

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CONSERVAÇÃO E  
MANEJO DE RECURSOS NATURAIS – NÍVEL MESTRADO

ADRIANA HELENA WALERIUS

COMPORTAMENTO DE ACASALAMENTO E ATRATIVIDADE AO FERÔMONIO  
SEXUAL DE *Gyropsylla spegazziniana* Lizer & Trelles (HEMIPTERA: PSYLLIDAE)

CASCADEL-PR

Março/2017

ADRIANA HELENA WALERIUS

COMPORTAMENTO DE ACASALAMENTO E ATRATIVIDADE AO  
FERÔMONIO SEXUAL DE *Gyropsylla spegazziniana* Lizer & Trelles (HEMIPTERA:  
PSYLLIDAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Conservação e Manejo de Recursos Naturais – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais

Área de Concentração: Ciências Ambientais

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Myrian Denise Araújo  
Coracini

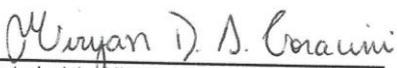
CASCADEL-PR

Março/2017

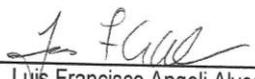
## ADRIANA HELENA WALERIUS

Comportamento de acasalamento e atratividade ao feromônio sexual de *Gyropsylla spegazziniana* Lizer & Trelles (Hemiptera: Psyllidae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, área de concentração Ciências Ambientais, linha de pesquisa Biologia Aplicada e Indicadores de Qualidade No Ambiente Terrestre, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:

  
Orientador(a) - Miryan Denise Araujo Coracini

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

  
Luís Francisco Angeli Alves

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

  
Camila Borges da Cruz Martins

Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Cascavel, 10 de março de 2017

*“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o mistério passará pela vida sem ver nada.”*

*Albert Einstein*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e pela força nos momentos de dificuldade.

À minha família, meu pai Ademir, minha mãe Lurdes e minha irmã Andresa, pelo amor, confiança, dedicação e apoio para que eu não desistisse de alcançar meus sonhos, por serem meus maiores incentivadores e exemplos humildade e honestidade. Muito obrigada!!!

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Miryan, pela amizade, confiança e pelos conhecimentos transmitidos neste 2 anos... Muito obrigada!!!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Izabel, pelo carinho, apoio e amizade, que foram essenciais no período da realização deste trabalho.

À Adrieli Gorlin, Juliete de Lara e Rafaela Pares pela amizade, apoio, compreensão, compartilhamos nossas tristezas, anseios, alegrias e vitórias. A vocês, muitíssimo obrigada!!

Às meninas do laboratório de Biotecnologia Agrícola: Camila Santana, Cristiane Kasburg, Marina, principalmente a Andreia Bonini pelo apoio durante o mestrado.

À minha colega, Vanessa que durante dois (ou mais) anos dividiu comigo mais do que um apartamento, mas também uma parte da sua vida. Por ter aguentado as minhas crises, o meu mais singelo muito obrigada!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores do PPRN pelo entusiasmo de ensinar, pela atenção aos alunos e pela oportunidade da realização do mestrado em especial à prof. Ana Tereza Bittencourt Guimarães.

A todos que de alguma forma contribuíram para que eu atingisse meu objetivo.

## Sumário

|   |    |
|---|----|
| <b>Resumo</b> .....   | 8  |
| <b>Abstract</b> .....   | 9  |
| <b>Capítulo 1 - Revista Neotropical Entomology</b> .....  | 10 |
| Comportamento de acasalamento de <i>Gyropsylla spegazziniana</i> (Lizer & Trelles)<br>(Hemiptera: Psyllidae) .....              | 10 |
| <b>Capítulo 2 - Revista International Journal of Development Research</b> .....   | 30 |
| Atratividade de machos e fêmeas de <i>Gyropsylla spegazziniana</i> (Hemiptera: Psyllidae)<br>ao feromônio sexual de fêmeas..... | 30 |
| <b>Anexo 1 - Normas da Revista do Cap. 1</b> .....  | 52 |
| <b>Anexo 2 - Normas da Revista do Cap. 2</b> .....  | 63 |

## Resumo

*Gyropsylla spegazziniana* (Hemiptera: Psyllidae) é um psílideo considerado uma das principais pragas da cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis*), causando grandes prejuízos econômicos. A maioria dos insetos utiliza sinais químicos, visuais ou acústicos na comunicação interespecífica. Os feromônios sexuais são os principais sinais envolvidos no acasalamento. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo descrever o comportamento de acasalamento de *G. spegazziniana*, verificar a atratividade entre machos e fêmeas em bioensaios com olfatômetro em Y e identificar o feromônio sexual da espécie. Para a descrição do acasalamento, casais virgens foram colocados em gaiolas contendo uma muda de erva-mate. Foi observado o comportamento dos casais durante a fotofase e escotofase. Para os ensaios de atratividade em olfatômetro em Y, foram utilizados insetos vivos (machos e fêmeas virgens) e um ramo de erva-mate como fonte de odor. Para analisar a presença do feromônio sexual foram feitos extratos do corpo de machos e fêmeas virgens, que foram analisados em cromatógrafo gasoso acoplado à espectrômetro de massas (CG-MS). Foi verificado que a cópula ocorreu somente durante a fotofase, sendo que na escotofase os casais permaneciam imóveis na parte abaxial da folhas. A sequência de acasalamento demonstrou que a fêmea caminha principalmente pela brotação e o macho vai ao seu encontro, ficando frente a frente com a mesma; após um breve toque de antenas entre o casal, o macho vira o abdome e rapidamente ocorre a cópula. Nos bioensaios de atratividade, machos e fêmeas foram atraídos para fêmeas vivas no olfatômetro, porém não foram atraídos para machos vivos, o que sugere a presença de voláteis liberados pelas fêmeas para atração sexual. Foi constatada a presença de um composto fêmea-específico, identificado como 2-nonadecanona, com o possível papel de feromônio sexual. De acordo com os resultados, sugere-se que as fêmeas de *G. spegazziniana* liberam feromônios sexuais para atrair machos para o acasalamento. Os compostos liberados pelas fêmeas podem interagir com os voláteis emitidos pela erva-mate, resultando na atratividade dos machos de *G. spegazziniana*.

Palavras - chave: Ampola-da-erva-mate, etograma, atração sexual, olfatômetro em Y, feromônio sexual

## Abstract

*Gyropsylla spegazziniana* (Hemiptera: Psyllidae) is considered an important pest of the yerba mate (*Ilex paraguariensis*), causing considerable economic losses. Most insects use chemical, visual, or acoustic signals in interspecific communication. Sex pheromones are the main signals involved in mating behavior. In this sense, this work aimed to describe the mating behavior of *G. spegazziniana*, to verify the attractiveness between males and females in Y olfactometer bioassays, and to identify the sex pheromone of this species. To describe the mating behavior virgin couples were placed in cages containing a yerba mate seedling. The insect behavior during the photophase and scotophase was observed. For behavioral tests in Y-olfactometer, virgin males or virgin females and a branch of yerba mate were used as odor source. To verify the presence of a sexual pheromone, body extracts of virgin males or virgin females were obtained and were analyzed by using gas chromatograph coupled to mass spectrometer (GC-MS). Mating occurred only during the photophase, in the scotophase the couples remained immobile in the abaxial surface of the leaves. The mating sequence showed that the female walks on the new leaves and the male goes to meet her, standing face to face with her. After a brief antennal touch between the couple, the male turns the abdomen and attaches to the female. As a result of Y olfactometer bioassays, males and females were attracted to females in the olfactometer but were not attracted to males, suggesting a presence of volatiles released by females for sexual attraction. There was a presence of a single female-specific compound, identified as 2-nonadecanone, that may act as sex pheromone. The results suggest that *G. spegazziniana* females release sex pheromone to attract males for mating. The compounds released by the females can interact with the volatiles emitted by the yerba mate, resulting in the attractiveness of *G. spegazziniana* males.

Keywords: yerba mate gall, etogram, sexual attraction, Y-olfactometer, pheromone

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31

**Capítulo 1 - Revista Neotropical Entomology**

‘Ecology, Behavior and Bionomics’

**Comportamento de acasalamento de *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer & Trelles)  
(Hemiptera: Psyllidae)**

**Mating behavior of *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer & Trelles) (Hemiptera:  
Psyllidae)**

AH Walerius<sup>1</sup>, MDA Coracini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais,  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Adriana Helena Walerius, Rua Universitária 2069, Jardim Universitário, 85819-110  
Cascavel, PR, Brasil, email: adrianahelenawalerius@gmail.com, telefone: (45)  
999339766

**Resumo**

O psílideo *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer & Trelles) (Hemiptera: Psyllidae) causa grandes prejuízos econômicos em cultivos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). Há estudos sobre a biologia e criação de *G. spegazziniana* em laboratório, mas não há sobre o comportamento sexual da espécie. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo descrever o comportamento de acasalamento de *G. spegazziniana* em condições de laboratório. Para isto, após se tornarem adultos, casais virgens foram colocados em gaiolas contendo uma muda de erva-mate. Foi observado o comportamento de 60 casais durante a fotofase e 40 casais na escotofase, pelo período de 10 dias. A cópula foi observada em 32 casais na fotofase e durante a escotofase não houve cópulas, quando os casais permaneciam imóveis na parte abaxial da folhas. A sequência de acasalamento

32 demonstrou que a fêmea caminha principalmente pela brotação e o macho vai ao seu  
33 encontro, ficando frente a frente com a mesma; após um breve toque de antenas entre o  
34 casal o macho vira o abdome e rapidamente ocorre a cópula. O número de cópulas  
35 aumentou a partir da quarta hora do início da fotofase, com um pico de acasalamento na  
36 nona hora da fotofase. O comportamento de acasalamento de *G. spegazziniana* é  
37 importante para determinar a idade dos insetos e o período do dia em que mais ocorrem  
38 cópulas, informações essenciais para a realização de futuros testes comportamentais, a  
39 fim de determinar possíveis sinais químicos envolvidos na comunicação deste psílídeo.

