

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

ESTUDO DA REPRODUÇÃO EM *Grapholita molesta* (BUSCK) (LEPIDOPTERA:
TORTRICIDAE) COM ÊNFASE NA MORFOLOGIA DOS ÓRGÃOS INTERNOS E NO
COMPORTAMENTO

Rosana Matos de Moraes
Bióloga (UFSM)
MSc. Biologia Animal (UFRGS)

Tese apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Doutor em Fitotecnia
Área de Concentração Fitossanidade

Porto Alegre (RS), Brasil
Agosto, 2009

(Página de homologação e ficha cartográfica: a serem inseridos)

Aos meus queridos Pais...

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Dra. Luiza Redaelli, pela carinhosa acolhida, confiança, amizade e preciosos ensinamentos, que guardarei para sempre, e Dr. Josué Sant’Ana pelo companheirismo, terna amizade e estímulo ao estudo comportamental dos insetos.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Aos pesquisadores e funcionários da Embrapa Uva e Vinho, pelo auxílio no estabelecimento da criação.

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da UFRGS.

A todos da equipe BIOECOLAB, que me presentearam com coleguismo, auxílio constante, divertidíssimos *happy hours* e conversas no cafezinho, e inesquecíveis momentos de alegria durante todos estes anos...

Aos grafoliteiros: Camila Leão, Luidi Antunes, Patrícia Pires e Rafael Lorscheiter, pela participação indispensável na execução deste trabalho.

Aos meus irmãos de “ninhada”, Caio Efrom e Ricardo Bisotto, pela parceria, afeto e assistência, que me ofereceram durante nossa trajetória de pós-graduandos.

As queridas Aline Nondillo e Deisi Altafini, pelo carinho, bom humor contagiante e prontidão em ajudar-me sempre, seja com atitudes ou palavras de conforto.

A professora Simone, pelo socorro estatístico.

A eterna Co, Aline Barcellos, por todo o estímulo, carinho e preocupação.

A valiosa amizade destas meninas: Carol Scherer, Carol Sokolowicz, Dai Bulsing, Laura da Luz, Lu Ayres e Taci Gattelli, que me proporciona alegria e conforto.

A minha amiga Perla Dornelles, pelo seu apoio imprescindível e doce companhia, seja para resolver problemas e oferecer o ombro ou tomar um chopinho.

Aos meus dindos Terezinha e Oscar pelo carinho constante.

Ao meu irmão Roberto e cunhada Karina, por serem anjos em minha vida.

Aos meus adoráveis pais, Dona Rosa e Seu Geroncio, por todo amor, incentivo e confiança que sempre dedicaram a esta filha.

ESTUDO DA REPRODUÇÃO EM *Grapholita molesta* (BUSCK) (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) – COM ÊNFASE NA MORFOLOGIA DOS ÓRGÃOS INTERNOS E NO COMPORTAMENTO¹

Autor: Rosana Matos de Moraes
Orientadora: Dra. Luiza Rodrigues Redaelli
Co-orientador: Dr. Josué Sant'Ana

RESUMO

Grapholita molesta é um tortricídeo de origem asiática, que tem como principais hospedeiros, espécies de rosáceas. Neste estudo foram avaliadas as alterações morfológicas nos órgãos reprodutivos de machos e fêmeas de *G. molesta* de um e oito dias de idade, virgens e acasalados. As implicações da idade, do número de acasalamentos e do comportamento poligâmico na performance reprodutiva de *G. molesta* também foram estudadas. No sistema reprodutivo das fêmeas a bolsa copuladora, ovidutos, receptáculo seminal e ovários foram as estruturas que sofreram significativas modificações em função da idade e/ou status de cópula. Nos machos, tais fatores levaram a alterações nos testículos, vasos deferentes, vesícula seminal, glândula dos dutos e dutos ejaculatórios. O comportamento poliândrico não elevou as médias de fecundidade, fertilidade e longevidade das fêmeas, assim como o poligínico foi desvantajoso ao macho, apenas por este não conseguir copular com todas as fêmeas oferecidas. Os machos mantiveram o mesmo sucesso reprodutivo após quatro cópulas consecutivas, apesar de na primeira transferirem um espermátóforo maior. Fêmeas copuladas por machos já acasalados foram mais receptivas em novos pareamentos, do que as fertilizadas por machos virgens, sem alterar a duração do período refratário. A fecundidade, fertilidade e longevidade das fêmeas não se alteraram quando estas copularam uma ou várias vezes ao longo da vida. O avanço da idade do casal foi um fator que contribuiu para a queda nas taxas das variáveis reprodutivas avaliadas. Os resultados apontam que a capacidade de reprodução de *G. molesta* alterou-se minimamente diante dos fatores analisados, ressaltando assim, o elevado potencial biótico da espécie.

¹Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (76p.) Agosto de 2009.

**STUDY OF THE REPRODUCTION OF IN *Grapholita molesta* (BUSCK)
(LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) – WITH EMPHASIS IN THE MORPHOLOGY
OF INTERNAL ORGANS AND BEHAVIOR¹**

Author: Rosana Matos de Morais
Advisor: Dra. Luiza Rodrigues Redaelli
Co-advisor: Dr. Josué Sant'Ana

ABSTRACT

Grapholita molesta is an Asian tortricidean that has rosacean species as one of its main hosts. In the present study morphological modifications in reproductive organs of males and females of *G. molesta* were evaluated in individuals of one and eight days of age, virgin and non-virgin. The implications of age, number of copulas, and polygamic behavior in the reproductive performance of *G. molesta* were also studied. In the reproductive system of the females the copulatory pouch, oviducts, sperm receptacle, and ovaries presented significant modifications according to the age and/or copula status. While in males, these factors led to alterations of the testicles, deferent ducts, seminal vesicles, ejaculatory ducts and its glands. The polyandric behavior did not increased mean fecundity, fertility, and longevity of the females, and the polygamic behavior presented disadvantages for the males, since they could not copulate with all available females. Males kept the same reproductive success after four consecutive copulas, but in the first they transferred a larger spermatophore. Females copulated by males that have had a copula before were more receptive when paired with other males, in comparison with females fertilized by virgin males. No alteration in length of the refractory period was observed. Fecundity, fertility, and longevity of the females were not altered when they copulated one or several times during the life cycle. The rates of the reproductive variables evaluated decreased with an increase in the age of the couple. The results demonstrate that the reproductive capacity in *G. molesta* presented minimum alteration in relation to the factors analyzed here, highlighting the elevated biotic potential of the species.

¹ Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (76p.), August, 2009.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Distribuição, importância econômica, monitoramento e controle de <i>G. molesta</i> ..	3
2.2 Aspectos biológicos de <i>G. molesta</i>	6
2.3 Comportamento reprodutivo de <i>G. molesta</i>	8
2.4 Aspectos da morfologia e fisiologia reprodutiva de Lepidoptera – Tortricidae....	9
2.5 Fatores que interferem no sucesso reprodutivo em Lepidoptera.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Criação de <i>G. molesta</i>	23
3.2 Descrição dos órgãos internos de reprodução de <i>G. molesta</i>	24
3.3 Avaliação das implicações da poliandria e da poliginia na performance reprodutiva de <i>G. molesta</i>	25
3.4 Avaliação do impacto da idade e de múltiplos acasalamentos no sucesso reprodutivo de <i>G. molesta</i>	26
3.4.1 Bioensaio 1- Avaliação do tempo de cópula, fecundidade, fertilidade e longevidade de fêmeas de <i>G. molesta</i> pareadas com machos virgens e recém-acasalados	27
3.4.2 Bioensaio 2- Avaliação do tempo de cópula, tamanho do espermatozóide, fecundidade, fertilidade e longevidade em fêmeas de <i>G. molesta</i> pareadas com machos virgens e de distintos históricos de acasalamento... ..	27
3.4.3 Bioensaio 3- Análise da receptividade de fêmeas de <i>G. molesta</i> a cópulas adicionais após o acasalamento com machos virgens ou acasalados e efeitos deste comportamento na fecundidade, fertilidade e longevidade das fêmeas.....	28
3.4.4 Bioensaio 4- Influência da idade de <i>G. molesta</i> no tempo de cópula, fecundidade e fertilidade.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Descrição dos órgãos de reprodução de <i>G. molesta</i>	30
4.1.1 Órgãos reprodutores da fêmea.....	30
4.1.2 Órgãos reprodutores do macho.....	36

4.2	Implicações da poliandria e da poliginia na performance reprodutiva de <i>G. molesta</i>	42
4.2.1	Implicações da poliandria na performance reprodutiva de <i>G. molesta</i>	42
4.2.2	Implicações da poliginia na performance reprodutiva de <i>G. molesta</i>	46
4.3	Impacto da idade e de múltiplos acasalamentos no sucesso reprodutivo de <i>G. molesta</i>	51
4.3.1	Bioensaio 1	51
4.3.2	Bioensaio 2	52
4.3.3	Bioensaio 3	55
4.3.4	Bioensaio 4	59
5	CONCLUSÕES	63
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1	Valores médios (mm) (\pm EP) do comprimento dos ovidutos comum, direito e esquerdo, e dos comprimentos e das larguras da bolsa copuladora, receptáculo seminal e ovários direito e esquerdo de fêmeas de <i>Grapholita molesta</i> com um e oito dias de idade, virgens e/ou copuladas. 35
2	Valores médios (mm) (\pm EP) do comprimento dos testículos, vasos deferentes (1ª e 2ª partes) e vesículas seminais e acessórias, ducto ejaculatório duplo, glândula do ducto ejaculatório duplo, ducto ejaculatório simples e edeago de machos de <i>Grapholita molesta</i> com um e oito dias de idade, virgens e/ou copulados..... 37
3	Médias de fecundidade e fertilidade (\pm EP) de fêmeas de <i>Grapholita molesta</i> pareadas sob condições de monogamia e poliandria com machos de um e três dias de idade.. 43
4	Médias de fecundidade e fertilidade (\pm EP) de fêmeas de <i>Grapholita molesta</i> pareadas com machos monogâmicos ou poliginicos, avaliadas durante 15 dias. . 47
5	Médias (\pm EP) de fecundidade, fertilidade, longevidade (dias) e tempo de cópula (min) de fêmeas pareadas com machos de <i>Grapholita molesta</i> virgens (n = 19) e previamente copulados (n = 19)..... 52
6	Médias (\pm EP) de fecundidade, fertilidade, longevidade (dias) e tempo de cópula de fêmeas pareadas com machos de <i>Grapholita molesta</i> virgens e de distintos eventos de acasalamento (n= número de casais)..... 52
7	Médias (\pm EP) de comprimento (mm) e largura (mm) do espermátóforo transferido para fêmeas por machos de <i>Grapholita molesta</i> virgens e de distintos status de acasalamento (n= número de casais)..... 53

8	Médias (\pm EP) de fecundidade, fertilidade e longevidade (dias) de fêmeas de <i>Grapholita molesta</i> , acasaladas com machos virgens, que realizaram uma ou várias cópulas ao longo da vida.....	58
9	Médias (\pm EP) de fecundidade, fertilidade e tempo de cópula (min) de casais de <i>G. molesta</i> acasalados com diferentes idades (n= número de casais).....	60

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1	<i>Grapholita molesta</i> : casal de em cópula (A) e espermatóforo (B)..... 9
2	Órgãos reprodutores internos de fêmeas de <i>Grapholita molesta</i> em vista ventral. A. Virgem com um dia; B. Virgem com oito dias; C. Copulada com oito dias. Ovários (Ov); Ovidutos laterais (OL); Oviduto comum (OC); bolsa copuladora (BC); Ostio da bolsa copuladora (Os); Receptáculo seminal (RS); Duto seminal (DS); Espermateca (E); Glândula acessória (GIA); Oviporo (O).. 32
3	Órgãos reprodutores internos de machos de <i>Grapholita molesta</i> , em vista ventral. A. Virgem com um dia; B. Virgem com oito dias; C. Copulado com oito dias. Testículos (T); Vasos deferentes 1ª parte (VD1); Vesículas seminais (VS); Vasos deferentes 2ª parte (VD2); Vesículas seminais acessórias (VSA); Duto ejaculatório duplo (DED); Glândula do duto ejaculatório duplo (GDED); Duto ejaculatório simples (DES); Edeago (Ed)..... 40
4	Número médio diário de ovos férteis de fêmeas de <i>Grapholita molesta</i> pareadas sob condições de monogamia e poliandria com machos de um e três dias de idade. 45
5	Número diário de fêmeas de <i>Grapholita molesta</i> copuladas por machos poligínicos ao longo da vida..... 48
6	Médias de fecundidade e fertilidade das fêmeas de <i>Grapholita molesta</i> de um (A) e três (B) dias de vida, pareadas durante os primeiros 15 dias de vida dos machos. Letras distintas nas barras referentes à fertilidade indicam diferença estatística entre as médias ($\alpha= 0,05$)..... 49
7	Comprimento (mm) (A) e largura (mm) (B) dos espermatóforos em relação ao número de cópulas de machos de <i>Grapholita molesta</i> 54
8	Percentual de fêmeas de <i>Grapholita molesta</i> por número de cópulas realizadas ao longo da vida após terem acasalado com macho virgem (barras cinza) ou acasalados (barras brancas).. 57

9	Número médio de ovos férteis de fêmeas de <i>Grapholita molesta</i> , acasaladas com machos virgens, que realizaram uma ou várias cópulas ao longo da vida.....	59
10	Tempo de cópula (min) (A) e a fertilidade (B) em relação à idade (dias) dos indivíduos de <i>Grapholita molesta</i>	61

1 INTRODUÇÃO

A mariposa-oriental, *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae), é uma das principais pragas das culturas da macieira e do pessegueiro no Brasil. O controle deste inseto tem sido realizado, principalmente, através do emprego de inseticidas sintéticos, com ênfase nos fosforados, o que resulta em riscos sobre a saúde dos aplicadores e na possibilidade de contaminação dos frutos e do ambiente. Além disso, tal medida de controle pode oferecer risco à aceitabilidade do produto no mercado externo, visto que nos últimos anos a União Européia tem feito maiores restrições à presença de resíduos nos frutos importados, impondo barreiras cada vez mais rígidas.

Neste contexto, a utilização dos feromônios sexuais sintéticos surgiu como uma alternativa adotada em diversos pomares brasileiros, representando uma importante ferramenta para monitoramento e controle, por meio da técnica de confusão sexual. Tal medida permite uma produção com menor impacto ao ambiente, que atende a demanda do mercado, especialmente quando se fala da maçã, que é um dos frutos brasileiros atualmente mais exportados.

Tendo em vista o emprego de técnicas comportamentais de controle, passa a existir a necessidade de um conhecimento maior com relação à capacidade de reprodução destes insetos. Visto que, mesmo com a extensa utilização desta medida de supressão

populacional, pouco se sabe sobre as estratégias de acasalamento e o potencial de reprodução de *G. molesta*.

Trabalhos que elucidem a influência das características comportamentais na ocorrência, distribuição e flutuação populacional da mariposa-oriental, podem fornecer subsídios, que auxiliem na interpretação dos resultados provenientes do campo, possibilitando assim, maior adequação e confiabilidade na utilização do controle comportamental, colaborando no aprimoramento do uso desta ferramenta no manejo da praga.

Neste sentido, o presente estudo teve como objetivos gerais verificar as implicações do comportamento poligâmico, do status de cópula e da idade dos indivíduos de *G. molesta* em variáveis de reprodução, bem como, avaliar a influência dos últimos fatores no sistema reprodutivo de machos e fêmeas, através da descrição morfológica das estruturas internas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Distribuição, importância econômica, monitoramento e controle de *G.*

molesta

Grapholita molesta (Busck), conhecida como “mariposa-oriental”, é originária do continente asiático (Gonzalez, 1989), no entanto, hoje é considerada uma praga cosmopolita, presente em diversas regiões agrícolas do mundo onde se cultivam rosáceas, seus principais hospedeiros (Salles, 2000). No Brasil, foi registrada no Rio Grande do Sul, em 1929 (Silva *et al.*, 1968), de onde se expandiu para os demais estados, sendo referida principalmente para a região centro-sul do País, grande produtora de frutas de caroço (Salles, 1998) e maçã (Mello, 2001).

Dentre as frutíferas de caroço, o pessegueiro possui uma posição de destaque no mercado mundial. No Brasil, o abastecimento provém de cinco pólos de produção: Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (Madail, 1998). O Rio Grande do Sul (RS) é o principal produtor de pêssegos, representando em torno de 50% do volume nacional, concentrado numa área de aproximadamente 14 mil hectares. O Estado é constituído por três regiões de produção: a metade sul, que compreende 29 municípios e concentra mais de 90% da produção, destinada ao processamento industrial; a da grande

Porto Alegre, composta por nove municípios, que produz parte dos pêssegos para consumo *in natura*; e o da serra gaúcha, com 32 municípios fornecedores de frutos para mesa (Protas & Madail, 2003; SIDRA, 2009). Na região da serra do RS, as principais cultivares são as de polpa branca, com destaque para Chiripá, Chimarrita e Marli (João, 2004).

O cultivo de macieiras do Brasil ocupa uma área em torno de 37 mil hectares, que resultou numa produção de 1.115.379 toneladas na safra de 2007 (SIDRA, 2009). Dentre os frutos de clima temperado, a maçã é o mais importante, tanto no contexto internacional, quanto no brasileiro e é comercializada principalmente *in natura* (Mello, 2001).

A região Sul concentra 99% da produção brasileira de maçãs. No RS, os municípios de maior produção, na safra 2007/2008, foram Vacaria (215 mil t), Caxias do Sul (49 mil t) e Bom Jesus (32 mil t) (AGAPOMI, 2009).

Grapholita molesta provoca injúrias à planta, exclusivamente, durante a fase larval. A lagarta perfura os brotos novos, não lignificados, ou o pecíolo da folha, migrando para os ramos principais, onde constrói galerias, através do consumo da parte interna do ramo, provocando murchamento e deformações (Grellmann & Loeck, 1992). A lagarta pode atacar de dois a quatro ponteiros, fazendo uma galeria de cima para baixo e deixando excrementos apenas na entrada desta (Salles, 2000). Ocorre ainda o secamento do ponteiro e exsudação de resina pelo orifício de entrada da lagarta (Lorenzato, 1988). Para as plantas jovens, durante a primeira e a segunda brotação, estes danos tornam-se ainda mais relevantes, por provocarem perda na dominância apical do ramo, o que acarreta a emissão de brotações laterais, prejudicando a arquitetura da planta (Monteiro & Hickel, 2004).

No pêssego, as lagartas penetram principalmente na área da base fruto, próximo à cavidade peduncular, perfurando uma galeria em direção ao centro, em torno do caroço (Salles, 2000). No entanto, a infestação pode ocorrer inicialmente em outras partes do fruto, conforme evidenciado por Rosenthal & Loeck (1994). Devido aos danos, os frutos ficam murchos e caem prematuramente, tornando-se imprestáveis para a comercialização (Monteiro & Hickel, 2004).

De acordo com Salles (1998), as lagartas de *G. molesta* atacam pêssegos verdes ou em vias de maturação, mas não maduros. Souza *et al.* (2000), em estudo realizado em Caldas, Minas Gerais, observaram que os danos em pessegueiro ocorrem durante a fase de brotação dos ramos e início da maturação dos frutos, sendo os últimos mais atingidos. Na macieira, a lagarta alimenta-se nos brotos, ocasionando o secamento dos ponteiros e paralisação do desenvolvimento da planta; enquanto nos frutos, o ataque do inseto causa murchamento e queda prematura dos mesmos (Bleicher & Bender, 1986).

