

Comportamento de larvas de *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) em resposta ao CO₂ e a plântulas de espécies cultivadas

Behavioral responses of *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) larvae to CO₂ and seedlings of host plants

Tânia Pereira¹ Maurício Ursi Ventura² Francisco Assis Marques³

RESUMO

As respostas de larvas de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) ao CO₂ e o comportamento destas larvas quando expostas a plantas hospedeiras e não hospedeiras foram estudadas em laboratório. Larvas de primeiro ínstar de *D. speciosa* foram utilizadas. Num primeiro bioensaio, as larvas preferiram o tratamento com CO₂, que foi gerado a partir da reação de bicarbonato de potássio com ácido acético em oposição a água destilada. Quando se observou o comportamento das larvas em relação a plantas hospedeiras, verificou-se que ocorreu um número significativamente maior de “mudanças de direção” em milho e milho pipoca do que em feijão, soja, trigo e sorgo. Este parâmetro foi inferior no sorgo em relação a todos os outros tratamentos. Valores similares foram verificados em milho pipoca e milho (26,2 e 24,2, respectivamente). Em relação a distância percorrida, foram verificadas maiores distâncias na aveia em comparação com milho pipoca, milho, feijão e sorgo. Após o contato das larvas com sorgo, elas não apresentaram comportamento de busca, pois a larva caía da plântula ou não se movia.

Palavras-chave: plantas hospedeiras, semioquímicos, atraentes, caïromônios.

ABSTRACT

Responses of *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) larvae to CO₂ and their behavior when exposed to host and non host plants were studied in the laboratory. First instar larvae of *D. speciosa* were used. In a first bioassay, larvae preferred the treatment with CO₂, from the reaction of the potassium bicarbonate and acetic acid, in opposition to distilled water. When the behavior of the larvae

was observed in response to host plants, a significant higher number of turns was found in corn and popcorn than in common beans, soybean, wheat and sorghum. Sorghum differed from all other treatments with a lower number of turns. Similar values were found in popcorn and corn. The greater distances ranged were found on oats in comparison to pop corn, corn, common beans and sorghum. After contact with sorghum seedlings larvae did not present searching behavior because they fell from the seedling or no movements were saw seen.

Key words: insecta, host plants, semiochemicals, attractants, kairomones.

INTRODUÇÃO

Diabrotica speciosa (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae), vulgarmente conhecida como “vaquinha” ou “patriota”, ocorre praticamente em todos os estados brasileiros, e em alguns países da América do Sul (KRYSAN, 1986). A larva de *D. speciosa* é importante praga do milho (*Zea mays* L.), batata (*Solanum tuberosum* L.) e trigo (*Triticum aestivum* L.). Consome o sistema radicular das plantas, diminuindo seu peso e, como consequência, o peso da parte aérea, a altura das plantas e a produção (MARQUES et al., 1999). Uma série de plantas hospedeiras foi listada por SILVA et al. (1968) num total de 80 citações bibliográficas. Para controle das larvas, aplica-se inseticida líquido ou granulado no sulco de plantio ou na amontoa (batata). Esta modalidade demanda quantidades relativamente

¹Curso de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, PR, Brasil.

²Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, CP 6001, 86051-970, Londrina, PR, Brasil. E-mail: mventura@uel.br. Autor para correspondência.

³Laboratório de Ecologia Química e Síntese Orgânica, Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, CP 19.081, 81531-990, Curitiba, PR, Brasil.

grandes de ingrediente ativo por área, o que eleva os custos e pode causar contaminação dos lençóis freáticos principalmente em solos arenosos.

Estudos relataram que as larvas de *D. virgifera virgifera* Le Conte podem se deslocar até 1 m no solo para encontrar raízes de um hospedeiro adequado (SHORT & LUEDTKE, 1970). Larvas de *Diabrotica* spp. alimentam-se preferencialmente do sistema radicular de milho nos quais apresentam desenvolvimento superior a outros hospedeiros (KRYSAN, 1986). O dióxido de carbono (CO₂) é importante para as larvas de *D. virgifera virgifera* localizarem a raiz da planta por quimiorientação (STRNAD et al., 1986; BERNKLAU & BJOSTAD, 1998a, 1998b; STRNAD & DUNN, 1990), visto que, respirando, a raiz do milho libera CO₂, formando um gradiente no solo com os gases difundidos pelas raízes (HARRIS & VAN BAVEL, 1957). A formação de um gradiente é característica para o ambiente do solo. Na parte aérea, os insetos não seguem um gradiente porque a turbulência impede a sua formação (BERNAYS & CHAPMAN, 1994).

