em plantas de feijão, tratadas com rastros de fêmeas (Plantas tratadas) e sem tratamento (Plantas controle). A) Latência (média do tempo em segundos no qual o macho emite primeiro canto), B) Tempo de resposta (média do tempo em segundos no qual o macho permaneceu cantando) C) Duração do pulso (média do tempo em milissegundos), D) Intervalo entre os pulsos (média do tempo, em milissegundos, do final de um pulso ao início do próximo), E) Número de pulsos emitidos. F) Frequência dominante (média da frequência dominante em um pulso, em Hertz). As linhas acima das barras representam o erro padrão. * representa diferença estatística entre os tratamentos (GLM $P < 0,05$)..... 151

Figura 3.11. Emissão de feromônio (ng/inseto/30 min) por machos de *E. heros* em arenas experimentais com presença de canto de chamamento da fêmea (FS1) ou sem este sinal vibratório (controle). Barras representa o valor média e

as linhas representam o erro padrão. * representa diferença estatística entre os tratamentos (teste de *Wilcoxon* $P < 0,05$).....152

Figura 3.12. Dinâmica da emissão e parâmetros dos sinais vibratórios de fêmea e machos de *E. heros*, avaliados em forma individual ou em casais em plantas que receberam feromônio sexual da espécie (Feromônio) ou n-hexano (Hexano) como controle. A) Latência (média do tempo em segundos no qual a fêmea emite primeiro sinal vibratório), B) Tempo de resposta (média do tempo em segundos no qual a fêmea permaneceu emitindo sinais vibratórios), C) Número de pulsos emitidos, D) Número de *buzz*, E) Duração do pulso (ms) milissegundos), F) Intervalo entre os pulsos (ms), G) Frequência dominante (Hz), H) Proporção de fêmeas e machos de que iniciaram a emissão do comportamento vibracional. As barras indicam os valores médios dos parâmetros e as linhas representam o erro padrão. * representa diferença estatística entre os tratamentos (GLMM $P < 0,05$).....156

Figura 3.13. Dinâmica da emissão e parâmetros dos sinais vibratórios de fêmea e machos de *E. heros*, avaliados em forma individual ou em casais em plantas que receberam feromônio sexual da espécie (Feromônio) ou n-hexano (Hexano) como controle. A) Duração do pulso (ms), B) Intervalo entre os pulsos (ms), C) Frequência dominante (Hz), D) Proporção de fêmeas e machos de que iniciaram a emissão do comportamento vibracional. As barras indicam os valores médios dos parâmetros e as linhas representam o erro padrão. * representa diferença estatística entre os tratamentos (GLMM $P < 0,05$).....157

Figura 4.1. Desenho esquemático mostrando a configuração estabelecida para registro de vibrações originadas pelo vento em plantas ou para os bioensaios onde os insetos foram expostos diretamente às correntes de ar. 1) Entrada do ar, 2) Saída de ar, 3) Plantas de feijão, 4) Vibrômetro laser, registro dos sinais vibratórios, 5) Placa para digitalizar os sinais, 6) Notebook para armazenamento dos dados.....173

Figura 4.2. Desenho esquemático mostrando a configuração estabelecida para registro de vibrações originadas por gotas de água impactando em folhas de plantas de feijão. 1) Planta de feijão, 2) Garrafa de plástico 500ml, 3) Equipo para infusão por gravidade para gerar as gotas de água, 4) Vibrômetro laser, captação dos sinais vibratórios, 5) Placa para digitalizar os sinais, 6) Notebook para armazenamento dos dados.....174

Figura 4.3. Efeito de ruído produzido por fatores abióticos na dinâmica de emissão de sinais vibratórios emitidos por fêmeas e machos de *E. heros*. A) Latência (média do tempo em segundos no qual o inseto emite primeiro canto); B) Tempo de resposta (média do tempo em segundos no qual o inseto permaneceu cantando); C) Número de pulsos emitidos. V: ruído de vento, Ch = ruído de chuva, Tv: plantas dentro do túnel de vento ligado. F=fêmeas e M=macho. As barras representam os valores médios de cada parâmetro e as linhas representam o erro padrão. As letras acima das linhas das barras representam diferença estatística entre os tratamentos (ANODEV e teste de contrastes $P < 0,05$).....178

Figura 4.4. Efeito de ruído produzido por fatores abióticos nos parâmetros dos sinais vibratórios emitidos por fêmeas e machos de *E. heros*. A) Duração do pulso (média do tempo em milissegundos); B) Intervalo entre os pulsos (média do tempo em milissegundos, do final de um pulso ao início do próximo); C) Frequência dominante (média da frequência dominante em um pulso, em Hz); V: ruído de vento, Ch = ruído de chuva, Tv: plantas dentro do túnel de vento ligado. F=fêmeas e M=macho. As barras representam os valores médios de cada parâmetro e as linhas representam o erro padrão. * indica diferenças significativas nos valores médios do tratamento em relação ao controle (Análise GLMM $P < 0,05$).....180

Figura 4.5. Proporção de bioensaios que terminaram com a cópula dos casais de *E. heros* em plantas de feijão tratadas com ruído de vento (V), ruído de chuva (Ch), plantas dentro de um túnel de vento ligado (Tv) e plantas sem vibrações, controle (C). F=fêmeas e M=macho. * acima das barras representam diferença estatística entre os tratamentos e o controle.....181

Figura 5.1. Esquema experimental de reprodução de sinais fêmeas de *E. heros* em armadilhas de plástico em plantas de soja dentro de gaiolas de acrílico. 1- Vibrometro laser. 1-placa de reprodução do sinal. 3- Armadilha de garrafa Pet com excitador mecânico conectado. 4-Armadilha entre as plantas de soja..194

Figura 5.2. Efeito de sinais vibratórios de coespecíficos na atração de fêmeas de *E. heros* em experimentos em arenas de dupla escolha. A) Escolha inicial B) Tempo de residência. C: Controle, braços da arena sem vibrações, FS1: braço da arena com sinal vibratório da fêmea de *E. heros*, MS1: braço da arena com sinal vibratório do macho de *E. heros*, SSD: braço direito do olfatómetro sem sinal, SSE: braço esquerdo do olfatómetro sem sinal. Barras em A, indicam a proporção média de resposta calculada a partir da regressão logística e as linhas o IC de 95%, e em B, o tempo de residência médio \pm EP * indica diferenças significativas ($P < 0,05$), teste χ^2 para escolha inicial e teste de Wilcoxon para tempo de residência.....197

Figura 5.3. Efeito de sinais vibratórios de coespecíficos na atração de machos de *E. heros* em experimentos em arenas de dupla escolha. A) Escolha inicial B) Tempo de residência. C: Controle, braços da arena sem vibrações, FS1: braço da arena com sinal vibratório da fêmea de *E. heros*, MS1: braço da arena com sinal vibratório do macho de *E. heros*, SSD: braço direito do olfatómetro sem sinal, SSE: braço esquerdo do olfatómetro sem sinal. Barras em A, indicam a proporção média de resposta calculada a partir da regressão logística e as linhas o IC de 95%, e em B, o tempo de residência médio \pm EP * indica diferenças significativas ($P < 0,05$), teste χ^2 para escolha inicial e teste de Wilcoxon para tempo de residência.....198

Figura 5.4. Influência da incorporação de sinais vibratórios de fêmeas de coespecíficos na captura de fêmeas e machos de *E. heros* em experimentos em gaiolas com plantas de soja. A) Número de insetos (media \pm EP) em plantas em contato ou em armadilhas plásticas. B) Número de fêmeas de *E. heros* em plantas em contato ou em armadilhas plásticas ao longo do tempo, C)

Número de machos de *E. heros* em plantas em contato ou em armadilhas plásticas ao longo do tempo. As armadilhas foram distribuídas em gaiolas de acrílico com 8 plantas de soja 4 em contato com as armadilhas e 4 sem contato 8 horas. PPA= Plantas próximas a armadilha, A= Armadilha, Armadilha Tratamento: armadilhas vibradas com sinal da fêmea de *E. heros* (FS1), Armadilha Controle: armadilha sem vibrações. As barras os pontos nos gráficos indicam os valores médios do número de insetos e as linhas representam o erro padrão. * representa diferença estatística entre os tratamentos (GLM $P < 0,05$).....200

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros temporais e espectrais dos sinais das espécies de percevejos utilizadas como modelo de estudo. Valore médios \pm SD.....29

Tabela 1.1. Resultados da análise de regressão logística e cálculo da razão de chance (IC 95%) para avaliação do efeito da reprodução de sinais de rivalidade de fêmea e macho de coespecíficos (Tratamento) para machos e fêmeas de *Euschistus heros* na proporção de insetos que emitiram sinais vibratórios (proporção de resposta). As variáveis foram computadas em forma binária (presença ausência do comportamento) e comparadas em relação ao observado nos casais colocados em situação de controle (plantas sem vibrações). Valores de razão de chance em negrito indicam efeito significativo do tratamento em relação ao controle.....89

Tabela 2.1. Resultados da análise de regressão logística e cálculo de razão de chance (IC 95%) para avaliação do efeito da reprodução de sinais heteroespecíficas (Tratamento) para *Euschistus heros* e *Chinavia impicticornis*. As variáveis foram computadas em forma binária (presença ausência do comportamento) e comparadas em relação ao observado nos casais colocados em plantas sem vibrações (Controle). Valores de razão de chance em negrito indicam efeito significativo do tratamento em relação ao controle.....110

Tabela 3.1. Hidrocarbonetos cuticulares isolados a partir de rastros de fêmeas e machos de *E. heros* depositados sobre superfícies de vidro.....146

Tabela 3.2. Resultados da análise de regressão logística e cálculo da razão de chance (IC 95%) para avaliação do efeito de tratamentos (Planta de feijão ou placas de Petri com rastro de fêmea ou macho de *E. heros*; de feijão em contato com papel filtro impregnados com extrato de aeração de machos de

E. heros (Feromônio). As variáveis foram computadas em forma binária (presença ausência do comportamento) e comparadas em relação ao observado nos casais colocados em situação de controle (Plantas sem rastro; placa sem rastro; plantas com solvente (Hexano), valores de razão de chance em negrito indicam efeito significativo do tratamento em relação ao controle.....153

Tabela 4.1. Resultados da análise de regressão logística e cálculo de razão de chance (IC 95%) para avaliação do efeito da reprodução de ruídos de vento (V), chuva (Ch) e expostos a um túnel de vento ligado a 3,2 m/s (Tv) (Tratamento) para fêmeas e machos de *Euschistus heros*. As variáveis foram computadas em forma binária (presença ausência do comportamento) e comparadas em relação ao observado nos casais colocados em plantas sem vibrações (Controle). Valores de razão de chance em negrito indicam efeito significativo do tratamento em relação ao controle.....181

INTRODUÇÃO GERAL

Comunicação e comportamento animal

O estudo da comunicação entre animais é um tema central de muitas áreas relacionadas à zoologia, visto que a comunicação é um processo que condiciona e influencia o comportamento e o sucesso evolutivo dos animais, (Bradbury e Vehrencamp, 2011).

A comunicação pode ser definida como um processo de troca de informações entre um indivíduo que emite um sinal (emissor) e um indivíduo que recebe, processa e muda o seu comportamento em relação ao estímulo recebido (receptor). Neste processo ambos os indivíduos se beneficiam em termos adaptativos (Greenfield et al., 2002).

As informações são transmitidas em forma de sinais que consistem em transformações do ambiente, físico ou químico, com intensidade superior ao do ruído ambiental. Os sinais são gerados pelos emissores, em resposta a diversos estímulos, e utilizados pelos receptores para captar informações a respeito da identidade, condição fisiológica e comportamental do emissor (Greenfield et al., 2002, Scott-Phillips, 2008). Os sinais produzidos pelos indivíduos podem ser de diferentes modalidades, como mecânicos, químicos, sonoros, táteis e visuais. Cada um deles produzidos por células ou órgãos específicos e detectados por componentes altamente adaptados do sistema sensorial do receptor. Adicionalmente, a natureza do sinal condiciona o canal de transmissão podendo ser este um meio gasoso (ar), líquido (água) ou sólido (por exemplo solo ou tecidos de uma planta) (Greenfield et al., 2002).

O processo de comunicação pode ser classificado com base na natureza do sinal originado pelo emissor e seu canal de transmissão e da forma em como é detectado pelo sistema sensorial do receptor (Higham e Hebets, 2013). Podendo ser unimodal, quando a informação é transmitida por um único canal e

detectado por um componente especializado do sistema sensorial do receptor. Um sinal multicomponente é aquele em que a informação é codificada por vários componentes da mesma natureza. Por sua vez, os sinais multimodais são aqueles que a informação se transmite por sinais de diferentes modalidades, e é transmitida por diferentes médios (canais) e o receptor utiliza diferentes receptores para detectar os sinais (Partan e Marler, 2005, Cokl et al., 2019).

A comunicação modula processos vitais dos animais como procura por nutrientes, defesa, reprodução e, ainda, interações sociais. Para ser eficiente e evitar interferências ou exploração por competidores e predadores, os sinais devem ser altamente específicos e transmitidos por canais que reduzam o acesso a intrusos (Bradbury e Vehrencamp, 2011). Estas características fazem com que os sinais e os processos de comunicação estejam submetidos a uma forte pressão evolutiva que origina sinais altamente específicos em estrutura e função (Greenfield et al., 2002).

Comunicação vibracional

O som pode ser definido como uma compressão repetitiva de um meio elástico que desloca as partículas que formam o meio (Bailey, 1991). Este conceito de som inclui outros tipos de sinais bioacústicos como as vibrações em substratos sólidos, sendo estas encontradas na comunicação em alguns grupos de vertebrados e em muitos insetos (Hill, 2008; Virant-Doberlet e Čokl, 2004; Crocroft e Rodríguez, 2005).

Embora a comunicação vibracional seja a forma de comunicação mais presente em insetos, se estima que umas 230.000 espécies de 16 Ordens utilizam esta modalidade de comunicação (Virant-Doberlet e Čokl, 2004), os conhecimentos ainda são escassos e o volume de informação somente tem iniciado um crescimento constante desde a década de 1990 (Cocroft et al., 2014). Recentemente tem se proposto o termo biotremologia para a disciplina que estuda a comunicação vibracional e outros aspectos do comportamento animal onde estão envolvidas vibrações (Hill, 2014).

A emissão de sinais vibratórios pelos insetos e sua transmissão através de substratos sólidos é um fenômeno conhecido há muito tempo (início da década de 1960). Mas somente a partir do final da década de 1980, com os primeiros estudos relacionando sinais vibratórios e comportamentos específicos, percebeu-se que esses sinais poderiam ter uma importante função na comunicação dos insetos, entre elas comunicação de parceiros durante a etapa reprodutiva, marcação de território, defesa e interações sociais (Čokl e Virant-Doberlet, 2003, Cocroft e Rodrigues, 2005).

Os sinais vibratórios são produzidos pela vibração de alguma parte do corpo do inseto e são propagados através do substrato, geralmente as plantas (Čokl, 2008). Entre os mecanismos de produção de sinais vibratórios se reconhecem vibrações do abdome ou outra parte corporal, vibração das asas, percussão do substrato com antenas ou patas ou tremulação (sacudidas fortes do corpo em sentido horizontal ou vertical) (Hill, 2014).

O principal receptor de sinais vibratórios são os órgãos subgenuais, localizados no interior das patas dos insetos e formados por um conjunto de sensilas denominadas escolopídeos. Além destes órgãos receptores externos, localizados na cutícula como as sensilascampaniformes e cerdas sensoriais também podem receber e processar vibrações (Kühne, 1982; Lakes-Harlan e Strauß, 2014; Yack, 2016).

Comunicação em Percevejos durante o comportamento reprodutivo

O comportamento reprodutivo dos percevejos é mediado por uma série de sinais de diferentes modalidades utilizadas em diferentes escalas espaço-temporais.

O início do comportamento reprodutivo está condicionado pela emissão do feromônio sexual pelos machos que atua em longa distância atraindo fêmeas para plantas próximas a eles (Borges e Blassioli-Moraes, 2017). Uma vez que os insetos estão no mesmo substrato (planta) a comunicação é estabelecida utilizando sinais vibratórios. A comunicação vibracional se inicia com a emissão

de sinais pela fêmea (sinais de chamamento), aos quais os machos respondem com um sinal de características similares e estabelecendo um dueto. Durante esta fase ocorre uma troca de informações, o sinal da fêmea direciona o macho que se orienta para o local onde ela se encontra. Na etapa final, uma vez que os insetos estão próximos ou em contato físico os insetos mudam seu repertório de sinais emitindo cantos de acasalamento. Nesta etapa sinais de outra natureza, como visuais e químicos (hidrocarbonetos cuticulares), modulam uma série de comportamentos que incluem o toque dos parceiros com movimentos ascendentes e descendentes das antenas (antenação), o movimento do macho entorno da fêmea (pivotamento) e o batimento do macho na parte posterior do corpo da fêmea para que esta adote posição de cópula (Borges, 1987), durante toda esta etapa os insetos emitem sinais vibratórios. As informações trocadas nesta etapa finalizam com a cópula (Virant-Dorbelet, 2006, Borges e Čokl, 2017) (Figura 1).

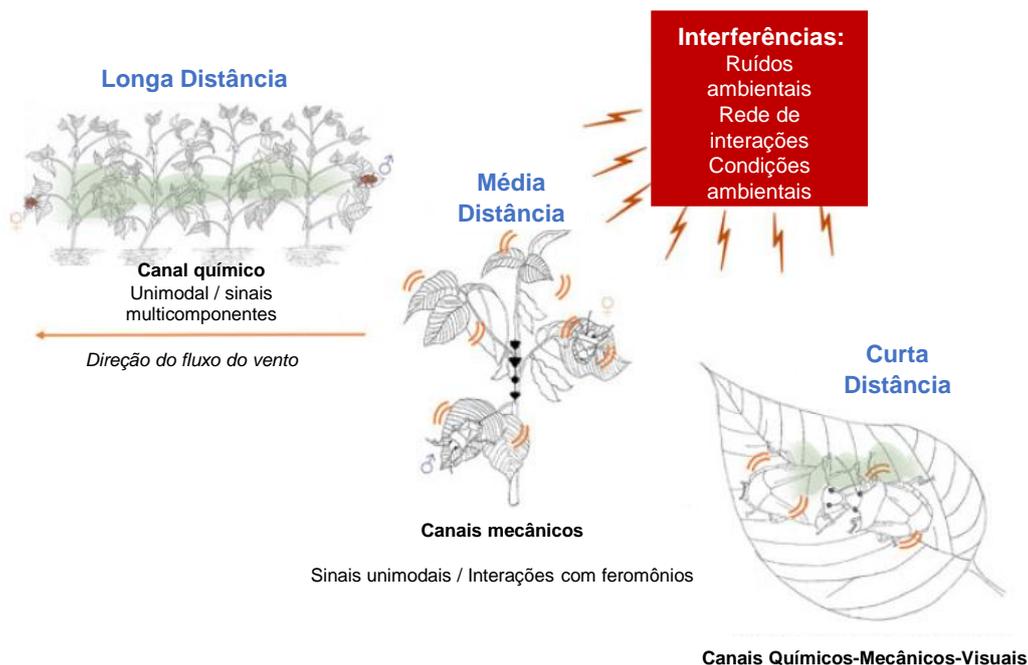


Figura 1. Sequência da comunicação no comportamento reprodutivo de percevejo. Sinais envolvidos, características, canal de transmissão e interações (Adaptado de Čokl et al., 2020). Desenhado por Júlia Dias Laumann.

Comunicação química

Os feromônios sexuais de percevejos são conhecidos desde a década de 1980 (Borges et al., 1987). Atualmente se conhecem os feromônios sexuais de ~45 espécies de percevejos em relação a sua estrutura e função. (Blassioli-Moraes e Borges, 2017, Weber et al., 2017). Em forma de um breve resumo pode se destacar que, em geral, os feromônios sexuais são formados por sesquiterpenos ou acetatos e a sua função principal é a de atrair coespecíficos. No caso das espécies neotropicais estudadas os feromônios sexuais tem como função principal atrair, principalmente, as fêmeas, já nas espécies neárticas os feromônios podem atrair ambos os sexos e as ninfas, atuando assim como compostos de agregação (Borges e Blassioli-Moraes, 2017). Os percevejos ainda produzem complexas misturas de feromônios de alarme, com função defensiva, formadas por moléculas pequenas de 6, 8 ou 10 carbonos que se arranjam em forma de (*E*)-2-alcenais, 4-oxo-(*E*)-2-alcenais, álcoois, acetatos e hidrocarbonetos lineares, neste último caso característicos dos adultos (Weber et al., 2017).

Dentre os percevejos que tiveram seus semioquímicos estudados, está o percevejo marrom *E. heros*, praga de grande importância agrícola. O feromônio sexual de *E. heros* é liberado somente pelos machos, e é composto pelos ésteres metílicos 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila (compondo 44%), 2*E*, 4*Z*-decanodienoato de metila (compondo 53%), sendo esses os compostos majoritários, e 2,6,10-trimetildodecanoato de metila (compondo 3%), como composto minoritário (Aldrich et al., 1994, Borges e Aldrich, 1994, Borges et al., 1998 e Zhang et al., 2003).

As fêmeas de *E. heros* apresentam o comportamento de atração quando em contato com o feromônio do macho (Borges et al., 1998). Não somente ao extrato natural, mas em campo, as fêmeas foram atraídas às armadilhas contendo septos impregnados com o composto majoritário, 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila do feromônio (Borges et al., 2011, Silva et al., 2014).

Outro tipo de sinal químico utilizado pelos percevejos podem ser os hidrocarbonetos cuticulares. Nos insetos os hidrocarbonetos cuticulares são produzidos nas células oenócitas da cutícula e secretados através de ductos celulares para a epicutícula (Chapman, 2012). Sua função principal é física, evitando a dessecação e protegendo contra a invasão de microrganismos (Howard & Blomquist, 2005). No entanto, também atuam no reconhecimento entre espécies através da presença de compostos específicos (Blomquist, 2010).

A composição química e sua função no comportamento reprodutivo dos percevejos é praticamente desconhecida. Se propõe que estes compostos podem ser relevantes em duas etapas do comportamento reprodutivo. Durante a antenação uma vez que podem fornecer informações da identidade específica e sexo dos indivíduos e durante a procura de parceiros mediante os hidrocarbonetos que os insetos depositam no substrato ao se deslocar, deixando assim um rastro químico. A informação disponível até o momento sugere que a composição dos hidrocarbonetos cuticulares de percevejos apresenta variações interespecíficas e entre os sexos (Colazza et al., 2007, Lagõa et al., 2020), sustentando assim a hipótese de que podem ser uma boa fonte de informação para os insetos. Isto foi comprovado para os parasitoides de ovos de percevejos (Hymenoptera: Scelionidae) que reconhecem os rastros de percevejos e os utilizam como pistas quando forrageiam por hospedeiros (Borges et al., 1999) e para discriminar espécies ou sexo selecionando aqueles do seu hospedeiro preferencial (Colazza et al., 2007, Lagõa et al., 2020).

Comunicação vibracional

A comunicação vibracional em percevejos foi descrita pela primeira vez uns 50 anos atrás em *Nezara viridula* (Čokl et al., 1972). Na atualidade se conhecem os repertórios dos sinais vibratórios de 36 espécies de percevejos (Čokl et al., 2017a). Em geral, os sinais podem ser classificados segundo o contexto comportamental como: sinais de chamamento, acasalamento, cópula, repelência e rivalidade (Čokl et al., 2017b).

Os sinais vibratórios de percevejos são produzidos pela vibração dos primeiros escleritos abdominais, movimentados por músculos especiais. No percevejo *N. viridula*, o primeiro e o segundo tergitos abdominais são fundidos em uma placa tergal, a qual pode mover-se para frente e para trás. Ela é fixada por uma membrana quitinosa, anteriormente ao tórax e posteriormente ao terceiro tergo abdominal. Os músculos compressores longitudinais e laterais da placa tergal ao contrair-se movimentam a placa e originam as vibrações do corpo (Zorovič, 2005). Esta vibração é transmitida através das pernas, que atuam como “molas”, para propagar o sinal para superfície das plantas (Čokl e Virant-Doberlet, 2003).

Os sinais vibratórios produzidos pelos percevejos são de baixa frequência, na faixa de 50 a 200 Hz, e grande parte dos sinais ficam em torno 100 Hz (Čokl e Virant-Doberlet, 2003). Esta característica está relacionada com as propriedades mecânicas das plantas, uma vez que os tecidos vegetais atuam como filtros de alta frequência para os sinais (Miklas et al., 2001, Čokl et al., 2005). Isto junto a efeitos de ressonância e de reflexão (eco) das vibrações nas interfaces entre os tecidos das plantas e o ar permitem transmitir os sinais vibratórios em distâncias maiores de 2 metros (Čokl et al., 2005), inclusive para plantas vizinhas (Kavčič et al., 2013).

Uma das características dos sinais vibratórios é sua especificidade determinada pelos padrões espectrais (Figura 2) (frequência dominante e subdominante, amplitude dos picos de frequência) e, principalmente, padrões temporais (duração dos pulsos, intervalo entre pulsos e número de pulsos numa sequência) (Virant-Doberlet e Čokl, 2004) (Figura 2). A informação coletada até o momento indica claramente que o reconhecimento e discriminação entre espécies e sexo é influenciada por essa arquitetura dos sinais vibratórios (padrões temporais e espectrais) (Žunič et al., 2011, Silveira et al., 2019). Estas características ainda definem o reconhecimento intrapopulacional, como foi demonstrado para populações de *N. viridula* de diferente origem geográfico, em que os machos responderam preferencialmente para os sinais das fêmeas da sua própria população (Čokl et al., 2000). Assim a estrutura específica dos sinais vibratórios de percevejos é determinante para o reconhecimento e isolamento reprodutivo mesmo em espécies muito próximas (Laumann et al., 2016).

Embora a comunicação vibracional ofereça aos insetos um canal mais ou menos privado, as interferências de organismos que exploram estes sinais, como competidores ou inimigos naturais, para extrair informação relevante, não é totalmente evitada.

Por exemplo, em situações nas quais vários indivíduos estão na mesma planta, podem se originar situações de competição na qual os machos e as fêmeas podem emitir sinais diferentes dos de corte e acasalamento, caracterizados como sinais de rivalidade (Blassioli-Moraes et al., 2005, 2014; Čokl et al., 2017b, 2020). Os sinais de rivalidade caracterizam a disputa pelo acesso ao parceiro sexual, e o vencedor silencia o rival que se afasta (Čokl et al., 2017b), em alguns casos também ocorrem disputas físicas durante o comportamento de rivalidade (Moraes et al., 2014, Čokl et al., 2017).

Sinais de percevejos de outras espécies também podem influenciar no comportamento sexual, prejudicando os machos a se orientarem em direção as fêmeas coespecíficas que estão emitindo sinais de chamamento nas plantas (McNett et al., 2010, 2011). Todavia, sinais bióticos não são os únicos que influenciam o comportamento de percevejos, pois vibrações ocasionadas por chuva e vento (ruído ambiental) podem interferir na comunicação, dificultando a transmissão e identificação dos sinais (McNett et al., 2010).

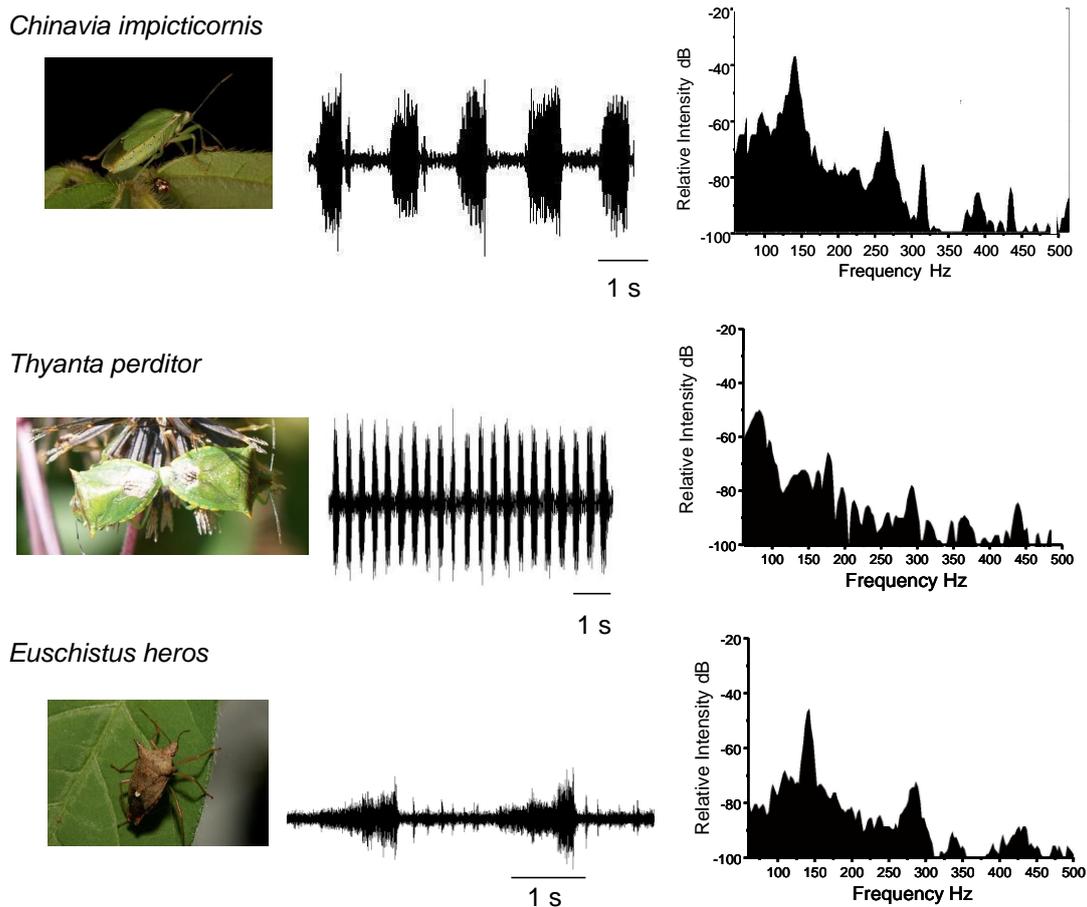


Figura 2. Oscilogramas e espectro de frequências do som de chamamento de três espécies de percevejos mostrando a clara diferença na estrutura temporal e espectral dos sinais. Fotos: *Chinavia impicticornis* e *Euschistus heros* (Cecilia Vieira), *Thyanta perditor* (Raúl Laumann)

Percevejos praga e potencial de manejo com aplicações da biotremologia

Os percevejos são pragas primárias das principais culturas de grãos no Brasil (soja, feijão, milho) (Panizzi, 1997; Panizzi, 2013; Panizzi e Lucini, 2017, Aquino et al., 2019) e nos últimos anos a sua incidência tem se estendido a outras culturas, tendo relatos de ataques severos em algodão, por exemplo (Soria et al., 2017).

Estes insetos atacam a soja durante o período reprodutivo (Panizzi, 2013), sugando as vagens e grãos e causando dano direto e também indireto pela transmissão de fungos (Côrrea-Ferreira et al., 2009) ou por gerar distúrbios fisiológicos na planta (Boethel et al. 2000). Pelo menos 15 espécies de

percevejos estão relacionadas com a soja, e na atualidade *Euschistus heros* (Fabricius) é a espécie mais relevante pela sua ampla distribuição geográfica e abundância na cultura (Panizzi e Luccini, 2013, Aquino et al., 2019).

Os métodos de controle destas pragas se fundamentam, quase que exclusivamente, no uso de inseticidas sintéticos com os consequentes riscos e efeitos negativos para o meio ambiente e saúde humana (Corrêa-Ferreira, et al., 2009, Panizzi, 2013, Bortollo et al., 2015). Adicionalmente, o uso continuado de princípios ativos a base de organofosforados tem favorecido o desenvolvimento de populações resistentes (Sosa-Gómez e Silva 2010), sendo este problema é agravado após a retirada do mercado dos princípios ativos metamidofós e endossulfâm, nos anos 2011 e 2013 respectivamente (Diário Oficial da União, 2010, 2011),

Esta situação torna relevante a procura por métodos alternativos de controle que forneçam ferramentas mais seguras e sustentáveis a longo prazo. A possibilidade de interferir no comportamento sexual dos insetos, e consequentemente no seu sucesso reprodutivo, é uma das estratégias com grande potencial para o manejo eficiente de suas populações (Laumann et al., 2017).

A aplicação da biotremologia para o manejo de pragas tem sido proposta e avaliada em diferentes grupos de insetos (Čokl e Millar, 2009, Polajnar et al., 2015, Laumann et al., 2017, Takanashi et al., 2019). Entre os usos identificados destacam-se as aplicações para monitoramento de pragas, seja com métodos de detecção diretos (incorporação de sinais vibratórios em armadilhas) ou indiretos (registro e identificação dos sinais vibratórios no habitat dos indivíduos) (Laumann et al., 2017), ou para controle via a técnica de interrupção do acasalamento, utilizando sinais vibratórios de interferência (Erikson et al., 2012).

Especificamente para os percevejos tem se proposto a incorporação de sinais vibratórios em armadilhas de monitoramento. A atração para armadilhas com feromônios é uma técnica de monitoramento de percevejos comprovadamente eficiente para o monitoramento populacional (Millar et al., 2002, Borges et al., 2011, Laumann et al., 2011). Entretanto a captura dos

insetos e precisão das armadilhas podem ser aprimoradas com a incorporação de outros sinais relacionados ao comportamento reprodutivo dos insetos, como os sinais vibratórios. Outra forma de aplicação em campo de sinais vibratórios é o uso de sinais disruptivos, que podem ser utilizados para repelir ou interferir na comunicação dos percevejos. Entre outros, podem se identificar sinais de competidores (sinais de indivíduos da mesma espécie/sexo ou sinais de indivíduos de outras espécies) ou antagonistas (predadores) que podem ter efeitos repelentes ou inibidores da comunicação (Laumann et al., 2017). O potencial disruptivo de vibrações, apresentadas aos percevejos como ruído ambiental, foi comprovada para o percevejo marrom, *E. heros*. Neste caso vibrações artificiais de tom puro entre 75 e 200 Hz tiveram um forte efeito inibidor da cópula. Entretanto em experimentos de longa duração o efeito foi reduzido (Laumann et al., 2018).

Embora nos últimos anos o conhecimento em relação à comunicação vibracional de percevejos tenha tido um progresso importante ainda, existem algumas lacunas de conhecimento que devem ser preenchidas. Čokl e colaboradores (2017) identificaram as interações grupais entre indivíduos coespecíficos e heteroespecíficos, as interações de sinais multimodais e sua capacidade para modular o comportamento dos insetos, e o efeito do ambiente (plantas hospedeiras e fatores climáticos) na comunicação vibracional como pontos relevantes que ainda não foram suficientemente explorados.

Os trabalhos de pesquisa desta tese estiveram orientados a abordar alguns dos aspectos da comunicação vibracional de percevejos, destacados acima, para contribuir com o avanço dessa linha de conhecimento. Adicionalmente os trabalhos tiveram uma orientação que visou avaliar a possibilidade da sua aplicação para o manejo de percevejos praga.

Para isto foram selecionadas três espécies como modelo de estudo. O percevejo marrom, *Euschistus heros* e dois percevejos verdes, *Chinavia ubica* e *Chinavia impicticornis* (Figura 3). Como mencionado anteriormente *E. heros* é a principal praga da soja no Brasil. Esta espécie têm uma ampla distribuição geográfica na região Neotropical, desde América Central até a Argentina e Uruguai (Panizzi e Lucini, 2017). As espécies de *Chinavia*, consideradas como

pragas secundárias da soja, são encontradas em baixas densidades nas culturas (Aquino et al., 2019). Estas espécies tem uma distribuição geográfica similar nas regiões tropicais e subtropicais da América do Sul (Panizzi e Lucini, 2017).

Estas espécies têm repertórios de comunicação vibracional diferentes e altamente específicos fazendo delas modelos interessante para comparar as reações frente a diferentes estímulos e condições.

Os sinais de *E. heros* foram identificados por Blassioli-Moraes e colaboradores (2005) e os de *C. impicticornis* e *C. ubica* por Laumann e colaboradores (2016). O repertório básico destas espécies inclui um sinal de chamamento, chamado de FS1 (do inglês Female Song 1) em *E. heros* e de FS-1a em *Chinavia* sp., seguido pela resposta dos machos, MS1 (do inglês: Male Song 1). Estes cantos apresentam as características de se apresentarem como pulsos ou trêm de pulsos relativamente curtos (1000 a 3000 ms de duração) repetidos regularmente (tempo de repetição conservado). Após a emissão destes sinais de chamamento e quando os insetos se encontram próximos ou em contato físico, a comunicação evolui com a emissão dos cantos de acasalamento que em *E. heros* se manifestam como FS-1 e MS-2 e em *Chinavia ubica* como uma alternância de cantos FS-1a e sua evolução para o FS-1b e MS-2. O canto FS-1b das fêmeas é típico das espécies de *Chinvaia* e se caracteriza pela fusão de pulsos do trem de pulsos original do canto FS-1a. Estes cantos se emitem em forma de dueto, alternando pulsos ou trem de pulsos entre machos e fêmeas e se caracterizam por apresentarem pulsos ou trem de pulsos longos (em geral com duração superior a 3000 ms) e irregulares tanto na sua duração como no tempo de repetição. Os duetos são mantidos até o início da cópula (Blassioli-Moraes et al., 2005, Laumann et al., 2016). No caso de *E. heros* tem se descrito ainda um canto de cópula (MS-3) emitido na etapa de pivotamento e, em alguns casos após início da cópula (Blassioli-Moraes et al., 2005) (Tabela 1 e Figura 4).



***Euschistus heros* (Fabricius, 1798)**



***Chinavia ubica* (Rolston, 1983)**



***Chinavia impicticornis* (Stål, 1872)**

Figura 3. Fotos demonstrando aspectos físicos das espécies de percevejo *Euschistus heros*, *Chinavia ubica* e *Chinavia impicticornis*. Fotos de Cecília Vieira.

Tabela 1. Parâmetros temporais e espectrais dos sinais das espécies de percevejos utilizadas como modelo de estudo. Valores médios \pm SD.

| Espécie | Sinal | Duração (ms) | | Tempo de repetição (ms) | | Frequência dominante (Hz) |
|-------------------------|--------|-----------------|------------------|-------------------------|------------------|---------------------------|
| | | Trem de pulso | Pulso | Trem de pulso | Pulso | |
| <i>E. heros</i> | FS1 | NA | 925 \pm 186 | NA | 2748 \pm 329 | 111 \pm 4 |
| <i>C. impicticornis</i> | FS-1a | 3886 \pm 250 | 195 \pm 32 | 11008 \pm 856 | 233 \pm 29 | 92 \pm 1 |
| <i>C. ubica</i> | FS1-1a | 1878 \pm 153 | 142 \pm 22 | 4191 \pm 1130 | 196 \pm 54 | 106 \pm 2 |
| <i>E. heros</i> | MS1 | NA | 6839 \pm 1873 | NA | 16105 \pm 9103 | 107 \pm 4 |
| <i>C. impicticornis</i> | MS1 | 4971 \pm 535 | 214 \pm 34 | NA | 231 \pm 23 | 91 \pm 2 |
| <i>C. ubica</i> | MS1 | 1740 \pm 193 | 163 \pm 27 | NA | 190 \pm 22 | 105 \pm 1 |
| <i>E. heros</i> | FS2 | 5663 \pm 1198 | | NA | NA | 152 \pm 7 |
| <i>C. impicticornis</i> | FS-1b | 1048 \pm 112 | 235 \pm 59 | 3078 \pm 204 | NA | 77 \pm 0 |
| <i>C. ubica</i> | FS1-1b | 1350 \pm 204 | 138,8 \pm 28,2 | 3020 \pm 888 | 169 \pm 21 | 109,2 \pm 0,7 |
| <i>E. heros</i> | MS2 | NA | 4407 \pm 582 | NA | NA | 105 \pm 3 |
| <i>C. impicticornis</i> | MS2 | 196 \pm 16 | NA | 244 \pm 18 | NA | 97-104 |
| <i>C. ubica</i> | MS2 | NA | 387 \pm 339 | NA | 485 \pm 253 | 104-135 |

Referências: NA= Não aplica, FS=sinal de fêmea, MS= sinal de macho. Identificado por Blassioli-Moraes et al. (2005), e Laumann et al. (2016).

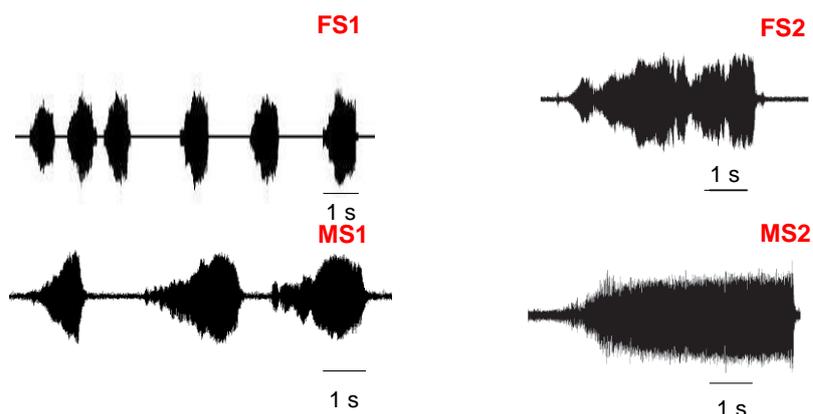
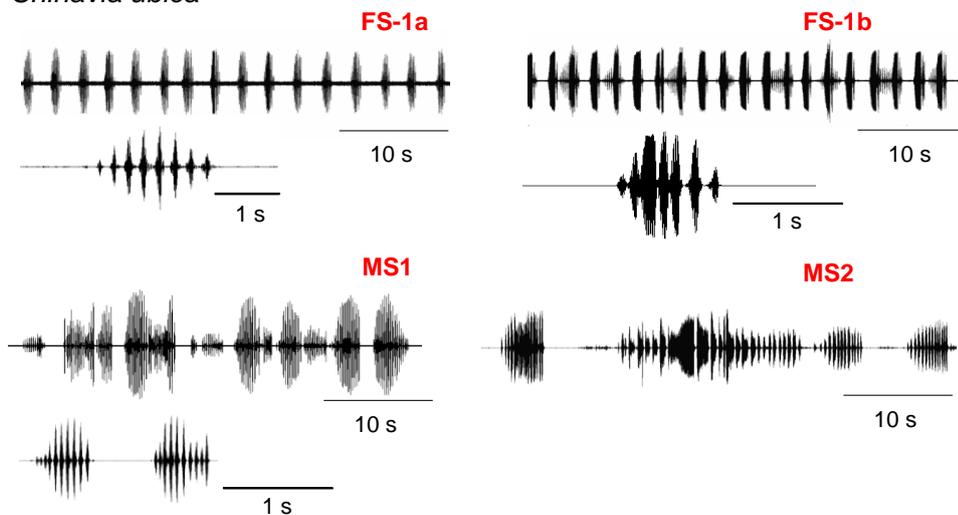
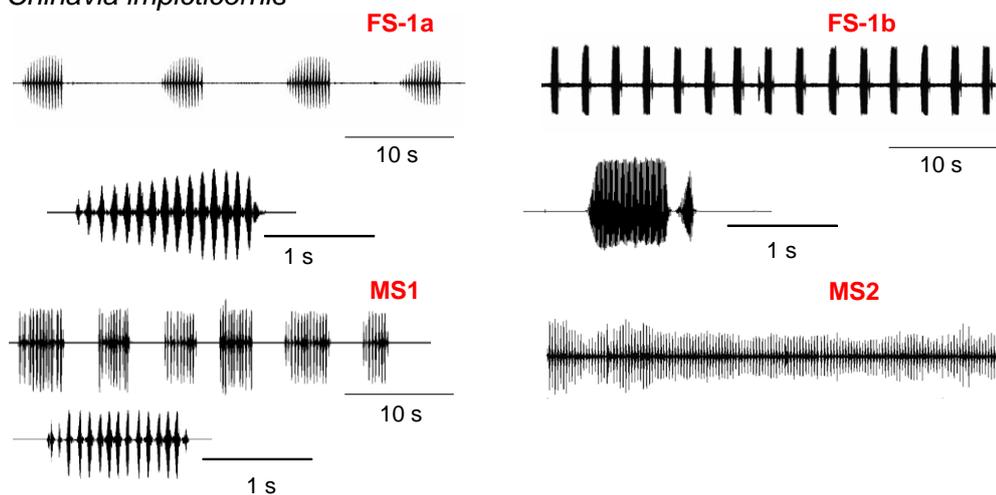
Euschistus heros*Chinavia ubica**Chinavia impicticornis*

Figura 4. Repertório de sinais das espécies utilizadas neste trabalho mostrando oscilogramas de sequencias de pulsos ou trêm de pulsos e detalhes de pulsos ou trêm de pulsos. FS= sinal de fêmea, MS= sinal de macho.

Objetivos e Estrutura da Tese

Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo principal aprofundar os conhecimentos na comunicação vibracional de percevejos, visando sua aplicação no manejo de pragas.

A tese está organizada nos seguintes capítulos:

Capítulo I: INTERAÇÕES INTRAESPECÍFICAS, RIVALIDADE ENTRE FÊMEAS E SEUS EFEITOS NA COMUNICAÇÃO VIBRACIONAL DE PERCEVEJOS

Objetivos: 1- Investigar interações intraespecíficas entre fêmeas de percevejos visando identificar sinais de rivalidade.

2- Avaliar o potencial dos sinais de rivalidade para que interferir ou inibir a comunicação intraespecífica e o comportamento reprodutivo;

Capítulo II: RELAÇÕES INTERESPECÍFICAS, INTERAÇÕES ENTRE PERCEVEJOS HERBÍVOROS E PREDADORES E SEUS EFEITOS NA COMUNICAÇÃO VIBRACIONAL DE PERCEVEJOS

Objetivos: 1- Investigar interações interespecíficas de sinais vibratórios de percevejos fitófagos e predadores avaliando os efeitos na comunicação vibracional das espécies

2- Identificar sinais com potencial para interferir ou inibir a comunicação vibracional e o comportamento reprodutivo de percevejos fitófagos;

Capítulo III: COMUNICAÇÃO MULTIMODAL, INTERAÇÕES ENTRE SINAIS QUÍMICOS E SINAIS VIBRATÓRIOS E SEUS EFEITOS NA COMUNICAÇÃO SEXUAL DE PERCEVEJOS

Objetivo: Desenvolver estudos de comunicação multimodal em percevejos, pretendendo estabelecer a interação entre sinais de diferentes modalidades (químicos e vibratórios) no comportamento reprodutivo destes insetos;

Capítulo IV: INFLUÊNCIA DE FATORES ABIÓTICOS NA COMUNICAÇÃO VIBRACIONAL DE PERCEVEJOS

Objetivos: 1- Avaliar a influência de vibrações originadas por fatores abióticos (vibrações originadas por vento ou chuva) na comunicação vibracional de percevejos

2- Avaliar o potencial de interferência ou inibição na comunicação vibracional e comportamento reprodutivo dos percevejos fitófagos das vibrações originadas por fatores abióticos;

Capítulo V: POTENCIAL DE SINAIS DE CHAMAMENTO DE E. heros PARA ATRAÇÃO DE COESPECÍFICOS PARA APLICAÇÃO NO MONITORAMENTO DE POPULAÇÕES

Objetivo: 1- Determinar se sinais de chamamento de fêmeas ou machos de *E. heros* tem potencial de atração de coespecíficos

2- Avaliar a eficiência de incorporação de sinais vibratórios de *E. heros* em arandilhas de monitoramento para atração e captura de machos e fêmeas.

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS GERAIS

Nesta seção se apresentarão os protocolos básicos de pesquisa que foram utilizados para execução dos experimentos realizados em todas as atividades deste trabalho. O intuito é descrever os procedimentos básicos e de uso comum nos experimentos de todos os capítulos da tese, para evitar repetições ao longo do texto. Esta seção de *Procedimentos experimentais gerais* será nomeada ao longo do texto como PEG.

Todas as atividades de pesquisa se desenvolveram no Laboratório de Semioquímicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. As atividades foram financiadas com recursos do projeto FAPDF "Comunicação vibracional de percevejos: desenvolvimento de tecnologias para aplicação no manejo de pragas"- Processo: 193.000.978/2015.

Criação de Insetos

Os percevejos fitófagos *Euschistus heros* (Fabricius, 1794), *Chinavia ubica* (Rolston, 1983) e *Chinavia impicticornis* (Stål, 1872) (Hemiptera: Pentatomidae), foram criados segundo a metodologia descrita por Borges e colaboradores (2006). Os adultos foram mantidos em gaiolas de plástico de 8 L e alimentados com dieta natural consiste em vagens frescas de feijão, *Phaseolus vulgaris* (L.) (8 a 10 vagens por gaiola) e sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* L.), soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e girassol (*Helianthus annuus* (L.)) coladas com cola branca (não tóxica, lavável) em cartelas de papel (10 cm de comprimento x 8 cm de largura).

Como complemento da alimentação e para manter umidade e prover fonte de água foram colocados nas gaiolas potes de plásticos de 200 mL cheios de vermiculita humedecida com água, e ramos frescos de boldo-de-jardim, *Plectranthus barbatus* Andrews, e boldo chileno, *Peumus boldus* Molina (Silva et al. 2019). Estas gaiolas foram tampadas com um tecido tipo organza, o qual foi preso com a tampa plástica dos potes, às quais foi retirada a parte central, para permitir a ventilação. Telas de nylon de 15 cm² foram colocadas nas gaiolas, juntamente com pedaços de algodão servindo como substrato para oviposição.

Os ovos coletados foram colocados em placa de Petri (9 cm de diâmetro) junto com uma vagem de feijão para manutenção da umidade e alimentação das ninfas. Após a eclosão das ninfas, estas foram mantidas nas placas até atingirem o segundo instar. A partir desse estágio as ninfas foram transferidas para gaiolas de plástico contendo a dieta descrita anteriormente. Todas as colônias foram mantidas em salas climatizadas 26,0 ± 0,5°C e 65 ± 10% UR com fotoperíodo de 14hL:10hO (Figura 5).



Figura 5. Sala de manutenção do percevejo com vista parcial da colônia de *E. heros*. Laboratório de Semioquímicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Todos os insetos utilizados nos experimentos foram mantidos segundo a descrição anterior e estavam com 10-20 dias de fase adulta e virgens (Silva et al. 2015). Para certificar que os insetos eram virgens, assim que acontecia a última ecdise os machos e fêmeas eram individualizados, pelas características da genitália externa e mantidos em gaiolas e salas de criação separadas até serem utilizados nos experimentos.

Cultivo das Plantas

Sementes de feijão, *P. vulgaris* foram plantadas em vasos de plástico de 10,5 cm de altura e 11 cm de diâmetro, com furos no fundo, preenchidos de solo estéril, enriquecido com NPK 10:10:10, e substrato para crescimento de plantas (Tropstrato HA Hortaliças) misturados em porções iguais. Estes vasos foram mantidos em casa de vegetação para germinação e crescimento, à temperatura de 27°C e luz complementar para 14 h de fotofase.

As plantas foram regadas diariamente, e utilizadas 25 a 35 dias após a germinação, quando estavam no estágio vegetativo 2 ou 4, com duas folhas unifolioladas ou duas folhas unifoliadas e dois trifólios e com 15 a 20 cm de altura. A escolha das plantas de feijão para a realização dos experimentos se fundamenta em que elas são um excelente modelo para registro de sinais vibratórios e de transmissão e retransmissão (playback) de sinais (Čokl 2008). Adicionalmente as plantas de feijão no estágio vegetativo 2 são ótimos modelos para os experimentos de escolha ao apresentar no estágio vegetativo 2 duas folhas unifoliadas opostas e com superfície adequada para alojar os insetos. Estas plantas de modelo transmitem eficientemente os sinais vibratórios com variações de intensidade ótimas para a execução de experimentos e observação da resposta comportamental dos insetos (Laumann et al., 2007). Adicionalmente nos experimentos onde foram utilizados dois insetos ou mais se utilizaram plantas no estágio V4 para aumentar a superfície disponível para os insetos.

Registro dos sinais vibratórios

Todos os experimentos com sinais vibratórios foram realizados, em salas especialmente condicionadas com temperatura mantida entre 25 a 27°C, e no período das 08:00 h as 17:00 h, horário de atividade dos percevejos.

As salas possuíam isolamento acústico e foram adaptadas para reduzir ao máximo a interferência de sinais eletromagnéticos. Nestas salas as paredes foram revestidas com espuma acústica e o piso elevado com uma plataforma de madeira preenchida com pérolas de poliestireno (isopor).

Para reduzir as vibrações ambientais, as plantas ou outros substratos utilizados para o registro dos sinais vibratórios foram colocados sobre placas de isopor, posicionadas sobre uma prancha de granito, a qual ficou apoiada em 5 câmaras de ar cheias, uma em cada ponta e uma no meio, dispostos sobre uma mesa de madeira, a qual ficou sobre um tapete de borracha.

Para o registro dos sinais usou-se um vibrômetro laser portátil (PDV 100, Polytec, Waldbronn, Germany), que permite obter o registro dos sinais vibratórios

diretamente das plantas ou outros substratos sem contato direto com a superfície (figura 6). O equipamento utiliza o sistema doppler e um decodificador de velocidade digital para medir a velocidade de deslocamento das partículas de uma superfície em vibração. Possui um intervalo de operação de 0,5 Hz a 22 KHz, 3 intervalos de medição 5, 15 e 1225 mm/s/V e 3 escalas de medição de velocidade com limites de 20, 100 e 500 mm/s.

Para as medições o raio laser do vibrômetro, utilizado com sensibilidade de 100 mm/s, foi apontado perpendicularmente a uma fita adesiva refletiva, 1 cm x 1 cm, colado nos substratos onde os sinais vibratórios dos insetos foram registrados (plantas ou arenas de vidro ou acrílico). Essa fita tem como função otimizar a reflexão do feixe luminoso do laser, maximizando o registro das vibrações diminuindo qualquer ruído ambiental na captação do sinal. O laser foi posicionado a uma distância de 20 a 40 cm das superfícies de medição. Nas plantas os registros foram realizados a, aproximadamente 5 cm acima da superfície do solo e em outros substratos em posição próxima (5 a 10 cm) da localização dos insetos.

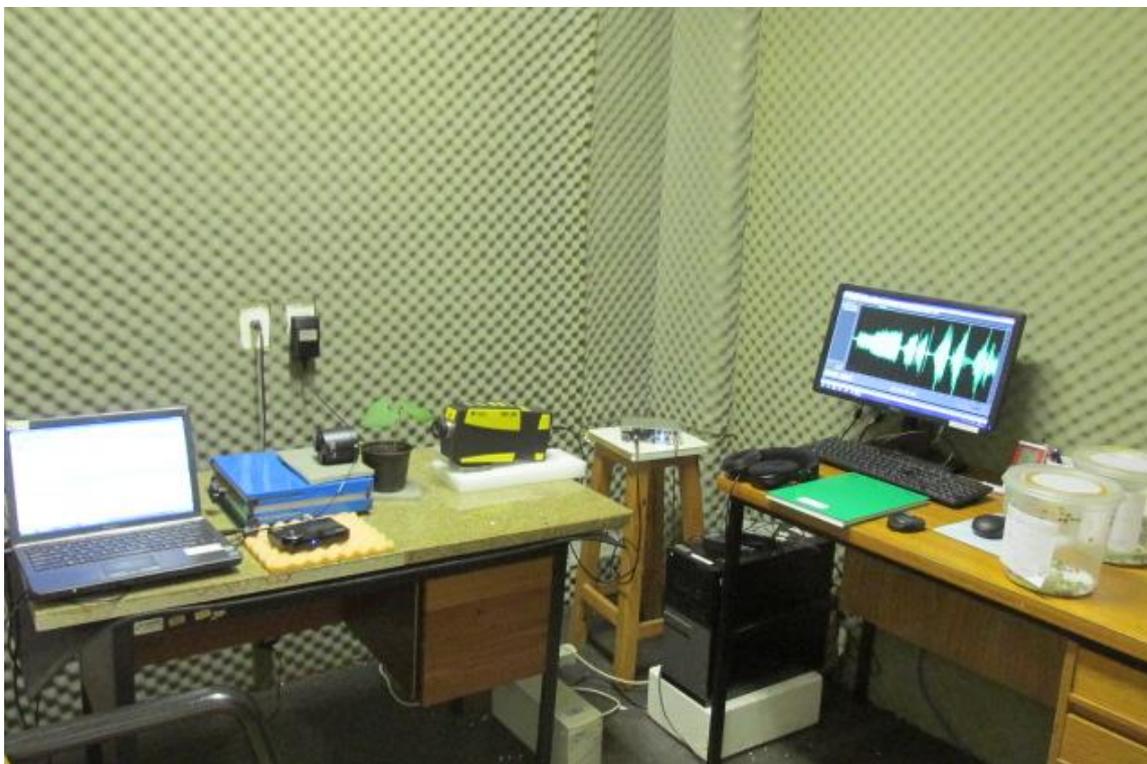


Figura 6. Sala com isolamento acústico e equipamentos utilizados nos experimentos. Laboratório de Semioquímicos, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Foto: Douglas Maccagnan.

Os sinais emitidos pelos insetos, e retransmitidos nas superfícies, foram captados pelo vibrômetro e transferidos, sem amplificação, a uma placa de áudio externa USB (Creative Sound Blaster X-Fi Surround 5.1), para digitalizar o sinal. A placa foi conectada a um computador, o qual armazenou os sinais em arquivos no formato .wav (24 bit, 96 kHz, 100 dB relação sinal/ruído) utilizando o software Coll Edit Pro (Syntrillium Software 2001) (Figura 7).

Durante a execução dos experimentos o monitoramento dos sinais vibratórios em tempo real foi realizado por meio da placa de áudio tanto em forma acústica, com auxílio de fones de ouvidos como visual mediante a observação dos oscilogramas dos sinais emitidos pelos insetos gerados pelo software.

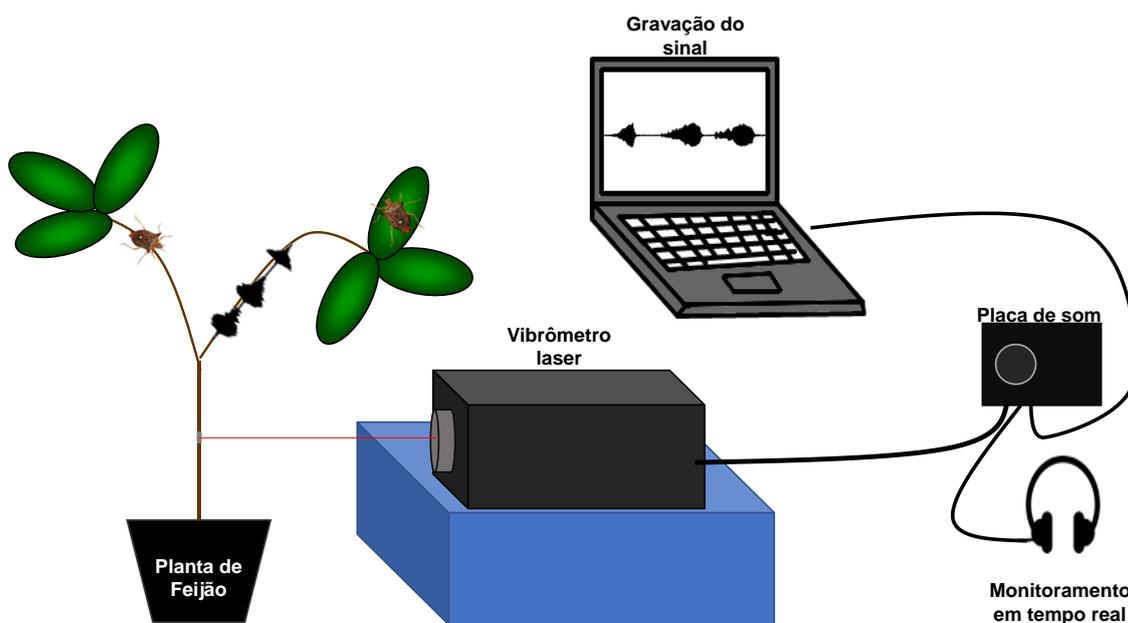


Figura 7. Esquema do arranjo para registro e armazenamento de sinais vibratórios de percevejos.

Para evitar a geração de arquivos digitais de grande tamanho os registros dos sinais vibratórios foram realizados em intervalos de 10 min. E nomeados em sequência numérica para identificar os arquivos do mesmo experimento.

Previamente à análise os arquivos armazenados no computador foram filtrados. Para isso, ruídos ambientais da sala foram gravados todos os dias, e o ruído referente a cada dia foi usado para depurar os arquivos de bioensaios com a ferramenta *NoiseReducion* do programa Cool Edit Pro. Retirando os ruídos ambientais e permanecendo somente as vibrações de interesse, no caso os sinais dos percevejos.

Análises dos sinais vibratórios

Os sinais vibratórios dos insetos foram classificados segundo a sua sequência de aparição nos registros e os comportamentos aos que estão associados, utilizando a terminologia de Broughtnon (1963), os componentes dos sinais foram classificados como:(1) *pulso*, um pulso é definido como uma parcela homogênea unitária de vibração com intensidade acima do nível de ruído e de duração finita, (2) *trem de pulsos*, grupo de pulsos repetíveis e temporalmente distintos e (3) *canção ou canto*, uma sequência de pulsos ou trem de pulsos com início e fim claramente identificáveis, a classificação dos cantos se faz utilizando o contexto comportamental em que são emitidas podendo ser de chamamento, acasalamento, cópula, rivalidade, etc. (Figura 8).

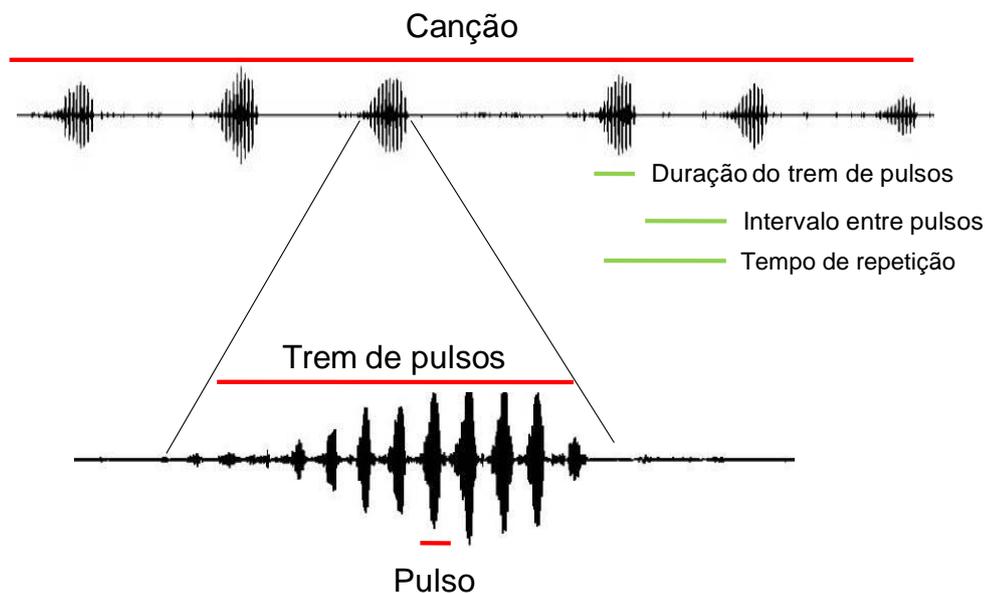


Figura 8. Representação dos parâmetros temporais de sinais vibratórios de percevejos e os critérios utilizados para quantificá-los. Na figura se observa o canto de chamamento (FS-1a) de fêmeas de *Chinavia ubica* segundo descrito em Laumann et al. (2016).

Os sinais vibratórios foram caracterizados pelos seus parâmetros temporais e espectros de frequência. Os parâmetros espectrais considerados foram *frequência dominante* (Hz, frequência com maior intensidade no espectro) e *número de harmônicos* (picos de frequência múltiplos da frequência do primeiro harmônico (frequência fundamental)), quando presentes. Os parâmetros temporais medidos foram *duração do pulso/trem de pulsos* (ms), considerando início e fim as oscilações registradas acima do nível de ruído, *tempo de repetição* (ms, intervalo entre o início de um pulso/trem de pulso e o seguinte) e *intervalo entre pulsos/trem de pulsos* (ms, intervalo entre a finalização de um pulso/trem de pulsos e início do próximo) (Figura 8).

Para analisar os parâmetros dos sinais vibratórios presentes nos arquivos foi utilizado o programa SoundForge (Sonic Foundry SoundForge 4.0). Este programa gera os oscilogramas dos sinais, e permite a medição dos parâmetros

temporais. Também gera os espectros das ondas pela função *Spectrum Analise*, que fornece os valores da amplitude, frequência e número de harmônicos da frequência dominante. Todos os valores foram tabulados para realizar as análises estatísticas dos dados.

Experimentos de retransmissão dos sinais (*playback*)

Para a retransmissão dos sinais vibratórios em superfícies teste, utilizou-se um excitador eletrodinâmico (“mini shaker” Modelo 4810, Bruel&Kjaer, Naerum, Denmark), que possui uma faixa de frequência de DC - 18 kHz e deslocamento máximo de pico a pico de 4 mm (Figura 9). Nos experimentos reproduziram-se programas de estimulação construídos a partir de sinais previamente gravados. As sequências de sinais vibratórios selecionadas para os programas de estimulação foram inseridas num novo arquivo e a intensidade ajustada e normalizadas para os valores de emissão natural registrados em substratos não ressonantes (alto-falantes), para que retransmitisse através do substrato de forma mais semelhante possível ao emitido naturalmente pelos insetos. Os programas de estimulação foram criados segundo os objetivos de cada experimento e armazenados em arquivos .wav (24 bit, 96 kHz, 100 dB relação sinal/ruído) os detalhes de cada programa de estimulação serão descritos em cada experimento em que foram utilizados.

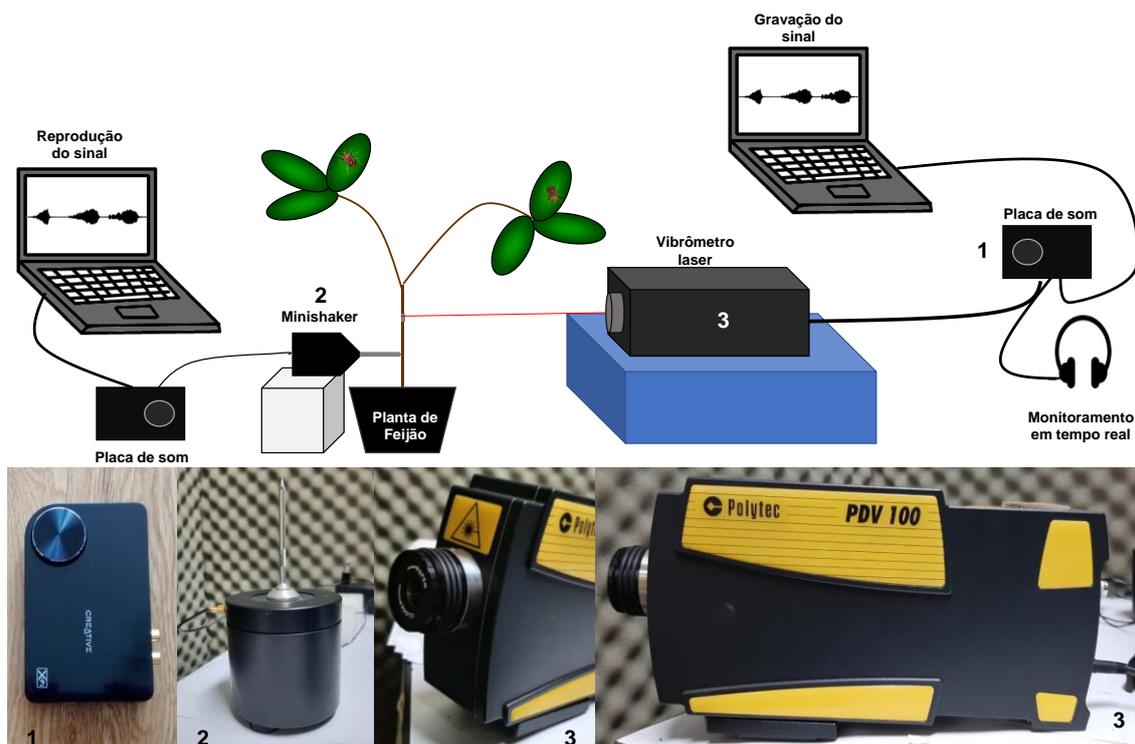


Figura 9. Desenho experimental de bioensaios de reprodução de arquivos de sinais vibratórios (experimentos de *playback*) em plantas de feijão. Para retransmitir os sinais utilizou-se um mini Shaker e para registro dos sinais emitidos pelos insetos um vibrômetro a laser.