Atualmente, iscas feromonais sintéticas vêm sendo utilizadas por produtores para o monitoramento de adultos de *G. molesta* no campo. O feromônio sexual de *G. molesta* é composto pelas substâncias *Z*-e *E*-8-acetato de dodecenila, numa proporção de 12:1 (Linn *et al.*, 1991). A armadilha é mantida no pomar do início da brotação até a colheita, a uma altura de 1,7 m do nível do solo e em local livre de ramos que possam interferir na captura dos insetos. Para o controle do inseto, utiliza-se normalmente, de uma a duas armadilhas por hectare, substituindo-se as cápsulas com feromônio a cada sete semanas, e estabelecendo como nível de controle a captura de 20 machos/armadilha/semana (Botton *et al.*, 2005).

A partir da safra 2004/5, teve início o emprego de feromônio sexual sintético (Biolita® e Splat Grappho®) com o objetivo de reduzir o crescimento populacional por meio da técnica de confusão sexual. Esta forma de controle consiste na liberação de uma grande quantidade de feromônio sexual sintético da fêmea no pomar, dificultando a orientação do macho na busca de parceiras para o acasalamento e diminuindo, conseqüentemente, o número de cópulas (Cardé & Minks, 1995). Esta técnica apresenta eficácia comprovada no controle de *G. molesta* no sul do País, em pomares de pessegueiros (Salles & Marini, 1989) e de macieiras (Monteiro *et al.*, 2008), assim como já registrado anteriormente em macieiras nos Estados Unidos da América (Kovanci *et al.*, 2005).

Não se conhece exatamente como a orientação do inseto é comprometida na confusão sexual. No entanto, sabe-se que a percepção química de machos fica prejudicada quando estes ficam continuamente expostos a altas dosagens do feromônio sexual de fêmeas, provocando saturação dos receptores das antenas. Esta contínua presença do composto no meio faz com que haja uma desorientação na linha de vôo de machos, impedindo o encontro com as fêmeas e, conseqüentemente, a cópula (Cardé & Minks, 1995).

2.2 Aspectos biológicos de *G. molesta*

Os adultos de *G. molesta* apresentam cerca de 12 mm de envergadura e coloração pardo-escuro-acizentada. Possuem hábitos crepusculares e longevidade em torno de 15 dias a 26 °C (Grellmann *et al.*, 1991). Os ovos têm cerca de 0,7 mm de diâmetro e formato de discos, ligeiramente convexos e esbranquiçados (Monteiro & Hickel, 2004). São depositados isoladamente na face inferior das folhas novas, nas brotações e nos frutos, possuindo um período de incubação que varia de três a cinco dias, quando mantidos a

temperatura de 20 e 30 °C respectivamente, fotofase de 14 horas e 75% de umidade (Grellmann *et al.*, 1991).

As lagartas apresentam cabeça preta e são branco-acinzentadas durante os três primeiros ínstaes, tornando-se branco-rosadas nos dois últimos, quando atingem de 12 a 14 mm de comprimento. As pupas ficam abrigadas em casulos de seda e permanecem, geralmente, em fendas da casca dos troncos e ramos, no pedúnculo dos frutos ou em detritos do solo, sob a copa da planta. Apresentam coloração castanha e medem, aproximadamente, 6 mm de comprimento (Salles, 2000; Monteiro & Hickel, 2004). O período larval dura de 11 a 21 dias e a fase de pupa, normalmente, de 9 a 12, quando condicionadas a 30 e 20 °C, respectivamente, umidade relativa de 75% e fotofase de 14 horas (Grellmann *et al.*, 1991). A duração de cada estágio de desenvolvimento depende principalmente da temperatura, havendo assim, uma relação inversa entre esta e o número de dias para completar o ciclo de vida.

Segundo Sarai (1970), lagartas de *G. molesta* podem entrar em diapausa quando submetidas, nos primeiros ínstaes, as fotofases de 11 e 13 horas e temperaturas entre 21 a 26 °C. O desenvolvimento é totalmente paralisado com temperaturas abaixo de 9 °C, sendo esta a temperatura mínima para o inseto completar seu ciclo (Grellmann *et al.*, 1991).

O comportamento de vôo também é dependente da temperatura, sendo necessário, no mínimo 16 °C para o seu início. No Rio Grande do Sul, a atividade de vôo ocorre no período de setembro a abril, podendo haver até sete gerações por ano agrícola, sendo quatro a cinco destas realizadas no período vegetativo do pessegueiro (Grellmann & Loeck, 1992).

2.3 Comportamento reprodutivo de *G. molesta*

O comportamento de acasalamento e corte em *G. molesta* é desencadeado com a liberação do feromônio sexual das fêmeas (Baker & Cardé, 1979a). A periodicidade do chamamento da fêmea é determinada por fatores endógenos, podendo também ser influenciada pelo fotoperíodo e variação de temperatura. Temperaturas elevadas, em torno de 31 °C, podem gerar um retardamento ou até mesmo supressão no início do chamamento (Baker & Cardé, 1979b). A resposta do macho é caracterizada, inicialmente, por vibrações contínuas das asas, curvatura do abdome para cima e para baixo, e curtos saltos ou vôos (Dustan, 1964). Inclui ainda, a exibição de tufos de pêlos presentes no final do abdome do macho, que atrai a fêmea, devido a estímulos químicos e visuais, a uma distância de 1 a 2 cm (Baker & Cardé, 1979a). O estímulo químico é devido à liberação de substâncias pelo macho, presentes no tufo de pêlos do abdome, identificadas como um mistura de trans-etil cinamato e metil 1-2 jasmonato (Nishida *et al.*, 1982).

Os machos podem demonstrar plasticidade no comportamento em condições de competição, utilizando-se de diferenciadas estratégias pelo acesso à fêmea. Quando postos machos em uma arena, em tempos distintos, o último a entrar em contato com a fêmea inicialmente não apresenta o comportamento de eversão de pêlos do abdome e ainda aproveita-se da atração da fêmea pelo primeiro macho, interceptando-a antes que ela aproxime-se deste. Outra estratégia utilizada pelo último macho é de mimetizar uma fêmea, tocando o abdome do primeiro com as antenas, e só posteriormente, realizar a sua própria exibição de pêlos. Em grande parte das observações, o último macho a entrar em contato com a fêmea foi o que apresentou maior sucesso de cópula (Baker, 1983).

Durante a cópula (Figura 1A), o casal raramente se move, e ocorre geralmente a transferência de apenas um espermatóforo (Figura 1B) por cópula. Deste modo, o exame da bolsa copuladora permite avaliar o número de vezes que a fêmea foi acasalada. O sucesso reprodutivo, geralmente, é verificado em maior número nas mariposas que mantêm um tempo de cópula mais longo, podendo este variar de 1 a 29,3 minutos (Dustan, 1964).

A maioria das cópulas ocorre no período entre a metade da tarde e o início da escotofase. Em geral, o período de acasalamento inicia nas primeiras 24 horas após a emergência e coincide com o vôo diário e o período de deposição dos ovos. Durante a primeira semana de vida, copulam, em média, uma vez por dia, sendo as fêmeas virgens preferidas para cópula (Dustan, 1964).



FIGURA 1- *Grapholita molesta*: casal de em cópula (A) e espermatóforo (B).

2.4 Aspectos da morfologia e fisiologia reprodutiva de Lepidoptera - Tortricidae

A morfologia interna e a fisiologia do sistema reprodutivo de *G. molesta* ainda não são conhecidas, porém, em outros tortricídeos como *Laspeyresia* (=Cydia) *pomonella* (Linnaeus) (Walker *et al.*, 1967), *Laspeyresia caryana* (Fitch) (Ferro & Akre, 1975) e *Choristoneura fumiferana* (Clemens) estes aspectos já foram devidamente descritos. Dentre

as espécies citadas, *C. fumiferana* é quem detém o maior número de estudos, não apenas de caráter morfológico, mas também quanto à histologia do sistema reprodutivo interno de machos e fêmeas (Outram, 1970; 1971).

Além desta, em famílias como Gelechiidae, representada por *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Wellso & Adkisson, 1962) e Noctuidae por *Heliothis zea* (Boddie) (Callahan & Cascio, 1963) e por *Pseudaletia separata* Walker (He *et al.*, 1995), a estrutura e o funcionamento do sistema reprodutivo já são conhecidos.

O sistema reprodutivo de Tortricidae é bastante semelhante ao encontrado nos demais lepidópteros. Os machos, no penúltimo instar larval, possuem os dois testículos separados, formados, cada um deles, por quatro folículos, os quais se conectam a um par de vasos deferentes. A fusão dos dois testículos em uma única estrutura é observada na passagem da fase de larva para pupa. No último instar são encontrados espermátócitos em maior número e poucas espermatogônias, assim como já ocorre a produção de eupirene e apirene, células que fazem parte do esperma de lepidópteros cumprindo diferentes funções na reprodução. Eupirene é nucleada e responsável pela fertilização dos ovos, enquanto, apirene é anucleada e sua função ainda está em estudo, sendo a movimentação e a nutrição de eupirene uma das atribuições propostas para este grupo de células (Friedländer, 1997; Fernandez & Cruz-Landim, 2005).

Durante a fase adulta, todas as etapas da espermatogênese são evidenciadas, desde a formação de espermatogônia até a espermatozoa (Benz, 1991). Em alguns lepidópteros, a liberação de esperma dos testículos já ocorre no momento da emergência. Antes deste evento, a liberação é inibida pela alta concentração de ecdisteróides na hemolinfa. Após a

emergência, o nível desses diminui e a liberação passa a ser regulada pelo ritmo cicardiano de cada espécie de inseto (Chapman, 1998).

As células espermáticas partem dos testículos, percorrendo os pares de vasos deferentes e as vesículas seminais, até chegarem ao ducto ejaculatório duplo, onde recebem substâncias que auxiliarão na formação do espermátóforo, secretadas pelas glândulas acessórias. Deste ponto em diante, o esperma transita pelo ducto ejaculatório simples (Snodgrass, 1994). Conforme Outram (1970), em *C. fumiferana*, o ducto ejaculatório simples pode ser dividido em parte primária, que se liga ao ducto ejaculatório duplo e, porção caudal ou cuticular, a qual tem término no edeago. A primeira parte, onde se inicia a produção do espermátóforo, é constituída por sete secções morfológicamente distintas, demarcadas por constrictões do ducto, porém histologicamente similares. A porção cuticular, conhecida como uma área de músculo constritor é formada por fibras longitudinais mais grossas derivadas da primeira parte, que se reorientam circularmente, e funcionam na modulação do espermátóforo, (Outram, 1970). Segundo Chapman (1998), espermátóforos de lepidópteros são inteiramente formados após entrarem em contato com o ducto feminino. No entanto, em estudo realizado com *L. pomonella*, Ferro & Akre (1975) evidenciaram que espermátóforos normais são produzidos independente de alguma secreção produzida pela fêmea.

Durante a cópula o espermátóforo é transferido para a fêmea. Em alguns grupos de insetos a abertura utilizada no processo copulatório é a mesma da oviposição, situada no nono segmento do abdome. Porém nos tortricídeos, assim como na maioria dos lepidópteros, as fêmeas possuem a abertura copulatória localizada no oitavo segmento, que serve de acesso à bolsa copuladora (Snodgrass, 1994).

A bolsa copuladora é o órgão da fêmea que recebe o espermátóforo logo após a cópula, e divide-se em: ducto, cérvix e corpo da bolsa. Este último é revestido por músculos bem desenvolvidos e contem em seu interior uma estrutura esclerotizada em forma de espinho, denominada *signum*, que pode ter a função de auxiliar no posicionamento do espermátóforo (Ferro & Akre, 1975), ou na perfuração deste, permitindo a liberação do esperma (Cordero, 2005). Na base lateral do *signum* ocorre também a inserção das fibras que delimitam a bolsa, as quais, durante a cópula esticam-se para acomodar o espermátóforo, achatando o epitélio e alisando as dobras existentes na cutícula (Outram, 1971). Desta forma, a presença do espermátóforo no interior do órgão faz com que este mude de aspecto, de colapsado e opaco em fêmeas virgens, para inflado, endurecido e translúcido em copuladas (Wellso & Adkrisson, 1962; Ferro & Akre, 1975).

Em *L. pomonella*, após 15 minutos de cópula, o espermátóforo começa a ser forçado para o interior da bolsa copuladora da fêmea, empurrando o *signum* e tornando-se endurecido. Após aproximadamente 40 minutos de cópula, quando o espermátóforo está quase completamente formado dentro da bolsa, o macho ejacula fluido seminal contendo apirene, seguido de uma substância compacta contendo mais eupirene. A transferência completa do esperma ocorre de 50 a 60 minutos após início do processo (Ferro & Akre, 1975). Em *Spodoptera litura* (Fabricius) (Noctuidae), o tempo de transferência do ejaculado para dentro da bolsa copuladora da fêmea também é em torno de 60 minutos após o início da cópula, sendo que, aos 45 minutos, o espermátóforo já se encontra com a parte anterior ocupada por esperma e secreções (Seth *et al.*, 2002).

Quando o esperma é liberado do espermátóforo, este percorre o receptáculo seminal, ducto seminal e oviduto comum até ser armazenado na espermateca (Wellso & Adkrisson,

1962). A espermateca, dependendo da espécie, pode ter diferentes formatos, cumprindo, no entanto, a mesma função de retenção do esperma até o momento da fertilização. Em *L. pomonella*, a espermateca é tubular e pode ser dividida em vesícula, reservatório e glândula da espermateca, sendo a primeira o local onde o esperma é inicialmente estocado após deixar o espermátóforo e migrar pelo ducto seminal (Ferro & Akre, 1975). Em *C. fumiferana*, apresenta-se bilobada e a análise histológica revelou diferentes tipos de organização celular ao longo do órgão, o que permite atividades distintas, desde o armazenamento à movimentação do esperma (Outram, 1971).

Abaixo da inserção da espermateca nos tortricídeos encontra-se a glândula acessória, com dois lobos que terminam em longos filamentos. Segundo Outram (1971), em *C. fumiferana* a estrutura dessa glândula é histologicamente semelhante à da espermateca. Callahan & Cascio (1963) sugerem que as substâncias secretadas pelas glândulas podem ser utilizadas como meio de manutenção e locomoção do esperma pelos ductos. Outros estudos atribuem a tais secreções, a função de fixação dos ovos ao substrato (Walker *et al.*, 1967; Davis, 1968).

Tanto a espermateca quanto as glândulas acessórias e a bolsa copuladora estão ligadas na porção lateral do oviduto comum, sendo a última através do ducto seminal. Na parte anterior do oviduto comum dos lepidópteros insere-se um par de ovidutos laterais, cada um deles, conectado a um ovário, composto por quatro ovariolos (Snodgrass, 1994). Nos ovariolos, partes distintas podem ser identificadas. A porção apical, que se liga ao diafragma, onde se localiza o germário, que são ovogônias formadas por células germinativas, as quais são seguidas pelo vitelo, que é constituído por células de reprodução misturadas às de nutrição (trofócitos). Na base dos ovariolos estão presentes os oócitos

maduros, junto ao pedicelo (Chapman, 1998). Os oócitos, à medida que vão amadurecendo, são liberados através do oviduto lateral, passando pelo oviduto comum onde podem ser fertilizados e seguem em direção ao ovipositor (Wellso & Adkisson, 1962).

2.5 Fatores que interferem no sucesso reprodutivo em Lepidoptera

Diversos fatores interferem no sucesso reprodutivo de insetos, como a idade, o status de cópula, a concentração de feromônio liberado, as variações na percepção deste, o tamanho dos espermatóforos, a disponibilidade de parceiros e o intervalo entre oviposições. O conhecimento dessas características, intrínsecas ao processo reprodutivo, podem contribuir para o sucesso do monitoramento e do controle comportamental de uma espécie de inseto.

No comportamento de escolha por parceiros, as fêmeas de *Cnephasia jactatana* Walker (Tortricidae) demonstram indiferença com relação à idade dos machos, porém quanto ao status de cópula, escolhem preferencialmente os virgens. Enquanto os machos são seletivos com relação a ambos os fatores, preferindo fêmeas jovens e virgens. Este comportamento pode ser resultado da variação na concentração de feromônio sexual liberado pelas fêmeas, o qual é dependente da idade e do status de cópula (Jiménez-Pérez & Wang, 2004a). Em *C. fumiferana* e *Choristoneura rosaceana* (Harris), a resposta da glândula secretora ao neuropeptídeo (PBAN) que estimula a produção de feromônio é reduzida em fêmeas virgens de nove dias, comparativamente às de um dia de idade. A produção deste neuropeptídeo é influenciada pela idade, apenas em *C. fumiferana*, a qual é elevada em torno de 50% nas fêmeas jovens (Delisle & Simard, 2003).

Padrões distintos de respostas dos machos ao feromônio das fêmeas, com relação à idade, podem ser encontrados em diferentes espécies de tortricídeos. Foster *et al.* (1995) constataram que machos de *Ctenopseutis obliquana* (Walker) responderam ao feromônio da fêmea na mesma proporção, durante uma semana a partir da emergência. Por outro lado, em *Ctenopseutis herana* (Felder & Rogenhofer), a atração ocorreu somente após um dia de idade do macho, intensificando-se do terceiro ao quinto e reduzindo-se posteriormente. No mesmo estudo, machos e fêmeas de *Epiphyas postvittana* (Walker) apresentaram-se reprodutivamente maduros logo após a emergência, concentrando também no terceiro dia, a maior incidência de cópulas.

Em alguns noctuídeos também se constata que as respostas podem variar em relação à idade. Proshold (1991) verificou que a maioria dos machos virgens de *Heliothis virescens* (Fabricius) capturados tinham de um a quatro dias de idade. Anton & Gadenne (1999) constataram que a percepção eletrofisiológica de machos de *Agrotis ipsilon* (Hüfnagel) ao feromônio sexual de fêmeas é baixa logo após a emergência, sendo dependente da concentração de hormônio juvenil.

Em *G. molesta*, segundo Fraser & Trimble (2001), a demora para início da atividade reprodutiva resulta numa redução diária de ovos férteis de aproximadamente 7%, apesar da fecundidade e fertilidade serem significativamente menores apenas nas fêmeas copuladas após o décimo dia de idade. Fêmeas de *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermueller) (Tortricidae) que copularam no primeiro dia de idade apresentaram fecundidade média e percentual de fertilidade de 150 ovos e 90%, respectivamente, enquanto que as de 16 dias depositaram apenas 22 ovos durante o mesmo período, sendo que destes, apenas 23% eram férteis. No entanto, fêmeas copuladas no primeiro dia apresentaram, em média, menor

longevidade (8,8 dias) e maior período de oviposição (7,2 dias), comparativamente às acasaladas aos 16 dias (18,4 e 2,1 dias, respectivamente). A reduzida fecundidade, de acordo com Torres-Vila *et al.* (2002), pode ser explicada pela retenção ou reabsorção dos oócitos, devido ao acasalamento tardio. Este fenômeno foi também observado em outras espécies de Tortricidae, como *E. postvittana* (Foster & Howard, 1999) e *Argyrotaenia spheropa* (Meyrick) (Pinto *et al.*, 2005).

Assim como nas fêmeas, a capacidade de fertilização por parte dos machos varia ao longo da vida. Em fêmeas de *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Tortricidae), a fecundidade e fertilidade são reduzidas quando pareadas com machos de um e sete dias, sendo os maiores valores de tais parâmetros registrados para os de dois e três dias de idade (Knight, 2007). A imaturidade no primeiro dia de vida pode ser decorrente do fato de que, apesar dos machos já emergirem com o sistema reprodutor totalmente formado e repleto de células espermáticas, como foi verificado por Benz (1991) em tortricídeos, a maturação e o volume destas alteram-se durante a fase adulta. Tais modificações foram evidenciadas em machos de *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Gelechiidae), os quais, apesar de serem capazes de produzir esperma durante toda a vida, detêm entre o quinto e sétimo dia de idade o maior número de células de reprodução maduras dentro dos testículos, comparativamente aos mais jovens (Brits, 1979).