O contato do inseto com a planta possibilita sua percepção pelos palpos maxilares. O comportamento das larvas em resposta ao contato com raízes de plantas hospedeiras, ou não, permite caracterizar a seleção hospedeira numa segunda fase (gustativa), enquanto na primeira, é aparentemente exclusivamente olfativa, guiada pelo CO₂ (BRANSON et al., 1969).

Apesar da importância das larvas de *D. speciosa*, como praga, não se dispõe de estudos envolvendo aspectos do comportamento desta fase do inseto. Desta forma, estudaram-se as respostas de larvas de *D. speciosa* ao CO₂ (obtido pela reação do bicarbonato de potássio e ácido acético) e os comportamentos de larvas de *D. speciosa* após o contato com plântulas de espécies de plantas cultivadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Entomologia da Universidade Estadual de Londrina (Latitude 23° 19'S, Longitude 51° 12'W), em sala climatizada sob luz fluorescente (25 ± 2°C, UR 60 ± 10%, fotoperíodo de L14:E10 h). Adultos de *D. speciosa* foram coletados no campo em plantas de couve, com rede entomológica, mantidos em gaiolas, em laboratório, tendo água e pedaços de cenoura, como alimento, disponíveis durante toda a criação. Os ovos foram coletados em gaze preta, tratados com sulfato de cobre 1%, e mantidos em papel filtro

umedecido até a eclosão das larvas. Nos bioensaios, foram utilizadas larvas de primeiro ínstar por ser essencial nesta fase que a larva encontre o alimento (larva de primeiro ínstar morre se não se alimentar) (BERNKLAU & BJOSTAD, 1998a).

Para avaliar a atratividade do CO₂, construiu-se um recipiente que consistia de uma arena com dois dispensadores para os compostos voláteis. A arena foi composta de uma placa de Petri de plástico (6cm de diâmetro) e dois tubos de ensaio (2cm de diâmetro). Dois orifícios, separados por 3cm de distância, foram feitos na placa de Petri para encaixe da abertura do tubo de ensaio.

O CO₂ foi produzido pela reação de bicarbonato de potássio com ácido acético (3mL de água, 0,200g de bicarbonato de potássio e 0,30mL de ácido acético) e testado em oposição à água destilada. Após a colocação dos tratamentos nos tubos de ensaio, 10 larvas foram liberadas na arena previamente forrada com papel filtro umedecido com água destilada, que era trocado após cada teste. As larvas eram observadas por 30 minutos, após os quais, registrou-se o número de larvas em cada tratamento e na placa. Após cada inseto testado, o recipiente era lavado, limpo com álcool e seco em estufa. Os tratamentos eram então aplicados, havendo alternância de posições. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com dez repetições, realizando-se o teste de Friedman para comparação das médias, ao nível de 5% de probabilidade (CONOVER, 1980).

Para estudar o comportamento de busca de larvas de *D. speciosa* após contato com as plântulas, adaptou-se a metodologia de STRNAD & DUNN (1990). As sementes germinaram em papel filtro em câmara climatizada (25 ± 2°C, UR 60 ± 10%, fotoperíodo de L14:E10 h). Utilizaram-se plântulas com 4-5 dias, após a germinação, de feijão (Iapar 59), sorgo forrageiro (AG-2002), milho (híbrido 30 F 80), milho pipoca (RS 20), soja (BRS 132), aveia (UPF-7) e trigo (OR-1).

As larvas ficaram cinco minutos em contato com as plântulas, as quais foram, a seguir, transferidas para placas de Petri de vidro (9mm de diâmetro), forradas com papel filtro umedecido com água destilada e observadas por cinco minutos. O trajeto das larvas foi desenhado na tampa da placa de Petri. Quantificaram-se as "mudanças de direção" (larva saía de um eixo imaginário representado pelo trajeto que efetuava em linha reta) e a distância percorrida pelas larvas. A distância que a larva percorreu foi medida com um curvímeter (ASI SWISS MADF, 122/15-30, Switzerland), com escala de 1:1. Foram utilizadas dez

larvas por tratamento que foi repetido 10 vezes. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os dados obtidos submetidos à análise de variância e teste de Tukey ao nível de 5% para comparação das médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando se comparou a preferência entre o CO₂ (produzido pela reação do bicarbonato de potássio e ácido) e a água, verificou-se atração das larvas de primeiro instar de *D. speciosa* pelo CO₂ (Tabela 1).