Os programas de estimulação foram reproduzidos utilizando a função de reprodução em "loop" do software SoundForge. O computador foi conectado a uma placa de áudio e posteriormente conectada ao minishaker. A amplitude de emissão dos sinais retransmitidos foi mensurada diretamente no cone vibratório do minishaker utilizando o vibrômetro laser e o nível das emissões ajustado para aquele naturalmente emitido pelos insetos. No cone vibratório do minishaker foi ajustada uma agulha de aço de (5 cm) com uma ponta aguçada que foi colocada em contato direto com as superfícies a serem vibradas. Após o ajuste deste dispositivo a transmissão dos sinais foi avaliada medindo, a superfície vibrada, a intensidade dos sinais utilizando o vibrômetro laser (Figura 9).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aldrich JR, Oliver JE, Lusby WR et al (1994) Identification of male-specific volatiles from Nearctic and Neotropical stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *J Chem Ecol* 20:1103–1111
- Aquino, M.F.S.; Sujii, E.R.; Borges, M.; Blassioli-Moraes, M.C.; Laumann, R.A. (2019). Diversity of stink bug adults and their parasitoids in soybean crops in Brazil: Influence of a latitudinal gradient and insecticide application intensity. *Env. Entomol.*, 48,105–113.
- Bailey, W.J. (1991). *Acousti Behavior of Insects. An evolutionary perspective.* Chapman and Hall, London, UK. 225 p.
- Blassioli-Moraes MC, Magalhaes DM, Čokl A, Laumann RA, Da Silva JP et al (2014) Vibrational communication and mating behaviour of *Dichelops melacanthus* (Hemiptera: Pentatomidae) recorded from the loudspeaker membrane and plants. *Physiol Entomol* 39:1–11
- Blomquist, G.J., Bagnères, A.G., (2010) Structure and analysis of insect hydrocarbons. In: Blomquist, G. H. (Ed). *Insect Hydrocarbons.* Cambridge University Press, Cambridge, 19-34 pp.
- Boethel, D.J.; Russin, J.S.; Wier, A.T.; Layton, M.B.; Mink, J.S.; Boyd, M.L. (2000) Delayed maturity associated with Southern green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) injury at various soybean phenological stages. *Journal of Economic Entomology*, v.93, p.707-712.
- Borges, M., Jepson, P.C., Howse, P.E. (1987). Long-range mate location and close-range courtship behaviour of the Green Stink Bug, *Nezara viridula* and its mediation by sex pheromones. *Entomologia experimentalis et applicata*. 44: 205-212.
- Borges, M., & Aldrich, J. R. (1994). Attractant pheromone for Nearctic stink bug, *Euschistus obscurus* (Heteroptera: Pentatomidae): insight into a Neotropical relative. *Journal of chemical ecology*, 20(5), 1095-1102.
- Borges M, Schmidt FVG, Sujii ER et al (1998) Field responses of stink bugs to the natural and synthetic pheromone of the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, (Heteroptera: Pentatomidae). *Physiol Entomol* 23:202–207

- Borges, M., Mori, K., Costa, M. L. M., Sujii, E.R. (1998). Behavioural evidence of methyl-2,6,10-trimethyltridecanoate as a Sex pheromone of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). *J. Appl. Entomol.* v. 122, n. 6, p. 335-338.
- Borges, M.; Costa, M.L.M.; Sujii, E.R.; Cavalcanti, M.G.; Redígolo, G.F.; Resck, I.S.; Vilela, E.F. (1999) Semiochemical and physical stimuli involved in host recognition by *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae) toward *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). *Physiol. Entomol*, 24, 227-233
- Borges, M., Laumann, R.A., Cavalcante, C., Moraes, M.C.B., Santos, H.M., Ribeiro, D.T. (2006). Metodologias de criação e manejo de percevejos da soja (Hemiptera: Pentatomidae) para estudos de comportamento e ecologia química. Documento Série Embrapa. Brasília:Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.
- Borges, M.; Moraes, M. C. B.; Peixoto, M. F.; Pires, C. S. S.; Sujii, E. R., Laumann, R. A. (2011). Monitoring the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) with pheromone-baited traps in soybean fields. *Journal of Applied Entomology*, v. 135, p. 68-80.
- Borges, M. and M.C. Blassioli-Moraes (2017), "The semiochemistry of Pentatomidae", pp. 95-124. In, A. Čokl and M. Borges (editors), *Stink Bugs: Biorational Control Based on Communication Processes*. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton London New York, 2017; pp. 95-124.
- Borges, M.; Čokl, A. (2017) Introduction. In: *Stink Bugs: Biorational Control Based on Communication Processes*, Čokl, A., Borges, M., Eds.; CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton London New York, 2017; pp. XV-XX.
- Bortolotto, O.C., Pomari-Fernandes, A., Bueno, R.C.O. de, Bueno, A. de F., Kruz, Y. K.S., Queiroz, A.P., Sanzovo, A. Ferreira, R.B., (2015). The use of soybean integrated pest management in Brazil: a review. *Agron. Sci. Biotechnol.* 1, 25–32.
- Bradbury JW, Vehrencamp SL (2011) *Principles of Animal Communication* 2nd Edition. Sinauer Associates Incorporated, Sunderland
- Broughton, W.B. (1963). Methods in bio-acoustic terminology. In: *Acoustic Behaviour of Animals*; Busnel, R.G., Eds.; Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-New York; pp 3 24
- Chapaman RF. (2012). *The Insects: Structure and Function* 5th Edition Cambridge University Press. Chapter 2. 53-100

- Cocroft RB, Rodríguez RL (2005) The behavioral ecology of insect vibrational communication. *Bioscience* 55:323–334. Capítulo do livro Virant-Doberlet, M, Mazzoni, V., de Groot, M., Polajnar, J., Lucchi, A., Symondson, W.O.C., Čokl, A. *Vibrational Communicatin Networks: Eavesdropping and Biotic Noise*. In Cocroft, r.B., gogala, M., Hill, P.S.M., Wessel, A. *Studing vibrational communication*. Springer Heidelberg New York Dordrecht London. Chapter 7. 93-123
- Cocroft, R., Goala, M., Hill, P.S.M., Wessel, A. (2014). Fostering research progress in a rapidly growing field In: Cocroft RB, Gogala M, Hill PSM, Wessel A (eds). *Studying Vibrational Communication*. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 3-12
- Čokl, A., Gogala, M., Jez, M. (1972). The analysis of the acoustic signals of bug *Nezara viridula* (L.) *Biol. Vestnic.* v. 20, p. 47-53.
- Čokl, A., Virant-Doberlet, M., & Stritih, N. (2000). The structure and function of songs emitted by southern green stink bugs from Brazil, Florida, Italy and Slovenia. *Physiological Entomology*, 25, 196-205.
- Čokl, A., Virant-Doberlet, M. (2003). Communication with substrate-Borne Sgnals in Small Plant-Dwelling insects. *Annual Review of Entomology*. Palo Alto. V. 48, p.29-50.
- Čokl, A., Zorovi, M., A., Virant-Doberlet, M. (2005): Tuning of host plants with vibratory songs of *Nezara viridula* L. (Heteroptera: Pentatomidae).- *J. Exp. Biol.* v. 208, p. 1481-1488.
- Čokl, A. (2008). Stink bug interaction with host plants during communication. *Journal of Insect Physiology*, 54, 113e1124.
- Čokl, A.; Millar, J. (2009). Manipulation of insect signalling for monitoring and control of insects. In *Biorational Control of Arthropod Pests*; Issac Ishaaya, I., Horowitz, A.R., Eds.; Springer, Dordrecht Heidelberg London New York, 2009, pp.279-316.
- Čokl, A; Laumann, R A ; Stritih, N. . Substrate-borne Vibratory Communication. In: Cokl, A.; Borges, M. (2017a). (Org.). *Stink Bugs. Biorational Contgrol based on Communication Processes*. 1ed.Boca Ratón: CRC Press, 2017, v., p. 125-164.
- Čokl, A.; Dias, A.M.; Blassioli-Moraes, M.C.; Borges, M.; Laumann R.A. (2017b). Rivalry between stink bug females in a vibrational communication network. *J. Insect Behav.*, 30,741-758.

- Čokl, Andrej ; Blassioli-Moraes, Maria Carolina ; Laumann, Raul Alberto ; Zunic , Alenka ; Borges, Miguel (2019). Stinkbugs: Multisensory Communication with Chemical and Vibratory Signals Transmitted Through Different Media. *Animal Signals and Communication*. 1sted.: Springer International Publishing, v. , p. 91-122
- Čokl, A.; Žunič, A.K.; Laumann, R.A.; Virant-Doberlet, M. (2020). Female competition for availability of males in insects: the *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) model. *Insect Sci*, 27, 801-814.
- Colazza, S., Aquila, G., De Pasquale, C. et al. (2007) The egg parasitoid *Trissolcus basalis* uses n-nonadecane, a cuticular hydrocarbon from its stink bug host *Nezara viridula*, to discriminate between female and male hosts. *Journal of Chemical Ecology*, 33, 1405–1420.
- Corrêa-Ferreira, B.S.; Krzyzanowski, F.C.; Minami, C.A. (2009). Percevejos e a qualidade da semente de soja – série sementes. Londrina: Embrapa Soja, 2009. 15 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 67)
- Da Silva VP, Pereira MJB, Vivan LM, Moraes MCB, Laumann RA, Borges M (2014) Monitoramento do percevejo marrom *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) por feromônio sexual em lavoura de soja. *Pesqui Agropecu Bras* 49:844–852
- Da Silva CC, Laumann RA, Blassioli-Moraes MC, Aquino MFS, Borges M (2015) Comparative biology of two congeneric stinkbugs, *Chinavia impicticornis* and *C. ubica* (Hemiptera: Pentatomidae) *Pesq Agropec Bras* 50:355–362
- Da Silveira, S., Dias, A. M., Gomes-Lagoa, A. C., Blassioli-Moraes, M. C., Borges, M., Čokl, A., & Laumann, R. A. (2019). Specificity of male responses to female vibratory signals in two *Chinavia* species (Hemiptera: Pentatomidae) is based on signal structure and narrow temporal parameter. *Animal Behavior and Cognition*, 6(1), 1-12.
- Da Silva, C. C. A., Blassioli-Moraes, M. C., Borges, M., & Laumann, R. A. (2019). Food diversification with associated plants increases the performance of the Neotropical stink bug, *Chinavia impicticornis* (Hemiptera: Pentatomidae). *Arthropod-Plant Interactions*, 13(3), 423-429.
- Diário Oficial da União. 2010. RESOLUÇÃO-RDC N 28, DE 9 DE AGOSTO DE 2010, Anvisa - Regulamento Técnico para o Ingrediente Ativo Endossulfam em decorrência da Reavaliação Toxicológica, Diário Oficial da União, Seção 1, N° 156, segunda-feira, 16 de agosto de 2010, p 64.
- Diário Oficial da União. 2011. RESOLUÇÃO-RDC N 1, DE 149 DE JANEIRO DE 2011, Anvisa - Regulamento Técnico para o Ingrediente Ativo

Metamidofós em decorrência da Reavaliação Toxicológica, Diário Oficial da União, Seção 1, Nº 11, segunda-feira, 17 de janeiro 2011, p 56.

- Eriksson, A.; Anfora, G.; Lucchi, A.; Lanzo, F.; Virant-Doberlet, M.; Mazzoni, V. (2012). Exploitation of insect vibrational signals reveals a new method of pest management. *PLoS One*. 7, 1-5.
- Gomes Lagôa, A. C., Blassioli Moraes, M. C., Borges, M., & Laumann, R. A. (2020). Selective responses of *Trissolcus basalís* and *Telenomus podisi* to chemical footprints of preferred hosts. *Physiological Entomology*, 45(1), 60-71.
- Greenfield, M.D. (2002). Signals and receivers. Mechanism and evolution of arthropod communication. Oxford University Press. New York. 414 pp. 2002.
- Higham JP, Hebets EA (2013) An introduction to multimodal communication. *Behav Ecol Sociobiol* 67:1381–1388
- Hill, P.S.M. (2008). Vibrational Communication in animals. Harvard University Press, Cambridge, U.S.A. 261 p.
- Hill, P.S.M. (2014) Stretching the paradigm of building a new? Development of a cohesive language for vibrational communication. In: Cocroft RB, Gogala M, Hill PSM, Wessel A (eds). *Studying Vibrational Communication*. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 13-30
- Howard, R.W., Blomquist, G.J. (2005). Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annu. Rev. Entomol.* 50:371–393.
- Kavčič, A., Čokl, A., Laumann, R. A., Blassioli-Moraes, M. C., & Borges, M. (2013). Tremulatory and abdomen vibration signals enable communication through air in the stink bug *Euschistus heros*. *PLoS One*, 8(2), e56503.
- Kühne R (1982) Neurophysiology of the vibration sense in locusts and bushcrickets: Response characteristics of single receptor units. *J Insect Physiol* 28:155–163
- Lakes-Harlan, R., & Strauß, J. (2014). Functional morphology and evolutionary diversity of vibration receptors in insects. In *Studying vibrational communication* (pp. 277-302). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Laumann, R. A., Moraes, M. C. B., Čokl, A., Borges, M. (2007) Eavesdropping on the sexual vibratory communication of stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) by the egg parasitoid *Telenomus podisi*. *Animal Behaviour*, v. 73, p. 637-649.

- Laumann, R.A., Lopes, Moraes, M.C.B. Čokl A., BORGES, M. (2011). Silent singers are not safe: Selective response of the parasitoid *Telenomus podisi* to substrate-borne vibratory signals of stink bugs. *Animal Behaviour*, v. 82, p. 1175-1183, 2011.
- Laumann, R.A.; Čokl, A.; Blassioli-Moraes, M.C.; Borges, M. (2016). Vibratory communication and its relevance to reproductive isolation in two sympatric species (Hemiptera: Pentatomidae: Pentatominae). *J. Insect Behav.*, 29, 643–665
- Laumann, R.A.; Bottura Maccagnan, D.H.; Čokl, A. (2017). Use of vibratory signals for stink bug monitoring and control. In *Stink Bugs: Biorational Control Based on Communication Processes*; Čokl, A., Borges, M., Eds.; CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton London New York, 2017, pp. 226-245.
- Laumann, R.A.; Maccagnan, D.H.B.; Čokl, A.; Blassioli-Moraes, M.C.; Borges, M. (2018). Substrate-borne vibrations disrupt the mating behaviors of the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*: implications for pest management. *J. Pest. Sci.*, 91, 995-1004
- McNett, G. D., Luan, L. H., & Coccoft, R. B. (2010). Wind-induced noise alters signaler and receiver behavior in vibrational communication. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 64(12), 2043-2051.
- Miklas N., Stritih, N., Čokl, A., Virant-Doberlet, M., Renou, M. (2001). The influence of substrate on male responsiveness to the female calling song in *Nezara viridula*. *Journal of Insect Behaviour*, Londres. v. 1213, p. 1-12.
- Millar, J. G., McBrien, H. L., Ho, H. –Y, Rice, R. E., Cullen. E., Zalom, F. G., and Uokl, A. (2002). Pentatomid bug pheromone in IPM: possible applications and limitations. *IOBC wprs Bulletin*. V. 25, p. 1-11.
- Moraes, M.C.B., Laumann, R.A., Čokl, A., Borges, M. (2005). Vibratory signals of four Neotropical stink bug species. *Physiological Entomology*, Londres. v. 30, n. 2, p. 175-188.
- Panizzi, A. R. (1997). Wild hosts of pentatomids: Ecological significance and role in their pest status on crops. *Annual Review of Entomology*, v. 42, p. 99-122.
- Panizzi A.R. (2013). History and contemporary perspectives of the integrated pest management of soybean in Brazil. *Neotrop. Entomol.* 42, 119–127.
- Panizzi, A.R.; Lucini, T. Host plant-stink bug relationships. In *Biorational Control Based on Communication Processes*; Čokl, A., Borges, M. (2017). Eds.;

CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton London New York, 2017; pp. 31-85

- Partan SR, Marler P (2005) Issues in the classification of multisensory communication signals. *Am Nat* 166:231–245
- Polajnar, J., A. Eriksson, A. Lucchi, G. Anfora, M. Virant-Doberletc and V. Mazzoni. (2015). Manipulating behaviour with substrate-borne vibrations – potential for insect pest control. *Pest. Manag. Sci.* 71: 15–23.
- Scott-Philips TC (2008) Defining biological communication. *Journal of Evolutionary Biology* 21:387-395
- Soria, M F; Degrande, P E; Panizzi, A R; Toews, M D. (2017). Economic Injury Level of the Neotropical Brown Stink Bug *Euschistus heros* (F.) on Cotton Plants. *NEOTROPICAL ENTOMOLOGY*, v. 46, p. 324-335.
- Sosa-Gómez, D.R.; Silva, J.J. (2010). Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*) resistance to methamidophos in Paraná, Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 45, p. 767-769, 2010
- Takanashi, T.; Uechi, N.; Tatsuta, H. (2019). Vibrations in hemipteran and coleopteran insects: behaviors and application in pest management. *Appl. Entomol. Zool.*, 54, 21-29.
- Virant-Doberlet, M. & Čokl, A. (2004). Vibrational communication in insects. *Neotropical Entomology* v. 33, n.2, p. 121-134.
- Virant-Doberlet M, Čokl A, Zorović M (2006) Use of substrate vibrations for orientation: from behaviour to physiology. In: Drosopoulos S, Claridge MF (eds) *Insect sounds and communication: physiology, behaviour, ecology and evolution*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, pp 81–98
- Virant-Doberlet, M.; Mazzoni, V.; de Groot, M.; Polajnar, J.; Lucchi, A.; Symondson W.O.C.; Čokl, A. (2014) Vibrational communication in networks: eavesdropping and biotic noise. In *Studying vibrational communication, Animal Signals and Communication*. Cocroft, R.B., Gogala, M., Hill P.S.M., Wessel, A.; Eeds.; Springer, Berlin; pp. 93-123.
- Weber D, Khrimian A, Blassioli-Moraes MC, Millar JG (2017) The semiochemistry of Pentatomoidea. In: McPherson JE (ed). *Invasive Stink Bugs and Related Species (Pentatomoidea): Biology, higher systematics, semiochemistry, and management*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton London New York

- Yack, J. (2016). Vibrational signaling. In *Insect hearing* (pp. 99-123). Springer, Cham.
- Zhang A, Borges M, Aldrich JR, Camp MJ (2003) Stimulatory bug volatiles for the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae). *Neotrop Entomol* 32:713–717
- Zorovič M (2005) Morphological and physiological properties of vibrational neurons in thoracic ganglia of the stink bug *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae). PhD Thesis, University of Ljubljana, Slovenia
- Žunič A., Virant-Doberlet M., Čokl A., (2011). Species Recognition During Substrate-Borne Communication in *Nezara viridula* (L.) (Pentatomidae: Heteroptera) *Journal of Insect Behavior*, v. 24, p. 468-487.

CAPÍTULO I

*INTERAÇÕES INTRAESPECÍFICAS,
RIVALIDADE ENTRE FÊMEAS E SEUS EFEITOS
NA COMUNICAÇÃO VIBRACIONAL DE
PERCEVEJOS*

Este capítulo teve como objetivos investigar interações intraespecíficas entre fêmeas de percevejos visando identificar sinais de rivalidade e avaliar o potencial dos sinais de rivalidade para que interferir ou inibir a comunicação intraespecífica e o comportamento reprodutivo. Em experimentos com grupos de 3 fêmeas e um macho ou com casais (uma fêmea e um macho) foram avaliadas as seguintes hipóteses:

1. Fêmeas em grupos, assim como os machos, quando expostas a uma situação de competição desenvolvem interações de rivalidade que incluem sinais vibratórios característicos.
2. A reprodução (*playback*) dos sinais de rivalidade de fêmeas e machos inibem a comunicação vibracional de seus coespecíficos.
3. A presença de sinais vibratórios de rivalidade, em forma de ruído ambiental, reduz a proporção de cópula dos casais expostos.

A maior parte dos resultados das atividades de pesquisa deste Capítulo já foram publicadas ou estão em processo de publicação. Desta maneira se apresentarão aqui um trabalho já publicado na revista *Journal of Insect Behaviour*, um trabalho submetido e aceito para publicação na revista *Insects* (Special Issue, Special Issue Behavioral Manipulation for Pest Control) e resultados que ainda não foram publicados.



Rivalry between Stink Bug Females in a Vibrational Communication Network

Andrej Čokl¹ · Aline Moreira Dias² ·
Maria Carolina Blassioli Moraes³ ·
Miguel Borges^{2,3} · Raul Alberto Lauermann^{2,3}

Revised: 12 September 2017 / Accepted: 29 November 2017 /

Published online: 18 December 2017

© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2017

Abstract In the field, male pheromone attracts stink bugs to meet on the same plant and triggers females to call a male by the emission of the calling song. As first among Pentatomidae we describe female rivalry in *Chinavia impicticornis*, *C. ubica* and *Euschistus heros*. Rivalry starts in *C. impicticornis* by synchronized exchange of the first type of the female calling song pulse trains and proceeds by one of them either to change pulse trains from the first to the second type or to produce readily repeated single pulses. Both reactions either inhibit calling of the rival female or trigger her to respond by alternation with the second type of the calling song pulse trains. Female rivalry in *C. ubica* differs by the emission of the rival song that replaces alternation with the second type of the calling song typical for *C. impicticornis*. *E. heros* females synchronize pulses of the calling song duets and induce emission of the female rival song by one of them that partly inhibits singing of the other. These competitive interactions in *Chinavia* species reduce the proportion of couples when compared with single couples on a plant. Contrary to both *Chinavia* species, *E. heros* female rivalry does not inhibit male response, male signals overlap female emissions and create complex vibrations with modified amplitude modulation pattern caused by interference.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10905-017-9651-z>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Andrej Čokl
andrej.cokl@nib.si

¹ Department of Organisms and Ecosystems Research, National Institute of Biology, Večna pot 111, 1000 Ljubljana, Slovenia

² Programa de Pós-graduação em Zoologia, Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília CEP 70910-900, Brazil

³ Laboratório de Semioquímicos, EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Avenida W5 Norte (Final), Brasília 70770-900, Brazil

Keywords Calling interactions · female duets · signal synchronization · signal modification · mating behaviour

Introduction

Animal communication usually includes more than just sender and receiver because other conspecific or heterospecific individuals could interfere with interchanged signals. This multiple player communication often happens in a communication network with several conspecific or heterospecific senders, rivals or exploiters that eavesdrop on signals (McGregor and Peake 2000; Bradbury and Vehrencamp 2011). This network context has been considered and studied in social group living animals and insects (Pinter-Wollman et al. 2014), but in sexual interactions, only emitter-receiver dyads have been usually contemplated (Virant-Doberlet et al. 2014).

With more than 2800 species the plant-dwelling stink bugs of the subfamily Pentatominae (Heteroptera: Pentatomidae) represent a smaller but economically important group of insects with well investigated biology, ecology, and feeding habits (Grazia et al. 2015). Mating behavior is characterized by multimodal communication with chemical (Borges and Blassioli-Moraes 2017) and vibratory (Čokl et al. 2017) signals. Male pheromone attracts mates to gather on the same plant (Borges et al. 1987) and triggers female calling by plant transmitted vibrational signals (Zgonik and Čokl 2014). Species and gender specific plant-transmitted signals have been described in more than 36 pentatomine species (Čokl et al. 2017) as result of recording emissions of one or two males placed together with a single female on a non-resonant substrate (usually loudspeaker membrane) or on a plant. Songs have been determined according to the mating behavioral context as calling, courtship, copulatory, repelling and rival songs. The latter were identified and described only for males competing to copulate with the same female (Čokl et al. 2000, 2011; Blassioli-Moraes et al. 2005; Bagwell et al. 2008).

Questions concerning rivalry or any vibratory interaction between females have not been investigated so far although aggregate distributions of males and females of different species have been observed on the same plant in the field (Higuchi 1992; Tillman et al. 2009; Panizzi 2013; Panizzi and Lucini 2016; Aquino 2016). We investigated vibratory interactions during reproductive behavior of three pentatomine species, *Chinavia impicticornis* (Stål 1872), *C. ubica* (Rolston 1983) and *Euschistus heros* (F. 1978) in a social environment where females compete to copulate with a male. Sympatric *C. impicticornis* and *C. ubica* mates feed and mate in the field on the same host plants (Panizzi et al. 2000) and recent investigation of their vibratory communication suggests that hybridisation between both species is prevented within the calling phase of mating behavior (Laumarn et al. 2016). *E. heros* females emit one type of the calling song signals (Blassioli-Moraes et al. 2005; Kavčič et al. 2013) that often overlap male vibratory responses. Interference significantly changes the temporal and frequency characteristics of masked vibrations (Čokl et al. 2015).

We hypothesized that females in a group, as males, compete to get access to males. Our prediction is that in competition situations females express rivalry by the exchange of vibratory rival signals and/or by physical interactions before or during courtship behavior. To confirm or reject this hypothesis we placed on a plant two or three

C. impicticornis, *C. ubica* or *E. heros* females with a single conspecific male, recorded their vibratory emissions and observed their behavior.

Methods

Insects, Plants and Growth Conditions

Experiments were conducted with at least 10 days old adults of *C. impicticornis*, *C. ubica* and *E. heros* from colonies maintained at the Laboratório de Semioquímicos of EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília (DF), Brazil. Insects were reared in acclimatized rooms (26 ± 1 °C, $65 \pm 10\%$ RH, photoperiod 06:00–20:00) in eight L transparent plastic containers and fed with a diet composed of water, offered in plastic pots with cotton wad, green bean pods (*Phaseolus vulgaris* L.), dry soybean seeds (*Glycine max* L.), sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.) and raw peanuts (*Arachis hypogaea* L.). The diet was replaced three times a week. Males and females were separated after imaginal moult and maintained in separated rooms until they have been used in experiments. Soybean plants were grown in green house in sterilized soil in 20 cm high and 15 cm diameter pots. Experiments were conducted on soybean plants of V3 stage (Fehr et al. 1971) with 16–27 high stem, two unifoliate (about 7×7 cm) and two trifoliate (about 6×8 cm) leaves. New fresh plants were used for each species and were changed every 5 to 10 tested groups.

Recording

All experiments were conducted in a sound insulated room during May and August 2016 between 08:00 and 16:30 h. Vibrational signals were registered by a portable digital laser vibrometer (PDV-100, Polytec GmbH, Waldbronn, Germany) from a reflective tape (diameter < 4 mm²) fixed on the stem (4 cm above the soil) of plants in pots placed on a shock-proof table. The laser beam was oriented perpendicularly to the stem. Laser recorded plant vibrations were digitized by a sound card (24-bit, 96-kHz, 100-dB signal-to-noise ratio, Sound Blaster Extigy, Creative Laboratories Inc., Milpitas, California, USA) and stored on a computer by the use of Cool Edit Pro 2.0 software (Syntrillium Software 2001 – Fort Wayne, Indiana, USA) for further analysis with Sound Forge, Version 6.0 (Sonic Foundry, Inc., Madison, California, USA) software.

Vibrational Signal Analysis

Songs produced by *C. impicticornis* and *C. ubica* are labelled according to terminology used by Laumann et al. (2016) as FS-1a or FS-1b for the first or the second type of female calling song pulse trains respectively, and as MS-1 or MS-2 for the male first and second song. *E. heros* female and male calling songs are labelled as FS-1 and MS-1 according to terminology used by Blassioli-Moraes et al. (2005). The newly recorded female rival song is labelled as FRS.

Songs were described by temporal and spectral characteristics of their basic units. Pulses are defined as unitary homogeneous parcels of vibration of finite duration (Broughton 1963) and constitute *E. heros* FS-1 song. The first and second type of

C. impicticornis and *C. ubica* FS-1 song are characterized by pulses grouped into distinct pulse trains. Pulses are described by their duration (the time between signal onset and end when their amplitude reached the noise level), repetition time (the time between onsets of two sequential signals) and interval (the time between two sequential signals). Pulse train duration is described as the time between the onset of the first and end of the last pulse, repetition time as the time between onsets of the first pulses of two sequential pulse trains and interval as the time between them. Signal frequency characteristics are described by their dominant frequency and frequency modulation (FM) measured from spectra and sonograms (FFT size 32,768, FFT overlap 99%, smoothing window Blackman-Harris, and display range 60–80 dB). FM is defined as upward or downward oriented frequency sweep and is expressed as the frequency difference measured at the signal onset and end divided by signal duration.

Experimental Design

Two or three females were placed on different leaves of a soybean plant and a conspecific male was added after they stopped moving. Each female or male was tested only once. Vibrational signals were recorded until the end of their emission. If no female calling songs were registered within 10 min we terminated the test and discarded insects of the group. Insects were monitored by direct observations and their behavior and vibratory signal emissions were registered in an electronic sheet considering the sequence of insects placed on a plant. Behavioral categories follow those described by Laumann et al. (2016) and are detailed in the Fig. 1.



Fig. 1 Sequence of courtship and mating behaviour of *C. impicticornis*, *C. ubica* and *E. heros* groups of females and a male. Values near lines represent the probability of transitions between behaviours. Solid-line arrows indicate the significant transitions ($P < 0.05$) and dashed-line arrows the non-significant transitions ($P > 0.05$). Boxes represent behavioural categories. C - Copula, c-FD - Copulated and non-copulated Female Duet, c-FDSR - Copulated Female Duet with alternated FRS and FS-1a or FS-1b signals, c-FRS - female rival song emitted by a non-copulated female in the presence of a copulated pair, c-RFD Female Duet Rivalry during copula, c-S - Female Solo calling in the presence of a copulated pair, FD - Female Duet, FDSR - Female Duet of alternated FRS with FS-1a or FS-1b signals, FF - Females Fight and aggression, FRD - Female Rivalry Duet with FRS signals, FRS - solo emission of FRS, FS1a - FS-1a, FS1b - FS-1b, G - Group singing, MFD - Male and Female Duet, MS - MS-1, RBS-NC - Reproductive Behavior Stopped, No Copulation observed, RFD - Rival Duet in *C. impicticornis* by alternated FS-1a and FS-1b signals, S - Female Solo calling in a group

Data Analysis

Data from 36 trials of *C. impicticornis*, 24 of *C. ubica* and 19 of *E. heros* behavioral sequences were used to create the first-order Markovian transition matrix of the total frequency of transitions (i.e. moving from one behavioral step to the next). The repetition of a single behavior (self-transition) was not included in the records to avoid the possible influence of the relative weight of transitions between behaviors. Transition probabilities were calculated from the observed frequency of a transition between two events divided by the total number of occurrences of the first event (Haccou and Meelis 1992). The expected values of each transition were obtained by multiplying the total values of each column and row of the respective transition and dividing by total number of transitions observed (grand total) and the statistical significance of the individual transitions was evaluated by G-test at 5% significance level. The results are shown graphically in ethograms.

Duetting *Chinavia* spp. females showed a clear one-to-one alternation of well-structured and synchronized FS-1a signals. Mean values of temporal (duration, repetition time and interval) and spectral (dominant frequency and FM) pulse train or pulses parameters were calculated and compared between individuals of the same group by paired *t*-test. To check if females of both species synchronize alternated signals in a similar way the differences of pulse train parameters between individuals of a pair in a sequence of 15 signals of 8 pairs were analysed between species by ANOVA repeatedly measures. In addition, the variation coefficient of the differences between individuals were calculated and compared by a *t*-test. Alternation of FS-1a/VS-1b or FS-1b/FS-1b signals is less regular, without longer lasting fully developed duets that does not allow relevant statistical analysis. Inter-individual comparison of female rival signal parameters of each species were conducted by the use of repeatedly measured ANOVA and generalized linear models with Poisson distribution for number of pulses/pulse train. All analyses were performed in R software version 3.1.2 (R Development Core Team 2011).

Results

Mating Behavior and Vibrational Interactions between Females and a Male

Ethograms of Fig. 1 show different steps (phases) of mating behavior and types of vibratory song emissions.

In both *Chinavia* species the presence of a male on a plant triggered conspecific females to emit the calling song (FS-1) constituted by pulse trains of the first (FS-1a) and second (FS-1b) type (Laumann et al. 2016). FS-1a was recorded as the first emission in 29 of 36 tests in *C. impicticornis* and in 22 of 24 tests in *C. ubica*.

FS-1a as the first female emission changes gradually to FS-1b in *C. impicticornis* and *C. ubica* (Fig. 2); only in one test with *C. ubica* the female started to call by pulse trains of the FS-1b type. MS-1 song was in both *Chinavia* species recorded as the response to the female calling. The female/male duets (MFD) induced courtship and copulatory behavior (C) or triggered the other female to enter singing in a group (G) (Fig. 1).

Female vibratory signal emissions produced during rivalry in a group differed in both *Chinavia* species. In *C. impicticornis* FS-1a emitted by one female induced female calling rivalry duets (RFD) (Figs. 1 and 2). Alternation with FS-1a and FS-1b signals silenced both the male and one of the rival females (S) and stopped the reproductive behavior (RBS-NC) (Fig. 1).

In *C. ubica* presence of the second female induced formation of a female FS-1 duet (FD) that evolved to insects singing in a group, including male signals (G) or to exchanging of different female signals (FDRS or FRD). Rivalry terminated with the

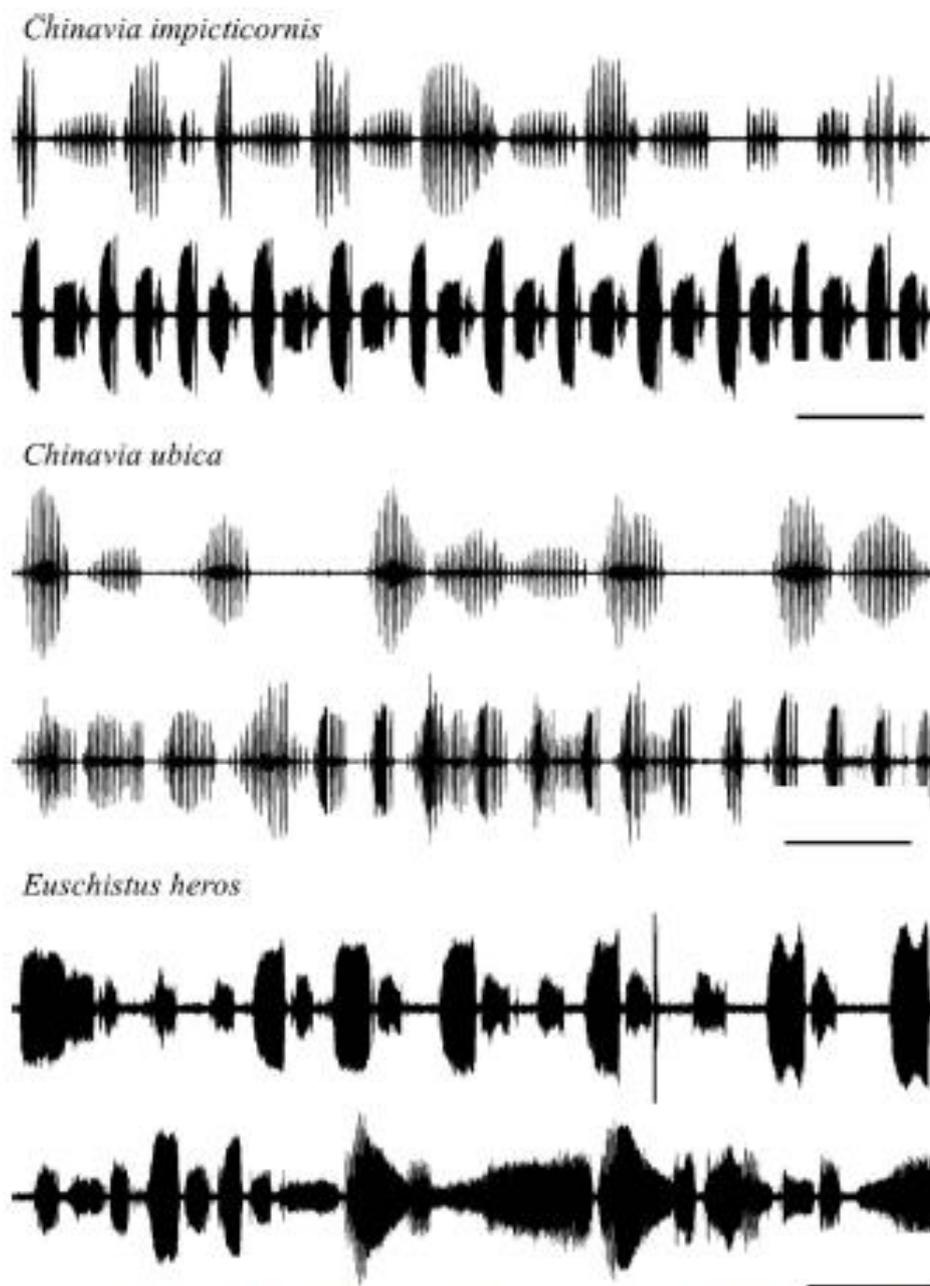


Fig. 2 Alternation of female calling signals in *C. impicticornis* (upper trace - FS-1a/FS-1a, lower trace - FS-1b/FS-1b), *C. ubica* (upper trace - FS-1a/FS-1a, lower trace - FS-1b/FS-1b) and in *E. heros* (upper trace - non overlapped FS-1 pulses, lower trace - partly overlapped alternated FS-1 with MS-1 signals). Horizontal lines indicate 5 s

emission of the rival song (FRS) with characteristic temporal and frequency structure (Figs. 1 and 2). The emission of FRS song silenced the rival female and the responding male. Consequently reproductive and copulatory behavior stopped (RBS-NC) (Fig. 1).

In *E. heros* vibratory interactions started with FS-1 emission in all observed groups. Compared to *Chinavia* species, *E. heros* females expressed less regular and strict pattern of rivalry (Fig. 1). Female calling induced male responses (MFD) and/or other female calling (FD) that all constituted singing in a group (G) (Fig. 1). Female calling duets either inhibited reproductive and copulatory behavior (RBS-NC) or induced FRS often emitted in a group (G) with the male (MFD).

Winning female usually copulated (C) after female/male duetting that followed rivalry. Copulation was observed in 15 pairs of 36 groups in *C. impicticornis* (41.67%), 13 pairs of 24 groups in *C. ubica* (54.17%) and in 15 pairs of 19 (78.94%) groups in *E. heros*.

The female rivalry was occasionally recorded also after a pair copulated. It was expressed as FS-1 alternations in *C. impicticornis* (8 females of a group in 15 mating pairs, C-FDR) and/or as FRS emissions (C-FRS) in *C. ubica* (3 females of a group in 13 mating pairs) and *E. heros* (4 females of a group in 15 mating pairs) (Fig. 1). In addition, after a pair started to copulate the other female sang either alone (c-S) (8 females in 13 matings in *C. ubica*, 4 females of 13 matings in *C. impicticornis*) or in a duet with copulated one (C-FD) (12 female duets in 15 matings in *E. heros*). In *C. impicticornis*, we observed female fight (FF) (Fig. 1) and physical attempt to separate the copulated pair (Online Resource ESM Videos 1, 2). If separation of copula by direct physical aggression succeeded, the aggressing female tried to push the other one out of the leaf and mating behavior was interrupted (RBS-NC) (Fig. 1).

Female Rivalry Interactions

In all three investigated species, female calling duets represent their first competitive interaction when on a plant with a single male (Fig. 2).

C. impicticornis female duets are expressed as synchronized alternations of FS-1a and/or FS-1b pulse trains. In fully developed analysed duets ($N=8$) are FS-1a pulse trains exchanged in one-to-one fashion (Fig. 2) by adaptation of pulse train duration to intervals between consecutive rival female signals. Comparison of pulse train parameters of alternated signals has shown significant differences of pulse train duration in most *C. impicticornis* evaluated pairs (62.5%) (Fig. 3).

Duetting with synchronized pulse trains terminated by one female that prolonged FS-1a pulse trains and disrupted them afterwards into a sequence of readily repeated pulses of different amplitudes that masked FS-1a pulse trains emitted by the other female (Fig. 4). Readily repeated FS-1a pulses either silenced the rival female or triggered her to change FS-1a to FS-1b type of pulse trains over various transitional forms (Fig. 4). FS-1b pulse trains inhibited emission of FS-1a signals and either silenced the rival female or triggered her to alternate with FS-1b pulse trains (Fig. 4). During female duetting, the male was silent until the “winning” female inhibited signalling of the rival one and produced again regular FS-1a pulse trains.

Simultaneously calling *C. ubica* females, like *C. impicticornis*, avoided FS-1a pulse train overlapping by adjusting their emission to intervals between consecutive signals produced by the duetting female (Fig. 2); in this case no significant temporal

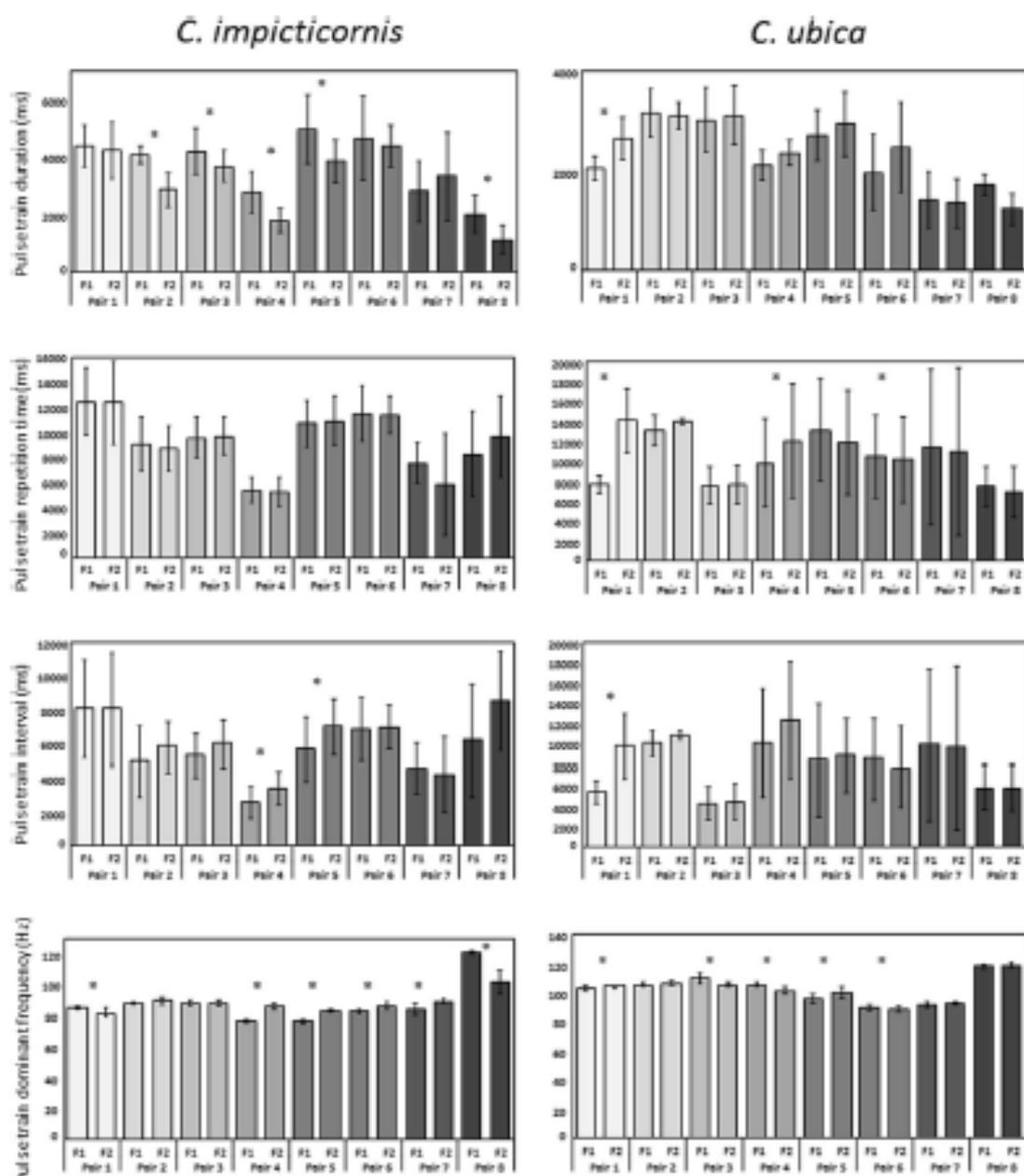


Fig. 3 Mean (\pm SD) values of pulse train duration, repetition time, interval and dominant frequency parameters of *C. impicticornis* and *C. ubica* alternated FS-1a signals emitted. * indicates significant differences of parameters between females of the same pair (paired *t*-test $P < 0.05$), F1 - female 1 of a pair, F2 - female 2 of the same pair

differences were observed in signals emitted by the females of the same pair (Fig. 3). Along alternation with FS-1a signals one female changed pulse trains from FS-1a to FS-1b type that either silenced the rival female (Fig. 2) or triggered her to emit the female rival song (FRS) (see below).

Significant differences of the mean dominant frequency were measured for alternated signals of the same pair in both species (Fig. 3).

Best structuration and less variability in the alternation of FS-1a signals were observed in *C. impicticornis* female interactions. Mean differences in pulse train duration and dominant frequency between individuals of the same pair were higher

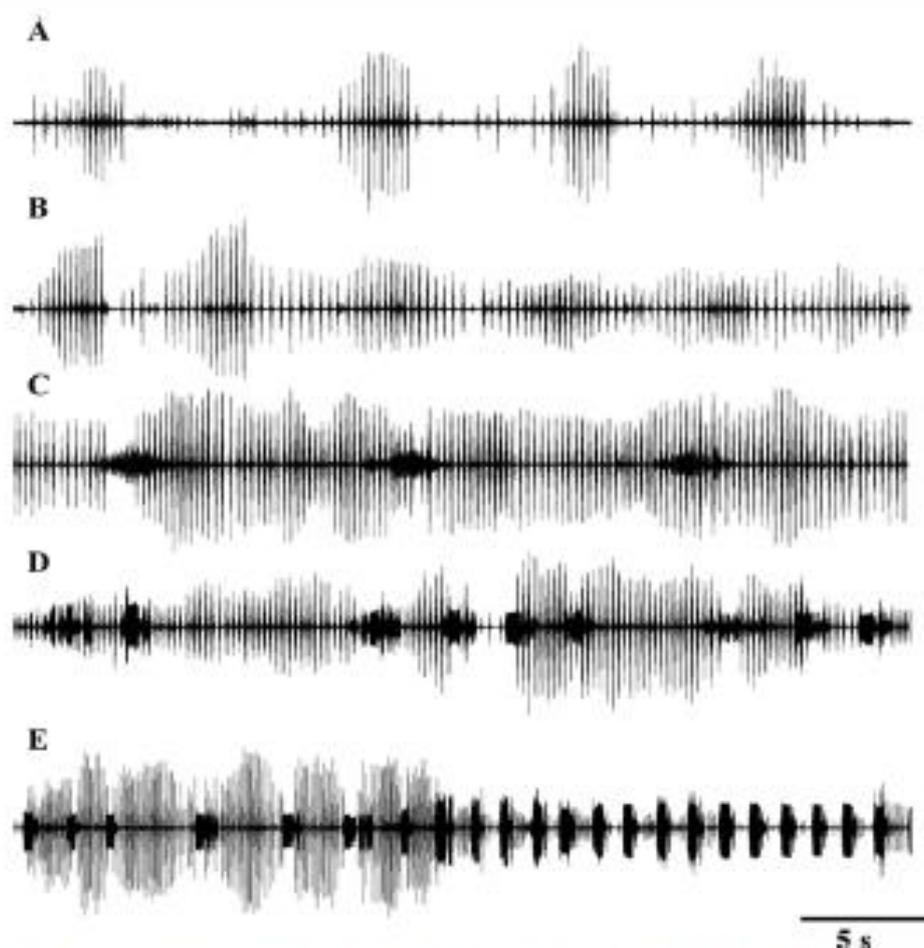


Fig. 4 Evolution of *C. impicticornis* FS-1 emissions in a female-female duet. (A) Readily repeated FS-1a pulse trains, (B) Sequence of single FS-1a pulses overlapping FS-1a pulse trains of the other female, (C, D) transition of FS-1a to FS-1b pulse train type, (E) inhibition of FS-1a pulses by readily repeated FS-1b pulse trains

in *C. impicticornis* than in *C. ubica* (repeated measures ANOVA, $F_{1-186} = 4.413$, $P = 0.037$ and $F_{1-177} = 6.658$, $P = 0.011$) (Fig. 5). On the other hand, mean difference in repetition time of pulse train between individuals of the same pair were higher in *C. ubica* (repeated measures ANOVA, $F_{1-186} = 5.826$, $P = 0.017$) (Figs. 2 and 5). No significant differences were found in mean differences of pulse train intervals between the species (repeated measures ANOVA, $F_{1-186} = 3.24$, $P = 0.0747$) (Fig. 5). Analyses of variability of emission expressed by variation coefficients of signal parameters showed higher variability of repetition time and intervals between pulses trains in *C. ubica* (Fig. 5).

Males of both *Chinavia* species were silent during female vibratory interactions and responded only to FS-1a or FS-1b calls of the “winning” female (Fig. 1).

Synchronization of FS-1 pulses emitted by simultaneously calling *E. heros* females was less regular and within the same sequence signals often overlapped each other (Fig. 6). Female duetting did not inhibit male responses that often masked overlapped female calls and gave rise to vibratory complexes in which interference caused significant modification of input signal patterns (Fig. 6). Their spectral and temporal characteristics were furthermore changed by increased signal duration and frequency modification of masked emissions as reaction to avoid or minimize distortion of their

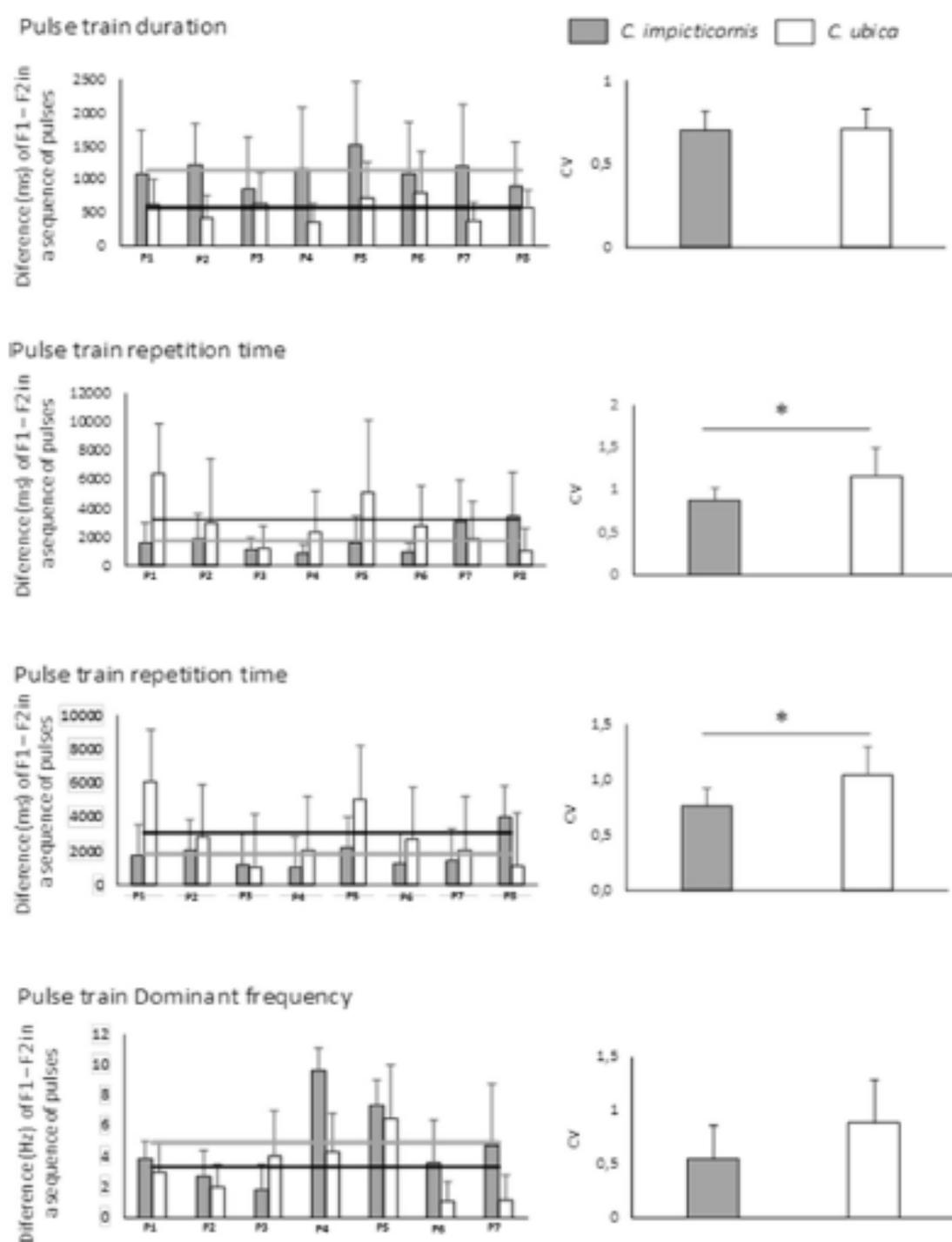


Fig. 5 Mean differences of temporal and spectral parameters of alternated FS-1 pulse trains emitted by two females (F1 and F2) in a sequence of 15 signals (left) and mean coefficient of variation (CV) of these variables (right). Bars indicate mean values, vertical lines above bars indicate SD and horizontal lines indicate mean values of differences between pairs for *C. impicticornis* (grey) and *C. ubica* (black). * indicates significant differences in CV (t -test $P < 0.05$). For dominant frequency, only seven pairs of females were considered because in each species these values showed discrepant values (outliers) related to the other pairs

signals (Fig. 6). Because of overlapped signals we were not able to measure exactly temporal or spectral parameters of each individual signal emitted in the group with other female and the male.

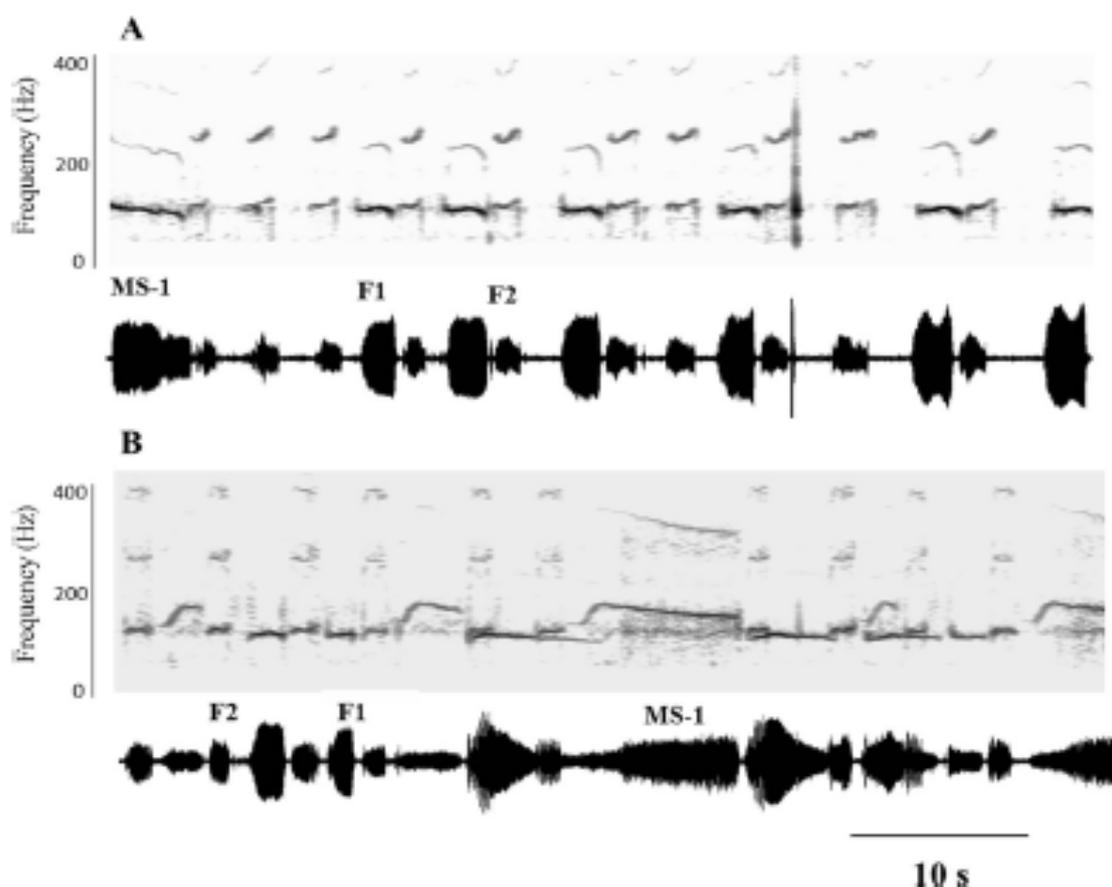


Fig. 6 Sonogram (upper trace) and oscillogram (lower trace) of *E. heros* female alternation with (A) non-masked and (B) partly masked FS-1 signals by male MS-1 responses. F1- female 1, F2 - female 2

Female Rival Song

Different from *C. impicticornis* that rivalry is expressed by female duets, *C. ubica* and *E. heros* females emit rival song (FRS) of characteristic and specific structure. The FRS of both species is characterized by frequency-modulated pulses grouped into irregularly repeated pulse trains of different duration that varies significantly among individuals (Table 1, Fig. 7).

FRS pulse trains produced by one of *C. ubica* duetting females inhibited the rival female emission of FS-1a or FS-1b pulse trains and triggered her to respond with FRS to form the rival duet (Fig. 7). Analyses of FRS temporal characteristics measured in three different *C. ubica* females have shown that pulse train duration increases linearly with increasing number of pulses (Online Resource ESM Fig. 1a). FRS pulse train duration values ranged between 5 (4 pulses/pulse train) and 57 s (34 pulses/pulse train) with majority of them shorter than 20 s (less than 20 pulses/pulse train). Pulse duration differs within the same pulse train and their distribution ($N=928$) shows peaks between 700 and 1100 ms with shortest single values below 300 and longest above 3000 ms (Online Resource ESM Fig. 1b). Values of intervals between pulse train pulses exhibit uniform distribution between 50 and 400 ms with peak around 200 ms (Online Resource ESM Fig. 1c). Mean inter-pulse duration values varied significantly (One-way ANOVA, $F_{13,859} = 4.911, P < 0.001$) between

Table 1 Temporal and spectral parameters (mean \pm SD) of *Chinavia ubica* and *Euschistus heros* female rivalry songs

| Signal parameter | <i>Chinavia ubica</i> | <i>Euschistus heros</i> |
|-------------------------|---|--|
| <i>Pulse train</i> | | |
| Duration (ms) | 13,222.64 \pm 9483.93 ($F_{1,5-96} = 0.59$ $P = 0.87$) | 12,890.75 \pm 5284.50 ($F_{1,8} = 0.08$ $P = 0.78$) |
| Pulses/pulse train | 11.34 \pm 6.40 ($\chi^2_{17} = 70.77$ $P < 0.001$) | 11.92 \pm 4.03 ($\chi^2_1 = 0.06$ $P = 0.81$) |
| Dominant frequency (Hz) | 101.93 \pm 9.42 ($F_{1,5-96} = 17.59$ $P < 0.001$) | 122.33 \pm 10.68 ($F_{1,8} = 13.68$ $P < 0.006$) |
| <i>Pulse</i> | | |
| Duration (ms) | 964.81 \pm 324.67 ($F_{1,7-892} = 6.74$ $P < 0.001$) | 848.45 \pm 278.99 ($F_{1,137} = 14.03$ $P < 0.001$) |
| Repetition time (ms) | 1195.61 \pm 352.48 ($F_{1,7-892} = 6.43$ $P < 0.001$) | 1000.05 \pm 215.60 ($F_{1,137} = 0.012$ $P = 0.91$) |
| Interval (ms) | 179.78 \pm 74.10 ($F_{1,7-892} = 5.85$ $P < 0.001$) | 259.42 \pm 111.44 ($F_{1,137} = 8.32$ $P = 0.0045$) |
| Dominant Frequency (Hz) | 122.44 \pm 45.66 ($F_{1,7-892} = 6.80$ $P < 0.001$) | 116.43 \pm 12.01 ($F_{1,137} = 126.5$ $P < 0.001$) |

Means were calculated from 16 individuals and 141 pulse trains and 18 individuals and 928 pulses for *Chinavia ubica* female rivalry songs and 2 individuals, 12 pulse trains and 141 pulses for *Euschistus heros* female rivalry songs. Differences between individuals of each species were calculated by repeated measures ANOVA and GLM with Poisson distribution for number of pulses/pulse train

minimal and maximal values at 138 ± 83.7 ($N = 14$) and 234.3 ± 114.7 ($N = 78$) ms respectively.

The dominant frequency of 948 analyzed pulses of *C. ubica* FRS was distributed between 72 and 117 Hz (Online Resource ESM Fig. 1d). Mean pulse dominant frequencies varied in FRS signals ($N = 11$) between minimal and maximal values at 87.1 ± 6.5 ($N = 16$) and 114.1 ± 2.0 ($N = 89$) Hz, respectively. FRS pulses show characteristic downward oriented frequency modulation sweep (Fig. 7) distributed within two distinct groups in pulses shorter than 1500 ms (Online Resource ESM Fig. 1e). Frequency decay of the first group (Fig. S1E) ranges between 10 and 55 Hz/100 ms for pulses of upper frequency between 109.4 ± 2.3 ($N = 32$) and 123 ± 2.8 ($N = 57$) Hz, and that of the second group (Fig. S1E) ranges below 10 Hz/100 ms for pulses with upper frequency between 91.54 ± 1.44 ($N = 24$) and 101.5 ± 2.66 ($N = 28$).

FRS signals emitted by *E. heros* differ significantly from FS-1 and MS-1 pulses by their temporal characteristics as well as by FM downward oriented frequency sweep (Fig. 7, Table 1). Pulse train duration varied between individuals (Table 1) and according to the number of pulses per pulse train between minimal and maximal single values at 5851 (5 pulses/pulse train) and 17,809 ms (16 pulses/pulse train) respectively. Pulse duration, interval and dominant frequency means differ significantly between individuals of two analysed groups contrary to pulse repetition time that was not significantly different for all pulses. *E. heros* FRS pulses show characteristic FM with downward oriented frequency sweep from values around 127 to 103 Hz in the first

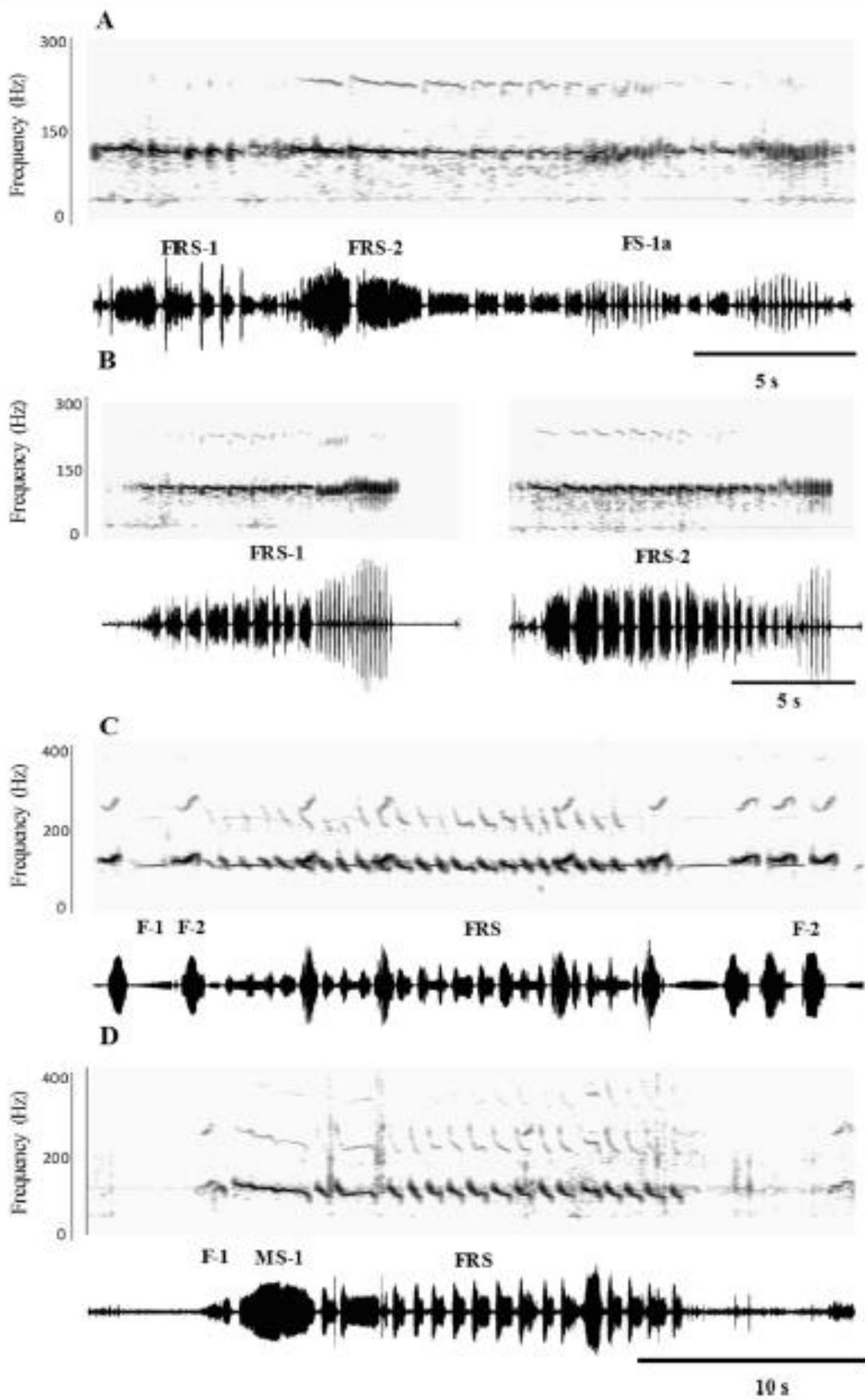


Fig. 7 Sonogram (upper trace) and oscillogram (lower trace) of *C. ubica* (A, B) and *E. heros* (C, D) female rival song (FRS) shown at different time scales. (A) Sequence of FRS pulse train duet with FS-1a emitted by the third female on a plant. (B) Two examples of FRS pulse trains, (C) and (D) *E. heros* FRS pulse trains connected with FS-1/MS-1 (C) and FS-1/FS-1 duets (D)

group and from 165 to 129 Hz in the second group showing mean sweep value of 4.6 and 4.3 Hz/100 ms respectively.

Discussion

In contrast to vertebrates, vibratory communication networks have been less studied in insects. Most investigations have been focused on group living species (Cocroft and Hamel 2010) and on interactions between males in a group during reproductive behavior (Virant-Doberlet et al. 2014).