Em outras espécies, como *Spodoptera exigua* (Hübner) (Noctuidae), Rogers & Marti (1996) verificaram que a ocorrência da cópula nos primeiros dias de vida foi um fator relevante na avaliação da fertilidade, fecundidade e longevidade. Os autores constataram que indivíduos que copularam no período de um a três dias após a emergência foram mais fecundos e férteis, apesar de menos longevos, que aqueles acasalados no sétimo ao nono dia

de vida. A redução na capacidade reprodutiva pode ser, em parte, explicada, pela diminuição no número de espermátóforos transferidos para as fêmeas por machos mais velhos.

A quantidade e a qualidade do espermatozoides pode ser também alterada em consequência do número de acasalamentos prévios vivenciados pelo macho, ocasionando em algumas espécies uma redução no número de descendentes. Em *C. fumiferana* e *C. rosaceana*, Marcotte *et al.*, (2005) observaram um menor percentual de ovos férteis quando as fêmeas copularam com machos já previamente acasalados. Este declínio foi justificado através de uma diminuição linear de espermatozoides e de substâncias provenientes das glândulas acessórias dos machos, observada na bolsa copuladora da fêmea, à medida que o número de acasalamentos prévios do macho aumentava.

De acordo com Jiménez-Pérez & Wang (2004b), fêmeas de *C. jactatana* que copularam com machos já acasalados receberam espermátóforo 45% menor que o transferido na primeira cópula. Nesta espécie, a redução refletiu diretamente na fertilidade, a qual decresceu em aproximadamente 23, 37 e 55 %, nas fêmeas copuladas com machos anteriormente pareados uma, duas e de três a cinco vezes, respectivamente. Comportamento diferente foi, no entanto, registrado para *C. pomonella*, onde a fecundidade e fertilidade de fêmeas pareadas com machos virgens e acasalados inúmeras vezes, não se alterou, apesar do tamanho do espermátóforo transferido na primeira cópula ser significativamente maior (Knight, 2007).

A poligamia é amplamente difundida entre os insetos, em especial o comportamento poligínico, enquanto a monogamia tende a ocorrer em menor proporção, sendo geralmente uma condição evolutivamente derivada (Matthews & Matthews, 1978). Cópulas múltiplas

umentam o risco de predação e parasitismo, porém trazem vantagens. Os machos beneficiam-se pela transferência de esperma a um maior número de parceiras e, as fêmeas, pelo aumento da diversidade genética da prole, seleção espermática e suprimento de ejaculado adequado, além de benefícios nutricionais que podem elevar seu período reprodutivo e tempo de vida (Svard & McNeil, 1994).

O sistema poliândrico conduz a adaptações relacionadas ao esforço de cópula e investimento parental pelo macho, visto que o valor nutricional do ejaculado tende a ser maior com o aumento do grau de poliandria da espécie (Boggs *et al.*, 2003). De acordo com Svard & McNeil (1994), algumas táticas são adotadas por machos poligínicos, com o intuito de otimizar o seu ganho reprodutivo, como diminuir o investimento em estratégias de corte em fêmeas previamente copuladas, ou ainda, reduzir a quantidade do ejaculado, quando acasalados por mais de uma vez com a mesma fêmea (McNamara *et al.*, 2008).

A manutenção do conteúdo espermático e de fertilidade invariável em mais de um acasalamento é uma característica relacionada, em grande parte, aos sistemas poligâmicos. Em tais sistemas, os machos adaptaram-se a investir de forma semelhante em mais de uma fêmea, pois desta forma, aumentam a probabilidade de fertilização durante a competição espermática (Bissoondath & Wiklund, 1996).

As substâncias ejaculadas podem atuar como modificadoras também no comportamento e na fisiologia da fêmea, reduzindo sua receptividade (Gillot, 2003). Secreções das glândulas acessórias masculinas e células de apirene podem agir de forma a determinar o período refratário da fêmea, reduzindo ou até mesmo cessando a liberação de feromônio (Kingan *et al.*, 1993). Em *E. postvittana*, o acasalamento resultou em uma inativação na produção de feromônio por parte da fêmea. Foster (1993), investigando as

causas desta supressão, constatou que, neste caso, esta não é originada pela pressão mecânica do espermátóforo na bolsa copuladora. Fatores hormonais e neurais foram os mais consistentes para explicar tal fenômeno, pois quando o cordão nervoso ventral de fêmeas copuladas era seccionado, estas ainda liberavam feromônio na mesma proporção que as virgens.

Tendo em vista a interferência do ejaculado na resposta das fêmeas, o tamanho do espermátóforo transferido em diferentes acasalamentos do macho pode ser uma variável importante na avaliação do período refratário. Como o verificado em fêmeas de *E. postvittana*, que ao copularem com machos virgens receberam uma maior quantidade de esperma e demoraram mais para reiniciarem o chamamento (Foster & Ayres, 1996). No entanto, em outras espécies de tortricídeos, como *C. fumiferana* e *C. rosaceana*, o tamanho do espermátóforo recebido não interferiu na receptividade da fêmea à recópula (Marcotte *et al.*, 2003, Jiménez-Pérez *et al.*, 2003).

O período no qual ocorre a oviposição é também um evento suscetível à influência do conteúdo espermático, pois ao mesmo tempo em que este pode alterar a receptividade, em outras espécies, como *Zeirapheta diniana* (Guenée) (Tortricidae), age acelerando o processo de oviposição. Nesse tortricídeo, o estímulo é desencadeado pela junção de fatores como presença do espermátóforo na bolsa copuladora, fluido seminal no receptáculo seminal e células espermáticas na espermateca que, somados à presença da planta hospedeira, fazem com que 94% dos ovos madurem e sejam depositados rapidamente (Benz, 1969). Já em *Bombyx mori* (Linnaeus) (Bombycidae), o evento é atribuído à sensibilização de gânglios abdominais localizados na junção do ducto seminal com o oviduto comum, pela presença de células espermáticas férteis (Karube & Kobayashi, 1999).

A fertilidade do macho também foi constatada como a causa na alteração no número de ovos de *S. litura* (Seth *et al.*, 2002). Nesta espécie, fêmeas copuladas por com machos férteis ovipositaram em maior proporção que as mantidas com machos esterilizados por radiação. Os autores consideraram que, este efeito possa ser em função da ausência de esperma fértil ou da deficiência de algum outro componente do sêmen que estimularia a postura.

Conforme Gillot (2003), em alguns lepidópteros a vitelogênese é estimulada pelo hormônio juvenil, que adquire maiores proporções na fêmea após a cópula, devido à contribuição do macho. Park *et al.* (1998) verificaram a importância das glândulas acessórias masculinas, no acúmulo e transferência de hormônio juvenil. Os autores demonstraram que, fêmeas de *H. virescens*, copuladas com machos anteriormente submetidos à retirada das glândulas acessórias, depositaram menor número de ovos e apresentaram proporção inferior de oócitos em estágio avançado de desenvolvimento, que as acasaladas com machos normais.

Tanto a aceleração no processo de oviposição, quanto à indução de um período refratário mais extenso na fêmea, são estratégias que machos de lepidópteros poligâmicos podem adotar, para garantir que os ovos depositados sejam fertilizados por seu esperma, antes que a parceira copule com outros. Da mesma forma, Vahed (1998) sugeriu que a manutenção de um espermátóforo maior ocorre em decorrência da competição de esperma dentro da fêmea e liberação de maior quantidade de substâncias inibidoras, entretanto, em alguns casos, poderia atuar como um investimento por parte do macho, favorecendo a fêmea ou a prole.

As vantagens da poliandria em lepidópteros são discutidas em diversos estudos (Arnqvist & Nilsson, 2000; Bergström *et al.*, 2002; Torres-Vila *et al.*, 2004), nos quais os autores concluem que, em geral, altos níveis de poliandria aumentam a oviposição e a fertilidade das fêmeas. Em espécies onde as fêmeas beneficiam-se com a quantidade de acasalamentos, o aumento da fecundidade pode ser devido não apenas ao elevado volume de células férteis, mas à expressiva demanda de estimulantes à oviposição e ao acúmulo de nutrientes extras recebidos do macho, que contribuem para a manutenção somática (Vahed, 1998).

O aumento na fecundidade foi observado em fêmeas de *C. pomonella*, quando copuladas mais de uma vez, apesar do número de ovos férteis não se alterar diante da maior disponibilidade de esperma recebida (Knight, 2007). Já em *Plodia interpunctella* (Hübner) (Pyralidae) (Cook, 1999) e *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Noctuidae) (Milano *et al.*, 2008) o número de espermatóforos recebidos pela fêmea não provocou variação na fecundidade. Em *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Noctuidae), Sadek (2001) observou que múltiplas cópulas com machos já acasalados foram vantajosas às fêmeas, elevando a fertilidade média destas, comparativamente àquelas que copularam apenas uma única vez com um macho virgem. Os autores ainda concluíram que, em campo, cópulas variadas com machos já acasalados são comuns e mais frequentes quando a quantidade de machos virgens é reduzida, induzindo as fêmeas à poliandria. Conforme Wedell *et al.* (2002), apesar do comportamento poliândrico ser determinado por componentes genéticos, a alteração no grau de poliandria de uma espécie pode ocorrer em resposta a certas necessidades, como escassez de recursos.

De acordo com Jiménez-Pérez *et al.* (2003), quando fêmeas de *C. jactatana* foram mantidas pareadas com o mesmo macho, e outras receberam machos virgens diariamente, ambos os grupos demonstraram fecundidade e fertilidade médias semelhantes. No entanto, as fêmeas do último grupo detiveram uma maior fecundidade diária e um menor período de oviposição, o que indicou uma aceleração na produção e na maturação dos ovos, influenciada pelo macho. Do mesmo modo, a proporção de ovos férteis das fêmeas que receberam machos virgens permaneceu constante no decorrer do tempo, independente da ocorrência de cópula diária, sugerindo que as fêmeas são capazes de controlar a necessidade de novas cópulas na maximização de seu sucesso reprodutivo.

As taxas de oviposição ainda podem ser alteradas negativamente com os múltiplos acasalamentos das fêmeas, como o observado em *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Noctuidae), onde as fêmeas apresentaram uma fecundidade reduzida quando acasaladas por mais de uma vez (Milano *et al.*, 2008). Os autores atribuíram o declínio da postura ao custo energético gerado pelas cópulas adicionais, além do estresse ocasionado pela presença e as investidas dos machos no momento em que as fêmeas realizavam as oviposições.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Criação de *Grapholita molesta*

A criação de *G. molesta* foi estabelecida no Laboratório de Biologia, Ecologia e Controle Biológico de Insetos da Faculdade de Agronomia (UFRGS), a partir de crisálidas provenientes do Laboratório de Entomologia da Embrapa Uva e Vinho (CNPUV).

Os insetos eram mantidos em sala climatizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$; $60 \pm 10\%$ U.R.; fotofase de 16 horas e luminância igual a 1,46 klx). Inicialmente, as crisálidas eram transferidas para gaiolas, confeccionadas com garrafas PET de 2 L, com a extremidade basal retirada e substituída por tecido tipo voile, fixado com atilho. A extremidade apical da garrafa era obstruída com algodão embebido em solução de mel a 15% e Nipagin® (metilparabeno) a 0,15%, fixado com a tampa da garrafa, o qual servia como substrato de alimentação. A cada dois dias, as gaiolas eram esvaziadas e as posturas, desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio a 15% (2 % de cloro ativo).

Porções das garrafas PET contendo os ovos eram dispostas, em recipientes plásticos de 500 mL, sobre a dieta artificial para lagartas, seguindo a metodologia proposta por Arioli *et al.* (2007). Quando as lagartas atingiam o último ínstar, os recipientes plásticos eram cobertos com gaze hidrófila (13 fios) para a crisalidação. Posteriormente, as crisálidas eram

removidas da gaze, desinfetadas com solução de água sanitária a 15% (2 % de cloro ativo). Aquelas a serem utilizadas nos bioensaios, eram separadas por sexo sob estereomicroscópio (aumento de 75 X), conforme Butt & Cantu (1979) e acondicionadas em recipientes plásticos de 500 mL, sobre algodão umedecido, até a emergência.

3.2 Descrição dos órgãos internos de reprodução de *G. molesta*

Após a emergência, indivíduos eram acondicionados em recipientes plásticos de 500mL contendo alimento em tubos de vidro com algodão dental. Para descrição, analisaram-se órgãos internos de reprodução de machos e fêmeas virgens, de um e de oito dias de idade, e de copulados, os quais após a emergência permaneceram pareados por oito dias até a dissecação. A confirmação da cópula era feita através da observação de ovos férteis (identificados pela cápsula cefálica da larva) depositados no frasco onde o casal havia sido confinado.

Foram dissecadas 39 fêmeas virgens com um dia, 20 fêmeas virgens com oito dias e 19 copuladas com oito dias de idade. Em relação aos machos, dissecou-se 34 virgens com um dia, 18 virgens com oito dias e 21 copulados com oito dias de idade. Os indivíduos foram mortos com acetato de etila e imediatamente dissecados em solução fisiológica, utilizando-se estereomicroscópio Wild M5. As estruturas foram mensuradas e desenhadas com auxílio de câmara clara e ocular micrométrica. A interpretação das figuras, assim como a maioria da terminologia empregada, foi baseada em Ferro & Akre (1975). Nas fêmeas foram medidos: ovários, ovidutos laterais e comum, bolsa copuladora e receptáculo seminal. Com exceção dos ovidutos, onde apenas o comprimento foi registrado, mensurou-se o comprimento e a largura dos órgãos, levando-se em conta os seus pontos mais

extremos. Nos machos, foi avaliado o comprimento das vesículas seminais, vaso deferente, vesícula seminal acessória, ducto ejaculatório duplo, glândula do ducto ejaculatório duplo, ducto ejaculatório simples e edeago, sendo nos testículos, considerado o maior diâmetro. Os valores médios obtidos de cada órgão foram comparados entre os diferentes grupos através do teste Kruskal-Wallis, ao nível de 5% de significância, no programa estatístico Bioestat 4.0 (Ayres *et al.*, 2006).

3.3 Avaliação das implicações da poliandria e da poliginia na performance reprodutiva de *G. molesta*

Os bioensaios foram conduzidos confinando-se, aos pares, machos e fêmeas em recipientes plásticos de 500 mL, com alimento. Os tratamentos avaliados foram os seguintes: 1) casal de até um dia de idade, que permaneceu junto por toda a vida (n = 35) (monogamia); 2) uma única fêmea com um macho virgem de até um dia de idade (n = 18) (poliandria); 3) uma única fêmea com um macho virgem de três dias de idade (n = 15) (poliandria); 4) um único macho com uma fêmea virgem de até um dia de idade (n = 15) (poliginia); 5) um único macho com uma fêmea virgem de até três dias de idade (n = 16) (poliginia). Todos os insetos virgens eram substituídos diariamente por outro de mesma condição. O número de ovos postos e o de férteis foram considerados como fecundidade e fertilidade, respectivamente.

Na avaliação da monogamia e poliandria, as posturas eram contabilizadas durante toda a vida das fêmeas. Os machos dos tratamentos 2 e 3 foram eliminados após o período de pareamento.

Na análise da poliginia, a fecundidade e fertilidade dos machos foram avaliadas indiretamente, pelo número de ovos das fêmeas mantidas com eles. Após o pareamento, cada fêmea permaneceu isolada em outro recipiente contendo alimento e diariamente, durante 15 dias, seus ovos eram verificados e contabilizados. A fecundidade e a fertilidade de cada macho poligínico foram estabelecidas, computando-se o número total de ovos depositados por cada fêmea que havia pareado com o macho, dividido pelo número de fêmeas que após o pareamento, sobreviveu por sete ou mais dias. Da mesma forma, apenas foram considerados apenas os ovos colocados durante os 15 primeiros dias de pareamento das fêmeas monogâmicas, possibilitando assim, a comparação entre os machos monogâmicos e poligínicos. Dos machos poligínicos foi possível também verificar o número de cópulas que realizaram durante o experimento, através do registro das fêmeas que depositaram ovos férteis.

Foram utilizados testes de Correlação de Pearson para avaliar a relação entre idade e número de cópulas dos machos. Os valores médios de fecundidade, fertilidade, período de oviposição e longevidade foram comparados entre os tratamentos pelo teste de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$). Para todas as análises foi utilizado o programa estatístico Bioestat 4.0 (Ayres *et al.*, 2006).

3.4 Avaliação do impacto da idade e de múltiplos acasalamentos no sucesso reprodutivo de *G. molesta*

Para todos os experimentos foram utilizados insetos de três dias de idade e virgens, que eram pareados em recipientes plásticos de 250 mL, e desde então observados

continuamente durante três horas e meia, antes da escotofase, registrando a ocorrência e o tempo de cópula. Foram realizados quatro experimentos com protocolos específicos, os quais estão descritos a seguir.

3.4.1 Bioensaio 1 - Avaliação do tempo de cópula, fecundidade, fertilidade e longevidade de fêmeas de *G. molesta* pareadas com machos virgens e recém-acasalados

Neste experimento o macho, após o término da primeira cópula, era imediatamente pareado com outra fêmea virgem e observado. Ao final de cada pareamento, as fêmeas que copulavam eram isoladas, individualmente, em frasco plástico de 500 mL contendo alimento, e mantidos em câmara climatizada. As posturas eram contabilizadas diariamente até a morte da fêmea. Foram avaliadas a fecundidade, fertilidade, longevidade e tempo de cópula de 38 fêmeas, sendo 19 acasaladas com machos virgens e as restantes com machos que haviam acasalado uma vez. Os tratamentos foram comparados pelo teste de Mann-Whitney.

3.4.2 Bioensaio 2- Avaliação do tempo de cópula, tamanho do espermátóforo, fecundidade, fertilidade e longevidade em fêmeas de *G. molesta* pareadas com machos virgens e de distintos históricos de acasalamento

Neste bioensaio, após o pareamento os machos que copulavam eram isolados e 24 horas depois recebiam outra fêmea virgem de três dias de idade. Deste modo, o processo foi repetido durante quatro dias consecutivos, resultando em quatro tratamentos de machos em sua primeira (n=45), segunda (n=38), terceira (29) e quarta (n=23) cópula. As fêmeas

copuladas eram isoladas em recipiente de 500 mL contendo alimento, sendo suas posturas acompanhadas durante 15 dias.

Um outro grupo de fêmeas, submetidas às mesmas condições descritas anteriormente, pareadas com machos na primeira (n= 37), segunda (n=26), terceira (18) e quarta (15) cópula destes foram dissecadas logo após o término do acasalamento, e o comprimento e largura do espermátóforo, mensurados. As médias foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis para todas as variáveis. A relação entre tamanho do espermátóforo e número de cópulas do macho foi testada pela Correlação de Pearson e Regressão Linear Simples.

3.4.3 Bioensaio 3- Análise da receptividade de fêmeas de *G. molesta* a cópulas adicionais após o acasalamento com machos virgens ou acasalados e efeitos deste comportamento na fecundidade, fertilidade e longevidade das fêmeas

Neste bioensaio dois grupos de fêmeas foram comparados, um de fêmeas virgens (n=34) de três dias de idade que copularam com machos virgens de mesma idade, e outro de fêmeas virgens (n=25) pareadas com machos que haviam acasalado no dia anterior. Após o primeiro acasalamento, todas as fêmeas passaram a receber, a cada 24 horas, um macho virgem de três dias de idade, com o qual permaneciam por três horas e meia. A proporção de cópulas entre os dois grupos de fêmeas foi comparada pelo teste Qui-Quadrado de heterogeneidade.