40

41 Palavras-chave: Ampola da erva-mate, etograma, número de cópulas, horário das  
42 cópulas.

43

44 Abstract:

45 The psyllid *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer & Trelles) (Hemiptera: Psyllidae) causes  
46 economic damages in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) cultivations. There are studies  
47 about biology and rearing of *G. spegazziniana* in the laboratory, but there is nothing  
48 about the sexual behavior of this species. Therefore, this work aimed to describe the  
49 mating behavior of *G. spegazziniana* in laboratory conditions. After becoming adults,  
50 virgin couples were placed in cages containing a yerba mate seedling. The behavior of  
51 60 couples during the photophase and 40 couples in the scotophase was observed during  
52 10 days. The mating was observed in 32 couples only in the photophase, and during the  
53 scotophase the insects remained still in the abaxial part of the leaves. The mating  
54 sequence showed that the female walks mainly on the new shoots of the plant and the  
55 male goes towards her, standing face to face with the female; after a brief antennal  
56 touch between the couple, the male turns the abdomen and the mating occurs. The

57 number of copulations increased from the fourth hour at the beginning of the  
58 photophase, with a peak at the ninth hour of the photophase. The knowledge about *G.*  
59 *spgazziniana* mating behavior is important to determine the age of the insects and the  
60 period of the day in which more copulations occur, and these informations are essential  
61 for future behavioral tests, in order to verify possible chemical signals involved in the  
62 sexual communication of this psyllid.

63

64 Keywords: yerba mate gall, etogram, number of mating, time of the mating.

65

## 66 **Introdução**

67

68 *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer & Trelles) (Hemiptera: Psyllidae), conhecida  
69 como "ampola da erva-mate", é considerada uma das principais pragas de importância  
70 econômica da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) na América do Sul (Leite *et al* 2007,  
71 Alves *et al* 2013). Este psílídeo alimenta-se da seiva da planta e injeta toxinas na  
72 nervura central da folha, ocasionando crescimento desproporcional de ambos os lados  
73 da mesma, deformando as brotações e formando estruturas conhecidas como "ampolas"  
74 ou "galhas" (Chiaradia & Milanez 1997, Leite & Zanol 2001). A fêmea ovípara na  
75 folha deformada e o desenvolvimento dos cinco estágios ninfais deste psílídeo ocorrem  
76 dentro da ampola (Gonçalves *et al* 2008, Barzotto & Alves 2013).

77 Como resultado da infestação da ampola da erva-mate, as folhas deformadas  
78 normalmente caem, ocorrendo atraso no desenvolvimento das mudas atacadas. Desta  
79 forma, a planta requer maior quantidade de nutrientes para emitir novas brotações  
80 (Chiaradia *et al* 2002, Leite 2002). Na Argentina, é permitida a utilização de dimetoato,  
81 metildemeton e endosulfan para o controle deste psílídeo (Burtnik 2003). No Brasil não  
82 há registro de produtos fitossanitários permitidos (Agrofit 2016). Apesar da importância  
83 econômica de *G. spegazziniana* para a cultura da erva-mate, devido a queda das folhas  
84 atacadas, as informações sobre este psílídeo restringem-se à morfologia e à biologia da  
85 espécie. Não há relatos sobre o comportamento de acasalamento, sendo esta informação  
86 essencial para o desenvolvimento de estudos que visam determinar os sinais químicos  
87 envolvidos na comunicação desta espécie e na elaboração de técnicas alternativas de  
88 controle, como coleta massal e confundimento através da utilização de armadilhas

89 contendo feromônios, que envolvam modificações no comportamento do inseto  
90 (Fonseca *et al* 2013).

91 Algumas espécies de psíldeos são consideradas pragas de importância  
92 econômica, como é o caso de *Diaphorina citri* (Kuwayama, 1908), inseto vetor da  
93 bactéria *Candidatus liberbacter* que causa "greening" em plantas de citros (Wenninger  
94 & Hall 2007), de *Cacopsylla pyricola* (Foerster, 1848) (Krysan 1990), uma importante  
95 praga nos pomares de pera, e de *Bactericera cockerelli* (Sulc, 1909), um psíldeo que  
96 causa danos na cultura da batata (Guédot *et al* 2012). Estes autores estudaram o  
97 comportamento de acasalamento dos psíldeos, que ocorre durante a fotofase com início  
98 a partir do segundo dia após a emergência dos adultos. Além disso, Guédot *et al* (2010,  
99 2011) avaliaram os sinais químicos envolvidos no acasalamento de *B. cockerelli* e *C.*  
100 *pyricola*, respectivamente, e evidenciaram a atratividade dos machos para as fêmeas  
101 destas espécies. Soroker *et al* (2004) descreveram que *Cacopsylla bidens* também  
102 utiliza sinais voláteis na comunicação entre macho e fêmea e entre a fêmea e sua planta  
103 hospedeira.

104 Neste sentido, compreender o comportamento de acasalamento de *G.*  
105 *spgazziniana* é o primeiro passo para futuros estudos, visando identificar possíveis  
106 sinais químicos, visuais ou sonoros na comunicação entre macho e fêmea. Assim, o  
107 objetivo do presente estudo foi descrever a sequência do comportamento de  
108 acasalamento de *G. spgazziniana* em laboratório.

109

## 110 **Material e Métodos**

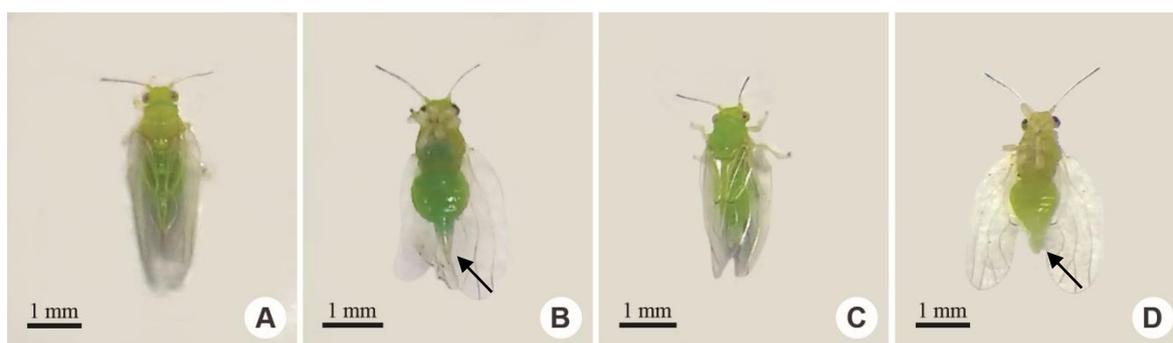
111

112 *Coleta de insetos*

113

114 Ninfas de *G. spegazziniana* foram coletadas entre os meses de novembro de  
115 2015 a março de 2016, em galhos de plantas adultas de erva-mate contendo ampolas, no  
116 município de Cascavel, Paraná, Brasil, e transportados até o Laboratório de  
117 Biotecnologia Agrícola, Unioeste, Campus Cascavel. As ampolas foram abertas e, com  
118 o auxílio de um pincel macio e umedecido com água, foram coletadas as ninfas de  
119 quinto ínstar, que são maiores em relação às demais e apresentam coloração esverdeada  
120 (Leite 2002). As ninfas foram individualizadas até a fase adulta. Os adultos virgens  
121 foram sexados após a emergência, de acordo com a aparência externa dos últimos  
122 segmentos abdominais, correspondendo a genitália dos insetos, no qual evidencia-se a  
123 presença de ovipositor na fêmea (Fig. 1) (Leite & Zanol 2001).

124



125

126 Fig 1 Indivíduos adultos de *Gyropsylla spegazziniana*. A - fêmea em vista dorsal, B -  
127 fêmea em vista ventral, com seta indicando o ovipositor, C - macho em vista dorsal, D -  
128 macho em vista ventral, com seta indicando o cláspes. Fotos: Adriana H. Walerius.

129

130

### 131 *Comportamento de acasalamento*

132

133 O experimento foi conduzido no período de novembro de 2015 a março de 2016.  
134 Para descrever o comportamento de acasalamento de *G. spegazziniana* em um ciclo  
135 completo de 24 horas, as observações foram divididas em 4 períodos: período 1 (06:00-

136 12:00 horas), período 2 (12:00-18:00 horas), período 3 (18:00-00:00 horas) e período 4  
137 (00:00-06:00 horas). Os casais foram observados, dentro de cada período, durante 10  
138 dias consecutivos. Para cada período, logo após emergidos os adultos, foi colocado um  
139 casal virgem em uma muda de erva-mate, sendo utilizados 10 casais por repetição, e  
140 para cada período foram realizadas 3 repetições em dias diferentes (n total=30). No  
141 período 4 foi realizada apenas uma repetição, pois de acordo com outras espécies da  
142 família Psyllidae, não ocorrem cópulas durante o período noturno (Krysan, 1990;  
143 Wenninger e Hall, 2007).

144 As mudas de erva-mate e os casais foram acondicionados individualmente em  
145 gaiolas de cloreto de polivinila (PVC) incolor (13 cm de diâmetro × 40 cm de altura),  
146 com a uma abertura lateral e a parte superior de cada gaiola coberta com tecido *voil*,  
147 permitindo a passagem de ar e o monitoramento da sequência de acasalamento (Fig. 2),  
148 conforme metodologia desenvolvida por Alves *et al* (2013). Os insetos foram  
149 observados diariamente, a cada 10 minutos, durante 10 dias.

150

151



152

153 Fig 2 Mudas de erva-mate recobertas por gaiolas de PVC. Em cada muda foi  
154 acondicionado um casal de *Gyropsylla spegazziniana*. Foto: Adriana H. Walerius.