O dióxido de carbono é relatado como um atraente de larvas de *Diabrotica* spp. e muitos outros insetos de importância na agricultura e na medicina (KELLOGG, 1970; MEEKING et al. 1974; WARNES & FINLAYSON, 1986; STEULLET & GUERIN, 1992; PERRI et al. 1993; RASCH & REMBOLD, 1994; JEWETT & BJOSTAD, 1996). BERNKLAU & BJOSTAD (1998b) propuseram utilizar este semioquímico para atrair organismos do solo, principalmente insetos, ácaros e nematóides, para longe das raízes das plantas hospedeiras ou para confundi-los para que não localizem a planta hospedeira. Uma das opções seria a água carbonatada que, utilizada na irrigação, melhora o estado fitossanitário e produção de certas culturas (MAUNEY & HENDRIX, 1998; STOFFELLA, 1985). ROBINSON (1995) estudou a viabilidade de utilizar agentes de controle biológico, juntamente com CO₂ como estratégia no manejo de nematóides. O autor verificou a atratividade para *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) e *Rotylenchulus reniformis* Linford and Oliveira para os quais, as concentrações ótimas são aquelas produzidas pela respiração aeróbica de *Saccharomyces cerevisiae*. BERNKLAY & BJOSTAD

(1998b) propuseram também a utilização de grânulos de bicarbonato de potássio formulado com um ácido e inseticida, espalhados ou incorporados ao solo para confundir os organismos na seleção da planta. Verifica-se, portanto, a possibilidade do desenvolvimento de novos estudos visando aproveitar o potencial de atração do CO₂ no manejo de *D. speciosa* e eventualmente de outras pragas agrícolas.

Com relação ao estudo envolvendo plântulas hospedeiras e não hospedeiras, um número significativamente maior de “mudanças de direção” de larvas de primeiro instar de *D. speciosa* foi observado em milho pipoca do que em feijão, soja, trigo e sorgo (Tabela 2). Valores similares foram verificados em milho pipoca, milho e aveia. Menor número de “mudanças de direção” foi verificado em sorgo em relação a todos os demais tratamentos.

Foram verificadas maiores distâncias percorridas em aveia em comparação com milho pipoca, milho, feijão e sorgo (Tabela 2). As menores distâncias percorridas pelas larvas de *D. speciosa* foram verificados em sorgo, milho pipoca e milho.

De maneira geral, em milho e milho pipoca, maior número de “mudanças de direção” e menores distâncias percorridas foram observadas. Estes trajetos são característicos de respostas adequadas ao hospedeiro, concordando com os dados obtidos por STRNAD & DUNN (1990). Esse padrão de comportamento, produzido por estímulos alimentares corresponde ao conceito de “busca local” (BELL, 1985). Se o estímulo da planta for adequado, a larva procura pelo alimento que o desencadeou, neste caso, a planta hospedeira adequada, o que caracteriza aumento no número de “mudanças de direção”. O inseto também caminha menos, porque já esteve em contato com o

Tabela 1 - Número médio de larvas de primeiro instar de *D. speciosa* ± EP, que se dirigiam para cada um dos tratamentos em bioensaio e que ficaram na placa (não responderam) (Temperatura 25° C ± 2°, 60% UR e fotofase de 14 h), em laboratório, durante 30 minutos de observação.

Tratamentos	Larvas ¹
CO ₂ ²	6,8 ± 2,3 a
Água	0,0 ± 0,0 c
Placa ³	3,2 ± 1,7 b

¹Médias não seguidas pela mesma letra diferem significativamente entre si pelo teste de Friedman a 5% de probabilidade de erro.

² Produzido pela reação de bicarbonato de potássio e ácido acético.

³ Não responderam.

Tabela 2 - Número médio ± EP de mudanças de direção e distância percorrida ± EP por larvas de primeiro instar de *D. speciosa* (Fotofase: 14 h, 60% UR e temperatura 25 ± 2°C) em laboratório, quando previamente submetida a contato com plântulas de espécies cultivadas.