Em relação ao primeiro grupo, comparou-se fecundidade, fertilidade e longevidade das fêmeas que copularam apenas uma vez com as que copularam duas ou mais vezes. As médias foram comparadas através do teste Mann-Whitney.

3.4.4 Bioensaio 4- Influência da idade de *G. molesta* no tempo de cópula, fecundidade e fertilidade

No bioensaio, adultos virgens, de ambos os sexos, foram pareados quando apresentavam um (n = 35), três (n = 30), seis (n = 62), nove (n = 27) e 12 dias (n = 41) de idade. Após o período de pareamento, cada fêmea que copulava era isolada em um frasco plástico de 500 mL com alimento e mantida em câmara climatizada. As posturas eram contabilizadas e a fertilidade dos ovos registrada diariamente, até o décimo dia de vida.

As médias de fecundidade, fertilidade e tempo de cópula foram comparadas entre os tratamentos através do teste de Kruskal-Wallis, enquanto a relação entre variáveis foi avaliada pelo teste de Correlação de Pearson e Regressão Linear Simples.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Descrição dos órgãos de reprodução de *G. molesta*

4.1.1 Órgãos reprodutores da fêmea

Assim como na grande maioria dos lepidópteros, o sistema reprodutivo das fêmeas de *G. molesta* compõe-se das seguintes estruturas: um par de ovários e ovidutos laterais, oviduto comum, espermateca, glândulas acessórias, ducto seminal, receptáculo seminal, bolsa copuladora e óstio.

Durante a cópula, a fêmea recebe a vesícula do edeago através do óstio, a abertura da bolsa copuladora, localizada entre o sétimo e oitavo segmentos do abdome (Ferro & Akre, 1975). Conforme os autores citados, a bolsa divide-se em ducto, cérvix e corpo, sendo o último responsável por abrigar o espermátóforo logo após a cópula. O corpo da bolsa é revestido por músculos bem desenvolvidos e contém em seu interior duas estruturas esclerotizadas em forma de espinho, denominadas signo, que podem ter a função de auxiliar no posicionamento do espermátóforo (Ferro & Akre, 1975) ou na perfuração deste, permitindo a liberação do esperma (Cordero, 2005).

Verificou-se que a bolsa copuladora de *G. molesta* tem aspecto bulboso e que fêmeas virgens (Figura 2A e B) apresentam largura média significativamente menor que as

copuladas (1,11 mm) ($H= 26,54$; $GL= 2$; $P< 0,05$) (Figura 2C), sendo este valor próximo ao registrado para virgens de *L. pomonella* (1-1,5 mm) (Ferro & Akre, 1975). Em relação ao comprimento deste órgão, embora nos indivíduos copulados o valor médio tenha sido maior, não diferiu significativamente do das fêmeas virgens de um dia de idade ($H= 13,22$; $GL= 2$; $P> 0,05$) (Tabela 1). Em fêmeas copuladas, a bolsa copuladora apresentou um aspecto translúcido, inflado e endurecido, devido à presença do espermatóforo, enquanto que em fêmeas não copuladas seu formato era achatado e de aparência opaca. A diferença de coloração foi também observada em fêmeas de *L. caryana* (Walker *et al.*, 1967).

Ligada à bolsa encontra-se um receptáculo seminal, em forma de bulbo, que nos indivíduos virgens de um dia de idade (Figura 2A) apresentou valor médio de 1,19 mm de comprimento do ápice à base. Nos exemplares de oito dias (Figuras 2B e C) registrou-se um maior comprimento médio, entretanto, este aumento pode não estar relacionado ao status de cópula, pois esta não diferiu das copuladas ($H= 8,06$; $GL= 2$; $P> 0,05$). A largura média não diferiu de forma significativa entre os indivíduos de diferentes idades e status de cópula ($H= 1,56$; $GL= 2$; $P= 0,45$) (Tabela 1). Através do ducto seminal, o receptáculo seminal une-se ao oviduto comum, cujo comprimento médio é semelhante entre insetos virgens de diferentes idades e copulados ($H= 5,21$; $GL= 2$; $P= 0,07$). O oviduto comum liga-se em sua extremidade anterior com os ovidutos laterais e, na posterior, com o oviporo. Lateralmente, três aberturas são conectadas ao oviduto comum, sendo estas, o ducto seminal, a espermateca e a glândula acessória.

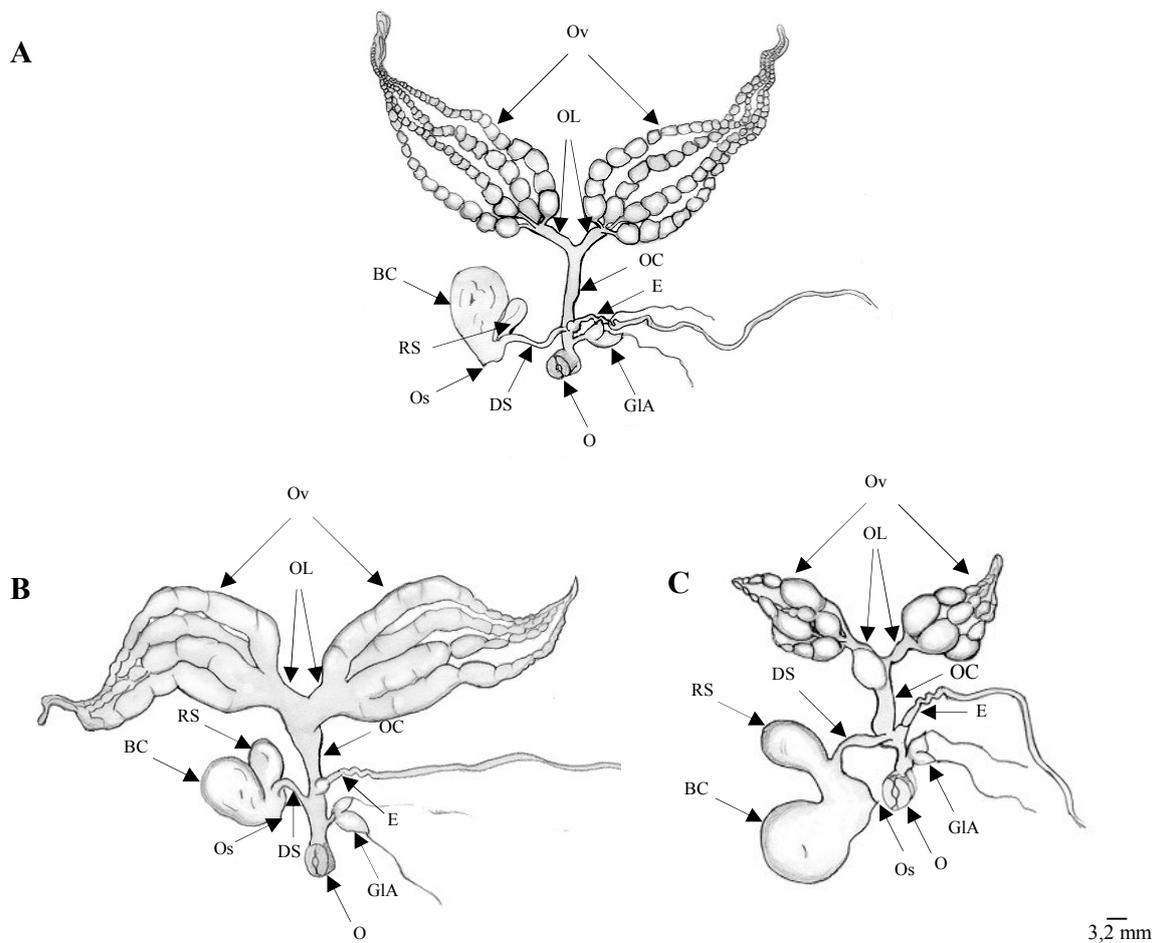


FIGURA 2. Órgãos reprodutores internos de fêmeas de *Grapholita molesta* em vista ventral. A. Virgem com um dia; B. Virgem com oito dias; C. Copulada com oito dias. Ovários (Ov); Ovidutos laterais (OL); Oviduto comum (OC); Bolsa copuladora (BC); Ostio da bolsa copuladora (Os); Receptáculo seminal (RS); Duto seminal (DS); Espermateca (E); Glândula acessória (GIA); Oviporo (O).

A espermateca é a estrutura que armazena o esperma até o momento da fertilização dos oócitos (Chapman, 1998). Em *G. molesta* tem um formato tubular, espiralado no terço anterior próximo ao oviduto comum, e é seguida por uma extensa glândula. Este aspecto também foi descrito para outros tortricídeos como *C. fumiferana* (Outram, 1971), *L. caryana* (Walker *et al.*, 1967) e *L. pomonella* (Ferro & Akre, 1975). Conforme Ferro & Akre (1975), a espermateca pode ser dividida em vesícula, reservatório e glândula da espermateca, sendo a primeira o local onde o esperma é inicialmente estocado após deixar o espermatóforo e migrar pelo ducto seminal. Em *C. fumiferana*, a análise histológica revelou diferentes tipos de organização celular ao longo do órgão, o que permite atividades distintas, desde o armazenamento à movimentação do esperma (Outram, 1971).

Logo abaixo da inserção da espermateca encontra-se a glândula acessória, com dois lobos que terminam em longos filamentos. Segundo Outram (1971), em *C. fumiferana* a estrutura dessa glândula é histologicamente semelhante à da espermateca. Callahan & Cascio (1963) sugerem que substâncias provenientes de tais glândulas podem ser utilizadas como meio de manutenção e locomoção do esperma pelos ductos. Outros estudos atribuem a esta estrutura a função de secretar substâncias responsáveis pela fixação dos ovos ao substrato (Walker *et al.*, 1967; Davis, 1968).

Os ovários são órgãos pareados, destacando-se como as estruturas mais conspícuas do sistema reprodutivo, sendo compostos por quatro ovariolos politróficos de coloração esbranquiçada. Verificou-se que os ovários reduziram-se em comprimento, devido ao amadurecimento dos oócitos e oviposição ao longo da vida, sendo os de fêmeas virgens com um dia de idade (Figura 2A) cerca de 1,6 vezes mais longos que os das copuladas com oito dias (Figura 2C). Com relação à largura do órgão, fêmeas virgens de oito dias de idade

apresentaram valores de ambos os ovários significativamente superiores aos dos demais grupos avaliados, sendo estes cerca de 20% maiores que em fêmeas copuladas de mesma idade (Tabela 1). Esta variação pode estar associada ao desenvolvimento e acúmulo de oócitos na base dos ovaríolos decorrente da ausência de cópula. Conforme Steigenga & Fischer (2007), em *Bicyclus anynana* (Butler) (Nymphalidae), apesar da cópula não induzir o desenvolvimento dos oócitos, esta acelera a oviposição. Sendo assim, fêmeas virgens, com o aumento da idade e ausência de cópula, tendem a reter seus oócitos por um maior período de tempo dentro do ovário.

O estímulo à oviposição, relacionado à cópula, pode ser desencadeado em *B. mori* através da sensibilização de gânglios abdominais localizados na junção do ducto seminal com o oviduto comum e pela presença de células espermáticas férteis (Karube & Kobayashi, 1999). Em *Z. diniana*, este evento é atribuído à presença do espermátóforo na bolsa copuladora e do esperma na espermoteca (Benz, 1969). Nos ovaríolos é possível identificar partes distintas, como as descritas para os demais membros da subordem Ditrysia. Na porção apical, que se liga ao diafragma, localiza-se o germário, que são ovogônias formadas por células germinativas, sendo estas seguidas pelo vitelo, que é constituído por células de reprodução misturadas às de nutrição (trofócitos). Na base dos ovaríolos, junto ao pedicelo, estão presentes os oócitos maduros (Chapman, 1998).

Os ovaríolos unidos formam o cálice que termina nos ovidutos laterais, estruturas tubulares, delicadas que conectam os ovários ao oviduto comum. O comprimento médio dos ovidutos laterais nas fêmeas recém-emergidas (Figura 2A) é significativamente maior que o das com idade mais avançada, independentemente do status de cópula. A união dos

ovidutos laterais dá origem ao oviduto comum, cujo comprimento médio não diferiu significativamente quanto à idade e status de cópula do inseto (Tabela 1).

TABELA 1. Valores médios (mm) (\pm EP) do comprimento dos ovidutos comum, direito e esquerdo, e dos comprimentos e das larguras da bolsa copuladora, receptáculo seminal e ovários direito e esquerdo de fêmeas de *Grapholita molesta* com um e oito dias de idade, virgens e/ou copuladas.

Órgão	Virgens		Copuladas	
	1 dia	8 dias	8 dias	
Bolsa copuladora	comprimento	1,56 \pm 0,113a* (n= 37)	1,47 \pm 0,127b (n= 20)	1,61 \pm 0,236a (n= 19)
	largura	0,97 \pm 0,114b	0,87 \pm 0,086c	1,11 \pm 0,260a
Receptáculo seminal	comprimento	1,19 \pm 0,096b (n= 36)	1,29 \pm 0,127a (n= 20)	1,29 \pm 0,195ab (n= 17)
	largura	0,45 \pm 0,051a	0,47 \pm 0,068a	0,48 \pm 0,135a
Oviduto comum	comprimento	1,83 \pm 0,224a (n= 34)	1,89 \pm 0,197a (n= 17)	1,75 \pm 0,211a (n= 17)
	largura	0,74 \pm 0,199a (n= 39)	0,55 \pm 0,108b (n= 20)	0,49 \pm 0,178b (n= 16)
Oviduto lateral direito	comprimento	0,88 \pm 0,219a (n= 28)	0,68 \pm 0,097b (n= 19)	0,64 \pm 0,133b (n= 16)
Oviduto lateral esquerdo	comprimento	5,25 \pm 0,851a (n= 24)	4,92 \pm 0,902a (n= 20)	3,10 \pm 0,892b (n= 16)
Ovário direito	largura	1,37 \pm 0,256b	1,66 \pm 0,240a	1,30 \pm 0,243b
	comprimento	5,22 \pm 1,037a (n= 25)	4,74 \pm 0,828a (n= 20)	3,26 \pm 0,801b (n= 16)
Ovário esquerdo	largura	1,40 \pm 0,281b	1,68 \pm 0,268a	1,28 \pm 0,192b

*Médias seguidas de mesma letra nas linhas são estatisticamente iguais ($\alpha=0,05$).

Considerando todas as estruturas observadas no sistema reprodutivo da fêmea de *G. molesta*, os ovários, a bolsa copuladora, o receptáculo seminal e os ovidutos laterais foram os órgãos que apresentaram modificações morfológicas no decorrer da fase adulta, sendo que nos ovários, estas estão relacionadas ao amadurecimento dos oócitos (Figura 2B). Em fêmeas copuladas verificou-se um aumento nas dimensões da bolsa copuladora, em

decorrência da presença de espermatozóides, e nos ovários, uma redução na largura e comprimento em função da oviposição (Figura 2C) (Tabela 1).

4.1.2 Órgãos reprodutores do macho

O sistema reprodutor dos machos é constituído por um par de testículos fundidos, vasos deferentes, vesículas seminais, vesículas seminais acessórias, ducto ejaculatório duplo, glândula do ducto ejaculatório duplo, ducto ejaculatório simples e edeago.

Em *G. molesta*, os testículos são de formato esférico, variando a coloração de amarelada à violeta, com ranhuras na superfície. O diâmetro médio desta estrutura é significativamente maior em exemplares recém-emergidos e virgens (Figura 3A) do que nos indivíduos virgens (Figura 3B) e copulados com oito dias de idade (Figura 3C) ($H=52,69$; $GL=2$; $P<0,05$) (Tabela 2).

A redução no tamanho dos testículos em função da idade foi também evidenciada por Brits (1979) em *P. operculella*, na qual o volume testicular passa de $0,919 \text{ mm}^3$ em machos recém-emergidos, para $0,228 \text{ mm}^3$ nos de sete dias de idade, os quais apresentaram dobrar nas paredes da estrutura. Os autores registraram nessa espécie, oito folículos testiculares durante toda a fase adulta, os quais são menos proeminentes em exemplares de idade avançada. Verificaram ainda, que os testículos são capazes de produzir esperma até a morte.

Os machos de tortricídeos, no primeiro dia da fase de pupa já possuem os órgãos do sistema reprodutivo totalmente formados, incluindo a fusão dos testículos pareados, que ocorre no último instar larval (Benz, 1991). Em *C. fumiferana*, Outram (1970) registrou

testículos de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro e cheios de esperma no final do sexto instar larval, sugerindo que o adulto é sexualmente maduro logo após a emergência.

TABELA 2. Valores médios (mm) (\pm EP) do comprimento dos testículos, vasos deferentes (1ª e 2ª partes) e vesículas seminais e acessórias, ducto ejaculatório duplo, glândula do ducto ejaculatório duplo, ducto ejaculatório simples e edeago de machos de *Grapholita molesta* com um e oito dias de idade, virgens e/ou copulados.

	Virgens		Copulados
	1 dia	8 dias	8 dias
Testículos	0,97 \pm 0,081a* (n= 34)	0,72 \pm 0,092b (n= 18)	0,65 \pm 0,105b (n= 21)
Vasos deferentes 1º parte	0,92 \pm 0,112a (n= 17)	0,88 \pm 0,092ab (n= 17)	0,79 \pm 0,151b (n= 20)
Vesículas seminais	0,78 \pm 0,185a (n= 18)	0,83 \pm 0,126a (n= 17)	0,77 \pm 0,142a (n= 20)
Vasos deferentes 2º parte	0,66 \pm 0,285a (n= 18)	0,45 \pm 0,148b (n= 17)	0,51 \pm 0,100ab (n= 21)
Vesículas seminais acessórias	0,42 \pm 0,061b (n= 18)	0,50 \pm 0,052a (n= 18)	0,45 \pm 0,062ab (n= 20)
Duto ejaculatório duplo	1,99 \pm 0,189b (n= 33)	2,31 \pm 0,211a (n= 16)	2,28 \pm 0,349a (n= 19)
Glândula do ducto ejaculatório duplo	7,79 \pm 0,987a (n= 33)	7,78 \pm 0,713a (n= 17)	7,06 \pm 0,978b (n= 22)
Duto ejaculatório simples	19,64 \pm 2,869b (n= 33)	23,79 \pm 4,225a (n= 15)	20,04 \pm 5,169b (n= 15)
Edeago	0,55 \pm 0,054a (n= 31)	0,52 \pm 0,043a (n= 18)	0,52 \pm 0,068a (n= 19)

*Médias seguidas de mesma letra nas linhas são significativamente iguais ($\alpha=0,05$).

As células de reprodução produzidas nos testículos movimentam-se em direção aos vasos deferentes, que são pares e estão ligados aos mesmos. Os vasos deferentes apresentam duas partes distintas, a primeira entre os testículos e as vesículas seminais é significativamente menor em indivíduos copulados com oito dias de idade (Figura 3C),

quando comparados com os virgens de um dia ($H= 8,42$; $GL= 2$; $P< 0,05$) (Figura 3A) (Tabela 2). Segundo Callahan & Cascio (1963), em Noctuidae esta parte pode ser considerada como uma porção da vesícula seminal, que funciona no armazenamento de esperma e secreções. Semelhante ao sugerido por Haniotakis & Summers (1968) para *P. transitella*, cujas vesículas, por terem epitélios semelhantes, são apenas distensões nodulares dos vasos deferentes. No entanto, em Tortricidae pode ser diferente, já que Outram (1971), observando *C. fumiferana*, demonstrou que existem algumas características histológicas distintas, não apenas entre a primeira parte dos vasos com as vesículas seminais, mas também desta com o restante dos vasos deferentes.