Comparative studies of communication in the calling phase of mating behavior, conducted in more than 36 stink bug species point out several exceptions and various opened questions about the basic pattern of information exchange. Spontaneous calling of a single male on a plant was recorded for example in *Thyanta perditor* (Fabricius 1794) (Blassioli-Moraes et al. 2005), *Nezara viridula* (Linnaeus 1758) (Zgonik and Čokl 2014) and *Chlorochroa uhleri* (Stål 1872) (Bagwell et al. 2008). The role of the second type of the female calling song has not been clarified yet in *N. viridula* (Čokl et al. 2000) and species like *Dichelops melacanthus* (Dallas 1851) Blassioli-Moraes et al. 2014), *C. impicticornis* and *C. ubica* (Laumann et al. 2016). In *Edessa mediatibunda* (Fabricius, 1794) for example starts the calling phase of mating behavior by emission of the first male song (MS1) and female responses are triggered by the male second song (MS2) emitted during courtship (Silva et al. 2012). Finally, female songs have not been recorded in several stinkbug species (Gogala and Razpotnik 1974; Shestakov 2015). Most investigations of communication between a single female and male were conducted using standardized protocol that enabled comparison of signals between different species, but ignored communication between conspecific individuals in a group.

The female calling song as highly autonomous and stable sequence of readily repeated uniform signals emitted from one place on a plant mediates among others information on the directionality of male movement to the female (Virant-Doberlet et al. 2006). To avoid signal overlapping males of species like *N. viridula* (Čokl et al. 2000), *C. impicticornis*, *C. ubica* (Laumann et al. 2016) respond to the calling female with vibratory signals emitted within interval between two consecutive female calls, that enables formation of well coordinated duets. On the other hand, masked female and male vibratory emissions have been recorded in *D. melacanthus* (Blassioli-Moraes et al. 2014) and different mechanisms to minimize consequences of interference occurring as consequence of overlapped vibrations have been described in *E. heros* (Čokl et al. 2015).

Our results bring several responses to above mentioned opened questions. Here we demonstrated as first among Pentatomidae, that (1) a male triggers simultaneous emission of the calling song in several females, (2) females synchronize calling signals in the coordinated one-to-one alternation pattern and, (3) female rivalry runs by

exchange of different types of calling song signals that includes modification of song temporal characteristics and emission of the rival song.

Synchronization of calling emissions could have several advantages as enhancing group detection or confusing predators (McGregor and Peake 2000). Notwithstanding, to reach this conclusion it is necessary to clearly demonstrate that females in synchronized choruses give some advantage (Greenfield 1994). The evolution of duets with synchronized calling signals of different temporal and frequency characteristics suggests direct female rivalry interactions of studied model stink bug species.

Rivalry interactions with vibrational signals have been until now described in male-male interactions. However, Percy and Day (2005) described alternation of female calling in the leafhoppers (Hemiptera: Cicadellidae) *Stenocotis depressa* (Walker) and *Austrolopa brunensis* Evans being similar to the one shown in our study for stinkbugs females.

The repertory of stinkbug female rivalry interactions observed as synchronized signalling, exchange of different types of calling song signals and emission of the female rival song is more complex than the one reported for male/male stink bug interactions. In the latter interactions, males express rivalry only by exchanging of rival song pulses in a-b-a-b sequence (Čokl et al. 2000, 2011; Blassioli-Moraes et al. 2005; Bagwell et al. 2008).

All described female rivalry interactions are included in the pattern of network interactions in sexual vibratory communication of arthropods. The stink bug rivalry communication is similar to the one described for male interactions of others taxa. In a review, Virant-Doberlet et al. (2014) identified at least one of such responses in male-male interactions in Crustacea, Araneae, and Insecta. In insects, such interactions have been observed principally in Hemiptera (Cercopidae, Cicadellidae, Membracidae, Delphacidae and Flatidae) and Diptera (Chloropidae and Cypselosomatidae).

Synchronization of alternated calling song signals is best expressed in duetting *C. impicticornis* females because of constant differences in repetition time between both females. The better-structured female duets in *C. impicticornis* could be related to the absence of the specific rival song. Simultaneous female calling inhibits male responding in *C. impicticornis* and *C. ubica* but not in *E. heros*; in the latter species male responses often overlap alternated female calling signals and mates singing in a group need to contrast their emissions by modification of their temporal and spectral characteristics. The relevance of these modifications depends on the potential of the sensory system to code and process temporal and FM changes within the complex vibrational signal. Studies concerning this problem have not been conducted yet at sensory and underlying neuronal network level. We hypothesize that phase coupled response pattern of low frequency vibratory receptor neurons described in the model species *N. viridula* (Čokl 1983; Čokl et al. 2006; Zorović et al. 2008; Zorović 2011) enables precise frequency discrimination in the frequency range characteristic for stinkbug vibratory communication signals.

Further evolution of female rivalry differs in the three studied species. *C. impicticornis* females display rivalry by transition from one to another type of the calling song that at different stages silences the competing one. The rivalry between *C. ubica* females differs by the emission of the rival song that replaces duets with the second type of the calling song. FRS duets carry basic characteristics of male one-to-one exchange of rival song signals described in several stink bug species (Čokl et al. 2017). Males of both species are silent during conspecific female rivalry to avoid overlapping synchronized emissions by

long responses produced within short intervals between female duetting signals. Female rivalry expressed in *E. heros* by FS-1 duets and emission of the FRS seems to be less effective because it does not silence other female or male singing as described in both *Chinavia* species. The vibratory communication interplay between females and the male are further complicated by overlapping of signals with similar frequency characteristics that lead to interference and reactions to minimize its effects as change in time parameters and increase the frequency difference between signals by changing the frequency level and the frequency modulation pattern (Čokl et al. 2015). Vibrational communication of grouped *E. heros* females and males needs further investigation to understand better the role and evolution of species signals within different behavioral contexts.

Compared with *Chinavia* species female/male pairs (Laumann et al. 2016) we observed a reduction of matings in grouped individuals as result of described rivalry interactions. Copulation was observed in 41.67% in *C. impicticornis* and in 54.17% in *C. ubica* groups. Laumann et al. (2016) reported successful copulations in 81.25% of *C. impicticornis* and 76.0% of *C. ubica* observed couples. On the other hand, it appears that females/male group interactions do not significantly decrease or inhibit copulation in *E. heros*: copulation was observed in 78.94% of the groups and in 85.0% in single female/male couples (data not published).

Differences between species suggest differential evolution of communication systems in stink bugs of different clades that leads to different adaptation to communicate in network conditions. Group singing *Chinavia* females clearly show disruptive interference during mating behavior with characteristically expressed rivalry. On the other hand, it seems that *E. heros* females are less affected by rivalry interactions. This could be related to the efficient response mechanisms to avoid or minimize the interference effect of overlapped signals (Čokl et al. 2015). This adaptive effect may have ecological consequences and could help to explain high population levels of *E. heros* in agricultural areas and their often observed aggregations on the same and/or neighbouring plants (Higuchi 1992; Panizzi and Lucini 2016; Aquino 2016). In contrast, *Chinavia* spp. are usually found at low population densities in natural and agroecosystems (Panizzi et al. 2000; Panizzi and Lucini 2016).

Results of the present study explain the role of different types of the female calling song signals. In both *Chinavia* species, FS-1b pulse trains represent emission at higher level of the courtship phase (Laumann et al. 2016) and play an important role in female rivalry. Rivalry function of the second female song can be expected also in other species. In the red-banded stink bug *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) the second female song was recorded in females staying alone or together with another female on a loudspeaker membrane (Blassioli-Moraes et al. 2005). In red-shouldered stinkbug *T. perditor* were long FS-2 pulses recorded only by females in the absence of a male (Blassioli-Moraes et al. 2005) and in *N. viridula* the second type of the female calling song pulse trains were recorded only occasionally in a female male couple without explanation of their role (Čokl et al. 2000).

In conclusion, the present study gives a new insight into the early phase of stink bug communication in natural conditions where we can expect chemical and vibratory interactions between numerous conspecific and alien species males and females. Our results on rivalry behavior and communication between females open the question on the role of until now mostly ignored signals with intermediate temporal and spectral characteristics. Finally, we need more information on the calling function of plant-

borne chemical signals, like footprints, that may replace calling function of female vibratory emissions lacking in some stinkbug species.

Acknowledgements Thanks go to Maycon Vinicius Laia Aquino for help with insect rearing. The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) supports M. Borges, M.C. B. Moraes and R. Laumann with productivity grants. The Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA) and The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) support long-term research at Semiochemicals Laboratory with grants. This work was supported by the Research Support Foundation of the Federal District (FAP-DF, Project 193.000.978/2015) and the Slovenian National Research Agency (Research Program No. P1-0255). Aline Moreira Dias received financial support through a grant from the Coordination of Superior Level Staff Improving (CAPES).

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Aquino MFS (2016) Interações de percevejos e parasitoides de adultos no sistema de cultura da Soja. Dissertation, Universidade de Brasília
- Bagwell GJ, Čokl A, Millar JG (2008) Characterization and comparison of substrate-borne vibrational signals of *Chlorochroa uhleri*, *Chlorochroa ligata* and *Chlorochroa sayi* (Heteroptera: Pentatomidae). *Ann Entomol Soc Am* 101:235–246
- Blassioli-Moraes MC, Laumann RA, Čokl A, Borges M (2005) Vibratory signals of four Neotropical bug species. *Physiol Entomol* 30:175–188
- Blassioli-Moraes MC, Magalhaes DM, Čokl A, Laumann RA, da Silva JP, Silva CCA, Borges M (2014) Vibrational communication and mating behaviour of *Dichelops melacanthus* (Hemiptera: Pentatomidae) recorded from loudspeaker membranes and plants. *Physiol Entomol* 39:1–11
- Borges M, Blassioli-Moraes MC (2017) The semiochemistry of Pentatomidae. In: Čokl A, Borges M (eds) Stink bugs biorational control based on communication processes. CRC Press, Boca Raton, pp 95–124
- Borges M, Jepson P, Howse P (1987) Long-range mate location and close-range courtship behaviour of the green stink bug, *Nezara viridula* and its mediation by sex pheromones. *Entomol Rev* 44:205–212
- Brdbury JW, Vehrencamp SL (2011) Principles of animal communication, 2nd edn. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland
- Broughton WB (1963) Methods in bio-acoustic terminology. In: Busnel RG (ed) Acoustic behaviour of animals. Elsevier Publishing Company, Amsterdam London New York, pp 3–24
- Cocroft RB, Hamel JA (2010) Vibrational communication in the “other” social insects: a diversity of ecology, signals and signal function. In: O’Connell-Rodwell CE (ed) vibrational communication in animals. Transworld research network, Kerala, pp 47–68
- Čokl A (1983) Functional properties of vibroreceptors in the legs of *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae). *J Comp Physiol A* 150:261–269
- Čokl A, Virant-Doberlet M, Striž N (2000) Structure and function of songs emitted by southern green stink bugs from Brazil, Florida, Italy and Slovenia. *Physiol Entomol* 25:1–10
- Čokl A, Virant-Doberlet M, Zorović M (2006) Sense organs involved in vibratory communication in bugs. In: Drosopoulos E, Claridge MF (eds) Insect sounds and communication. CRC Press, Boca Raton London New York, pp 71–80
- Čokl A, Žunič A, Virant-Doberlet M (2011) Predatory bug *Picromerus bidens* communicates at different frequency levels. *Central Eur. J Biol* 6:431–439
- Čokl A, Laumann RA, Žunič-Kosi A, Blassioli-Moraes MC, Virant-Doberlet M, Borges M (2015) Interference of overlapping insect vibratory communication signals: an *Euschistus heros* model. *PLoS One* 10:1–16

- Čokl A, Laumann RA, Stritih N (2017) Substrate-borne vibratory communication. In: Čokl A, Borges M (eds) Stink bugs: biomimetic control based on communication processes. CRC Press, Boca Raton, pp 125–164
- Fehr WR, Caviness CE, Burmood DT, Pennington JS (1971) Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Sci* 11:929–931
- Gogala M, Razpotnik R (1974) Methods of oscillographic analysis for research in bioacoustics. *Biološki vestnik* 22:209–216
- Grazia J, Panizzi AR, Greve C, Schwertner CF, Campos LA, Garbelotto TA, Fernandes JAM (2015) Stink bugs (Pentatomidae). In: Panizzi AR, Grazia J (eds) True bugs (Heteroptera) of the Neotropics. Springer, Dordrecht, pp 681–756
- Greenfield MD (1994) Synchronous and alternating choruses in insects and anurans: common mechanisms and diverse functions. *Am Zool* 34:605–615
- Haccou P, Meelis E (1992) Statistical analysis of behavioural data: an approach based on time-structured models. Oxford University Press, Oxford
- Higuchi H (1992) Population prevalence of occurrence and spatial distribution of *Piezodorus hybneri* adults (Heteroptera: Pentatomidae) on soybeans. *Appl Entomol Zool* 27:363–369
- Kavčič A, Čokl A, Laumann RA, Blassioli-Moraes MC, Borges M (2013) Tremulatory and abdomen vibration signals enable communication through air in the stink bug *Euschistus heros*. *PLoS One* 8:1–10
- Laumann RA, Čokl A, Blassioli-Moraes MC, Borges M (2016) Vibratory communication and its relevance to reproductive isolation in two sympatric species (Hemiptera: Pentatomidae: Pentatominae). *J Insect Behav* 29:643–665
- McGregor PK, Peake TM (2000) Communication networks: social environments for receiving and signalling behaviour. *Acta Ethol* 2:71–81
- Panizzi AR (2013) History and contemporary perspectives of the integrated pest management of soybean in Brazil. *Neotrop Entomol* 42:119–127
- Panizzi AR, Lucini T (2016) What happened to *Nezara viridula* (L.) in the Americas? Possible reasons to explain populations decline. *Neotrop Entomol* 45:619–628
- Panizzi AR, McPherson JE, James DG, Javahery M, McPherson RM (2000) Stink bugs (Pentatomidae). In: Schaefer CW, Panizzi AR (eds) Heteroptera of economic importance. CRC Press, Boca Raton, pp 421–474
- Percy DM, Day MF (2005) Observations of unusual acoustic behaviour in two Australian leafhoppers (Hemiptera: Cicadellidae). *J Nat Hist* 39:3407–3417
- Pinter-Wolman N, Hobson EA, Smith JE, Edelman AJ, Shizuka D, de Silva S, Waters JS, Prager SD, Sasaki T, Wittemyer G, Fewell J, McDonald DB (2014) The dynamics of animal social networks: analytical, conceptual, and theoretical advances. *Behav Ecol* 25:242–255
- R Development Core Team (2011) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org/>, Vienna
- Shestakov LS (2015) A comparative analysis of vibrational signals in 16 sympatric species (Pentatomidae, Heteroptera). *Entomol Rev* 95:310–325
- Silva ACA, Laumann RA, Ferreira JBC, Blassioli-Moraes MC, Borges M, Čokl A (2012) Reproductive biology, mating behaviour and vibratory communication of the brown-winged stink bug, *Edessa mediatubosa* (Fabr.) (Heteroptera: Pentatomidae). *Psyche* 2012:1–9
- Tillman PG, Northfield TD, Mizell RF, Riddle TC (2009) Spatiotemporal patterns and dispersal of stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae) in peanut-cotton farmscapes. *Env Entomol* 38:1038–1052
- Virant-Doberlet M, Čokl A, Zorović M (2006) Use of substrate vibrations for orientation: from behaviour to physiology. In: Drosopoulos S, Claridge MF (eds) Insect sounds and communication. CRC Press, Boca Raton, pp 81–97
- Virant-Doberlet M, Mazzoni V, De Groot M, Poljšnar J, Lucchi A, Symondson WOC, Čokl A (2014) Vibrational communication networks: eavesdropping and biotic noise. In: Cocroft R, Gogala M, PSM H, Wessel A (eds) (2014) studying vibrational communication. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 93–123
- Zgonik V, Čokl A (2014) The role of signals of different modalities in initiating vibratory communication in *Nezara viridula*. *Central Eur. J Biol* 9:200–211
- Zorović M (2011) Temporal processing of vibratory communication signals at the level of ascending interneurons in *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). *PLoS One* 6:1–8
- Zorović M, Prešern J, Čokl A (2008) Morphology and physiology of vibratory interneurons in the thorsic ganglia of the southern green stinkbug *Nezara viridula* (L.) *J Comp Neurol* 508:365–381

Article

Inhibitory Copulation Effect of Vibrational Rival Female Signals of Three Stink Bug Species as a Tool for Mating Disruption

Aline Moreira Dias ¹, Miguel Borges ², Maria Carolina Blassioli Moraes ², Matheus Lorrán Figueira Coelho ², Andrej Čokl ³ and Raúl Alberto Laumann ^{2*}

¹ Zoology Post-Graduation Program, Institute of Biology, University of Brasília, Brasília 70910-900, Brazil; linem.dias@gmail.com

² Semiochemicals Laboratory, Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília 70770-917, Brazil; miguel.borges@embrapa.br (M.B.); carolina.blassioli@embrapa.br (M.C.B.M.); matheuslorran8856@gmail.com (M.L.F.C.)

³ Department of Organisms and Ecosystems Research, National Institute of Biology, Ljubljana 1000, Slovenia; andrej.cokl@inbi.si

* Correspondence: raul.laumann@embrapa.br

Citation: Moreira, D.A.; Borges, M.; Blassioli Moraes, M.C.; Lorrán Figueira Coelho, M.; Čokl, A.; Laumann, R.A. Inhibitory Copulation Effect of Vibrational Rival Female Signals of Three Stink Bug Species as a Tool for Mating Disruption. *Insects* **2021**, *12*, 177. <https://doi.org/10.3390/insects12020177>

Academic Editor: Monique M. Van Oers

Received: 21 December 2020

Accepted: 14 February 2021

Published: 18 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: In this work, we investigated the effects of conspecific female rival signals in vibratory communication and mating behavior of three species of stink bugs. In the presence of rival female signals, as noisy background vibrations, couples (a male and a female) of the three species showed negative effects in their sexual vibratory communication that resulted in reduced mating and copulation in relation to pairs not exposed to rival signals. The results suggest that female rival signals could be used to disrupt mating and may be a tool for stink bug management by reducing their population increase.

Abstract: Stink bugs are major pests in diverse crops around the world. Pest management strategies based on insect behavioral manipulation could help to develop biorational management strategies of stink bugs. Insect mating disruption using vibratory signals is an approach with high potential for pest management. The objective of this work was to investigate the effect of conspecific female rival signals on the mating behavior and copulation of three stink bug species to establish their potential for mating disruption. Previously recorded female rival signals were played back to bean plants where pairs of the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, and two green stink bugs, *Chinavia ubica* and *Chinavia impicticornis* were placed. Vibratory communication and mating behavior were recorded for each pair throughout the experimental time (20 min). Female rival signals show a disrupting effect on the reproductive behavior of three conspecific investigated stink bug species. This effect was more clearly expressed in *E. heros* and *C. ubica* than in *C. impicticornis*. The likelihood of copulating in pairs placed on control plants, without rival signals, increased 29.41 times in *E. heros*, 4.6 times in *C. ubica* and 1.71 times in *C. impicticornis*. However, in the last case, the effect of female rivalry signals in copulation was not significant. The effect of mating disruption of female rival signals of the three stink bug species may originate from the observed reduction in specific vibratory communication signals emitted, which influences the duet formation and further development of different phases of mating behavior. Our results suggest that female rival signals have potential for application in manipulation and disruption of mating behavior of stink bugs. Further work needs to focus on the effects of female rival signals used in long duration experiments and also their interactions with chemical communication of stink bugs.

Keywords: biotremology; behavior manipulation; population control; pest management

1. Introduction

Communication using substrate-borne vibrations is common in many insect species, particularly those that live on plants [1]. Among other tasks, substrate-borne vibratory signals enable mate recognition and location on continuous substrate [2].

Plant-dwelling stink bugs communicate during reproductive behavior predominantly by chemical [3] and substrate-borne vibratory signals [2]. In these insects, the male pheromone attracts females [4] to land on the same plant, and there it triggers the female to produce vibratory signals that attract males to search for and approach the calling female. Duetting with calling-song signals changes at close distance to mutual emission of the courtship song. Close-range mechanical and visual interactions are the complementary source of information that leads to copulation [2]. In general, stink bug vibratory signals are classified by their specific function in the mating behavioral context, as calling, courtship, copulatory, repelling and rival songs [5]. Their species and gender specificity are expressed by temporal (duration, repetition time) and spectral (dominant frequency, amplitude (AM) and frequency (FM) modulation) characteristics of pulses and pulse trains [2]. The basic repertory of stink bug vibratory signals is produced by vibration of abdomen [2]. Signals produced by tremulation of the whole body, percussion and vibration of lifted wings have been described in the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) [6]; the role of these signals has not been described yet.

Male rival signals have been described in several stink bug species when a group of males competed for access to copulation with the same female [5,7–9]. Rivalry between females has been described among Pentatomidae in *E. heros*, two green Neotropical stink bugs *Chinavia ubica* (Rolston, 1983) and *Chinavia impicticornis* (Stål, 1872) [10] and in the southern green stink bug, *Nezara viridula* (L., 1758) [11].

Male rivalry interactions are usually characterized by a sequence of alternated short pulses between the competing males. In general, the duration of male rivalry interactions is short (several seconds) and it ends when one of the males is silenced by the competitor [5].

Rivalry in females starts by the exchange of calling song signals. In *E. heros* and *C. ubica* the exchange of these signals stimulates the emission of a specific rival song by one of the competing females that silences the other in *C. ubica* but not in *E. heros*. On the other hand, rivalry in *C. impicticornis* is expressed by the evolution of synchronized exchange of the first type calling song pulse trains (FS-1a) to the emission by a female of the second type of calling song (FS-1b) or to a sequence of readily repeated single pulses that silence the other female [10]. Rivalry interactions are complemented, in some cases, in both investigated *Chinavia* species with physical aggression between individuals [10]. More complex rival interactions have been described for *N. viridula* [12]. In this species, the presence of a male in a group of females triggers rival interactions that start with female calling songs alternation with pulses that occasionally overlap each other. In this phase of interaction, the leader female maintains more or less stable the temporal and spectral characteristics of their pulses and the other tries to disturb changing signal parameters. After this phase, rival interactions evolve to emission of specific rival songs. Three different types of rival songs could be identified [11].

Rival interactions between females appear to have an inhibitory or interference effect on *Chinavia* spp. copulation. In groups with females competing for a male, a reduced number of copulations were observed [10] in relation to those observed in single pairs [12]. However, in *E. heros*, the observed reduction was not of the same magnitude as in *Chinavia* spp. [10]. The principal interference in the reproductive behavior observed during rival female interaction appears to be due the rival signals, but it was not directly tested [10].

Biotremology offers great potential for application in pest management by methods and technology with low environmental impact. Vibratory signals could be used to manipulate the behavior of insects, for their monitoring and control [13–16]. Mating disruption using vibratory signals is one of the proposed approaches [17,18]. The potential use

of background noise as mating disruption elements has been shown in several hemipterans, such as the leafhoppers (Cicadellidae) *Aurascia devastans* (Dist.) [19], *Scaphoideus titanus* Ball [17,18,20], *Homalodis cavitripennis* (Germar) [21], the planthopper (Delphacidae), *Nilaparvata lugens*(Stål) [19] and the psyllids *Bactericera cockerelli* ((Šulc, 1909) (Triozidae) [22] and *Diuraphis acirri* (Kuwayama, 1908) (Liviidae) [23,24]. The disrupting effect of pure tone vibrations on the reproductive behavior of *E. heros* was studied [25]. Pure tone vibrations between 75 and 200 Hz significantly reduced the proportion of males searching for females and consequently inhibited copulation. However, in 24 h long experiments, background noise delayed but did not completely disrupt mating [25].

Stink bugs are pests in different crops, including legumes, grains, vegetables, fruits and nuts [26]. Their polyphagous and wide geographic distribution makes many stink bug species key pests around the world [27]. In addition, some tropical and subtropical stink bug species, such as *Halyomorpha halys* (Stål), *Bagnada hilaris* (Burmeister) or *Piezodorus guildinii* (Westwood), are invasive in temperate regions, with the potential to become important pests in many crops [28]. In Brazil, stink bugs are the main pests in soybean and other crops, where they usually appear as a complex of species dominated by *E. heros* [29,30]. *E. heros* is a Neotropical stink bug, present principally in tropical and subtropical regions, from Central America to the north of Argentina and Uruguay [26]. *Chinavia ubica* and *Chinavia impicticornis* are considered secondary pests in soybean and are usually found in low densities in soybean fields [30]. These species have similar geographic distribution that includes tropical and subtropical regions in South America, principally Brazil [26]. Management of stink bugs is conducted principally by population monitoring and insecticide applications [31]. The development of biorational control methods based on the manipulation of stink bug behavior could contribute to developing technology with a low environmental impact on agriculture [32]. In this work, the effect of conspecific female rival signals, as background environmental noise, on the mating behavior and copulation of three stink bug species, *E. heros*, *C. ubica* and *C. impicticornis*, was investigated for the first time. The principal objective was to identify the potential of rival signals to be used in a mating disruption strategy for these pests. Two hypotheses were tested by playback experiments: 1—playback of rival female signals inhibits the vibratory communication of conspecific stink bugs; 2—the presence of rival signals reduces the proportion of pairs developing mating behavior and copulation.

The model species were selected because they have different female rival interactions and signals that could condition the responses of the insects. In addition, the three species give the opportunity to work with a key pest of grain crops in Brazil, *E. heros*, and two secondary pests, *C. ubica* and *C. impicticornis*. In this way, results of this work could help to develop biorational management strategies for current and potential pests.

2. Material and Methods

2.1. Insects

The colonies of *E. heros*, *C. ubica* and *C. impicticornis* were started with insects collected in soybean fields near Brasília, DF, Brazil. Colonies were maintained for more than 5 years and 60 generations in the laboratory and were partially renewed every year by the incorporation of new field collected insects. Stink bugs were reared following procedures previously described by Borges et al. [33] for *E. heros* and Blassioli-Moraes et al. [34] for *Chinavia* species. Insects were maintained in rearing rooms at 26 ± 10 °C, $65 \pm 10\%$ RH, photoperiod 14 hL:10 hD, at the Laboratório de Semioquímicos of Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Adults were maintained in 8 L transparent plastic containers on a diet composed of green bean pods (*Phaseolus vulgaris* L.), dry soybean seeds (*Glycine max* L.), sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.) and raw peanuts (*Arachis hypogaea* L.) and a bouquet of branches of boldo (*Plectranthus barbatus* Andrews) placed in plastic pots with humidified vermiculite. The diet was replaced three times a week. Eggs were collected every two or three days and kept in plastic Petri dishes with a bean pod. When nymphs reached

the second instar, they were transferred to 8 L containers and maintained following the same procedures as described for adults. Sexually mature virgin adults (≥ 10 days after the final molt) were used for the experiments [33,34]. Males and females were separated, by the external genitalia characters, after the imaginal molt and cuticular hardening (ca. 24 h after molting) and maintained in separated containers and rearing rooms until used in experiments.

2.2. Plants

All bioassays were conducted on bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). Beans were grown in plastic pots with a mixture of soil and organic growth substrate (1:1 w/w) and kept in a greenhouse (14 h L:10 h D). Experiments were conducted on bean plants with a 20 to 30 cm high stem and two fully expanded unifoliate leaves.

2.3. Rival Signals and Stimulation Programs

For playback experiments, we used previously recorded rival signals from each species [10], selected from digital files (.wav recorded at 24-bit, 96- kHz, 100-dB signal-to-noise ratio, with a Sound Blaster Extigy, Creative Laboratories Inc., Milpitas, California, USA). The stimulation program consisted of sequences of rival signals produced by grouped females of each species (Figure S1). Signals from one to three different files were combined in a sequence with amplitude normalized to naturally emitted signals and at the same level within the whole sequence. The stimulation programs lasted 30 to 120 s, with 5 to 20 s of interval between signals from different individuals. For *C. impicticornis*, the last sequence of rivalry, when insects alternate FS-1b, which silences one of the rival females, was selected [10] (Figure S1).

2.4. Playback Experimental Procedures

Experiments were conducted in a sound-proof room. Plants in pots were placed on a shock-proof table. Playback stimulation programs from each species were applied to bean plant surfaces by the tip of the 5 cm stick firmly fixed to the head of a vibration exciter (Mini-shaker Type 4810, Brüel & Kjær, Naerum, Denmark), positioned horizontally on a polyurethane foam coated iron support. The mechanically isolated vibrator was in contact with the tested plant only by the tip of the stick, which was placed on the stalk ~ 10 cm above the soil level (Figure S2). Playback experiments were conducted in a random sequence of stimulation programs and insect species. A conspecific female and a male were placed individually on opposite leaves of the bean plant, which was vibrated (treatment) or not vibrated (control) with one of the stimulation programs of the respective species. Insects were observed for 20 min, monitoring their behavior and recording signals emitted during this period.

Behavior categories recorded were the proportion of responses (number of pairs of each species emitting at least one signal in relation to total pairs tested), proportion of emissions of signals of each type by females and males in relation to the total females and males emitting signals, proportion of pair formation (number of pairs of each species in which the insects meet on the same leaf in relation to the total pairs tested), and proportion of copulation (number of pairs of each species that copulate in relation to total number of pairs tested). Latency (time from start the experiment until one of the insects of the pair starts to emit vibratory signals) and response time (time from start to emitting vibratory signals, until emitting the last one) were also registered.

Vibratory signals were recorded by a portable digital laser vibrometer (PDV-100, Polytec GmbH, Waldbronn, Germany). The laser beam was focused perpendicularly to a piece of a reflective tape of ~ 4 mm² glued to the stalk of bean plants at ~ 20 cm from the soil surface at 2 to 3 cm below the insertion of unifoliate leaves, where the insects were placed. Surface vibrations, digitized by a sound card (24-bit, 96- kHz, 100-dB signal-to-

noise ratio, Sound Blaster Extigy, Creative Laboratories Inc., Milpitas, CA, USA) were recorded and stored on a computer by Cool Edit Pro 2.0 software (Syntrillium Software 2001—Fort Wayne, Indiana, USA).

General experimental design included randomly reproduced stimulation programs of each species that were changed every three to five bioassays joint with the plants. For each species and condition of stimulation defined as treatment (plants vibrated with conspecific rival female signals) or control (non-vibrated plants), 25 to 30 repetitions were performed. Insects were considered as non-responsive if they did not emit any signals or displayed no reproductive behavior in the first 10 min of the bioassay. Insects that emitted signals were observed for 20 min or until they copulated.

2.5. Signal Analyses

Female and male songs produced by abdomen vibration were classified and named according to Blassioli-Moraes et al. [8] for *E. heros* and Laumann et al. [12] for *C. ubica* and *C. impicticornis*. *E. heros* signals were identified as FS-1 (the first female song), FS-2 (the second female song), MS-1 (the first male song), MS-2 (the second male song). For *C. ubica* and *C. impicticornis*, signals were named FS-1a (the first female song, type a), FS-1b (the second female song, type b), MS-1 (the first male song) and MS-2 (the second male song).

The basic units of vibratory emissions (pulses and pulse trains) [35] were described by their duration (ms) as the time between signal onset and end, repetition time (ms) as the time between onsets of two sequential pulses and/or pulse trains, and the number of pulses per pulse train. Sound Forge software (Sonic Foundry <http://www.sonicsfoundry.com>) was used to analyze frequency spectra (Fast Fourier Transform (FFT) size 32,768, FFT overlap 99%, smoothing window Blackman-Harris, and display range 60–80 dB) and sonograms (FFT size 8192, FFT overlap 99%, smoothing window Blackman-Harris display range 40–80 dB). Spectra are described by the fundamental, dominant and harmonic peak frequencies.

2.6. Statistical Analyses

Proportion of responses, proportion of emissions of signals of each type by females and males and proportion of copulation were compared between pairs of each species in treatment and control by logistic regression considering binary responses (yes = 1 or no = 0) as response variable, and control or treatment as explanatory factor. Coefficients and standard error from the logistic regressions were used to calculate the odds ratios (ORs) and their corresponding confidence interval of 95% (95% CI). Odds were considered significant if their CI did not include 1 value. The percentage of response reduction when insects were placed on vibrated plants was calculated as: $1 - \text{OR} \times 100$, and the increase in response in non-vibrated plants (control) as: $1/\text{OR}$. The proportion of pair formation, i.e., females and males on the same plant with visual and physical contact that were a consequence of males that showed oriented movements and reached female positions, was not directly observed and was estimated by computing the proportion between the number of insects that copulate in relation to the number of insects that emit vibratory signals. These proportions of males of each species with oriented movements on plants vibrated with rival songs (treatment) and on non-vibrated plants (control) were compared, using two-proportion z-tests with continuity corrections.

Latency, response time and female and male vibratory signal temporal parameters (pulse duration, pulse train duration, repetition time of pulses or pulse train), number of pulses per pulse train and dominant frequency of normality distribution were evaluated with Shapiro-Wilk test. When data showed normal distribution, they were compared by repeated measure analyses of variance (ANOVA), considering the pulses measured in the same individual as repeated measures. When data did not show normality, they were analyzed with generalized linear mixed models (GLMMs) with Poisson distribution, considering the parameters as response variable, the condition in which insects were exposed

(treatment or control) as explanatory factor and individuals as random effects. All statistical tests were developed in R platform version 4.0.0 (R Development Core Team, 2020) using the package lme4 for GLMM. Possible outliers identified in boxplot figures (Figure S2) were removed from the data set before the analyses. When models showed over-dispersion of data, a quasi GLM or quasi GLMM was used. Model diagnosis was evaluated by normal residues and quantile (qq-norm) plot curves (Figure S3). Scripts and results of statistical analyses are shown in the supplementary File S1.

3. Results

3.1. Proportion of Responses

In the three species, a reduced proportion of pairs emitting vibratory signals was observed when submitted to playback of rival female signals, with significant effect only in *C. impicticornis* ($z = -2.157$, $p = 0.031$, $df = 53$, $OR = 0.281$, $95\% \text{ CI} = 0.089\text{--}0.891$) (Figures 1 and S1). In this case, the odds of pairs initiating vibratory communication increased by 3.55-fold in the absence of rival signals (control).

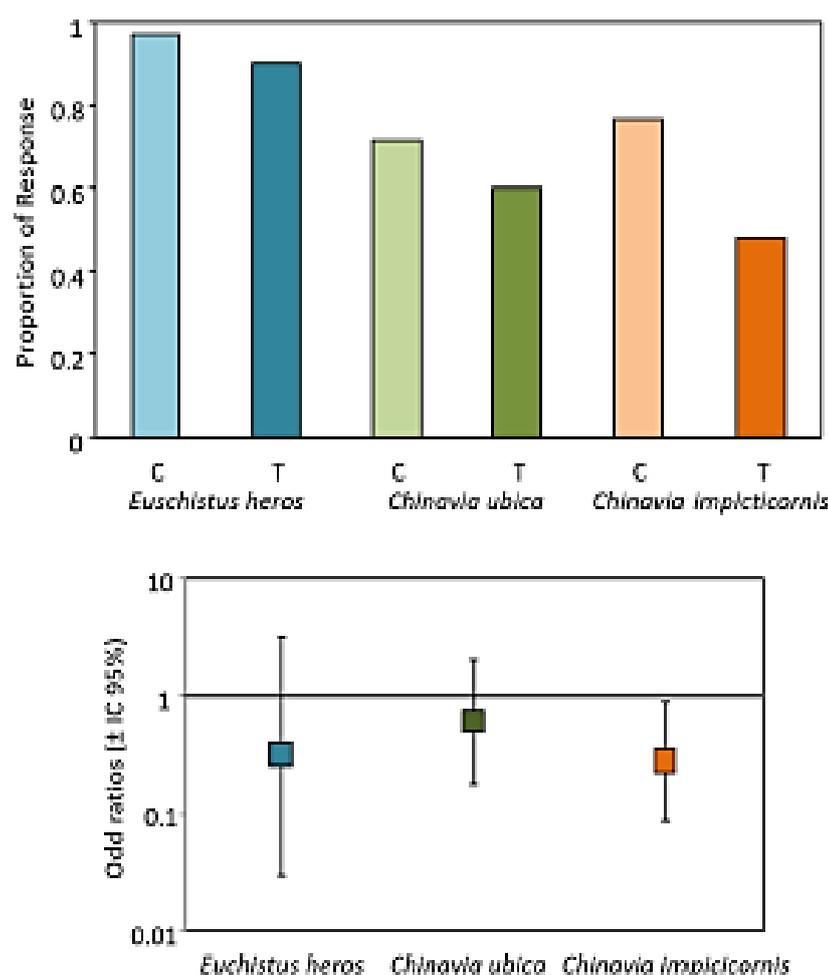


Figure 1. Effect of conspecific female rival signals on the emission of vibratory signals of three stink bug species. Upper graph: proportion of responses (number of pairs emitting vibratory signals/number of pairs tested) of *Euschistus heros*, *Chinavia ubica* and *Chinavia impicticornis* pairs (female and male) placed on control (non-vibrated—C) or treatment (vibrated with conspecific female rival signals—T). Lower graph: odds ratios (95% CI) = likelihood that a pair (female and male) on treatment plant will emit vibratory signals. Significance of odds ratios was established if 95% CI did not include 1. Proportions were calculated from 30 pairs of each species and treatment.

3.2. Latency and Response Time

Latency was affected only in *C. ubica* females, showing a longer time to start emission of vibratory signals when stimulated with conspecific female rival signals ($t = 2.683$, $p = 0.013$, $df = 23$) (Figures 2 and S1). Only *C. impicticornis* males showed a shorter response time when stimulated by female rival signals ($t = -2.592$, $p = 0.015$, $df = 29$) (Figure 2).

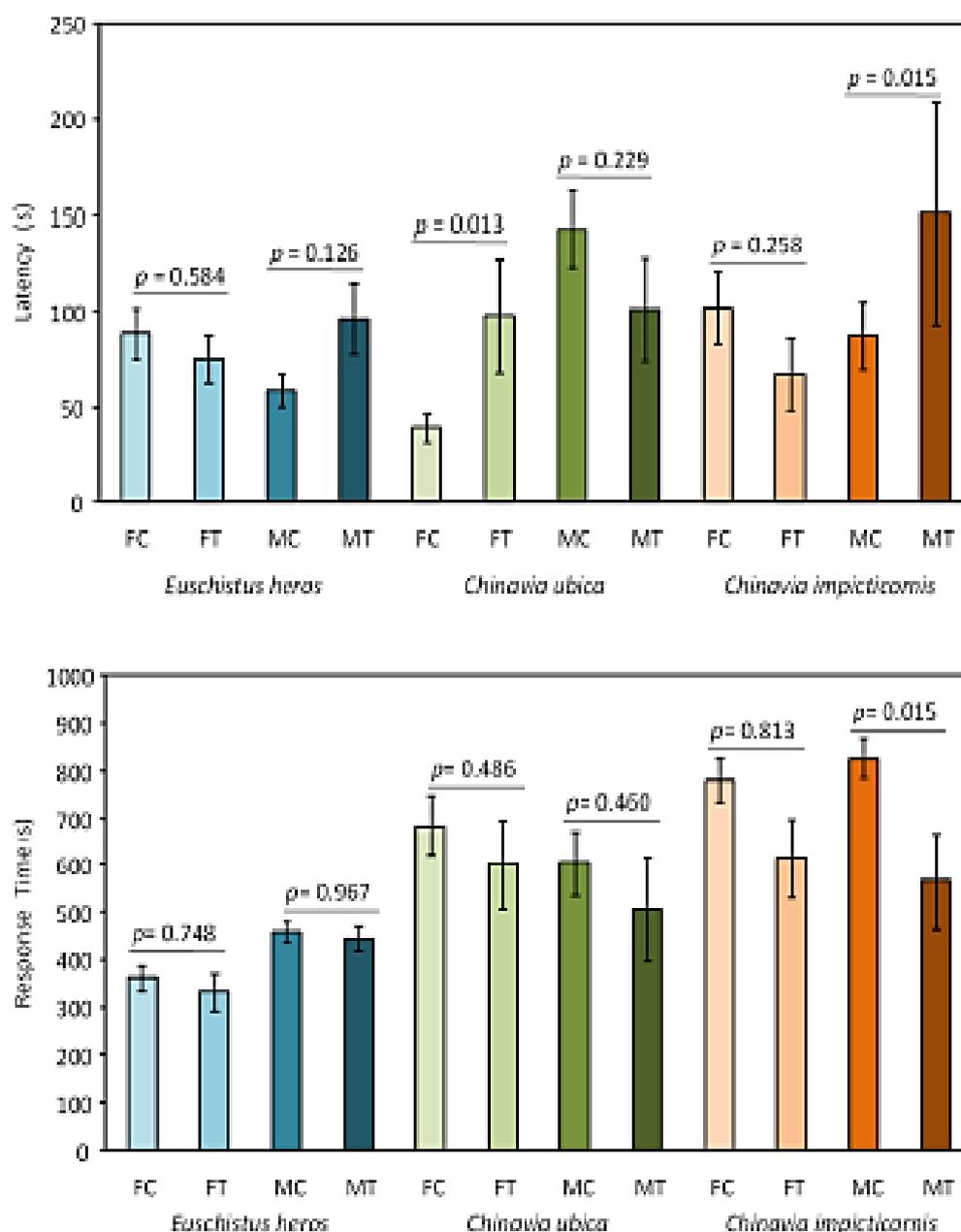


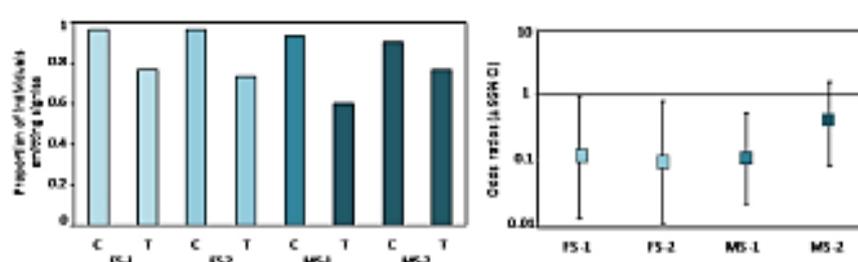
Figure 2. Effect of conspecific female rival signals on latency and response time of males and females of three stink bug species. Latency (s) (upper graph) and Response Time (s) (lower graph) of *Euschistus heros*, *Chinavia ubica* and *Chinavia impicticornis* females (F) and males (M) placed on control (non-vibrated—C) or treatment (vibrated with conspecific female rival signals—T) plants.

Significant differences between times in C and T were established with generalized linear mixed models (GLLM). N = Latency *Euschistus heros* FC = 24, FT = 20, MC = 26, MT = 23, *Chinavia ubica* FC = 14, FT = 10, MC = 17, MT = 11, *Chinavia impicticornis* FC = 23, FT = 11, MC = 22, MT = 9. Response time *Euschistus heros* FC = 29, FT = 24, MC = 27, MT = 21, *Chinavia ubica* FC = 19, FT = 12, MC = 19, MT = 12, *Chinavia impicticornis* FC = 23, FT = 9, MC = 20, MT = 11.

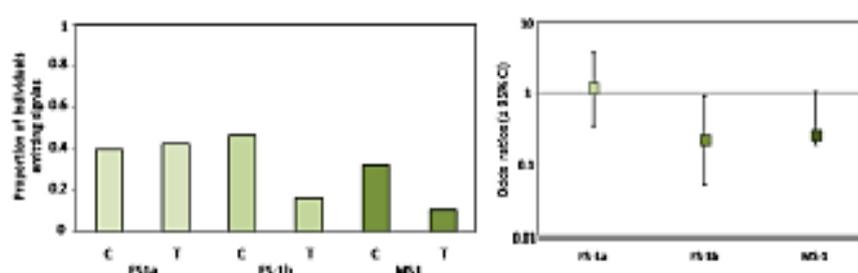
3.3. Signal Emission and Parameters

Proportion of *E. heros* individuals emitting the first (FS-1) and the second (FS-2) female song and the first (MS-1) male song was significantly reduced when insects were stimulated with rival female signals (treatment) (FS-1: $z = -1.971$, $p = 0.048$, $df = 58$, $OR = 0.113$, 95% CI = 0.012–0.988; FS-2: $z = -2.146$, $p = 0.0032$, $df = 58$, $OR = 0.095$, 95% CI = 0.011–0.815; MS-1: $z = -2.719$, $p = 0.006$, $df = 58$, $OR = 0.107$, 95% CI = 0.021–0.536) (Figures 3 and S3). The odds of emitting FS-1, FS-2 and MS-1 increased 8.85, 10.52 and 9.34 times when insects were on non-vibrated (control) plants (Figures 3 and S3). No significant differences were observed in the second male song (MS-2) when stimulated (vibrated plants) or in control (non-vibrated plants) conditions (Figure 3).

Euschistus heros



Chinavia ubica



Chinavia impicticornis

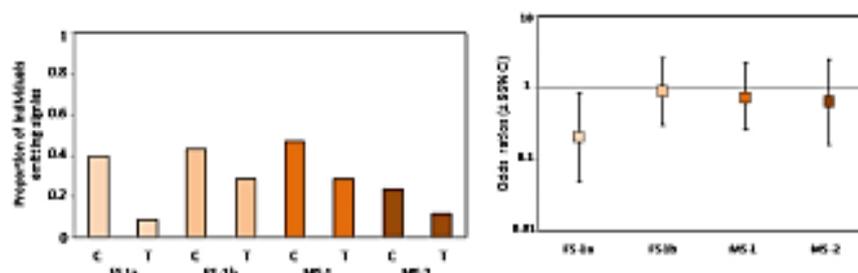


Figure 3. Effect of conspecific female rival signals on the emission of species specific vibratory signals of three stink bug species. Left graphs: proportion of females (F) and males (M) of *Euschistus heros*, *Chinavia ubica* and *Chinavia impicticornis* emitting species specific signals when they were placed on control (non-vibrated—C) or treatment (vibrated with conspecific female rival signals—T) plants. Right graphs: odds ratios (95% CI) = likelihood of individuals (female or male) on treatment plant emitting species-specific vibratory signals. Significance of odds ratios was established if 95% CI did not include 1. Signals are named following Blassioli-Moraes et al. (2005) for *E. heros* and Laumann et al. (2016) for *C. ubica* and *C. impicticornis*. FS-1 = first female song, FS-2 = second female song 2, MS-1 = first male song 1. FS-1a = first female song type aa, FS-1b = first female song type b. N = *Euschistus heros* C = 30, T = 30, *Chinavia ubica* C = 29, T = 20, *Chinavia impicticornis* C = 30, T = 25.

Table 1. b were significantly reduced in *Chinavia ubica* by female rival signals ($z = -2.094$, $p = 0.037$, $df = 45$, $OR = 0.216$, $95\% CI = 0.051-0.913$) (Figure 3). In this case, the odds of emitting FS-1b on non-vibrated plants were increased 4.63 times.

When *C. impicticornis* females and males were placed on plants vibrated with female rival signals, only FS-1a emissions were reduced in comparison with females placed on non-vibrated plants ($z = -2.206$, $p = 0.027$, $df = 53$, $OR = 0.205$, $95\% CI = 0.049-0.838$) (Figure 3). Odds of emitting FS-1b in non-vibrated plants were increased 4.88 times.

Playback of rival signals did not significantly affect the signal parameters emitted by *E. heros*. In this case, only dominant frequencies of female signals showed significant differences in relation to signals emitted by females in control plants (Tables 1 and S1). In *C. ubica*, a significant effect was observed as an increasing pulse train repetition time of the first female song (FS-1a) and a reduction in the number of pulses per pulse train and an increase in dominant frequency of the second female song (FS-1b) when insects were on treated plants (Tables 1 and S1). During stimulation, *C. impicticornis* females and males emitted signals with increasing temporal parameters (pulse train duration and pulse train repetition time) in FS-1a, a decrease in FS-1b pulse train repetition time and a decrease in pulse duration of the second male song (MS-2) in relation to signals emitted in control conditions (Tables 1 and S1).

Table 1. Temporal and spectral characteristics of *Euschistus heros*, *Chinavia ubica* and *C. impicticornis* females and males when recorded from couples on bean plants without vibrations or vibrated with rival female signals from conspecifics in playback experiments.

| Species | Control | Treatment | Statistics |
|-------------------------|-------------------|-------------------|---------------------------|
| <i>Euschistus heros</i> | | | |
| FS-1 | | | |
| PD | 1096.62 ± 325.10 | 985.34 ± 320.40 | $z = -1.63$, $p = 0.104$ |
| RT | 2332.98 ± 1472.11 | 2034.28 ± 1396.36 | $z = -1.64$, $p = 0.219$ |
| DF | 115.08 ± 9.36 | 120.13 ± 11.71 | $z = 2.13$, $p = 0.033$ |
| N/Ni | 314/30 | 229/23 | |
| FS-2 | | | |
| PD | 3506.61 ± 1372.20 | 3437.11 ± 1420.73 | $z = -1.43$, $p = 0.152$ |
| DF | 118.75 ± 8.35 | 125.58 ± 10.58 | $z = 2.60$, $p = 0.009$ |
| N/Ni | 169/29 | 62/22 | |
| MS-1 | | | |
| PD | 1613.01 ± 657.37 | 1667.63 ± 737.22 | $z = 0.82$, $p = 0.410$ |
| RT | 3394.05 ± 2279.39 | 2560.49 ± 1837.38 | $z = -1.74$, $p = 0.082$ |
| DF | 142.62 ± 13.96 | 140.86 ± 15.68 | $z = 0.04$, $p = 0.970$ |
| N/Ni | 212/28 | 78/18 | |
| MS-2 | | | |
| PD | 5156.69 ± 2077.66 | 4856.28 ± 1693.33 | $z = -1.19$, $p = 0.232$ |
| DF | 138.59 ± 11.33 | 144.82 ± 15.44 | $z = 0.79$, $p = 0.432$ |
| N/Ni | 141/27 | 173/23 | |
| <i>Chinavia ubica</i> | | | |
| FS-1a | | | |
| PTD | 1707.71 ± 440.34 | 1923.32 ± 505.19 | $z = 1.28$, $p = 0.209$ |
| NPPT | 9.32 ± 2.23 | 10.03 ± 2.19 | $z = 0.97$, $p = 0.333$ |
| PTRT | 4051.17 ± 1294.39 | 4700.43 ± 1958.94 | $z = 1.78$, $p = 0.075$ |
| DF | 103.10 ± 7.55 | 108.25 ± 5.72 | |
| N/Ni | 41/10 | 53/8 | |
| FS-1b | | | |
| PTD | 1063.16 ± 205.65 | 879.95 ± 117.72 | $t = -2.09$, $p = 0.097$ |
| NPPT | 4.95 ± 1.45 | 3.35 ± 1.35 | $z = -2.74$, $p = 0.006$ |
| PTRT | 2251.95 ± 275.26 | 2271.90 ± 1329.45 | $z = 0.24$, $p = 0.807$ |
| DF | 100.45 ± 7.61 | 107.60 ± 2.85 | $z = 2.55$, $p = 0.011$ |
| N/Ni | 38/8 | 20/3 | |

| | | | |
|-------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------------|
| MS-1 | | | |
| PTD | 1808.84 ± 440.94 | 2144.02 ± 655.45 | $z = 1.36, p = 0.186$ |
| NPPT | 9.44 ± 2.41 | 7.19 ± 1.36 | $z = -0.95, p = 0.343$ |
| DF | 106.12 ± 5.33 | 113.81 ± 6.12 | $z = 0.39, p = 0.692$ |
| N/Ni | 50/9 | 21/2 | |
| <i>Chinavia impicticornis</i> | | | |
| FS-1a | | | |
| PTD | 3188.03 ± 549.07 | 4442.93 ± 334.44 | $z = 3.20, p = 0.001$ |
| NPPT | 12.77 ± 3.47 | 16.36 ± 1.01 | $z = 2.37, p = 0.018$ |
| PTRT | 7358.78 ± 3395.57 | 9675.53 ± 1016.06 | $z = 1.72, p = 0.086$ |
| DF | 87.30 ± 9.55 | 93.43 ± 3.63 | $z = 1.44, p = 0.149$ |
| N/Ni | 105/10 | 15/3 | |
| FS-1b | | | |
| PTD | 1193.23 ± 298.66 | 1040.14 ± 230.27 | $z = -1.32, p = 0.186$ |
| NPPT | 2.30 ± 0.96 | 2.32 ± 0.99 | $z = -0.08, p = 0.933$ |
| PTRT | 4307.58 ± 1794.54 | 3007.68 ± 740.51 | $z = -3.64, p = 0.0002$ |
| DF | 88.39 ± 4.74 | 90.65 ± 5.46 | $z = 1.08, p = 0.280$ |
| N/Ni | 119/11 | 168/11 | |
| <i>C. impicticornis</i> | | | |
| MS-1 | | | |
| PTD | 3957.88 ± 622.39 | 3531.72 ± 755.82 | $t = -2.41, p = 0.024$ |
| NPPT | 16.34 ± 2.57 | 14.92 ± 2.94 | $z = -2.31, p = 0.020$ |
| DF | 87.93 ± 7.81 | 96.12 ± 6.40 | $z = 1.28, p = 0.209$ |
| N/Ni | 134/14 | 158/15 | |
| MS-2 | | | |
| PD | 185.83 ± 35.94 | 148.36 ± 33.74 | $z = -2.26, p = 0.024$ |
| PRT | 265.72 ± 44.35 | 230.27 ± 26.38 | $z = -1.83, p = 0.068$ |
| DF | 99.93 ± 13.33 | 107.25 ± 7.07 | $z = 1.03, p = 0.293$ |

References: Signals are named following Blassioli-Moraes et al. (2005) [8] for *Euschistus heros* and Laumann et al. (2016) [12] for *Chinavia ubica* and *Chinavia impicticornis*. FS-1 = first female song, FS-2 = second female song 2, MS-1 = first male song 1, FS-1a = first female song type aa, FS-1b = first female song type b. PD = pulse duration (ms), RT: repetition time (ms), DF = dominant frequency (Hz), PTD = pulse train duration (ms), NPPT = number of pulses/pulse train, PTRT = pulse train repetition time, N = number of individual signals, Ni = number of individuals.

3.4. Proportion of Pair Formation and Copulation

The proportion of males that reached the female by oriented movement and formed a couple after exchanging vibratory signals was significantly lower in *E. heros* and *C. ubica* when stimulated by playback rival signals ($\chi^2_1 = 23.426, p < 0.001$ and $\chi^2_1 = 3.809, p = 0.05$). No significant differences were found in pair formation of *C. impicticornis* when they were placed on vibrated or non-vibrated plants (Figure 4).

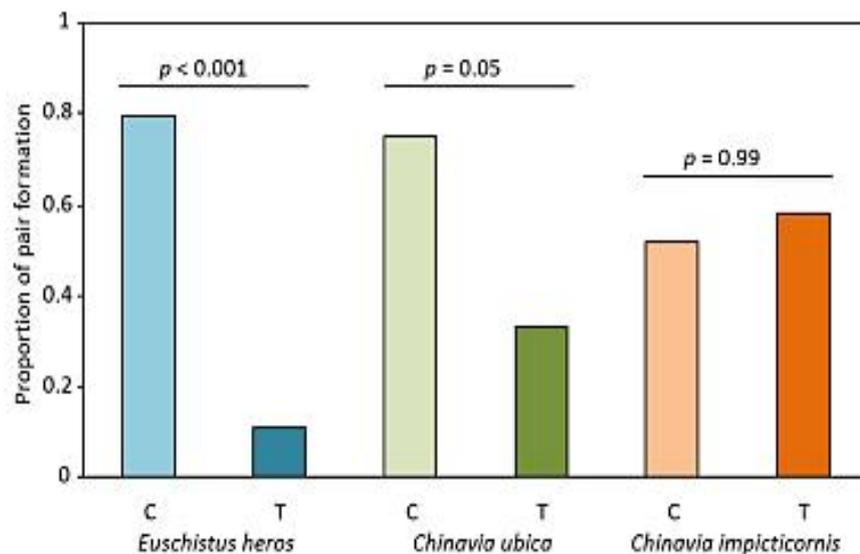


Figure 4. Effect of conspecific female rival signals on the pair formation (insects on the same the same leaf of the plant and in physical contact) of three stink bug species. Proportion of pair formation (individuals copulating/individuals emitting vibratory signals of *Euschistus heros*, *Chinavia ubica* and *Chinavia impicticornis* when they were placed on control (non-vibrated—C) or treatment (vibrated with conspecific rival female signals—T). Significant differences were established by z-test for two proportions with continuity corrections. N = *Euschistus heros* C = 29, T = 27, *Chinavia ubica* C = 20, T = 12, *Chinavia impicticornis* C = 23, T = 12.

A significant reduction in copulating pairs was observed when males and females of *E. heros* and *C. ubica* were placed on plants vibrated with conspecific rival female signals (*E. heros*: $z = -4.539$, $p < 0.001$, $df = 58$, OR = 0.034, 95% CI = 0.008–0.146, *C. ubica*: $z = -2.265$, $p = 0.024$, $df = 46$, OR = 0.217, 95% CI = 0.058–0.814) (Figures 5 and S2). The likelihood of copulation in the absence of female rival signals increased 29.41 times in *E. heros*, 4.6 times in *C. ubica* and 1.71 times in *C. impicticornis*. However, in the last case, the difference in copulation proportions was not significant ($z = -0.928$, $p = 0.313$, $df = 53$) and odds ratios also did not show significance (OR = 0.583, 95% CI = 0.321–1.384) (Figures 5 and S2).

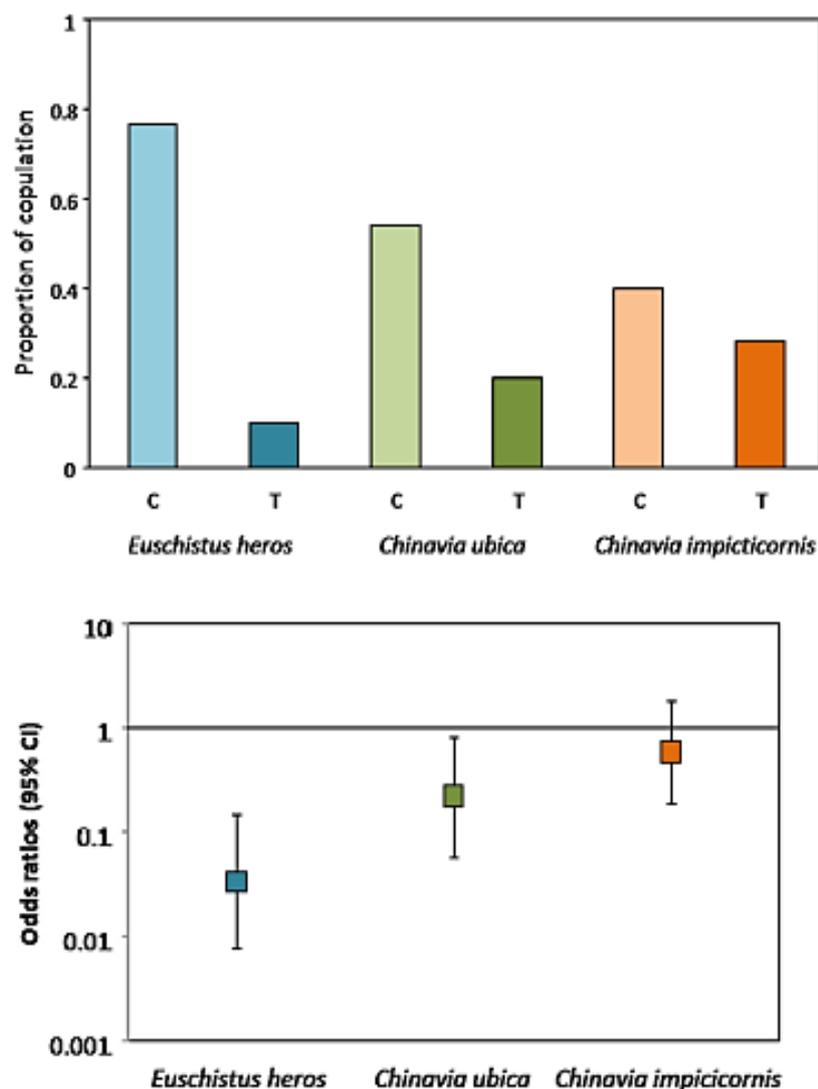


Figure 5. Effect of conspecific female rival signals on copulation of three stink bug species. Upper graph: proportion of pairs copulating (number of pairs copulating/number of pair tested) of *Euschistus heros*, *Chinavia ubica* and *Chinavia impicticornis* pairs (female and male) placed on control (non-vibrated—C) or treatment (vibrated with conspecific rival female signals—T). Lower graph: odds ratios (95% CI) = likelihood of a pair copulating on treatment plant. Significance of odds ratios was established if 95% CI did not include 1. N = *Euschistus heros* C = 23, T = 3, *Chinavia ubica* C = 15, T = 4, *Chinavia impicticornis* C = 13, T = 7.

4. Discussion

Results of the present study show a disrupting effect of rival female signals on the reproductive behavior of the three investigated stink bug species. This effect is more clearly expressed in *E. heros* and *C. ubica* than in *C. impicticornis*. In the first two species, we observed, from odds ratio analyses, a significant reduction in pair formation and copulation when insects were placed on plants vibrated with conspecific rival signals. This effect is associated with the reduction (expressed for odd ratios < 1) in specific vibratory

communication signal emission (FS-1, FS-2 and MS-1 in *E. heros* and FS-1b in *C. ubica*), which may influence the duet formation and further development of different phases of mating behavior. Duetting by vibratory signals is decisive in stink bugs during the calling and courtship phase, working in pair formation and copulation [10]. In contrast with the latter two species, *C. impicticornis* rival female signals reduce the proportion of responsive insects (proportion of pairs that emit vibratory signals) but not pair formation or copulation. The different effects of rival signals in the tested species could be related to their difference in rivalry behavior, which is associated with differences in the vibratory signal structure. *E. heros* and *C. ubica* emit specific rival signals (FRS) after alternation with female calling signals (FS-1 of *E. heros* and FS-1a and FS-1b for *C. ubica*). In contrast, rivalry in *C. impicticornis* is expressed by alternation and transition of calling song FS-1a to the FS-1b type, which is maintained until one of the competitors falls silent [10]. Considering these specific characteristics, we may hypothesize that rival signals of *E. heros* and *C. ubica* inhibit conspecifics more than those of *C. impicticornis*. This is also supported by the observation that the proportions of insect signaling, latency and response time of *C. ubica* and *E. heros* were not significantly affected by rival female signals played back to plants, but in both cases the number of pairs copulating was reduced in the presence of this signals.

In *C. impicticornis* the proportion of pairs that copulate was not reduced by female rival signals and may be a consequence of some mechanisms of adaptation to a noisy background by modifying the spectral and temporal parameters of their signals. In general, *C. impicticornis* individuals extend the duration of calling signals (FS-1a) and shorten pulses and repetition time of duet signals (FS-1b and MS-1) when in the presence of rival female signals. A similar variation in signal emissions was observed in females of *N. viridula* during female rivalry interactions [11] that, similarly to *C. impicticornis*, proceed in different levels of complexity by the emission of three types of rival songs [11]. However, as temporal parameters of stink bug signals are directly related to gender and species-specificity, and characteristics need to be conserved during communication [8,12,36–38], it was observed that *C. impicticornis* signal parameters of individuals in noisy environments are in the general species-specific range [12].

Several studies have showed inhibitory and disrupting effects on airborne or substrate-borne communication by environmental noise [39–41], and the application of this knowledge to behavioral pest management has been proposed [14]. One of the proposed strategies is using vibrations as a tool to disrupt mating [18,19]. This strategy was successfully tested in different hemipterans, such as Cicadellidae, Delphacidae, Liviidae and Triozidae, using natural (e.g., disruptive, rival or female signals) or artificially synthesized (ex. white noise, pure tone) vibrations [17–19,23,24,42–44]. The general pattern observed in these studies suggests that mating disruption could be achieved by interference in communication, which reduces signal emission and the probability of pair formation. A similar effect was observed in our study on *E. heros* and *C. ubica*.

Mating disruption in stink bugs was studied first in *E. heros* using continuous pure tone vibrations as interference background noise [25]. Playing back pure-tone vibrations (75 to 200 Hz) showed significant effects on *E. heros* communication, reducing the responses of males to calling signals and their search for females. In addition, this pure-tone vibration had a strong effect on copulation, reducing it by 94.2 to 100% in relation to control pairs [25]. However, in long-duration experiments (24 h), the reduction in copulation was lower and reached 24.7% on plants with background noise in relation to results obtained in experiments on non-stimulated plants [25]. Similar results obtained in experiments with playback rival female signals showed a reduction in copulation as a result of reducing signals and duetting emissions and of disrupting male directional movement to calling females.

The disrupting effect of background noise on males searching for females was also shown in *N. viridula* [45]. In this species, searching and orientation were also negatively affected by simultaneous playback of female calling songs from conspecific and alien spe-

cies [37]. The principal mechanism for vibrational directionality is detection and processing of amplitude, phase and/or time differences in the time of signals arrival at leg receptors spatially distributed on the substrate [46,47]. Background vibrations could disrupt stink bugs directionality by interference with naturally emitted signals, breaking the differences in amplitude, phase or time.

The reduction in the efficiency of background noise (emitted as pure-tone vibrations) in disrupting mating in long-duration experiments in *E. heros* was explained as result of habituation [25]. It was proposed that this habituation effect could be reduced with different strategies, for example, the use of discontinuous reproduction of artificial signals or of predators, rival or male signals emitted prior to copulation [25], because all of these signals have disruptive effects on stink bug communication [10]. Following this hypothesis, we tested the impact of rival signals. The results presented here suggest their potential for application in pest control management as a tool for manipulation and disruption of mating behavior. Further work needs to focus on the effects of rival female signals used in long-duration experiments and on their interference in the release of the male sex pheromone. Stink bugs' sexual behavior includes communication with signals of different modalities, principally chemicals (pheromone) and substrate-borne vibration [48]. The mating disruption strategy needs to consider interactions (e.g., synergistic effects and regulation of signal emission by signals from another modality) between signals of these two modalities.

The use of a mating disruption strategy at the present stage of technology seems to be more complicated in crops in large areas. This is the case of soybean in Brazil and other countries [15], compared with previously studied systems such as those described for vineyard pests, that use an electromagnetic vibrator coupled to the wires used to support the plants [18,20,22,43] and for *D. citri*, where disturbing synthetic female responses are played back with a microcontroller piezo buzzer platform after detecting a male calling [23,24]. However, the combined use of sex pheromones and disrupting signals could be used in a mating disruption strategy in extensive crop areas. Pheromones could be used to aggregate insects in specific places in the cultivated fields, where the disrupting signals could be applied successfully by mechanical or airborne components that transmit them to plants.

5. Conclusions

Vibratory communication among stink bugs offers a great opportunity to develop biorational pest control tools based on their behavioral manipulation, and mating disruption could be one of the more promising strategies for this. In this work, it was demonstrated at first that (1) female rival signals played back as background noise affect vibratory communication of pairs of three stink bug species. In two cases (*E. heros* and *C. ubica*), female rival signals silence the pair, interrupting the duet signalization. In the other species, *C. bipuncticornis*, insects in the presence of female rival signals change temporal and spectral parameters to avoid background noise interference (Hypothesis 1); (2) as a consequence of this, the presence of rival signals reduces the proportion of pairs developing mating behavior and copulation. This effect was more strongly observed in *E. heros* and *C. ubica* (Hypothesis 2).

The results show potential for interference in stink bugs communication and for disrupting mating. The effect on population dynamics and pest control needs to be tested in long duration semi-field and field experiments.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/2075-4450/12/2/177/s1, Figure S1: Figure S1. Oscillograms of stimulation programs used in the play back experiments. Figures show a complete sequence of pulses (with the total duration at right) of one stimulation programs for each species studied and a detail (marked in the stimulation program with a red square) of a sequence of pulses with the correspondent one second scale. *Euschistus heros*: sequences of rival songs of three different female rival interactions. *Chinavia ubica*: a long sequence

of rival songs from one female rival interaction. *Chinaria impicticornis*: sequence of alternation of FS-1b of two different female rival interactions. Figure S2: General setup of the play back experiments. Figure S3: Title. File S1: Statistical analyses scripts and results.