155

156 Estudos preliminares realizados no Laboratório de Biotecnologia Agrícola  
157 demonstraram que *G. spegazziniana* não acasala em condições de laboratório. Dessa  
158 forma, o experimento de comportamento de acasalamento teve que ser realizado em  
159 condições mais próximas às naturais. As gaiolas contendo as plantas e os casais foram  
160 acondicionadas em uma sala cuja janela ficou sempre aberta, permitindo a entrada de  
161 luz natural e com temperatura e umidade relativa similares à do lado externo (11-35°C,  
162 64-99% U.R.) (Simepar 2016). Nenhuma luz branca foi acesa na sala durante todo o  
163 experimento. Para observar os adultos durante a escotofase foi utilizada uma lanterna  
164 manual recoberta com papel celofane vermelho. A cor vermelha não é percebida pelos  
165 insetos, visto que a faixa de luz utilizada por eles é a ultravioleta ou polarizada (Ruppert  
166 *et al* 2005).

167 Foi observado o comportamento dos insetos desde a aproximação do casal até o  
168 final do acasalamento. Os registros foram a olho nu e com o auxílio de fotografias e  
169 filmagens. Foram avaliados os seguintes parâmetros: idade (em dias) em que os adultos  
170 copularam pela primeira vez, duração (em minutos) das cópulas e número de cópulas  
171 por casal.

172

### 173 *Cópula na presença de vários machos*

174

175 Uma fêmea e quatro machos, de um dia de vida adulta, foram colocados em  
176 mudas de erva-mate recobertas por gaiolas de PVC, como citado anteriormente. O  
177 número de quatro machos foi utilizado para observar se ocorreria interação entre um  
178 casal e os demais machos. Foram observadas as reações da fêmea na presença dos  
179 quatro machos e a reação dos demais machos durante a cópula (n= 10).

180

181 *Análise estatística*

182

183 Para a realização da análise estatística foram utilizados os dados dos casais que  
184 acasalaram em seus respectivos períodos, manhã e tarde. Para avaliar as diferenças entre  
185 os acasalamentos do período da manhã e da tarde foi utilizado o teste de Qui-Quadrado  
186 com posterior teste de Marasculio. Para o número de cópulas e a duração das cópulas  
187 foram utilizados os testes de normalidade Shapiro-Wilk e Wilcoxon-Mann-Whitney.  
188 Todas as análises foram realizadas utilizando o Statistical software & data analysis add  
189 on for Excel (XLSTAT) versão 2015. A significância estatística foi fixada em  $p \leq 0,05$ .

190

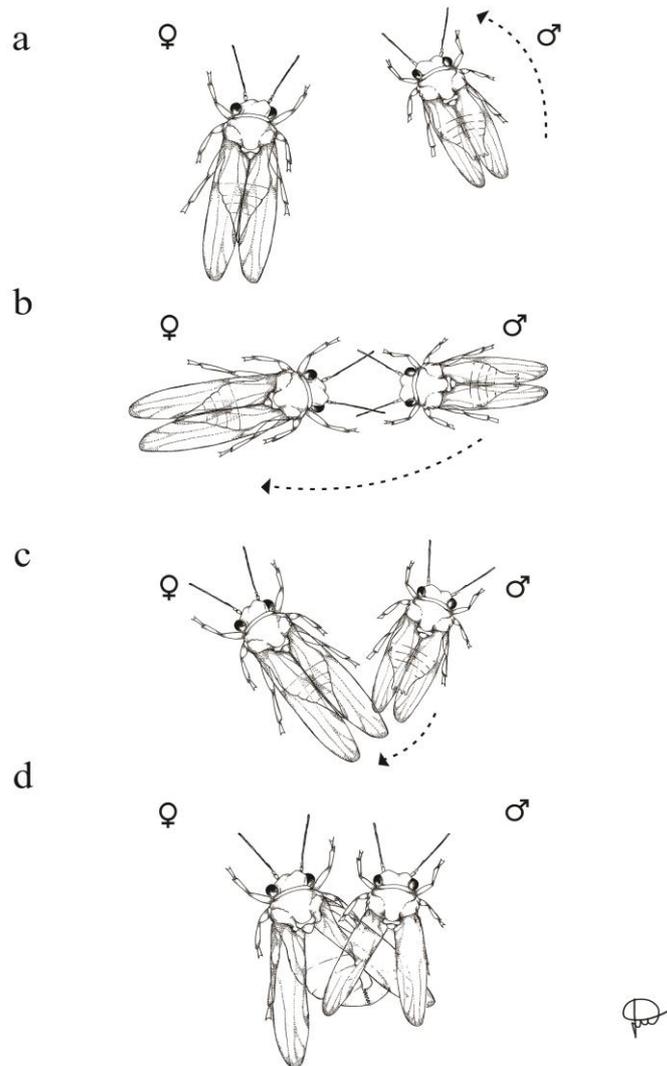
## 191 **Resultados**

192

193 Antes do acasalamento, a fêmea e macho de *G. spegazziniana* geralmente  
194 permaneciam imóveis nas folhas da erva-mate. Ao iniciar o movimento de  
195 acasalamento, a fêmea caminhava pelas folhas mais jovens e pela brotação. O macho,  
196 ao perceber a fêmea, ia ao encontro dela e virava o corpo, ficando de frente em relação a  
197 ela (Fig. 3a). Neste momento, ocorria o toque das antenas (Fig. 3b) e o macho virava o  
198 corpo novamente, ficando ao lado da fêmea (Fig. 3b,c). Ao ficar de lado com a fêmea, o  
199 macho realizava movimentos com o clássper, para unir-se a fêmea pelo aparelho  
200 reprodutor. O macho geralmente precisava de mais de uma tentativa para conseguir  
201 copular com a fêmea. Durante a cópula, o casal permanecia ligado apenas pela genitália  
202 e o macho permanecia ao lado da fêmea (Fig. 3d), posição permitida pelo curvamento  
203 dos segmentos finais do abdome de ambos os sexos (Fig. 3d). Durante a cópula, o casal  
204 permaneceu imóvel ou realizando movimentos laterais com o abdome.

205 Ao término do acasalamento, geralmente o macho desligou-se da fêmea,  
206 afastando-se dela. A fêmea permaneceu parada no local da cópula ou procurou a  
207 brotação mais nova e ovipositou imediatamente.

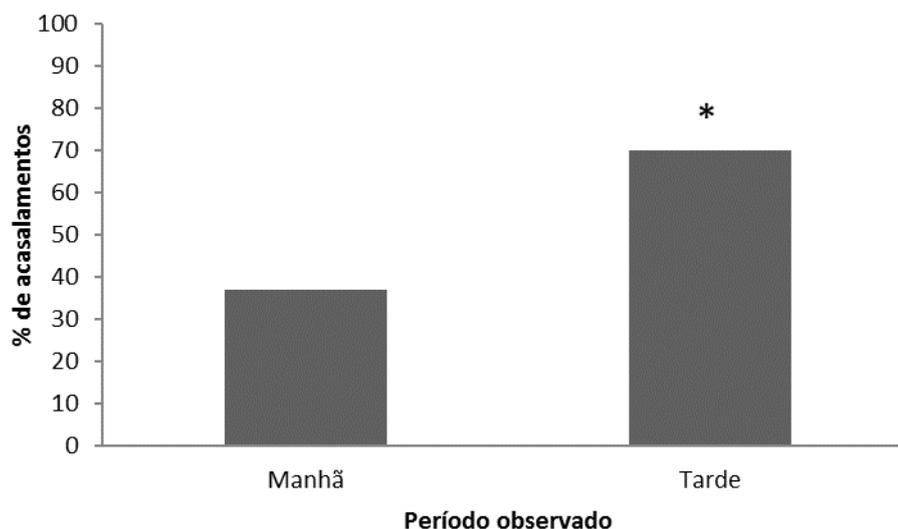
208  
209



210  
211 Fig 3 Sequência do comportamento de acasalamento em *Gyrospylla spegazziniana*. (a)  
212 macho aproxima-se da fêmea; (b) macho fica de frente para a fêmea e ocorre o toque  
213 das antenas; (c) macho vira o abdome, fica lado a lado com a fêmea e tenta copular; (d)  
214 a cópula ocorre e o casal permanece lado a lado, parado ou realizando movimentos  
215 laterais do abdome, ambos ligados apenas pela genitália. Ilustração: Juliana Souza.

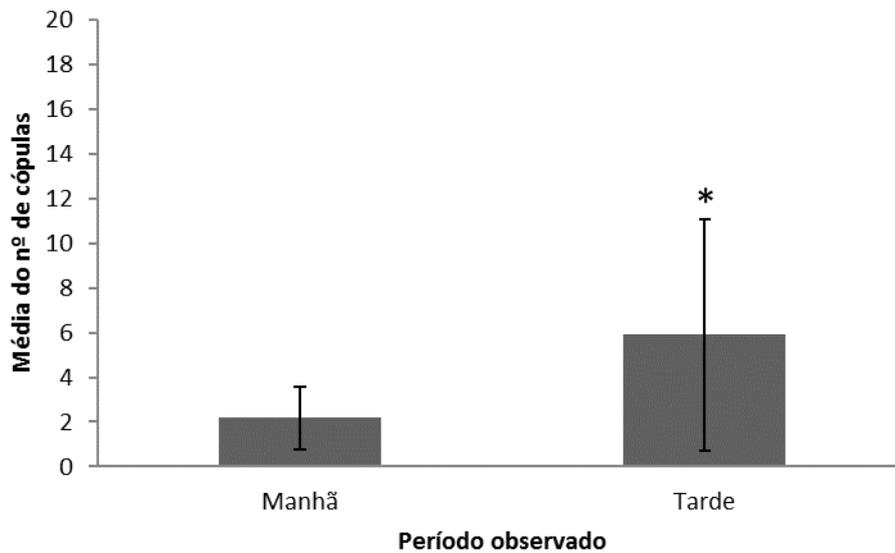
216

217 Adultos de *G. spegazziniana* começaram a acasalar a partir do segundo/terceiro  
218 dia após emergência. Os casais observados durante a escotofase não apresentaram  
219 comportamento de acasalamento, permanecendo imóveis principalmente na face abaxial  
220 das folhas mais velhas. Em relação aos casais analisados durante a fotofase, nos  
221 períodos da manhã e da tarde, houve 32 casais que acasalaram, sendo que 11 casais  
222 acasalaram no período da manhã e 21 casais no período da tarde. A porcentagem de  
223 acasalamento diferenciou significativamente entre os períodos da fotofase, com maior  
224 porcentagem de cópulas ocorrendo no período da tarde ( $\chi^2 = 6,69$ ; g.l. = 1;  $P = 0,01$ )  
225 (Fig. 4).