Tratamento	Mudanças de direção ¹	Distância percorrida (cm) ¹
Pipoca	26,20 ± 3,19 a	7,05 ± 1,45 bc
Milho	24,20 ± 2,54 ab	5,70 ± 0,92 bc
Aveia	18,50 ± 1,74 ab	12,60 ± 1,46 a
Feijão	16,30 ± 2,40 b	8,00 ± 1,29 bc
Soja	15,00 ± 1,94 b	9,30 ± 1,20 abc
Trigo	14,70 ± 1,59 b	10,00 ± 1,09 ab
Sorgo	4,90 ± 2,10 c	2,50 ± 0,96 c

¹Médias não seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

estímulo. Imediatamente, depois do contato com a raiz de milho pipoca ou milho, a larva “pesquisa” uma pequena área e se move vagarosamente (possível hospedeiro). O oposto ocorre com o não hospedeiro, ou seja, a larva percorre áreas maiores e mais rapidamente. Em estudo comparativo do desenvolvimento de *D. speciosa* em diferentes hospedeiros, o milho e batata foram superiores ao feijão e a soja (AVILA & PARRA, 2002). Em levantamentos de campo, VENTURA & GOMES (2004) verificaram maiores populações de larvas em milho, seguido pelo trigo e baixas populações em aveia, o que caracteriza este último como hospedeiro não preferencial.

Verificou-se com larvas de *D. virgifera virgifera* LeConte, previamente expostas a plântulas de milho e trigo, menor área de “pesquisa” do que quando expostas à soja, *Setaria faberi* Herm. e aveia (STRNAD & DUNN, 1990). Em relação ao número de mudanças de direção, em trigo e milho também foram observados maiores valores do que nos demais. Aparentemente, *D. speciosa* não apresentou o mesmo grau de associação com o trigo. Diferenças entre o grau de associação com plantas hospedeiras são reportadas no gênero *Diabrotica* Chevrolat, que se subdivide em dois grupos taxonômicos: *D. speciosa* pertence ao grupo *fucata*. Este grupo é multivoltino e as larvas são polífagas (KRYSAN, 1986). Já o grupo *virgifera*, que inclui *D. virgifera virgifera*, é univoltino e o espectro de plantas hospedeiras é restrito a algumas gramíneas (BRANSON & KRYSAN, 1981).

Quando as larvas estiveram em contato com o sorgo, a maioria não apresentou o comportamento de busca, pois a larva caía da plântula ou não se movia depois do contato, provavelmente caracterizando efeito tóxico da planta sobre a larva. Este efeito também foi relatado por STRNAD & DUNN (1990).

Para larvas expostas a raízes de feijão, soja e trigo observou-se menor número de “mudanças de direção” e, de maneira geral, com maior distância. Segundo STRNAD & DUNN (1990), instantaneamente, a larva mantém a busca respondendo aos estímulos. Caso não seja estimulada positivamente continua a busca e o comportamento de resposta ao volátil ocorre novamente. A busca pelo alimento pode continuar se este não for nutritivo (BELL, 1957). Além da qualidade, a localização do alimento depende parcialmente da intensidade dos estímulos (NAKAMUTA, 1985).

CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos neste trabalho verificou-se que larvas de primeiro ínstar de *D.*

speciosa são atraídas pelo CO₂, que na natureza é produzido pelas raízes do milho.

Em contato com as plântulas hospedeiras e não hospedeiras, as larvas respondem de forma distinta aos estímulos de diferentes espécies, aumentando o número de “mudanças de direção” em relação ao seu trajeto e diminuindo a distância total percorrida na busca do hospedeiro quando em contato com hospedeiros adequados.

REFERÊNCIAS

- AVILA, C.J.; J.R.P. PARRA. Desenvolvimento de *Diabrotica speciosa* (germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) em diferentes hospedeiros. *Cienc Rural*, Santa Maria, v.32, n.5, p.739-743, 2002.
- BELL, W.J. On the Biology and eggs-laying habits of the western corn rootworm. *J Econ Entomol*, Lanham, v.50, n.1, p.126-128, 1957.
- BRANSON T.F.; KRYSAN J.L. Feeding and oviposition behavior and life cycle strategies of *Diabrotica*: an evolutionary view with implications for pest management. *Environ Entomol*, Lanham, v.10, n.6, p.826-831, 1981.
- BRANSON, T.F. et al. Toxicity of sorghum roots to larvae of western corn rootworm. *J Econ Entomol*, Lanham, v.62, n.1, p.1375-1378, 1969.
- BERNKLAU E.J.; BJOSTAD L.B. Reinvestigation of host location by western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae): CO₂ is the only volatile attractant. *J Econ Entomol*, Lanham, v.91, n.6, p.1331-1340, 1998a.
- BERNKLAU, E.J.; BJOSTAD, L.B. Behavioral responses of first-instar western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae): to carbon dioxide in a glass bead bioassay. *J Econ Entomol*, Lanham, v.91, n.2, p.445-456, 1998b.
- BERNAYS E.A.; CHAPMAN R.F. *Host-Plant selection by phytophagous insects*. New York: Chapman & Hall, 1994. 310p.
- CONOVER, W.J. *Practical nonparametric statistics*. 2.ed. New York: Wiley, 1980. 493p.
- HARRIS, D.G.; VAN BAVEL, C.H.M. Root respiration of tobacco, corn and cotton plants. *Agron Journal*, Madison, v. 49, n.1, p.182-184, 1957.
- JEWETT, D.K.; BJOSTAD, L.B. Dichloromethane attracts diabroticite larvae in a laboratory behavioral bioassay. *J Chem Ecol*, New York, v.22, n.7, p.1331-1334, 1996.
- KRYSAN, J.L. Introduction: biology, distribution and identification of pest *Diabrotica*. In: KRYSAN, J.L.; MILLER, T.A. *Methods for study of pest Diabrotica*. New York: Springer Verlag, 1986. p.1-23
- KELLOGG, F.E. Water vapor and carbon dioxide receptors in *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol*, Oxford, v.16, n. 2, p.99-108, 1970.
- MARQUES, G.B.C. et al. Danos causados por larvas de *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) em milho.