Contrariamente à maioria dos lepidópteros, os tortricídeos possuem dois pares de vesículas seminais responsáveis pelo armazenamento de esperma (Benz, 1991). As vesículas seminais em *G. molesta* possuem, em média, 0,78 mm de comprimento, não diferindo de tamanho entre insetos virgens e copulados com idades distintas ($H= 1,17$; $GL= 2$; $P= 0,554$) (Tabela 2). Este comprimento é cerca de 36% maior que o registrado para o noctuídeo *H. zea* (0,5 mm), apesar desse ser uma mariposa de maior porte (Callahan & Cascio, 1963). Tais vesículas são separadas pela segunda parte dos vasos deferentes, cujo comprimento médio, nos indivíduos recém-emergidos é de 0,66 mm.

Conectado às vesículas seminais acessórias está o duto ejaculatório duplo, no qual o esperma recebe secreções das glândulas acessórias antes de partir em direção ao duto ejaculatório simples (Walker *et al.*, 1967). O duto ejaculatório duplo de *G. molesta* é significativamente menor (1,98 mm) em indivíduos recém-emergidos (Figura 3A) que nos com oito dias de idade (2,3 mm) ($H= 17,82$; $GL= 2$; $P< 0,05$) (Figura 3B e C) (Tabela 2). Estes valores são semelhantes aos registrados para outros tortricídeos, como *C. fumiferana*

(2mm) (Outram, 1970) e *L. pomonella* (1,5 a 2mm) (Ferro & Akre, 1975). Além das secreções dessas glândulas, Outram (1970) observou no ducto ejaculatório duplo de *C. fumiferana* a presença de substâncias similares às encontradas nas vesículas seminais e nos vasos deferentes.

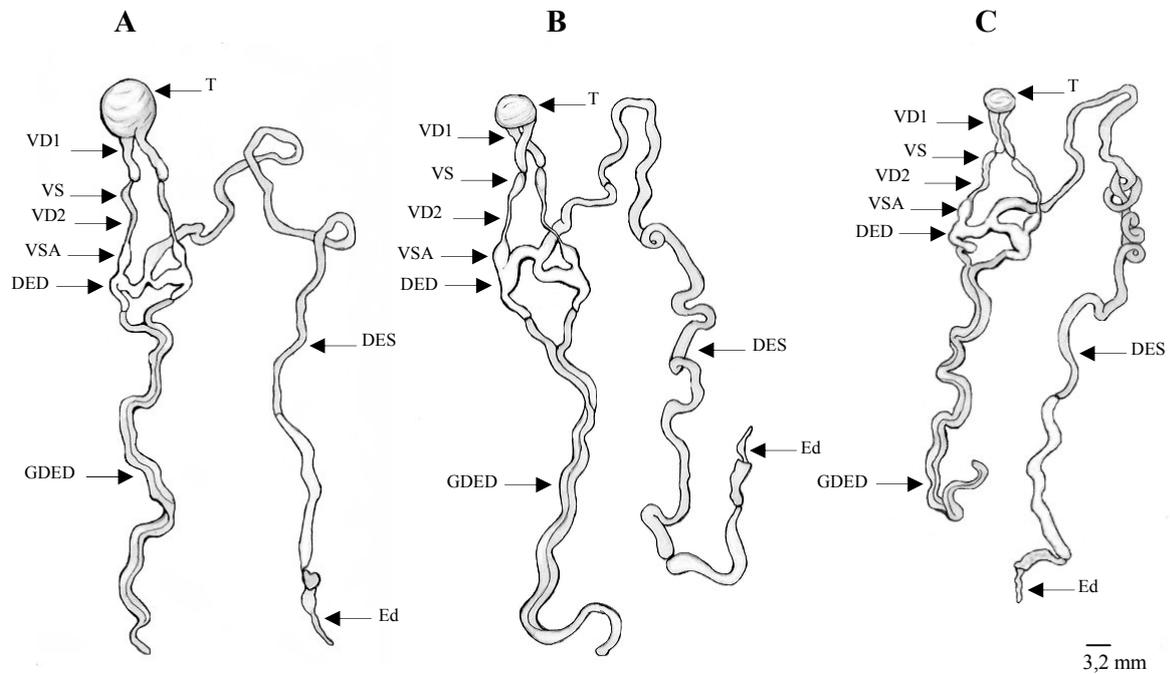


FIGURA 3. Órgãos reprodutores internos de machos de *Grapholita molesta*, em vista ventral. A. Virgem com um dia; B. Virgem com oito dias; C. Copulado com oito dias. Testículos (T); Vasos deferentes 1^a parte (VD1); Vesículas seminais (VS); Vasos deferentes 2^a parte (VD2); Vesículas seminais acessórias (VSA); Duto ejaculatório duplo (DED); Glândula do duto ejaculatório duplo (GDED); Duto ejaculatório simples (DES); Edeago (Ed).

As estruturas glandulares associadas aos órgãos masculinos têm a função de secretar substâncias, que são depositadas nas células espermáticas e auxiliam na formação do espermatóforo (Snodgrass, 1994). As glândulas do ducto ejaculatório duplo também podem conter substâncias que influenciam no comportamento de chamamento de fêmeas, como observado em *H. zea*, as quais após a cópula reduzem a liberação de feromônio (Kingan *et al.*, 1993). Tais glândulas em *G. molesta* são pareadas, firmemente unidas, e nos indivíduos copulados com oito dias de idade (Figura 3C) têm um comprimento médio significativamente menor (7,06 mm), que o dos indivíduos virgens (H= 8,22; GL= 2; P< 0,05) (Figura 3A e B) (Tabela 2). Em *L. pomonella* esta estrutura é maior, medindo de 11 a 14 mm de comprimento, e 0,2 e 0,05 mm de diâmetro na base e ápice, respectivamente (Ferro & Akre, 1975). Em *C. fumiferana*, Outram (1970) registrou um comprimento ainda maior, de 16- 20 mm, e três regiões secretoras histologicamente distintas, circundadas por uma única camada de músculo longitudinal e outra de músculos circulares, por toda a extensão.

O ducto ejaculatório simples é um canal longo cujo comprimento médio, em exemplares recém-emergidos (19,64 mm) (Figura 3A), é diferente dos virgens de oito dias de idade (H= 10,62; GL= 2; P< 0,05) (Figura 3B) (Tabela 2). Esta estrutura parte do ducto ejaculatório duplo e termina no edeago, onde se torna mais opaco que a parte restante, porém não se constatou diferenças quanto à coloração entre os grupos avaliados. Em comparação com o de outros tortricídeos como *C. fumiferana*, cujo comprimento varia de 25 – 32 mm (Outram, 1970), pode-se dizer que na mariposa-oriental esta estrutura é reduzida. Em *L. pomonella*, Ferro & Akre (1975) observaram duas partes distintas neste ducto uma porção anterior, que inicia no ducto ejaculatório duplo e termina numa constrição,

considerada o local onde substâncias que originarão o espermatozóide são secretadas, e uma posterior que inicia a partir desta e termina no edeago. Outra divisão foi proposta por Outram (1970), para *C. fumiferana*, na qual a diferenciação foi baseada nas distintas secreções encontradas em cada uma das sete partes separadas pelo autor, apesar da similaridade histológica entre elas. Em *P. transitella*, o ducto ejaculatório simples é dividido em quatro partes, de acordo com os tipos de células observadas ao longo do órgão (Haniotakis & Summers, 1968). O segmento final do ducto ejaculatório simples conecta-se ao edeago, que fica protegido externamente por estruturas esclerotizadas da genitália. O edeago possui interiormente a vesícula, órgão que é introduzido na fêmea durante a cópula.

O sistema reprodutivo dos machos de *G. molesta* demonstrou modificações relacionadas à idade em indivíduos virgens, nas dimensões dos testículos, na segunda parte dos vasos deferentes, nas vesículas seminais acessórias e nos ductos ejaculatórios duplo e simples. Em insetos copulados observou-se diminuição do tamanho da glândula do ducto ejaculatório duplo e do ducto ejaculatório simples (Tabela 2).

4.2 Implicações da poliandria e da poliginia na performance reprodutiva de *G. molesta*

4.2.1 Implicações da poliandria na performance reprodutiva de *G. molesta*

A fecundidade média das fêmeas de *G. molesta* foi semelhante em todos os grupos avaliados ($H= 3,84$; $GL= 2$; $P= 0,146$) (Tabela 3). Este resultado discorda do verificado por Torres-Vila & Jennions (2005), os quais constataram que das 25 espécies de lepidópteros pesquisadas, em 22 delas as fêmeas tenderam a elevar a fecundidade, quando copuladas por

machos virgens, em função de uma maior quantidade de material ejaculado na primeira cópula do macho. No entanto, em *C. pomonella* observa-se comportamento semelhante ao registrado no presente estudo. Nesta espécie, a fecundidade e a viabilidade dos ovos de fêmeas pareadas com machos virgens e acasalados várias vezes, em intervalos de 24 horas, não se alterou, apesar do tamanho do espermátforo transferido na primeira cópula ser significativamente maior (Knight, 2007).

TABELA 3. Médias de fecundidade e fertilidade (\pm EP) de fêmeas de *Grapholita molesta* pareadas sob condições de monogamia e poliandria com machos de um e três dias de idade.

	Monogamia	Poliandria (♂ 1dia)	Poliandria (♂ 3dias)
Fecundidade	223,4 \pm 14,55 a*	195,5 \pm 22,36 a	258,9 \pm 12,67 a
Fertilidade	201,1 \pm 16,48 ab	136,7 \pm 24,11b	245,6 \pm 13,56 a

* Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem significativamente ($\alpha=0,05$)

A fertilidade média de fêmeas pareadas com machos de três dias de idade não diferiu das que permaneceram com o mesmo parceiro, porém foi superior a das acasaladas com machos de um dia de idade ($H=9,88$; $GL=2$; $P<0,05$) (Tabela 3). Sendo assim, é possível supor que a falta de maturação reprodutiva de machos com um dia, pode ter subestimado a avaliação da capacidade reprodutiva da fêmea, uma vez que machos recém-emergidos podem ser menos aptos à cópula que os com três dias de vida.

Embora, machos de algumas espécies de lepidópteros já apresentem células de reprodução em estágio avançado de maturação logo após a emergência, são necessários

estímulos hormonais para a liberação de esperma dos testículos, sendo estes dependentes do ritmo circadiano de cada espécie (Benz, 1991; Giebultowicz & Brooks, 1998). A alteração dos níveis hormonais no decorrer da fase adulta pode influenciar na fisiologia dos órgãos reprodutivos do inseto, podendo estes, por exemplo, serem importantes na síntese de proteínas nas glândulas acessórias (Happ, 1992). No entanto, em machos de *G. molesta*, a resposta eletrofisiológicas não se altera do primeiro ao 13º dia de vida dos insetos (Altafini, 2008). Já em machos de *A. ipsilon*, Anton & Gadenne (1999) constataram, que a percepção eletrofisiológica ao feromônio sexual é baixa logo após a emergência, sendo dependente do aumento dos níveis de hormônio juvenil presente na hemolinfa do inseto. Resultado semelhante foi observado por Foster *et al.* (1995) para *C. herana*. Nesta espécie, a atração ocorreu somente após um dia de idade do macho, intensificando-se do terceiro ao quinto e reduzindo-se posteriormente. No entanto, a relação entre a idade e a percepção eletrofisiológica ao feromônio pode variar. Os mesmos autores observaram que machos de *C. obliquana* responderam ao feromônio sexual na mesma proporção durante uma semana, enquanto que em *E. postvittana* machos e fêmeas foram mais receptivos no terceiro dia de idade.

A semelhança entre a fertilidade média de fêmeas monogâmicas e poligâmicas, que receberam machos virgens diariamente, durante toda a vida, também foi verificada por Cook (1999) em *P. interpunctella*. O número médio de ovos férteis não diferiu comparativamente às acasaladas com machos já copulados anteriormente. Segundo o autor, a quantidade de espermatóforos recebidos não alterou significativamente a média de fertilidade, enfatizando ainda que machos virgens, embora tenham fornecido em apenas uma cópula, em média, três vezes mais eupirene que os já copulados, em ambos os casos

apenas um evento foi suficiente para fertilizar todos os ovos. O autor discute que o excedente de conteúdo espermático transferido para a fêmea seria vantajoso ao macho na competição espermática e supressão da receptividade da parceira.

O padrão de oviposição de fêmeas de *G. molesta* pareadas sob condições de monogamia e poliandria foi semelhante (Figura 4). Em todos os tratamentos houve um pico de posturas no terceiro dia, indicando que, independentemente dos fatores avaliados, o período de maior oviposição é de 24 a 48 horas após a primeira cópula. Além disso, avaliando-se o período (dias) em que ovos férteis foram depositados, não foi constatada diferença ($H= 2,30$; $GL= 2$; $P = 0,316$) entre fêmeas monogâmicas ($10,5 \pm 0,85$), pareadas com machos de um dia ($12,8 \pm 1,58$) e de três dias de idade ($11,5 \pm 0,54$).

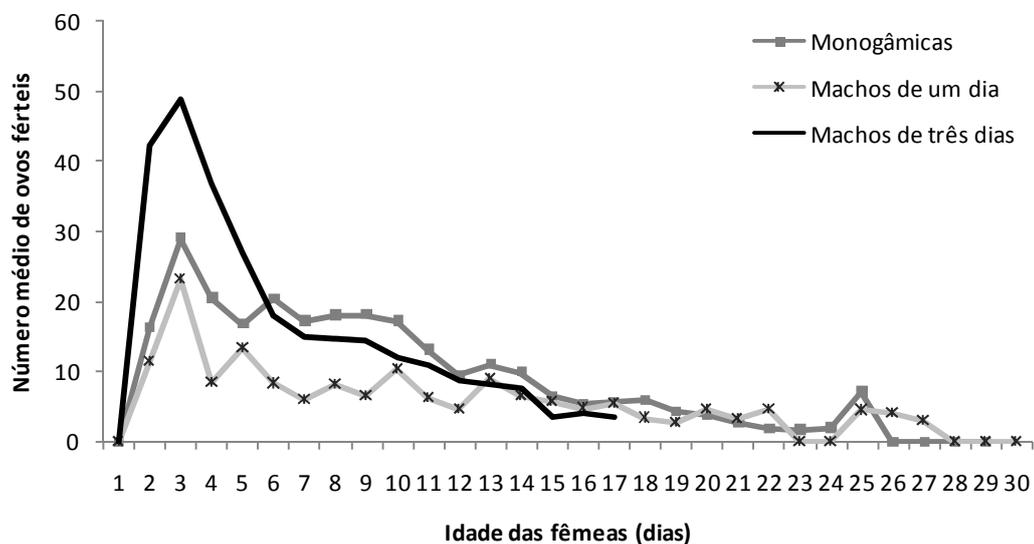


FIGURA 4. Número médio diário de ovos férteis de fêmeas de *Grapholita molesta* pareadas sob condições de monogamia e poliandria com machos de um e três dias de idade.

A ocorrência de um reduzido número de cópulas já mencionado anteriormente para fêmeas pareadas com machos de um dia, pode ter contribuído para uma maior longevidade destas ($17,88 \pm 1,26$ dias), a qual foi significativamente semelhante nas pareadas com machos de três dias ($13,47 \pm 0,78$) e maior que nas monogâmicas ($13,44 \pm 1,11$ dias) ($H=5,25$; $GL=2$; $P=0,072$). Em *H. virescens*, as fêmeas emergem com reservas nutricionais para manutenção de moderada produção de ovos e sobrevivência. No entanto, se ocorre uma maior frequência de cópulas durante o período de maturação dos oócitos, a oviposição é estimulada, alterando o padrão de distribuição nutricional pela realocação de reservas para uma postura extra, reduzindo assim a longevidade da fêmea (Proshold *et al.*, 1982).

4.2.2 Implicações da poliginia na performance reprodutiva de *G. molesta*

A fecundidade ($H=17,72$; $GL=2$; $P<0,05$) e fertilidade ($H=22,47$; $GL=2$; $P<0,05$) médias das fêmeas pareadas com os machos até o 15º dia de vida destes foram significativamente menores naquelas de um e três dias de idade pareadas com machos poligínicos, em comparação com as mantidas com apenas um parceiro (monogâmicos) (Tabela 4). O menor número de ovos das fêmeas mantidas com machos poligínicos pode ser em decorrência de pareamentos que não resultaram em cópula, e assim reduziram a média total. Considerando que até o 15º dia de vida dos machos houve 206 pareamentos com fêmeas de um dia de idade e 202 com as de três dias, e dentre estes apenas 80 (38,8%) e 126 (62,3 %) das fêmeas foram, respectivamente copuladas. O restrito número de cópulas com fêmeas mais jovens pode estar relacionado à menor emissão de feromônio destas, como foi observado em estudos com quatro espécies de tortricídeos por Foster *et al.* (1995).

Conforme os autores, a maior atratividade de machos às fêmeas ocorre a partir do segundo dia, provavelmente em função da elevada concentração de feromônio na glândula destas.

TABELA 4. Médias de fecundidade e fertilidade (\pm EP) de fêmeas de *Grapholita molesta* pareadas com machos monogâmicos ou poligínicos, avaliadas durante 15 dias.

	Monogamia	Poliginia (♀ 1dia)	Poliginia (♀ 3dias)
Fecundidade	210,6 \pm 12,64 a	102,65 \pm 10,98 b	99,55 \pm 3,82 b
Fertilidade	190,4 \pm 14,81 a*	73,15 \pm 12,03 b	81,79 \pm 4,45 b

* Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem significativamente ($\alpha=0,05$)

A longevidade média (dias) dos machos poligínicos pareados com fêmeas de um dia de idade foi significativamente maior ($27,86 \pm 2,90$) que a dos monogâmicos ($16,70 \pm 1,21$) e dos pareados com as de três dias de idade ($15,94 \pm 1,61$) ($H=11,68$; $GL=2$; $P < 0,05$). A maior longevidade dos machos pareados com fêmeas de um dia pode ser em função de que 61,2 % delas não terem sido copuladas, proporcionando assim, um menor gasto energético aos machos deste grupo. Estes resultados corroboram os apresentados por McNamara *et al.* (2008), os quais fizeram uma análise dos benefícios da poligamia em *Cadra cautella* (Walker) (Pylalidae) e sugeriram que o custo dos machos na atividade reprodutiva, como a produção do ejaculado, incorre em uma redução no tempo de vida destes.

Com relação à idade reprodutiva do macho, o maior número de fêmeas copuladas foi registrado quando estes apresentavam de três a oito dias de idade, em ambos os tratamentos (Figura 5). Verificou-se uma correlação negativa entre a idade do macho e o

número de fêmeas copuladas tanto de um ($r = -0,621$; $GL = 23$; $P = 0,0009$) quanto de três dias de idade ($r = -0,786$; $GL = 27$; $P < 0,0001$).