226  
227 Fig 4 Porcentagem total de acasalamentos de *Gyrospylla spegazziniana* durante a  
228 fotofase, nos períodos da manhã e tarde, durante os dias de observação. \*Diferença  
229 estatística significativa entre os períodos (Teste de Marasculio aplicado ao  $\chi^2$ ,  $p < 0,05$ ).  
230

231 A duração média da primeira cópula observada nos 32 casais foi de  $6,59 \pm 4,32$   
232 min (média  $\pm$  D.P.). O número de cópulas por casal observado variou significativamente  
233 entre o período da manhã e o da tarde (Fig. 5), sendo que o maior número de  
234 cópulas/casal ocorreu a tarde ( $p = 0,03$ ).



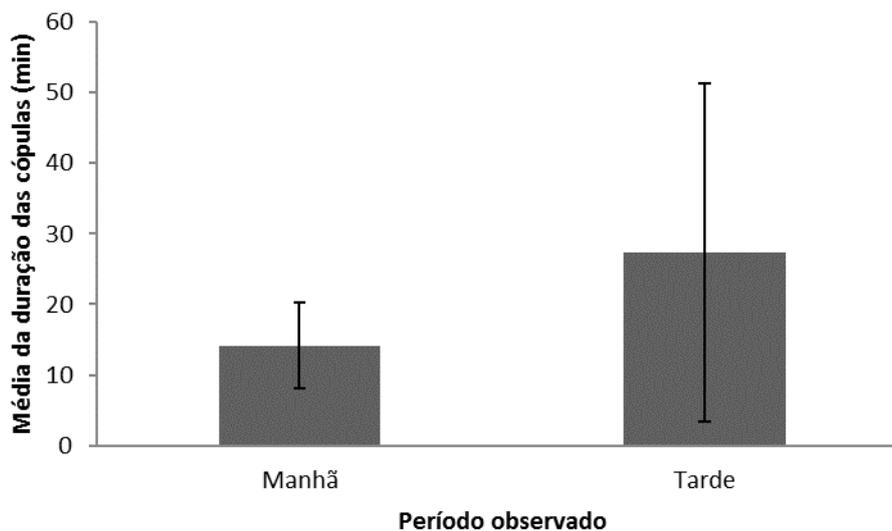
236

237 Fig 5 Número médio de cópulas por casal de *Gyrospylla spegazziniana* durante os  
 238 períodos da manhã e da tarde da fotofase. \* indica diferença estatística significativa entre  
 239 os períodos (Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ).

240

241 Em relação a duração total das cópulas dos 32 casais observados, apesar de  
 242 ocorrer tempo médio na manhã com  $14,18 \pm 6,09$  min e tarde com  $27,38 \pm 23,92$  min,  
 243 não houve diferença significativa entre os períodos ( $p = 0,14$ ) (Fig. 6).

244



245

246 Fig 6 Duração média (min.) das cópulas por casal de *Gyrospylla spegazziniana* durante  
 247 o período da manhã e da tarde.

248

249           Em relação a presença de vários machos na gaiola com a fêmea, 70% dos 10  
250 casais observados acasalaram. Os machos rivais permaneceram próximos aos casais  
251 copulando sem atrapalhar a cópula em 42% dos acasalamentos. Em 26% dos  
252 acasalamentos, enquanto a fêmea e o macho acasalavam, um ou dois machos  
253 permaneciam ao lado do casal com o cláster aberto, realizando movimentos laterais  
254 com o objetivo de atrapalhar a cópula e acasalar com a fêmea. As fêmeas copularam  
255 com mais de um macho durante o período observado. Além disso, foi observada  
256 tentativa de cópula entre machos.

257

## 258   **Discussão**

259

260           A sequência do comportamento de acasalamento de *G. spegazziniana* demonstra  
261 que os machos aproximam-se das fêmeas, sugerindo a utilização de sinais químicos,  
262 visuais ou sonoros. Não foi observado um comportamento de corte prolongado antes da  
263 cópula nesta espécie, apenas o toque de antenas por período muito curto,  
264 comportamento observado também na presença de machos rivais.

265           Poucos trabalhos descreveram a sequência do comportamento de acasalamento  
266 de insetos da família Psyllidae, no entanto, todos eles se assemelham à descrição  
267 realizada para *G. spegazziniana* (Fig. 1). De acordo com Kysan (1990), o macho de *C.*  
268 *pyricola* reconhece a fêmea visualmente movendo-se em direção a ela rapidamente. O  
269 primeiro contato físico é realizado com as antenas e o macho posiciona-se  
270 paralelamente à fêmea, curvando o ápice do abdome a fim de acoplar-se com ela.  
271 Durante a cópula, o casal permanece lado a lado sem realizar movimentos e, ao final da  
272 cópula, a fêmea desloca-se para outro local.

273 O macho de *Trioza erytreae* (Hemiptera: Psylloidea: Triozidae), conhecido  
274 popularmente como psilídeo do citros, também posiciona-se paralelamente à fêmea,  
275 curvando seu abdome de modo a acoplar-se com o abdome dela. Ao iniciar a cópula,  
276 ambos permanecem parados ou caminham curtas distâncias e o acasalamento termina  
277 quando a fêmea se afasta do macho (Van Den Berg 1990, Van Den Berg *et al* 1991).

278 Para outro psilídeo do citros, *Cardiaspina densitexta* (White 1969), machos e  
279 fêmeas tendem a permanecer na face abaxial e no pecíolo de folhas, inclusive durante o  
280 acasalamento. O macho caminha pelas folhas até encontrar a fêmea e, ao encontrá-la,  
281 toca as suas asas com as antenas, permanecendo imóvel ao lado dela. Durante o  
282 movimento de pré-acasalamento, o macho se posiciona lateralmente à fêmea e, com o  
283 clássper aberto, realiza movimentos a fim de encaixar seu órgão copulatório no final do  
284 abdome da fêmea. Após o acasalamento, o casal fica em posições opostas.

285 As observações realizadas durante a escotofase demonstraram que *G.*  
286 *spgazziniana* não apresentou comportamento de acasalamento no período noturno.  
287 Este comportamento pode estar relacionado à diminuição das pistas visuais e/ou da  
288 temperatura, como foi justificado por Wenninger & Hall (2007) em relação a  
289 diminuição da atividade de acasalamento de *D. citri*, e por Krysan (1990) em relação a  
290 ausência de cópulas durante a escotofase para *C. pyricola*.

291 Durante a escotofase, os casais de *G. spgazziniana* permaneceram quase  
292 imóveis, geralmente na face abaxial das folhas, comportamento conhecido como *sleep-*  
293 *like* (Wenninger & Hall 2007), já descrito para o psilídeo *D. citri* (Wenninger & Hall  
294 2007), o qual também não movimentava-se durante as primeiras horas da fotofase (Paris *et*  
295 *al* 2015).

296 Durante a fotofase, os casais de *G. spgazziniana* permaneceram principalmente  
297 nas brotações e nas folhas mais jovens das plantas de erva-mate. De acordo com

298 Wenninger & Hall (2007), machos e fêmeas de *D. citri* preferiam permanecer sobre as  
299 folhas jovens do citros, pois estas seriam alimentos melhores em relação às folhas mais  
300 velhas, além de serem o local de desenvolvimento das ninfas.

301 A maioria dos casais apresentou comportamento semelhante em relação ao local  
302 das cópulas, ocorrendo quase que exclusivamente nas brotações jovens. Segundo  
303 Randall *et al* (2000), a locomoção e a reprodução requerem gasto energético. Desta  
304 forma, o ato de acasalar e em seguida ovipositar nas brotações é uma forma de diminuir  
305 o gasto energético, além de atenuar os riscos de predação com a locomoção das fêmeas.  
306 Este comportamento também foi verificado em *D. citri* (Wenninger & Hall 2007).

307 A preferência do acasalamento durante a fotofase revelada por *G. spegazziniana*  
308 também foi observada em *C. pyricola* (Krysan 1990). Brown *et al* (2009) constataram  
309 que machos de *C. pyricola* procuraram os odores liberados pelas fêmeas contidos em  
310 armadilhas apenas durante a fotofase.

311 Os adultos de *G. spegazziniana* começaram a acasalar a partir do  
312 segundo/terceiro dia após emergência. Outros psilídeos apresentaram as mesmas  
313 características, como os adultos de *D. citri*, que atingiram a idade reprodutiva após 2-3  
314 dias de vida adulta (Wenninger & Hall 2007), e fêmeas de *B. cockerelli*, que atingiram a  
315 idade reprodutiva 24 horas após a eclosão e os acasalamentos ocorreram após 2-3 dias  
316 de emergência (Guédot *et al* 2012).

317 Segundo Guédot *et al* (2013), insetos que acasalam com poucos dias de vida  
318 apresentam maiores prejuízos para a planta hospedeira. *G. spegazziniana*, ao atacar as  
319 brotações de erva-mate, faz com que a planta necessite de mais nutrientes para emitir  
320 novas brotações, comprometendo o desenvolvimento foliar sadio (Leite & Zanol 2001,  
321 Chiaradia *et al* 2002). Além disso, a longevidade de machos e fêmeas de *G.*  
322 *spegazziniana*, de 15,2 dias para as fêmeas e 43,7 dias para machos quando não

323 manipulados, o tamanho de 2,0 a 3,4 mm de comprimento e a presença de predadores e  
324 parasitoides, podem justificar o ato de começar a acasalar nos primeiros dias de vida,  
325 garantindo a maior quantidade de descendentes (Leite 2002, Leite & Zanol 2001).