Author Contributions: A.M.D., A.Č., M.B., M.C.B.M., and R.A.L. designed the study and hypotheses; A.M.D. and M.L.F.C. collected the data; A.M.D. and R.A.L. analyzed the data and write the first version of the manuscript. All authors reviewed and edited the manuscript and agreed to the published version of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by Fundação de apoio à pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) (project 193.000.978/2015). A.M.D. received a grant from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and M.L.F.C. received a grant from FAP-DF (project N0193.001792/2017).

Data Availability Statement: The data has not been presented in a separate link but can be made available to anyone interested by contacting the corresponding author.

Acknowledgments: The authors thank Adriele Batista and Giancarlo Catafesta for helping to rear the insects used in this work and Susan Casement for improving the language of the text.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Cocroft, R.B.; Rodriguez, R.L. The behavioral ecology of insect vibrational communication. *Bioscience* **2005**, *55*, 323–334.
- Čokl, A.; Laumann, R.A.; Stritih, N. Substrate-borne vibratory communication In *Stink Bugs: Biorational Control Based on Communication Processes*; Čokl, A., Borges, M., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA; Taylor & Francis Group: Abingdon, UK, 2017; pp. 125–164.
- Borges, M.; Blassioli-Moraes, M.C. The semiochemistry of Pentatomidae. In *Stink Bugs: Biorational Control Based on Communication Processes*; Čokl, A., Borges, M., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA; Taylor & Francis Group: Abingdon, UK, 2017; pp. 95–124.
- Borges, M.; Jepson, P.C.; Howse, P.E. Long-range mate location and close range courtship behavior of the green stink bug, *Nezara viridula* and its mediation by sex pheromones. *Entomol. Exp. Appl.* **1987**, *44*, 205–212.
- Čokl, A.; Blassioli-Moraes, M.C.; Laumann, R.A.; Žunič, A.; Borges, M. Stinkbugs—multisensory communication with chemical and vibratory signals transmitted through different media. In *Biotremology—Studying Vibrational Behavior*; Hill, P.S.M., Lakes-Harlan, R., Mazzoni, V., Narins, P.M., Virant-Doberlet, M., Wessel, A., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2019; pp. 91–122.
- Kavčič, A.; Čokl, A.; Laumann, R.A.; Moraes, M.C.B.; Borges, M. Tremulatory and abdomen vibration signals enable communication through air in the stink bug *Euschistus heros*. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e56503.
- Čokl, A.; Virant-Doberlet, M.; Stritih, N. The structure and function of songs emitted by the southern green stink bugs from Brazil, Florida, Italy and Slovenia. *Physiol. Entomol.* **2000**, *25*, 196–205.
- Blassioli-Moraes, M.C.; Laumann, R.A.; Čokl, A.; Borges, M. Vibratory signals of four Neotropical stink bug species. *Physiol. Entomol.* **2005**, *30*, 175–188.
- Bagwell, G.J.; Čokl, A.; Millar, J.G. Characterization and comparison of the substrate-borne vibrational signals of *Chlorochroa uhleri*, *C. ligata* and *C. sayi*. *Am. Entomol. Soc. Am.* **2008**, *101*, 235–246.
- Čokl, A.; Dias, A.M.; Blassioli-Moraes, M.C.; Borges, M.; Laumann, R.A. Rivalry between stink bug females in a vibrational communication network. *J. Insect Behav.* **2017**, *30*, 741–758.
- Čokl, A.; Žunič, A.K.; Laumann, R.A.; Virant-Doberlet, M. Female competition for availability of males in insects: The *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) model. *Insect Sci.* **2020**, *27*, 801–814.
- Laumann, R.A.; Čokl, A.; Blassioli-Moraes, M.C.; Borges, M. Vibratory communication and its relevance to reproductive isolation in two sympatric species (Hemiptera: Pentatomidae: Pentatominae). *J. Insect Behav.* **2016**, *29*, 643–665.
- Čokl, A.; Millar, J. Manipulation of insect signalling for monitoring and control of insects. In *Biorational Control of Arthropod Pests*; Issac Ishaaya, I., Horowitz, A.R., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2009; pp.279–316.
- Polajnar, J.; Eriksson, A.; Lucchi, A.; Anfora, G.; Virant-Doberlet, M.; Mazzoni, V. Manipulating behaviour with substrate-borne vibrations—Potential for insect pest control. *Pest. Manag. Sci.* **2015**, *71*, 15–23.
- Laumann, R.A.; Bottura Maccagnan, D.H.; Čokl, A. Use of vibratory signals for stink bug monitoring and control. In *Stink Bugs: Biorational Control Based on Communication Processes*; Čokl, A., Borges, M., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA; Taylor & Francis Group: Abingdon, UK, 2017; pp. 226–245.
- Takanashi, T.; Uechi, N.; Tatsuta, H. Vibrations in hemipteran and coleopteran insects: Behaviors and application in pest management. *Appl. Entomol. Zool.* **2019**, *54*, 21–29.
- Mazzoni, V.; Lucchi, A.; Čokl, A.; Prešern, J.; Virant-Doberlet, M. Disruption of the reproductive behavior of *Scaphoideus titanus* by playback of vibrational signals. *Entomol. Exp. Appl.* **2009**, *133*, 174–185.

18. Eriksson, A.; Anfora, G.; Lucchi, A.; Lanzo, F.; Virant-Doberlet, M.; Mazzoni, V. Exploitation of insect vibrational signals reveals a new method of pest management. *PLoS ONE* **2012**, *7*, 1–5.
19. Saxena, K.N.; Kumar, H. Interruption of acoustic communication and mating in a leafhopper and a planthopper by aerial sound vibrations picked up by plants. *Experientia* **1980**, *36*, 933–936.
20. Polajnar, J.; Eriksson, A.; Lucchi, A.; Virant-Doberlet, M.; Mazzoni, V. Mating disruption of a grapevine pest using mechanical vibrations: From laboratory to the field. *J. Pest. Sci.* **2016**, *89*, 909–921.
21. Mazzoni, V.; Polajnar, J.; Baldini, M.; Rossi Stacconi, M.V.; Anfora, G.; Guidetti, R.; Maistrello, L. Use of substrate-borne vibrational signals to attract the Brown Marmorated Stink Bug, *Halyomorpha Halys*. *J. Pest. Sci.* **2017**, *90*, 1219–1229.
22. Avosani, S.; Sullivan, T.E.; Ciolli, M.; Mazzoni, V.; Suckling, D.M. Can vibrational playbacks disrupt mating or influence other relevant behaviours in *Bactericera cockerelli* (Triozidae: Hemiptera). *Insects* **2020**, *11*, 1–13.
23. Lujo, S.; Hartman, E.; Norton, K.; Pregon, E.A.; Rohde, B.B.; Mankin, R.W. Disrupting mating behaviour of *Diaphorina citri* (Liviidae). *J. Econ. Entomol.* **2016**, *109*, 2373–2379.
24. Mankin, R.W.; Rohde, B.B.; McNeill, S.A.; Paris, T.M.; Zagvazdina, N.L.; Greenfeder, S. *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) responses to microcontroller-buzzer communication signals off potential use in vibration traps. *Fl. Entomol.* **2013**, *96*, 1546–1555.
25. Laumann, R.A.; Maccagnan, D.H.B.; Čokl, A.; Blassioli-Moraes, M.C.; Borges, M. Substrate-borne vibrations disrupt the mating behaviors of the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*: Implications for pest management. *J. Pest. Sci.* **2018**, *91*, 995–1004.
26. Panizzi, A.R.; Lucini, T. Host plant-stink bug relationships. In *Biorational Control Based on Communication Processes*; Čokl, A., Borges, M., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA; Taylor & Francis Group: Abingdon, UK, 2017; pp. 31–85.
27. Panizzi, A.R.; McPherson, J.E.; James, D.G.; Javahery, M.; McPherson, R.M. Stink bugs (Pentatomidae). In *Heteroptera of Economic Importance*; Schaefer, C.W., Panizzi, A.R., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2000; pp. 421–474.
28. Panizzi, A.R. Growing problems with stink bugs (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae): Species invasive to US and potential Neotropical invaders. *Am. Entomol.* **2015**, *6*, 223–233.
29. Panizzi, A.R.; Silva, F.A.C. Seed-sucking bugs (Heteroptera). In *Insect Bioecology and Nutrition for Integrated Pest Management*; Panizzi, A.R., Parra, J.R.P., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2012; pp. 295–324.
30. Aquino, M.F.S.; Sujii, E.R.; Borges, M.; Blassioli Moraes, M.C.; Laumann, R.A. Diversity of stink bug adults and their parasitoids in soybean crops in Brazil: Influence of a latitudinal gradient and insecticide application intensity. *Env. Entomol.* **2019**, *48*, 105–113.
31. Panizzi, A.R. History and contemporary perspectives of the integrated pest management of soybean in Brazil. *Neotrop. Entomol.* **2013**, *42*, 119–127.
32. Borges, M.; Čokl, A. Introduction. In *Stink Bugs: Biorational Control Based on Communication Processes*; Čokl, A., Borges, M., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA; Taylor & Francis Group: Abingdon, UK, 2017; pp. XV–XX.
33. Borges, M.; Costa, M.L.M.; Sujii, E.R.; Cavalcanti, M.G.; Redigolo, G.F.; Resck, I.S.; Vilela, E.F. Semiochemical and physical stimuli involved in host recognition by *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae) toward *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). *Physiol. Entomol.* **1999**, *24*, 227–233.
34. Blassioli-Moraes, M.C.; Laumann, R.A.; Oliveira, M.W.M.; Woodcock, C.M.; Mayon P.; Hooper, A.; Pickett, J.A.; Birkett, M.A.; Borges, M. Sex pheromone communication in two sympatric Neotropical stink bug species *Chinavia ubica* and *Chinavia impicticornis*. *J. Chem. Ecol.* **2012**, *38*, 836–845.
35. Broughton, W.B. Methods in bio-acoustic terminology. In *Acoustic Behaviour of Animals*; Busnel, R.G., Ed.; Elsevier Publishing Company: Amsterdam, The Netherlands, 1963; pp. 3–24.
36. Čokl, A. Stink bug interaction with host plants during communication. *J. Insect Physiol.* **2008**, *54*, 1113–1124.
37. De Groot, M.; Čokl, A.; Virant-Doberlet, M. Effects of heterospecific and conspecific vibrational signal overlap and signal-to-noise ratio on male responsiveness in *Nezara viridula* (L.). *J. Exp. Biol.* **2010**, *213*, 3213–3222.
38. Žunič, A.; Virant-Doberlet, M.; Čokl, A. Species recognition during substrate-borne communication in *Nezara viridula* (L.) (Pentatomidae: Heteroptera). *J. Insect Behav.* **2011**, *24*, 468–487.
39. Slabbekoon, H.; Peet, M. Birds sing at a higher pitch in urban noise. *Nature* **2003**, *424*, 267.
40. Brumm, H.; Slabbekoon, H. Acoustic communication in noise. *Adv. Stud. Behav.* **2005**, *35*, 151–209.
41. Virant-Doberlet, M.; Mazzoni, V.; de Groot, M.; Polajnar, J.; Lucchi, A.; Symondson W.O.C.; Čokl, A. Vibrational communication in networks: Eavesdropping and biotic noise. In *Studying Vibrational Communication, Animal Signals and Communication*; Cocroft, R.B., Gogala, M., Hill, P.S.M., Wessel, A., Eds.; Springer, Berlin, Germany, 2014; pp. 93–123.
42. Gordon, S.D.; Sandoval, N.; Mazzoni, V.; Krugner, R. Mating interference of glassy-winged sharpshooters, *Homalodisca vitripennis*. *Entomol. Exp. Appl.* **2017**, *164*, 27–34.
43. Krugner, R.; Gordon, S.D. Mating disruption of *Homalodisca vitripennis* (Germar) (Hemiptera: Cicadellidae) by playback of vibrational signals in vineyard trellis. *Pest. Manag. Sci.* **2018**, *74*, 2013–2019.
44. Nieri, R.; Mazzoni, V. Vibrational mating disruption of *Empoasca vitis* by natural or artificial disturbance noises. *Pest. Man. Sci.* **2019**, *75*, 879–1198.
45. Polajnar, J.; Čokl, A. The effect of vibratory disturbance on sexual behaviour of the southern green stink bug *Nezara viridula* (Heteroptera, Pentatomidae). *Cent. Eur. J. Biol.* **2008**, *3*, 189–197.
46. Čokl, A.; Virant-Doberlet, M.; McDowell, A. Vibrational directionality in the southern green stink bug, *Nezara viridula* (L.), is mediated by female song. *Anim. Behav.* **1999**, *58*, 1277–1283.

-
47. Prešern, J.; Polajnar, J.; de Groot, M.; Zorović, M.; Virant-Doberlet, M. On the spot: Utilization of directional cues in vibrational communication of a stink bug. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–13.
 48. Čokl, A.; Žunič, A.; Laumann, R.A. Stink bug communication with multimodal signals transmitted through air and substrate. *Ent. Sci. J.* **2019**, *3*, 407–424.

RESULTADOS ADICIONAIS

Avaliação do efeito de sinais de rivalidade de fêmeas e machos de *E. heros* para coespecíficos.

Esta etapa do trabalho foi complementar aos experimentos realizados no trabalho previamente apresentado (Inhibitory copulation effect of vibrational rival female signals of three stink bugs species as a tool for mating disruption).

Neste caso foram desenvolvidos experimentos com o objetivo de avaliar o efeito dos sinais vibratórios quando os indivíduos (macho ou fêmeas) se encontravam individualmente nas plantas. Desta forma o intuito foi aprofundar o entendimento de como os sinais de rivalidade podem interferir na comunicação dos coespecíficos. O sinal de rivalidade dos machos foi incorporado para avaliar se possui um efeito disruptivo similar ao comprovado para as fêmeas. Assim além de ser avaliado o seu efeito nos insetos em forma individual o mesmo também foi avaliado quando reproduzido para casais

As metodologias desenvolvidas e análises de dados foram as mesmas que as descritas anteriormente (Inhibitory copulation effect of vibrational rival female signals of three stink bugs species as a tool for mating disruption).

Segundo o descrito anteriormente os experimentos consistiram em reproduzir os sinais de rivalidade para plantas de feijão. Os programas de estimulação com o canto de rivalidade das fêmeas foram os mesmos que os utilizados nos experimentos com casais das três espécies.

Um procedimento similar foi adotado para criar os programas de estimulação com sinais de rivalidade de machos de *E. heros*. Neste caso os sinais de rivalidade incluem uma sequência alternada de pulsos emitidos pelos machos, onde um dos machos emite uma série de pulsos e o rival responde com

um pulso individual, dando ao canto uma sequência tipo a-a-a-a-b-a-a-a-b, onde a e b representam os diferentes machos rivais (Blassioli-Moraes et al 2005).

Para obter os sinais de rivalidade dos machos foram colocados, na mesma folha, dois machos e uma fêmea de *E. heros*, e os sinais registrados segundo descrito na seção PEG. A descrição dos programas de estimulação utilizados está no Anexo I.

Os bioensaios foram realizados com casais coespecíficos (N= 30 para cada espécie e tratamento) também foram utilizados fêmeas ou machos individualmente (N = 20 para cada sexo e tratamento).

RESULTADOS

Experimentos com fêmeas e machos em forma individual e reprodução do sinal de rivalidade de fêmeas

Para facilitar a leitura os resultados apresentados foram somente os testes estatísticos significativos. Os resultados de todas as análises estatísticas se apresentam no Apêndice 1.

Nos experimentos onde foi reproduzido o sinal de rivalidade das fêmeas não foram observadas diferenças estatísticas na proporção de fêmeas ou machos de *E. heros*, que responderam emitindo sinais vibratórios em relação ao controle (plantas sem vibração) (Tabela 1.1).

As fêmeas de *E. heros* foram estimuladas a emitir sinais vibratórios quando em presença do sinal de rivalidade das fêmeas coespecíficas. O tempo de latência foi menor para as fêmeas que estiveram em plantas vibradas com o sinal de rivalidade (tratamento) em relação às plantas sem vibrações (controle)

($t = -3,661$, $gl = 20$, $p = 0,001$), os machos não mostraram diferenças significativas na latência (Figura 1.1 A). Adicionalmente o tempo de resposta (tempo em que o macho permaneceu emitindo sinais vibratórios) foi menor nos machos em plantas tratadas em relação às plantas controle ($t = -2,744$, $gl = 19$, $P = 0,012$) e as fêmeas não apresentaram diferença significativa (Figura 1.1 B).

Tabela 1.1. Resultados da análise de regressão logística e cálculo da razão de chance (IC 95%) para avaliação do efeito da reprodução de sinais de rivalidade de fêmea e macho de coespecíficos (Tratamento) para machos e fêmeas de *Euschistus heros* na proporção de insetos que emitiram sinais vibratórios (proporção de resposta). As variáveis foram computadas em forma binária (presença ausência do comportamento) e comparadas em relação ao observado nos casais colocados em situação de controle (plantas sem vibrações). Valores de razão de chance em negrito indicam efeito significativo do tratamento em relação ao controle.

| Tratamento | Variável | Estatística | Razão de chance (IC 95%) |
|------------------|-------------------|------------------------------|----------------------------|
| Rivalidade Fêmea | Resposta Fêmeas | $z=0,99$ $P=0,32$ $Gl=48$ | 1,86 (0,54 - 6,40) |
| | Resposta Machos | NA | |
| Rivalidade Macho | Resposta Fêmeas | $z= -0,78$ $P=0,46$ $Gl=77$ | 0,66 (0,21 - 2,0) |
| | Resposta Machos | NA | |
| | Resposta Fêmeas C | NA | |
| | Resposta Machos C | NA | |
| | Cópula | $z=-4,50$ $P < 0,05$ $Gl=58$ | 0,02 (0,004 - 0,11) |

Referências: Valores de razão de chance em negrito indicam efeito significativo do tratamento em relação ao controle. C= casal, experimentos feitos com casais. Resposta fêmeas= fêmeas que emitiram pelo menos um pulso de sinal vibratório durante o experimento. Resposta machos = machos que emitiram pelo menos um pulso de sinal vibratório durante o experimento. Cópula= casais que copularam durante a execução do experimento. NA= não avaliado, nestes tratamentos todos os insetos emitiram sinais vibratórios tanto no controle quanto no tratamento

Para avaliar o efeito dos sinais de rivalidade na estrutura dos sinais vibratórios emitidos pelos insetos foram considerados os parâmetros temporais e espectrais característicos destes sinais

A duração do pulso dos sinais foi afetada pela presença do sinal de rivalidade das fêmeas, fêmeas e machos emitiram pulsos menores em relação ao controle (Fêmea: $z = -152$, $gl = 916$, $P < 0,001$; Macho: $z = 103$, $gl = 814$, $P < 814$) (Figura 1.2 A). Os intervalos entre pulsos foram maiores nessas plantas tratadas em relação ao dos sinais vibratórios emitidos em plantas controle

(Fêmea: $z = 107$, $gl = 916$, $P < 0,001$; Macho: $z = 19$, $gl = 814$, $P < 0,001$) (Figura 1.2 B). Tanto machos quanto fêmeas não mostraram efeitos significativos do tratamento com o sinal de rivalidade das fêmeas no número de pulsos emitidos em relação aos insetos na situação controle (plantas sem vibrações) (Figura 1.2 C). A frequência dominante foi maior quando os insetos estiveram em plantas tratadas com sinal de rivalidade de fêmeas, em comparação com plantas controle (Fêmea: $z = 20$, $gl = 916$, $P < 0,001$; Macho: $z = 11$, $gl = 814$, $P < 0,001$) (Figura 1.2 D).

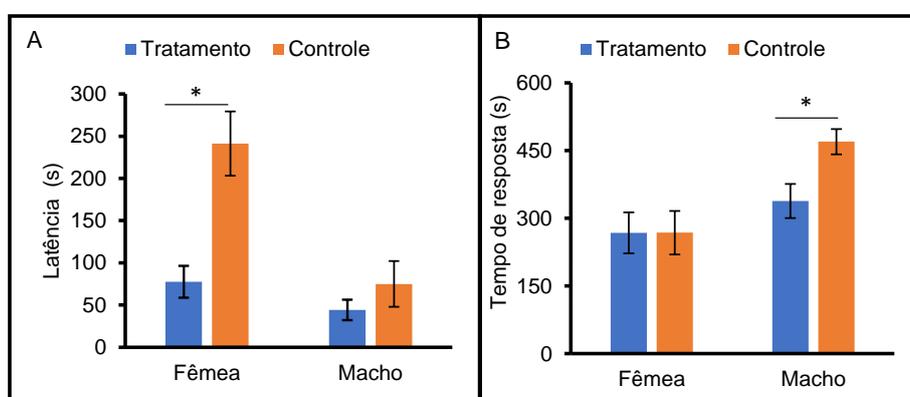


Figura 1.1. Resposta de fêmeas e machos de *E. heros* em plantas vibradas com sinal de rivalidade de fêmeas (Tratamento) ou não vibradas (Controle). A) Latência (média do tempo em segundos no qual o inseto emite primeiro canto) e B) Tempo de resposta (média do tempo em segundos no qual o inseto permaneceu cantando). As barras representam o número médio dos parâmetros e as linhas acima das barras representam o erro padrão. *acima das linhas das barras representam diferença estatística entre os tratamentos.

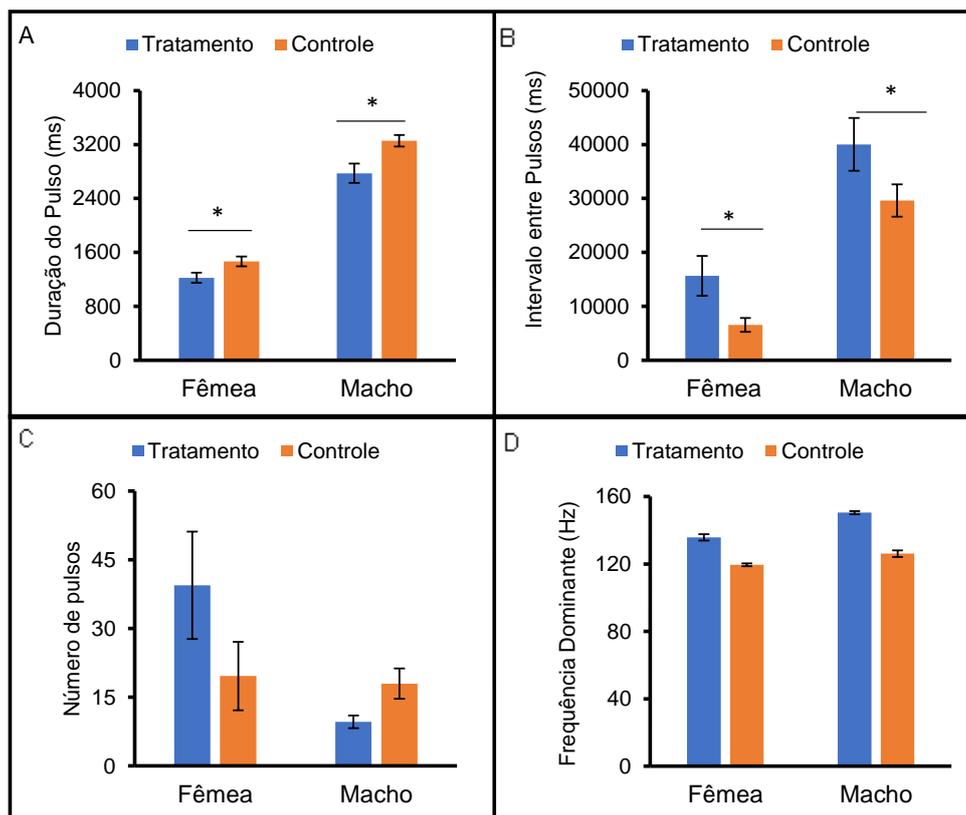


Figura 1.2. Parâmetros dos sinais emitidos por fêmeas e machos de *E. heros* em plantas vibradas com sinal de rivalidade de fêmeas (Tratamento) ou não vibradas (Controle). A) Duração do pulso (média do tempo em milissegundos). B) Intervalo entre os pulsos (média do tempo em milissegundos, do final de um pulso ao início do próximo). C) Média do número de pulsos. D) Frequência dominante (média da frequência dominante em um pulso, em Hz). As barras representam o número médio dos parâmetros e as linhas acima das barras representam o erro padrão. *acima das linhas das barras representam diferença estatística entre os tratamentos.

Experimentos com fêmeas e machos em forma individual e casais com a reprodução do sinal de rivalidade de machos

De forma similar ao observado quando os insetos estiveram em plantas com o sinal de rivalidade das fêmeas a proporção de insetos que emitiram sinais vibratórios (proporção de resposta) não diferiu nas plantas vibradas com o sinal de rivalidade dos machos e as plantas controle (sem vibração).

Em presença do sinal de rivalidade dos machos as fêmeas mostraram uma latência maior em relação às fêmeas em plantas controle ($t = -3$, $gl = 19$, $P =$

0.006) (Figura 1.3 A). A resposta dos machos não foi influenciada ao considerar este parâmetro comportamental.

Nas plantas vibradas com o sinal de rivalidade de machos, os machos emitiram sinais vibratórios num período menor de tempo em relação aos insetos em plantas controle ($t = -3$, $gl = 19$, $P = 0.006$). Para as fêmeas não foram observadas diferenças significativas (Figura 1.3 B).

Ao considerar os parâmetros dos sinais emitidos quando os insetos estiveram em contato com sinais de rivalidade de machos foram observadas respostas diferenciadas nas fêmeas e nos machos. Em plantas tratamento as fêmeas emitiram pulso de menor duração ($z = -40$, $gl = 546$, $P < 0,001$) e os machos pulsos mais longos ($z = 195$, $gl = 656$, $P < 0,001$) em relação aos pulsos emitidos pelos indivíduos em plantas controle (Figura 1.5. A). O intervalo entre pulsos foi maior para os insetos dos dois sexos quando os insetos estiveram nas plantas tratamento em relação aos insetos em plantas controle (Fêmea: $z = 338$, $gl = 546$, $P < 0,001$; Macho: $z = 2275$, $gl = 656$, $P < 0,001$) (Figura 1.5. B). O número de pulsos emitidos pelos machos nas plantas tratamento foi maior do que nas plantas controle ($t = -3$, $df = 19$, $P = 0.001$) as fêmeas não apresentaram diferença significativa neste parâmetro (Figura 1.5. C).

A variação na frequência dominante mostrou diferente tendência nos insetos dos dois sexos. Enquanto as fêmeas mostraram uma redução da frequência dos sinais emitidos em plantas vibradas com o sinal de rivalidade dos machos em relação às plantas controle ($z = -16$, $gl = 951$, $P < 0,001$) a frequência dominante dos machos aumentou nessa situação ($z = 14$, $gl = 656$, $P < 0,001$) (Figura 1.5 D).

Na situação onde as plantas foram vibradas com o sinal de rivalidade dos machos e os insetos estiveram nas plantas em presença de um coespecífico do sexo oposto nenhum dos parâmetros básicos do comportamento analisados, proporção de resposta (Tabela 1), latência e tempo de resposta (Figura 1.3 A e B), tanto nos machos quando nas fêmeas foi afetado em relação ao observado nas plantas controle. As fêmeas testadas isoladamente levaram mais tempo para começar a emitir sinais vibratórios quando não havia a presença do sinal de

rivalidade de macho ($t = -3.0839$, $gl = 19$, $P = 0.006$), para os machos não foram observadas diferenças significativas entre plantas tratamento e controle (Figura 1.3 A). Entretanto, os machos permaneceram menos tempo emitindo sinais vibratórios quando havia a presença do sinal de rivalidade de machos coespecíficos ($t = -3.0606$, $gl = 19$, $P = 0.006$) (Figura 1.3 B)

A duração dos pulsos dos sinais emitidos pelas fêmeas e os machos quando estiveram juntos nas plantas e em presença de sinais de rivalidade de machos mostrou uma tendência oposta à observada quando os insetos estiveram individualizados nas plantas e na presença do mesmo sinal. Quando em casais, a duração dos pulsos emitidos pelas fêmeas foi maior quando estimuladas com sinal de rivalidade dos machos comparado ao controle (Casal Fêmea: $z = 32$, $gl = 951$, $P < 0,001$; Fêmea: $z = -40$, $gl = 546$, $P < 0,001$) e a dos machos foi menor (Casal Macho: $z = -22$, $gl = 862$, $P < 0,001$; Macho: $z = -195$, $gl = 656$, $P < 0,001$) (Figura 1.5 A). O intervalo entre pulsos foi maior tanto para fêmeas quanto para machos nas plantas tratamento em relação às plantas controle (Casal Fêmea: $z = 1064$, $gl = 951$, $P < 0,001$; Fêmea: $z = 338$, $gl = 546$, $P < 0,001$ Casal Macho: $z = 207$, $gl = 862$, $P < 0,001$; Macho: $z = 2275$, $gl = 656$, $P < 0,001$) (Figura 1.5 B). Os machos testados individualmente ($t = -3.7762$, $df = 19$, $p\text{-value} = 0.001$) e as fêmeas em casais ($t = -2.1276$, $df = 27$, $p\text{-value} = 0.04265$) emitiram um maior número de pulsos nas plantas tratamento (Figura 1.5 C). Tanto os casais, e os machos testados individualmente emitiram sinais com frequência dominante maior nas plantas tratamento em relação aos sinais emitidos nas plantas controle (Casal Fêmea: $z = 22$, $gl = 951$, $P < 0,001$; Fêmea: $z = -16$, $gl = 546$, $P < 0,001$; Casal Macho: $z = 18$, $gl = 862$, $P < 0,001$; Macho: $z = 14$, $gl = 656$, $P < 0,001$), as fêmeas responderam de forma contrária (Figura 1.5 D).

Quando considerada a proporção de casais que copularam foi observado um claro efeito inibitório dos sinais de rivalidade dos machos ($z = -4,50$, $gl = 58$, $P < 0,05$) (Tabela 1, Figura 1.4).

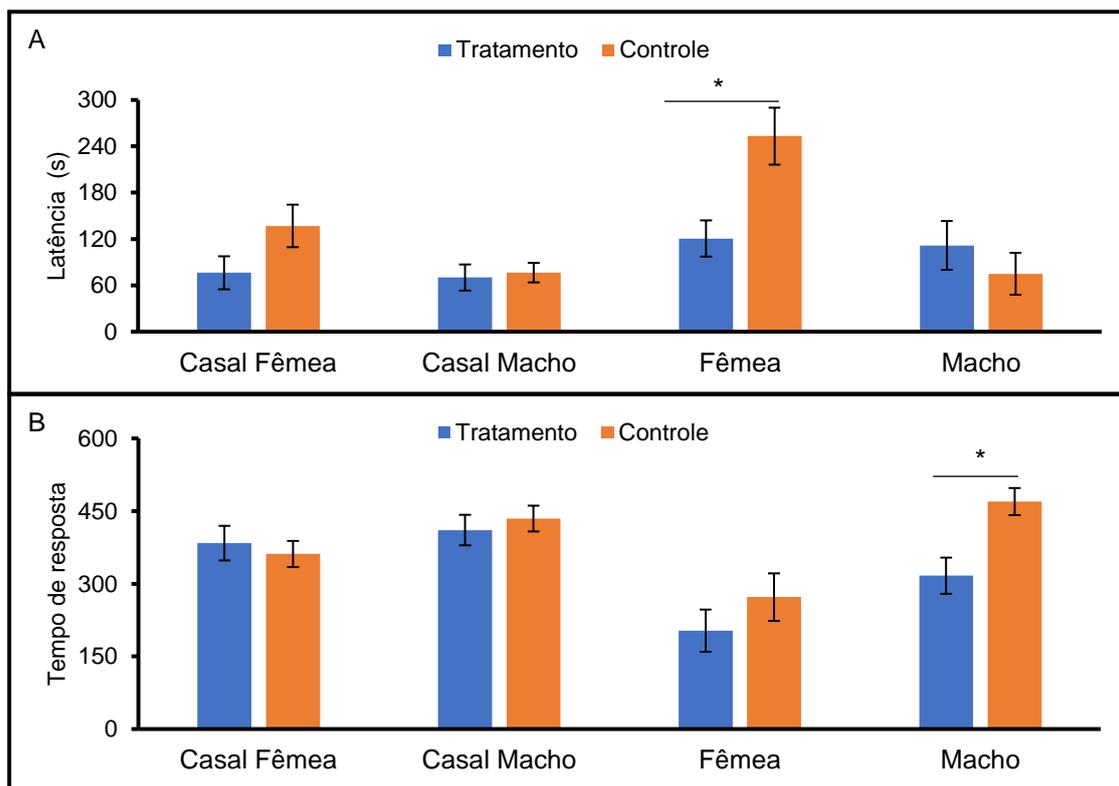


Figura 1.3. Resposta de fêmeas e machos de *E. heros* quando colocados em forma individual ou em casais (uma fêmea e um macho) em plantas vibradas com sinal de rivalidade de fêmeas (Tratamento) ou não vibradas (Controle) quando. A) Latência (média do tempo em segundos no qual o inseto emite primeiro canto) e B) Tempo de resposta (média do tempo em segundos no qual o inseto parou de cantar). As barras representam o número médio dos parâmetros e as linhas acima das barras representam o erro padrão. *acima das linhas das barras representam diferença estatística entre os tratamentos.

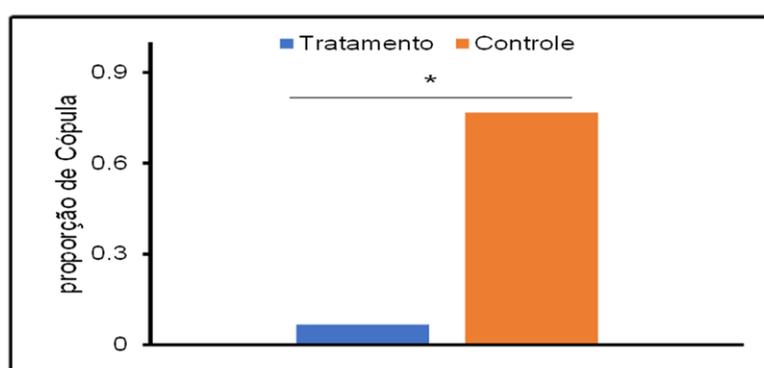


Figura 1.4. Proporção de bioensaios que terminaram com a cópula dos casais de *E. heros* em plantas com sinal vibratório de rivalidade de machos da espécie (Tratamento, barra azul) e plantas sem sinal (Controle, barra laranja). *acima das barras representam diferença estatística entre os tratamentos ($P < 0,05$).

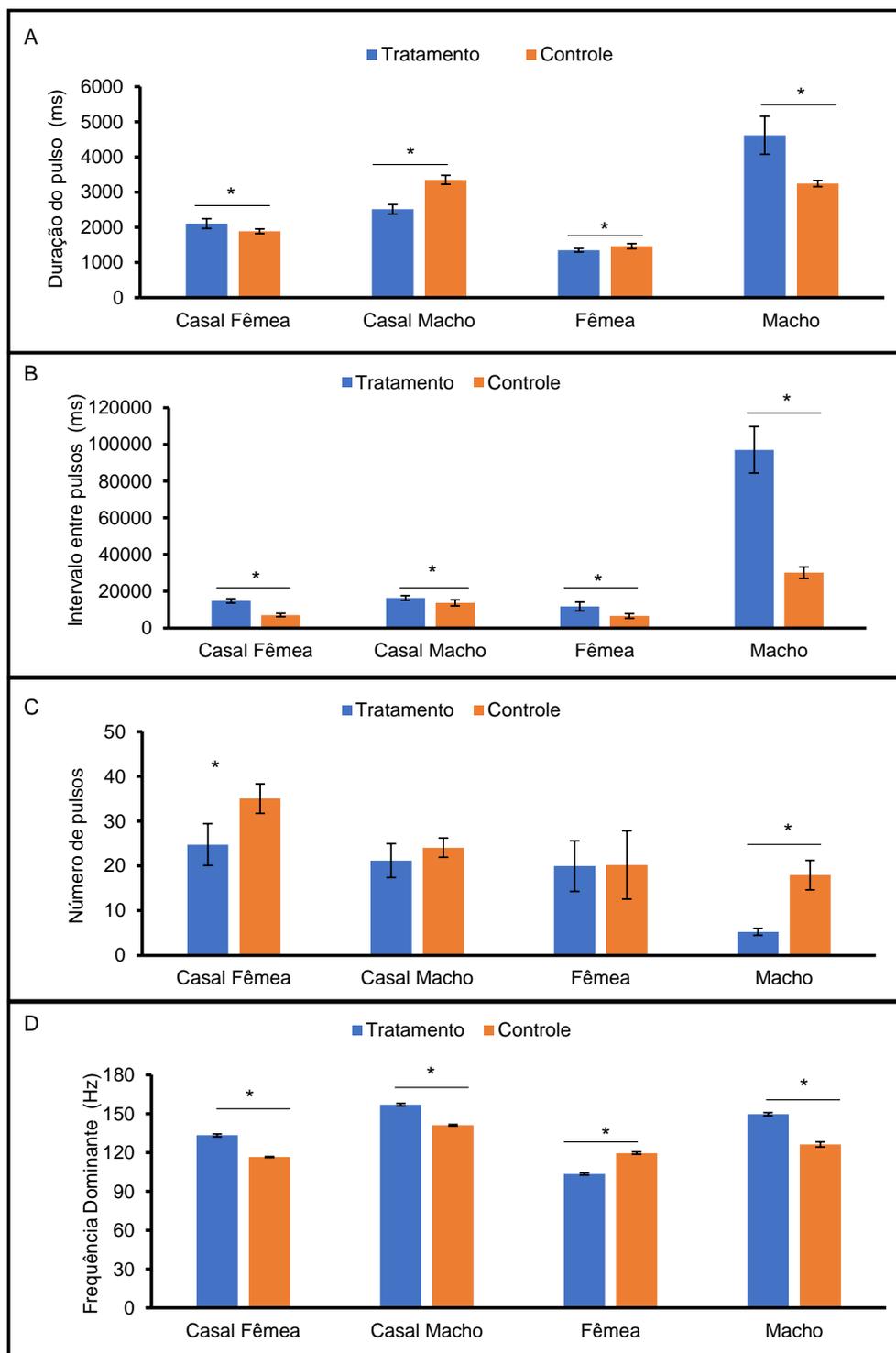


Figura 1.5. Parâmetros dos sinais emitidos por fêmeas e machos de *E. heros* quando colocados em forma individual ou em casais (uma fêmea e um macho) em plantas vibradas com sinal de rivalidade de fêmeas (Tratamento) ou não vibradas (Controle). A) Duração do pulso (média do tempo em milissegundos) B) Intervalo entre os pulsos (média do tempo, em milissegundos, do final de um pulso ao início do próximo), C) Média do número de pulsos e D) Frequência dominante (média da frequência dominante em um pulso, em Hz). As barras representam o número médio dos parâmetros e as linhas acima das barras representam o erro padrão. *acima das linhas das barras representam diferença estatística entre os tratamentos.

DISCUSSÃO

A disrupção de cópula no percevejo marrom *E. heros* foi primeiramente estudado utilizando a vibração contínua de tons puros como uma interferência de ruído de fundo (Laumann et al., 2018). Ao reproduzir os tons puros, entre 75 a 200Hz, foi observado uma redução da resposta dos machos aos sinais de chamamento de fêmea e ao comportamento de procura da fêmea na planta. Adicionalmente a reprodução destes tons puros também ocasionou a redução da proporção de cópulas de 94.2 a 100% em relação ao controle (Laumann et al., 2018). Porém, em experimentos de longa duração (24 h), a redução da cópula foi menor e chegou a 24,7% nas plantas com ruído de fundo em relação aos resultados obtidos em experimentos com plantas não estimuladas (Laumann et al., 2018). Esse resultado condiz com encontrado neste capítulo, uma vez que os playbacks de rivalidade interferiram na comunicação entre os pares na planta, atrapalhou a direcionalidade dos insetos na planta e reduziu o número de cópulas dos casais. Para confirmar se o efeito de disrupção do comportamento de cópula por rivalidade continua efetivo por várias horas, experimentos similares, mas com longa duração de transmissão de playbacks de rivalidade deve ser realizados.

O efeito de disrupção, causado por um ruído de fundo, na busca dos machos por fêmeas foi visto em *N. viridula* (Polajnar e Čokl, 2008). Nessa espécie a busca e orientação dos insetos na planta também foi afetada negativamente pela reprodução de playback de sinal de chamamento de fêmeas coespecíficas e heteroespecíficas (De Groot et al., 2010; 2011). O principal mecanismo que rege o direcionamento vibracional é a detecção e processamento da amplitude, a fase e/ou diferenças no tempo em que os detectores presentes na perna receberam os sinais distribuídos no substrato (Čokl et al., 1999; Prešern et al., 2018). Um ruído vibracional de fundo pode causar a disrupção na direcionalidade do percevejo na planta pela interferência na fase ou tempo da amplitude dos sinais.

Recentemente um estudo realizado com o psílídeo do tomate *Bactericera cockerelli* (Šulc) (Hemiptera: Triozidae) mostrou que a presença do playback de fêmeas e de ruído provocou um efeito disruptivo no comportamento sexual dos machos e casais, reduzindo a atividade do comportamento vibracional e diminuindo o número de cópulas dos casais, além de induzir as fêmeas que estavam com machos a competir com os playbacks tentando cobrir os sinais reproduzidos, e estabelecer um dueto com os machos (Avosani et al., 2020). Estes resultados conferem com os obtidos neste capítulo, uma vez que o playback tanto de fêmeas quanto de machos interferiu no comportamento sexual e vibracional dos percevejos testados.

Os resultados obtidos nesse capítulo sugerem uma possível estratégia de manejo de pragas, como uma ferramenta de manipulação e interrupção do comportamento sexual dos percevejos. O uso da estratégia de interrupção da cópula é mais difícil de se estabelecer em culturas cultivadas em grande escala, como é feito com a soja no Brasil e outros países, comparado aos estudos com aplicação em campo realizados até o momento (Raul et al., em preparação). No entanto, uma estratégia unindo o uso de feromônio sexual a sinais disruptivos de cópula em grandes áreas de cultura pode ser mais eficaz. O feromônio atrai os insetos a áreas específicas, em que o sinal vibracional disruptivo de cópula é transmitido nas plantas.

Pode-se concluir que o comportamento vibracional de percevejos da família Pentatomidae pode ser modificado por diferentes fatores existentes no meio que estão inseridos, como um alto nível populacional em uma planta, gerando comportamento de rivalidade entre machos e fêmeas. E esses sinais vibracionais podem ser usados como potenciais estratégias de controle de pragas, uma vez que diminuem a taxa de cópula dos casais, e uma grande oportunidade de desenvolvimento de um controle de pragas bioracional, ferramentas de manipulação do comportamento vibracional e interrupção do comportamento sexual podem se tornar estratégias promissoras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avosani, S.; Sullivan, T.E.; Ciolli, M.; Mazzoni, V.; Suckling, D.M. (2020). Can vibrational playbacks disrupt mating or influence other relevant behaviours in *Bactericera cockerelli* (Triozidae: Hemiptera). *Insects*. 11, 299, 1-13.
- Laumann, R.A.; Maccagnan, D.H.B.; Čokl, A.; Blassioli-Moraes, M.C.; Borges, M. (2018). Substrate-borne vibrations disrupt the mating behaviors of the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*: implications for pest management. *J. Pest. Sci.* 91, 995-1004.
- De Groot, M.; Čokl, A.; Virant-Doberlet, M. (2010). Effects of heterospecific and conspecific vibrational signal overlap and signal-to-noise ratio on male responsiveness in *Nezara viridula* (L.). *J. Exp. Biol.* 213, 3213-3222.
- De groot, Maarten, Čokl, Andrej, Virant-Doberlet, Meta. (2011) Species identity cues: possibilities for errors during vibrational communication on plant stems. *Behav. ecol.*, vol. 22, str. 1209-1217.
- Čokl, A.; Virant-Doberlet, M.; McDowell, A. (1999). Vibrational directionality in the southern green stink bug, *Nezara viridula* (L.), is mediated by female song. *Anim. Behav.* 58, 1277-1283
- Polajnar, J.; Čokl, A. (2008). The effect of vibratory disturbance on sexual behaviour of the southern green stink bug *Nezara viridula* (Heteroptera, Pentatomidae). *Cent. Eur. J. Biol.* 3 189-197.
- Prešern, J.; Polajnar, J.; de Groot, M.; Zorović, M.; Virant-Doberlet, M. (2018). On the spot: utilization of directional cues in vibrational communication of a stink bug. *Sci. Rep.* 8, 1-13.

CAPÍTULO II

*RELAÇÕES INTERESPECÍFICAS, INTERAÇÕES
ENTRE PERCEVEJOS HERBÍVOROS E
PREDADORES E SEUS EFEITOS NA
COMUNICAÇÃO VIBRACIONAL DE PERCEVEJOS*

INTRODUÇÃO

Nos insetos, a comunicação sexual tem sido considerada como uma forma de intercâmbio de informação mais ou menos privativa, que acontece em canais específicos e isolados (Kuhelje Virant-Doberlet, 2017). Esta premissa tem condicionado a investigação dos mecanismos e comportamento envolvidos na comunicação sexual a experimentos onde somente se considera a participação de um emissor e um receptor.

Entretanto, na natureza, a comunicação é mais complexa e envolve uma série de atores, seja coespecíficos, formando redes de comunicação, com vários emissores e receptores atuando conjuntamente (Mc Gregor, 2000, McGregor e Peake, 2005, Peake, 2005), ou heteroespecíficos, que podem invadir os canais de comunicação e atuar como rivais, competidores ou antagonistas (por exemplo predadores ou parasitoides) (Rose et al., 2020). Estas interações também podem ser benéficas aumentando as chances de encontro de parceiros, de dispersão dos sinais ao sinalizar em grupos (corais) ou reduzindo o risco de predação (Virant-Doberlet et al., 2017). Um caso interessante é o relatado para mamíferos das savanas africanas, diferentes espécies que possuem os mesmos predadores adquiriram a habilidade de identificar sinais de alarme de espécies diferentes e assim fugir de seus predadores (Meise et al., 2018), este mecanismo é desconhecido para insetos.

Por outra parte os herbívoros também podem identificar vibrações de seus inimigos naturais e assim se defenderem da predação, lagartas de *Semiothisa aemulataria* (Walker, 1861) (Geometridae) quando exposta a vibrações de 200 Hz, estímulo que mimetizam o percevejo predador *Podisus maculiventris* (Say, 1832), ou a vibrações produzidas pela vespa *Polistes fuscatus* (Fabricius, 1793) quando pousa na planta, responderam com o comportamento defensivo, se pendurando na folha através de um fio de seda (Castellanos e Barbosa, 2006). As lagartas de lepidóptera também possuem a capacidade de discriminar

vibrações de diferentes fontes como coespecíficos, predadores e vibrações causadas por fatores abióticos (vento ou chuva) com base nas frequências e amplitude das mesmas, como foi demonstrado para *Drepana arcuata* (Drepanidae) (Walker, 1855) (Guedes et al., 2012).

Em agroecossistemas existem diferentes tipos de pragas fitófagas e inimigos naturais, e a comunicação intraespecífica destes animais pode ser disruptiva para seus heteroespecíficos (De Groot et al., 2010, 2011) ou benéficas na localização de hospedeiros ou presas nas plantas (Laumann et al., 2007, 2011, Castellanos e Barbosa, 2006).

Os percevejos (Hemiptera: Pentatomidae) utilizam sinais vibratórios durante a fase final do seu comportamento reprodutivo. Os sinais vibratórios atuam na troca de informação entre os indivíduos quando estes se encontram a distâncias moderadas (1 a 2 metros) ou curtas (poucos centímetros ou contatos físicos). Utilizando os sinais vibratórios os insetos recebem e enviam informação a respeito do sexo, receptividade para a cópula e localização (Čokl e Virant-Doberlet, 2003).

No entanto esse canal não é exclusivamente privativo, sinais de outras espécies de percevejos podem interferir na comunicação incrementando o ruído ambiental. Por exemplo, a comunicação de *Nezara viridula* e o comportamento de busca de machos é afetado pela presença de sinais de outra espécie de percevejos. Em experimentos onde os sinais das fêmeas da espécie foram reproduzidos numa das folhas de plantas de feijão e sinais de *Chinavia hilare* (Say, 1832) em outra folha foi observado que os machos reduzem o comportamento de busca e, em algumas situações, fazem escolhas erradas se orientando para a fonte de sinais vibratórios dos heteroespecíficos (De Groot et al., 2010; 2011).

Outra fonte de interferência podem os inimigos naturais que, atuando como espiões, utilizam os sinais vibratórios de seus hospedeiros como pistas quando forrageiam. O parasitoide de ovos *Telenomus podisisi* (Ashmead, 1893) (Hymenoptera: Scelionidae) é atraído pelo sinal de chamamento de fêmeas de *E. heros*, seu hospedeiro preferencial, e esta atração é específica uma vez que

as vespas escolheram os sinais de fêmeas ao invés dos de macho, ou de outras espécies de percevejos (Laumann et al., 2007, 2011).

A cultura de soja no Brasil apresenta um grande complexo de insetos praga e inimigos naturais (Panizzi, 2013). Os percevejos da família Pentatomidae são considerados praga chave pela sua ampla distribuição geográfica, abundância nas culturas e injúrias causadas aos grãos (Panizzi, 1997, Panizzi, 2013, Aquino et al., 2019). A presença e evolução populacional dos percevejos nas culturas estão diretamente relacionadas ao seu sucesso reprodutivo. Este é fortemente condicionado pela eficiente comunicação sexual (Žunic et al., 2011) estabelecida com sinais de diferente natureza como feromônios e sinais vibratórios (Borges e Blassioli-Moraes, 2017; Čoklet al., 2017, 2019).

O percevejo marrom *E. heros* é a praga mais abundante atualmente nas plantações de soja (Aquino et al., 2019) e seu comportamento e biologia são estudados para o estabelecimento de um manejo integrado de pragas mais eficiente em campo. Hoje esta praga é controlada, principalmente, com aplicação de inseticidas que muitas vezes são aplicados de forma indiscriminada com os consequentes impactos ambientais (Corrêa-Ferreira et al., 2009, Panizzi, 2013, Bortolotto et al., 2015). A procura por métodos alternativos e bioracionais para o manejo deste e outros percevejos praga pode contribuir para o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável.

O objetivo deste capítulo foi avaliar interações interespecíficas de sinais vibratórios de percevejos fitófagos e predadores avaliando os efeitos na comunicação vibracional das espécies, e identificar sinais com potencial para interferir ou inibir a comunicação vibracional e o comportamento reprodutivo de percevejos fitófagos

Para isso foram selecionadas três espécies de percevejos herbívoros que são frequentemente encontrados em plantios de soja *E. heros*, *Chinavia ubica* e *Chinavia impicticornis*, e o percevejo predador *Podisus nigrispinus*.

Foram avaliadas as seguintes hipóteses:

- 1) Existe interferência entre sinais de percevejos de espécies diferentes quando presentes ao mesmo tempo no ambiente. Esta interferência pode ser expressada com mudanças nos parâmetros temporais e espectrais dos sinais de percevejos.
- 2) A emissão de sinais vibratórios por uma espécie de percevejo tem efeito inibitório na comunicação e cópula em indivíduos de outras espécies;
- 3) A emissão de sinais vibratórios por percevejos predadores e sua identificação por percevejos fitófagos produz, nestes últimos, inibição da comunicação e desenvolvimento de comportamentos defensivos;
- 4) Os percevejos predadores utilizam sinais vibratórios de percevejos herbívoros como fonte de informação espacial mostrando movimento direcionados à fontes de emissão desses sinais.

MATERIAL E MÉTODOS

Criação dos Insetos:

Os percevejos foram criados e mantidos em condições laboratoriais como descrito na seção PEG.

Os percevejos predadores da espécie *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae) foram mantidos em colônias de laboratório seguindo os protocolos descritos em Pires et al. (2009). Os adultos foram colocados em caixas gerbox (Dimensões: 11 x 11 x 3,5cm; Capacidade: 250ml). Cinco casais foram colocados em cada caixa e alimentados com 10 larvas e 5 pupas do besouro *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera:

Tenebrionidae). Como complemento da alimentação foram colocadas vagens frescas de feijão. Um copo de plástico de 50 mL cortado ao meio (4 cm de diâmetros e 1,5 cm de altura) com um algodão embebido em água foi oferecido como fonte de água e para manter a umidade na caixa. As larvas e pupas foram oferecidas diariamente assim como a coleta de ovos e limpeza geral das caixas. Os ovos foram colocados em placas de Petri com vagens frescas de feijão para eclosão das ninfas, que assim foram mantidas até chegarem a segundo instar. Posteriormente as ninfas foram colocadas em caixas gerbox e mantidas da mesma forma que os adultos.

Para os experimentos foram utilizados adultos (fêmeas e machos), que já haviam tido experiência de cópula. Como foi testado o comportamento de busca por presas, previamente aos bioensaios, estes insetos foram deixados 24 horas sem alimentação. Para isso foram isolados em um tubo Falcon de 50 mL, fechado com um tecido tipo organza, e somente um algodão, umedecido com água, foi colocado no final do tubo de ensaio besouros *T. molitor* foram criados em caixas de plástico com tampa (8 L). Os insetos foram alimentados com farelo de milho, farelo de trigo e leite em pó (40:50:10) e vagens frescas de feijão colocadas sobre a dieta, as quais serviam tanto para alimentação quanto para manter humidade. A troca de alimento e limpeza geral da colônia se realizou em intervalos de 20 a 30 dias. Nestes momentos foram separados adultos de larvas e pupas. A colônia foi mantida em salas climatizadas a $26.0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e $65 \pm 10\%$ UR com fotoperíodo de 14L:10O, no laboratório de Semioquímicos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Cultivo das Plantas

Nos experimentos foram utilizadas plantas de feijão, cultivadas e condicionadas segundo descrito na sessão PEG.

Bioensaios comportamentais

Efeito de sinais de heteroespecíficos na comunicação vibracional e cópula de Euschistus heros e Chinavia impicticornis.

Para avaliar as interações durante o comportamento sexual entre insetos de espécies diferentes foram feitos bioensaios comportamentais com a retransmissão de sinais através de plantas.

Para os bioensaios foram construídos programas de estimulação utilizando sequências dos cantos de chamamento das fêmeas de *E. heros* (FS1 segundo Blassioli-Moraes et al., 2005), de *C. impicticornis* e *C. ubica* (FS-1a, segundo Laumann et al., 2016) e dos machos de *P. nigrispinus* MS1 (Laumann et al., 2013). Estes sinais foram selecionados pelas suas características similares. Todos são produzidos em longas sequências com pulsos ou trem de pulsos emitidos a intervalos regulares. Para construir os programas foram selecionadas sequências de 5 indivíduos diferentes de cada espécie. A amplitude de todos os sinais foi normalizada para valores equivalentes aos da emissão natural dos insetos registrados em substratos não ressonantes (alto-falantes, Laumann et al., 2013, 2016). Os oscilogramas dos programas de estimulação utilizados estão no Apêndice II.

Um macho e uma fêmea de cada espécie avaliada foram colocados simultaneamente em folhas opostas de uma planta de feijão, nas quais foram reproduzidos os programas de estimulação (tratamento) ou se mantiveram sem vibrações (controle). Para reproduzir os sinais se seguiram os procedimentos descritos em PEG. Foram realizadas as seguintes combinações de tratamentos:

Reprodução do sinal FS-1a de *Chinavia impicticornis* (SCi) para um casal de *E. heros*

Reprodução do sinal FS-1a de *Chinavia ubica* (SCu) para um casal de *E. heros*

Reprodução do sinal MS1 de *Podisus nigrispinus* (SPn) para um casal de *E. heros*

Reprodução do sinal FS1 *E. heros* (SEh) para um casal de *C. impicticornis*

Reprodução do sinal FS-1a de *Chinavia ubica* (SCu) para um casal de *C. impicticornis*

Para cada combinação de tratamentos foram realizadas 30 repetições num desenho experimental completamente aleatorizado onde os diferentes programas de estimulação foram trocados a cada cinco repetições junto com as plantas.

O comportamento dos insetos foi monitorado por observação direta e foi registrado em ata durante 20 minutos. Durante todo esse intervalo de tempo os sinais vibratórios emitidos pelos insetos foram registrados seguindo as metodologias descritas em PEG.

Os comportamentos registrados foram: Proporção de resposta (proporção de casais em que ao menos um inseto emitiu um sinal vibratório ou mais em relação ao total de casais avaliados) latência (s) (tempo desde o início do bioensaio até que o inseto emite o primeiro sinal vibratório) tempo de resposta (s) (tempo em que o inseto permanece emitindo sinais vibratórios), número de pulsos emitidos por cada inseto durante o bioensaio, e proporção de casais que finalizaram o bioensaio com a cópula. Os parâmetros dos sinais vibratórios registrados e analisados foram frequência dominante (Hz), duração dos pulsos e intervalo entre pulsos (ambos em ms). Esses dados foram todos passados para planilhas e depois processados para as análises estatísticas e representação gráfica dos resultados.

Respostas do percevejo predador Podisus nigrispinus a sinais vibratórios de presas potenciais (Euschistus heros)

Foram feitos experimentos para testar a atração dos sinais vibratórios de uma presa potencial *E. heros* para o percevejo predador *P. nigrispinus*.

Para isso, foram utilizadas arenas de dupla escolha (Laumann e Macagnan, não publicado). Estas arenas foram construídas com uma prancha

de acrílico (40 cm x 32 cm) com um furo central em formato “Y” (corpo 20 cm; braços 17 cm cada um), o qual foi vedada na parte superior e inferior com placas de vidros (40 cm x 32 cm x 4 mm) para o inseto não escapar. O piso da arena foi preenchido com papel Panamá de cor cinza e 1,62 mm de espessura, cortado no formato do “Y” que serviu como substrato para transmissão dos sinais. Para transmitir os sinais ao papel, o vidro inferior da arena foi perfurado (furo de 0,7 cm diâmetro) na região coincidente com a finalização de um dos braços da arena (~1 cm da finalização). Este furo permitiu a entrada da agulha do Minishaker, para mantê-la em contato com o piso de papel. Para evitar a difusão das vibrações para o braço oposto da arena, na região de bifurcação do Y a base de papel foi cortada, estabelecendo uma fenda de 1 mm (Figura 2.1) entre os dois braços. Desta forma a arena possui uma região que vibra formada por um dos braços do Y e o corpo central da arena e uma região que não vibra (braço oposto da arena). Assim a arena mimetiza o caule central de uma planta e sua bifurcação e permite avaliar a escolha do inseto por uma área com vibrações e uma área sem vibrações (Figura 2.1).

Para os bioensaios foram utilizados programas de estimulação construídos com sinais de chamamentos de fêmeas de *E. heros*. Esta espécie foi selecionada por ser a mais frequente e abundante na cultura da soja. Os programas (N = 5) foram construídos seguindo os mesmos procedimentos previamente descritos. Durante todo o período dos bioensaios os programas de estimulação foram reproduzidos seguindo as metodologias descritas em PEG para reprodução de sinais. A descrição dos programas de estimulação utilizados está no Anexo II.

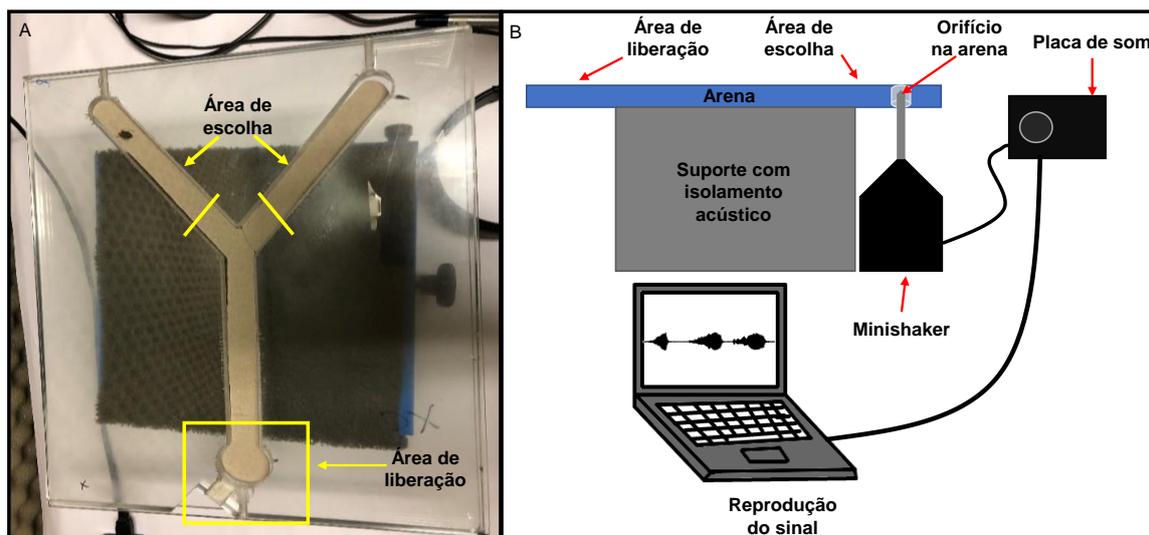


Figura 2.1. A) Arena de dupla escolha em formato de Y. B) Desenho esquemático do bioensaio.

Para os bioensaios um macho ou uma fêmea de *P. nigrispinus* foram colocados individualmente no extremo final do braço comum do olfatômetro (base do Y), e um dos programas de estimulação foi retransmitido através do papel Panamá durante 10 minutos. Durante este período o comportamento do percevejo foi monitorado registrando escolha inicial (braço do olfatômetro onde o inseto entrou em primeiro lugar se deslocando nele até pelo menos um terço do seu comprimento) e o tempo de residência (s) (tempo em que o inseto permaneceu em cada um dos braços da arena). Como controle e para evitar qualquer possível viés da arena foram realizados bioensaios onde nenhum dos braços foi vibrado. Foram realizadas 20 repetições para cada combinação de tratamentos num modelo completamente aleatorizado com mudança dos programas de estimulação e insetos (machos ou fêmeas) a cada 3 bioensaios, quando a base de papel da arena foi trocada. A cada 5 bioensaios os braços tratamento e controle foram invertidos girando o vidro inferior da arena para permitir que o furo fique na posição correta.

Análise de dados

A proporção de resposta, proporção de sinais de cada tipo emitidos por fêmeas e machos e a proporção de cópulas de cada espécie e entre as plantas dos diferentes tratamentos (vibradas com sinais de diferentes espécies de

perceijos de rivalidade coespecíficas) e controle (sem vibração) foram comparadas utilizando um modelo de regressão logística considerando respostas binárias como variável. Os coeficientes da regressão logística e seus correspondentes desvios padrões foram utilizados para calcular a razão de chances (oddsratios - OR) e seus correspondentes intervalos de confiança de 95% (IC 95%). Com a razão de chances pode se estimar se a probabilidade de que os comportamentos considerados sejam desenvolvidos pelos insetos se reduzem ($OR < 1$) ou se os incrementa ($OR > 1$) quando os insetos estiveram nas plantas tratamento em relação ao observado nas plantas controle. A razão de chance foi considerada significativa se o seu IC 95% não inclui o valor de 1.

A latência, tempo de resposta e número de pulsos foram avaliados com o teste de Shapiro-Wilk. Quando os dados apresentaram distribuição normal os valores obtidos nas plantas com os diferentes tratamentos e nas plantas controle foram comparados por uma análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, considerando os dados obtidos no mesmo indivíduo como medidas repetidas. Para comparar os valores médios dos diferentes tratamentos foi utilizado o teste de Tukey quando os dados não apresentaram normalidade, foram analisados com modelos lineares generalizados mistos (GLMM) e análise de deviança (ANODEV) com distribuição de erros Gamma, considerando os parâmetros como variável resposta, a condição em que os insetos foram expostos (tratamento ou controle) como fator explicativo e os indivíduos como efeitos aleatórios. Para comparar os valores médios dos diferentes tratamentos foram utilizadas análises de contraste.

Nos experimentos em arenas de dupla escolha para comprar a primeira escolha entre os lados da arena foi realizada um teste de regressão logística para estimar a probabilidade de escolha para o braço tratamento. O teste de χ^2 de Wald foi utilizado para avaliar a hipótese de não preferência (50% de probabilidade de escolha para cada lado) entre os braços tratamento e controle da arena. O tempo de residência em cada lado da arena foi comparado utilizando o teste de *Wilcoxon*. Todas análises foram realizadas na plataforma R versão 4.0.0 (R Development Core Time, 2020) utilizando o pacote lme4 para as análises GLMM.

RESULTADOS

Os resultados de todas as análises estatísticas se apresentam no Apêndice 2

Efeito de sinais de heteroespecíficos na comunicação vibracional e cópula de *E. heros* e *C. ubica*

A comunicação vibracional e comportamento de cópula de *E. heros* não foram influenciados negativamente pelos sinais de heteroespecíficos (Figura 2.2 e Tabela 2.1). Não foram observados efeitos significativos dos tratamentos (plantas vibradas com sinais de heteroespecíficos) na proporção de resposta de fêmeas e machos e na proporção de cópula em relação às plantas controle (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Resultados da análise de regressão logística e cálculo de razão de chance (IC 95%) para avaliação do efeito da reprodução de sinais heteroespecíficas (Tratamento) para *Euschistus heros* e *Chinavia impicticornis*. As variáveis foram computadas em forma binária (presença ausência do comportamento) e comparadas em relação ao observado nos casais colocados em plantas sem vibrações (Controle). Valores de razão de chance em negrito indicam efeito significativo do tratamento em relação ao controle.

| <i>Espécie avaliada</i> | Variável | Estatística | Razão de chance (IC 95%) |
|--------------------------------------|-----------------|------------------------------|-----------------------------|
| Tratamento | | | |
| <i>Euschistus heros</i> | | | |
| <i>SCi</i> | Resposta Fêmeas | $z = -1,30$ P = 0,19 Df = 58 | 0,22 (0,02 - 2,14) |
| | Resposta Machos | NA | |
| | Copula | $z = -0,58$ P = 0,56 Df = 58 | 0,71 (0,22 - 2,25) |
| <i>SCu</i> | Resposta Fêmeas | $z = -1,56$ P = 0,12 Df = 58 | 0,17 (0,02 - 1,58) |
| | Resposta Machos | $z = -1,30$ P = 0,19 Df = 58 | 0,22 (0,02 - 2,14) |
| | Copula | $z = -1,62$ P = 0,10 Df = 58 | 0,40 (0,13 - 1,21) |
| <i>SPn</i> | Resposta Fêmeas | $z = -1,56$ P = 0,12 Df = 58 | 0,17 (0,02 - 1,58) |
| | Resposta Machos | $z = -0,99$ P = 0,32 Df = 58 | 0,31 (0,03 - 3,17) |
| | Copula | $z = -0,58$ P = 0,56 Df = 58 | 0,71 (0,22 - 2,25) |
| <i>Chinavia impicticornis</i> | | | |
| <i>SCu</i> | Resposta Fêmeas | $z = -2,13$ P = 0,03 Df = 56 | 0,27 (0,08 - 0,90) |
| | Resposta Machos | $z = -3,89$ P < 0,05 Df = 56 | 0,01 (0,001 - 0,12) |
| | Copula | $z = -2,08$ P = 0,04 Df = 56 | 0,17 (0,03 - 0,90) |
| <i>SEh</i> | Resposta Fêmeas | $z = -3,28$ P < 0,05 Df = 56 | 0,13 (0,04 - 0,44) |
| | Resposta Machos | $z = -3,89$ P < 0,05 Df = 56 | 0,01 (0,001 - 0,12) |
| | Copula | $z = -2,17$ P = 0,03 Df = 56 | 0,16 (0,03 - 0,84) |

Referências: Resposta fêmeas = fêmeas que emitiram pelo menos um pulso de sinal vibratório durante o experimento. Resposta machos = machos que emitiram pelo menos um pulso de sinal vibratório durante o experimento. Cópula= casais que copularam durante a execução do experimento. NA= não avaliado, neste tratamento todos os machos emitiram sinais vibratórios tanto no controle quanto no tratamento.