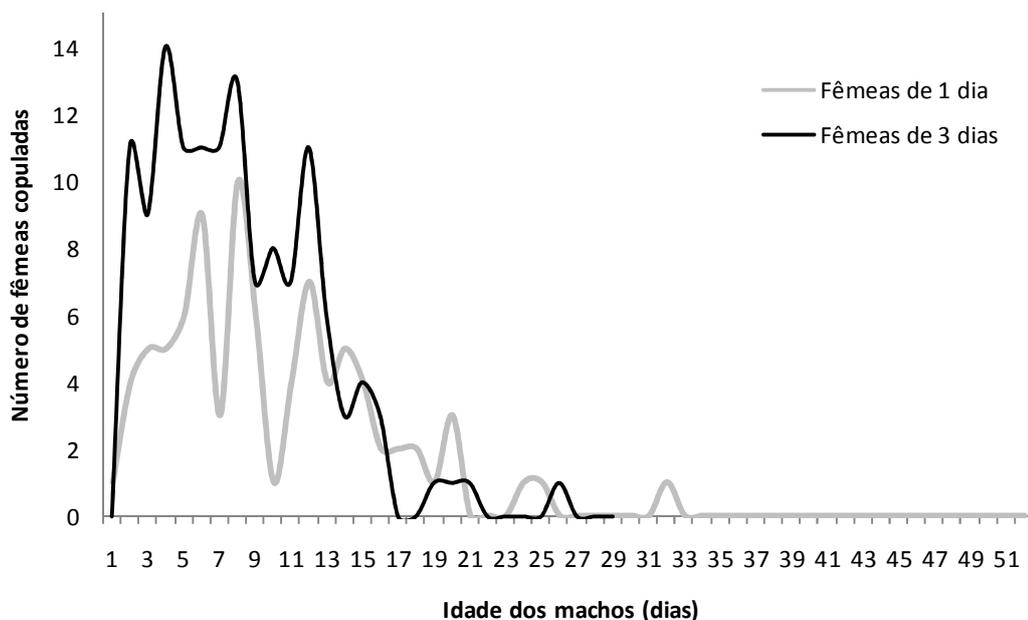


FIGURA 5. Número diário de fêmeas de *Grapholita molesta* copuladas por machos poligínicos ao longo da vida.

A fecundidade média foi semelhante entre as fêmeas pareadas com os machos do primeiro ao 15º dia de vida deste, nos grupos poligínicos ($H = 9,40$; $GL = 4$; $P = 0,051$). Os maiores valores médios de fertilidade foram registrados para as fêmeas que estiveram com os machos a partir do quarto dia de vida. Nas fêmeas de um dia de idade, a fertilidade somente diferiu entre as pareadas com machos cujas idades estavam entre os períodos de um a três e de quatro a seis dias de vida ($H = 18,35$; $GL = 4$; $P < 0,05$). No tratamento em que os machos recebiam fêmeas de três dias, os maiores valores de fertilidade foram registrados

quando estes tinham de quatro a nove dias, diferindo somente dos períodos extremos ($H=21,4$; $GL=4$; $P<0,05$) (Figura 6). Os resultados sugerem que os machos de *G. molesta* possuem uma capacidade reprodutiva estável por um longo período de tempo.

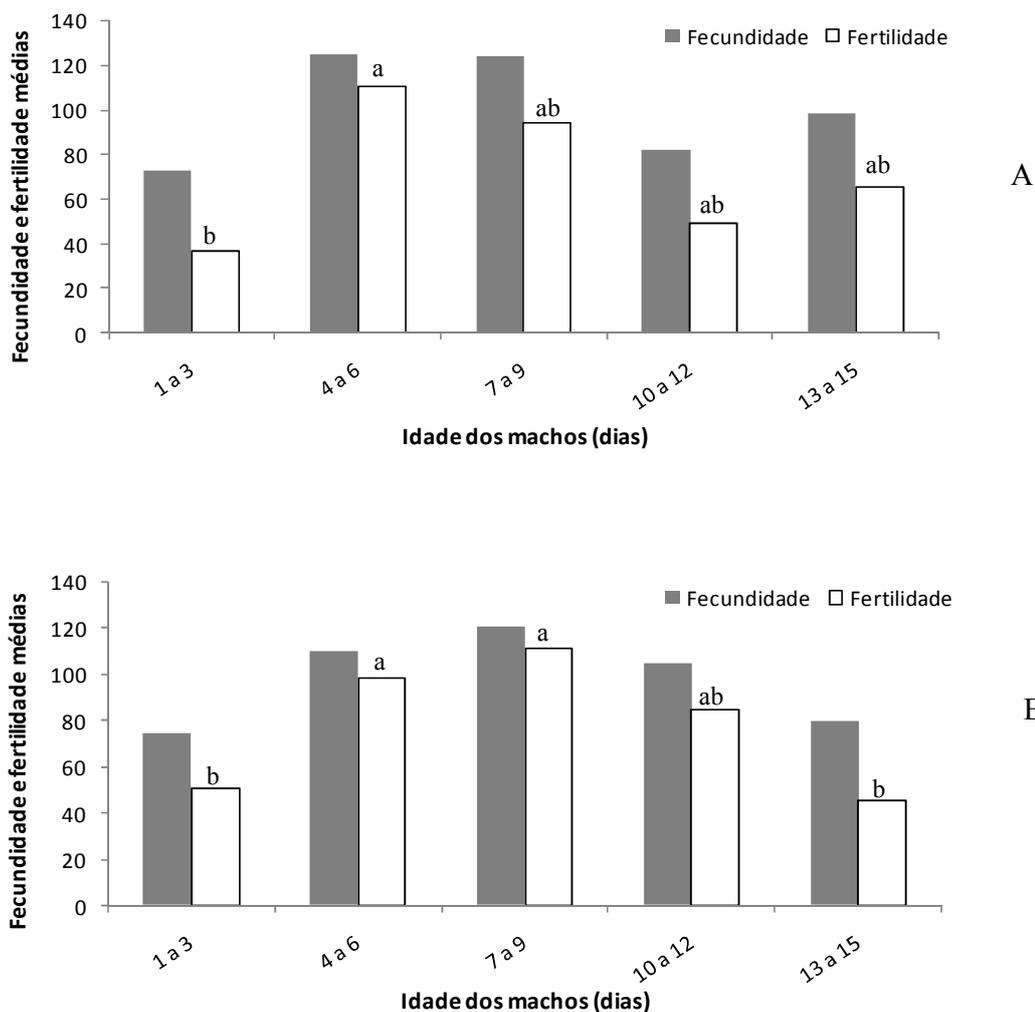


FIGURA 6. Médias de fecundidade e fertilidade das fêmeas de *Grapholita molesta* de um (A) e três (B) dias de vida, pareadas durante os primeiros 15 dias de vida dos machos. Letras distintas nas barras referentes à fertilidade indicam diferença estatística entre as médias ($\alpha=0,05$).

Foster & Ayres (1996) observaram que em machos de *E. postvittana* avaliados até o 15º dia de vida, a proporção de ovos férteis das fêmeas não é afetada pela idade destes. No entanto, resultado contrário foi evidenciado em *C. pomonella*, onde a fecundidade e fertilidade foram reduzidas quando fêmeas eram pareadas com machos de um e sete dias, sendo os maiores valores registrados para os de dois e três dias de idade (Knight, 2007).

A relação entre a fertilidade e a idade dos machos pode estar associada à quantidade de conteúdo espermático recebido pela fêmea durante a cópula. Apesar dos machos já emergirem com o sistema reprodutor totalmente formado e repleto de células espermáticas, como foi verificado por Benz (1991) em tortricídeos, a maturação e o volume destas alteram-se durante a fase adulta. Além da idade, a redução da capacidade de reprodução dos machos de *G. molesta* após certo período, pode também ter sofrido a influência do número de cópulas que estes mantiveram ao longo da vida. Em alguns tortricídeos, como *C. fumiferana* e *C. rosaceana* (Harris), o percentual de ovos férteis reduz-se quando as fêmeas copulam com machos já previamente acasalados, devido a uma diminuição linear de esperma e de substâncias provenientes das glândulas acessórias dos machos, observada na bolsa copuladora da fêmea, à medida que o número de acasalamentos prévios do macho aumenta (Marcotte *et al.*, 2005).

De maneira geral, constataram-se diferentes implicações da poligamia entre os dois sexos de *G. molesta*. As fêmeas não necessitam de cópulas com machos adicionais e virgens para elevar suas taxas de fertilidade e possuem um mesmo padrão de oviposição independentemente do número e da idade dos parceiros. Os machos, a partir do terceiro dia de vida, demonstram aptidão em copular um grande número de fêmeas, mantendo-se férteis por um longo período de tempo.

4.3 Impacto da idade e de múltiplos acasalamentos no sucesso reprodutivo de *G. molesta*

4.3.1 Bioensaio 1

Dentre os machos acasalados, 33,3% voltaram a copular, em média, 32 minutos depois do início do segundo pareamento. O tempo da primeira cópula variou de 28 a 47 minutos e o da segunda de 122 a 1.110 minutos, sendo esta, significativamente maior que a primeira ($U= 0$; $P< 0,0001$) (Tabela 5). A evidência de um tempo de cópula mais extenso em insetos já acasalados foi registrado também em outras espécies de lepidópteros como *C. pomonella* (Howell *et al.*, 1978), *C. fumiferana* (Marcotte *et al.* 2005), *Pieris rapae* (Pieridae) (Linnaeus) (Bissoondath & Wiklund 1996) e *Jalmenus evagoras* (Donovan) (Lycaenidae) (Hughes *et al.*, 2000).

Em machos de *G. molesta*, a duração da segunda cópula foi, em média, 15 vezes maior que a da primeira, talvez em função da indisponibilidade momentânea de ejaculado. Conforme Oberhauser (1988), a maior duração das cópulas consecutivas pode ser em decorrência da diminuição na quantidade de substâncias como proteínas, provenientes das glândulas acessórias do macho, o qual necessitaria de um maior intervalo para produzi-las.

A variação no tempo de cópula não se refletiu na fecundidade ($U= 122,5$; $P= 0,141$), fertilidade ($U= 125$; $P= 0,162$) e longevidade ($U= 137$; $P = 0,204$) das fêmeas que copularam com machos de distinto status, as quais foram semelhantes nos dois grupos (Tabela 5). A manutenção de fertilidade invariável em mais de um acasalamento é uma característica relacionada, em grande parte, aos sistemas poligâmicos (Bissoondath & Wiklund, 1996).

TABELA 5. Médias (\pm EP) de fecundidade, fertilidade, longevidade (dias) e tempo de cópula (min) de fêmeas pareadas com machos de *Grapholita molesta* virgens (n = 19) e previamente copulados (n = 19).

	Fecundidade	Fertilidade	Longevidade	Tempo
Virgens	115,4 \pm 11,38 a*	102,6 \pm 11,58 a	13,9 \pm 1,07 a	35,7 \pm 1,25 b
Copulados	92,7 \pm 16,36 a	78,0 \pm 17,41 a	15,4 \pm 0,70 a	527,8 \pm 50,29 a

* Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem significativamente ($\alpha=0,05$)

4.3.2 Bioensaio 2

O tempo médio (min) da primeira cópula foi significativamente menor que o das demais ($H=7,43$; $GL=3$; $P<0,05$) (Tabela 6). Este resultado também foi evidenciado em *C. pomonella*, onde o período variou em função do número de cópulas do macho, sendo o tempo médio de 37 min na primeira cópula e de 76 na quarta (Howell *et al.*, 1978). No mesmo estudo os autores considerando apenas o primeiro acasalamento, observaram que as cópulas que duravam mais de 30 min resultavam geralmente em maiores espermatozóides, enquanto os menores eram oriundos das que atingiam no máximo 25 minutos. No presente estudo não foi constatado a relação entre o tamanho do espermatozóide e o tempo de cópula.

TABELA 6. Médias (\pm EP) de fecundidade, fertilidade, longevidade (dias) e tempo de cópula de fêmeas pareadas com machos de *Grapholita molesta* virgens e de distintos eventos de acasalamento (n= número de casais).

Cópulas	Fecundidade	Fertilidade	Longevidade	Tempo
1° (n= 49)	155,8 \pm 8,66 a*	152,1 \pm 9 a	17,1 \pm 0,92 a	34,8 \pm 2,62 b
2° (n= 39)	156,6 \pm 8,45 a	155,6 \pm 8,59 a	17 \pm 1,05 a	95,1 \pm 14,84 a
3° (n= 29)	151,6 \pm 11,82 a	150,4 \pm 11,72 a	16,9 \pm 1,10 a	104,8 \pm 17,90 a
4° (n= 23)	130,5 \pm 13,75 a	129,5 \pm 13,90 a	15,1 \pm 1,26 a	81,9 \pm 14,26 a

* Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem significativamente ($\alpha=0,05$)

Quando comparado o tamanho do ejaculado transferido pelo macho, o espermátóforo oriundo da primeira cópula foi significativamente maior que os demais, no comprimento ($1,43 \pm 0,10$ mm) ($H= 71,93$; $GL= 3$; $P< 0,05$) e na largura ($0,83 \pm 0,11$ mm) ($H= 55,55$; $GL= 3$; $P< 0,05$), sendo os transferidos nas demais cópulas, iguais entre si (Tabela 7). Jiménez-Pérez & Wang (2004b) também registraram em machos de *C. jactatana* uma redução na massa de esperma após a primeira cópula, mesmo com tempos indistintos em consecutivos acasalamentos.

Evidenciou-se no presente estudo uma correlação negativa entre o número de cópulas realizadas pelo macho com o comprimento ($r= - 0,785$; $GL= 95$; $P< 0,0001$) e largura ($r= -0,681$; $GL= 95$; $P< 0,0001$) do espermátóforo, onde ambas as dimensões ($F= 152,91$; $R^2= 61,28\%$; $P< 0,0001$) ($F= 82,07$; $R^2= 45,79\%$; $P< 0,0001$) apresentaram uma variação significativa em função do status de cópula do macho (Figura 7). Segundo Boggs *et al.* (2003), em lepidópteros, apesar dos machos realizarem cópulas subseqüentes mesmo não tendo quantidade adequada de ejaculado, a paternidade da prole em um maior número de fêmeas é garantida.

TABELA 7. Médias (\pm EP) de comprimento (mm) e largura (mm) do espermátóforo transferido para fêmeas por machos de *Grapholita molesta* virgens e de distintos status de acasalamento (n= número de casais).

Cópulas	Comprimento	Largura
1° (n= 37)	$1,4 \pm 0,01$ a*	$0,8 \pm 0,01$ a
2° (n= 26)	$1,0 \pm 0,02$ b	$0,7 \pm 0,01$ b
3° (n= 18)	$1,1 \pm 0,03$ b	$0,7 \pm 0,01$ b
4° (n= 15)	$0,9 \pm 0,01$ b	$0,6 \pm 0,02$ b

* Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem significativamente ($\alpha= 0,05$)

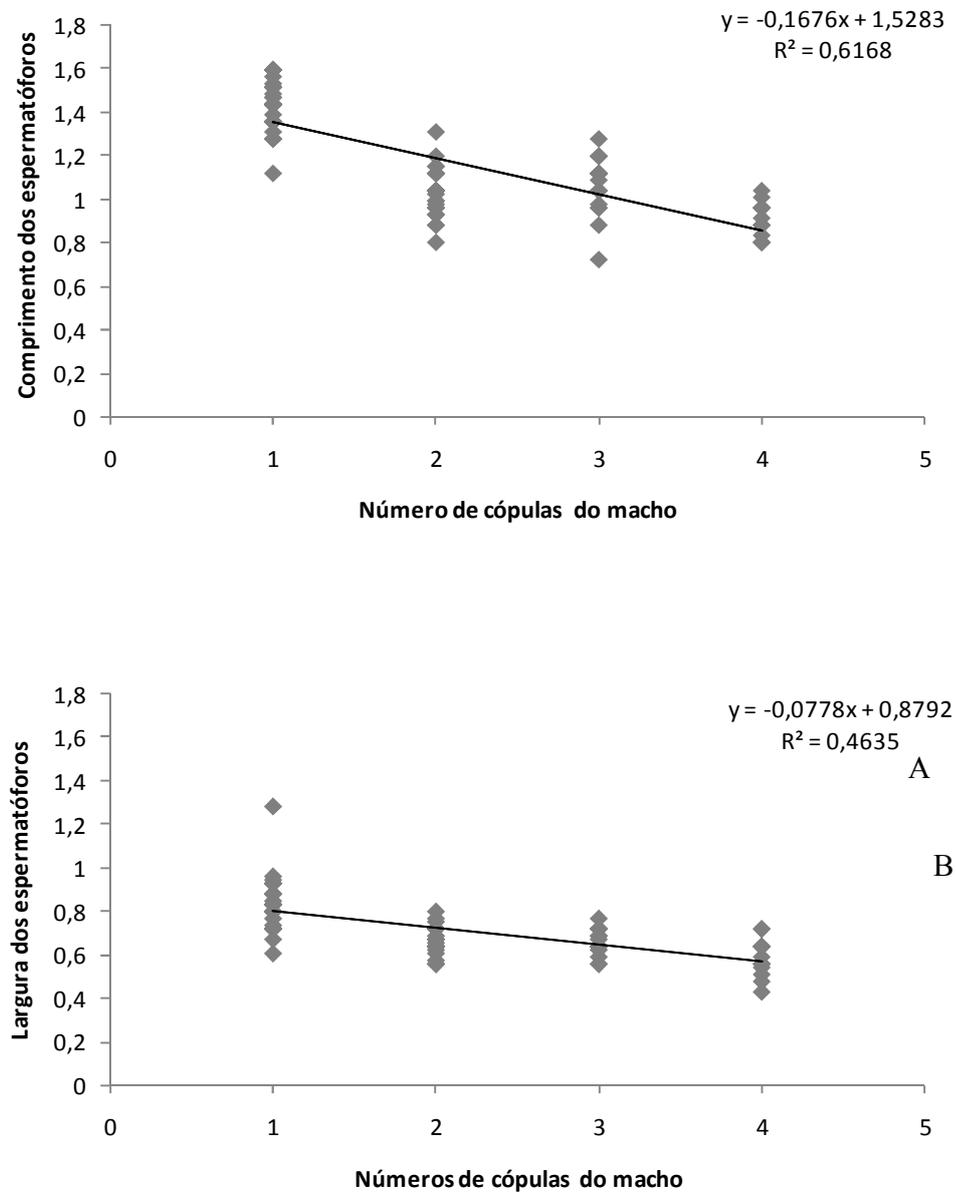


FIGURA 7. Comprimento (mm) (A) e largura (mm) (B) dos espermatozoides em relação ao número de cópulas de machos de *Grapholita molesta*.

Apesar da variação no tempo de cópula e na quantidade de esperma, eventos sucessivos não afetaram significativamente a fecundidade ($H = 2,787$; $GL = 3$; $P = 0,425$), a

fertilidade ($H= 2,361$; $GL= 3$; $P= 0,501$) e a longevidade ($H= 1,795$; $GL= 3$; $P= 0,616$) das fêmeas pareadas com machos virgens, em comparação com aquelas pareadas com machos de distintos históricos de acasalamento (Tabela 6).

A alteração no tamanho do espermátóforo não interferiu no número de ovos férteis depositados, como observado em *P. interpunctela*, por Cook (1999), e em *C. pomonella*, por Knight (2007). Estes resultados indicam que a quantidade de ejaculado não interfere no sucesso reprodutivo destes insetos. A manutenção da fertilidade pode ser em função da transferência de células espermáticas férteis em quantidade superior ao número de oócitos produzidos pela fêmea, mesmo quando o macho deposita menor ejaculado (Marcotte *et al.*, 2005).

No entanto, em algumas espécies o tamanho do espermátóforo pode intervir diretamente na fertilidade. Em *C. jactatana*, o espermátóforo transferido na segunda cópula foi 45% menor que o da primeira, reduzindo a fertilidade em aproximadamente 23% (Jiménez-Pérez & Wang, 2004b). O mesmo foi observado em fêmeas de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Gelechiidae), as quais reduziram a fertilidade de 97 para 50% após copularem com machos virgens e acasalados 11 vezes, respectivamente (Silva, 2008). Segundo Foster & Ayres (1996), mesmo quando a diminuição do espermátóforo em função de cópulas sucessivas não altera a fertilidade, esta pode interferir na capacidade do ejaculado em inibir a aceitabilidade das fêmeas a cópulas consequentes.