326 Os acasalamentos de *G. spegazziniana* apresentaram maior ocorrência no  
327 período da tarde (Fig. 4 e 5), o que pode estar relacionado à temperatura, biologia desta  
328 espécie e fenologia da planta, dado que o período de emissão de novas folhas ocorre nos  
329 meses de primavera e verão. Chiaradia *et al* (2002) descreveram que a temperatura  
330 influencia no desenvolvimento de *G. spegazziniana* e os picos de coleta deste psilídeo  
331 em campo ocorrem entre outubro e fevereiro, o que coincide com as maiores taxas de  
332 insolação e, conseqüentemente, maiores temperaturas. Em *D. citri*, os acasalamentos  
333 ocorrem de forma constante durante a fotofase, não sendo observado picos de  
334 acasalamentos (Wenninger e Hall, 2007).

335 *G. spegazziniana* apresentou o maior número de cópulas no período da tarde  
336 (12:00 - 18:00 horas) quando comparado com a manhã. Já a duração das cópulas não  
337 apresentou diferença em relação ao período da manhã (Fig. 6), apesar de ter uma  
338 tendência a ser maior.

339 Ao estudar a atratividade de armadilhas com odores de fêmeas de *C. pyricola*,  
340 pesquisadores verificaram que um maior número de machos foi coletado entre as 10:45  
341 - 17:00 horas, tanto para psilídeos de verão como para de inverno (Brown et al, 2009).  
342 Guédot et al (2012) descreveram que os machos de *B. cockerelli* foram mais atraídos  
343 aos voláteis das fêmeas entre as 11:00 - 17:00 horas. Desta forma, pode observar que os  
344 machos de *C. pyricola* e *B. cockerelli* movimentam-se em direção a fêmea nos mesmos  
345 horários que *G. spegazziniana* apresenta os maiores números de cópulas.

346 A duração média das cópulas de *G. spegazziniana* foi de  $14,18 \pm 6,09$  min para o  
347 período da manhã e  $27,38 \pm 23,94$  para o período da tarde (Fig. 6). Para *D. citri*, as



374 Alves LFA, Formentini MA, Fanti ALP, Schapovaloff ME, Barzotto ILM (2013)  
375 Susceptibility of *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer & Trelles) (Hemiptera: Psyllidae) to  
376 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Arq Inst Biol 80: 363-366  
377 Barzotto ILM, Alves LFA (2013) Bioecologia e manejo de *Gyropsylla spegazziniana*  
378 em erva-mate. Arq Inst Biol 80: 457- 464  
379 Brown RL, Landolt PJ, Horton DR, Zarck RS (2009) Attraction of *Cacopsylla pyricola*  
380 (Hemiptera: Psyllidae) to female psylla in pear orchards. Environ Entomol 38: 815-822.  
381 doi: 10.1603/022.038.0335  
382 Burts EC, Fischer WR (1967) Mating behavior, egg production, and egg fertility in the  
383 pear psylla. J Econ Entomol 60: 1297-1300. doi: 10.1093/jee/60.5.1297  
384 Chiaradia LA, Milanez JM (1997) Atratividade de armadilhas coloridas à *Gyropsylla*  
385 *spegazziniana* (Lizer, 1917) (Homoptera, Psyllidae). Pesquisa Agropecuária Gaúcha 3:  
386 183-185  
387 Chiaradia LA, Milanez JM, Sabedot SM (2000) Caracterização e danos da ampola-da-  
388 erva-mate. Pesquisa Agropecuária Catarinense 13: 50-53  
389 Chiaradia LA, Milanez JM, Zidko A (2002) Estimativa das gerações anuais de  
390 *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer, 1917) em função de sua exigência térmica. Ciência  
391 Rural 32: 385-391  
392 Eben A, Mühlethaler R, Gross J, Hoch H (2015) First evidence of acoustic  
393 communication in the pear psyllid *Cacopsylla pyri* L. (Hemiptera: Psyllidae). J Pest Sci  
394 88: 87–9. doi: 10.1007/s10340-014-0588-0  
395 Fonseca MG, Silva SEB, Auad AM, Paiva IG, Borges CAV (2013) Mating behavior of  
396 *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae) under laboratory conditions. J Insect  
397 Behav 26: 824–831. doi: 10.1007/s10905-013-9394-4  
398 Gonçalves D, Ferla NJ, Souza EFM (2008) Flutuação populacional de *Gyropsylla*  
399 *spegazziniana* (Hem.: Psyllidae) associada a diferentes formas de cultivo de erva-mate  
400 no Rio Grande de Sul. Biociências, 16: 149-153  
401 Guédot C, Horton DR, Landolt PJ (2010) Sex Attraction in *Bactericera cockerelli*  
402 (Hemiptera: Triozidae). Environ Entomol 39: 1302-1308. doi: 10.1603/EN10048  
403 Guédot C, Horton DR, Landolt PJ (2011) Response of summerform pear psylla  
404 (Hemiptera:Psyllidae) to male- and female-produced odors. Can Entomol 143: 245–253.  
405 doi: 10.4039/n11-003

406 Guédot C, Horton DR, Landolt PJ (2012) Age at reproductive maturity and effect of age  
407 and time of day on sex attraction in the potato psyllid *Bactericera cockerelli*. *Insect Sci*  
408 00: 1-10. doi: 10.1111/j.1744-7917.2011.01498.x

409 Guédot C, Horton DR, Landolt PJ, Munyaneza JE (2013) Effect of mating on sex  
410 attraction in *Bactericera cockerelli* with evidence of refractoriness. *Entomol Exp Appl*  
411 149: 27–35. doi: 10.1111/eea.12104

412 Horton DR, Landolt PJ (2007) Attraction of male pear psylla, *Cacopsylla pyricola*, to  
413 female-infested pear shoots. *Entomol Exp Appl* 123: 177–183. doi: 10.1111/j.1570-  
414 7458.2007.00537.x

415 Krysan JL(1990) Laboratory study of mating behavior as related to diapause in  
416 overwintering *Cacopsylla pyricola* (Homoptera: Psyllidae). *Environ Entomol* 19: 551-  
417 557. doi: 10.1093/ee/19.3.551

418 Leite MSP, Zanol KM, Iede ET, Penteadó SRC (2007) Flutuação populacional de  
419 *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer y Trelles) (Hemiptera, Psyllidae) e de seus inimigos  
420 naturais em erva-mate no município de São Mateus do Sul, PR, Brasil. *Rev Bras*  
421 *Entomol* 51: 520-523. doi 10.1590/S0085-56262007000400020

422 Leite MSP, Zanol KMR (2001) Biologia e morfologia de *Gyropsylla spegazziniana*  
423 (Lizer y Trelles) (Hemiptera, Psyllidae). *Acta Biol Par* 30:19-34. doi:  
424 10.5380/abpr.v30i0.598

425 Leite MSP (2002) Biologia e determinação do dano de *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer  
426 y Trelles,1919) (Hemiptera, Psyllidae) na cultura da erva mate (*Ilex paraguariensis*, St.  
427 Hilare). Tese, Universidade Federal do Paraná

428 Paris TM, Croxton SD, Stansly PA, Allan SA (2015) Temporal response and attraction  
429 of *Diaphorina citri* to visual stimuli. *Entomol Exp Appl* 155: 137–147. doi:  
430 10.1111/eea.12294

431 Randall D, Burggren W, French K (2000) Usando a energia: enfrentando desafios  
432 ambientais. In: *Fisiologia animal: Mecanismos e adaptações*, 4ª ed. Guanabara Koogan,  
433 Rio de Janeiro, pp 619 - 671

434 Ruppert EE, Fox RS, Barnes RD (2005) Hexapoda. In:  
435 *Zoologia dos invertebrados: Uma abordagem funcional-evolutiva*, 7ª ed. Rocca, São  
436 Paulo, pp 844-858

437 Soroker V, Talebaev S, Harari AR, Wesley DS (2004) The role of chemical cues in host  
438 and mate location in the pear psylla *Cacopsylla bidens* (Homoptera: Psyllidae). *J Insect*  
439 *Behav* 17: 613-626. doi: 10.1023/B:JOIR.0000042544.35561.1c

439 Van Den Berg MA, Deacon VE, Thomas CD (1991) Ecology of the citrus psylla, *Trioza*  
440 *erytrae* (Hemiptera: Triozidae). 3. Mating, fertility and oviposition. *Phytophylactica*  
441 23: 195-200

442 Wenninger EJ, Hall DG (2007) Daily timing of mating and age at reproductive maturity  
443 in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Fla Entomol* 90: 715-722. doi:  
444 10.1653/0015-4040(2007)90[715:DTOMAA]2.0.CO;2

445 Wenninger EJ, Stelinski LL, Hall DG (2008) Behavioral evidence for a female-  
446 produced sex attractant in *Diaphorina citri*. *Entomol Exp Appl* 128: 450–459. doi:  
447 10.1111/j.1570-7458.2008.00738.x

448 Wenninger EJ, Hall DG, Mankin RW(2009a) Vibrational communication between the  
449 sexes in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Ann Entomol Soc Am* 102: 547-555.  
450 doi: 10.1603/008.102.0327

451 Wenninger EJ, Stelinski LL, Hall DG (2009b) Roles of olfactory cues, visual cues, and  
452 mating status in orientation of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) to  
453 four different host plants. *Environ Entomol* 38: 225-234. doi: 10.1603/022.038.0128

454 Zampier NC (2001) Avaliação dos níveis de nutrientes, cafeína e taninos após adubação  
455 mineral e orgânica, e sua relação com a produtividade na erva-mate (*Ilex paraguariensis*  
456 St Hil.). Dissertação, Universidade Federal do Paraná  
457