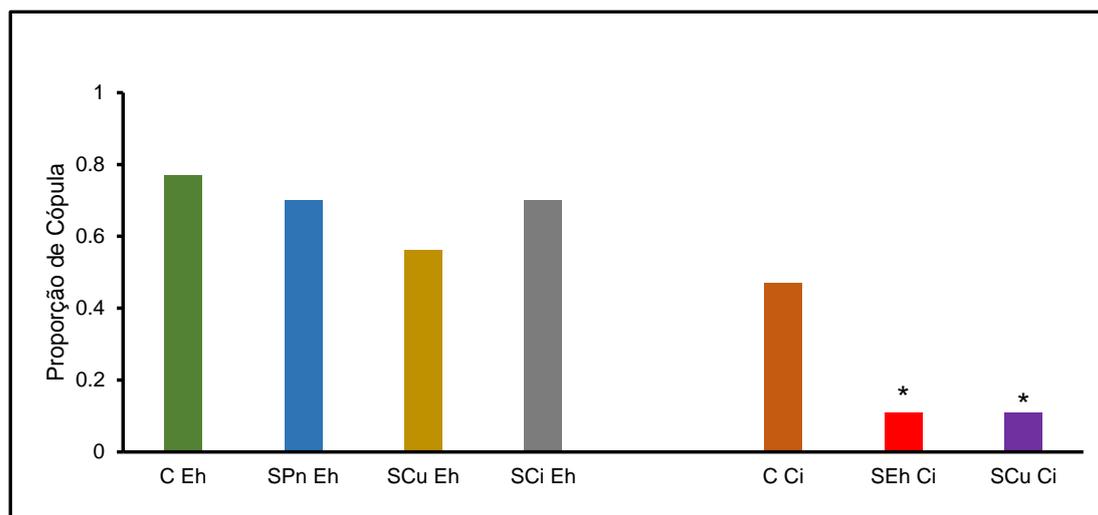


Figura 2.2. Proporção de bioensaios que terminaram com a cópula dos casais de *E. heros* (Eh) e *C. impicticornis* (Ci) em plantas vibradas com sinais vibratórios de heteroespecíficos ou plantas sem vibrações (controle). C Controle, plantas em vibração; SCi: plantas vibradas com sinal FS-1a de *C. impicticornis*; SCu: plantas vibradas com sinal de FS-1a de *C. ubica*; SPn: plantas vibradas com MS-1: sinal MS1 de *P. nigrispinus*. As letras acima das linhas representam diferença estatística entre os tratamentos (Análise de Regressão logística $P < 0,05$).

Para *C. impicticornis* foi comprovado um claro efeito inibidor tanto na emissão de sinais vibratórios quando da cópula quando os insetos estiveram em plantas vibradas com sinais das três espécies avaliadas em relação ao observado em plantas controle (Tabela 2.1) (Figura 2.2).

Em *E. heros*, também não foram observados efeitos significativos na latência e tempo de resposta dos indivíduos que iniciaram a comunicação vibracional (Figura 2.3 A e B). Um resultado similar foi observado para *C. impicticornis* quando se considerou a latência. Entretanto, o tempo de resposta tanto das fêmeas quanto dos machos foi diferente entre os tratamentos (Fêmea: $F = 34,95$; $gl = 46$; $P < 0,001$; Macho: $F = 27,39$; $gl = 33$; $P < 0,001$) (Figura 2.4 A e B). Os machos e as fêmeas permaneceram mais tempo emitindo sinais nas plantas controle (sem vibrações) em relação às plantas vibradas com sinais SCu ou SEh (testes de contrastes $P < 0,05$) (Figura 2.4 B).

O número de pulsos emitidos pelas fêmeas de *E. heros* variou significativamente entre os tratamentos ($F = 1737,3$; $gl = 104$, $P < 0,001$). As fêmeas emitiram um maior número de pulsos nas plantas vibradas com SCi, seguidas pelas fêmeas nas plantas controle e SCu e SPn (testes de contrastes

$P < 0,05$) (Figura 2.3 C). No caso dos machos somente foi observada uma redução do número de pulsos quando os insetos estiveram em plantas vibradas com MSPn ($F = 944,94$; $gl = 111$, $P < 0,001$ e testes de contrastes $P < 0,05$) (Figura 2.3 C). Para *C. impicticornis* não foram observadas diferenças no número de pulsos emitidos por machos e fêmeas nas diferentes condições experimentais (Figura 2.4 C).

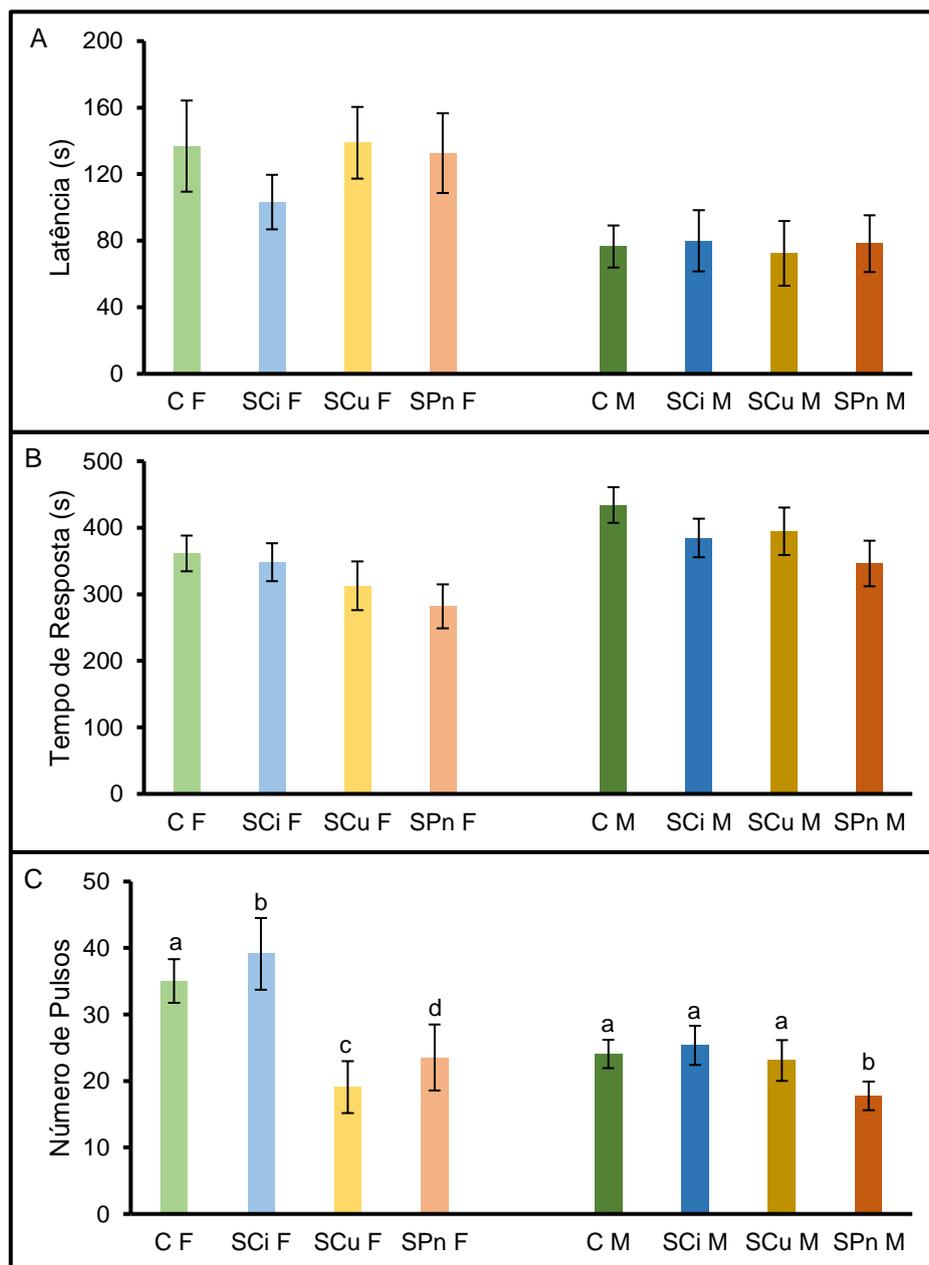


Figura 2.3. Efeito de sinais de heteroespecíficos na dinâmica de emissão de sinais vibratórios de fêmeas (F) e machos (M) de *E. heros*. A) Latência (tempo desde o início do bioensaio até que o inseto emite o primeiro sinal vibratório). B) Tempo de resposta (média do tempo em segundos no qual o inseto permaneceu cantando) C) Número de pulsos emitidos. C Controle, plantas em vibração; SCi: plantas vibradas com sinal FS-1a de *C. impicticornis*; SCu: plantas vibradas com sinal de FS-1a de *C. ubica*; SPn: plantas vibradas com MS-1: sinal MS1de *P. nigrispinus*. As Barras representam os valores médios dos parâmetros e linhas EP. As letras acima das linhas representam diferença estatística entre os tratamentos (teste de contrastes, $P < 0,05$).

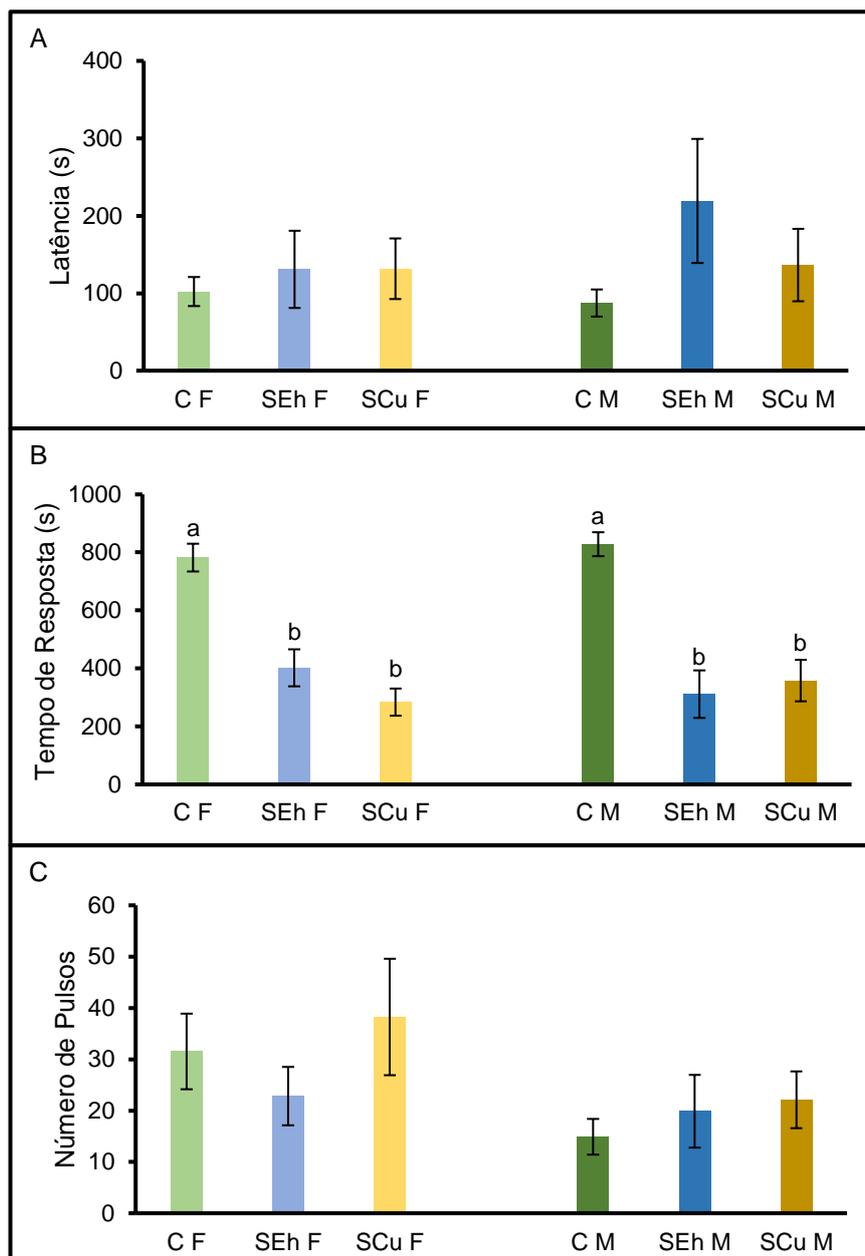


Figura 2.4. Efeito de sinais de heteroespecíficos na dinâmica de emissão de sinais vibratórios de fêmeas (F) e machos (M) de *Chinvia impicticornis*. A) Latência (tempo desde o início do bioensaio até que o inseto emite o primeiro sinal vibratório), B) Tempo de resposta (média do tempo em segundos no qual o inseto permaneceu cantando) e C) Número de pulsos emitidos. C) Controle, plantas em vibração; SEh: plantas vibradas com sinal FS1 de *E. heros*; SCu: plantas vibradas com sinal de FS-1a de *C. ubica*. As barras representam os valores médios dos parâmetros e linhas EP. As letras acima das linhas representam diferença estatística entre os tratamentos (teste de contrastes, $P < 0,05$).

Respostas do percevejo predador *Podisus nigrispinus* a sinais vibratórios de presas potenciais (*Euschistus heros*)

Nos bioensaios nos quais nenhum dos braços da arena foi vibrado com sinais FS1 de *E. heros* nem as fêmeas e nem os machos de *P. nigrispinus* mostraram preferência por um dos braços (Figura 2.5 e 6 A). Da mesma forma o tempo de residência não mostrou diferenças entre os tratamentos (Figura 2.5 e 6 C). Quando um dos braços da arena experimental foi vibrado com o sinal FS1 da fêmea de *E. heros*, as fêmeas de *P. nigrispinus* não mostraram preferência por este tratamento em relação ao controle (Figura 2.5 B). Os machos de *P. nigrispinus* mostraram clara preferência pelas áreas da arena com vibrações de fêmeas de *E. heros* (escolha inicial: $\chi^2 = 6$, gl = 1, $P = 0,03$), tempo de residência resultado: $t = -3,14$, gl = 14, $P = 0,007$) (Figura 2.6 B e C).

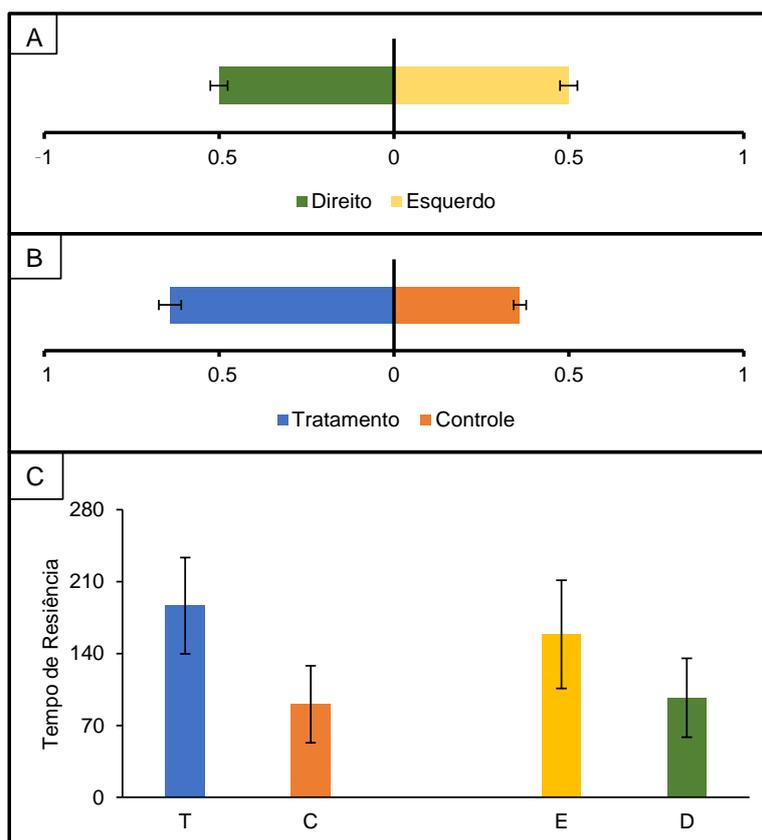


Figura 2.5. Resposta de fêmeas de *P. nigrispinus* ao sinal vibratório de fêmeas de *E. heros* (FS1) em arenas de dupla escolha. A) e B) Escolha inicial (proporção), C) Tempo de residência (s) C: controle, braços da arena sem vibrações, T: tratamento, braços da arena vibrados com o sinal FS1 de fêmeas de *E. heros*. As barras em A e B, indicam a proporção média de resposta calculada a partir da regressão logística e as linhas o IC de 95%, e em C, o tempo de residência médio \pm EP * indica diferenças significativas ($P < 0,05$), teste χ^2 para escolha inicial e teste de Wilcoxon para tempo de residência.

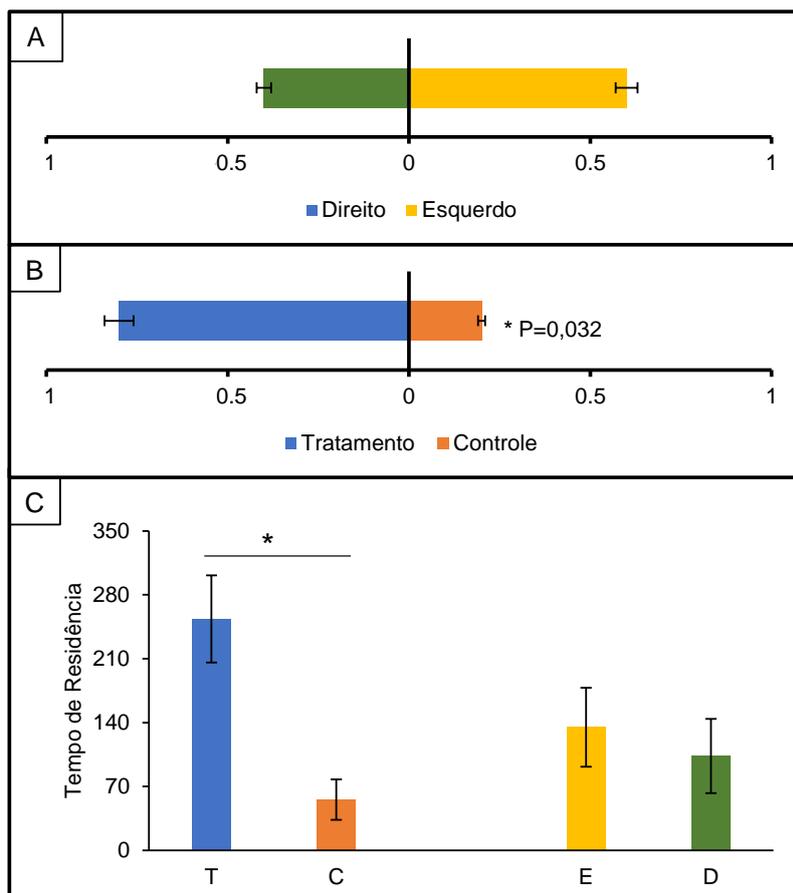


Figura 2.6. Resposta de machos de *P. nigrispinus* ao sinal vibratório de fêmeas de *E. heros* (FS1) em arenas de dupla escolha. A) e B) Escolha inicial (proporção), C) Tempo de residência (s) de machos de *P. nigrispinus* em arenas de dupla escolha. C: controle, braços da arena sem vibrações, T: tratamento, braços da arena vibrados com o sinal FS1 de fêmeas de *E. heros*. As barras em A, indicam a proporção média de resposta calculada a partir da regressão logística e as linhas o IC de 95%, e em B, o tempo de residência médio \pm EP * indica diferenças significativas ($P < 0,05$), teste χ^2 para escolha inicial e teste de Wilcoxon para tempo de residência.

DISCUSSÃO

A presença de sinais de heteroespecíficos não mostrou efeitos significativos no comportamento reprodutivo de *E. heros* e somente condicionou um dos parâmetros da comunicação vibracional reduzindo o número de pulsos

emitidos pelos insetos quando em presença de sinais vibratórios de *C. impicticornis* e *P. nigrispinus*. No caso de *C. impicticornis* os sinais vibratórios reproduzidos (sinais de *C. ubica* e de *E. heros*) alteraram fortemente tanto o comportamento reprodutivo, como a comunicação vibracional, incidindo negativamente na formação de casais e cópula e na emissão de sinais vibratórios.

Os resultados podem ser explicados pela forma em que se estrutura a comunicação vibracional destas espécies de percevejos. A comunicação vibracional de *E. heros* evoluiu com a formação de duetos com sinais de longa duração (algumas emitidas continuamente durante alguns segundos) que geralmente se superpõem (Blassioli-Moraes, 2005). Esta superposição desencadeia nos emissores uma mudança dos parâmetros temporais (redução dos pulsos e dos intervalos entre pulsos) e espectrais (mudanças da frequência dominante dos sinais) que permitem que os sinais específicos possam ser individualizados pelos receptores minimizando assim as interferências originadas na superposição dos sinais (Cokl et al., 2015). Este mecanismo poderia também ser utilizado em situações com ruído ambiental elevado.

A diferença do observado previamente para sinais de rivalidade (Capítulo 1, Resultados, página 77, 85 e 90) os sinais de heteroespecíficos não apresentaram efeitos disruptivos para *E. heros*. Isto pode ser explicado pela evolução sistema de comunicação na espécie, que permite aos coespecíficos identificar a estrutura característica dos sinais de rivalidade, que transmitem informação de conflito entre indivíduos, desestimulando outros indivíduos para desenvolver os comportamentos reprodutivos.

Até o momento a única informação em relação a interferência de heteroespecíficos em percevejos provem de trabalhos realizados com *Nezara viridula*. Nesta espécie, similarmente ao observado em *E. heros*, foi comprovado que a presença de sinais de heteroespecíficos não reduz a resposta dos machos quando emitidos em amplitude reduzida em relação à emissão dos sinais dos coespecíficos. Mas quando os sinais dos heteroespecíficos foram emitidos com intensidade maior os machos foram inibidos e não conseguiram identificar a fonte de vibração das fêmeas da sua espécie, mostrando

movimentos não orientados (de Groot et al., 2010, 2011). Os experimentos desenvolvidos com *E. heros* e *C. impicticornis* não incluíram variações na intensidade dos sinais pelo que esse efeito deve ser avaliado em experimentos futuros.

Os resultados relatados para *C. impicticornis* similar ao descrito para *N. viridula* e podem estar influenciados porque ambas espécies possuem um sistema similar de comunicação com sinais vibratórios, com formação de duetos altamente estruturados em que cada indivíduo adapta suas emissões aos intervalos entre os trens de pulsos do parceiro, evitando assim sobreposição dos sinais vibratórios (Cokl et al., 2000, Laumann et al., 2016). A presença de um sinal "intruso" na comunicação entre machos e fêmeas pode reduzir a troca de informações e a orientação dos machos (Virant-Doberlet et al., 2006) levando a disrupção da comunicação vibracional e interferindo no comportamento reprodutivo que finaliza com cópula.

Em diversas culturas, os percevejos ocorrem como uma guilda onde a composição e dominância de espécies pode variar entre regiões geográficas (Panizzi et al., 2012). Contudo, *E. heros* é atualmente a espécie mais abundante entre os percevejos encontrados em culturas de grãos do Brasil (Panizzi e Lucini 2016; Aquino et al. 2019). Uma explicação para o alto nível populacional de *E. heros*, além de adaptações específicas para as condições climáticas e sistemas de cultivo (Panizzi e Lucini, 2016), é o seu grande sucesso reprodutivo que pode se relacionar à plasticidade do seu sistema de comunicação vibracional, com adaptações específicas para manter a troca de informações ainda em ambientes com altos níveis de ruído ambiental (Cokl et al., 2015).

Insetos herbívoros podem detectar sinais vibratórios de seus inimigos naturais, e responder com comportamentos que impedem o parasitismo/predação (Castellanos e Barbosa, 2006). Para avaliar se o percevejo herbívoro *E. heros* consegue identificar os sinais de predadores foram transmitidos sinais vibratórios de machos de *P. nigrispinus* para casais de *E. heros*. Os machos e fêmeas emitiram menos pulsos quando o sinal de macho de *P. nigrispinus* foi reproduzido na planta, porém isso não influenciou o comportamento reprodutivo e a proporção dos casais que copularam, quando

comparados aos casais em plantas controle. *Euschistus heros* não apresentaram um comportamento defensivo quando em contato com sinais vibratórios do percevejo predador *P. nigrispinus*, uma hipótese para esses fitófagos não identificarem o sinal destes predadores é que *P. nigrispinus* é uma espécie polífaga e generalista (Evangelista Júnior et al., 2004), sendo os percevejos presas alternativas em relação às suas presas preferenciais, lagartas de Lepidoptera (Zanuncio et al., 1994).

Entretanto *P. nigrispinus* respondeu positivamente aos sinais vibratórios de *E. heros* mostrando que o predador pode utilizar esses sinais para identificar locais onde existem presas potenciais. A comunicação vibracional de *P. nigrispinus* e outros percevejos predadores (Pentatomidae: Asopinae) sugere que, neste grupo, o padrão de comunicação vibracional é mais complexo com sinais produzidos pela vibração do abdome, por tremulação e por percussão (Žunič, 2008, Shestakov 2008, Laumann et al., 2013), e ainda utilizam sinais num intervalo de frequências mais amplo do que os dos percevejos fitófagos (Pentatominae) (Čokl et al., 2011). Sendo assim, estes insetos podem ter sistemas sensoriais com resposta a uma ampla variedade de sinais vibratórios e, estar especialmente adaptados, para receber diferentes tipos de vibrações e utilizá-las para extrair informação relevante da presença no ambiente de presas potencial.

O uso de vibrações produzidas por presas ou hospedeiros como resultado de atividades gerais (movimento ou alimentação) são uma fonte de informação para inimigos naturais (Meyhofer et al., 1997; Meyhofer e Casas, 1999; Broad e Quicke, 2000; Vilhelmsen et al., 2001). Para os percevejos predadores (Asopinae) é conhecido que podem identificar e se orientar para vibrações produzidas pela alimentação ("chewing") de lagartas de lepidóptera (Pfannenstiel et al., 1995). O uso de sinais envolvidos no comportamento sexual de insetos tem sido considerado como um canal privativo de comunicação. Entretanto, nos últimos anos vários relatos demonstram que esses sinais podem ser explorados tanto por parasitoides (Laumann et al., 2007, 2011) como por predadores, especialmente aranhas (Roberts et al., 2007, Virant-Doberlet et al., 2011). A relação entre um percevejo predador e sinais vibratórios de percevejos,

presas potenciais, é relatada aqui pela primeira vez e abre uma nova perspectiva nas interações entre Asopinae e suas presas.

Os resultados deste capítulo mostram que dentro dos ruídos bióticos presentes em plantas a relação entre herbívoros e predadores podem ocorrer de diferentes formas. E que a comunicação vibracional é estabelecida de diferentes formas dependendo o indivíduo que está presente na planta. Estes resultados podem contribuir para compreender as interações das diferentes espécies de percevejos que compartilham habitats (ex. plantas hospedeiras), e abrir caminho para estudos de técnicas que podem servir como uma boa ferramenta no manejo integrado de pragas da soja.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aquino, M.F.S.; Sujii, E.R.; Borges, M.; Blassioli-Moraes, M.C.; Laumann, R.A. (2019). Diversity of stink bug adults and their parasitoids in soybean crops in Brazil: Influence of a latitudinal gradient and insecticide application intensity. *Env. Entomol.*, 48,105–113.
- Blassioli-Moraes, M.C.; Laumann, R.A.; Čokl, A.; Borges, M. (2005). Vibratory signals of four Neotropical stink bug species. *Physiol. Entomol.*, 30,175–188.
- Borges, M. and M.C. Blassioli-Moraes (2017), “The semiochemistry of Pentatomidae”, pp. 95-124. In, A. Čokl and M. Borges (editors), *Stink Bugs: Biorational Control Based on Communication Processes*. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton London New York, 2017; pp. 95-124.
- Bortolotto, O.C., Pomari-Fernandes, A., Bueno, R.C.O. , Bueno, A. de F., Kruz, Y.K.S., Queiroz, A.P., Sanzovo, A. Ferreira, R.B. (2015). The use of soybean integrated pest management in Brazil: a review. *Agron. Sci. Biotechnol.* 1, 25–32

- Broad, G. R. & Quicke, D. L. J. (2000). The adaptative significance of host location by vibration sounding in parasitoid wasp. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 267, 2103e2109. doi:10.1098/rspb.2000.1298.
- Castellanos I, Barbosa P (2006) Evaluation of predation risk by acaterpillar using substrate-borne vibrations. *Anim Behav*72:461–469
- Čokl, A.; Virant-Doberlet, M.; Stritih, N. (2000). The structure and function of songs emitted by the southern green stink bugs from Brazil, Florida, Italy and Slovenia. *Physiol. Entomol.*, 25,196–205.
- Čokl, A., Virant-Doberlet, M. (2003). Communication with substrate-Borne Signals in Small Plant-Dwelling insects. *Annual Review of Entomology*. Palo Alto. v. 48, p.29-50.
- Čokl, Andrej, Žunič, Alenka, Virant-Doberlet, Meta. (2011). Predatory bug *Picromerus bidens* communicates at different frequency levels. *Cent. Eur. j. biol.*, vol. 6, no. 3, str. 431-439. <http://dx.doi.org/10.2478/s11535-011-0015-y>, doi: 10.2478/s11535-011-0015-y.
- Čokl A, Laumann RA, Žunič-Kosi A, Blassioli-Moraes MC, Virant-Doberlet M, Borges M (2015) Interference of overlapping insect vibratory communication signals: an *Eushistus heros* model. *PLoSOne* 10:1–16
- Čokl, A ; Laumann, R A ; Stritih, N. . Substrate-borne Vibratory Communication. In: Cokl, A.; Borges, M. (2017a). (Org.). *Stink Bugs. Biorational Contgrol based on Communication Processes*. 1ed.Boca Ratón: CRC Press, 2017, v. , p. 125-164.
- Čokl, Andrej ; Blassioli-Moraes, Maria Carolina ; Laumann, Raul Alberto ; Zunic , Alenka ; Borges, Miguel (2019). *Stinkbugs: Multisensory Communication with Chemical and Vibratory Signals Transmitted Through Different Media. Animal Signals and Communication*. 1sted.: Springer International Publishing, v. , p. 91-122
- Corrêa-Ferreira, B.S., Krzyzanowski, F.C., Minami, C. A. (2009). Percevejos e a qualidade da semente de soja – série sementes. EMBRAPA-CNPSo, Londrina. Circular Técnica, 67
- De Groot, M.; Čokl, A.; Virant-Doberlet, M. (2010). Effects of heterospecific and conspecific vibrational signal overlap and signal-to-noise ratio on male responsiveness in *Nezara viridula* (L.). *J. Exp. Biol.* 213, 3213-3222.
- De Groot, Maarten, ČOKL, Andrej, VIRANT-DOBERLET, Meta. (2011). Search behaviour of two hemipteran species using vibrational communication. *Cent. Eur. j. biol.*, no. 5, vol. 6, str. 756-769.

- Evangelista Júnior, W. S., Gondim Junior, M. G. C., Torres, J. B., & Marques, E. J. (2004). Fitofagia de *Podisus nigrispinus* em algodoeiro e plantas daninhas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39(5), 413-420.
- Guedes RN, Matheson SM, Frei B, Smith ML, Yack JE. (2012). Vibration detection and discrimination in the masked birch caterpillar (*Drepana arcuata*). *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*. May;198(5):325-335.
- Kuhelj, A., & Virant-Doberlet, M. (2017). Male–male interactions and male mating success in the leafhopper *Aphrodes makarovi*. *Ethology*, 123(6-7), 425-433.
- Laumann, R. A., Moraes, M. C. B. , Čokl, A., Borges, M. (2007). Eavesdropping on the sexual vibratory communication of stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) by the egg parasitoid *Telenomus podisi*. *Animal Behaviour*, v. 73, p. 637-649.
- Laumann, R.A., Lopes , Moraes, M.C.B. Čokl A., Borges, M. (2011). Silent singers are not safe: Selective response of the parasitoid *Telenomus podisi* to substrate-borne vibratory signals of stink bugs. *Animal Behaviour*, v. 82, p. 1175-1183.
- Laumann, R.A., Kavacic, A., Moraes, M.C.B., Borges, M., Čokl, A. (2013), Reproductive behaviour and vibratory Communication of the neotropical predatory stink bug *Podisus nigrispinus*. *Physiological Entomology*. 38, 71–80.
- Laumann, R.A.; Čokl, A.; Blassioli-Moraes, M.C.; Borges, M. (2016). Vibratory communication and its relevance to reproductive isolation in two sympatric species (Hemiptera: Pentatomidae: Pentatominae). *J. Insect Behav.*, 29, 643–665.
- McGregor PK, Peake TM (2000) Communication networks: social environments for receiving and signalling behaviour. *Acta Ethol* 2:71–81
- McGregor, P. K. (Ed.). (2005). *Animal communication networks*. Cambridge University Press.
- Meise, K., Franks, D. W., & Bro-Jørgensen, J. (2018). Multiple adaptive and non-adaptive processes determine responsiveness to heterospecific alarm calls in African savannah herbivores. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1882), 20172676.
- Meyhöfer, R., Casas, J. & Orn, S. (1997). Vibration-mediated interactions in a host-parasitoid system. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 264, 261e266.

- Meyhöfer, R. & Casas, J. (1999). Vibratory stimuli in host location by parasitic wasps. *Journal of Insect Physiology*, 45, 967e971.
- Panizzi, A. R.; Vivan, L. M. (1997). Seasonal abundance of the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, in overwintering sites, and the breaking of dormancy. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, Dordrecht, v. 82, n. 2, p. 213-217.
- Panizzi, A. R. (2013), History and contemporary perspectives of the integrated pest management of soybean in Brazil. *Neotropical Entomology*, Londrina, v. 42, n. 2, p. 119-127.
- Panizzi AR, Lucini T (2017) Host plant-stink bug relationships. In: C. okl A, Borges M (eds) *Biorational control based on communication processes*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, pp 31–85
- Peake, T. (2005). Eavesdropping in communication. *Animal communication networks*, 13.
- Pfannenstiel, R. S., Hunt, R. E. & Yeorgan, K. V. (1995). Orientation of a hemipteran predator to vibration produced by feeding caterpillar. *Journal of Insect Behavior*, 8, 1e9.
- Pires, E. M., de Azevedo, D. O., Pinto, R., Pelúzio, R. J. E., Serrão, J. E., & Zanuncio, J. C. (2009). Desenvolvimento, reprodução e performance predatória do percevejo zoofitófago *Podisus distinctus* (Hemiptera: Pentatomidae) alimentado com larvas de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) imobilizadas ou soltas. *Revista Brasileira de Biociências*, 7(3).
- Roberts J. Andrew, Phillip W. Taylor, George W. Uetz, (2007). Consequences of complex signaling: predator detection of multimodal cues, *Behavioral Ecology*, Volume 18, Issue 1, January, Pages 236–240,
- Shestakov, L.S. (2008) Studies of vibratory signals in Pentatomidae bugs (Heteroptera, Asopinae) from European Russia. *Entomological Review*, 88, 20–25.
- Swift, R. J., Anteau, M. J., Roche, E. A., Sherfy, M. H., Toy, D. L., & Ring, M. M. (2020). Asymmetric benefits of a heterospecific breeding association vary with habitat, conspecific abundance and breeding stage. *Oikos*, 129(10), 1504-1520.
- Vilhelmsen, L., Isidoro, N., Romani, R., Basibuyuk, H. H. & Quicke, L. J. (2001). Host location and oviposition in a basal group of parasitic wasps: the subgenual organ, ovipositor apparatus and associated structures in the Orussidae (Hymenoptera, Insecta). *Zoomorphology*, 121, 63e84.

- Virant-Doberlet, M.; Mazzoni, V.; de Groot, M.; Polajnar, J.; Lucchi, A.; Symondson W.O.C.; Čokl, A. (2014). Vibrational communication in networks: eavesdropping and biotic noise. In *Studying vibrational communication, Animal Signals and Communication*. Cocroft, R.B., Gogala, M., Hill P.S.M., Wessel, A.; Eeds.; Springer, Berlin; pp. 93-123.
- Virant-Doberlet M, King RA, Polajnar J, Symondson WO. (2011). Molecular diagnostics reveal spiders that exploit prey vibrational signals used in sexual communication. *Mol Ecol*. 2011 May;20(10):2204-2216.
- Zanuncio, J., Alves, J. B., Zanuncio, T. V., & Garcia, J. F. (1994). Hemipterous predators of eucalypt defoliator caterpillars. *Forest Ecology and Management*, 65(1), 65-73.
- Zuñic, A., Čokl, A., Virant-Doberlet, M. et al. (2008) Communication with signals produced by abdominal vibration, tremulation and percussion in *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 101, 1169–1178.
- Žunič, Alenka, Virant-Doberlet, Meta, Čokl, Andrej (2011). Species recognition during substrate-borne communication in *Nezara viridula* (L.) (Pentatomidae: Heteroptera). *J. insect behav.*, 2011, vol. 24, no. 6, str.468-487.

CAPÍTULO III

*COMUNICAÇÃO MULTIMODAL, INTERAÇÕES
ENTRE SINAIS QUÍMICOS E SINAIS
VIBRATÓRIOS E SEUS EFEITOS NA
COMUNICAÇÃO SEXUAL DE PERCEVEJOS*

INTRODUÇÃO

A comunicação, bem como a eficiência de transmissão e recepção dos sinais propagados durante este processo, são cruciais para o sucesso reprodutivo dos animais (Žunic et al., 2011). Os sinais produzidos pelos indivíduos podem ser de diferentes modalidades, como: mecânicos, sonoros, táteis, visuais e químicos, como: olfativos e gustativos.

Higham e Hebets (2013) apontam duas maneiras de caracterizar a composição dos sinais. Uma está relacionado ao emissor e corresponde à natureza do sinal (propriedades físicas) e às propriedades do canal de transmissão. A outra considera o sistema sensorial do receptor, que detecta o sinal. Sendo assim, os sinais podem ser classificados como unimodais quando a informação se transmite como um único componente e por um canal específico, sendo receptado por um sistema sensorial especializado em detectar esse componente. Os sinais são considerados multicomponentes quando são formados por unidades diferenciadas da mesma natureza e que se transmitem pelo mesmo canal. Os sinais multimodais são caracterizados por componentes de natureza diferente, transmitidos por meio de diferentes canais e processados por diferentes receptores sensoriais (Partan e Marler 1999, 2005, Higham e Hebets, 2013).

Um exemplo de comunicação unimodal é o caso do primeiro feromônio descrito, o do bicho da seda *Bombix mori* (L.) (Lepidoptera: Bombycidae). Neste caso todo o comportamento sexual é desencadeado por um único composto produzidos pelas fêmeas ((*E,Z*)-10,12-hexadecadien-1-ol ou bombykol) (Butendant et al. 1959).

Para exemplificar a comunicação multimodal podemos citar o exemplo da aranha *Habronattus coecatus* (Hentz, 1846) (Araneae: Salticidae). Nesta espécie, os machos, durante o comportamento de corte, saltam e emitem sinais

vibratórios para as fêmeas, estas recebem e processam essas duas informações para responder ao comportamento de corte do macho (Elias et al., 2012).

Os componentes de um sinal multicomponente ou multimodal podem ser redundantes se codificam a mesma informação ou não redundante se cada componente transmite uma informação diferente (Partan e Marler, 2005). Considerando as respostas dos receptores a um único ou a todos os componentes, os componentes redundantes podem gerar respostas equivalentes (sem mudança na intensidade da resposta do receptor) ou aprimoradas (maior intensidade da resposta do receptor). Os componentes não redundantes podem gerar respostas dos indivíduos receptores em quatro níveis diferentes: independência (resposta individual a cada componente), dominância (resposta a um único componente), modulação (resposta maior ou menor a um componente individual) ou emergência (uma nova resposta comportamental quando todos os componentes se apresentam conjuntamente) (Partan e Marler, 2005, Bradbury e Vehrencamp, 2011).

Nos insetos a comunicação multimodal está relacionada a diferentes tipos de comportamento. Um exemplo típico é o da dança da abelha europeia, *Apis mellífera* (L.) (Hymenoptera: Apidae), que consiste na transferência de informação em relação à fonte de recursos florais modulada por sinais de modalidade física, os movimentos do abdome que originam sinais acústico e vibracionais (bater das asas e vibrações produzidas durante a dança), e visuais determinados pelo padrão e orientação dos movimentos (Frisch, 1967). O comportamento de corte das moscas das frutas também é mediado por comunicação multimodal, uma vez que as fêmeas utilizam sinais vibracionais acústicos originados no batimento das asas, sinais visuais e químicos (hidrocarbonetos cuticulares) (Rybak et al., 2002).

Em percevejos (Pentatomidae) o comportamento reprodutivo inclui comunicação a diferentes níveis intermediada por sinais de diferente natureza. Os machos emitem o feromônio sexual que atua a longas distâncias, vários metros, atraindo as fêmeas para a sua proximidade (Cokl et al., 2016, 2017). Quando estão na mesma planta, as fêmeas emitem sinais vibratórios transmitidos pelo substrato com a função de chamamento que advertem os

machos da sua presença e os direcionam para o local onde elas se encontram. Uma vez que os insetos estão em contato físico ou próximos estabelecem-se duetos nos quais os insetos emitem sinais vibratórios de corte ou acasalamento (Miklas et al., 2003) enquanto tocam com suas antenas o corpo do parceiro, comportamento conhecido como antenação. Este comportamento tem sido relacionado com estímulos táteis e com o reconhecimento de coespecíficos utilizando os hidrocarbonetos presentes na cutícula dos insetos. Após esta etapa, e se a fêmea aceita o macho, se produz a cópula (Borges et al., 1987). Em algumas espécies de percevejos foi identificado também um canto de cópula, emitido pelos machos durante a transferência de esperma (Blassioli-Moraes et al., 2005).

Em relação ao uso de sinais multimodais no comportamento reprodutivo de percevejos as informações são escassas e, em geral, relacionadas com a modulação da emissão de um sinal por outro de natureza diferente. Miklas e colaboradores (2003) observaram, em *N. viridula*, que a emissão de sinais de chamamento das fêmeas estimula a produção e liberação de feromônio sexual pelos machos. Nesta mesma espécie foi comprovado que a emissão de sinais vibratórios pelos machos é estimulada por uma combinação de sinais vibratórios e visuais produzidos pelas fêmeas (Zognik e Cokl, 2014).

Além dos sinais descritos acima, tem se proposto que os hidrocarbonetos cuticulares podem ter uma função relevante na comunicação química dos percevejos, principalmente para reconhecimento específico e de parceiros (Čokl et al., 2019).

Os hidrocarbonetos cuticulares são encontrados em toda a cutícula dos insetos (Jackson e Baker, 1970) e são compostos alifáticos apolares de cadeia longa (geralmente 15 a 35 carbonos). Estes compostos podem ser saturados (alcanos) ou insaturados (alcenos e alcinos). Os mais comumente encontrados em insetos são n-alcanos, alcenos e hidrocarbonetos com ramificações de metila. Pelas características químicas a função dos n-alcanos é associada com a impermeabilização da cutícula e a dos alcenos e os hidrocarbonetos metilados estariam mais relacionados com a comunicação dos insetos (Blomquist et al., 1987).

No caso dos percevejos os hidrocarbonetos têm sido estudados no contexto de rastros químicos (pegadas) que se formam quando os insetos se locomovem e depositam os hidrocarbonetos no substrato. Estes rastros químicos apresentam claras diferenças entre as espécies e entre os indivíduos (machos e fêmeas) (Lagôa et al., 2020). Esta informação é utilizada pelos inimigos naturais, parasitoides de ovos (Scelionidae), durante o forrageamento por hospedeiros para localizar áreas onde a probabilidade de encontrar massas de ovos é maior. Neste processo os parasitoides discriminam rastros segundo as espécies e o sexo dos indivíduos que os originam (Borges et al., 1999, Silva et al., 2006, Colazza et al., 2009, Laumann et al., 2009, Lagôa et al., 2020). Zgonik e Čokl (2014) propõem que a emissão espontânea de sinais vibratórios observada no percevejo verde, *Nezara viridula*, pode estar relacionada com os rastros químicos de coespecíficos depositados nas plantas onde os insetos foram colocados.

A partir dos conhecimentos básicos em relação à comunicação de Pentatomidae e as características dos sinais Čokl e colaboradores (2019) sugerem que a comunicação com sinais multimodais em pentatomídeos pode ser relevante para o comportamento reprodutivo destes insetos e que os sinais de uma modalidade específica podem ter um efeito modulador ou regulador de sinais de outra modalidade. As consequências para o comportamento dos insetos e para o seu sucesso reprodutivo são desconhecidas.

Considerando esta lacuna no conhecimento, este capítulo possui o objetivo de desenvolver estudos de comunicação multimodal em percevejos, pretendendo se estabelecer a interação entre sinais de diferentes modalidades (químicos e vibratórios) no comportamento reprodutivo destes insetos

Para investigar a interação entre sinais vibratórios e químicos e a influência no comportamento reprodutivo de *E. heros*, foram testadas quatro hipóteses:

- 1) Os percevejos podem identificar rastros químicos de coespecíficos e o contato com estes rastros estimula a emissão de sinais vibratórios

- 2) A resposta a rastros químicos é influenciada pela identidade (sexo) do indivíduo que gerou o rastro;
- 3) O contato com feromônio sexual de machos estimula a emissão de sinais vibratórios e modifica os parâmetros temporais e espectrais destes sinais;
- 4) A emissão de feromônio inibe e/ou modifica o repertório de sinais vibratórios do percevejo.

O percevejo marrom foi selecionado como modelo de estudo uma vez que vários aspectos da sua comunicação química (Borges et al., 2006) e vibracional (Blassioli-Morais et al., 2005) são conhecidos e por tratar-se da principal praga de culturas de grãos, especialmente a soja no Brasil (Grigolli, 2016, Aquino et al., 2019), pelo que os conhecimentos gerados possuem potencial de aplicação para o desenvolvimento de estratégias de manejo desta praga baseadas na manipulação comportamental da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Influência de rastros químicos na emissão de sinais vibratórios

Para avaliar a influência de rastros químicos de machos e fêmeas, e como estes podem influenciar a comunicação vibracional dos percevejos foram realizados experimentos em substratos artificiais (arenas experimentais de vidro) e substratos naturais (plantas).

Experimentos em Substratos artificiais

Para obter superfícies com rastros contendo os hidrocarbonetos cuticulares dos percevejos foram utilizadas as metodologias descritas por Lagôa et al. (2019). Foram colocados cinco indivíduos, machos ou fêmeas de *E. heros*, todos do mesmo sexo, em uma arena construída com o fundo de uma placa de Petri de vidro de 15 cm de diâmetro. Quatro destas placas foram colocadas sobre uma placa de vidro de 30 x40 cm, com a abertura virada para baixo (Figura 3.1 A), evitando que os insetos escapassem. Por efeito do fototaxismo positivo os insetos tendem a movimentarem-se para a parte superior da arena maximizando assim a coleta de rastros químicos na base da placa de Petri. Foi permitido que os insetos se movimentassem livremente na arena por um período de duas horas. Após esse período, os insetos foram retirados da arena e utilizou-se a placa de Petri para os bioensaios. Os rastros da placa de vidro inferior foram descartados por estarem contaminados com as fezes dos insetos. Placas previamente lavadas com detergente neutro, desinfetadas com acetona e mantidas em uma estufa a 100°C durante 2 horas foram utilizadas com controle.

Para os bioensaios duas placas contendo os rastros ou duas sem rastros (controle) foram unidas (uma sobre a outra) pelas suas bordas formando assim uma arena cilíndrica de 15 cm de diâmetro e 4 cm de altura (Figura 3.1 B). Desta forma todas as superfícies da arena estavam contaminadas como rastros químicos do percevejo. Nesta arena foram introduzidos um macho, uma fêmea ou um casal de *E. heros*. A arena foi posicionada sobre uma peça de espuma de poliuretano de 15 cm de grossura para evitar as vibrações externas. Para captar os sinais vibratórios na parede externa do lado superior da arena de vidro foi colada uma fita reflexiva (1 x 1 cm) na qual foi focado o raio laser do vibrômetro(Figura 3.1 C).

Os procedimentos para registro, armazenamento e análises dos sinais vibratórios seguem os descritos na seção PEG. Os bioensaios foram monitorados durante 20 min por observação direta e os arquivos armazenado para posterior análise dos sinais vibratórios dos insetos.

Os comportamentos registrados foram: Proporção de resposta (proporção de casais em que ao menos um inseto emitiu um sinal vibratório ou mais em relação ao total de casais avaliados), latência (s) (tempo desde o início do bioensaio até que o inseto emite o primeiro sinal vibratório), tempo de resposta (s) (tempo em que o inseto permanece emitindo sinais vibratórios), número de pulsos emitidos por cada inseto durante o bioensaio, e proporção de casais que finalizaram o bioensaio com a cópula. Os parâmetros dos sinais vibratórios registrados e analisados foram frequência dominante (Hz), duração dos pulsos e intervalo entre pulsos (ambos em ms). Esses dados foram todos passados para planilhas e depois processados para as análises estatísticas e representação gráficas dos resultados.

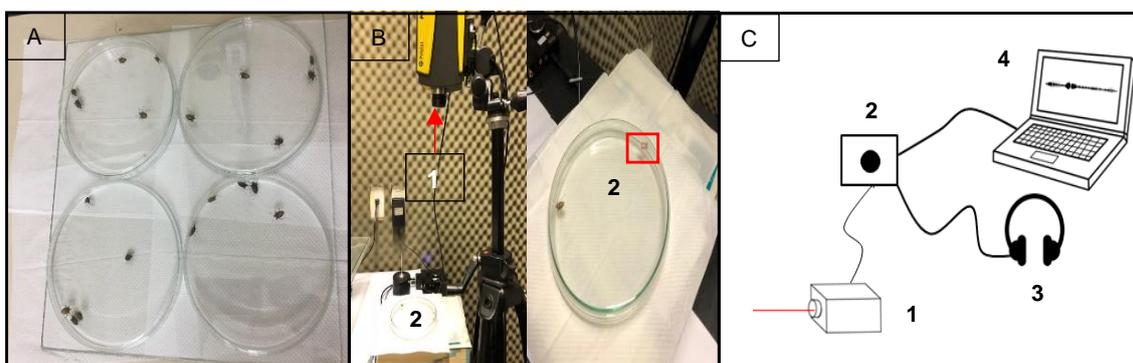


Figura 3.1. Sequência dos procedimentos experimentais para avaliação da influência de rastros químicos na comunicação vibracional de *E. heros* em substratos artificiais. A) Percevejo *E. heros* em placas de Petri de vidro para coleta de rastros químicos. B) Esquema do bioensaio com rastros 1-vibrometro laser, 2- arena experimental. C) esquema de captação e armazenamento dos dados: 1-vibrômetro laser, captação dos sinais vibratórios, 2-Placa de digitalização externa, 3-fone de ouvido para monitoramento em tempo real e 4- Notebook para armazenamento dos dados.

O desenho experimental incluiu todas as combinações possíveis de rastros (rastros de fêmeas, rastros de machos e placas controle (sem rastros) e insetos (fêmeas, machos e casais).

Para cada tratamento foram realizadas 30 repetições com casais e 20 repetições com machos e fêmeas, a cada repetição as placas foram trocadas e

desinfetadas lavando-as com detergente neutro e posteriormente foram mantidas em estufa a 100°C durante 2 horas.

Experimentos em Substratos naturais

Para avaliar a atração e comportamento dos insetos em contato com hidrocarbonetos cuticulares presente nas superfícies de plantas, foram utilizadas plantas de feijão, todas do mesmo tamanho e com duas folhas trifoliadas completamente expostas. Estas plantas, cultivadas segundo o descrito em PEG, foram utilizadas como arenas de dupla escolha.

Uma das folhas foi impregnada com rastros dos insetos. Para isto, colocaram-se 10 adultos de *E. heros* do mesmo sexo em uma das folhas, sendo seu movimento restringido envolvendo a folha e seu pecíolo com um saco de plástico micro perfurado, evitando que os insetos escapassem ou passassem para a folha oposta ou o restante da planta (Figura 3.2). Após 2 horas o saco foi removido e os insetos retirados. Posteriormente, um macho ou uma fêmea de *E. heros* foram colocados cuidadosamente na parte inferior da haste principal, e o comportamento e os sinais vibratórios foram registrados durante 10 minutos. Para registro e análises dos sinais vibratórios foram seguidos os procedimentos descritos em PEG.

O número de repetições foi igual a 20 para indivíduos de cada sexo. Após cada repetição a planta foi substituída por outra nas mesmas condições. Como controle foram utilizadas plantas não expostas a percevejos. Foram avaliadas todas as combinações de tratamentos (plantas sem rastros (controle) para machos e fêmeas, plantas com rastros de fêmeas para macho e plantas com rastros de machos para fêmea).

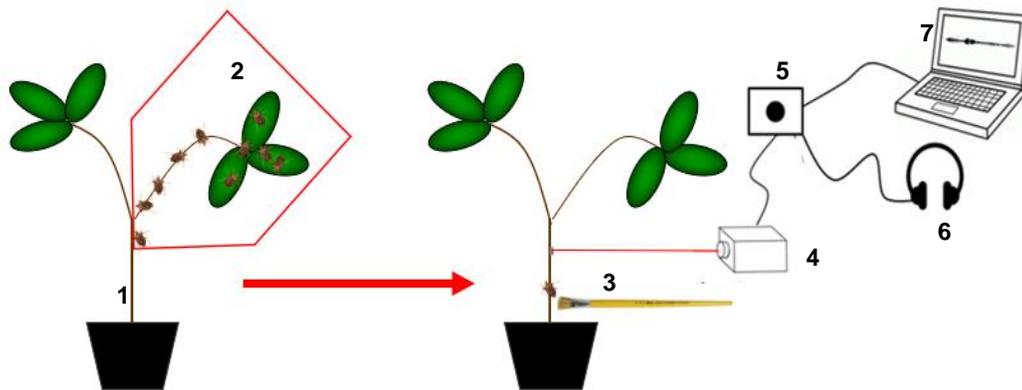


Figura 3.2. Sequência dos procedimentos experimentais para avaliação da influencia de rastros químicos na comunicação vibracional de *E. heros* em substratos naturais (plantas). 1-Planta de feijão em estágio V3; 2-Saco de plástico Microperfurado retendo os adultos de *E. heros* nos locais de contaminação com rastros; 3- ponto de liberação do inseto avaliado; 4-vibrometro laser; registro dos sinais vibratórios;5-Placa de digitalização externa;6-fone de ouvido para monitoramento em tempo real; 7-Notebook para armazenamento dos dados.

Os comportamentos avaliados foram: 1- escolha inicial, referente à qual das folhas o inseto escolheu inicialmente. Para considerar uma escolha o inseto, que foi cuidadosamente liberado no caule principal próximo ao solo, precisava caminhar até passar a bifurcação do caule e ultrapassar o limite de um terço do tamanho da folha escolhida; 2- tempo de residência: tempo em segundos em que o inseto ficou em cada uma das folhas.

Os insetos que ficaram somente na haste principal, isto é, não caminharam para nenhuma das folhas foram considerados como não responsivos e retirados das análises. Os parâmetros dos sinais vibratórios considerados nas análises da comunicação vibracional foram aqueles descritos na seção PEG.

Análise química dos hidrocarbonetos cuticulares

Para avaliar se a influência de rastros químicos na comunicação vibracional de *E. heros* depende da composição química dos rastros de machos e fêmeas foi identificado e comparado o perfil químico dos hidrocarbonetos cuticulares presentes em rastros de machos e fêmeas. Para obter extratos dos compostos cuticulares presentes nos rastros foram colocados 50 percevejos do

mesmo sexo dentro de um pote de plástico (13 cm x 9 cm altura/diâmetro) perfurado em sua lateral, para manter ventilação. Para tampar o pote colocou-se uma placa de Petri de vidro (9 cm de diâmetro). Foi permitido que os insetos se movimentassem livremente no interior da arena por um período de 24 h. Pelo fototaxismo positivo dos insetos maximizou-se a coleta de rastros químicos na placa de Petri (Figura 3.3 A). Após o período de 24 h os insetos foram retirados e somente a placa de vidro foi usada para extração dos hidrocarbonetos presentes na placa. Para isto, as placas foram tratadas com 500 µl de *n*-hexano e o fundo e a lateral das mesmas foram friccionadas com a ponta de uma pipeta Pasteur de vidro durante 30 s. O solvente posteriormente foi transferido para um vial de vidro de 2 ml. Esse processo foi repetido 3 vezes até atingir uma quantidade de 1,5 ml do solvente dentro do vial (Figura 3.3 B).

Duas amostras do mesmo tratamento foram misturadas, obtendo assim o total do rastro de 100 insetos em 24 h. Posteriormente as amostras foram pré-concentradas para 50 µl sob um fluxo suave de N₂. Desta forma foram obtidas amostras com dois insetos equivalente (i.e.) por µl (Figura 3.3 C).

Para identificação dos compostos presentes nas amostras, foram selecionadas três amostras de cada tratamento e uma alíquota de 1 µl foi injetada em um cromatógrafo gasosos (CG) acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM) (Agilent 5975C) equipado com analisador quadrupolar, em coluna apolar DB-5 (0,25 mm de diâmetro x 30 m de comprimento, com filme 0,25 µm, Supelco, Bellefonte, PA, EUA), com ionização de impacto de elétrons (70-eV, temperatura 200°C) e com um injetor “splitless”, no mesmo programa na temperatura de 50°C/2 min, 20°C/min a 300°C/72. Foi utilizado Hélio como gás de arraste. Os dados foram coletados e analisados com o software ChemStation. A identificação dos compostos foi obtida por comparação do padrão de fragmentação dos compostos da amostra com o de dados catalogados em bibliotecas espectrais (NIST).

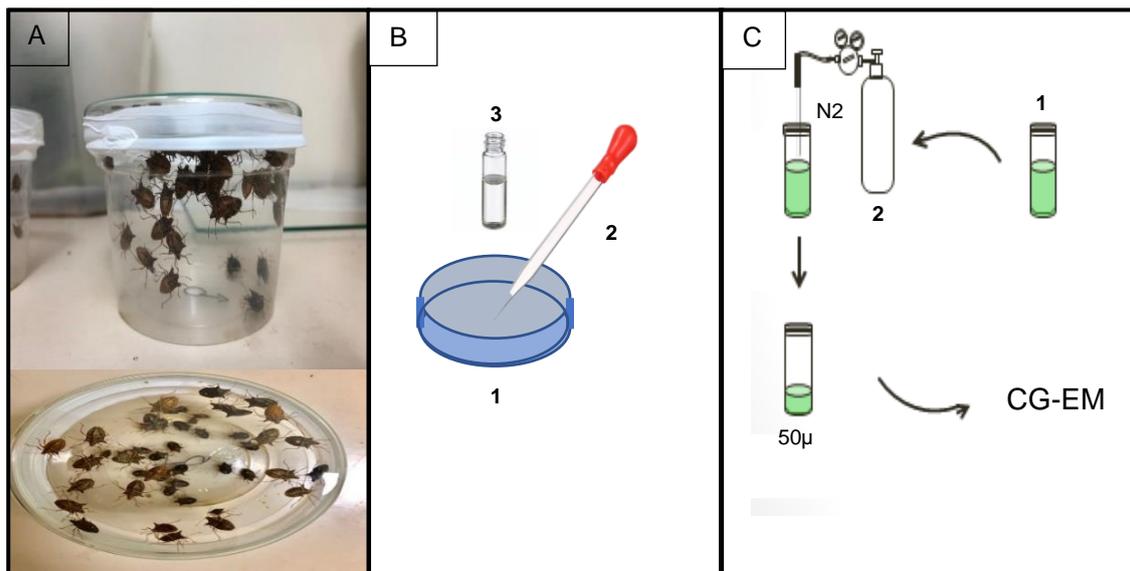


Figura 3.3. Sequência de procedimentos experimentais para extração de hidrocarbonetos cuticulares de rastros de *E. heros* e preparação para análises químicas. A) Adultos de *E. heros* do mesmo sexo em potes de plástico tampados com uma placa de Petri de vidro (foto superior vista geral, foto inferior vista da parte superior com a placa de Petri). B) 1-Placa de Petri 9 cm de diâmetro; 2- Pipeta de vidro; 3-Vial de 2 mL. C) 1- Vial de 2 mL; 2- Representação do sistema de fluxo de gás N₂ para pré-concentrar amostras. CG-EM: Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas.

Influência dos sinais vibratórios na emissão do feromônio sexual

Para avaliar se os sinais vibratórios modulam a emissão de feromônios pelos machos de *E. heros* utilizou-se um desenho experimental com arenas em formato de Y formadas por uma peça de conexão de vidro em formato de Y (corpo 7 cm braços 7 cm, diâmetro interno 2 cm) com juntas de vidro 24/40 e adaptadores esmerilados para conectar a vidraria.

Um macho de *E. heros* foi colocado no interior desta arena experimental e em um dos braços do Y foi conectado um tubo de vidro contendo um filtro de carvão ativado permitindo a entrada de ar purificado. Na abertura do outro braço foi colocada uma vagem de feijão envolta em um papel toalha, esterilizado em estufa a 60 °C durante 24 h, de forma que a parte com papel ficava somente na parte externa à abertura, a vagem e o papel foram envoltos por uma fita de politetrafluoretileno e, por último, mais uma vez envolta com membrana de parafina plástica para vedação (Parafilm). No corpo do Y, na abertura da base,

foi ajustado um septo de silicone/PTFE (9 mm de diâmetro) nele foi inserida uma agulha de 1,2 X 40 mm, a qual foi conectada a um fluxômetro e este conectado a uma bomba de vácuo com o fluxo ajustado a 0,3 L/min. Desta maneira criou-se um fluxo de ar dentro do Y com entrada pelo filtro de carvão ativado e escoamento pela agulha conectada à bomba de vácuo (Figura 3.4).

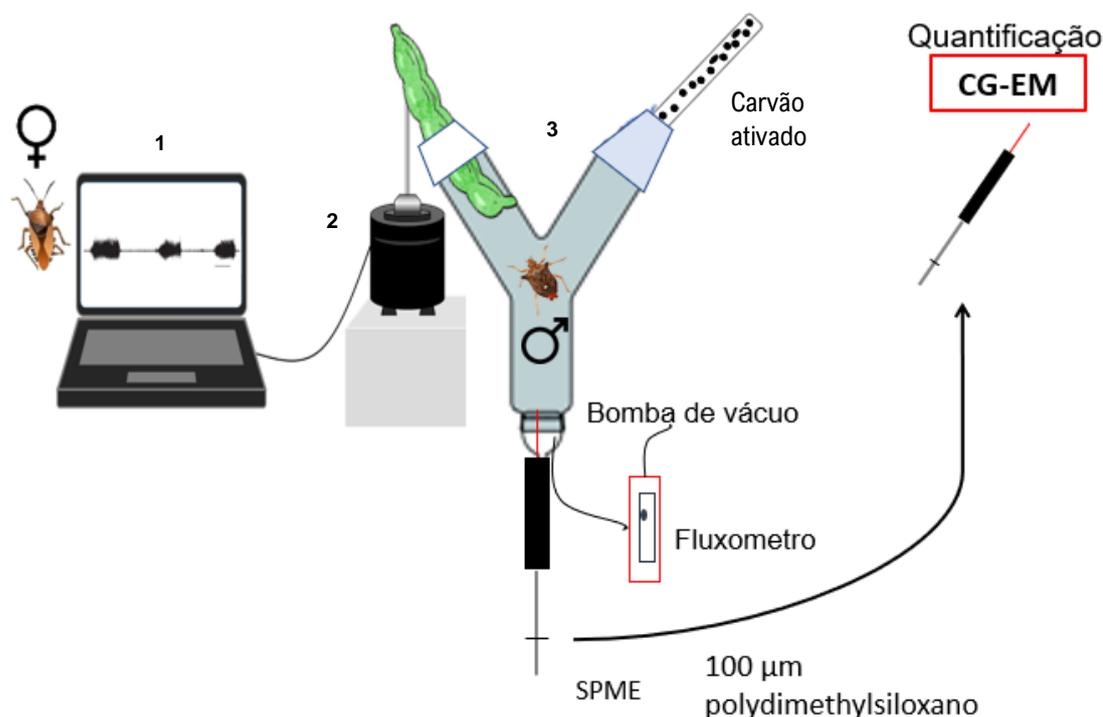


Figura 3.4. Sequência de procedimentos para os experimentos de influência dos sinais vibratórios na comunicação química de machos de *E. heros*. 1- Notebook com programa de reprodução do sinal; 2- Minishaker para reprodução do programa de estimulação; 3- Arena de vidro fechada para coletar voláteis.

Os insetos foram introduzidos de forma individual no interior das arenas e foram estimulados com reprodução dos sinais de chamamento das fêmeas (FS1) seguindo os procedimentos gerais descritos em PEG. Para transmitir as vibrações a agulha do minishaker foi colocada em contato com a vagem de feijão. O programa de estimulação consistia de uma sequência de 4 pulsos do sinal FS1 da fêmea de *E. heros* que foi reproduzido durante 30 minutos de forma ininterrupta (Apêndice III), e os voláteis coletados durante todo esse tempo. Os voláteis liberados pelos insetos foram coletados por uma fibra de SPME (SolidPhaseMicroExtraction) de revestimento PDMS (polydimethylsiloxane) com

100 µm de espessura e 10 mm de comprimento. Como controle, foram coletados os voláteis de grupos de insetos não estimulados com sinais vibratórios.

Para coleta dos voláteis a fibra foi inserida no septo na mesma abertura onde se encontrava a seringa conectada à bomba de vácuo. Após o ajuste necessário para evitar vazamento a fibra de SPME foi exposta aos voláteis do interior da arena durante 30 minutos. Após este período a fibra foi retirada e colocada imediatamente no injetor de um Cromatógrafo Gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (Agilent 5975C) equipado com analisador quadruplar, em coluna apolar DB-5 (0,25 mm de diâmetro x 30 m de comprimento, com filme 0,25 µm, Supelco, Bellefonte, PA,EUA), com detector de ionização por chama (DID) a 260°C e um programa na temperatura de 50°C/2 min, 20°C/min até atingir 260°C/ e posteriormente mantido por 30 minutos nesta temperatura), com ionização de impacto de elétrons (70-eV, temperatura 200°C) e um injetor “splitless”. Foi utilizado Hélio como gás de arraste. Os dados foram coletados e analisados com o software ChemStation.

A identificação dos compostos foi obtida por comparação do padrão de fragmentação dos compostos da amostra com o de dados catalogados em bibliotecas espectrais (NIST). O programa utilizado selecionava somente os íons 88: 101: 156, presentes na molécula do padrão 2, 6, 10- trimetiltricoato de metila, componente majoritário do feromônio sexual de *E. heros*, facilitando a identificação do composto na fibra. O tamanho das áreas de cada pico foi registrado para análise quantitativa. Após cada repetição a fibra era exposta ao detector de chamas de um CG, a 250°C durante 40 min para limpeza e posterior utilização em uma próxima repetição. Foram feitas 20 repetições, e a cada repetição todo sistema foi trocado.

A análise quantitativa e comparação entre tratamento e controle, foi feita por padrão externo, utilizando-se uma curva de calibração (Apêndice III) com o padrão do 2, 6, 10- trimetiltricoato. Para isto foi utilizada a mesma montagem experimental para coleta dos voláteis descrita previamente, mas, no lugar do inseto no interior da câmara foram introduzidos pedaços de papel filtro (1 x 2 cm) impregnados com soluções do composto sintético nas concentrações de 0,025, 0,035, 0,05, 0,25 e 0,35 mg/ml, sendo esses os diferentes pontos de utilizados

para curva. Como descrito previamente, a fibra foi injetada no CG-EM, e as áreas dos picos correspondentes ao composto foram calculadas. A área correspondente ao composto foi calculada e aplicada à equação da curva de calibração para se estimar a concentração do composto na amostra (Apêndice III) (Figura 3.5).