Pesq Agropec Bras, Brasília, v.34, p.1983-1986, 1999.

MAUNEY, J.R.; HENDRIX, D.L. Responses of glasshouse grown cotton to irrigation with carbon dioxide saturated water. **Crop Science**, Madison, v.18, n.4, p.835-838, 1998.

MEEKING, J.M. et al. Perception of carbon dioxide by larvae of *Orthosoma brunneum* (Coleoptera: Cerambycidae) as indicated by recordings from the ventral cord. **Canadian Entomol**, Victoria, v.106, n.3 p.257-262, 1974.

NAKAMUTA K. Mechanism of the swichover from extensive to area-concentrad search behavior of the ladybird beetle, *Coccinella septempunctata bruckii*. **J Insect Physiol**, Columbus, v.31, n.11, p.849-856, 1985.

PERRII, D.W. et al. Computer controlled olfactometer system for studying behavioral responses of ticks to carbon dioxide. **J Medical Entomol**, Lanham, v.30, n.7, p.571-578, 1993.

PROT, J.C. Migration of plant-parasitic nematodes towards plants roots. **Review of Nematology**, v.3, n.1, p.305-318, 1980.

RASCH, C.; REMBOLD, H. Carbon dioxide-highly attractive signal for larvae of *Helicoverpa armigera*. **Naturwissenschaften**, v.81, n.5, p.228-229, 1994.

ROBINSON, A.F. Optimal release rates for attracting *Meloidogyne incognita*, *Rotylenchulus reniformis* and other nematodes to carbon dioxide in sand. **J Nematol**, v.27, n.1, p.42-50, 1995.

SHORT, D.E.; LUEDTKE, R.J. Larval migration of the western corn rootworms. **J Econ Entomol**, Lanham, v.63, n.3, p.325-326, 1970.

SILVA, A.G.A. et al. **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil. Seus parasitos e predadores**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1968. 622p.

STEULLET, P.; GUERIN, P.M. Perception of breath components by the tropical bont tick. *Amblyomma variegatum* Fabricius (Ixodidae) I.CO₂ inhibited receptors. **J Comp Physiol**, New York, v.170, n.6, p.665-676, 1992.

STOFFELLA, P.J. et al. Citrus rootstock and carbon-dioxide enriched irrigation influence on seedling emergence, growth and nutrient content. **J Plant Nutrit**, New York, v.18, n.12, p.1439-1448, 1985.

STRNAD, S.P. et al. First-instar western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) response to carbon dioxide. **Environ Entomol**, Lanham, v.15, n.4, p.839-842, 1986.

STRNAD, S.P.; DUNN, P.E. Host search behaviour of neonate western rootworm (*Diabrotica Virgifera Virgifera*). **J Insect Physiol**, Columbus, v.36, n.3, p.201-205, 1990.

VENTURA, M.U.; GOMES, M.R. Population study of *Diabrotica speciosa* (Ger.) (Coleoptera: Chrysomelidae) in fall / winter season. **Ciênc Rural**, Santa Maria, v.34, n.6, p.1939-1943, 2004.

WARNES, M.L.; FINLAYSON, L.H. Electroantennogram responses of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, to carbon dioxide and other odors. **Physiol Entomol**, Oxford, v.11, n.4, p.469-479, 1986.