25           **Resumo** - Em insetos, precedendo o acasalamento, ocorre a emissão de sinais  
26 que são utilizados na comunicação interespecífica, sendo estes sinais visuais, acústicos e  
27 químicos. Os feromônios sexuais são os principais intermediadores no acasalamento.  
28 Na superfamília Psylloidea (Hemiptera) há apenas relatos de quatro espécies que  
29 utilizam sinais químicos para localizar o companheiro. Este trabalho teve como objetivo  
30 verificar a atratividade entre machos e fêmeas do psilídeo da erva-mate, *Gyropsylla*  
31 *spiegazziniana* (Hemiptera: Psyllidae), em bioensaios com olfatômetro em Y e  
32 identificar o feromônio sexual desta espécie. Nos bioensaios foram utilizados insetos  
33 vivos (machos e fêmeas virgens) e um ramo de erva-mate como fonte de odor. Para  
34 analisar a presença do feromônio sexual foram feitos extratos do corpo de machos e  
35 fêmeas virgens, que foram analisados em cromatógrafo gasoso acoplado à  
36 espectrômetro de massas (CG-MS). Como resultado, os machos e as fêmeas foram  
37 atraídos para fêmeas vivas no olfatômetro, porém não foram atraídos para machos  
38 vivos, o que sugere a presença de voláteis liberados pelas fêmeas para atração sexual.  
39 Foi constatada a presença de um composto fêmea-específico, identificado como 2-  
40 nonadecanona, com o possível papel de feromônio sexual. Assim, sugere-se que as  
41 fêmeas de *G. spiegazziniana* liberam compostos voláteis para atrair machos para o  
42 acasalamento. Além disso, os compostos liberados pelas fêmeas podem interagir com os  
43 voláteis emitidos pela erva-mate, resultando na atratividade dos machos de *G.*  
44 *spiegazziniana*. Desta forma, faz-se necessário verificar o sinergismo entre os voláteis da  
45 planta e os liberados pelas fêmeas de *G. spiegazziniana* e se há presença de outros  
46 componentes feromonais secundários.

47

48 **Palavras-chave:** Ampola-da-erva-mate, atração sexual, olfatômetro em Y, extração de  
49 feromônio

50           **Abstract** - In insects, preceding mating, occurs the emission of signals that are  
51 used in interspecific communication, which can be visual, acoustic and chemical  
52 signals. Sex pheromones are the main intermediaries in mating. In the superfamily  
53 Psylloidea (Hemiptera) there are studies only about four species that use chemical  
54 signals to locate the co-specific. The aim of this study was to verify the attractiveness of  
55 males and females of the yerba mate psyllid, *Gyropsylla spegazziniana* (Hemiptera:  
56 Psyllidae), in bioassays with an Y-olfactometer, and to identify the sexual pheromone of  
57 this species. In the bioassays were used live insects (virgin males and females) and a  
58 branch of yerba mate as odor source. In order to analyze the presence of the sexual  
59 pheromone, body extracts of virgin males and females were done, which were analyzed  
60 in a gas chromatograph coupled to the mass spectrometer (GC-MS). As a result, males  
61 and females were attracted to live females in the olfactometer, but were not attracted to  
62 live males, suggesting the presence of volatiles released by females for sexual attraction.  
63 It was found the presence of a female-specific compound, identified as 2-nonadecanone,  
64 as a possible sex pheromone. Thus, it is suggested that females of *G. spegazziniana*  
65 release volatile compounds to attract males for mating. In addition, the compounds  
66 released by the females can interact with the volatiles emitted by the yerba mate,  
67 resulting in attractiveness of *G. spegazziniana* males. Thus, it is necessary to verify the  
68 synergism between plant volatiles and those released by *G. spegazziniana* females, and  
69 if there are other secondary pheromone components.

70

71   **Keywords** - Yerba mate, sexual attraction, Y-olfactometer, pheromone extraction

## 72 **Introdução**

73           Para obter sucesso no acasalamento os animais necessitam passar por etapas,  
74 como busca ao companheiro e corte, e para isto utilizam sinais químicos, visuais e de  
75 vibração através do substrato (Soroker et al., 2004; Lubanga et al., 2014; Lubanga et al.,  
76 2016a,b). Os insetos, em grande maioria, utilizam sinais químicos para exercer suas  
77 atividades comportamentais como seleção de plantas hospedeiras, defesa, localização de  
78 alimento, local para acasalamento e oviposição, além de localização de companheiro  
79 para cópula (Horas, 2009). As substâncias químicas envolvidas são denominadas  
80 semioquímicos, sendo estes classificados em aleloquímicos ou feromônios. Os  
81 aleloquímicos são as substâncias envolvidas nas interações interespecíficas e os  
82 feromônios na comunicação intraespecífica (Vilela & Della Lucia, 2001).

83           Os feromônios são denominados de acordo com seu modo de ação, como  
84 feromônios sexual, de alarme, de agregação, de dispersão, de trilha, de territorialidade e  
85 oviposição (Vilela & Della Lucia, 2001). Os feromônios sexuais atuam na fisiologia dos  
86 insetos com o propósito de atrair o sexo oposto para o acasalamento (Vilela, 1992;  
87 Parra-Pedrazzoli, 2006).

88           *Gyropsylla spegazziniana* (Hemiptera: Psyllidae) (Lizer e Trelles, 1919) é uma  
89 importante praga da cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis*), que está distribuída nos  
90 países da América do Sul (Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai) (Alves et al., 2013). A  
91 fêmea injeta saliva tóxica na nervura central da folha, ocasionando crescimento  
92 desproporcional em ambos os lados (Chiaradia et al., 2002; Barzotto & Alves, 2013). A  
93 folha deformada, conhecida como ampola, servirá de abrigo para os cinco estágios  
94 ninfais do psílideo (Chiaradia et al., 2002). Como consequência da infestação do  
95 psílideo na erva-mate, as folhas deformadas cairão, ocasionando perdas na produção

96 (Chiaradia et al., 2000). Apesar do prejuízo causado por *G. spegazziniana*, na erva-mate  
97 produzida no Brasil não é permitido o uso de produtos fitossanitários (Agrofit, 2016).

98 Neste sentido a identificação de substâncias químicas utilizadas por *G.*  
99 *spegazziniana* na comunicação intraespecífica pode auxiliar no desenvolvimento de  
100 métodos alternativos para o monitoramento e controle desta praga. Há trabalhos sobre a  
101 atratividade entre os sexos e a presença de possíveis compostos voláteis com psilídeos  
102 de outras culturas, como *Diaphorina citri* na cultura do citros (Wenninger et al., 2008),  
103 *Cacopsylla pyricola* e *C. bidens* na cultura da pêra (Soroker et al., 2004; Horton &  
104 Landolt, 2007; Guedot et al., 2009a) e *Bactericera cockerelli* na cultura da batata  
105 (Guédot et al., 2010). Nestas espécies, as fêmeas liberam compostos atrativos aos  
106 machos, mas apenas *C. pyricola* e *D. citri* tiveram os compostos químicos identificados  
107 e testados (Guédot et al., 2009a; Mann et al., 2013).

108 Estudos preliminares com *G. spegazziniana* demonstraram que o acasalamento  
109 ocorre durante a fotofase, preferencialmente durante a tarde (12:00 - 18:00 hs). O  
110 comportamento de acasalamento de *G. spegazziniana* demonstra que os machos se  
111 aproximam das fêmeas nas mudas de erva-mate, indicando a presença de compostos  
112 atrativos exalados pelas fêmeas (dados não publicados).

113 Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo verificar a resposta  
114 comportamental de machos e fêmeas de *G. spegazziniana* a coespecíficos e realizar a  
115 identificação da estrutura química do feromônio sexual da espécie.

116

## 117 **Material e Métodos**

### 118 **Coleta de insetos**

119 As ampolas contendo as ninfas de *G. spegazziniana* foram coletadas entre os  
120 meses de novembro de 2016 a janeiro de 2017, em galhos de plantas adultas de erva-

121 mate, no município de Cascavel, Paraná, Brasil, e transportados até o Laboratório de  
122 Biotecnologia Agrícola, Unioeste, Campus Cascavel. As ampolas foram abertas e, com  
123 o auxílio de um pincel macio e úmido, foram coletadas apenas as ninfas de quinto  
124 ínstar, pois não há como manter os demais ínstar ninfais em criação em laboratório.  
125 As ninfas de quinto ínstar apresentam coloração esverdeada, sendo facilmente  
126 reconhecidas (Leite & Zanol, 2001). As ninfas foram individualizadas até a fase adulta.  
127 Os adultos recém emergidos foram sexados, sendo o sexo determinado de acordo com a  
128 aparência externa dos últimos segmentos abdominais, correspondendo a genitália dos  
129 insetos (Figura 1), de acordo com Leite & Zanol (2001).

130 Após sexados, os insetos foram mantidos em mudas de erva-mate, dentro de  
131 gaiolas de cloreto de polivinila (PVC) incolor (13 cm diâmetro × 40 cm altura), com a  
132 lateral e a parte superior de cada gaiola coberta com tecido *voil*, conforme metodologia  
133 desenvolvida por Alves et al. (2013). A gaiola foi colocada sobre a muda de erva-mate,  
134 envolvendo-a totalmente, deixando o vaso com terra fora da gaiola. Havia uma gaiola  
135 para machos e outra para fêmeas.

136

### 137 **Bioensaios em olfatômetro**

138 Para avaliar a resposta de machos e fêmeas de *G. spegazziniana* aos estímulos  
139 olfativos foi utilizado um olfatômetro em Y. O mesmo consistia em um tubo de vidro de  
140 2 cm de diâmetro em forma de Y, com o tubo principal com 22 cm de comprimento e  
141 dois braços menores de 14 cm cada. Como a ampola tem o hábito de posicionar-se no  
142 ápice dos ramos, foram feitos testes preliminares nos quais se constatou que o  
143 olfatômetro devia ser posicionado verticalmente, com uma inclinação de 45°.