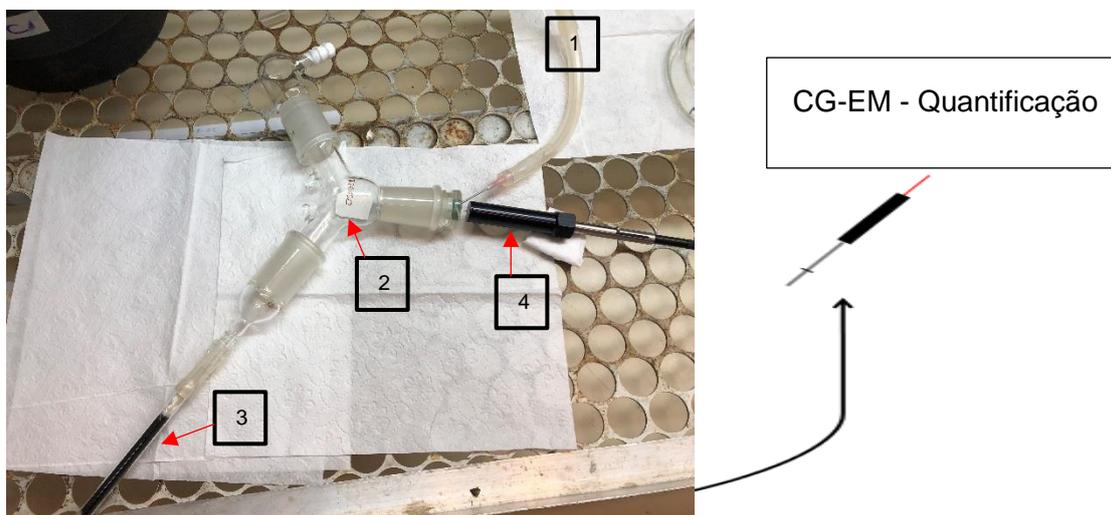


Figura 3.5. Procedimentos experimentais para coleta de voláteis para construção de curva de calibração para quantificação do feromônio de *Euschistus heros* em fibra de SMPE, em uma vidraria de conexão de 3 saídas. 1- Conexão a bomba de vácuo para manter o fluxo; 2-papel filtro impregnado com o composto padrão; 3-Carvão ativado para purificação do ar; 4-Fibra SPME.

Influência do feromônio na emissão de sinais vibratórios

Para avaliar a influência do feromônio sexual na modulação da emissão de sinais vibratórios foram realizados experimentos onde machos e fêmeas de *E. heros* foram expostos ao feromônio sexual naturalmente produzido pelos machos da espécie.

Coleta e preparação das soluções com feromônio sexual

Para coleta do feromônio sexual naturalmente produzido pelos machos de *E. heros* foi utilizada a técnica de coleta de voláteis por aeração (Blassioli-Moraes 2009). Para isto, foi utilizada uma câmara de vidro de 2 L

hermeticamente fechada. A tampa desta câmara possui dois orifícios onde se adaptaram dois tubos de vidro. Um dos tubos, por onde o ar entrou na câmara de coleta, tinha no interior carvão ativado funcionando como um filtro de ar, o outro tubo, por onde o ar foi escoado, foi preenchido com 100 mg de um adsorvente polimérico (Porapak Q). Antes de cada aeração os tubos com adsorvente foram pré-condicionados embebendo-os com diclorometano (2 ml) e aquecidos à 134°C sobre fluxo de N₂ por duas horas.

No interior da câmara foram introduzidos 20 machos de *E. heros* virgens e com 10 dias na fase adulta. Na câmara também foram colocadas 5 vagens de feijão limpas e frescas, que serviram como fonte de alimento para os insetos.

Um fluxo de ar (0,6 L/min) foi estabelecido utilizando uma bomba de vácuo conectada ao tubo de vidro com o adsorvente. Desta forma o fluxo foi estabelecido com entrada pelo filtro de carvão ativado, circulação pela câmara com os insetos e saída pelo tubo com o adsorvente. O período de coleta foi de 24 horas. Após a aeração, os tubos de vidro contendo o adsorvente foram eluídos com 1 ml do solvente orgânico *n*-hexano e pré-concentrados para 100 µl com fluxo suave de N₂, resultando em uma solução 0,2 inseto equivalente/ µl. Os extratos foram armazenados a -20°C.

A presença do feromônio sexual e ausência de quaisquer contaminante em cada extrato foi confirmada antes de sua utilização nos bioensaios. Para isto uma alíquota de 1 µl de cada extrato foi injetada em um cromatógrafo gasoso (CG) (Agilent 5975C, coluna apolar DB-5, 0.25 mm de diâmetro x 30 m de comprimento, filme 0.25 µm, J&W Scientific, Folsom, CA, USA), com detector por ionização de chama (DID) usando o modo splitless, tendo hélio como gás de arraste e um programa na temperatura de 50°C/1 min, 15°C/min a 250°C/20 min. A temperatura do detector foi de 270°C e do injetor 250°C. Para comparação, foi injetado 1 µl de uma solução em *n*-hexano, concentrada a 0,01 mg/ml do composto 2, 6, 10- trimetiltridecanoato de metila e 2, 6, 10- trimetildodecanoato de metila, componentes presentes no feromônio do percevejo *E. heros*, servindo assim como padrão comparativo. Depois injetou-se 1µl de cada extrato preparado, e comparou-se com a amostra do padrão, se os picos desses compostos estivessem presente no extrato e o mesmo estivesse livre de outros

contaminantes (ex. componentes da glândula metatorácica) esse extrato foi utilizado nos bioensaios. Após este procedimento foram selecionados 10 extratos para serem utilizados nos bioensaios os quais foram armazenados em refrigeração a -20°C . Para os bioensaios os papeis de filtro foram impregnados com $5\ \mu\text{l}$ das amostras (equivalentes à quantidade de voláteis liberada por um inseto em 24 h).

Bioensaios comportamentais

Foram realizados experimentos comportamentais com machos e, fêmeas individualmente ou com casais de *E. heros*. Nos experimentos com machos e fêmeas individualizados, um indivíduo foi colocado na folha de uma planta de feijão. Um suporte de laboratório com uma garra onde se prendeu um papel filtro (1 x 2 cm) impregnado com $5\ \mu\text{l}$ de um extrato contendo o feromônio sexual do percevejo *E. heros*, obtido segundo a descrição acima, foi colocado a ~ 5 cm de distância e à altura da parte inferior da folha onde se encontrava o inseto. O comportamento foi monitorado por observação direta durante 20 minutos e registrado em ata. Os sinais vibratórios emitidos foram registrados durante todo o experimento seguindo os procedimentos descritos em PEG. Nos experimentos realizados com casais um macho e uma fêmea foram colocados simultaneamente, em folhas opostas da planta. Como controle os bioensaios foram executados com papeis de filtro contendo $5\ \mu\text{l}$ de n-hexano. Os papeis de filtro e as plantas utilizadas nos bioensaios foram trocados a cada 10 repetições.

Os parâmetros analisados foram: a proporção de insetos que emitiram sinais vibratórios durante os bioensaio, latência (s), (tempo desde o início do bioensaio até que o inseto emite o primeiro sinal vibratório), tempo de resposta (s), (tempo em que o inseto permanece emitindo sinais vibratórios), proporção de casais que finalizaram o bioensaio com a cópula e inseto (sexo) que iniciou a comunicação vibracional Durante a execução dos bioensaios notou-se uma emissão frequente de um outro tipo de sinal acústica, caracterizada com Buzz. Este sinal se produz por um batimento enérgico das asas (Borges, 1987) gerando um sinal de alta intensidade (em comparação com os sinais vibratórios)

e com espectro de frequência caracterizados por uma frequência dominante entorno de 100 Hz e uma serie de harmônicos que podem atingir os 1000 Hz (Raúl Laumann, comunicação pessoal). Desta forma também foram registrados o número de buzzes emitidos por cada inseto nos bioensaios. Os parâmetros dos sinais vibratórios registrados e analisados foram frequência dominante (Hz), duração dos pulsos e intervalo entre pulsos (ambos em ms). Esses dados foram todos passados para planilhas e depois processados para as análises estatísticas e representação gráficas dos resultados.

O desenho experimental considerou a presença do feromônio na sala de experimentação, para evitar a saturação foi estabelecida uma sequência de aplicação dos diferentes tratamentos que consistiu iniciar os experimentos em cada dia com os bioensaios com fêmeas e com tratamento controle. As demais combinações de insetos e tratamentos foram executadas em forma aleatorizada. Essa ordem foi estabelecida para que a sala não ficasse com o odor do feromônio dos machos, interferindo nos bioensaios de controle com fêmeas. A cada 5 bioensaios a porta da sala experimental foi aberta e ventilada durante 10 minutos, para eliminar o excesso de feromônio no local. Foram realizadas 30 repetições para os casais e 20 para machos ou fêmeas quando avaliados em forma individualizada e para cada tratamento (feromônio ou controle). Os experimentos foram conduzidos entre as 09:00 e 17:00h.

Análises dos dados

A proporção de respostas, proporção de emissão de sinais por fêmeas e machos e proporção de cópula foram comparadas entre pares de cada espécie em tratamento e controle por regressão logística considerando respostas binárias (sim - 1 ou não - 0) como variável de resposta, e controle ou tratamento como fator explicativo. Coeficientes e erro padrão das regressões logísticas foram usados para calcular os oddsratios (OR) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%). As probabilidades foram consideradas significativas se seu IC não incluiu o valor 1. A porcentagem de redução da resposta quando os insetos foram colocados em plantas vibradas foi calculada como: $1 - OR * 100$, e o aumento da resposta em plantas não vibradas (controle) como: $1 / OR$.

A latência, o tempo de resposta e parâmetros temporais do sinal vibratório dos insetos (duração do pulso e intervalo entre pulsos), número de pulsos e distribuição da frequência dominante da normalidade foram avaliados com o teste de Shapiro-Wilk. Quando os dados apresentavam distribuição normal, eram comparados por uma análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, considerando os pulsos medidos no mesmo indivíduo como medidas repetidas. Quando os dados não apresentaram normalidade, foram analisados com modelos lineares generalizados mistos (GLMM) com distribuição de Poisson, considerando os parâmetros como variável resposta, a condição em que os insetos foram expostos (tratamentos) como fator explicativo e os indivíduos como efeitos aleatórios. Quando o resultado da anova apresentou diferença estatística foi realizado um teste de contraste entre os tratamentos.

Nos experimentos com rastros químicos em plantas para comparar a primeira escolha entre as folhas da planta foi realizado um teste de regressão logística para estimar a probabilidade de escolha para cada um dos tratamentos. O teste de χ^2 de Wald foi utilizado para avaliar a hipótese de não preferência (50% de probabilidade de escolha para cada lado) por um tratamento. O tempo de residência em cada folha trifoliada foi comparado com teste de *Wilcoxon*.

Os dados da quantidade de feromônio (em ng) quantificados segundo descrito acima foram submetidos ao teste *t* de *Student* para comparar a quantidade, em ng, do composto presentes na fibra quando os insetos foram submetidos a vibrações (tratamento FS1) ou foram mantidos sem vibrações (controle).

Nos experimentos de indução com feromônios a análise de qual sexo iniciou o canto foi realizada a partir de um teste de proporções. O número de Buzz foi entre os tratamentos foi comparado por um teste *t* de Student. Todos os testes estatísticos foram desenvolvidos na plataforma R versão 4.0.0 (R Development Core Team, 2020) utilizando o pacote lme4 para GLMM.

RESULTADOS

Os resultados de todas as análises estatísticas se apresentam no Apêndice III.

Influência de rastros químicos na emissão de sinais vibratórios

Nos bioensaios realizados em placas de Petri. As fêmeas de *E. heros* somente emitiram sinais vibratórios quando em contato com rastros de machos (25% das fêmeas avaliadas), desta maneira os demais parâmetros não podem ser comparados entre os tratamentos e o controle. Os machos avaliados isoladamente e fêmeas e machos em casais não mostraram diferenças significativas na proporção de insetos que emitiram sinais vibratórios (Figura 3.6). Da mesma maneira não foram encontradas diferenças significativas na latência e no tempo de resposta entre os tratamentos (rastros de fêmeas e machos) e o controle para as fêmeas em casais e para os machos avaliados individualmente ou em casais (Figura 3.6 A e B).

Os machos individualizados e as fêmeas e machos em casais não alteraram os padrões temporais de seus sinais vibratórios em presença de rastros de coespecíficos e em relação aos insetos colocados em placas de Petri sem rastros (controle) (Figura 3.6 C e D). O número de pulsos também não foi afetado pela presença de rastros de coespecíficos em fêmeas avaliadas em casais e machos avaliados individualmente e junto com fêmeas (Figura 3.6 E).

Os sinais emitidos pelos insetos tampouco mostraram diferenças no principal componente do seu espectro de frequências (Frequência dominante). Somente os machos, quando testados isoladamente na arena e em presença de rastros de fêmeas mostraram diferenças na frequência dominante (aumento) em relação aos insetos em contato com rastros de machos ou em placas sem rastros (controle) ($F=14,65$, $gl= 2$, $P<0,0001$ e teste de contrastes $P < 0,05$). (Figura 3.6 F).

Ao considerar a proporção de cópula dos casais em placas de Petri com a presença de rastros de fêmeas, machos ou controle (sem rastros) foi observada um efeito significativo dos rastros das fêmeas na proporção de casais que copularam ($\chi^2 = 1,97$, ddf = 10-31, $P < 0.001$). (Tabela 3.7).

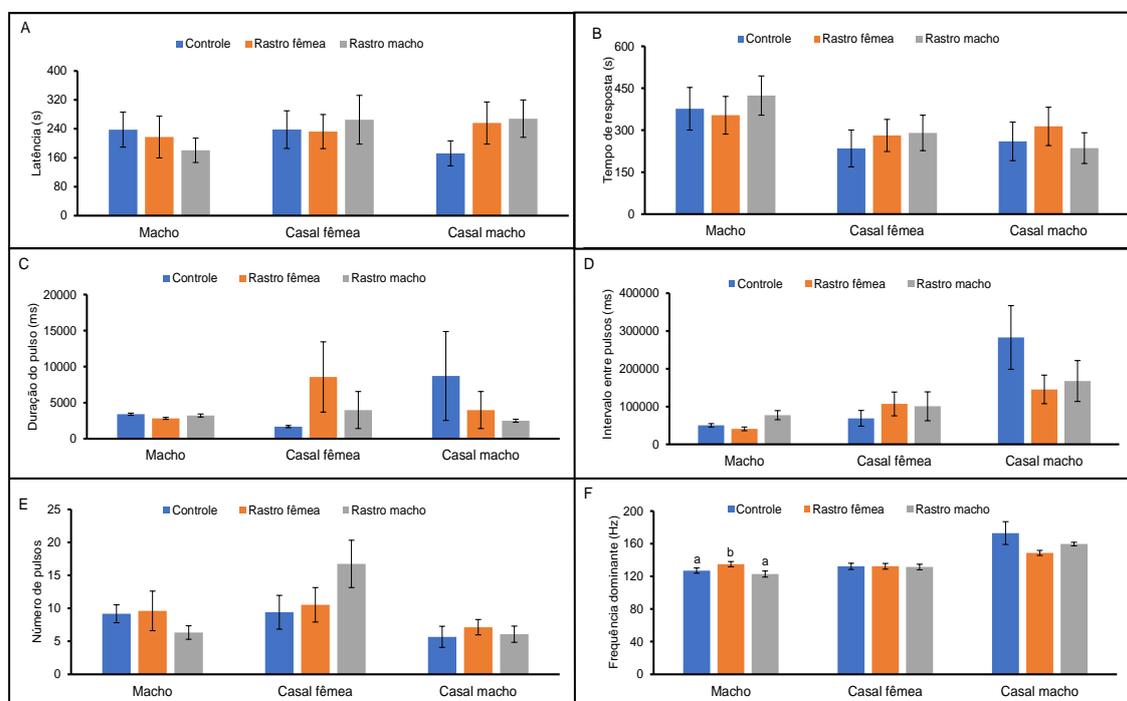


Figura 3.6. Efeito de rastros químicos de fêmeas e machos de *E. heros* na dinâmica de emissão e nos parâmetros dos sinais emitidos por machos de *E. heros* quando avaliados individualmente ou em casais. A) Tempo de latência (média do tempo em segundos no qual o inseto emite primeiro sinal vibratório), B) Tempo de resposta (média do tempo em segundos no qual o inseto permaneceu emitindo sinais vibratórios) C) Duração do pulso (média do tempo em milissegundos), D) Intervalo entre os pulsos (média do tempo, em milissegundos, do final de um pulso ao início do próximo), E) Média do número de pulsos dos sinais F) Frequência dominante (média da frequência dominante em um pulso, em Hertz). Os insetos foram expostos a placas de Petri de vidro tratadas com rastro de macho (barra cinzas), rastro de fêmea (barra laranjas) e controle, placas sem rastros (barras azuis). As linhas acima das barras representam o erro padrão. As letras acima das barras representam diferença estatística entre os tratamentos (teste de contrastes $P < 0,05$).

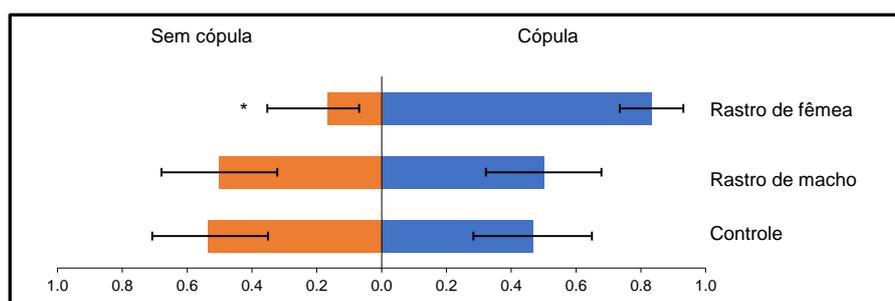


Figura 3.7. Efeito de rastros químicos de fêmeas e machos de *E. heros* na proporção de casais de *E. heros* que copularam quando expostos a placas tratadas com rastros de fêmeas, rastros de machos ou controle (sem rastros). As barras horizontais indicam a proporção média de resposta calculada a partir da regressão logística e as linhas o IC de 95%. * representa efeito significativo do tratamento na proporção de cópula ($P < 0,05$).

Foram identificados os compostos presentes nos hidrocarbonetos cuticulares de machos e fêmeas de *E. heros* (tabela 1). As fêmeas possuem cinco compostos exclusivo, não encontrados nos machos (Eicosanal, Pentacosadieno, (Z9) Pentacoseno, (Z7) Pentacoseno, (Z9) Heptacoseno, (Z7) Heptacoseno, escaleno, Triatricoteno), e os machos possuem três compostos que as fêmeas não possuem (Acetato de octadecanol, tricoseno, compostos coeluidos e com tentativas de identificação em tempos de retenção diferentes) (Tabela 3.1)

Os cromatogramas da identificação se apresentam no Apêndice III.

Tabela 3.1. Hidrocarbonetos cuticulares isolados a partir de rastros de fêmeas e machos de *E. heros* depositados sobre superfícies de vidro.

| HC de <i>E. heros</i> | Fêmeas | | Machos |
|---------------------------------------|--------|--------|--------|
| | TR | TR | IR |
| <i>Composto</i> | CGME | CGME | |
| 1 Hexadecanol | 31.224 | 31.224 | 1883 |
| 2 Ácido Hexadecanóico | 32.268 | 32.268 | 1961 |
| 3 Eicosano | 35.758 | 35.758 | 2000 |
| 4 Octadecanal | 32.836 | 32.836 | 2005 |
| 5 Octadecanol | 33.759 | 33.759 | 2086 |
| 6 Heneicosano | 33.896 | 33.896 | 2100 |
| 7 Ácido Z) -9-octadecenóico | 34.295 | 34.295 | 2137 |
| 8 Docasano | 34.905 | 34.905 | 2200 |
| 8a Acetato de octadecanol | ND | 34.905 | 2209 |
| 9 Eicosanal | 35.164 | ND | 2224 |
| 10 Tricoseno | ND | 35.164 | 2281 |
| 10a Tricoseno | ND | 35.164 | 2292 |
| 10b Tricosano | 35.861 | 35.861 | 2300 |
| 11 Éstertridecílico de ácido benzóico | 35.935 | 35.935 | 2306 |
| 12 CAD | 36.033 | 36.033 | 2317 |
| 13 Tetracosano | 36.736 | 36.736 | 2399 |

| Continuação tabela 1 | | | |
|----------------------|------------------------------------|--------|------|
| 14 | Ácidobenzóico, éster tetradecílico | 36.862 | 2413 |
| 15 | Pentacosadieno | 37.323 | 2469 |
| 16 | Z9 Pentacoseno | 37.359 | 2472 |
| 17 | Z7Pentacoseno | 37.413 | 2478 |
| 18 | Pentacosano | 37.565 | 2500 |
| 19 | Ácidobenzóico, éster pentadecílico | 37.724 | 2517 |
| 20 | Hexacosano | 38.35 | 2597 |
| 21 | Z9 Heptacoseno | 38.895 | 2667 |
| 22 | Z7 Heptacoseno | 38.983 | 2679 |
| 23 | Heptacosano | 39.103 | 2697 |
| 24 | 13-metil heptacosano | 39.329 | 2725 |
| 25 | 2-metil heptacosano | 39.636 | 2768 |
| 26 | Octacosano | 39.825 | 2800 |
| 27 | Desconhecido | 39.868 | 2802 |
| 28 | Esqualeno | 39.93 | 2808 |
| Continuação tabela 1 | | | |
| 29 | Nonacosadieno | 40.364 | 2879 |
| 30 | Nonacosano | 40.543 | 2900 |
| 31 | Triacontadieno | 41.137 | 2970 |
| 32 | Triacontano | 41.327 | 3000 |
| 33 | Hentriacontatriene | 41.735 | 3040 |
| 34 | Hentriacontatriene | 41.802 | 3047 |
| 35 | Hentriacontadiene | 42.019 | 3071 |
| 36 | Hentriacontano | 42.233 | 3094 |
| 37 | Colesterol | 42.623 | 3132 |
| 38 | Dotriacontano | 43.283 | 3200 |
| 39 | Triatriconteno | 44.533 | 3395 |
| 40 | Tritriacontano | 44.685 | 3300 |
| 41 | Hidrocarbóento ramificado | ND | 3325 |
| 42 | Hidrocarboneto metílico | ND | 3370 |
| 43 | Tetratriacontano | 46.026 | 3400 |
| 44 | Dimetiltetratriacontano | 47.22 | 3480 |
| 45 | Pentatriacontano | 47.825 | 3500 |
| 46 | Metilpentatriacontano | 48.746 | 3600 |
| 47 | Metilpentatriacontano | 49.197 | 3569 |
| 48 | Metilpentatriacontano | ND | 3607 |
| 49 | HCLMR | 50.983 | 3646 |
| 50 | HCLMR | 51.326 | 3659 |
| 51 | HCLMR | 52.723 | 3677 |
| 52 | HCLMR | ND | 3695 |
| 53 | HCLMR | 57.353 | 3855 |
| 54 | HCLMR | 57.714 | 3863 |
| 55 | HCLMR | ND | 3869 |
| 56 | HCLMR | 58.472 | 3880 |

Referências: letras ao lado dos números sugerem outro composto. HC = hidrocarbonetos cuticulares; TR = tempo de retenção; IR = índice de retenção; CGME = cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas; ND = não detectado; CAD = composto aromático desconhecido; HCLMR = Hidrocarbonetos de cadeia longa metil ramificada.

Substratos naturais

A presença de rastros de hidrocarbonetos cuticulares de machos não condicionou a preferência das fêmeas por um lugar específico da planta (escolha inicial) (Figura 3.8) e não mostrou um efeito de retenção dos insetos nas folhas contaminadas com rastros (tempo de residência) o mesmo foi observado nas plantas controle (Figura 3.8).

Os machos de *E. heros* quando expostos às plantas controle, não mostraram diferenças entre as folhas do lado esquerdo e direito das mesmas tanto para escolha inicial, e tempo de residência em cada lado. Em contraste, os machos preferiram (primeira escolha $\chi^2=9,8$, $gl=1$, $P=0,001$) (Figura 3.8) e passaram maior quantidade de tempo (tempo de residência=4,521, $gl=19$, $P<0,001$) (Figura 3.9) nas folhas com rastros de fêmeas em relação às folhas não tratadas.

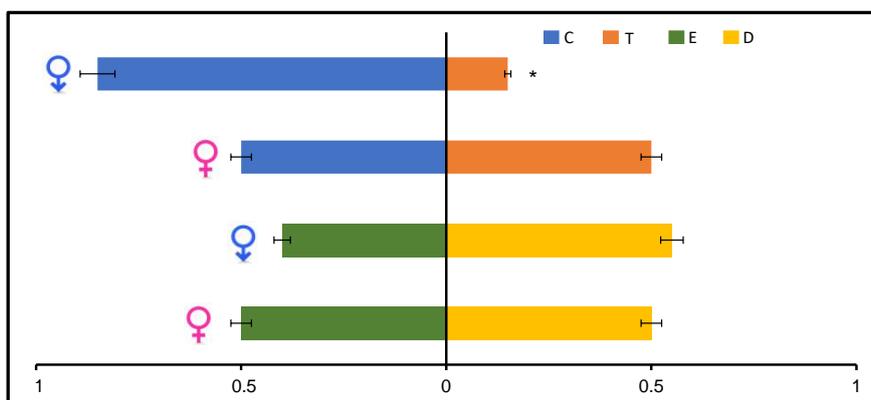


Figura 3.8. Resposta de fêmeas e machos de *E. heros* em plantas de soja com uma das folhas contaminadas com rastros químicos de coespecíficos a outra sem rastros ou em plantas de soja sem rastros. Proporção de fêmeas de *E. heros* que escolheram primeiramente uma das folhas de plantas controle ou uma das folhas das plantas tratadas com rastros químicos de coespecíficos do sexo oposto. E: folha do lado esquerdo da planta, D: folha do lado direito da planta, T: folha da planta com rastros de machos (resposta de fêmeas) ou fêmeas (resposta de machos, C: folha controle (sem rastros). As barras horizontais indicam a proporção média de resposta calculada a partir da regressão logística e as linhas o IC de 95%. * representa diferença estatística entre os tratamentos (teste X^2 de Wald, $P<0,05$).

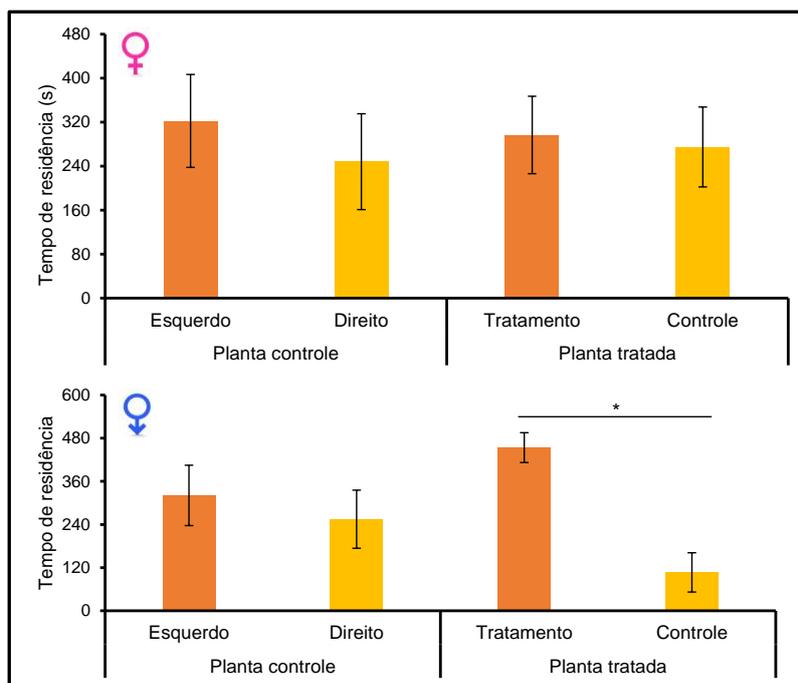


Figura 3.9. Tempo de residência (média do tempo em segundos, em que o inseto permaneceu em uma das folhas escolhida) de fêmeas (acima) e machos (abaixo) de *E. heros* nas folhas do lado esquerdo ou direito de plantas de feijão sem tratamento (Plantas controle) ou nas folhas de plantas tratadas, onde uma das folhas tinha rastros químicos de macho (para fêmeas) ou fêmeas (para machos) (Tratamento) e a outra permaneceu sem rastros (Controle). As linhas acima das barras representam o erro padrão. * representa diferença estatística entre os tratamentos (teste de Wilcoxon $P < 0,05$).

As fêmeas de *E. heros* em plantas com rastros de machos emitiram sinais vibratórios com maior frequência do que aquelas que iniciaram a comunicação em plantas controle, contudo essa proporção não foi estatisticamente significativa. A proporção de machos emitindo sinais vibratórios em plantas tratamento (com rastros de fêmeas) ou controle não mostrou diferenças significativas (Tabela 3.2). Um fato interessante é que foi observada uma alta proporção machos (55%) emitindo o canto MS3 (canto de cópula) quando em presença de rastros de fêmeas. Em plantas controle não foi emitido este canto (Blassioli-Moraes et al 2005).

Somente 5 fêmeas responderam nas plantas controle (sem rastros). Este número limitado de dados não permitiu as comparações pelo que os resultados relacionados aos parâmetros dos sinais emitidos serão apresentados somente para os machos.

Os machos em plantas com rastros de fêmeas mostraram um menor tempo de latência em relação a machos em plantas sem rastros ($T=2,618$, $gl=17$, $P= 0,017$) (Figura 3.10 A). Entretanto uma vez iniciada a emissão de sinais vibratórios o tempo no qual os insetos mantiveram essa emissão não diferiu entre os machos em plantas com ou sem rastros (Figura 3.10 B).

O contato com rastros de fêmeas também modificou os parâmetros temporais dos sinais emitidos (Figura 3.10 C e D). Em plantas com rastros de fêmeas os machos emitiram um maior número de pulsos (Figura 3.10 E) e estes foram de menor duração e a intervalos menores (Número de pulsos emitidos: $T=-0,03$, $gl= 17$, $P=0,0001$, Duração dos pulsos: $z = -3,2$, $gl= 949$, $P<0,001$, Intervalo entre pulsos: $z = -606$, $gl= 949$, $P< 0,01$) (Figura 3.10 C). Os parâmetros espectrais dos sinais emitidos pelos machos não foram influenciados pela presença ou não de rastros de fêmeas (Figura 3.10 F).

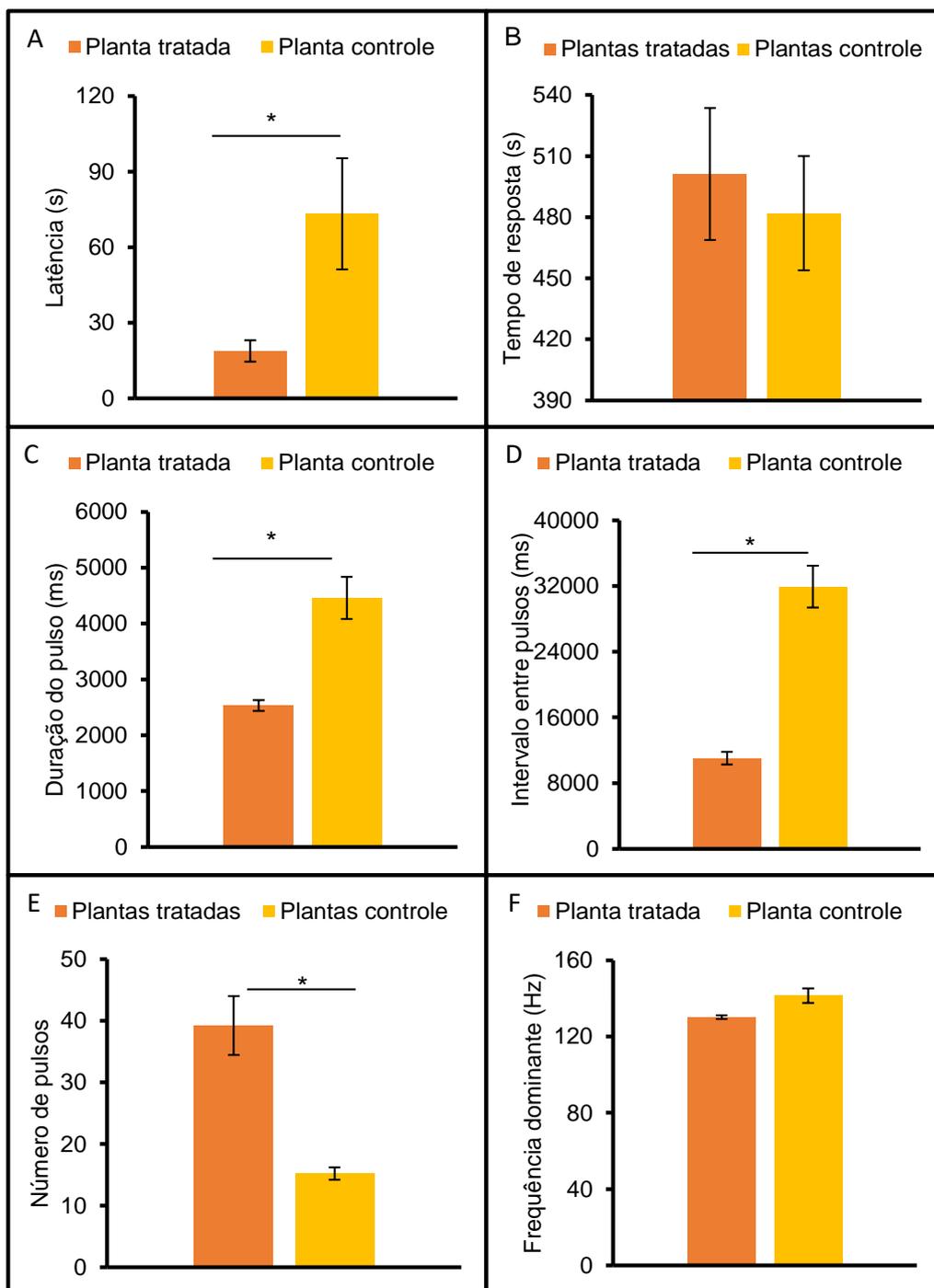


Figura 3.10. Dinâmica da emissão e parâmetros dos sinais vibratórios emitidos por machos de *E. heros* em plantas de feijão, tratadas com rastros de fêmeas (Plantas tratadas) e sem tratamento (Plantas controle). A) Latência (média do tempo em segundos no qual o macho emite primeiro canto), B) Tempo de resposta (média do tempo em segundos no qual o macho permaneceu cantando) C) Duração do pulso (média do tempo em milissegundos), D) Intervalo entre os pulsos (média do tempo, em milissegundos, do final de um pulso ao início do próximo), E) Número de pulsos emitidos. F) Frequência dominante (média da frequência dominante em um pulso, em Hertz). As linhas acima das barras representam o erro padrão. * representa diferença estatística entre os tratamentos (GLM $P < 0,05$).

Influência dos sinais vibratórios na emissão de feromônio:

Machos de *E. heros*, quando em contato com o canto de chamamento da fêmea (FS1), liberaram uma quantidade maior de feromônio sexual comparado a machos que não foram expostos ao tratamento ($t = -2.5498$, $gl = 19$, $P = 0.01957$) (Figura 3.11).

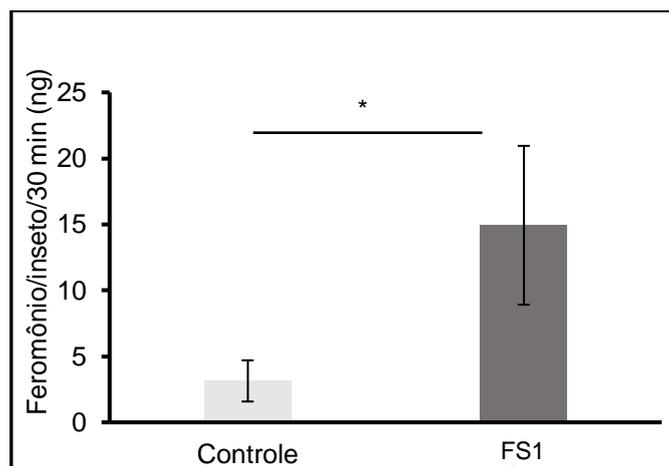


Figura 3.11. Emissão de feromônio (ng/inseto/30 min) por machos de *E. heros* em arenas experimentais com presença de canto de chamamento da fêmea (FS1) ou sem este sinal vibratório (controle). Barras representa o valor média e as linhas representam o erro padrão. * representa diferença estatística entre os tratamentos (teste de *Wilcoxon* $P < 0,05$).

Influência do feromônio na emissão de sinais vibratórios:

Não houve diferença significativa na proporção de machos emitindo sinais vibratórios quando tratados ou não com o feromônio sexual dos machos, tanto nos experimentos em que os machos estavam sozinhos na planta ou com uma fêmea (casais) (Tabela 3.2). A proporção de fêmeas emitindo sinais vibratórios também não diferiu quando estiveram sozinhas em presença ou não do feromônio sexual dos machos ou em casais. Entretanto, uma maior proporção de fêmeas emitiu sinais vibratórios quando foram colocadas em plantas tratadas com o feromônio sexual dos machos em relação às fêmeas que estavam em plantas controle (sem feromônio) ($z = 2,7$, $gl = 34$, $P = 0,006$) (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Resultados da análise de regressão logística e cálculo da razão de chance (IC 95%) para avaliação do efeito de tratamentos (Planta de feijão ou placas de Petri com rastro de fêmea ou macho de *E. heros*; de feijão em contato com papel filtro impregnados com extrato de aeração de machos de *E. heros* (Feromônio). As variáveis foram computadas em forma binária (presença ausência do comportamento) e comparadas em relação ao observado nos casais colocados em situação de controle (Plantas sem rastro; placa sem rastro; plantas com solvente (Hexano), valores de razão de chance em negrito indicam efeito significativo do tratamento em relação ao controle.

| Tratamento | Variável | estatística | Reação de chance (IC 95%) |
|-----------------------------|----------------------|------------------------|-----------------------------|
| | Resposta fêmea | NA | |
| Placa RM X Placa SR | Resposta macho | z= -0,29 P=0,76 GI=78 | 0,84 (0,26 - 2,65) |
| | Resposta casal fêmea | z=-1,21 P=0,22 GI=57 | 0,33 (0,05 - 1,97) |
| | Resposta Casal Macho | z=-1,21 P=0,22 GI=57 | 0,33 (0,05 - 1,97) |
| | Resposta macho | z= -0,29 P=0,76 GI=78 | 0,84 (0,26 - 2,65) |
| Placa RF X Placa SR | Resposta fêmea C | NA | |
| | Resposta Macho C | NA | |
| Planta RM X Planta SR | Resposta fêmea | z= -0,83 P=0,40 GI=35 | 0,53 (0,12 - 2,33) |
| Planta RF X Planta SR | Resposta macho | z=0,63 P=0,52 GI=39 | 2,22 (0,18 - 26,62) |
| | Resposta fêmeas | z=2,72 P<0,05GI=34 | 11,57 (1,98 - 67,48) |
| Feromônio X Hexano | Resposta machos | NA | |
| | Resposta fêmea C | NA | |
| | Resposta macho C | NA | |
| | Cópula | z=-0,784 P=0,433 GL=58 | 0,66 (0,23 - 1,8) |
| | Fêmea início | z= 2,33 P< 0,05 GL=58 | 3,7 (1,2 - 11,38) |
| | Macho início | z= -2,33 P<0,05 GL=58 | 0,26 (0,08 - 0,8) |

Referências: RM= rastro de macho de *E. heros*. RF= rastro de fêmeas de *E. heros*. SR= sem rastro. C= casal, experimentos feitos com casais. Resposta fêmeas= fêmeas que emitiram pelo menos um pulso de sinal vibratório durante o experimento. Resposta machos = machos que emitiram pelo menos um pulso de sinal vibratório durante o experimento. Cópula= casais que copularam durante a execução do experimento. NA= não avaliado, nestes tratamentos todos os insetos emitiram sinais vibratórios tanto no controle quanto no tratamento.

O feromônio estimulou a emissão de sinais vibratórios pelas fêmeas uma vez que, nos bioensaios em que as fêmeas estiveram em plantas tratadas o tempo de latência foi menor ($T=2,31$, $gl=20$, $P=0,03$) (Figura 3.12 A) e o tempo de resposta foi maior ($T=5,97$, $gl=20$, $P<0,001$) (Figura 3.12 B) do que observados em fêmeas colocadas em plantas controle. No caso dos machos a presença do feromônio não interferiu no tempo de latência e no tempo de resposta, (Figura 3.12 A e B) (resultados dos testes). Nos bioensaios com casais somente foi observado que a presença do feromônio incrementa o tempo de latência dos machos ($T=2,249$, $gl=29$, $P=0,032$) (Figura 3.12 A).

Não foram observadas diferenças significativas no número de pulsos emitidos pelas fêmeas nas plantas controle e com feromônio. Os machos emitiram menor número de pulsos quando em contato com as plantas tratadas com o feromônio ($T=-2,11$, $gl=21$, $P=0,046$). Nos bioensaios realizados com casais as fêmeas e machos não variaram o número de pulsos entre os tratamentos (Figura 3.12 C).

As fêmeas, quando avaliadas individualmente, em plantas com tratamento emitiram maior número de sinais originadas no batimento das asas (buzz) ($T=-3,151$, $gl=10$, $P=0,01$). Não houve diferença estatística entre tratamento e controle no número de vezes que os machos bateram as asas durante o experimento (Figura 3.12 D). Nos bioensaios com casais as fêmeas não mostraram alteração na emissão de buzzes quando estiveram em plantas tratadas com feromônio sexual da espécie ou em plantas controle (sem feromônio), os machos, quando na presença de feromônio, bateram as asas maior número de vezes durante os bioensaios (número de Buzz: $T=-2,566$, $gl=7$, $P=0,03$) (Figura 3.12 D).

As fêmeas em contato com tratamento emitiram pulsos de menor duração (duração do pulso: $z = -145$, $gl= 771$, $P<0,001$) (Figura 3.13 A) e com maior intervalo entre os pulsos ($z = 1192$, $gl=771$, $P< 0,01$) (Figura 3.13 B). Os machos emitiram pulsos maiores ($z = 8,2$, $gl = 835$, $P < 0,001$) e com intervalo entre os pulsos maior quando os machos estiveram em plantas com tratamento ($z = 707$, $gl = 835$, $P < 0,001$) (Figura 3.13 A e B). Quando os insetos foram testados em pares, as fêmeas apresentaram sinais vibratórios com pulsos maiores ($z = 74$,

gl=2050, $P < 0,001$) e intervalo entre pulsos de maior duração nos bioensaios com plantas tratadas com feromônio em comparação ao controle com hexano ($z = 834$, gl=2050, $P < 0,001$) (Figura 3.13 A eB). A duração dos pulsos dos sinais vibratórios emitidos pelos machos foi maior nos bioensaios em que as plantas foram expostas ao hexano(controle) ($z = -143$, gl=1354, $P < 0,001$) (Figura 3.13 A) e o intervalo entre pulsos foram menores ($z = 459$, gl = 1354, $P < 0,001$) (Figura 3.13 B).

A frequência dominante dos sinais vibratórios emitidos pelas fêmeas e machos foi maior quando em contato com as plantas com tratamento (Fêmeas: $z = 10$, gl=771, $P < 0,001$, Machos: $z = 23$, gl = 835, $P < 0,001$) (Figura 3.13 C). Nos bioensaios com casais as fêmeas e os machos emitiram pulsos com a frequência dominante maior em plantas com feromônio em relação aos pulsos emitidos em plantas controle (Fêmeas: $z = 22$, gl= 2050, $P < 0,001$, Machos: $z = 17$, gl= 1354, $P < 0,001$) (Figura 3.13 C).

Nos bioensaios feito com casais a porcentagem de fêmeas que iniciaram a emissão de sinais vibratórios foi significativamente maior em plantas com feromônio (53.3%) do que em plantas sem feromônio (controle) (2,33%) ($z = 2,33$, gl = 58, $P < 0,05$ GL=58) e os machos reduziram a proporção de indivíduos que iniciaram o comportamento reprodutivo na presença do feromônio ($z = -2,33$, gl = 58, $P < 0,05$) (Figura 3.13 D). A presença de feromônios não alterou a proporção dos casais que copularam em relação ao observado nas plantas controle (Tabela 3.2).

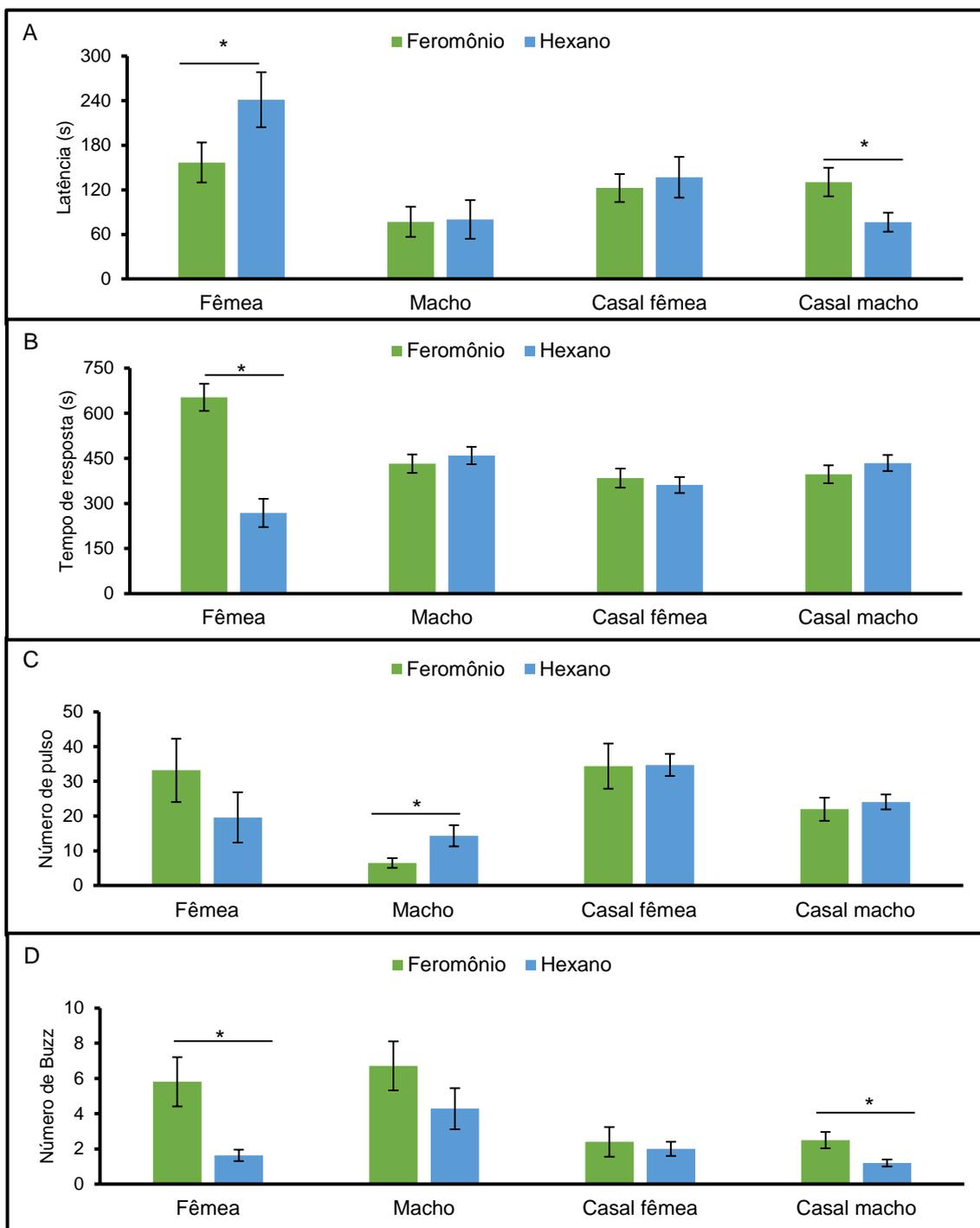


Figura 3.12. Dinâmica da emissão e parâmetros dos sinais vibratórios de fêmea e machos de *E. heros*, avaliados em forma individual ou em casais em plantas que receberam feromônio sexual da espécie (Feromônio) ou n-hexano (Hexano) como controle. A) Latência (média do tempo em segundos no qual a fêmea emite primeiro sinal vibratório), B) Tempo de resposta (média do tempo em segundos no qual a fêmea permaneceu emitindo sinais vibratórios), C) Número de pulsos emitidos, D) Número de buzz. As barras indicam os valores médios dos parâmetros e as linhas representam o erro padrão. * representa diferença estatística entre os tratamentos (GLMM $P < 0,05$).

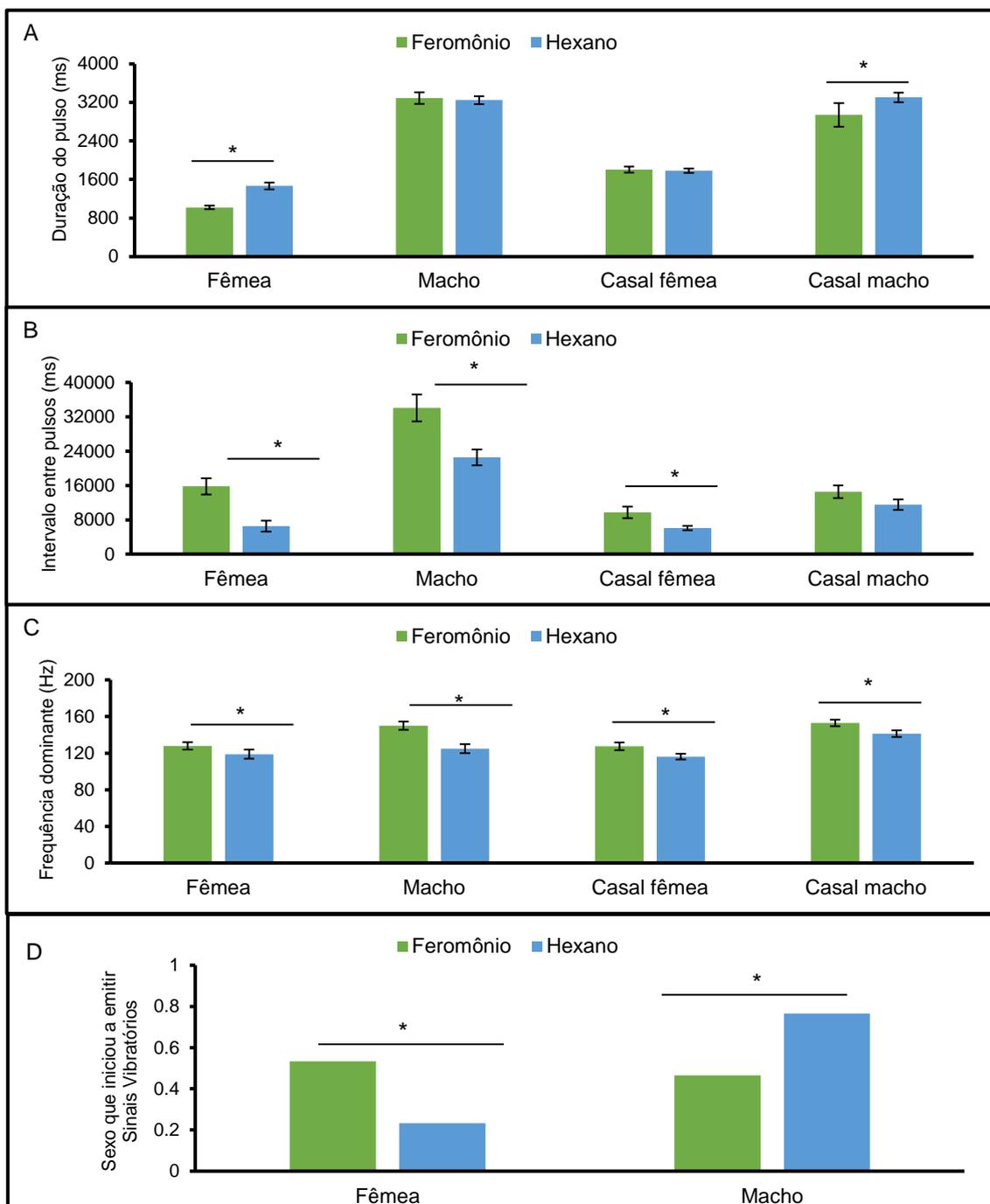


Figura 3.13. Dinâmica da emissão e parâmetros dos sinais vibratórios de fêmea e machos de *E heros*, avaliados em forma individual ou em casais em plantas que receberam feromônio sexual da espécie (Feromônio) ou n-hexano (Hexano) como controle. A) Duração do pulso (ms), B) Intervalo entre os pulsos (ms), C) Frequência dominante (Hz), D) Proporção de fêmeas e machos de que iniciaram a emissão do comportamento vibracional. As barras indicam os valores médios dos parâmetros e as linhas representam o erro padrão. * representa diferença estatística entre os tratamentos (GLMM $P < 0,05$).

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados aqui sugerem uma clara influência dos sinais químicos na comunicação vibracional do percevejo marrom, *E. heros*. A presença de rastros químicos de seus coespecíficos estimulam os insetos a emitirem sinais vibracionais. E a presença do feromônio dos machos próximo às plantas estimulam as fêmeas de *E. heros* a emitirem sinais vibracionais e inibe os machos. Por sua vez os sinais vibratórios modulam a emissão de sinais químicos uma vez que foi comprovado que a presença de sinais vibratórios de fêmeas estimula os machos a emitirem uma quantidade maior de feromônio sexual.

Esses resultados confirmam a hipótese de que o contato com rastros químicos de percevejos influencia a comunicação vibracional, e esta influência depende da identidade (espécie/sexo) do rastro. Também a hipótese, de que os sinais vibratórios de indivíduos da mesma espécie interferem na emissão de feromônios sexuais. E confirma a última hipótese testada, que sugere que o contato com feromônio sexual de machos interfere na comunicação vibracional estimulando a emissão de sinais vibratórios e influencia parâmetros temporais e espectrais destes sinais.

Adicionalmente foi comprovado que os rastros de hidrocarbonetos cuticulares podem ter um efeito na orientação direcional dos insetos uma vez que os machos mostraram uma clara preferência por folhas tratadas com rastros químicos das fêmeas. Este é um fato não relatado previamente na literatura e que pode auxiliar para interpretar a orientação espacial dos machos nas plantas quando procuram por fêmeas. Nesse sentido estes sinais químicos podem potencializar o efeito dos sinais de chamamento das fêmeas (FS-1) que os machos utilizam como fonte de informação para localiza-las (como se demonstra no capítulo 5 desta tese) mostrando movimentos orientados à fonte de emissão destes sinais (Čokl, et al., 1999). Adicionalmente, os machos em contato com os

rastros das fêmeas ficaram mais estimulados, levando menos tempo para começar a emitir espontaneamente sinais vibratórios, emitindo um maior número de pulsos com intervalos menores entre si. Por sua vez, as fêmeas tiveram maior proporção de resposta quando em contato com plantas com rastro de machos.

Um outro efeito observado foi que, em presença dos rastros das fêmeas os machos emitem com maior frequência o canto de acasalamento MS3. Este canto tem sido associado ao reconhecimento de seu parceiro sexual durante o comportamento de acasalamento e cópula (Blassioli-Moraes et al., 2005). As observações realizadas quando em contato com os rastros químicos das fêmeas sugerem alguma outra função para este canto que deve ser estabelecida em trabalhos futuros.

O contato com os rastros químicos dos machos tem uma clara influência na emissão de sinais vibratórios das fêmeas. Isto foi observado tanto em substratos artificiais (arenas de vidro) como em substratos naturais (plantas). Os hidrocarbonetos cuticulares (HC) têm, nos insetos, diversas funções, entre elas o reconhecimento de coespecíficos e de parceiros para cópula (Theresa, 1998). Para os pentatomídeos a função dos hidrocarbonetos cuticulares na comunicação intraespecífica ainda é desconhecida. A composição dos HC apresenta diferenças claras entre espécies (Lagôa et al., 2019) e para as espécies Neotropicais *Chinavia ubica* e *Chinavia impicticornis* também se identificaram diferenças entre o sexo dos indivíduos (Silveira et al., 2016,). Nas análises dos HC de *E. heros* foram identificados compostos diferentes entre os machos e fêmeas. A relevância destas diferenças para a comunicação dos insetos e se elas têm influência decisiva para a transmissão de informações entre indivíduos é desconhecida. Os resultados apresentados aqui constituem os primeiros relatos em relação à relevância dos HC na comunicação dos percevejos.

A mesma função de orientação dos insetos exercida por HC presentes nos rastros de percevejos tinham sido demonstrada previamente para os seus inimigos naturais, como os parasitoides de ovos *Trissolcus basalís* e *Telenomus podisi* (Borges et al., 2003, Colazza et al., 2007). Lagôa e colaboradores (2019) também demonstraram que estes insetos podem

discriminar entre os rastros de diferentes espécies de percevejos e Colazza e colaboradores (2007) demonstraram a discriminação entre rastros de machos e fêmeas. Desta forma fica evidente que os rastros químicos de percevejos fornecem informação relevante e de alta confiabilidade tanto para os coespecíficos, quanto para inimigos naturais.

A maior resposta observada quando os insetos foram avaliados em plantas em relação a arenas de vidro pode ser uma consequência de uma melhor percepção e persistência dos rastros nas plantas. Sabe-se que os hidrocarbonetos cuticulares do percevejo *N. viridula* podem interagir com os lipídeos e ceras presentes na cutícula das folhas que adsorvem e retêm os compostos depositados na superfície (Colazza et al., 2009).

Os efeitos observados quando os insetos foram colocados individualmente na planta foram reduzidos para o caso dos casais (uma fêmea e um macho na planta). Isso pode ser consequência de interações entre os indivíduos mediadas por outro tipo de sinais como por exemplo, visuais ou táteis (Čokl et al., 2019) No entanto, a proporção de cópula foi maior quando o casal foi exposto, na arena, contendo o rastro de fêmea. Este resultado pode sugerir que, ou os rastros agiram de forma sinérgica na procura do macho dentro da arena, ou as fêmeas quando em presença de competidoras ficaram mais suscetíveis a aceitar os machos para cópula.

Os rastros químicos dos insetos podem fornecer informações de relevância para o sucesso reprodutivo dos indivíduos como, por exemplo, reconhecimento de parceiros sexuais, seu estado fisiológico (Beani et al., 2019) e maturidade sexual dos indivíduos (Butterworth et al., 2020). Os resultados obtidos sugerem que em *E. heros* os hidrocarbonetos cuticulares podem ter funções similares, entretanto para compreender totalmente a sua função é necessário aprofundar os conhecimentos de quais os compostos presentes nos rastros têm a função de transmitir essas informações.

Os machos de *E. heros* liberaram maior quantidade de feromônios sexual quando os insetos estiveram em presença dos sinais vibratórios das fêmeas (FS1). Este resultado confere com o relatado por Miklas e colaboradores (2003).

Nesse trabalho os machos de *N. viridula* liberaram uma maior quantidade de feromônio quando em contato com o som de fêmeas da mesma população, enquanto que não houve diferença entre a quantidade de feromônio liberada pelos machos quando em contato com o som de fêmeas de uma população diferente, com o canto de rivalidade dos machos ou controle. Entretanto, no caso de *N. viridula*, a quantidade de feromônio só aumentou no período pós estímulo e, por sua vez, os machos de *E. heros* liberaram uma quantidade maior de feromônio durante o período de estímulo.

Na natureza, durante a fase de busca por parceiros sexuais os machos liberam feromônio sexual para atração de fêmeas (Borges et al., 1987). Contudo a produção desse feromônio exige um gasto energético e fisiológico, prova disso é que a liberação só ocorre se estiverem devidamente alimentados (Moraes et al., 2008). Além disto, a liberação de feromônio aumenta o risco de predação (Wang e Tan, 2019) e parasitismo (Borges et al., 1994, Silva e colaboradores (2014). Portanto, o sinal vibracional de fêmea pode estimular o macho a liberar feromônio, uma vez que a presença da fêmea na planta é certa. Adultos de *E. heros* podem realizar múltiplas cópulas com diversos parceiros durante a fase reprodutiva (Panizzi, 1985), assim, mesmo com o sinal de fêmeas próximas, pode ser vantajosa a atração de um maior número possível de parceiras sexuais.

Quando foi testado o efeito do feromônio na resposta do percevejo *E. heros*, as fêmeas testadas isoladamente emitiram sinais vibratórios mais rápido e por mais tempo quando em contato com o feromônio. Os padrões espectrais a temporais dos sinais, tanto de machos quanto de fêmeas também variaram, além de sinais multifuncionais, como o bater de asas (*Buzz*), identificado por Kavcič e colaboradores (2013).

As fêmeas, quando testadas isoladamente, e na presença do feromônio, emitiram um maior número de *Buzz* durante os bioensaios. Já nos bioensaios com casais, somente machos emitiram maior número de *Buzz* quando expostos ao feromônio. Foi observado que ao bater as asas os percevejos emitem sinais de advertência de longo alcance, uma vez que, estes sinais se transmitem na planta por distâncias maiores atingindo outras plantas próximas (Čokl, Zunič, Blassioli-Moraes, Borges e Laumann, comunicação pessoal).

Visto a função dos sinais de *buzz*, duas hipóteses podem ser propostas. Quando testados isoladamente os machos não emitiram maior número de *buzz* entre os tratamentos. Bater as asas demanda um gasto energético, assim, talvez os insetos realizem esse comportamento quando há a garantia de um parceiro sexual próximo, no caso das fêmeas ao detectarem o feromônio do macho, e para os machos atraindo as fêmeas que estão emitindo FS1 na planta. Outra hipótese é que este sinal (*buzz*) esteja ligado a rivalidade, uma vez que os insetos os emitiram em maior número em situação onde poderia se inferir a presença de um competidor. Contudo para confirmar essas hipóteses experimentos com reprodução do sinal de Buzz precisam ser realizados.

Os resultados obtidos no experimento com feromônio conferem com os observados por Zgonik e Čokl (2013). E nesse trabalho, os autores observaram que as fêmeas de *N. viridula* responderam com maior frequência, emitindo sinais vibratórios, a papéis de filtro contendo o feromônio dos machos de sua espécie. Todavia, os padrões espectrais e temporais dos sinais emitidos não foram quantificados, somente a porcentagem de resposta, que neste capítulo não foi diferente quando as fêmeas foram testadas isoladamente.

A resposta dos machos de *E. heros* foi diferente à observada por Zgonik e Čokl (2013) com machos de *N. viridula*. Os machos de *E. heros*, quando em contato com o feromônio da espécie não apresentaram diferença na porcentagem de resposta e emitiram um número de pulsos menor em relação a machos sem presença do feromônio. Em contrapartida, os machos de *N. viridula* apresentaram uma taxa de resposta maior em presença do feromônio dos coespecíficos. Em presença do feromônio sexual os insetos emitiram sinais com frequência dominante maior. Sabe-se que a presença de sinais ou ruídos vibracionais (Laumann et al., 2018) e canto de outros percevejos (Avosani et al., 2020, Silveira et al., 2019) pode ocasionar a mudança do padrão da frequência dos pulsos emitidos. Contudo a relação da mudança da frequência dominante com a presença de feromônio sexual no ambiente ainda é desconhecida.

Os resultados aqui apresentados mostram que existe uma interação de sinais químicos e vibracionais com consequências tanto na modulação da emissão dos sinais vibratórios, como na própria estrutura dos mesmos. Esta

interação pode resultar benéfica uma vez os insetos são estimulados a emitir sinais que estabelecem a comunicação durante o comportamento sexual o que pode resultar em maior sucesso reprodutivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aquino, M.F.S.; Sujii, E.R.; Borges, M.; Blassioli Moraes, M.C.; Laumann, R.A. (2019). Diversity of stink bug adults and their parasitoids in soybean crops in Brazil: Influence of a latitudinal gradient and insecticide application intensity. *Env. Entomol.*, 48, 105–113
- Avosani, S., Sullivan, T. E., Ciolli, M., Mazzoni, V., & Suckling, D. M. (2020). Can Vibrational Playbacks Disrupt Mating or Influence Other Relevant Behaviours in *Bactericera cockerelli* (Triozidae: Hemiptera)? *Insects*, 11(5), 299.
- Beani, L., Bagnères, A. G., Elia, M., Petrocelli, I., Cappa, F., & Lorenzi, M. C. (2019). Cuticular hydrocarbons as cues of sex and health condition in *Polistes dominula* wasps. *Insectes Sociaux*, 66(4), 543-553.
- Blassioli-Moraes, M.C.; Laumann, R.A.; Čokl, A.; Borges, M. (2005). Vibratory signals of four Neotropical stink bug species. *Physiol. Entomol.*, 30, 175–188.
- Blomquist, G.J., Nelson, D.R. & Renobales, M. (1987) Chemistry, biochemistry, and physiology of insect cuticular lipids. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 6, 227–265.
- Borges, M.; Costa, M.L.M.; Sujii, E.R.; Cavalcanti, M.G.; Redígolo, G.F.; Resck, I.S.; Vilela, E.F. (1999) Semiochemical and physical stimuli involved in host recognition by *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae) toward *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). *Physiol. Entomol.*, 24, 227-233.
- Borges, M. and M.C. Blassioli-Moraes, (2017). “The semiochemistry of Pentatomidae”, pp. 95-124. In, A. Čokl and M. Borges (editors), *Stink Bugs:*

Biorational Control Based on Communication Processes. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton London New York, 2017; pp. 95-124..

Borges, M., Jepson, P.C., Howse, P.E. (1987). Long-range mate location and close-range courtship behaviour of the Green Stink Bug, *Nezara viridula* and its mediation by sex pheromones. *Entomologia experimentalis et applicata*. 44: 205-212.

Borges, M.; Colazza, S.; Ramirez-Lucas, P.; Chauhan, K.R.; Moraes, M.C.B.; Aldrich, J.R. (2003) Kairomonal effect of walking traces from *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae) on two strains of *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae). *Physiological Entomology*. v.28, n.4, p.349–355.

Bradbury JW, Vehrencamp SL (2011) *Principles of Animal Communication* 2nd Edition. Sinauer Associates Incorporated, Sunderland

Butenandt, V. A. (1959). Über den sexual-lockstoff des seidenspinners *Bombyx mori*. Reindarstellung und konstitution. *Z. Naturforschg*, b, 14, 283.

Butterworth, N. J., Drijfhout, F. P., Byrne, P. G., Keller, P. A., & Wallman, J. F. (2020). Major transitions in cuticular hydrocarbon expression coincide with sexual maturity in a blowfly (Diptera: Calliphoridae). *Journal of chemical ecology*, 46(7), 610-618.

Čokl, A.; Laumann, R.A.; Stritih, N. (2017). Substrate-borne vibratory communication In *Stink Bugs: Biorational Control Based on Communication Processes*; Čokl A. M. Borges Eds.; CRC Press Taylor&Francis Group, Boca Raton London New York,; pp. 125-164.

Čokl, A.; Virant-Doberlet, M.; McDowell, A. (1999). Vibrational directionality in the southern green stink bug, *Nezara viridula* (L.), is mediated by female song. *Anim. Behav.* 58, 1277-1283

Čokl, Andrej, Alenka Žunič-Kosi, and Raul Alberto Laumann. (2019). "Stink Bug Communication with Multimodal Signals Transmitted through Air and Substrate." *Emerging Science Journal* 3.6: 407-424.

Colazza, S., Aquila, G., De Pasquale, C. et al. (2007) The egg parasitoid *Trissolcus basalis* uses n-nonadecane, a cuticular hydrocarbon from its stink bug host *Nezara viridula*, to discriminate between female and male hosts. *Journal of Chemical Ecology*, 33, 1405–1420.