4.3.3 Bioensaio 3

Uma proporção significativamente maior de fêmeas (84%) foi receptiva a cópulas adicionais quando pareadas com machos já acasalados, em comparação com aquelas

copuladas por machos virgens (32,4%) ($\chi^2 = 26,3$; GL= 4; $P < 0,001$). A maior parte das fêmeas (67,6%) que havia copulado com machos virgens não copulou novamente. Dentre as pareadas com machos já acasalados, a maioria (44%) realizou três cópulas (Figura 8).

A permanência da receptividade da fêmea após a cópula com macho já acasalado também foi verificado em fêmeas de *E. postvittana*, que ao copularem com machos virgens demoraram mais para reiniciarem o chamamento (Foster & Ayres, 1996). Tendo em vista que machos acasalados transferem um menor ejaculado (Marcotte, 2005), tal evento pode ser atribuído a menor quantidade de secreções das glândulas acessórias masculinas e células de apirene, as quais podem agir de forma a determinar o período refratário da fêmea, reduzindo ou até mesmo cessando a liberação de feromônio (Kingan *et al.*, 1993). Enquanto, em outras espécies de tortricídeos, como *C. fumiferana* e *C. rosaceana*, o tamanho do espermátóforo recebido não interferiu na receptividade da fêmea à recópula (Marcotte *et al.*, 2003, Jiménez-Pérez *et al.*, 2003).

Levando-se em conta o grupo de fêmeas que voltou a copular, o período refratário entre o primeiro e segundo evento foi semelhante nas fêmeas copuladas primeiramente com machos virgens (4,18 dias) ou com acasalados (3,14 dias) ($H = 2,731$; GL= 1; $P = 0,098$).

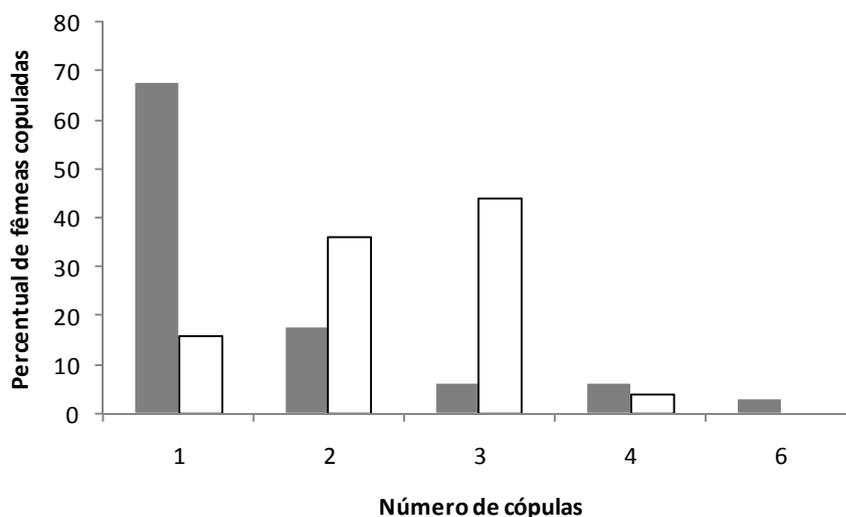


FIGURA 8. Percentual de fêmeas de *Grapholita molesta* por número de cópulas realizadas ao longo da vida após terem acasalado com macho virgem (barras cinza) ou acasalados (barras brancas).

O restabelecimento da receptividade da fêmea poderia estar vinculado ao período de oviposição desta, pois no presente estudo, este coincidiu com o momento em que o número de ovos declinou. De acordo com Marcotte *et al.* (2006), a diminuição da quantidade de oócitos, na medida em que ocorre a oviposição, seria responsável pela aquisição da receptividade sexual. Cópulas de curta duração, conforme Bissoondath & Wiklund (1996), também poderiam gerar a necessidade de acasalamentos adicionais. No entanto, no presente estudo, assim como registrado em *C. jactatana* (Jiménez-Pérez *et al.*, 2003), a duração média (min) da primeira cópula, foi semelhante ($U=94,5$; $P= 0,311$) entre as fêmeas que copularam apenas uma vez ($33,7 \pm 1,65$) das que tiveram cópulas adicionais ($37,3 \pm 3,05$).

Fêmeas de *G. molesta* que copularam apenas uma vez apresentaram médias de fecundidade ($U= 77$; $P= 0,068$), fertilidade ($U=79$; $P= 0,080$) e longevidade ($U= 81$; $P=$

0,094) semelhantes àquelas que tiveram mais de um acasalamento (Tabela 8), assim como o pico de oviposição, independentemente do número de acasalamentos foi no terceiro dia após a cópula (Figura 9). Evento semelhante foi observado em fêmeas de *P. operculella* e *Tecia solanivora* (Povolný) (Gelechiidae) (Fenemore, 1977; Rincón & García, 2007). Tais resultados não corroboram os compilados em algumas revisões (Arnqvist & Nilsson, 2000; Torres-Vila *et al.*, 2004), nas quais os autores concluem que, em geral, altos níveis de poliandria aumentam a oviposição e a fertilidade dos lepidópteros.

Tendo em vista a ausência de um incremento na postura e longevidade das fêmeas de *G. molesta* por acasalamentos adicionais, supõe-se que estes sejam mais vantajosos com relação à seleção de esperma e variabilidade genética (Boggs *et al.*, 2003), do que na obtenção de benefícios nutricionais utilizados na oviposição (Vahed, 1998). Conforme Wedell *et al.* (2002), apesar do comportamento poliândrico ser determinado por componentes genéticos, a alteração no grau de poliandria de uma espécie pode ocorrer em resposta a certas necessidades, como escassez de recursos.

TABELA 8. Médias (\pm EP) de fecundidade, fertilidade e longevidade (dias) e fêmeas de *Grapholita molesta*, acasaladas com machos virgens, que realizaram uma ou várias cópulas ao longo da vida.

Cópulas	Fecundidade	Fertilidade	Longevidade
Uma (23)	174 \pm 9,26 *	172,2 \pm 9,45	12,30 \pm 1,16
Várias (11)	216,7 \pm 19,56	214,27 \pm 18,79	14 \pm 2,26

* Médias nas colunas não diferem significativamente ($\alpha= 0,05$)

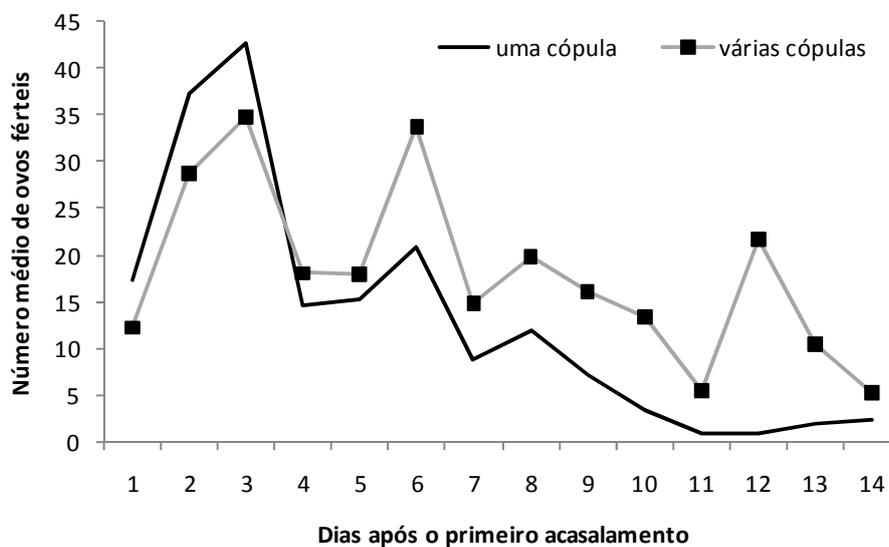


FIGURA 9. Número médio de ovos férteis de fêmeas de *Grapholita molesta*, acasaladas com machos virgens, que realizaram uma ou várias cópulas ao longo da vida.

4.3.4 Bioensaio 4

O maior tempo médio de cópula foi registrado nos insetos de seis, nove e 12 dias de idade, que diferiram dos de um e três dias ($H= 47,74$; $GL= 4$; $P< 0,05$) (Tabela 9). Houve uma correlação positiva entre a idade e o tempo de cópula ($r = 0,503$; $GL= 119$; $P< 0,0001$ e), sendo significativa a variação do segundo fator em função do primeiro ($F= 40,45$; $R^2= 24,74\%$; $P< 0,0001$) (Figura 10A).

A maior duração da cópula em insetos que se acasalam tardiamente pode ser em decorrência da dificuldade dos machos em transferirem o ejaculado com o acréscimo da idade, como já foi observado também em *C. rosaceana* (Foster *et al.*, 1995). Entretanto, em outros tortricídeos, como *C. herana*, *Planototrix octo* Dugdale e *E. postvittana*, os mesmos

autores constataram que a duração da cópula não foi alterada do primeiro ao sétimo dia de idade.

TABELA 9. Médias (\pm EP) de fecundidade, fertilidade e tempo de cópula (min) de casais de *Grapholita molesta* acasalados com diferentes idades (n= número de casais).

Idades	Fecundidade	Fertilidade	Tempo
1 dia (n= 14)	149 \pm 14,53 a*	146,4 \pm 14,50 a	32,21 \pm 1,92 b
3 dias (n= 26)	162,1 \pm 8,59 a	154,9 \pm 8,27 a	36,07 \pm 1,09 b
6 dias (n= 32)	107,9 \pm 10,03 b	94,4 \pm 9,08 b	44,90 \pm 2,45 a
9 dias (n= 26)	96,59 \pm 7,79 b	86,62 \pm 7,69 b	44,96 \pm 1,53 a
12 dias (n= 22)	78,5 \pm 9,99 b	49,5 \pm 11,06 b	59,40 \pm 5,38 a

* Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem significativamente ($\alpha= 0,05$)

O tamanho da prole de *G. molesta* também pode sofrer influência da idade, visto que houve uma queda linear no número de ovos à medida que os insetos foram pareados a partir do sexto dia de vida. Os valores médios de fecundidade (H= 34,39; GL= 4; P< 0,05) e fertilidade (H= 44,87; GL= 4; P< 0,05), registrados no presente trabalho foram maiores nos insetos com um e três dias de idade, diferindo dos demais (Tabela 9). Registrou-se uma correlação negativa entre a fertilidade e a idade dos insetos ($r = - 0,572$; GL= 119; P< 0,0001), caracterizando a idade como um fator responsável pelas variações ocorridas na fertilidade das fêmeas (F= 57,84; R²= 32,14%; P< 0,0001) (Figura 10B).

A redução no número de ovos férteis pode estar vinculada à demora para a ocorrência da primeira cópula da fêmea, como já foi relatado para *G. molesta* por Fraser & Trimble (2001), e em *E. postvittana* por Foster & Ayres (1996). De acordo com Chapman (1998), fêmeas de *Dytrisia* já emergem com todos os oócitos que utilizarão ao longo da

vida, e estes apenas aguardam o amadurecimento para serem depositados. Desta forma, a postura de ovos inférteis ocorrida antes do acasalamento pode ter restringido o número de oócitos que seriam fertilizados pelos machos, quando as fêmeas parearam tardiamente.

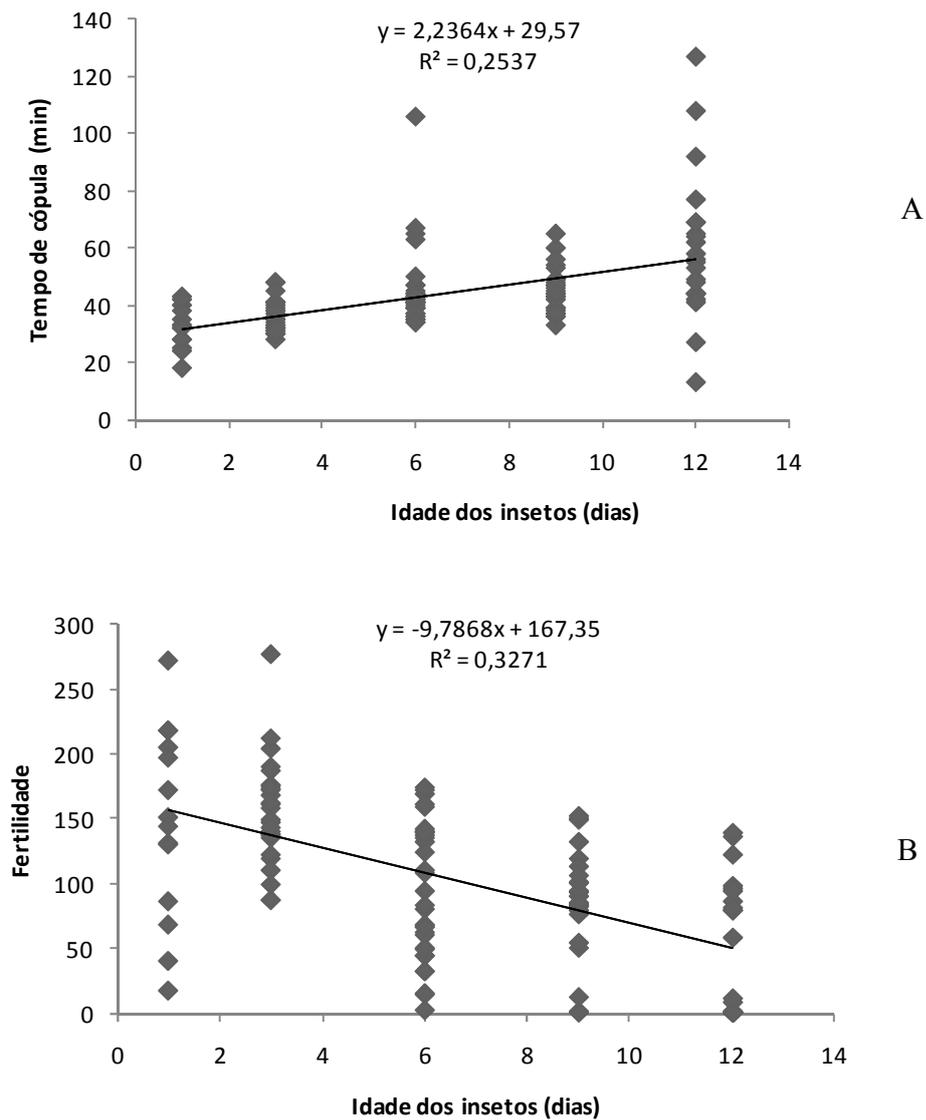


FIGURA 10. Tempo de cópula (min) (A) e a fertilidade (B) em relação à idade (dias) dos indivíduos de *Grapholita molesta*.

Deste modo, a performance reprodutiva de *G. molesta* foi afetada somente pela idade dos indivíduos. O número de acasalamentos anteriores do macho não reduziu sua capacidade de inseminação, assim como as fêmeas independem de cópulas adicionais para atingirem o ápice reprodutivo. Tais resultados caracterizam *G. molesta* como uma espécie de elevado potencial reprodutivo, sendo este um aspecto relevante para que assumam a condição de praga em pomares de rosáceas.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo e nas condições sob as quais foram realizados os bioensaios, foi possível concluir que:

- em fêmeas de *G. molesta*, com o avanço da idade ocorre uma redução no tamanho da bolsa copuladora e dos ovidutos, e um aumento do receptáculo seminal e dos ovários;
- a cópula, em fêmeas de *G. molesta*, resulta no aumento da bolsa copuladora e na redução dos ovários;
- em machos de *G. molesta*, com o avanço da idade, ocorre uma redução dos testículos e dos vasos deferentes, e um aumento da vesícula seminal acessória e dos dutos ejaculatórios;
- a cópula, em machos de *G. molesta*, resulta na diminuição da glândula do duto e do duto ejaculatório duplo;
- a presença do mesmo (monogamia) ou de distintos parceiros (poliandria) ao longo da vida, não altera as médias de fecundidade, fertilidade e padrão de oviposição de fêmeas de *G. molesta*;
- a monogamia em machos de *G. molesta* acarreta em médias de fecundidade e fertilidade elevadas;
- machos de *G. molesta*, a partir do terceiro dia de idade, copulam um maior número de fêmeas, mantendo-se férteis até o décimo segundo dia de vida;

- imediatamente após o término de um acasalamento, machos de *G. molesta* são aptos a copular com outra fêmea, sem alterar a capacidade de fertilização, embora a duração da cópula seja maior;
- a duração da primeira cópula do macho de *G. molesta* é menor que a das realizadas até o quarto acasalamento consecutivo, em intervalos de 24 horas;
- o tamanho do espermátforo transferido para fêmeas de *G. molesta* reduz da primeira para a quarta cópula do macho;
- a fecundidade, fertilidade e longevidade das fêmeas de *G. molesta* é igual quando copuladas com machos virgens ou acasalados até quatro vezes;
- fêmeas de *G. molesta* que copulam com machos já acasalados são mais receptivas a novas cópulas;
- a fecundidade, fertilidade, longevidade e padrão de oviposição das fêmeas de *G. molesta* não se alteram com uma ou várias cópulas;
- a fecundidade e fertilidade de *G. molesta* se reduz-se à medida que o casal envelhece;
- o aumento da idade de *G. molesta* eleva o tempo médio do acasalamento.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo oferecem subsídios relevantes no que diz respeito à capacidade de reprodução de machos e fêmeas de *G. molesta*, levando-se em conta a idade fisiológica dos insetos e a interferência de cópulas anteriores.

O fato dos machos de *G. molesta* manterem-se igualmente férteis durante grande parte da vida, e mesmo após inúmeras cópulas, faz com que sua presença no campo torne-se um risco às técnicas de controle utilizadas, especialmente naquelas baseadas em métodos comportamentais, como a confusão sexual. Além disso, soma-se o fato das fêmeas coespecíficas não necessitarem de cópulas adicionais para atingirem o ápice reprodutivo ou elevarem sua longevidade. Sugerindo que, mesmo sob a desorientação provocada por plumas feromonais sintéticas, apenas um encontro dos sexos seria necessário para garantir a próxima geração.

As informações obtidas pelos testes comportamentais foram ainda corroboradas pela análise morfológica dos órgãos internos de reprodução dos insetos, demonstrando que os machos variam minimamente em função da idade e status de cópula, ao contrário das fêmeas. Além disso, ambos já emergem aptos ao acasalamento, não necessitando de

extenso período para a maturação reprodutiva, como observado em outras espécies de lepidópteros.

O conhecimento dos parâmetros reprodutivos abordados no presente estudo pode auxiliar na interpretação dos níveis de dano obtidos em armadilhas de monitoramento, assim como, no aprimoramento dos métodos de controle comportamental. Sugerindo a utilização de armadilhas atraí e mata, em detrimento apenas da confusão sexual, e a implantação de liberadores feromônais antecipadamente ao calendário usual, em função da atividade reprodutiva precoce e elevado potencial biótico da mariposa-oriental.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAPOMI - Associação Gaúcha dos Produtores de Maçã. Disponível em: <http://www.agapomi.com.br/dados.php>. Acesso em: maio 2009.

ALTAFINI, D. L. **Percepção química de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) ao feromônio sexual e a voláteis de plantas hospedeiras.** 2008. 67f. Dissertação (Mestrado) - Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

ANTON, S.; GADENNE, C. Effect of juvenile hormone on the central nervous processing of sex pheromone an insect. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, p. 5764-5767, 1999.

ARIOLI, C. J. et al. Técnica de criação de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) em laboratório utilizando dieta artificial para a produção de insetos visando estudos de comportamento e controle. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento: Embrapa Uva e Vinho**, Bento Gonçalves, v. 13, p. 1-13, 2007.