144 Um fluxo de ar, produzido por bomba a vácuo, foi filtrado em coluna de carvão  
145 ativado, posteriormente umidificado em coluna contendo água destilada, e dirigido a

146 duas cubas de vidro de 1L contendo as fontes de odor (Figura 2). Cada frasco contendo  
147 uma fonte de odor foi ligado a um braço do olfatômetro. Precedendo os ensaios, o fluxo  
148 de ar foi passado por todo o sistema a 5 L/min em cada braço, durante 1 hora. Este fluxo  
149 foi mantido durante todo o experimento.

150 Os testes foram realizados no período da tarde, entre 12:00 - 18:00h, pois é o  
151 período em que *G. spegazziniana* apresenta maior atividade sexual. Para realizar os  
152 experimentos, ambas as cubas continham um ramo de erva-mate, com a extremidade  
153 cortada sendo mantida em vidro com água. A cuba controle continha apenas um ramo  
154 de erva-mate e a cuba do estímulo olfativo continha um ramo de erva-mate e 25 fêmeas  
155 virgens ou um ramo de erva-mate e 25 machos virgens.

156 As comparações entre os tratamentos foram realizadas em ordem aleatória, no  
157 mesmo dia. Os insetos foram colocados individualmente em copo plástico com tampa (5  
158 cm altura x 6 cm diâmetro), precedendo os ensaios em 30 min. Os insetos foram  
159 liberados individualmente na entrada do tubo principal do olfatômetro, sendo observado  
160 seu comportamento por 20 min ou até entrar em um dos braços do olfatômetro. A  
161 escolha foi registrada quando o psilídeo adentrou 5 cm do braço, não permitindo o  
162 contato do psilídeo com a extremidade do braço para evitar liberação de voláteis nesta  
163 área. Cada inseto foi considerado uma repetição e, após a liberação de cinco insetos, os  
164 braços do olfatômetro foram rodados em 180° para evitar viés de posição, e a cada 10  
165 repetições o olfatômetro foi lavado com detergente neutro e água, enxaguado com  
166 álcool etílico e água destilada e secado em estufa a 100°C por 2h, para evitar  
167 contaminação. Cada inseto foi testado apenas uma vez.

168 A idade dos machos e das fêmeas utilizados na cuba e os ensaios em olfatômetro  
169 foi mantida constante, entre 3 e 7 dias de vida após tornarem-se adultos, pois foi neste  
170 período que os insetos mais acasalaram (dados não publicados).

171 Foi observada a resposta de machos e fêmeas de *G. spegazziniana* aos seguintes  
172 estímulos:

173 a) resposta de machos para 25 fêmeas X controle;

174 b) resposta de machos para 25 machos X controle;

175 c) resposta de fêmeas para 25 fêmeas X controle;

176 d) resposta de fêmeas para 25 machos X controle.

177 Apenas para os insetos que escolheram uma das fontes de odor foi anotado o  
178 período de tempo (min) desde a liberação do inseto no olfatômetro até quando alcançou  
179 o braço com a fonte de odor. Os insetos que permanecerem imóveis ou não escolheram  
180 umas das fontes nos 20 min de observação não foram contabilizados e analisados.

181

## 182 **Extratos de machos e fêmeas**

183 As extrações foram realizadas entre 12:00 e 17:00h, pois é o período em que *G.*  
184 *spegazziniana* apresenta maior atividade sexual (dados não publicados). Para cada  
185 extração e de cada sexo, 50 insetos foram alocados em copo plástico com tampa (5 cm  
186 altura x 6 cm diâmetro), e posteriormente colocados em freezer a -4°C por 3 min para  
187 cessar os movimentos. Os insetos foram então transferidos para frascos de vidro de 1  
188 mL com tampa, onde foram adicionados 250 µL de hexano bidestilado. Após 20 min o  
189 solvente contendo os voláteis foi retirado com auxílio de micropipeta e transferido para  
190 um frasco de vidro de 2 mL com tampa, que foi mantido em freezer a - 4°C para  
191 posterior análise.

192

## 193 **Identificação estrutural do feromônio sexual**

194 Uma alíquota de 1 µL dos extratos de machos e fêmeas foi injetada e analisada  
195 por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-MS), modelo

196 Shimadzu QP-5050A, equipado com uma coluna capilar DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25  
197 µm de filme) (J & W Scientific, Folsom, Califórnia, EUA) com ionização por impacto  
198 de elétrons (70 eV). O CG-MS foi operado em modo splitless (250°C), com  
199 programação de temperatura de 50°C por 1 min, aumentando 7°C/min até 250°C,  
200 permanecendo nesta temperatura por 10 min. A linha de transferência operou a 270°C e  
201 o hélio foi usado como gás de arraste com fluxo de 1mL/min.

202 O composto A do extrato da fêmea, que se diferenciou do extrato do macho, foi  
203 identificado por meio dos respectivos padrões de fragmentação, tempo de retenção,  
204 comparações com a biblioteca NIST do espectrômetro e índice de Kovats.

205

## 206 **Análise estatística**

207 Para verificar a diferença na escolha de *G. spegazziniana* para a fonte de odor foi  
208 utilizado o teste de  $\chi^2$ , e para analisar a diferença no tempo que cada inseto levou para  
209 escolher uma fonte de odor foi utilizado teste de Wilcoxon, ambos a 5% de  
210 significância. Para a realização das análises estatísticas foi utilizado o programa  
211 estatístico R (2013).

212

## 213 **Resultados**

214 Os resultados obtidos nos testes de olfatômetro em Y com machos e fêmeas de  
215 *G. spegazziniana* estão dispostos nas figuras 3 e 4. Pode-se observar diferenças nas  
216 respostas em relação às fontes de odor. Os machos mostraram uma resposta positiva aos  
217 voláteis provenientes das fêmeas virgens ( $\chi^2= 4,9231$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,0265$ ). Dos 91  
218 machos testados, 48 responderam aos testes em olfatômetro, e destes 63% escolheram o  
219 lado das fêmeas e 38% escolheram o lado controle (Figura 3).

220 Os machos não mostraram resposta positiva em relação aos voláteis de machos  
221 virgens, sendo que dos 90 machos testados, 63 responderam e 63% destes escolheram o  
222 lado do controle e 37% o lado dos machos virgens (Figura 4). Assim sendo, os machos  
223 escolheram ambos os lados, com resposta positiva e significativa para o lado do  
224 controle ( $\chi^2 = 4,5873$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,032$ ).

225 Em relação as respostas das fêmeas, as mesmas foram atraídas  
226 significativamente aos voláteis das fêmeas virgens ( $\chi^2 = 4,3333$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,037$ ) em  
227 comparação com o controle. Das 55 fêmeas testadas, 67% escolheram o lado contendo  
228 as fêmeas e 33% das fêmeas o controle (Figura 3). Além disso, as fêmeas responderam  
229 positivamente para o controle quando comparado com o ramo de erva-mate infestado  
230 com machos ( $\chi^2 = 3,9302$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,047$ ). Das 73 fêmeas testadas, 65% escolheram o  
231 controle e 35% o lado dos machos virgens (Figura 4).

232 Quando comparadas as médias de tempo que machos e fêmeas utilizaram para  
233 chegar a um dos lados do olfatômetro, observa-se que, independente do estímulo  
234 olfativo, não houve diferença significativa no tempo de escolha (Tabela 1).

235

### 236 **Análises dos extratos cuticulares**

237 Verificou-se a presença de vários compostos em comum para os dois sexos  
238 (Figura 5A). Porém, no extrato de fêmeas, foi encontrado um composto ausente nos  
239 machos (Figura 5B), que foi identificado como 2-nonadecanona (Figura 5C),  
240 pertencente ao grupo das cetonas, já descrito como componente feromonal de insetos.

241

### 242 **Discussão**

243 Diferentes sinais estão envolvidos na localização das fêmeas por machos durante  
244 o processo de seleção sexual em insetos. Tanto machos como fêmeas de *G.*

245 *spgazziniana* responderam aos estímulos do mesmo sexo (fêmea-fêmea) e do sexo  
246 oposto (macho-fêmea) com a planta hospedeira em olfatômetro, demonstrando que o  
247 comportamento deste psilídeo é determinado pela emissão e recepção de voláteis, dado  
248 que não havia estímulos visuais ou acústicos no teste realizado. Já *C. pyricola* utiliza  
249 sinais visuais, pois experimentos de cópula indicaram que os acasalamentos ocorreram  
250 somente durante a fotofase (Krysan, 1990). No entanto, sinais acústicos também já  
251 foram descritos como parte da interação entre sexos desta espécie (Eben et al.,2015).

252 *D. citri* também reduziu suas atividades no período noturno, indicando o uso de  
253 sinais visuais na comunicação intraespecífica (Wenninger & Hall, 2007). Além disso,  
254 Wenninger et al. (2009a) e Rohde et al. (2013) sugerem que os machos de *D. citri*  
255 utilizam a sinalização vibracional para localizar as fêmeas, além de sinais olfativos e de  
256 vibrações das asas na comunicação entre machos e fêmeas.

257 Além dos sinais utilizados na interação intraespecífica, Wenninger et al. (2009b)  
258 verificaram sinais olfativos e visuais na interação interespecífica de *D. citri*, pois as  
259 fêmeas utilizaram estes sinais para encontrar quatro tipos de plantas hospedeiras,  
260 enquanto os machos localizaram apenas duas plantas. Os autores sugerem que os  
261 machos chegam até as fêmeas utilizando substâncias químicas emitidas pelas plantas.