Colazza, S.; Lo Bue, M.; Lo Giudice, D.; Peri, E. (2009). The response of *Trissolcus basalis* to footprint contact kairomones from *Nezara viridula* females is mediated by leaf epicuticular waxes. *Naturwissenschaften*. v.96,

p.975–981, 2009. communication in *Nezara viridula*. *Central Eur J Biol* 9(2):200–211

da Silveira, S., Dias, A. M., Gomes-Lagoa, A. C., Blassioli-Moraes, M. C., Borges, M., Čokl, A., & Laumann, R. A. (2019). Specificity of male responses to female vibratory signals in two *Chinavia* species (Hemiptera: Pentatomidae) is based on signal structure and narrow temporal parameter. *Animal Behavior and Cognition*, 6(1), 1-12.

Elias, D. O., Maddison, W. P., Peckmezian, C., Girard, M. B., & Mason, A. C. (2012). Orchestrating the score: complex multimodal courtship in the *Habronattus coecatus* group of *Habronattus* jumping spiders (Araneae: Salticidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 105(3), 522-547.

Gomes Lagôa, A. C., Blassioli Moraes, M. C., Borges, M., & Laumann, R. A. (2020). Selective responses of *Trissolcus basalís* and *Telenomus podisi* to chemical footprints of preferred hosts. *Physiological Entomology*, 45(1), 60-71.

Grigolli, J. (2017) Pragas da soja e seu controle. *Tecnologia e Produção: Soja 2015/2016*.

Higham JP, Hebets EA (2013) An introduction to multimodal communication. *Behav Ecol Sociobiol* 67:1381–1388

Jackson, L.L. & Baker, G.L. (1970) Cuticular lipids of insects. *Lipids*, 5, 239 246.

Kavčič, A., Čokl, A., Laumann, R. A., Blassioli-Moraes, M. C., & Borges, M. (2013). Tremulatory and abdomen vibration signals enable communication through air in the stink bug *Euschistus heros*. *PLoS One*, 8(2), e56503.

Laumann, R.A., Aquino, M.F.S., Moraes, M.C.B. et al. (2009) Response of the egg parasitoids *Trissolcus basalís* and *Telenomus podisi* to compounds from defensive secretions of stink bugs. *Journal of Chemical Ecology*, 35, 8–19.

Laumann, R.A.; Maccagnan, D.H.B.; Čokl, A.; Blassioli-Moraes, M.C.; Borges, M. (2018). Substrate-borne vibrations disrupt the mating behaviors of the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*: implications for pest management. *J. Pest. Sci.*, 91, 995-1004.

Miklas, Iasnier (2003). Male Bugs Modulate Pheromone Emission in Response to Vibratory Signals from Conspecifics. *Journal of Chemical Ecology* volume 29, pages561–574.

- Miklas N., Čokl, A., Renou, M. & Virant-Doberlet, M. (2003b). Variability of vibratory signals and mate choice selectivity in the southern green stink bug. *Behavioural Process, Cambridge*. v. 61, n. 2, p. 131-142.
- Moraes, M. C. B. et al. (2009). Attraction of the stink bug egg parasitoid *Telenomus podisi* to defence signals from soybean activated by treatment with cis -jasmone. *Entomologia Experimentalis et Applicata, Dordrecht*, v. 131, n. 2, p. 178-188. MUMM, R
- Moraes, M. C., Borges, M., Pareja, M., Vieira, H. G., De Souza Sereno, F. T., & Laumann, R. A. (2008). Food and humidity affect sex pheromone ratios in the stink bug, *Euschistus heros*. *Physiological Entomology*, 33(1), 43-50.
- Panizzi, A. R., & Slansky Jr, F. (1985). Review of phytophagous pentatomids (Hemiptera: Pentatomidae) associated with soybean in the Americas. *Florida Entomologist*, 184-214.
- Partan SR, Marler P (2005) Issues in the classification of multisensory communication signals. *Am Nat* 166:231–245
- Theresa L.S., (1998). Roles of hidrocarbons in the recognition systems of insects- Theresa Singer
- Rybak, F., Sureau, G., & Aubin, T. (2002). Functional coupling of acoustic and chemical signals in the courtship behaviour of the male *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269(1492), 695-701.
- Silva, C. C. et al. (2006). Sensory response of the egg parasitoid *Telenomus podisi* to stimuli from the bug *Euschistus heros*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília*, v. 41, n. 7, p. 1093-1098, jul. 2006.
- Silva VP, Pereira MJB, Vivian LM, Moraes MCB, Laumann RA, Borges M (2014) Monitoramento do percevejo marrom *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) por feromônio sexual em lavoura de soja. *Pesqui Agropecu Bras* 49:844–852
- Silveira S (2015) Isolamento reprodutivo em duas espécies simpátricas de *Chinavia* (Orian) (Hemiptera: Pentatomidae): Importância da comunicação vibracional e composição química da cutícula. MSc Thesis, Universidade de Brasília, Brazil
- von Frisch, K. (1967). *The Dance Language and Orientation of Bees*, Harvard University Press, Cambridge, MA.4

- Wang, Z.; Tan, K. (2019). Honey Bee Alarm Pheromone Mediates Communication in Plant–Pollinator–Predator Interactions. *Insects*, 10, 366.
- Zgonik, V., & Čokl, A. (2014). The role of signals of different modalities in initiating vibratory communication in *Nezara viridula*. *Open Life Sciences*, 9(2), 200-211.
- Žunič A., Virant-Doberlet M., Čokl A., (2011). Species Recognition During Substrate-Borne Communication in *Nezara viridula* (L.) (Pentatomidae: Heteroptera) *Journal of Insect Behavior*, v. 24, p. 468-487.

CAPÍTULO IV

*INFLUÊNCIA DE FATORES ABIÓTICOS NA
COMUNICAÇÃO VIBRACIONAL DE PERCEVEJOS*

INTRODUÇÃO

A comunicação vibracional é considerada uma forma de intercâmbio de informação em que os indivíduos utilizam um canal de transmissão dos sinais privativo, é conhecido que na natureza a comunicação ocorre numa rede de interações que envolvem coespecíficos (emissores, receptores e competidores) e heteroespecíficos (que exploram os sinais vibratórios seja para parasitismo/predação ou para competição) (Virant-Doberlet et al., 2014). Assim a comunicação entre os indivíduos sofre interferências de fatores bióticos (descritos acima), e abordados nos capítulos 1 e 2 desta tese, e abióticos, constituídos principalmente por fenômenos ambientais como vento e chuva (Virant-Doberlet et al., 2014). Por serem organismos pecilotérmicos os insetos são fortemente afetados pelas condições ambientais. Fenômenos climáticos como vento e precipitações exercem uma forte pressão evolutiva nos insetos e conduziram a um grande número de adaptações fisiológicas, comportamentais e ecológicas (Speight, et al., 2008). O tamanho reduzido da maioria das espécies torna os insetos especialmente susceptíveis à dinâmica de processos ambientais como fluxos de ar e água ou impacto da chuva ou neve (Speight, et al., 2008). Estes elementos podem impactar processos fisiológicos e o comportamento dos insetos com consequências sobre a adaptação dos indivíduos (Kight e Swaddle, 2011)

Existem muitas evidências que diversos fatores climáticos interferem em diversos comportamentos dos insetos como no comportamento de forrageamento e oviposição (Fink e Wolfgang, 1995, Kobori e Amano, 2003, Chambó et al., 2018) e no comportamento sexual (Pellegrino et al., 2013, Austin et al., 2014).

No caso específico da comunicação vibracional dos insetos, o vento é considerado o principal ruído abiótico (Barth, 1988; Cocroft e Rodríguez, 2005; Tishechkin, 2007, McNett et al., 2010). O principal efeito do vento estaria

relacionado com a sua intensidade (Cocroft e Rodríguez, 2005, Tishechkin, 2007). O efeito do vento se produz, principalmente, porque o movimento das massas de ar impacta os substratos onde os insetos se encontram, por exemplo caules, galhos e folhas das plantas. Embora intensidades de vento baixas a moderadas geram vibrações de baixa frequência (< 20 Hz) que não impactariam na comunicação dos insetos, intensidade maiores poder gerar vibrações de frequências entre 100 a 200 Hz (Casas et al., 1998). Essas frequências estão na faixa dos sinais de muitos grupos de insetos, entre eles os percevejos da família Pentatomidae, que emitem sinais variando entre 50 e 200 Hz, com frequências dominantes próximas a 100 Hz (Čokl e Virant-Doberlet, 2003). Entretanto, o impacto do vento no comportamento dos insetos poderia ser mais uma consequência da movimentação violenta das plantas, originada pela alta intensidade do vento, mais do que um efeito de interferência das vibrações.

Existem poucas evidências experimentais que demonstrem que o vento pode interferir na comunicação dos insetos pela ação direta das vibrações que origina nas plantas. Este efeito foi claramente observado em cigarrinhas da espécie *Enchenopa binotata* (Say, 1824) (Hemiptera: Membracidae). Em experimentos de *playback* onde se reproduziram ruídos originados pelo vento nas plantas hospedeiras, os machos desta espécie somente emitiram sinais vibratórios nos intervalos onde o ruído estava ausente. Adicionalmente, experimentos de campo mostraram que, nesta espécie, existe uma maior atividade de comunicação vibracional no começo da manhã, quando a intensidade do vento é menor (McNett et al., 2010).

As vibrações causadas pelas gotas de chuva impactando nas plantas geram vibrações característica com uma fase inicial de curta duração, com vibrações de amplitude irregular e maior frequência, e uma segunda fase com vibrações de menor frequência e com variações de amplitude regulares que decaem exponencialmente até o nível do ruído (Casas et al., 1888). Estas vibrações podem influenciar tanto o comportamento de forrageio quanto a comunicação sonora de animais. Por exemplo, os insetos parasitoides reduzem o comportamento de forrageio quando chove (Casas, 1989). Embora essa redução não foi ligada diretamente às vibrações originadas pela chuva nas plantas.

Por outra parte, estudos em Lepidoptera sugerem que as lagartas ao menos reconhecem vibrações produzidas por vento e chuva. Lagartas de *Semiothisa aemulataria* (Walker, 1861) (Geometridae) diferenciam as vibrações causadas por gotas de água das produzidas por predadores quando se locomovem nas plantas (Castellanos e Barbosa, 2006), de forma similar lagartas de *Drepana arcuata* (Walker, 1855) (Drepanidae) discriminam ruídos produzidos por vento ou chuva de estímulos vibracionais produzidos por coespecíficos ou pelo predador *Podisus maculiventris* (Say, 1832) (Heteroptera: Pentatomidae) (Guedes et al., 2012).

Como, em geral, as evidências reportadas até o momento sugerem que os ruídos abióticos têm um efeito disruptivo na comunicação dos insetos existe um potencial de utilizar estes conhecimentos para o manejo integrado de pragas.

O objetivo deste capítulo foi avaliar a influência de vibrações originadas por fatores abióticos (vibrações originadas por vento ou chuva) na comunicação vibracional de percevejos e o potencial de interferência ou inibição na comunicação vibracional e comportamento reprodutivo dos percevejos fitófagos das vibrações originadas por fatores abióticos;

Foram avaliadas as seguintes hipóteses:

- 1- Os ruídos ambientais de chuva e vento interferem na comunicação vibracional do percevejo marrom.
- 2- A interferência na comunicação vibracional produzida pelo ruído ambiental de vento e chuva resulta em redução do comportamento de acasalamento e cópula do percevejo marrom

MATERIAL E MÉTODOS

Procedimentos gerais

Para avaliar as hipóteses propostas foram realizados experimentos de reprodução de programas de estimulação previamente gerados. Estes sinais foram reproduzidos em plantas de feijão onde foram colocados casais (uma fêmea e um macho) do percevejo marrom *E. heros*. Durante os experimentos o comportamento dos insetos e os sinais vibratórios emitidos foram registrados para posterior avaliação dos efeitos dos ruídos ambientais avaliados na comunicação vibracional e comportamento reprodutivo dos insetos.

Programas de estimulação

Vento

Os ruídos produzidos pelo vento foram simulados em um túnel de vento. Este aparelho consiste em uma câmara de vidro, de 1,5 x 0,5 x 0,5 m vasada nas duas extremidades (Figura 4.1). Em uma das extremidades encontra-se o plenum, uma estrutura feita com “honey-comb”, para manter um fluxo unidirecional e laminar do ar que entra no sistema até a outra extremidade, que possui uma grade de alumínio fechando o túnel. Um ventilador industrial com motor 3 Hp é responsável por gerar a corrente de ar que circula no túnel de vento, esse ar é regulado por um inversor de frequência (inverter CFW 08, Weg) que varia a velocidade da corrente de ar entre 0,2 m/s e 1,32 m/s. No interior do túnel foram introduzidas plantas de feijão, no estágio V3, a 1,2 m de distância da entrada do ar, e as vibrações geradas por uma corrente de ar, simulando vento de intensidade média (1,32 m/s) foram registradas com vibrômetro laser, seguindo os procedimentos descritos em PEG.

As vibrações foram registradas de forma contínua por um período de 20 min utilizando 5 plantas diferentes, uma a cada 20 min. Os arquivos gerados foram armazenados para posterior utilização nos experimentos.

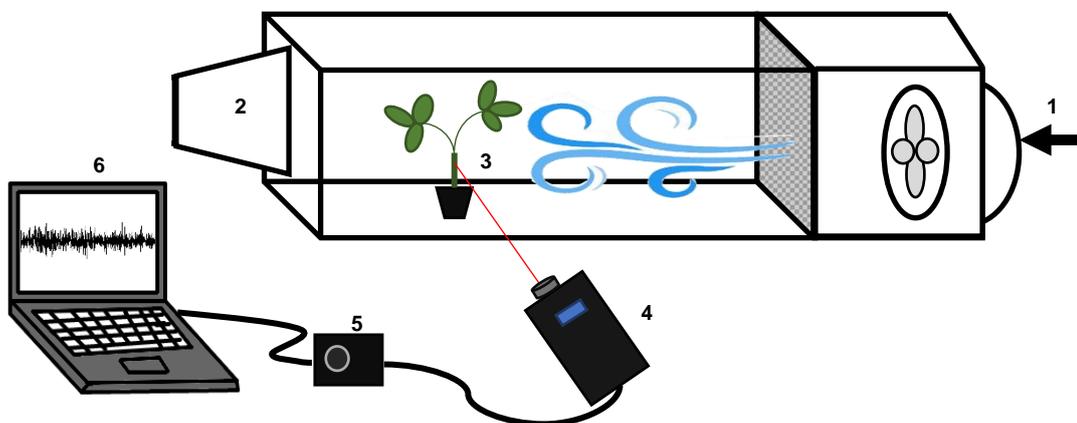


Figura 4.1. Desenho esquemático mostrando a configuração estabelecida para registro de vibrações originadas pelo vento em plantas ou para os bioensaios onde os insetos foram expostos diretamente às correntes de ar. 1) Entrada do ar, 2) Saída de ar, 3) Plantas de feijão, 4) Vibrômetro laser, registro dos sinais vibratórios, 5) Placa para digitalizar os sinais, 6) Notebook para armazenamento dos dados.

Chuva

Os programas de estimulação com ruído de chuva foram criados simulando o impacto das gotas sobre as folhas de uma planta de feijão em estágio V3. Para isto foi utilizado um equipo para infusão por gravidade, com um tubo flexível transparente de 50cm conectado a uma câmara para visualização de gotejamento e posteriormente a uma pinça rolete, para o controle do fluxo. A fonte de água foi uma garrafa plástica de 500ml à qual foi adaptado o dispositivo de gotejamento. Todo o dispositivo foi disposto de forma que a extremidade da mangueira do gotejador ficou a uma distância de 30 cm da folha da planta e de forma que as gotas impactem no terço apical das folhas. O equipamento dispensou as gotas (60 gotas = 1 ml) a um ritmo de 38 por segundo.

Uma vez estabelecido o fluxo das gotas de água as vibrações geradas na planta foram registradas com um vibrômetro laser seguindo os procedimentos

descritos em PEG. Para isto o laser foi apontado e focado no caule principal da planta de feijão, assim descartando o excesso de ruído provocado pelo movimento das folhas ao cair das gotas.

As vibrações foram registradas de forma contínua por um período de 5 m utilizando 5 plantas diferentes uma a cada 5 minutos. Os arquivos gerados foram armazenados para posterior utilização nos experimentos (Figura 4.2).

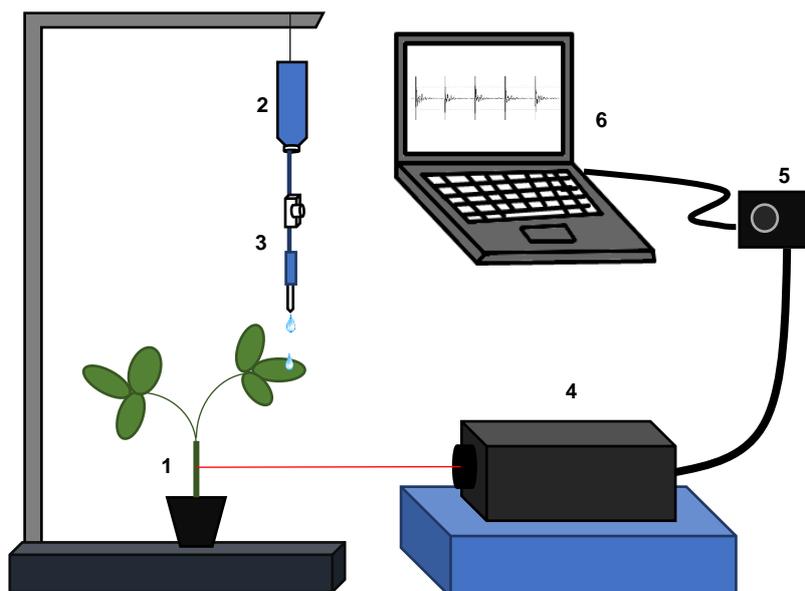


Figura 4.2. Desenho esquemático mostrando a configuração estabelecida para registro de vibrações originadas por gotas de água impactando em folhas de plantas de feijão. 1) Planta de feijão, 2) Garrafa de plástico 500ml, 3) Equipo para infusão por gravidade para gerar as gotas de água, 4) Vibrômetro laser, captação dos sinais vibratórios, 5) Placa para digitalizar os sinais, 6) Notebook para armazenamento dos dados.

Experimentos

Os bioensaios foram realizados reproduzindo os programas de estimulação (vento e chuva) em plantas de feijão seguindo os procedimentos descritos em PEG para bioensaios de reprodução de sinais. A descrição dos programas de estimulação utilizados está no Apêndice IV. Adicionalmente, no caso do vento, para avaliar o efeito da exposição direta dos insetos à corrente de ar foram realizados bioensaios com as plantas colocadas no túnel de vento e expostas a uma corrente de ar com igual intensidade à utilizada para criar os

programas de estimulação (1,32 m/s) (túnel de vento). Como controle foram utilizadas plantas sem vibrações.

Um macho e uma fêmea do percevejo marrom foram colocados simultaneamente em folhas opostas da planta de feijão, e um dos programas de estimulação foi reproduzido durante 20 minutos. O comportamento foi monitorado por observação direta e registrado em ata, os sinais vibratórios emitidos pelos insetos foram registrados e analisados seguindo os procedimentos gerais descritos em PEG.

Os programas de estimulação foram reproduzidos num desenho experimental completamente aleatorizado. O número de repetições para cada tratamento (vento, chuva e túnel de vento) e controle foi igual a 30 e a cada 5 bioensaios as plantas foram trocadas por novas. Os comportamentos registrados foram: Proporção de resposta (proporção de casais em que ao menos um inseto emitiu um sinal vibratório ou mais em relação ao total de casais avaliados) latência (s), (tempo desde o início do bioensaio até que o inseto emite o primeiro sinal vibratório) tempo de resposta (s), (tempo em que o inseto permanece emitindo sinais vibratórios), número de pulsos emitidos por cada inseto durante o bioensaio, e proporção de casais que finalizaram o bioensaio com a cópula. Os parâmetros dos sinais vibratórios registrados e analisados foram frequência dominante (Hz), duração dos pulsos e intervalo entre pulsos (ambos em ms).

Esses dados foram todos passados para planilhas e depois processados para as análises estatísticas e representação gráfica dos resultados.

Análises estatísticas

A Proporção de respostas, proporção de emissão de sinais por fêmeas e machos e proporção de cópula foram comparadas entre pares de cada espécie em tratamento e controle por regressão logística considerando respostas binárias (sim - 1 ou não - 0) como variável de resposta, e controle ou tratamento como fator explicativo. Coeficientes e erro padrão das regressões logísticas foram usados para calcular os oddsratios (OR) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%). As probabilidades foram consideradas significativas

se seu IC não incluiu o valor 1. A porcentagem de redução da resposta quando os insetos foram colocados em plantas vibradas foi calculada como: $1 - OR * 100$, e o aumento da resposta em plantas não vibradas (controle) como: $1 / OR$.

A latência, o tempo de resposta e parâmetros temporais do sinal vibratório dos insetos (duração do pulso e intervalo entre pulsos), número de pulsos e frequência dominante foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Quando os dados apresentavam distribuição normal, foram submetidos a análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, para analisar as diferenças entre os tratamentos e controle. O modelo considerou as variáveis medidas em cada indivíduo como medidas repetidas. Quando os dados não apresentaram normalidade, foram analisados com modelos lineares generalizados mistos (GLMM) e análise de deviança (ANODEV) com distribuição de Poisson, considerando os parâmetros como variável resposta, a condição em que os insetos foram expostos (tratamentos) como fator explicativo e os indivíduos como efeitos aleatórios. Para a análise dos parâmetros temporais e espectrais dos sinais vibratórios o modelo comparou o efeito dos tratamentos em relação ao controle somente. Quando o resultado da ANODEV apresentou diferença estatística significativa foi realizado um teste de contraste entre os tratamentos. Todos os testes estatísticos foram desenvolvidos na plataforma R versão 4.0.0 (R Development Core Team, 2020) utilizando o pacote lme4 para GLMM.

RESULTADOS

Os resultados de todas as análises estatísticas se apresentam no Apêndice IV.

A proporção de insetos (fêmeas e machos) que emitiram sinais vibratórios durante a execução dos bioensaios não foi significativamente afetada pelas vibrações de ruído de vento (V). Quando os insetos estiveram sobre plantas vibradas com ruído de chuva (Ch) ou expostos diretamente à corrente de ar no túnel de vento (Tv) a proporção de indivíduos que emitiram sinais vibratórios foi menor da observada nas plantas controle (bioensaio sem transmissão de sinais) (Fêmea: Chuva: $z = -4,19$, $gl = 63$, $P < 0,001$; Túnel de vento: $z = -3,73$, $gl = 58$, $P < 0,001$) (Macho: Chuva: $z = -3,72$, $gl = 63$, $P < 0,001$; Túnel de vento: $z = -3,6$, $gl = 63$, $P < 0,001$) (Tabela 4.3 A).

As fêmeas não foram afetadas pelas vibrações das plantas reproduzindo ruídos de vento ou chuva ou quando ficaram expostas diretamente a uma corrente de ar e iniciaram a emissão de sinais vibratórios com a mesma latência das fêmeas presentes nas plantas controle (Figura 4.3 A). Em contraste os machos foram afetados mostrando latências maiores em todos os tratamentos em relação ao controle ($F = 88,17$, $gl = 74$, $P < 0,001$) (Figura 4.3 A). O maior atraso para iniciar a emissão de sinais vibratórios foi observado quando os insetos estiveram em plantas que receberam um fluxo direto de ar (Tv), neste caso a latência não diferiu da dos machos em plantas vibradas com ruído de chuva (teste de contrastes $P < 0,05$) (Figura 4.3 A).

O tempo em que as fêmeas e os machos emitiram sinais foi significativamente afetado pelos tratamentos (Fêmea: $F = 108,9$, $gl = 71$, $P = 0,003$; Macho: $F = 68,74$, $gl = 74$, $P < 0,001$) (Figura 4.3 B). Não caso das fêmeas o tempo de resposta foi menor quando as plantas foram vibradas com ruídos de vento ou chuva (Figura 4.3 B) e no caso dos machos todos os tratamentos reduziram significativamente a emissão de sinais vibratórios em relação ao controle (Figura 4.3 B).

Embora com redução dos tempos de resposta a sinalização dos insetos não mostrou um efeito determinante dos ruídos abióticos. O número de pulsos emitidos pelos insetos somente foi reduzido quando os machos estiveram em plantas vibradas com ruído de chuva em relação ao controle ($F = 1001,5$, $gl = 74$, $P = 0,043$). (Figura 4.3 C).

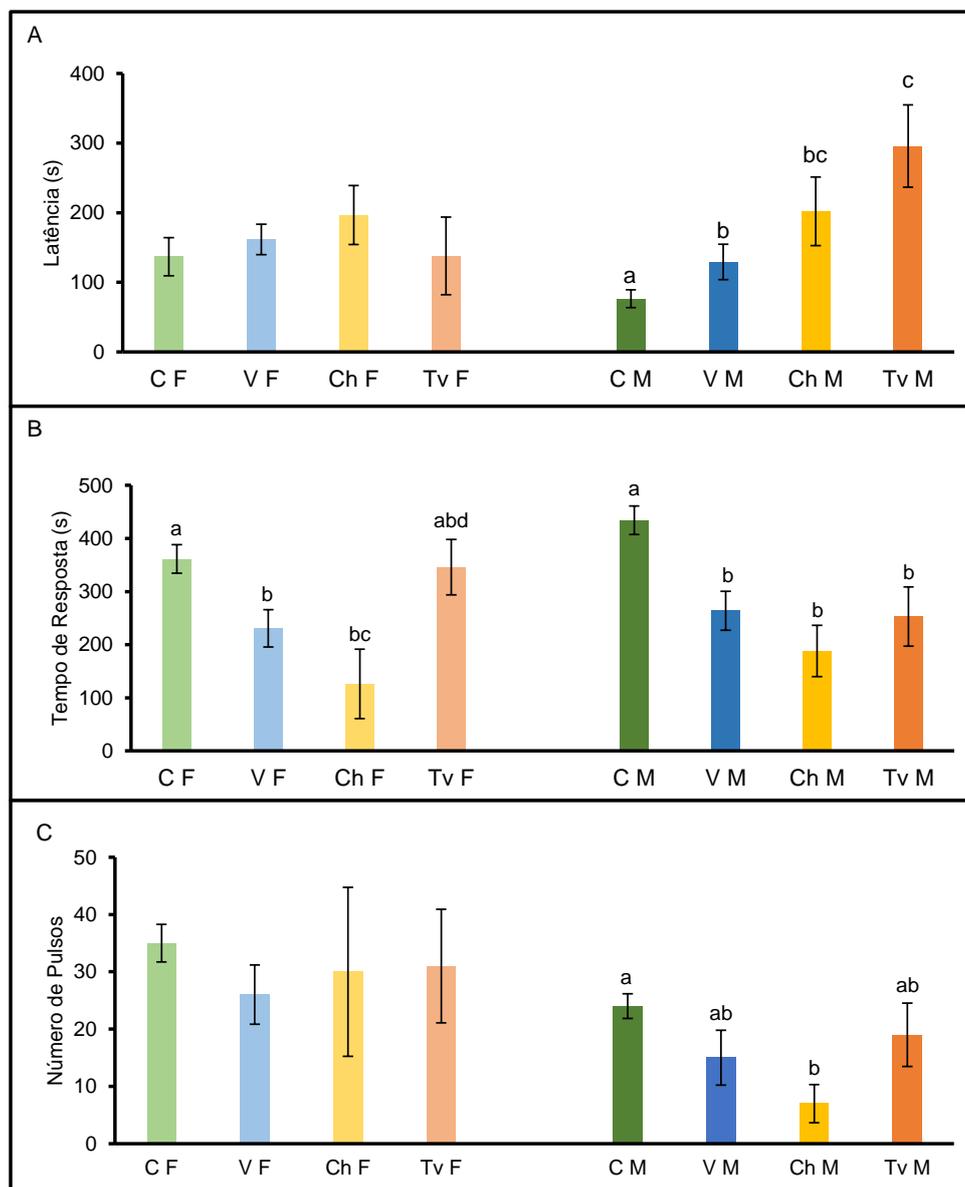


Figura 4.3. Efeito de ruído produzido por fatores abióticos na dinâmica de emissão de sinais vibratórios emitidos por fêmeas e machos de *E. heros*. A) Latência (média do tempo em segundos no qual o inseto emite primeiro canto); B) Tempo de resposta (média do tempo em segundos no qual o inseto permaneceu cantando); C) Número de pulsos emitidos. V: ruído de vento, Ch = ruído de chuva, Tv: plantas dentro do túnel de vento ligado. F=fêmeas e M=macho. As barras representam os valores médios de cada parâmetro e as linhas representam o erro padrão. As letras acima das linhas das barras representam diferença estatística entre os tratamentos (ANODEV e teste de contrastes $P < 0,05$).

Ao considerar os parâmetros dos sinais emitidos em plantas com ruídos abióticos e compará-los com os emitidos pelos insetos nas plantas controle não foram observadas mudanças decisivas nos parâmetros temporais dos sinais (Figura 4.4). Os sinais emitidos pelas fêmeas de *E. heros* não foram afetados pelo ruído de chuva, em presença de ruído de vento (V) os intervalos entre pulsos foram maiores ($z = 1,9$, $gl = 1306$, $P = 0,05$), e na exposição direta à corrente de ar no túnel de vento (Tv) os intervalos entre pulsos foram menores ($z = 1,9$, $gl = 1306$, $P = 0,05$) em relação ao controle (Figura 4.4 B). No caso dos machos os efeitos significativos observados foram na emissão de pulsos de menores duração quando em presença de vibrações de Vento (V) ($z = -1,95$, $gl = 962$, $P = 0,05$) e chuva (Ch) ($z = -2,67$, $gl = 962$, $P = 0,007$), e redução do intervalo entre pulsos em plantas Tv ($z = -2,17$, $gl = 962$, $P = 0,02$) (Figura 4.4 A). Tanto machos quanto fêmeas não modificaram a frequência dominante dos sinais emitidos em plantas tratamento e controle (Figura 4.4 C).

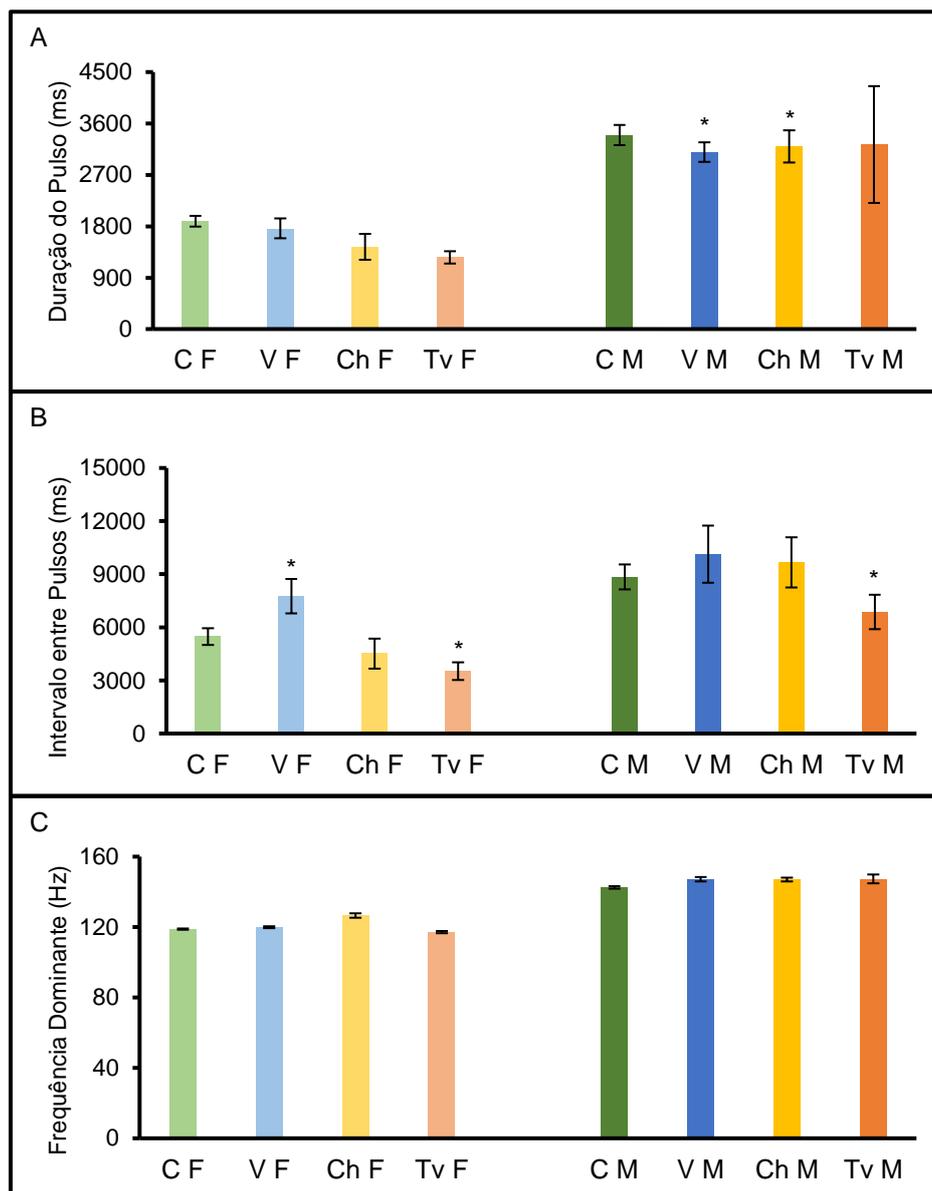


Figura 4.4. Efeito de ruído produzido por fatores abióticos nos parâmetros dos sinais vibratórios emitidos por fêmeas e machos de *E. heros*. A) Duração do pulso (média do tempo em milissegundos); B) Intervalo entre os pulsos (média do tempo em milissegundos, do final de um pulso ao início do próximo); C) Frequência dominante (média da frequência dominante em um pulso, em Hz); V: ruído de vento, Ch = ruído de chuva, Tv: plantas dentro do túnel de vento ligado. F=fêmeas e M=macho. As barras representam os valores médios de cada parâmetro e as linhas representam o erro padrão. * indica diferenças significativas nos valores médios do tratamento em relação ao controle (Análise GLMM $P < 0,05$).

A proporção de cópula dos casais nas plantas tratadas com ruído de chuva e dentro do túnel de vento foi menor em relação à proporção de cópula em plantas controle (Ruído de Chuva: $z = 0,6$, $gl = 48$, $P < 0,001$, Túnel de vento:

$z = 3,09$, $gl = 44$, $P = 0,001$). Não foi observado efeitos significativos do ruído de vento na proporção de casais que copularam (Tabela 4.1; Figura 4.5).

Tabela 4.1. Resultados da análise de regressão logística e cálculo de razão de chance (IC 95%) para avaliação do efeito da reprodução de ruídos de vento (V), chuva (Ch) e expostos a um túnel de vento ligado a 3,2 m/s (Tv) (Tratamento) para fêmeas e machos de *Euschistus heros*. As variáveis foram computadas em forma binária (presença ausência do comportamento) e comparadas em relação ao observado nos casais colocados em plantas sem vibrações (Controle). Valores de razão de chance em negrito indicam efeito significativo do tratamento em relação ao controle.

| Tratamento | Variável | Estatística | Razão de chance (IC 95%) |
|------------|-------------------|----------------------------|---------------------------|
| V | Resposta Fêmeas C | $z=-0,98$ $P=0,32$ $Gl=58$ | 0,31 (0,03 - 3,16) |
| | Resposta Machos C | $z=-1,55$ $P=0,11$ $Gl=58$ | 0,17 (0,01 - 1,57) |
| | Cópula | $z=-0,89$ $P=0,37$ $Gl=58$ | 0,58 (0,17 - 1,91) |
| Ch | Resposta Fêmeas C | $z=-4,19$ $P=2,78$ $Gl=63$ | 0,01 (0,00 - 0,08) |
| | Resposta Machos C | $z=-3,72$ $P<0,05$ $Gl=63$ | 0,01 (0,00 - 0,14) |
| | Cópula | $z=-3,60$ $P<0,05$ $Gl=48$ | 0,07 (0,01 - 0,31) |
| Tv | Resposta Fêmeas C | $z=-3,73$ $P<0,05$ $Gl=58$ | 0,01 (0,00 - 0,14) |
| | Resposta Machos C | $z=-3,60$ $P<0,05$ $Gl=58$ | 0,01 (0,00 - 0,16) |
| | Cópula | $z=-3,09$ $P<0,05$ $Gl=44$ | 0,10 (0,02 - 0,43) |

Referências: Resposta fêmeas= fêmeas que emitiram pelo menos um pulso de sinal vibratório durante o experimento. Resposta machos = machos que emitiram pelo menos um pulso de sinal vibratório durante o experimento. Cópula= casais que copularam durante a execução do experimento. NA= não avaliado, neste tratamento todos os machos emitiram sinais vibratórios tanto no controle quanto no tratamento.

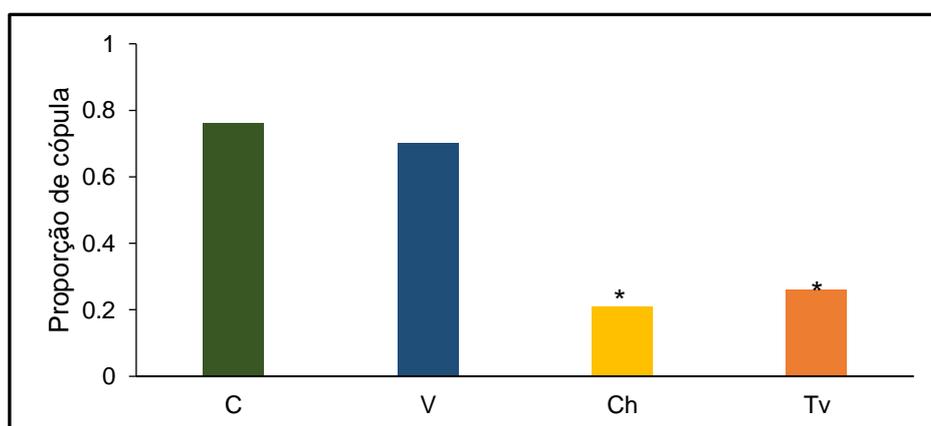


Figura 4.5. Proporção de bioensaios que terminaram com a cópula dos casais de *E. heros* em plantas de feijão de feijão tratadas com ruído de vento (V), ruído de chuva (Ch), plantas dentro de um túnel de vento ligado (Tv) e plantas sem vibrações, controle (C). F=fêmeas e M=macho. * acima das barras representam diferença estatística entre os tratamentos e o controle.

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados indicam uma influência diferenciada das vibrações causadas por ruídos abióticos avaliadas em teses de reprodução de estímulos previamente gravados. As plantas vibradas com registros de plantas expostas a correntes de ar (vento) não influenciaram significativamente a comunicação vibracional das fêmeas e machos de *E. heros* e conseqüentemente não mostraram um efeito inibitório da cópula. Por sua vez, as plantas onde os insetos estiveram expostos a vibrações simulando chuva ou que estiveram diretamente expostas a correntes de ar afetaram a comunicação vibracional reduzindo a proporção de indivíduos que emitem sinais vibratórios, aumentando a latência das respostas e reduzindo o tempo no qual os insetos permanecem emitindo sinais. Estes dois últimos efeitos foram observados principalmente nos machos de *E. heros*. Como conseqüência esses ruídos ambientais tiveram um claro efeito inibidor da cópula.

A diferença observada entre as respostas a plantas vibradas com ruído de vento e a exposição direta ao mesmo pode indicar que as vibrações originadas pelo vento de intensidade moderadas, com frequência de 51 Hz e uma intensidade de -64 dB, não são as responsáveis pelos efeitos observados na comunicação vibracional e comportamento reprodutivo de *E. heros*. O vento ao balançar as folhas e o caule das plantas, pode atuar como um amplificador da vibração, efeito que não está presente quando se reproduz a vibração somente. Este resultado confirma observações prévias que indicam que as vibrações causadas pelo vento nas plantas, pelas suas características de frequência, não são as responsáveis pela interferência na comunicação vibracional. Observações de campo também indicam que os insetos evitam se comunicar nos períodos que as correntes de ar são mais fortes (Cocroft e Rodriguez, 2005, Virant-Doberlet et al. 2014, Čokl et al., 2019).

O efeito observado do ruído de chuva pode estar relacionado com as características ecológicas dos percevejos. Em geral se considera que o impacto da chuva na comunicação dos insetos depende da sua adaptação prévia à mesma. Insetos de florestas tropicais, onde as chuvas são constantes, estão submetidos a uma pressão seletiva que modifica seus sinais de forma que contrastem com o ruído ambiental originado pelas gotas de chuva (Cocroft e Rodriguez, 2005). Os percevejos *E. heros* é uma espécie adaptada a regiões do Cerrado, em que o clima é mais seco e quente, e as chuvas ocorrem em épocas específicas do ano, por isso, podem ter desenvolvido os sinais vibratórios sem a presença de chuvas constantes, essa hipótese pode explicar o efeito inibidor observado pelos ruídos de chuva nesta espécie. Contudo experimentos em campo, com gravação de sinais em épocas chuvosas e secas precisam ser desenvolvidos para confirmar essa hipótese.

Adultos de *E. heros* apresentam uma movimentação vertical nas plantas hospedeiras. Encontrando-se no dossel superior nas horas iniciais do dia e ao crepúsculo quando a movimentação das massas de ar é menos intensa e as chuvas menos frequentes (Panizzi, 1991). Os efeitos observados neste trabalho em relação à interferência na comunicação vibracional podem ajudar a explicar esta dinâmica de movimentação ao longo do dia

Os insetos expostos a ruídos ambientais (vento, chuva e túnel de vento), mostraram adaptações dos sinais vibratórios emitidos que incluem modificação de parâmetros temporais (duração do pulso e intervalo entre pulsos). Estas mudanças nos sinais emitidos fazem parte dos mecanismos utilizados para diferenciar os sinais emitidos pelos insetos num ambiente com interferência de sinais sejam estes artificiais (Polajnar et al., 2008, Laumann et al., 2018) ou naturais (Čokl et al., 2015)

A interferência de vibrações reproduzidas como ruídos ambientais no comportamento de insetos também foi avaliada em insetos que vivem agregados, como no pulgão *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Hemiptera-Aphididae). Neste caso a exposição dos insetos a sons de alta intensidade e frequência (100 - 10000 Hz) inibiram a alimentação (Lee et al., 2012). Avosanii e colaboradores (2020) também observaram em *Bactericera cockerelli* (Šulc,

1909) (Hemiptera: Triozidae) redução na emissão de sinais de chamamento pelos machos quando expostos a tipos de ruídos ambientais de 0 a 22000 Hz. Este comportamento confere com o observado em *E. heros* quando expostos a ruídos de fatores abióticos, onde tanto a proporção de machos quanto a de fêmeas que emitiram sinais vibratórios foi reduzida em relação aos insetos não expostos e ainda os machos levaram mais tempo para começar a emitir sinais vibratórios.

As hipóteses testadas neste capítulo foram confirmadas, pois o ruído de vento e chuva modificaram o padrão de resposta dos casais de *E. heros*. Também foi comprovado um efeito de inibição da cópula para os casais expostos a vibrações que simulam chuva ou nos casais expostos diretamente a uma corrente de ar. Os resultados apresentados aqui são a primeira contribuição ao efeito que fatores ambientais podem ter na comunicação vibracional de percevejos e desta forma podem contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos de comunicação, comportamento reprodutivo e ecologia destes insetos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Austin, C.J., Guglielmo, C.G. & Moehring, A.J. (2014). A direct test of the effects of changing atmospheric pressure on the mating behavior of *Drosophila melanogaster*. *Evol Ecol* 28, 535–544.
- Barth FG (1988) Spiders of the genus *Cupiennius Simon* 1891 (Araneae, Ctenidae) II. On the vibratory environment of a wandering spider. *Oecologia* 77:194–201
- Casas, J. (1989). Foraging behaviour of a leafminer parasitoid in the field. *Ecol. Entom.* 14, 257–26
- Castellanos I, Barbosa P (2006) Evaluation of predation risk by acaterpillar using substrate-borne vibrations. *Anim Behav* 72:461–469

- Chambó, E.D., de Oliveira, N.T.E., Garcia, R.C. et al. (2017). Statistical modeling of insect behavioral response to changes in weather conditions in *Brassica napus* L.. *Arthropod-Plant Interactions* 11, 613–621.
- Cocroft RB, Rodríguez RL (2005) The behavioral ecology of insect vibrational communication. *Bioscience* 55:323–334. Capítulo do livro Virant-Doberlet, M, Mazzoni, V., de Groot, M., Polajnar, J., Lucchi, A., Symondson, W.O.C., Čokl, A. *Vibrational Communicatin Networks: Eavesdropping and Biotic Noise*. In Cocroft, r.B., gogala, M., Hill, P.S.M., Wessel, A. *Studing vibrational communication*. Springer Heidelberg New York Dordrecht London. Chapter 7. 93-123
- Čokl, A. , Zorović, M., Žunič, A.K., Stritih, N., Virant-Doberlet, M. (2014). Communication through plants in a narrow frequency window. In *Studyin vibratonal communication, Animal Signals and Communication* 3, (Eds. Crocoft, R., Gogala, M., Hill, P.S.M. and Wessel, A.). Springer-Verlag, Belring Heidelberg. Chapter 10, pp 171-195.
- Čokl, A., Laumann, R.A., Žunič Kosi, A., Blassioli-Moraes, M.C., Virant-Doberlet, M., & Borges, M. (2015). Interference of Overlapping Insect Vibratory Communication Signals: An *Eushistus heros* model. *PLoS ONE*, 10(6), 1-16.
- Čokl, A., Virant-Doberlet, M. (2003). Communication with substrate-Borne Signals in Small Plant-Dwelling insects. *Annual Review of Entomology*. Palo Alto. v. 48, p.29-50.
- Čokl, A.; Blassioli-Moraes, M.C.; Laumann, R.A.; Žunič, A.; Borges, M. (2019). Stinkbugs – multisensory communication with chemical and vibratory signals transmitted through different media. In *Biotremology – Studying Vibrational Behavio*; Springer; Hill, P.S.M. Lakes-Harlan, R., Mazzoni, V., Narins, P.M., Virant-Doberlet M., Wessel A., EDs.; Springer Nature Switzerland AG 2019; pp. 91-122.
- Corrêa-Ferreira, B. S. (2005). Suscetibilidade da soja a percevejos na fase anterior ao desenvolvimento das vagens. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 40(11), 1067-1072.
- Fink, U., Völkl, W. (1995). The effect of abiotic factors on foraging and oviposition success of the aphid parasitoid, *Aphidius rosae* . *Oecologia* 103, 371–378.
- Guedes, R. N. C.; Matheson, S. M. ; Frei, B. ; Smith, M. L. ; Yack, J. E. (2012). Vibration detection and discrimination in the masked birch caterpillar (*Drepana arcuata*). *Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, v. 198, p. 325-335.

- Kight, C. R., & Swaddle, J. P. (2011). How and why environmental noise impacts animals: an integrative, mechanistic review. *Ecology letters*, 14(10), 1052-1061.
- Kobori, Y., & Amano, H. (2003). Effect of rainfall on a population of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Applied Entomology and Zoology*, 38(2), 249-253.
- Laumann, R.A., Maccagnan, D.H.B., Čokl, A., Blassioli-Moraes, M.C. Borges, M., (2018). Substrate-borne vibrations disrupt the mating behaviors of the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*: implications for pest management. *Journal of Pest Science*, 91(3), p. 995-1004. <http://sci-hub.tw/10.1007/s10340-018-0961-5>
- Lee, Y.; Kim, H.; Kang, T.J.; Jang, Y. (2012). Stress Response to Acoustic Stimuli in an Aphid: A Behavioral Bioassay Model. *Entomol. Res.* 42, 320–329.
- M.R. Speight, M.D. Hunter, A.D. (2008) *Watt Ecology of Insects: Concepts and Applications 2*. Chapter 32 *Insecta and Climate*. Wiley-Blackwell Hoboken, NJ
- McNett, G.D., Luan, L.H. & Coccoft, R.B. (2010). Wind-induced noise alters signaler and receiver behavior in vibrational communication. *Behav Ecol Sociobiol* 64, 2043–2051.
- Panizzi, A.R. (1991). Ecologia nutricional de insetos sugadores de sementes. p. 253-287. In: Panizzi, A.R & Parra, J.R.P. *Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de praga*. São Paulo, Manole. 360 p.
- Pellegrino AC, Peñaflor MFGV, Nardi C, Bezner-Kerr W, Guglielmo CG, et al. (2013) Weather Forecasting by Insects: Modified Sexual Behaviour in Response to Atmospheric Pressure Changes. *PLOS ONE* 8(10): e75004.
- Polajnar, J.; Čokl, A. (2008). The effect of vibratory disturbance on sexual behaviour of the southern green stink bug *Nezara viridula* (Heteroptera, Pentatomidae). *Cent. Eur. J. Biol.* 3 189-197.
- Tishechkin DY (2007) Background noises in vibratory communication channels of Homoptera (Cicadinea and Psyllinea). *Russ Entomol J* 16:39–46
- Virant-Doberlet, M.; Mazzoni, V.; de Groot, M.; Polajnar, J.; Lucchi, A.; Symondson W.O.C.; Čokl, A. (2014). Vibrational communication in networks: eavesdropping and biotic noise. In *Studying vibrational communication, Animal Signals and Communication*. Coccoft, R.B., Gogala, M., Hill P.S.M., Wessel, A.; Eeds.; Springer, Berlin, 2014; pp. 93-123.

CAPÍTULO V

*POTENCIAL DE SINAIS DE CHAMAMENTO DE
E. heros PARA ATRAÇÃO DE COESPECÍFICOS
PARA APLICAÇÃO NO MONITORAMENTO DE
POPULAÇÕES*

INTRODUÇÃO

No Brasil, extensas áreas do território são ocupadas com culturas, predominando as monoculturas, como é o caso da soja. Com uma área cultivada de 38 milhões de ha e uma produção estimada para a safra da campanha 2020/2021 de 133 milhões de toneladas, o Brasil é o maior produtor de soja do mundo (CONAB, 2021). Esses sistemas de produção possuem grandes desvantagens ecológicas, uma vez que reduzem a biodiversidade do local e promovem o surgimento de pragas relacionadas à cultura.

Os percevejos (Hemiptera: Pentatomidae) são pragas primárias das principais culturas de grãos no Brasil (soja, feijão, milho) (Panizzi, 1997; Panizzi, 2013) e nos últimos anos sua incidência tem se estendido a outras culturas tendo relatos de ataques severos em algodão, hortaliças, mamona, entre outros (Panizzi, 2013). No caso da cultura da soja e outros grãos os percevejos sugam principalmente as sementes causando assim um dano direto à produção (Corrêa-Ferreira e Moscardi, 1995, Panizzi, 1997). Estes insetos também podem se alimentar de outras partes da planta, quando as mesmas estão em estágios vegetativo causando distúrbios fisiológicos que originam reduções significativas no rendimento da soja (Corrêa-Ferreira, 2005).

O percevejo marrom, *Euschistus heros* (Fabricius, 1749) (Hemiptera: Pentatomidae), é considerado a praga de maior destaque na soja no Brasil (Panizzi, 2013). Esta espécie domina a guilda de percevejos em toda a área de produção de soja do Brasil que abarca desde o extremo sul até o norte do país (Aquino et al. 2019). Os métodos de controle baseiam-se na utilização de inseticidas sintéticos que geralmente são utilizados sem acompanhar as recomendações técnicas e ainda com aplicações preventivas (Bortolotto et al., 2015, Corrêa-Ferreira et al., 2009, Panizzi, 2013), com os consequentes efeitos negativos para o meio ambiente e para a saúde humana (Gazzoni, 2012). Adicionalmente aplicações preventivas ou sem respeitar os níveis de controle

favorecem o surgimento de populações resistentes e afetam negativamente os inimigos naturais (Corrêa-Ferreira et al., 2009; Gazzoni, 2012).

A possibilidade de interferir no comportamento sexual dos insetos, e conseqüentemente, no seu sucesso reprodutivo, é uma das estratégias com grande potencial para o manejo eficiente de suas populações (Laumann et al., 2017). Embora a aplicação de sinais vibratórios para o manejo de pragas ainda é escassa, existe um grande potencial que ainda precisa ser explorado e avaliado cientificamente.

Sinais vibratórios podem ser utilizados para repelir ou interferir na comunicação dos percevejos nas áreas cultivadas (Polajnar e Čokl, 2008, Čokl et al., 2015, Laumann et al., 2017). Outra forma de interferência pode ser a utilização de sinais de competidores (sinais de indivíduos da mesma espécie/sexo ou sinais de indivíduos de outras espécies) ou antagonistas (predadores) que podem ter efeitos repelentes ou inibidores da comunicação (Laumann et al., 2017). Nos capítulos I e II desta tese se apresentam dados do efeito de interferência na comunicação e de inibição da cópula causados por sinais de rivalidade de coespecíficos e sinais de chamamento de heteroespecíficos que sustentam estas premissas.

Outra forma de aplicação pode ser para o monitoramento das pragas. Este pode se dar de forma direta, mediante a identificação dos sinais vibratórios emitidos pelos insetos, ou em forma indireta, com a incorporação de sinais vibratórios em armadilhas de captura (Laumann et al., 2017).

O monitoramento de percevejos tradicionalmente se realiza com a técnica do pano de batida. Esta técnica consiste em colocar um pano de 1 m de comprimento entre as linhas de soja e bater as plantas sobre o pano para coletar os insetos. Embora seja eficiente esta técnica é pouco aplicável nas grandes áreas onde se cultiva a soja uma vez que é necessário realizar panos de batida em 10 pontos a cada 100 ha. Uma alternativa que tem surgido e demonstrado grande potencial para o monitoramento de percevejos é o uso de armadilhas iscadas com o feromônio sexual das espécies (Borges et al., 2011, Laumann et al., 2011, Tillman e Cottrell, 2017).

Em particular, para o percevejo marrom armadilhas iscadas com o principal componente do seu feromônio sexual (2,3,10 trimetiltridecanoato de metila) mostram ser altamente eficientes para a captura de fêmeas da espécie. As armadilhas, quando distribuídas nas bordas da cultura com espaçamentos de 200 m entre elas, são uma boa ferramenta para estimar os níveis populacionais que auxiliam para estabelecer a necessidade de aplicar técnicas de controle (Borges et al., 2011).

Entretanto a eficiência e precisão das capturas podem ser incrementadas se incorporam os sinais vibratórios que atuam na etapa final do comportamento reprodutivo dos percevejos (Millar et al 2002). Esta incorporação pode contribuir para reduzir o número de insetos que são atraídos pelo feromônio, mas não entram nas armadilhas, um fato que comumente se reporta em estudos de campo (Millar et al., 2002, Cullen e Zalom 2005, Borges et al., 2011).

Um dos sinais vibratórios com maior potencial para esta função pode ser o sinal de chamamento das fêmeas que, assim como em outras espécies de percevejos, em *E. heros* tem como uma das suas principais funções biológicas o de atrair os machos (Čokl et al., 2000, Blassioli Moraes et al., 2005). A incorporação deste tipo de sinal nas armadilhas também pode incrementar as capturas já que atraem os machos seletivamente (Millar et al., 2002, Laumann et al., 2017, Mazzoni et al., 2017).

O único antecedente do uso de sinais vibratórios de percevejos como ferramenta para atrair os indivíduos é uma pesquisa realizada com a espécie invasora *Halyomorpha halys* (Stål, 1855). Mazzoni et al (2017) avaliaram o potencial de um dos sinais emitidos pelas fêmeas desta espécie (FS2) para atrair os machos. Em experimentos em diversos substratos e arenas experimentais mais de 50% dos machos avaliados foram atraídos pelo sinal FS2 (Mazzoni et al., 2017).

Considerando o exposto, o objetivo deste estudo foi determinar se sinais de chamamento de fêmeas ou machos de *E. heros* tem potencial de atração de coespecíficos e avaliar a eficiência de incorporação de sinais vibratórios de

E. heros em armadilhas de monitoramento para atração e captura de machos e fêmeas.

MATERIAL E MÉTODOS

Experimentos em arenas

Para selecionar os sinais com maior atratividade foram realizados bioensaios em arenas de dupla escolha descritas no capítulo II desta tese.

Os programas de estimulação oferecidos foram construídos utilizando sinais registrados e digitalizados previamente como descrito no PEG. Os sinais presentes nos arquivos foram sinais de chamamento de fêmeas (FS1) e de machos (MS1) de *E. heros*. Os programas foram construídos juntando sinais de 2 ou 3 indivíduos com sua intensidade normalizada aos níveis emitidos naturalmente pelos insetos. A descrição dos programas de estimulação utilizados está no Apêndice V.

Foram utilizadas arenas de dupla escolha formadas por uma prancha de acrílico (40 cm x 32 cm) com um furo central em formato “Y” (corpo de 20 cm; braços de 17 cm cada um), a qual foi vedada na parte superior e inferior com placas de vidros (40 cm x 32 cm x 4 mm) para o inseto não escapar. O piso da arena foi preenchido com papel Panamá de cor cinza e 1,62 mm de espessura, cortado no formato do “Y” que serviu como substrato para transmissão dos sinais. Para transmitir os sinais ao papel, o vidro inferior da arena foi perfurado (furo de 0,7 cm diâmetro) na região coincidente com a finalização de um dos braços da arena (~1 cm da finalização). Este furo permitiu a entrada da agulha do Minishaker, para mantê-la em contato com o piso de papel. Para evitar a difusão das vibrações para o braço oposto da arena, na região de bifurcação do

Y a base de papel foi cortada, estabelecendo uma fenda de 1 mm (Figura 5.1) entre os dois braços. Desta forma a arena possui uma região que vibra formada por um dos braços do Y e o corpo central da arena e uma região que não vibra (braço oposto da arena). Assim a arena mimetiza o caule central de uma planta e sua bifurcação e permite avaliar a escolha do inseto por uma área com vibrações e uma área sem vibrações.

Os bioensaios foram realizados introduzindo um macho ou uma fêmea de *E. heros* na área de liberação (base do Y) e o seu comportamento observado por um período de 10 minutos registrando escolha inicial (braço da arena onde o inseto entrou primeiro e se deslocou nele até pelo menos um terço do seu comprimento) e o tempo de residência (s) (tempo em que o inseto permaneceu em cada um dos braços da arena). Como controle e para evitar qualquer possível viés da arena foram realizados bioensaios onde nenhum dos braços foi vibrado.

Durante todo o período do bioensaios programas de estimulação selecionados foram reproduzidos seguindo as metodologias descritas em PEG para reprodução de sinais. Foi avaliada a resposta dos indivíduos machos e fêmeas para os sinais de *E. heros* FS1 e MS1 (tratamento) em relação ao braço sem vibração (controle). Os diferentes programas de estimulação e sexo dos insetos foram avaliados num desenho completamente aleatorizado com mudança dos sinais e insetos (machos ou fêmeas) a cada 3 bioensaios, quando a base de papel da arena foi trocada. A cada 5 bioensaios os braços tratamento e controle foram invertidos girando o vidro inferior da arena para permitir que o furo fique na posição correta.

Experimentos em gaiolas

Para avaliar o potencial de sinais vibratórios para atrair e capturar insetos nas armadilhas foram selecionados, segundo os resultados dos experimentos em arenas, os o sinal de fêmeas de *E. heros* FS1. Para realizar os experimentos em laboratório foram utilizadas gaiolas de acrílico (1 x 1 x 0,5 m). No interior destas gaiolas foram introduzidas 8 plantas de soja cultivadas em sacos de plásticos de (5 L). A preparação do solo para o cultivo das plantas seguiu os

procedimentos descritos em PGE. Em cada saco foram plantadas 10 sementes de soja. Os sacos foram mantidos a intempérie e regados quando necessário. Quando as sementes germinaram foi realizado um desbaste deixando somente três a quatro plantas por saco. As plantas foram usadas quando atingiram o estágio reprodutivo R5 (vagens totalmente formadas e grãos em fase de enchimento).

No centro das gaiolas foi ajustada uma armadilha construída com uma garrafa PET de plástico de 2 litros seguindo o modelo proposto por Borges e colaboradores (1998). A armadilha possui na sua parte superior quatro furos circulares de 1,5 cm de diâmetro em cada um dos quais se adaptou um funil construído com tela de arame. No interior da armadilha e na parte central foi adaptado outro funil formado a parte superior de uma garrafa PET, desta forma delimitaram-se duas partes. Na parte superior os furos e os funis servem como orifício de entrada dos insetos na armadilha e o funil interno e a parte inferior da armadilha servem como local de retenção dos insetos capturados.

Nessa armadilha foi grudado, com fita adesiva transparente, um fone de ouvido (JBL Fone de Ouvido, JBL, Tune 110 Intra-Auricular), de forma que seu alto falante ficou em contato com a lateral da armadilha, assim a armadilha retransmitia o sinal sonoro liberado pelo fone. O fone foi ligado a um sistema microcontrolado com um módulo para o armazenamento das vibrações em forma de áudio e com interface amplificadora formado por um circuito para regulação da tensão de entrada. Este equipamento foi desenvolvido pela equipe da Embrapa em colaboração com uma equipe da Universidade Estadual de Mato Grosso (UNEMAT) coordenada pelo Prof. Tadeu de Miranda Queiroz. Nesse sistema foi gravado uma sequência de pulsos de 10 segundos do sinal FS1 (a mesma que foi reproduzida continuamente durante os experimentos). Como controle foi instalado concomitantemente outra gaiola similar à supracitada, porém a armadilha permaneceu desligada e em outra mesa, assim evitando que o sinal de uma gaiola passasse para outra. Foram feitos experimentos com grupos de machos e grupos de fêmeas de *E. heros*. Os insetos utilizados estavam com 10 dias de fase adulta e sem acasalar, foram feitas 10 repetições com cada tratamento.

Para os experimentos foram liberados 30 indivíduos do mesmo sexo distribuídos sobre as diferentes plantas da gaiola. O experimento teve 8 horas de duração, e a cada hora foram registrados o número de insetos presentes em plantas que estavam em contato com a armadilha, sobre a armadilha, e o número de insetos capturados (no interior da armadilha) (Figura 5.1).



Figura 5.1. Esquema experimental de reprodução de sinais fêmeas de *E. heros* em armadilhas de plástico em plantas de soja dentro de gaiolas de acrílico. 1- Vibrometro laser. 2- Armadilha de garrafa Pet com excitador mecânico conectado. 3-Armadilha entre as plantas de soja.

Os parâmetros analisados foram o número de insetos presentes nas plantas em contato com a armadilha e o número de insetos capturados em todos os intervalos durante as 8 horas do experimento e a variação do número de insetos presentes nas plantas próximas a armadilhas ou capturados no seu interior em função do tempo.

Análises estatísticas.

Nos experimentos em arenas para comparar a primeira escolha entre os lados da arena foi realizado um teste de regressão logística para estimar a probabilidade de escolha para o braço tratamento. O teste de χ^2 de Wald foi utilizado para avaliar a hipótese de não preferência (50% de probabilidade de escolha para cada lado) entre os braços tratamento e controle da arena. O tempo de residência em cada lado da arena foi comparado utilizando o teste de Wilcoxon.

Para comparar o número de insetos presentes nas plantas próximas e o número de insetos capturados nas armadilhas tratamento e controle nos intervalos durante as 8 horas de duração do experimento e o número total de insetos capturados em todo o período do experimento (8 horas) foram utilizados modelos lineares generalizados (GLM) com distribuição de erros de Poisson. Para comparar o número de insetos capturados ao longo do tempo foram utilizados modelos lineares generalizados de efeitos mistos (GLMM) com distribuição de erros de Poisson considerando os tratamentos como efeitos fixos e as gaiolas como efeitos aleatórios de medidas repetidas.

Todas as análises foram realizadas utilizando a plataforma R versão 4.0.0 (R Development Core Team, 2020) para as análises GLMM foi utilizado o pacote lme4

RESULTADOS

Arenas de duas escolhas (Y).

As fêmeas de *E. heros* escolheram preferencialmente os braços da arena vibrados tanto com o sinal de chamamento das fêmeas FS1 ($\chi^2 = 5$, gl = 1, P = 0,025) quanto com o sinal de chamamento do macho, MS1 ($\chi^2 = 7.2$, gl = 1, P = 0,007) (Figura 5.2). Nos bioensaios em que ambos os braços da arena não foram vibrados os insetos (machos e fêmeas) não mostraram preferência por nenhum dos lados da arena indicando assim que a arena experimental não condiciona o comportamento dos insetos (macho: $\chi^2 = 0.047619$, gl = 1, P = 0.827, fêmea: $\chi^2 = 0$, gl = 1, P = 1) (Figura 5.1 A e 5.2 A). Da mesma maneira o tempo de residência das fêmeas em cada um dos braços da arena não mostrou diferenças significativas quando os bioensaios foram realizados sem reprodução de sinais vibratórios (Figura 5.2 B e 5.2 B). Por sua vez o tempo de residência foi superior nos braços da arena vibrados com sinais dos coespecíficos em relação aos braços controle bioensaios (FS1 W= 2,515, gl = 19, P = 0,021 e MS1 W = -2,206, gl = 1, P = 0,039) (Figura 5.2 B).

Os machos de *E. heros* também escolheram primeiramente os braços da arena vibrados com o sinal da fêmea, FS1 ($\chi^2 = 4,482$, gl = 1, P = 0,034) ou com o sinal do macho, MS1 ($\chi^2 = 5$, gl = 1, P = 0,025) (Figura 5.3 A). Estes tratamentos não mostraram efeitos significativos nos tempos de residência (Figura 5.3 B).

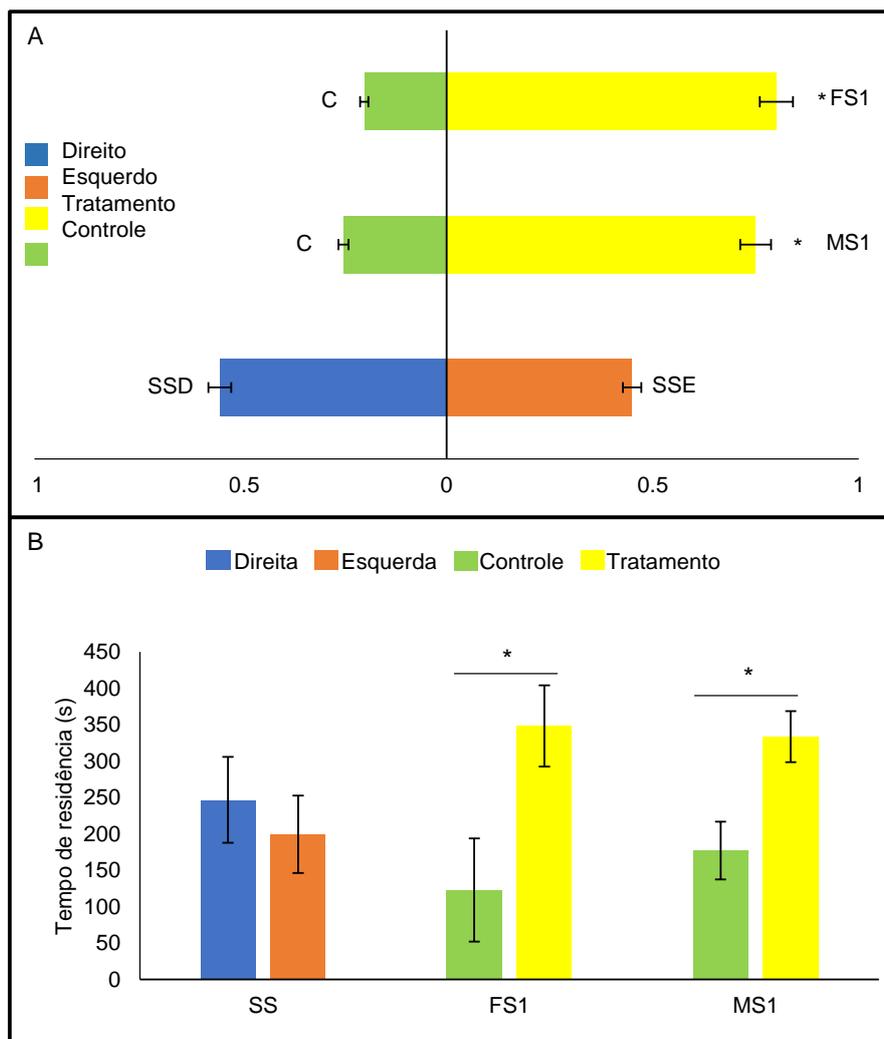


Figura 5.2. Efeito de sinais vibratórios de coespecíficos na atração de fêmeas de *E. heros* em experimentos em arenas de dupla escolha. A) Escolha inicial B) Tempo de residência. C: Controle, braços da arena sem vibrações, FS1: braço da arena com sinal vibratório da fêmea de *E. heros*, MS1: braço da arena com sinal vibratório do macho de *E. heros*, SSD: braço direito do olfatômetro sem sinal, SSE: braço esquerdo do olfatômetro sem sinal. Barras em A, indicam a proporção média de resposta calculada a partir da regressão logística e as linhas o IC de 95%, e em B, o tempo de residência médio \pm EP * indica diferenças significativas ($P < 0,05$), teste χ^2 para escolha inicial e teste de Wilcoxon para tempo de residência.