ARNQVIST, G; NILSSON, T. The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. **Animal Behaviour**, London, v. 60, p. 145–164, 2000.

AYRES, M. et al. **BioEstat 4.0 Aplicações estatísticas nas áreas da ciências biológicas e médicas.** Belém : Sociedade Civil Mamirauá : CNPq, 2006. 324 p.

BAKER, T. C.; CARDÉ, R. T. Courtship behavior of the oriental fruit moth (*Grapholita molesta*): Experimental analysis and consideration of the role of sexual selection in the evolution of courtship pheromones in the Lepidoptera. **Annals of the Entomological Society of America**, Washington, v. 72, n. 1, p. 173-188, 1979a.

BAKER, T. C.; CARDÉ, R. T. Endogenous and exogenous factors affecting periodicities of female calling and male sex pheromone response in *Grapholita molesta* (Busck). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 25, p. 943-950, 1979b.

- BAKER T. C. Variations in male oriental fruit moth courtship patterns due to male competition. **Experientia**, Basel, v. 39, p. 112-114, 1983.
- BENZ, G. Influence of mating, insemination, and other factors on oogenesis and oviposition in the moth *Zeiraphera diniana*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 15, p. 55-71, 1969.
- BENZ, G. Physiology, reproduction and ecology. In: VAN DER GEEST, L.; EVENHUIS, H. (eds). **Tortricid pests, their biology, natural enemies and control**. New York : Elsevier, 1991. 604p.
- BERGH, J. C.; SEABROOK, W. D. A simple technique for indexing the mating status of male spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). **The Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 118, p. 37-41, 1986.
- BERGSTRÖM, J.; WIKLUND, C.; KAITALA, A. Natural variation in female mating frequency in a polyandrous butterfly: effects of size and age. **Animal Behaviour**, London, v. 64, p. 49-54, 2002.
- BISSOONDATH, C. J.; WIKLUND, C. Male butterfly investment in successive ejaculates in relation to mating system. **Behavioral ecology and Sociobiology**, New York, v. 39, p. 285-292, 1996.
- BLEICHER, J.; BENDER, R. J. **Manual da cultura da macieira**. Florianópolis : EMPASC, 1986. 562p.
- BOGGS, C.; WATT, W. B.; EHRLICH, P. R. **Butterflies: Ecology and evolution taking flight**. Chicago : University of Chicago Press, 2003. 739 p.
- BOTTON, M. et al. **Embrapa Clima Temperado - Sistemas de produção - Cultivo do pessegueiro**. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pessego/CultivodoPessegueiro>. 2005. Acesso em: 24 abr 2006.
- BRITS, J. A. The influence of age on the adult male reproductive system of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Journal of the Entomological Society of Southern Africa**, Pretoria, v. 42, n. 2, p. 395-400, 1979.
- BUTT, B. A.; CANTU, E. **Sex identification of lepidopterous pupae**. Washington, USA : USDA, 1962. 7p.
- CALLAHAN, P. S.; CASCIO, T. Histology of the reproductive tracts transmission of the sperm in the corn earworm, *Heliothis zea*. **Annals of the Entomological Society of America**, Washington, v. 56, p. 535-556, 1963.

CARDÉ, R.T.; MINKS, A. K. Control of moth pests by mating disruption: successes and constraints. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 40, p. 559-585, 1995.

CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. Cambridge : Cambridge University, 1998. 412p.

COOK, P. A. Sperm Numbers and Female Fertility in the Moth *Plodia interpunctella* (Hubner) (Lepidoptera; Pyralidae). **Journal of Insect Behavior**, Oxford, v. 12, p. 767-780, 1999.

CORDERO, C. The evolutionary origin of *signa* in female Lepidoptera: natural and sexual selection hypotheses. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 232, n. 3, p. 443-449, 2005.

DAVIS, F. M. Morphology of the reproductive systems of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*. **Annals of the Entomological Society of America**, Washington, v. 61, n. 5, p. 1143-1147, 1968.

DELISLE, J.; SIMARD, J. Age-related changes in the competency of the pheromone gland and the pheromonotropic activity of the brain of both virgin and mated females of two *Choristoneura* species. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 49, p. 91-97, 2003.

DUSTAN, G. G. Mating behaviour of the oriental fruit moth, *Grapholitha molesta* (Busck) (Lepidoptera: Olethreutidae). **The Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 96, p. 1087-1093, 1964.

EVENDEN, M. L.; DELURY, L. E.; JUDD, G. J. R. Assessing the mating status of male obliquebanded leafrollers *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae) by dissection of male and female moths. **Annals of the Entomological Society of America**, Washington, v. 96, n. 3, p. 217-224, 2003.

FENEMORE, P. G. Oviposition of potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* Zell. (Lepidoptera: Gelechiidae); fecundity in relation to mated state, age, and pupal weight. **New Zealand Journal of Zoology**, Wellington, p. 4187-191, 1977.

FERNANDEZ, F. C.; CRUZ-LANDIM, C. Apyrene spermatozoain *Achroia grisella* (Lepidoptera: Piralidae): a honeybee waxmoth. **Brazilian Journal Biology**, São Paulo, v. 65, n. 4, p. 739-741, 2005.

FERRO, D.; AKRE, R. Reproductive morphology and mechanics of mating of codling moth, *Laspeyresia pomonella*. **Annals of the Entomological Society of America**, Washington, v. 68, n. 3, p. 417-424, 1975.

FOSTER, S. P. Neural inactivation of sex pheromone production in mated lightbrown apple moths, *Epiphyas postvittana* (Walker). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 39, n. 3, p. 267-273, 1993.

FOSTER, S. P.; HOWARD, A. J.; AYRES, R. H. Age-related changes in reproductive characters of four species of tortricid moths. **New Zealand Journal of Zoology**, Wellington, v. 22, p. 271-280, 1995.

FOSTER, S. P.; AYERS, R. H. Multiple Mating and its Effects in the Lightbrown Apple Moth, *Epiphyas postvittana* (Walker). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 42, n. 7, p. 651-667, 1996.

FOSTER, S. P.; HOWARD, A. J. The effects of mating, age at mating, and plant stimuli, on the lifetime fecundity and fertility of the generalist herbivore *Epiphyas postvittana*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 91, p. 287-295, 1999.

FRASER, H. W.; TRIMBLE, R. M. Effect of delayed mating on reproductive biology of the oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae). **The Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 133, p. 219-227, 2001.

FRIEDLÄNDER, M. Control of the eupyrene-apyrene sperm dimorphism in Lepidoptera. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 43, n. 12, p. 1085-1092, 1997.

GIEBULTOWICZ, J. M.; BROOKS, N. The circadian rhythm of sperm release in the codling moth, *Cydia pomonella*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 88, p. 229-234, 1998.

GILLOT, C. Male accessory gland secretions: Modulators of female reproductive physiology and behavior. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 48, p. 163-184, 2003.

GONZALEZ, R. H. Fenologia de la grapholita o polilia oriental del durazno. **Aconex**, Santiago, v. 12, p. 5-12, 1989.

GRELLMANN, E. et al. Ciclo evolutivo de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera – Olethreutidae) em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 13, p. 21-26, 1991.

GRELLMANN, E. O.; LOECK, A. E. Necessidades térmicas e estimativa do número de gerações de *Grapholita molesta* (Busck 1916) (Lepidoptera: Olethreutidae) em Pelotas, RS. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 7, p. 999-1004, 1992.

HAPP, G. Maturation of the male reproductive system and endocrine regulation. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 37, p. 303-20, 1992.

HANIOTAKIS, V.; SUMMERS, F. M. Morphology of the internal reproductive organs of the navel orangeworm, *Paramyelois transitella*. **The Florida Entomologist**, Gainesville, v. 51, n. 1, p. 1-10, 1968.

HE, Y.; TOSHIHARU T.; MIYATA, T. Eupyrene and apyrene sperm and their numerical fluctuations inside the female reproductive tract of the armyworm, *Pseudaletia separata*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 41, n. 8, p. 689-694, 1995.

HOWEL, J. F.; HUTT, R. B.; WILL, W. B. Codling moth: mating behavior in laboratory. **Annals of the Entomological Society of America**, Washington, v. 7, n. 1, p. 891-895, 1978.

HUGHES, L. Effects of mating history on ejaculate size, fecundity, longevity, and copulation duration in the ant-tended lycaenid butterfly, *Jalmenus evagoras*. **Behavioral ecology and Sociobiology**, New York, v. 47, p. 119–128, 2000.

JIMÉNEZ-PÉREZ, A. *et al.* Remating behavior of *Cnephasia jactatana* Walker females (Lepidoptera: Tortricidae). **Journal of Insect Behavior**, Oxford, v. 6, n. 6, p. 797-809, 2003.

JIMÉNEZ-PÉREZ, A.; Q. WANG. Male remating behavior and its effect on female reproductive fitness in *Cnephasia jactatana* Walker (Lepidoptera: Tortricidae). **Journal of Insect Behavior**, Oxford, v. 17, p. 685-694, 2004a.

JIMÉNEZ-PÉREZ, A.; Q. WANG. Sexual selection in *Cnephasia jactatana* (Lepidoptera: Tortricidae) in relation to age, virginity, and body size. **Annals of the Entomological Society of America**, Washington, v. 97, p. 819-824, 2004b.

JOÃO, P. L. **Levantamento da fruticultura comercial do Rio Grande do Sul 2003/2004**. Porto Alegre : Emater/RS, 2004. 88p.

KARUBE, F.; KOBAYASHI, M. Presence of eupyrene spermatozoa in vestibulum accelerates oviposition in the silkworm moth, *Bombyx mori*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 45, p. 947-957, 1999.

KINGAN, T.; THOMAS-LAEMONT, P. A.; RAINA, A. K. Male accessory gland factors elicit change from 'virgin' to 'mated' behaviour in the female corn earworm moth *Helicoverpa zea*. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 183, p. 61-76, 1993.

KNIGHT, A. L. Multiple Mating of Male and Female Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) in Apple Orchards Treated with Sex Pheromone. **Environmental Entomology**, College Park, v. 36, n. 1, p. 157-164, 2007.

KOVANCI, O. B. et al. Comparison of Mating Disruption with Pesticides for Management of Oriental Fruit Moth (Lepidoptera: Tortricidae) in North Carolina Apple Orchards. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 98, n. 4, p. 1248-1258, 2005.

LINN, C. et al. The effects of different blend ratios and temperature on the active space of the oriental fruit moth sex-pheromone. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 16, p. 211-222, 1991.

LORENZATO, D. Lepidópteros nocivos em frutíferas rosáceas no sul do Brasil. **Ipagro Informa**, Porto Alegre, v. 3, p. 71-78, 1988.

MANDAIL, J. C. M. Economia da produção. In: MEDEIROS, C.A.B.; RASEIRA, M. do C. B. **A cultura do pessegueiro**. Brasília: Embrapa-CPACT, 1998. 351p.

MARCOTTE, M.; DELISLE, J.; MCNEIL, J. N. Pheromonostasis is not directly associated with post-mating sperm dynamics in *Choristoneura fumiferana* and *C. rosaceana* females. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 49, p. 81–90, 2003.

MARCOTTE, M.; DELISLE, J.; MCNEIL, J. N. Impact of male mating history on the temporal sperm dynamics of *Choristoneura rosaceana* and *C. fumiferana* females. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 51, p. 537–544, 2005.

MARCOTTE, M.; DELISLE, J.; MCNEIL, J. N. Impact of male mating history on the postmating resumption of sexual receptivity and lifetime reproductive success in *Choristoneura rosaceana* females. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 31, p. 227–233. 2006.

MARTI, O. G.; CARPENTER, J. E. C. A character demonstrating the occurrence of mating in male *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae). **The Florida Entomologist**, Gainesville, v. 90, n. 1, p. 278-281, 2007.

MATTHEWS, R.W.; J. R. MATTHEWS. **Insect behavior**. New York : John Wiley & Sons, 1978. 685p.

MCNAMARA, K. B.; ELGAR, M. A. A longevity cost of re-mating but no benefits of polyandry in the almond moth, *Cadra cautella*. **Behavioral ecology and Sociobiology**, New York, v. 62, p. 1433–1440, 2008.

MELLO, L. M. R. **Produção de mercado brasileiro de maçã**. Bento Gonçalves : Embrapa-CNPUV, 2001. (Comunicado Técnico, 50)

MILANO, P.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; CÔNSOLI, F. L. Influência da Temperatura na Frequência de Cópula de *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda*. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 37, n. 5, p. 528-535, 2008.

MONTEIRO, L. B.; HICKEL, E. Introdução à fruteiras de caroço. In: MONTEIRO, L. B. **Fruteiras de caroço** – Uma visão ecológica. Curitiba : UFPR., 2004. 309p.

MONTEIRO, L. B.; DE SOUZA, A.; BELLI, L. Confusão sexual para o controle de *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae), em pomares de macieira, em Fraiburgo (SC), Brasil. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n.1, p.191-196, 2008.

NISHIDA, R.; BAKER, T. C.; ROELOFS. Hairpencil pheromone components of male oriental fruit moths, *Grapholita molesta*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 8, p. 947-959, 1982.

OBERHAUSER K. S. Male monarch butterfly spermatophore mass and mating strategies. **Animal Behaviour**, London, v. 36, p. 1384–1388, 1988.

OUTRAM, I. Morphology and histology of the reproductive system of the male spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. **The Canadian Entomologist**, Gainesville, v. 102, p. 404-414, 1970.

OUTRAM, I. Morphology and histology of the reproductive system of the female spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). **The Canadian Entomologist**, Gainesville, v. 103, p. 32-43, 1971.

PARK, Y. I.; RAMASWAMY, S. B.; SRINIVASAN, A. Spermatophore formation and regulation of egg maturation and oviposition in female *Heliothis virescens* by the male. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 44, p. 903–908, 1998.

PINTO, A. P.; SANT'ANA, J.; BOTTON, M. Influência da idade da fêmea na performance reprodutiva e longevidade de *Argerotaenia sphaleropa* (Lepidoptera: Tortricidae). **Iheringia**, Porto Alegre, v. 95, p. 435-440, 2005.

PROSHOLD, F. I.; KARPENKO, C. P.; GRAHAM, C. K. Egg Production and Oviposition in the Tobacco Budworm: Effect of Age at Mating. **Annals of the Entomological Society of America**, Washington, v. 75, n. 1, p. 51-55, 1982.

PROSHOLD, F. I. Mating status of Tobacco Budworm (Lepidoptera: Tortricidae) males captured in pheromone traps compared with males and females collected at night by hand. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 84, n. 5, p. 1492-1498, 1991.

PROTAS, J. F. S.; MADAIL, J. C. M. **Embrapa Clima Temperado** - Sistemas de produção de pêssegos de mesa na região da serra gaúcha. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pessego/PessegodeMesaRegiaoSerraGaucha/index.htm>. 2003. Acesso em : 24 abr. 2006.

- RETNAKARAN, A. The male reproductive system of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). I. Spermatogenesis. **Annals of the Entomological Society of America**, Washington, v. 63, p. 851-858, 1970.
- RINCÓN, D. F.; GARCÍA, G. J. Frecuencia de cópula de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Revista Colombiana de Entomología**, Santafe de Bogotá, v. 33, n. 2, p. 133-140, 2007.
- ROGERS, C. E.; MARTI, O. G. JR. Beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): effects of age at first mating on reproductive potential. **The Florida Entomologist**, Gainesville, v. 79, p. 343-352, 1996.
- ROSENTHAL, M. A.; LOECK, A. E. Infestação natural de pêssegos, maçãs e marmelos pela mariposa oriental *Grapholita molesta* (Busck). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 23, n. 3, p. 561-563, 1994.
- ROTHSCHILD, G.; VICKERS, R. Biology, ecology and control of oriental fruit moth. In: VAN DER GEEST, L. ; EVENHUIS, H. (Eds). **Tortricid pests, their biology, natural enemies and control**. New York : Elsevier, 1991. p. 389-409.
- SADEK, M. M. Polyandry in field-collected *Spodoptera littoralis* moths and laboratory assessment of the effects of male mating history. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 98, p. 165-172, 2001.
- SALLES, L. A. B.; MARINI, L. H. Avaliação de uma formulação de feromônio de confundimento no controle de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera, Tortricidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 18, n. 2, p. 329-336, 1989.
- SALLES, L. A. B. Principais pragas e seu controle. In: MEDEIROS, C.A.B.; RASEIRA, M. do C. B. **A cultura do pessegueiro**. Brasília: Embrapa- CPACT, 1998. 351p.
- SALLES, L. A. Mariposa-oriental, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). In: VILELLA, E. F.; ZUCCHI, R. A.; CANTOR, F. (Eds). **Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil**. Ribeirão Preto : Holos, 2000. P. 42-45.
- SARAI, D. S. The seasonal history of the oriental fruit moth in Southern Missouri. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 63, p. 301-302, 1970.
- SETH, R. K.; KAUR, J. J.; RAO, D. K.; REYNOLDS, S. E. Sperm transfer during mating, movement of sperm in the female reproductive tract, and sperm precedence in the common cutworm *Spodoptera litura*. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 27, p. 1-14, 2002.
- SILVA, A.G. et al. **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil**. Rio de Janeiro : MARA-SDSV, 1968. 622 p.

SILVA, S. **Fatores da biologia reprodutiva que influenciam o manejo comportamental de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)**. 2008. 75f. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.

SIDRA – Sistema IBGE de Recuperação Automática. **Apresenta informações estatísticas**. Desenvolvido pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: maio 2009.

SNODGRASS, R. E. **Principles of insect morphology**. New York : McGraw Hill, 1994. 667p.

SOUZA, B. et al. Ocorrência de danos de *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) em pessegueiros no município de Caldas - MG. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 185-188, 2000.

STEIGENGA, M. J.; FISCHER, K. Ovarian dynamics, egg size, and egg number in relation to temperature and mating status in a butterfly. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 125, n. 2, p. 195-203, 2007.

SVARD, L.; MCNEIL, J. N. Female benefit, male risk: Polyandry in the true armyworm *Pseudaletia unipuncta*. **Behavioral ecology and Sociobiology**, New York, v. 35, p. 319-326, 1994.

TORRES-VILA, L. M.; RODRÍGUEZ-MOLINA, M. C.; STOCKEL, J. Delayed mating reduces reproductive output of female European grapevine moth, *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 92, p. 241–249, 2002.

TORRES-VILA, L. M.; RODRÍGUEZ-MOLINA, M. C.; JENNIONS, M. D. Polyandry and fecundity in the Lepidoptera: can methodological and conceptual approaches bias outcomes? **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 55, p. 315–324, 2004.

TORRES-VILA, L. M.; JENNIONS, M. Male mating history and female fecundity in the Lepidoptera: do male virgins make better partners? **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 55, p. 318-326, 2005.

VAHED, K. The function of nuptial feeding in insects: a review of empirical studies. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 73, p. 43-78, 1998.

WALKER, L.; TEDDERS, J.; CALCOTE, V. Male and female reproductive systems of *Laspeyresia caryana*, the hickory shuckworm moth (Lepidoptera: Olethreutidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Washington, v. 60, n. 1, p. 280-281, 1967.

WEDELL, N.; WIKLUND, C.; COOK, P. Monandry and polyandry as alternative lifestyles in a butterfly. **Behavioral Ecology**, Cary, v. 13, n. 4, p. 450–455. 2002.

WELLSO, S. G.; ADKISSON, P. L. The morphology of the reproductive system of the female pink bollworm moth, *Pectinophora gossypiella* (Saund). **Journal of Kansas Entomological Society**, Manhattan, v. 35, p. 233-235, 1962.