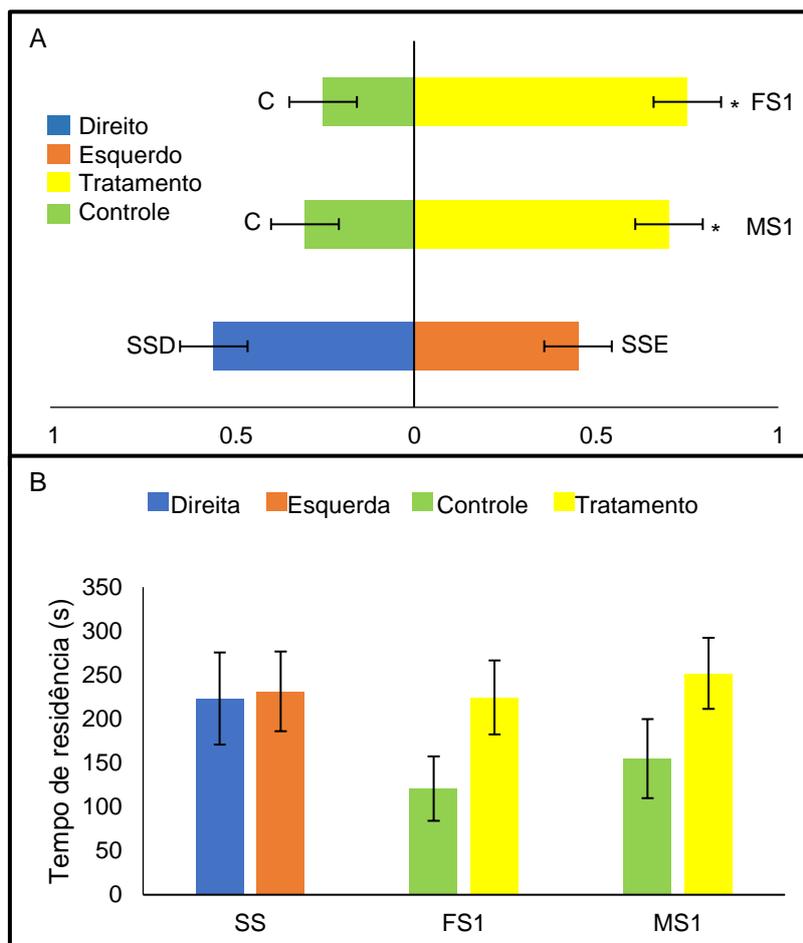


Figura 5.3. Efeito de sinais vibratórios de coespecíficos na atração de machos de *E. heros* em experimentos em arenas de dupla escolha. A) Escolha inicial B) Tempo de residência. C: Controle, braços da arena sem vibrações, FS1: braço da arena com sinal vibratório da fêmea de *E. heros*, MS1: braço da arena com sinal vibratório do macho de *E. heros*, SSD: braço direito do olfatômetro sem sinal, SSE: braço esquerdo do olfatômetro sem sinal. Barras em A, indicam a proporção média de resposta calculada a partir da regressão logística e as linhas o IC de 95%, e em B, o tempo de residência médio \pm EP * indica diferenças significativas ($P < 0,05$), teste χ^2 para escolha inicial e teste de Wilcoxon para tempo de residência.

Experimentos em Gaiolas

Considerando todo o período do experimento (8 horas) foi observado um maior número de machos ($z = 2,66$, $g = 10$, $P < 0,05$) e de fêmeas ($z = 1,81$, $g = 10$, $P = 0,05$) capturadas nas armadilhas com tratamento (armadilhas vibradas com FS1 de *E. heros*) (Figura 5.4 A). Considerando o número de insetos em plantas próximas não foram observadas diferenças entre as armadilhas tratamento e controle para as fêmeas ($z = 1,38$, $g = 10$, $P = 0,16$) (Figura 5.4 A).

Entretanto foi observado um maior número de macho nas plantas em contato com as armadilhas nas gaiolas com armadilhas vibradas com FS1 em relação as gaiolas com armadilhas controle ($z=2,93$, $gl=10$, $P < 0,05$) (Figura 5.4. A).

O número médio de insetos capturados nas armadilhas das gaiolas tratamento e controle em cada intervalo de tempo mostrou diferenças significativas somente para os machos (armadilha: $z = 2,17$ $gl = 92$ $P = 0,03$, planta: $z = -0,8$, $gl = 92$, $P = 0,42$). Neste caso as capturas mostraram um incremento constante ao longo do tempo (Figura 5.4 B). Não houve diferença estatística entre o controle e tratamento no número de fêmeas tanto nas plantas próximas a armadilhas quanto nas capturadas (planta: $z = 0,89$, $gl = 92$, $P = 0,36$, armadilha: $z = 0,11$, $gl = 92$, $P = 0,9$) (Figura 5.4 C).

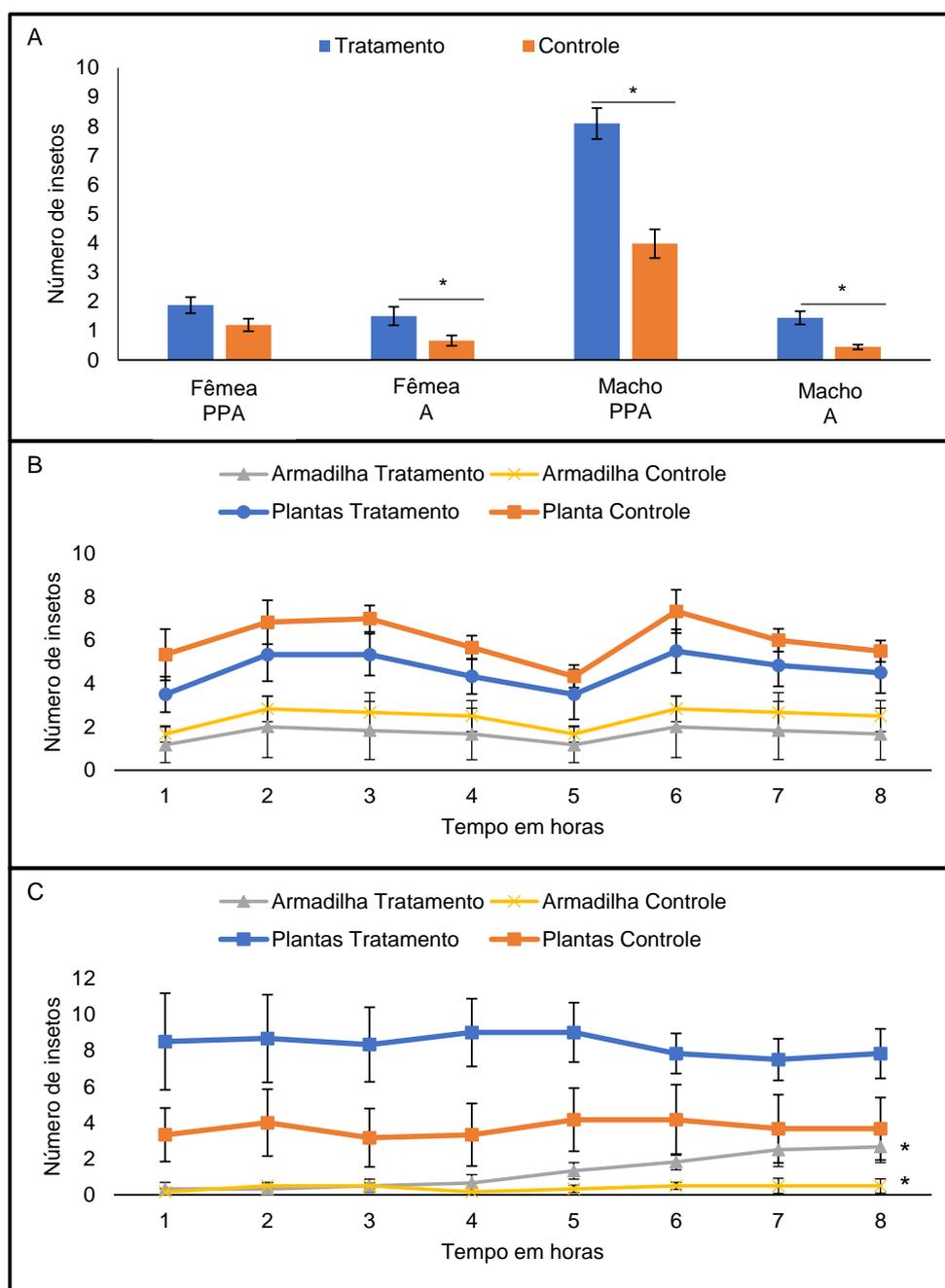


Figura 5.4. Influência da incorporação de sinais vibratórios de fêmeas de coespecíficos na captura de fêmeas e machos de *E. heros* em experimentos em gaiolas com plantas de soja. A) Número de insetos (media \pm EP) em plantas em contato ou em armadilhas plásticas. B) Número de fêmeas de *E. heros* em plantas em contato ou em armadilhas plásticas ao longo do tempo, C) Número de machos de *E. heros* em plantas em contato ou em armadilhas plásticas ao longo do tempo. As armadilhas foram distribuídas em gaiolas de acrílico com 8 plantas de soja 4 em contato com as armadilhas e 4 sem contato 8 horas. PPA= Plantas próximas a armadilha, A= Armadilha, Armadilha Tratamento: armadilhas vibradas com sinal da fêmea de *E. heros* (FS1), Armadilha Controle: armadilha sem vibrações. As barras os pontos nos gráficos indicam os valores médios do número de insetos e as linhas representam o erro padrão. * representa diferença estatística entre os tratamentos (GLM $P < 0,05$).

DISCUSSÃO

Os resultados deste capítulo mostram a atração de *E. heros* aos sinais vibracionais de seus coespecíficos. Tanto machos quanto fêmeas em arenas de duas escolhas, foram atraídos para áreas da arena onde foram emitidos os sinais de fêmeas ou de machos de *E. heros*. Em particular a atração obtida para as fêmeas é um resultado inédito e que aporta novos conhecimentos em relação à função dos cantos de chamamento de percevejos e sua utilização para orientação espacial.

Os machos de percevejos utilizam o sinal de chamamento das fêmeas, que consiste numa sequência de pulsos regularmente repetidos durante um longo período de tempo, para obter informação espacial e direcionar os seus movimentos na planta para o encontro das fêmeas e início do comportamento de acasalamento. (Čokl et al., 1999). O mecanismo mais provável pelo qual os insetos recebem a informação direcional é a diferença de tempo na qual os sinais, transmitidos pelas plantas, atingem os diferentes receptores sensoriais das patas em lados opostos do corpo (Polajnar et al., 2012).

Este mecanismo originalmente descrito em *N. viridula* (Čokl et al., 1999) posteriormente foi observado em várias espécies de percevejos Neotropicais, incluindo *E. heros* (Blassioli et al., 2005, 2014, Silva et al., 2012, Laumann et al., 2016). Assim a atratividade do canto FS1 para os machos observada nos bioensaios em arenas corrobora estas informações prévias. Por outra parte a atração de fêmeas e o mesmo efeito observado para o canto MS1 em insetos de ambos os sexos resulta em uma informação que pode ter grande relevância na interpretação de alguns aspectos biológicos e ecológicos dos percevejos. Segundo o observado nos experimentos estes sinais além da sua função de chamamento e orientação também poderiam ser utilizados para o recrutamento de coespecíficos, tendo assim uma função de agregação. Em geral os percevejos, embora sejam insetos solitários, geralmente apresentam padrões

agregados de distribuição tanto em uma determinada área como em plantas individuais (Roggia 2009, Carvalho, 2014). Estas agregações poderiam ser resultado das respostas aos sinais de chamamento observadas nos bioensaios. Entretanto para confirmar esta hipótese é necessário realizar experimentos onde se avalie a resposta de grupos de insetos.

A maior permanência das fêmeas nos lados da arena com o sinal FS1 condiz com o relatado no primeiro capítulo desta tese quando se avaliaram grupos de fêmeas na mesma planta. Nos experimentos em que três fêmeas estavam presentes na planta e só havia um macho, as fêmeas ficavam todas juntas emitindo sinais vibracionais, esta emissão de sinais conjunta tem sido interpretada como um mecanismo cooperativo de potenciação dos sinais similar aos coros amplamente relatados para alguns vertebrados (Virant-Doberlet et al., 2014). Entretanto a presença dos machos pode interferir neste processo tornando as interações competitivas entre as fêmeas segundo o relatado no trabalho do capítulo 1 (Čokl et al., 2017).

Nos bioensaios realizados com os machos foi observado que os mesmos foram em direção aos sinais de machos e fêmeas de seu coespecífico, entretanto, diferente das fêmeas, os sinais não retiveram os insetos nas áreas vibradas uma vez que o tempo de residência não foi diferente entre as áreas da arena experimental vibradas e não vibradas o que sugere que os machos ao não encontrar fisicamente a fêmea ou outros estímulos que relacionem a sua presença continuam com o comportamento de busca pelos parceiros.

Até o momento, somente um outro estudo realizado com o percevejo marmorado marrom, *Hyalomorpha halys*, abordou o estudo de sinais de chamamento como uma forma de atrair os coespecíficos e uma ferramenta para o monitoramento de percevejos. Mazzoni e colaboradores (2017) desenvolveram experimentos com o sinal FS2 das fêmeas deste inseto e avaliaram a atratividade destes sinais para machos da espécie em experimentos em plantas e arenas artificiais de acrílico. Os resultados obtidos indicam um comportamento semelhante ao observado para os machos de *E. heros* quando a presença do sinal das fêmeas estimula os insetos a procurar, tornando-os muito ativos. Os machos mostraram movimentos altamente direcionados às fontes de vibração

(Mazzoni et al. 2017). Entretanto, somente 50% dos insetos avaliados responderam ao tratamento, um número bem inferior se comparado com o observado para machos de *E. heros*.

Os bioensaios realizados com gaiolas mostraram resultados similares indicando atração dos insetos para as armadilhas vibradas em relação às armadilhas controle, nestes experimentos os machos foram mais atraídos para as armadilhas ou suas proximidades do que as fêmeas. Da mesma maneira que o observado para os feromônios, mais indivíduos foram atraídos dos que capturados nas armadilhas (Cullen e Zalom, 2005, Aldrich et al., 2009, Borges et al., 2011, Laumann et al., 2011). Este comportamento característico dos percevejos em relação a estímulos unimodais reforça a necessidade de considerar para o seu manejo as combinações de sinais. Como fora demonstrado no capítulo 3 desta tese estas interações são decisivas para a comunicação e o comportamento reprodutivo dos percevejos.

Os resultados deste trabalho têm claras implicações práticas uma vez que demonstra o potencial de atração dos sinais vibratórios incorporados nas armadilhas para percevejos. Embora os FS1 quando incorporado às armadilhas parece ser mais eficiente para atrair os machos esta característica não seria um fator totalmente negativo. A associação de sinais vibratórios com feromônio, em armadilhas pode ser uma boa estratégia uma vez cada sinal pode atuar como uma isca para um grupo de indivíduos diferente. Potenciando o efeito dos sinais. Para confirmar essa hipótese experimentos com a combinação desse sinal e a armadilha com feromônio precisam ser realizados.

Uma outra perspectiva interessante relacionada com a interação dos sinais é o fato relatado no capítulo 3 desta tese de que o sinal FS1 estimula os machos a produzir feromônios. Assim machos capturados em armadilhas vibradas com este sinal podem espontaneamente liberar o feromônio sexual atraindo as fêmeas. Esta estratégia pode ser muito relevante para viabilizar o uso de armadilhas em campo já que elimina a necessidade de uma das iscas que seria produzida naturalmente pelos insetos (Laumann et al., 2017). Além da atração dos percevejos, também foi comprovado que o sinal FS1 é atrativo para o parasitoide de ovos *T. podisi* (Ashmed) (Hymenoptera: Scelionidae) pelo que

as armadilhas reproduzindo este sinal ainda podem ter um efeito benéfico para o manejo comportamental deste agente de controle biológico (Laumann et al., 2007, 2011).

Uma outra aplicação pode surgir a partir de um exemplo de uso de armadilhas sonoras em sistema atrai-mata. Um sistema de armadilhas sonora associado a um dispositivo para aplicação de inseticidas foi desenvolvido para o controle da cigarra *Quesada gigas* (Olivier, 1790). A armadilha consiste num alto-falante que reproduz o sinal do macho da cigarra, as fêmeas e machos ao voarem em direção ao alto-falante recebem um spray com o veneno. Desta forma o sistema é altamente específico em relação ao organismo alvo e reduz a distribuição de inseticidas no campo (Maccagnan et al., 2008). O fato relatado da concentração dos percevejos entorno à fonte de vibração observado nos experimentos em gaiolas é uma característica que pode ser considerada no desenvolvimento de um sistema atrai-mata similar ao descrito.

Os resultados aqui apresentados trazem interessantes perspectivas da aplicação do conhecimento da comunicação vibracional de percevejos para o monitoramento destas pragas. Nos últimos anos o manejo integrado destas pragas tem ressurgido como a estratégia mais adequada para controlar eficientemente estes insetos e reduzir os impactos ambientais de técnicas como o uso indiscriminado de inseticidas (Bueno et al., 2011, Panizzi, 2013). O MIP tem como base fundamental o conhecimento das densidades populacionais dos insetos praga. Desta forma o desenvolvimento de técnicas inovadoras e precisas para o monitoramento de percevejos pode contribuir para expandir e disseminar o MIP nas diversas regiões produtoras do país.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aquino, M.F.S.; Sujii, E.R.; Borges, M.; Blassioli-Moraes, M.C.; Laumann, R.A. (2019). Diversity of stink bug adults and their parasitoids in soybean crops in Brazil: Influence of a latitudinal gradient and insecticide application intensity. *Env. Entomol.*, 48,105–113
- Aldrich JR, Khrimian A, Chen X, Camp MJ (2009) Semiochemically based monitoring of the invasion of the brown marmorated stink bug and unexpected attraction of the native green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) in Maryland. *Fla Entomol* 92:483–491.
- Blassioli-Moraes, M.C.; Laumann, R.A.; Čokl, A.; Borges, M. (2005). Vibratory signals of four Neotropical stink bug species. *Physiol. Entomol.* 2005, 30,175–188.
- Blassioli-Moraes MC, Magalhaes DM, Čokl A, Laumann RA, Da Silva JP et al (2014) Vibrational communication and mating behaviour of *Dichelops melacanthus* (Hemiptera: Pentatomidae) recorded from the loudspeaker membrane and plants. *Physiol Entomol* 39:1–11
- Borges, M. ; Moraes, M. C. B. ; Peixoto, M. F. ; Pires, C. S. S. ; Sujii, E. R., Laumann, R. A. (2011). Monitoring the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) with pheromone-baited traps in soybean fields. *Journal of Applied Entomology*, v. 135, p. 68-80.
- Bortolotto, O.C., Pomari-Fernandes, A., Bueno, R.C.O. , Bueno, A. de F., Kruz, Y.K.S., Queiroz, A.P., Sanzovo, A. Ferreira, R.B. (2015). The use of soybean integrated pest management in Brazil: a review. *Agron. Sci. Biotechnol.* 1, 25–32
- Bueno, A.F., M.J. Batistela, R.C.O.F. Bueno, J.B. França-Neto, M.A.N. Nishikawa and A. Libério Filho. (2011). Effects of integrated pest management, biological control and prophylactic use of insecticides on the management and sustainability of soybean. *Crop Prot.* 30: 937-945.
- Carvalho, João Henrique Silva. Distribuição espacial do percevejo-marrom, *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Heteroptera: Pentatomidae), na cultura da soja, utilizando geoestatística. 2014. iii, 45 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de

Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, 2014. Available at: <<http://hdl.handle.net/11449/122003>>.

- Čokl, A.; Virant-Doberlet, M.; McDowell, (1999). A. Vibrational directionality in the southern green stink bug, *Nezara viridula* (L.), is mediated by female song. *Anim. Behav.* 58, 1277-1283
- Čokl, A., Virant-Doberlet, M., & Stritih, N. (2000). The structure and function of songs emitted by southern green stink bugs from Brazil, Florida, Italy and Slovenia. *Physiological Entomology*, 25, 196-205.
- Čokl A, Laumann RA, Žunič AK, Blassioli-Moraes, MC, Virant-Doberlet M, Borges M (2015) Interference of overlapping insect vibratory communication signals: an *Euschistus heros* model. *Plos One* June 22: 1-16.
- Čokl, A.; Laumann, R.A.; Stritih, N. (2017). Substrate-borne vibratory communication In *Stink Bugs: Biorational Control Based on Communication Processes*; Čokl A. M. Borges Eds.; CRC Press Taylor&Francis Group, Boca Raton London New York; pp. 125-164.
- Conab, 2021. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v.8– Safra 2020/21, n. 4 - Quarto levantamento, Brasília, p. 1-85, Janeiro 2021
- Corrêa-Ferreira, B. S. & F. Moscardi. (1995) Seasonal occurrence and host spectrum of egg parasitoids associated with soybean stink bugs. *Biol. Control*, 5:196-202
- Corrêa-Ferreira, B.S., Krzyzanowski, F.C., Minami, C. A. (2009). Percevejos e a qualidade da semente de soja – série sementes. EMBRAPA-CNPSo, Londrina. Circular Técnica, 67
- Cullen EM, Zalom FFG, (2005). Relationship between *Euschistus conspersus* (Hem., Pentatomidae) pheromone trap catch and canopy samples in processing tomatoes. *J. Appl. Entomol.* 129, 505–514
- Gazzoni, D.L. (2012). Perspectivas do manejo de pragas, in: Hoffmann-Campo, C.B., Corrêa Ferreira, B.S., Moscardi, F. (Eds.), *Soja: Manejo Integrado de Insetos e outros Artrópodes-Praga*. Embrapa, Brasília, DF, pp.789–829
- Laumann, R. A., Moraes, M. C. B. , Čokl, A., Borges, M. (2007) Eavesdropping on the sexual vibratory communication of stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) by the egg parasitoid *Telenomus podisi*. *Animal Behaviour*, v. 73, p. 637-649.
- Laumann, R.A., Lopes , Moraes, M.C.B. Čokl A., BORGES, M. (2011). Silent singers are not safe: Selective response of the parasitoid *Telenomus podisi*

to substrate-borne vibratory signals of stink bugs. *Animal Behaviour*, v. 82, p. 1175-1183, 2011.

- Laumann, R.A.; Čokl, A.; Blassioli-Moraes, M.C.; Borges, M. (2016). Vibratory communication and its relevance to reproductive isolation in two sympatric species (Hemiptera: Pentatomidae: Pentatominae). *J. Insect Behav*, 29, 643–665
- Laumann, R.A.; Bottura Maccagnan, D.H.; Čokl, A. (2017). Use of vibratory signals for stink bug monitoring and control. In *Stink Bugs: Biorational Control Based on Communication Processes*; Čokl, A., Borges, M., Eds.; CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton London New York, 2017, pp. 226-245.
- Maccagnan, D. H. B. (2008). Cigarra (Hemiptera: Cicadidae): emergência, comportamento acústico e desenvolvimento de armadilha sonora (Doctoral dissertation, PhD Thesis, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo
- Mazzoni, V.; Polajnar, J.; Baldini, M.; Rossi Stacconi, M.V.; Anfora, G.; Guidetti, R.; Maistrello, L. (2017). Use of substrate-borne vibrational signals to attract the Brown Marmorated Stink Bug, *Halyomorpha halys*. *J. Pest. Sci.*, 90, 1219-1229.
- Millar, J. G., McBrien, H. L., Ho, H. –Y, Rice, R. E., Cullen. E., Zalom, F. G., and Uokl, A. (2002). Pentatomid bug pheromone in IPM: possible applications and limitations. *IOBC wprs Bulletin*. V. 25, p. 1-11.
- Panizzi, A. R. (1997). Wild hosts of pentatomids: Ecological significance and role in their pest status on crops. *Annual Review of Entomology*, v. 42, p. 99-122.
- Panizzi, A R. (2013). History and contemporary perspectives of the integrated pest management of soybean in Brazil. *Neotropical Entomology*, 42(2), 119–27.
- Polajnar J. and Čokl A. (2008). The effect of vibratory disturbance on sexual behaviour of the southern green stink bug *Nezara viridula* (Heteroptera, Pentatomidae). *Central European Journal of Biology*, v.3, n. 2, p. 189-197
- Polajnar, Jernej, Svenšek, Daniel, Čokl, Andrej. (2012). Resonance in herbaceous plant stems as a factor in vibrational communication of pentatomid bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *Journal of the Royal Society interface*, vol. 9, no. 73, str. 1898-1907.

- Roggia, R.C.R.K. (2009). Distribuição espacial e temporal de percevejos da soja e comportamento de *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) (Hemiptera: Pentatomidae) na soja (*Glycine max* (L.) Merrill) ao longo do dia. 128f Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria.
- Silva, Cleonor Cavalcante A., Laumann, Raúl Alberto, Ferreira, Jonatas Barbosa Cavalcante, Moraes, Maria Carolina Blassioli, BORGES, Miguel, Čokl, Andrej.(2012). Reproductive biology, mating behavior, and vibratory communication of the brown-winged stink bug, *Edessa meditabunda* (Fabr.) (Heteroptera: Pentatomidae). *Psyche*, vol. 2012, 1-9 str.
- Tillman, P. Glynn; Cottrell, Ted E. (2017). Use of Pheromones for Monitoring Phytophagous Stink Bugs (Hemiptera: Pentatomidae). In: *Stinkbugs: biorational control based on communication processes*, Čokl, A. and Borges, M 2017, Chapter 10. 16 pp
- Virant-Doberlet, M.; Mazzoni, V.; de Groot, M.; Polajnar, J.; Lucchi, A.; Symondson W.O.C.; Čokl, A. (2014). Vibrational communication in networks: eavesdropping and biotic noise. In *Studying vibrational communication, Animal Signals and Communication*. Cocroft, R.B., Gogala, M., Hill P.S.M., Wessel, A.; Eeds.; Springer, Berlin, 2014; pp. 93-123.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os trabalhos de pesquisa desenvolvidos e apresentados nesta tese são uma contribuição para o avanço dos conhecimentos da comunicação vibracional de percevejos. A obtenção de várias informações inéditas junto à avaliação da aplicação de alguns dos aspectos da comunicação vibracional para o manejo de percevejos praga abre novas perspectivas para que, no futuro, possam ser desenvolvidos métodos alternativos de controle para estas importantes pragas das culturas de grãos no país.

Como resumo geral dos principais resultados podem se destacar:

Capítulo I - Fêmeas de percevejos em interações competitivas com outras fêmeas desenvolvem comportamento de rivalidade que incluem sinais específicos. Os sinais de rivalidade, são descritos pela primeira vez para percevejos na literatura. Também foi comprovado que os sinais relacionados a rivalidade, tanto de fêmeas quanto de machos possuem efeito disruptivo no comportamento sexual, e inibição de cópula de seus coespecíficos.

Capítulo II – Sinais de percevejos heteroespecíficos podem desencadear comportamentos diferentes e específicos aos mesmos. Em algumas espécies não possuem efeitos inibitórios no comportamento sexual, como em *E. heros*, em *C. impicticornis* sinais heteroespecíficos suprimem o comportamento sexual e a cópula. Os efeitos de sinais heteroespecíficos no comportamento reprodutivo de percevejos são relatados pela primeira vez. Percevejos predadores da espécie *P. nigrispinus* podem reconhecer e são atraídos por sinais vibratórios de presas potenciais como o percevejo fitófago *E. heros*.

Capítulo III – Sinais de diferentes modalidades podem modular o comportamento vibracional de percevejos. Rastros de percevejo são reconhecidos pelos seus coespecíficos e interferem na comunicação vibracional (estimulando fêmeas e machos a emitirem sinais vibratórios) e comportamento sexual (presença de rastro de fêmeas induz o casal a cópula) do percevejo marrom *E. heros*. A

emissão de sinais vibratórios de fêmeas (FS1) de *E. heros* estimula os machos da sua espécie a emitirem o feromônio sexual. A presença feromônio sexual pode estimular (fêmeas) ou inibir (machos), dependendo o sexo do indivíduo, a emissão de sinais vibracionais do percevejo.

Capítulo IV –. Ruídos ambientais originados por vibrações simulando chuva ou a exposição direta dos insetos a correntes de ar possuem um efeito disruptivo no comportamento sexual do percevejo marrom da soja, *E. heros*, inibindo o comportamento de cópula do mesmo. Estes efeitos são demonstrados pela primeira vez para percevejos Pentatomidae

Capítulo V- Os sinais de chamamento de fêmeas e machos coespecíficos são atrativos tanto para machos quanto para as fêmeas de *E. heros*. O efeito atrativo de sinais de chamamento de machos é demonstrado pela primeira vez entre os pentatomídeos. Sinais vibratórios quando reproduzidos em armadilhas apresentam atração dos percevejos para estas, e para plantas próximas, em contato com as armadilhas.

A aplicação destes conhecimentos para o manejo de pragas é discutida e depende de desenvolvimentos tecnológicos que permitam incorporar os sinais vibratórios em dispositivos para sua dispersão no campo, como, por exemplo, no caso das armadilhas, ou ainda metodologias e equipamentos para identificar estes sinais, originando assim uma alternativa para o monitoramento de populações.

Várias das metodologias experimentais aqui apresentadas também são inéditas e podem contribuir para difundir os estudos de biotremologia, uma disciplina incipiente no Brasil, mas de grande relevância científica e com potencial de aplicação para o manejo de pragas.

APÊNDICE I

Exemplo dos programas de estimulação utilizados nos bioensaios de reprodução de sinais de rivalidade.

Sonograma (acima) e oscilograma (abaixo) de sinal de rivalidade:

A) Fêmea *E. heros*: O programa de estimulação possui 26,5 s, com 25 pulsos com média de 0.452 s de duração, com intervalo médio de 0.289 s entre eles e frequência dominante 116 Hz e intensidade em -56 dB.

B) Fêmea *C. impicticornis*: O programa de estimulação possui 30 s e é composto por 10 pulsos com média de duração de 0.714 s com intervalo médio de 2.095s entre eles e frequência dominante de 102Hz e intensidade em -58dB.

C) Fêmea *C. ubica*: O programa de estimulação apresenta 1min19 s. Possui 3 sequências de trem de pulso, sendo a primeira composta de 14 pulsos com média de 1.562 s de duração, com intervalo médio de 0.205s entre eles e frequência dominante de 113 Hz e intensidade em -58 dB. O intervalo entre o primeiro e segundo trem de pulso foi de 21.324 s. A segunda sequência de trem de pulso é composta por 3 pulsos com média de 0.911 s de duração, com intervalor médio de 0.181 s entre eles. O intervalo entre o segunda e o terceiro trem de pulso foi de 23.812 s. A terceira sequência é composta por 9 pulsos, com duração média de 1.482 s, com intervalo médio de 0.135 s entre eles.

D) Macho de *E. heros*: O programa de estimulação apresenta 47,5 s com 38 pulsos com média de 0.995 s de duração, com intervalo médio de 0.232 s entre eles, frequência dominante 153 Hz e intensidade em -55 dB.

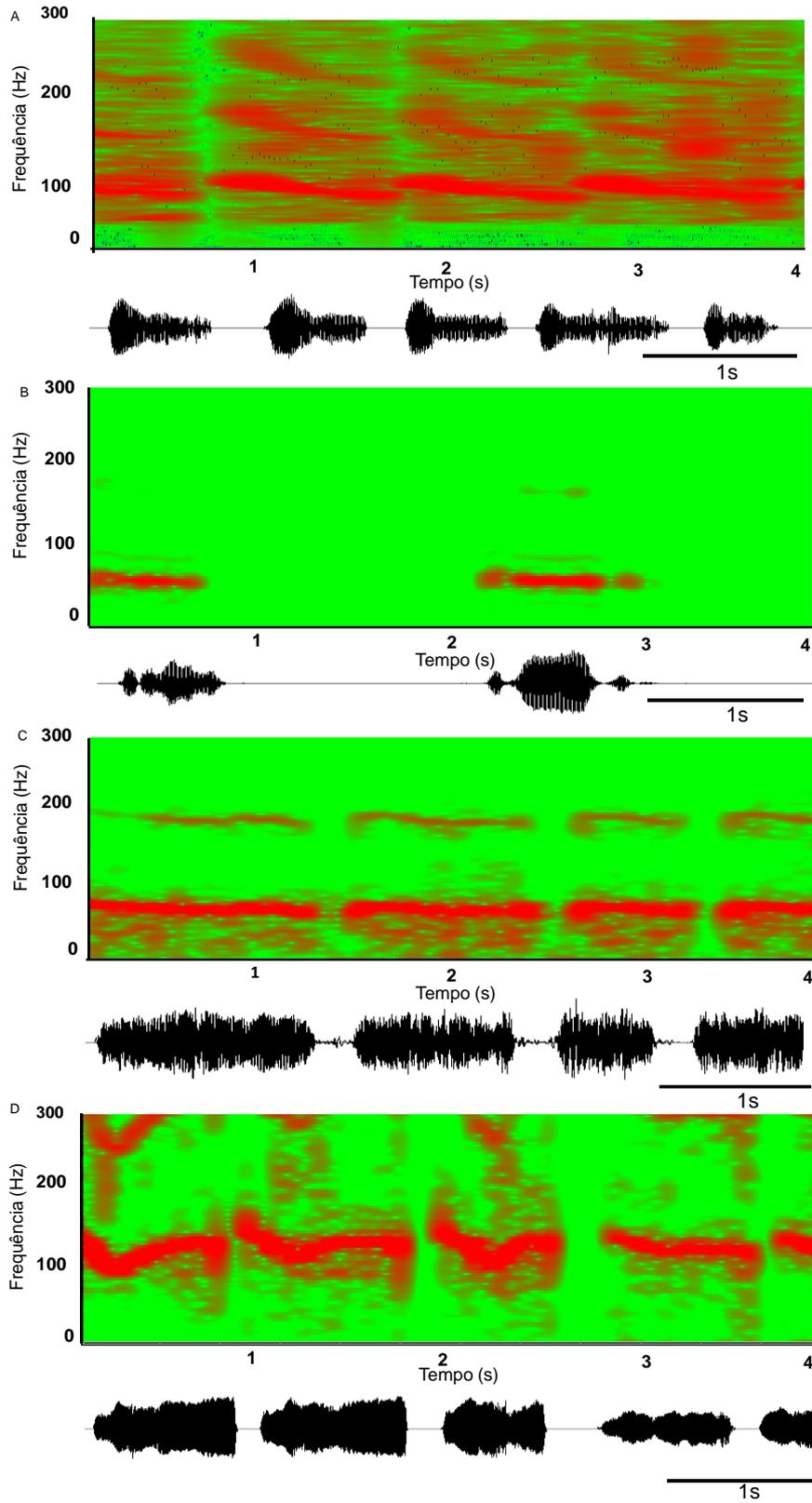


Tabela 1. Resultados das análises estatísticas dos experimentos desenvolvidos no Capítulo 1

| Capítulo I | | | Valor de teste | GL | Valor de P |
|-------------------------------------|------------------------|-------------|----------------|--------|------------|
| Rivalidade de Fêmea <i>E. heros</i> | Latência | Fêmea | t=3.66 | 20 | P<0.05 |
| | | Macho | t=-1.03 | 19 | 0.31 |
| | Tempo de Resposta | Fêmea | t=0.009 | 20 | 0.99 |
| | | Macho | t=-2.7 | 19 | P<0.05 |
| | Duração do Pulso | Fêmea | z=0.1 | 579 | 0.7 |
| | | Macho | z=3.81 | 696 | 0.05 |
| | Intervalo entre Pulsos | Fêmea | z=7.73 | 579 | P<0.05 |
| | | Macho | z=0.55 | 696 | 0.47 |
| | Número de pulsos | Fêmea | t=1.48 | 20 | 0.15 |
| | | Macho | t=-1.9 | 19 | 0.06 |
| | Frequência Dominante | Fêmea | z=56 | 579 | P<0.05 |
| | | Macho | z=9.98 | 696 | P<0.05 |
| Rivalidade de macho <i>E. heros</i> | Latência | Casal Fêmea | t = -1.5961 | 27 | 0.01 |
| | | Casal Macho | t = 0.02187 | 25 | 0.98 |
| | | Fêmea | t=-3.08 | 19 | P<0.05 |
| | | Macho | t=0.87 | 19 | 0.39 |
| | Tempo de Resposta | Casal Fêmea | t = 0.57277 | 27 | 0.5 |
| | | Casal Macho | t = 1.1659, | 25 | 0.25 |
| | | Fêmea | z=0.92 | 19 | 0.36 |
| | | Macho | z=-3.03 | 19 | P<0.05 |
| | Duração do Pulso | Casal Fêmea | z=2.17 | 893 | 0.14 |
| | | Casal Macho | z=12 | 807 | P<0.05 |
| | | Fêmea | z=7.63 | 527 | P<0.05 |
| | | Macho | z=0.02 | 607 | 0.88 |
| | Intervalo entre Pulsos | Casal Fêmea | z=1.04 | 893 | 0.3 |
| | | Casal Macho | z=2.89 | 807 | 0.08 |
| | | Fêmea | z=2.69 | 527 | 0.1 |
| | | Macho | z=0.023 | 607 | 0.88 |
| | Número de pulsos | Casal Fêmea | t = -2.1276 | 27 | 0.04 |
| | | Casal Macho | t = 0.7058 | 25 | 0.48 |
| | | Fêmea | t=0.02 | 19 | 0.98 |
| | | Macho | t=-3.77 | 19 | P<0.05 |
| Frequência Dominante | Casal Fêmea | z=133 | 893 | P<0.05 | |
| | Casal Macho | z=102 | 807 | P<0.05 | |
| | Fêmea | z=24.75 | 527 | P<0.05 | |
| | Macho | z=4.35 | 607 | P<0.05 | |

APÊNDICE II

Exemplo dos programas de estimulação utilizados nos experimentos.

Sonograma acima e oscilograma abaixo do sinal de:

A) FS1 de *E. heros*: O programa de estimulação apresenta 3 min 25 s e é composto por 58 pulsos com média de 0,946 s de duração com intervalo médio de 1.346 s entre eles, frequência dominante de 116 Hz e intensidade em -65 dB.

B) FS-1a de *C. impicticornis*: O programa de estimulação apresenta 2 sequências de trem de pulso, sendo a primeira iniciada com 2min 50 s e composta de 17 pulsos com média de 3.762 s de duração, com intervalo médio de 7.303 s entre eles, frequência dominante 94 Hz e intensidade em -38 dB. O intervalo entre o primeiro e segundo trem de pulso foi de 2min 39.45 s. A segunda sequência de trem de pulso é composta por 17 pulsos com média de 3.59 s de duração, com intervalor médio de 7.47 s.

C) FS-1a de *C. ubica*: O programa de estimulação apresenta 8 min 54 s com 2 sequências de trem de pulso, sendo a primeira iniciada com 1min e composta de 26 pulsos com média de 1.621 s de duração, com intervalo médio de 5.717 s entre eles, frequência dominante 105 Hz e intensidade em -49 dB. O intervalo entre o primeiro e segundo trem de pulso foi de 2 min 07 s. A segunda sequência de trem de pulso é composta por 26 pulsos com média de 1.544 s de duração, com intervalor médio de 5.376 s entre eles.

D) MS1 de *P nigrispinus*: O programa de estimulação apresenta 51 s e possui 12 pulsos com média de 2.577 s de duração, com intervalo médio de 0.813 s entre eles, frequência dominante de 137 Hz e intensidade em -67 dB.

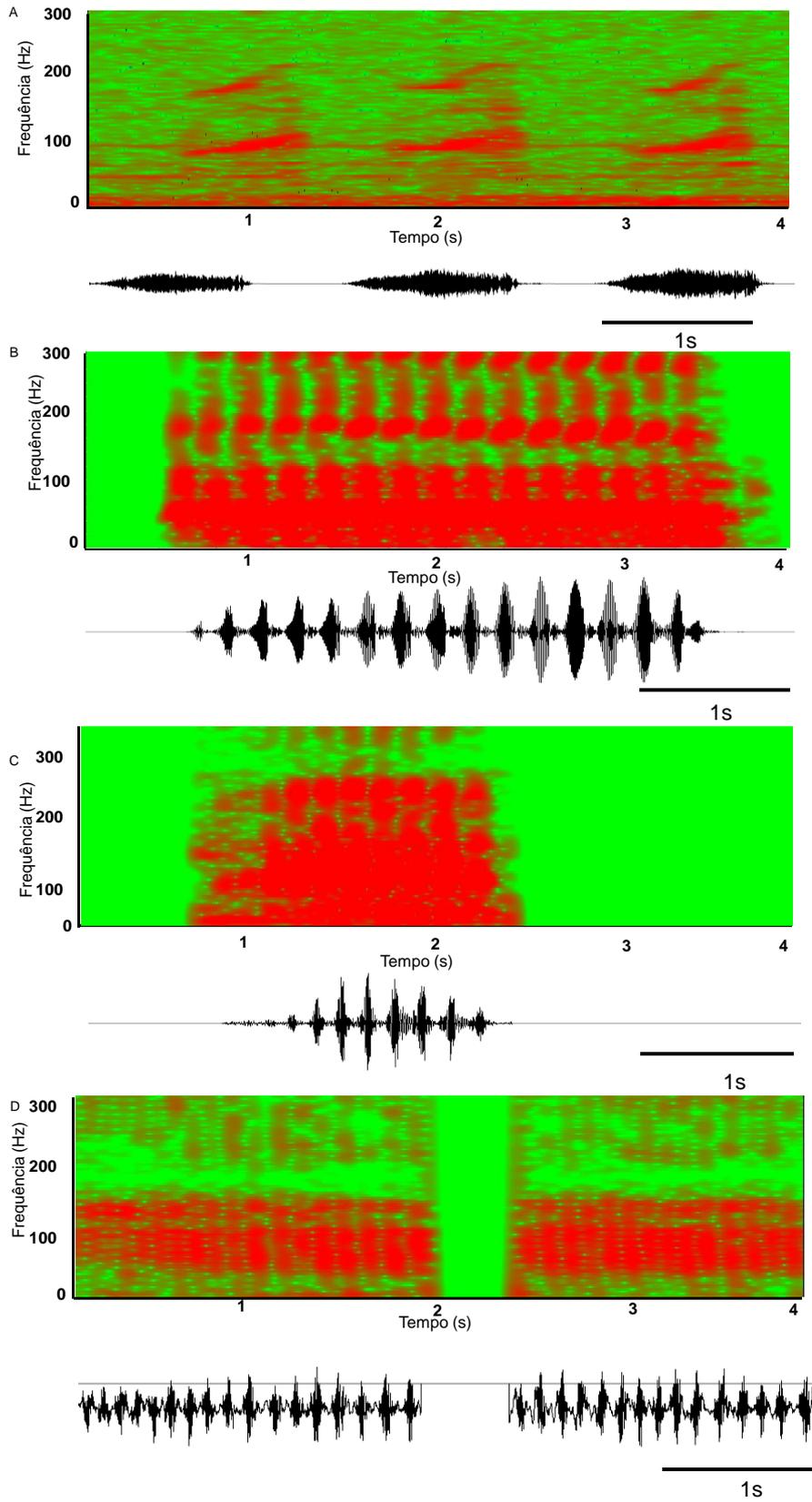


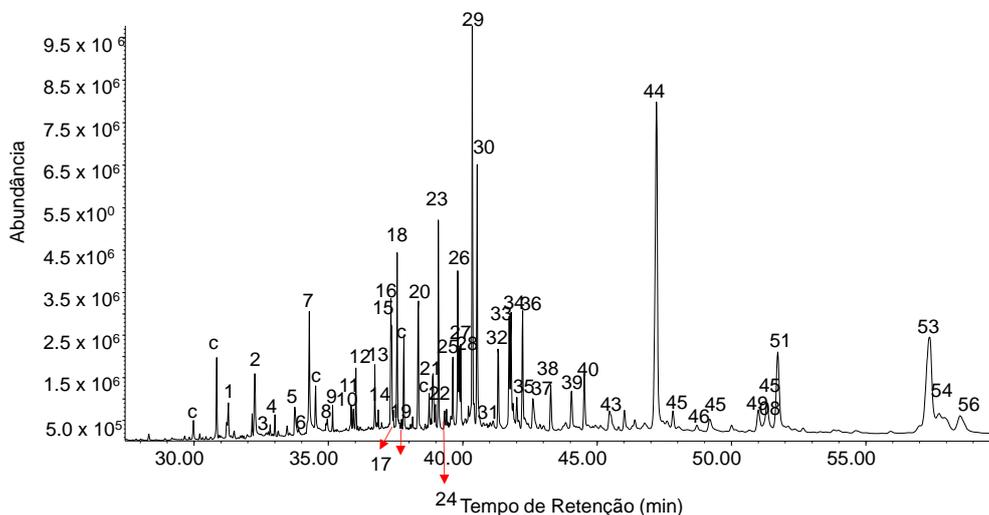
Tabela 2. Resultados das análises estatísticas dos experimentos do Capítulo 2.

| Capítulo II | | | | Valor de teste | GL | Valor de P |
|-------------------------------|-------|----|-------------------|----------------|-----|------------|
| <i>E. heros</i> | Fêmea | Ci | Latência | t=1128 | 104 | 0.262 |
| | | Cu | | t=-0.060 | 104 | 0.952 |
| | | Pn | | t=0.123 | 104 | 0.902 |
| | | Ci | Tempo de Resposta | t=0.272 | 104 | 0.786 |
| | | Cu | | t=1048 | 104 | 0.297 |
| | | Pn | | t=1756 | 104 | 0.082 |
| | | Ci | Número de Pulsos | t=2527 | 104 | 0.0115 |
| | | Cu | | t=-11158 | 104 | < 0.05 |
| | | Pn | | t=-7737 | 104 | <0,05 |
| | Macho | Ci | Latência | t=-0.141 | 111 | 0.888 |
| | | Cu | | t=0.177 | 111 | 0.860 |
| | | Pn | | t=-0.070 | 111 | 0.944 |
| | | Ci | Tempo de Resposta | t=1070 | 111 | 0.2869 |
| | | Cu | | t=0.822 | 111 | 0.4128 |
| | | Pn | | t=1911 | 111 | 0.0586 |
| | | Ci | Número de Pulsos | t=1013 | 111 | 0.311 |
| | | Cu | | t=-0.780 | 111 | 0.436 |
| | | Pn | | t=-5143 | 111 | <0,05 |
| <i>Chinavia Impicticornis</i> | Fêmea | Cu | Latência | t=-0.495 | 46 | 0.623 |
| | | Eh | | t=-0.426 | 46 | 0.672 |
| | | Cu | Tempo de Resposta | t=-3578679 | 46 | 0.0000000 |
| | | Eh | | t=-2468065 | 46 | 0.0000023 |
| | | Cu | Número de Pulsos | t=0.522 | 37 | 0.60479 |
| | | Eh | | t=-0.618 | 37 | 0.54026 |
| | Macho | Cu | Latência | t=-0.972 | 33 | 0.3381 |
| | | Eh | | t=-2255 | 33 | 0.0309 |
| | | Cu | Tempo de Resposta | t=-2654927 | 24 | 0.0000082 |
| | | Eh | | t=-3126177 | 24 | 0.0000016 |
| | | Cu | Número de Pulsos | t=3642 | 24 | 0.000271 |
| | | Eh | | t=2583 | 24 | 0.009791 |

APÊNDICE III

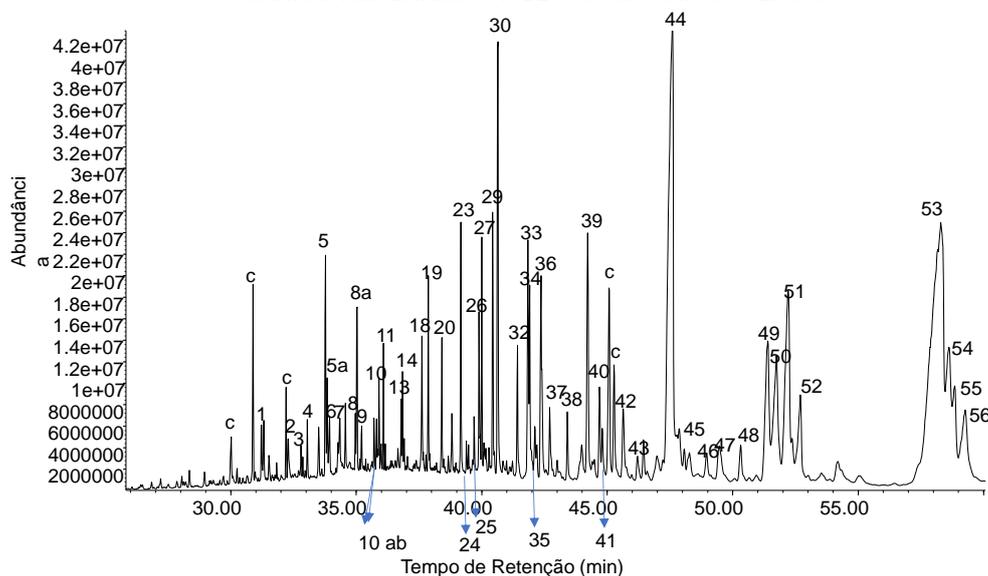
Cromatograma característicos de rastros de fêmeas (cima) e machos (abaixo) de *E. heros* depositados em superfícies de vidro e extraídos com n-hexano. Os números correspondem aos compostos descritos abaixo do cromatograma

CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE RASTROS DE 100 FEMEA *E. heros*



1) Hexadecanol, 2) Ácido Hexadecanóico, 3) Eicosano, 4) Octadecanal, 5) Octadecanol, 6) Heneicosano, 7) Ácido (Z) -9-octadenoíco, 8) Docasano, 9) Eicosanal, 10) Tricoseno, 11) Ácido benzóico, éster tridecílico, 12) Composto aromático desconhecido, 13) Tetracosano, 14) Ácido benzóico, éster tetradecílico, 15) Pentacosadieno, 16) Z9-Pentacoseno, 17) Z7-Pentacosano, 18) Pentacosano 19) Ácido benzóico, éster pentadecílico, 20) Hexacosano, 21) Heptacoseno, 22) Heptacoseno, 23) Heptacosano, 24) 13-metil heptacosano, 25) 2-metil heptacosano, 26) Octacosano, 27) desconhecido, 28) Esqualeno, 29) Nonacosadieno, 30) Nonacosano, 31) Triacontadieno, 32) Triacontano, 33) Hentriacontatriene, 34) Hentriacontatriene, 35) Hentriacontadieno, 36) Hentriacontano, 37) Colesterol, 38) Dotriacontano, 39) Tritriaconteno, 40) Tritriacontano, 43) Tetratriacontano, 44) Pentatriaconteno, co eluído com dimetil tetratriacontano 45) dimetil tetratriacontano 46) Pentatriacontano, 46 a 47 metil pentatriacontano, 48 - 56 hidrocarbonetos de cadeia longa metil ramificada C = contaminante

CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE RASTRO 100 MACHO *E. heros*



1) Hexadecanol, 2) Ácido hexadecanóico, 3) Eicosano, 4) Octadecanal, 5) Octadecanol, 5a) linoleato de metil, 6) Heneicosano, 7) (Z) -9-ácido octadenoíco, 8) Docasano, 8 a) acetato de octadecil, 9) Eicosanal, 10a) Tricoseno, 10b) tricoseno 10) Tricosano, 11) Ácido benzóico, éster tridecílico, 12) Composto aromático desconhecido, 13) Tetracosano, 14) Ácido benzóico, éster tetradecílico, 18) Pentacosano 19) Ácido benzóico, éster pentadecílico, 20) Hexacosano, 23) Heptacosano, 24) 13-metil heptacosano, 25) 2-metil heptacosano, 26) Octacosano, 27) desconhecido, 28) Esqualeno, 29) Nonacosadieno, 30) Nonacosano, 31) Triacontadieno, 32) Triacontano, 33) Hentriacontatrieno, 34) Hentriacontatrieno, 35) Hentriacontadieno, 36) Hentriacontano, 37) Colesterol, 38) Dotriacontano, 39) Tritriaconteno, 40) Triatriacontano, 41) Tritriaconteno 42) Hidrocarboneto de metila, 43) Tetratriacontano, 44) Pentatriaconteno, co eluído com dimetil tetratriacontano, 45) Pentatriacontano, 46 a 47 metil pentatriacontano, 48 - 56 hidrocarbonetos de cadeia longa metil ramificada C = contaminante

Curvas de calibração construídas para quantificação do feromônio sexual extraído com fibras de SPEM em experimentos de indução de emissão do feromônio sexual de *E. heros* com sinais vibratórios. Acima: curva de calibração da solução padrão do 2, 6, 10- trimetiltrcanoato. Solução injetada no CG-FID nas concentrações de 0,025, 0,035, 0,05, 0,25 e 0,35 mg/ml. Abaixo solução absorvida em uma fibra de SPEM nas mesmas concentrações dos compostos injetados no FID. Equação da curva de calibração utilizada na quantificação dos compostos.

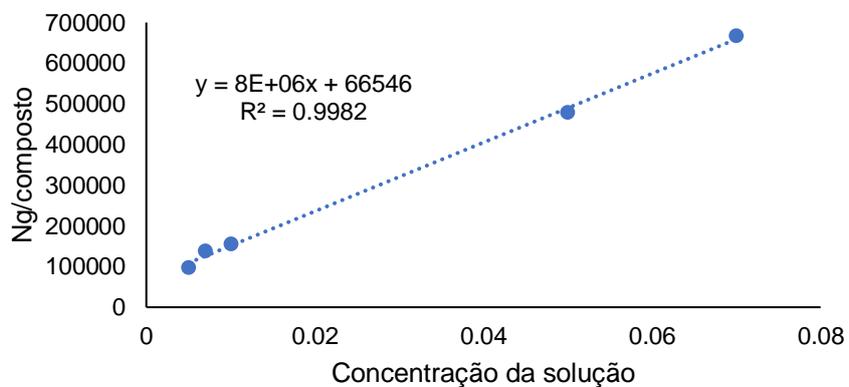
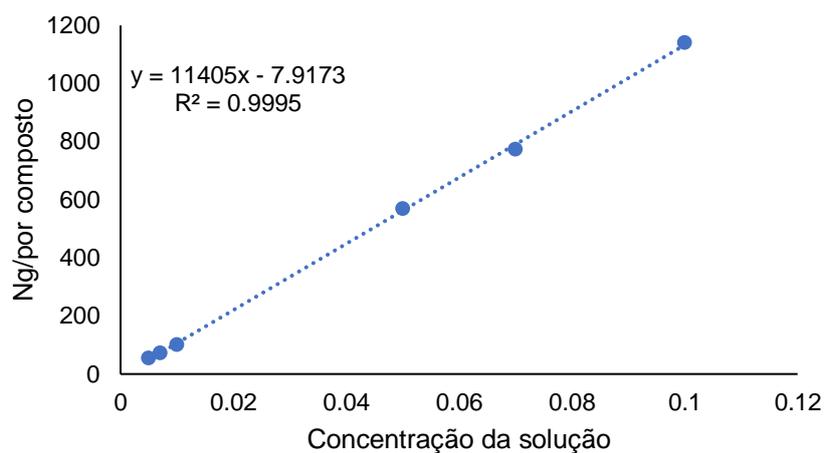


Tabela 3. Resultados das análises estatísticas dos experimentos do Capítulo 3.

| Capítulo III | | | Valor de teste | GL | Valor de P |
|---|------------------------|-------------|----------------|--------|------------|
| Controle X Rastro Fêmea X Rastro Macho | Latência | Fêmea | T=0.17609 | 12 | 0.8632 |
| | | Macho | T=-0.39928 | 12 | 0.6967 |
| | Tempo de Resposta | Fêmea | F=1.417 | 516 | 0.243 |
| | | Macho | F=1.196 | 343 | 0.304 |
| | Duração do Pulso | Fêmea | F=0.431 | 516 | 0.65 |
| | | Macho | F=1.925 | 343 | 0.147 |
| | Intervalo entre Pulsos | Fêmea | F=0,4 | 38 | 0.3 |
| | | Macho | F=0,3 | 38 | 0.2 |
| | Número de pulsos | Fêmea | F=0,2 | 28 | 0.8 |
| | | Macho | F=183 | 28 | 0.2 |
| Frequência Dominante | Fêmea | F=0.274 | 516 | 0.76 | |
| | Macho | F=14.65 | 343 | <0,05 | |
| Planta sem Rastro | Primeira Escolha | Fêmea | $\chi^2=0$ | 1 | 1 |
| | Tempo de Residência | Fêmea | T=0,56 | 19 | 0.57 |
| Planta Rastro de Macho <i>E. heros</i> | Primeira Escolha | Fêmea | $\chi^2=0$ | 1 | 1 |
| | Tempo de Residência | Fêmea | T=0,19 | 19 | 0.84 |
| Planta sem Rastro | Primeira Escolha | Macho | $\chi^2=0,2$ | 1 | 0.4 |
| | Tempo de Residência | Macho | T=0,5 | 19 | 0.6 |
| Hexano X Feromônio para casal <i>E. heros</i> | Tempo de Resposta | Macho | T=-0,42 | 17 | 0.67 |
| | | Casal Fêmea | T=-0.40076 | 29 | 0.6915 |
| | Latência | Casal Macho | T=2.2499 | 29 | 0.03222 |
| | | Fêmea Macho | T=-2.3193 | 20 | 0.03108 |
| | Tempo de Resposta | Casal Macho | T=-0.086106 | 21 | 0.9322 |
| | | Fêmea Macho | T=0.59578 | 29 | 0.5559 |
| | Duração do Pulso | Casal Macho | T=-1.1476 | 29 | 0.2605 |
| | | Fêmea Macho | T=5.9702 | 20 | <0,05 |
| | Intervalo entre Pulsos | Casal Macho | T=-0.58465 | 21 | 0.565 |
| | | Fêmea Macho | F=0.118 | 1990 | 0.731 |
| Número de pulsos | Casal Macho | F=7.201 | 1296 | <0,05 | |
| | Fêmea Macho | F=25.58 | 751 | <0,05 | |
| Intervalo entre Pulsos | Casal Macho | F=0.299 | 806 | 0.584 | |
| | Fêmea Macho | F=4.417 | 1990 | <0,05 | |
| Número de pulsos | Casal Macho | F=3.129 | 1296 | 0.0771 | |
| | Fêmea Macho | F=12.93 | 751 | <0,05 | |
| Número de pulsos | Casal Macho | F=4.388 | 806 | <0,05 | |
| | Fêmea Macho | T=-0.052081 | 29 | 0.9588 | |

Continuação Tabela3

| | | | | |
|---|-------|------------|------|---------|
| | Casal | | | |
| | Macho | T=-0.55956 | 29 | 0.5801 |
| | Fêmea | T=1.3351 | 20 | 0.1968 |
| | Macho | T=-2.1138 | 21 | 0.04667 |
| Frequência Dominante | Casal | | | |
| | Fêmea | F=20.66 | 1990 | <0.05 |
| | Casal | | | |
| | Macho | F=158.7 | 1296 | <0.05 |
| | Fêmea | F=133.4 | 751 | <0,05 |
| | Macho | F=45.35 | 806 | <0.05 |
| Número de <i>Buzz</i> | Casal | | | |
| | Fêmea | T=-0,5 | 5 | 0.62 |
| | Casal | | | |
| | Macho | T=-2,5 | 6 | 0.03 |
| | Fêmea | T=-3.1519 | 10 | 0.0103 |
| | Macho | T=-1.5026 | 6 | 0.1836 |
| Sexo que iniciou a emitir sinais vibracionais | Fêmea | Z=0,33 | 58 | 0.01 |
| | Macho | Z=2,33 | 58 | 0.01 |

APÊNDECE IV

Exemplo dos programas de estimulação utilizados nos experimentos

Sonograma (acima) e oscilograma (abaixo) de uma sequencia de pulsos do programa de estimulação simulando de:

A) simulando vento de intensidade média (1,32 m/s); Vibrações geradas por uma corrente de ar

B) Gotas caindo em folhas de feijão. O programa de estimulação apresenta 9 min 40 s. Distância entre picos grandes é de 2.511 s. O programa de estimulação apresenta 7 min 20 s composto por vibrações contínuas com frequência dominante de 51 Hz e intensidade em -67 dB.

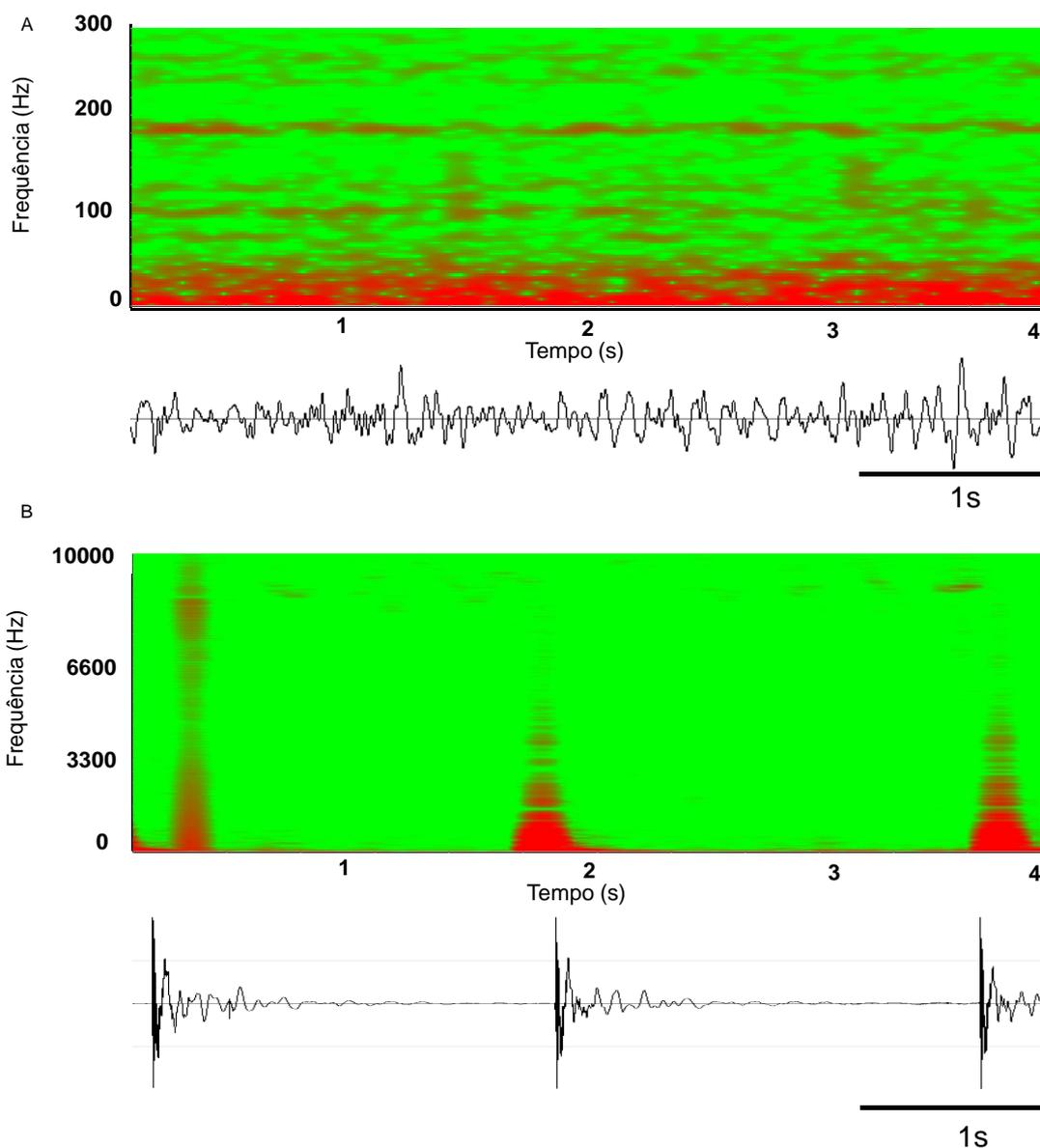


Tabela 4 Resultados das análises estatísticas dos experimentos.

| Capítulo IV | | | Valor de teste | GL | Valor de P | | |
|----------------------|---------------------|---------------------------|----------------|-------------------|------------|----|------|
| Controle X Vento | Fêmeas | Latência | -0.649 | 71 | 0.51 | | |
| | | Tempo de Resposta | 2,147 | 71 | <0,05 | | |
| | | Número de Pulsos | -9,203 | 71 | <0,05 | | |
| | | Duração do Pulso | 0.755 | 71 | 0.45 | | |
| | | Tempo de Repetição | 1,955 | 71 | 0.05 | | |
| | | Frequência Dominante | 3,252 | 71 | <0,05 | | |
| | Machos | Latência | -2,065 | 74 | <0,05 | | |
| | | Tempo de Residência | 2,696 | 74 | <0,05 | | |
| | | Número de Pulsos | 7,392 | 74 | <0,05 | | |
| | | Duração do Pulso | -1,953 | 74 | 0.05 | | |
| | | Tempo de Repetição | 1,560 | 74 | 0.11 | | |
| | | Frequência Dominante | 1,927 | 74 | 0.05 | | |
| | | Controle X Túnel de Vento | Fêmeas | Latência | -0.023 | 71 | 0.98 |
| | | | | Tempo de Resposta | 0.159 | 71 | 0.87 |
| | | | | Número de Pulsos | -1,513 | 71 | 0.13 |
| Duração do Pulso | -0.905 | | | 71 | 0.36 | | |
| Tempo de Repetição | -1,904 | | | 71 | 0.05 | | |
| Frequência Dominante | -0.001 | | | 71 | 0.99 | | |
| Machos | Latência | | -4,111 | 74 | <0,05 | | |
| | Tempo de Residência | | 2,053 | 74 | <0,05 | | |
| | Número de Pulsos | | -2,844 | 74 | <0,05 | | |
| Controle X Chuva | Fêmeas | Duração do Pulso | -1,847 | 74 | 0.06 | | |
| | | Tempo de Repetição | -2,176 | 74 | <0,05 | | |
| | | Frequência Dominante | 0.921 | 74 | 0.35 | | |
| | | Latência | -1,026 | 71 | 0.30 | | |
| | | Tempo de Resposta | 2,420 | 71 | <0,05 | | |
| | | Número de Pulsos | -10,099 | 71 | <0,05 | | |
| | Machos | Duração do Pulso | -0.478 | 71 | 0.63 | | |
| | | Tempo de Repetição | 0.053 | 71 | 0.95 | | |
| | | Frequência Dominante | 1,636 | 71 | 0.10 | | |
| | | Latência | -3,216 | 74 | <0,05 | | |
| | | Tempo de Residência | 2,978 | 74 | <0,05 | | |
| | | Número de Pulsos | -10,525 | 74 | <0,05 | | |
| | | Duração do Pulso | -2,671 | 74 | <0,05 | | |
| | | Tempo de Repetição | 1,030 | 74 | 0.30 | | |
| | | Frequência Dominante | -0.263 | 74 | 0.79 | | |

“E tudo quanto fizerdes, fazei-o de todo o coração, como ao Senhor,
e não aos homens...”

Colossenses 3:23