262 Para o psilídeo *Aacanthocnema dobsoni* (Triozidae), testes com os extratos  
263 cuticulares para atrair o sexo oposto revelaram que estes não eram ativos (Lubanga et al.  
264 2016b). Em outro trabalho, concluiu-se que *A. dobsoni* utiliza apenas vibrações  
265 suportadas por substrato para comunicação interespecífica, já que fêmeas e machos  
266 atraem-se através de vibrações suportadas por substrato (SBVs), sendo as vibrações dos  
267 machos longas e curtas e as femininas apenas curtas (Lubanga et al., 2016a). Os autores  
268 ainda descrevem que a frequência e a intensidade da vibração são diferentes em insetos

269 jovens e mais velhos, porém a resposta de fêmeas não foi influenciada pelo tamanho do  
270 corpo ou pela idade do macho.

271 Os resultados dos testes em olfatômetro sugerem que os machos e as fêmeas de  
272 *G. spegazziniana* são atraídos por ramos de erva-mate infestados por fêmeas, e os  
273 machos não são atraídos por ramos de erva-mate infestados por machos. Estes  
274 resultados corroboram com os descritos por Horton & Landolt (2007) para *C. pyricola*,  
275 em que os machos são positivamente atraídos para brotos de pêra infestados por fêmeas.  
276 Para os autores, os voláteis emitidos pelas fêmeas associados aos ramos de pêra atraem  
277 os machos, pois os machos não são atraídos por ramos de pêra infestados por machos  
278 (Horton & Landolt, 2007).

279 Ainda em *C. pyricola*, machos são atraídos por fêmeas mais velhas quando  
280 comparado com fêmeas jovens, não havendo preferência dos machos por fêmeas  
281 virgens ou acasaladas (Horton et al., 2008). Os autores ainda relatam que os machos são  
282 atraídos para fêmeas mesmo sem a presença da planta hospedeira, confirmando a  
283 hipótese de atrativo sexual liberado pela fêmea (Horton et al., 2008, Guédot et al.,  
284 2011). Brown et al. (2009) também relatam que machos de *C. pyricola* são atraídos em  
285 campo por armadilhas contendo fêmeas vivas.

286 Os machos de *C. bidens* também demonstraram preferência por plantas  
287 hospedeiras com a presença de fêmeas (Soroker et al., 2004). Para os autores as fêmeas  
288 emitem feromônios enquanto se alimentam, sendo que a interação entre os voláteis da  
289 planta hospedeira e os liberados pelas fêmeas influenciam na resposta dos machos  
290 (Soroker et al., 2004).

291 Wenninger et al. (2008) observaram que machos e fêmeas de *D. citri*  
292 apresentaram este mesmo comportamento, indicando a presença de voláteis emitidos  
293 pelas fêmeas para atrair os machos. Segundo os autores, há algumas hipóteses para

294 explicar este comportamento: as fêmeas liberam voláteis que atraem os machos e as  
295 fêmeas; as fêmeas ao se alimentar induzem a emissão de voláteis pela planta, os quais  
296 são atrativos aos machos; a alimentação e oviposição induzem mudanças nas plantas,  
297 atraindo os machos; as fêmeas podem deixar sinais químicos e/ou físicos nas plantas e  
298 assim os machos são atraídos. Desta forma, os machos de *G. spegazziniana*, são atraídos  
299 por compostos liberados pelas fêmeas e/ou compostos das fêmeas em sinergismo com  
300 os voláteis da erva-mate.

301 Ainda para *D. citri*, Wenninger et al. (2008) verificaram que os machos  
302 respondiam mais aos odores emitidos pelas fêmeas quando os odores eram liberados por  
303 15 fêmeas quando comparado a 4 fêmeas, indicando que quanto maior o número de  
304 fêmeas, maior a atratividade e, provavelmente, maior a quantidade de sinais olfativos  
305 emitidos. Este resultado corrobora com o observado em *G. spegazziniana*, pois em  
306 experimentos anteriores não houve respostas de machos ou fêmeas em olfatômetro  
307 quando utilizou-se poucos insetos (5 - 10 insetos) como fonte de odor, necessitando de  
308 uma quantidade maior de fêmeas e machos para promover atração entre os sexos.

309 Os machos do psílideo da batata, *B. cockerelli*, também são atraídos por voláteis  
310 liberados pelas fêmeas vivas e por extrato de fêmeas (Guédot et al., 2010; Guédot et al.,  
311 2013). Os machos foram atraídos por voláteis de machos e extratos de machos, sendo  
312 que este foi o primeiro registro de atração entre machos na superfamília Psylloidea  
313 (Guédot et al.,2010). O mesmo não foi observado em *G. spegazziniana*, na qual os  
314 machos não apresentaram preferência por voláteis emitidos pelo mesmo sexo. Já os  
315 machos de *C. pyricola*, morfotipo de inverno, são repelidos por voláteis de machos  
316 (Guédot et al.,2009b).

317 Os machos de *B. cockerelli* expostos simultaneamente a odores de machos e  
318 fêmeas preferiram odores das fêmeas, enquanto as fêmeas evitaram os voláteis liberados

319 por fêmeas e machos vivos e por extratos de fêmeas e machos (Guedót et al.,2010). A  
320 idade de machos e fêmeas de *B. cockerelli* não influenciou na atração. Machos não  
321 mostraram preferência por fêmeas novas (1-4 dias) ou velhas (8-10 dias), ou seja, a  
322 idade das fêmeas não afetou a atratividade (Guédot et al., 2012).

323 Na análise cromatográfica dos extratos de *G. spegazziniana* foi possível verificar  
324 um pico presente apenas no extrato de fêmeas, sendo este descrito na literatura como  
325 nonadecan-2-ona ou 2-nonadecanona. Possivelmente este componente do extrato está  
326 envolvido na atratividade dos machos para fêmeas.

327 Este mesmo composto foi encontrado nos extratos de *Callosobruchus*  
328 *rhodesianus* (Coleoptera: Chrysomelidae) por Shimomura et al. (2016). Segundo os  
329 autores, o composto 2-nonadecanona juntamente com hexahidrofarnesila e um  
330 hidrocarboneto cuticular (HC), formam o feromônio sexual do coleóptero (Shimomura  
331 et al., 2016).

332 Em *G. spegazziniana*, a substância 2-nonadecanona está em processo de  
333 confirmação da identificação e síntese química em laboratório, e mais testes são  
334 necessários para verificar se este composto é ativo na atração sexual de machos e  
335 fêmeas, e se este age em sinergia com outros compostos oriundos das plantas de erva-  
336 mate. Vale ressaltar que esta substância pertence ao grupo das cetonas, com cadeia de  
337 carbono simples, produzida e distribuída comercialmente.

338 Dentro da superfamília Psylloidea quatro espécies possuem compostos voláteis  
339 emitidos pelas fêmeas: *C. pyricola*, *C. bidens*, *B. cokerelli* e *D. citri* (Lubanga et al.,  
340 2014). Destas, foram identificados os feromônios sexuais apenas de *C. pyricola* e *D.*  
341 *citri*.

342 Para *C. pyricola* foi identificado o composto 3-metil-heptacosano como a  
343 substância liberada pelas fêmeas e responsável pela atração do macho para o

344 acasalamento. O composto foi testado em laboratório e em campo e em ambos os testes  
345 não houve atratividade para o sexo feminino, apenas para o sexo masculino (Guédot et  
346 al., 2009a).

347       Para *D. citri*, o extrato cuticular de machos e de fêmeas apresentaram algumas  
348 similaridades. O ácido dodecanóico estava presente em maior quantidade nos extratos  
349 de fêmeas. Testes comportamentais com machos de *D. citri* mostraram a escolha  
350 preferencial do braço do olfatômetro contendo ácido dodecanóico (Mann et al., 2013), e  
351 em campo uma maior quantidade de ácido dodecanóico atraiu significativamente mais  
352 machos do que fêmeas. Porém, em quantidade baixas, a atratividade foi semelhante às  
353 armadilhas controle. Os autores sugerem que mais de um componente dos  
354 hidrocarbonetos cuticulares são utilizados para atratividade de *D. citri* (Mann et al.,  
355 2013). Nos extratos de *G. spegazziniana* não foram identificadas as substâncias  
356 presentes nos extratos dos psilídeos *C. pyricola* e *D. citri*, sendo necessários mais  
357 estudos para a identificação dos demais compostos presentes nos extratos *G.*  
358 *spegazziniana*.

359       Os resultados apresentados comprovam que machos e fêmeas de *G.*  
360 *spegazziniana* são atraídos para brotos de erva-mate infestados por fêmeas. Não é  
361 possível afirmar através destes resultados se a presença da planta hospedeira é  
362 necessária para a atração sexual. Mas apenas a presença dos voláteis foi suficiente para  
363 atrair machos e fêmeas para fêmeas coespecíficas. Estudos adicionais são necessários  
364 para verificar a atração de machos e fêmeas para os extratos cuticulares de seus  
365 coespecíficos. Extratos de fêmeas mais concentrados, contendo maior quantidade de  
366 feromônio sexual, precisam ser analisados para confirmar se há apenas um componente  
367 feromonal para *G. spegazziniana*.

368

369 **Agradecimentos**

370 À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela  
371 concessão da bolsa de estudo.

372

373 **Referências**

374 Alves, L.F.A., Formentini, M.A., Fanti, A.L.P., Schapovaloff, M.E. e Barzotto, I.L.M.  
375 (2013) Susceptibility of *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer & Trelles) (Hemiptera:  
376 Psyllidae) to *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Arquivo do Instituto Biológico 80, pp.  
377 363-366.

378

379 Barzotto, I.L.M. e Alves, L.F.A. (2013) Bioecologia e manejo de *Gyropsylla*  
380 *spegazziniana* em erva-mate. Arquivo do Instituto Biológico 80, pp. 457-464.

381

382 Brown, R.L., Landolt, P.J., Horton, D.R. e Zarck, R.S. (2009) Attraction of *Cacopsylla*  
383 *pyricola* (Hemiptera: Psyllidae) to female psylla in pear orchards. Environmental  
384 Entomologist 38, pp. 815-822.

385

386 Chiaradia, L.A., Milanez, J.M. e Sabedot, S.M. (2000) Caracterização e danos da  
387 ampola-da-erva-mate. Pesquisa Agropecuária Catarinense 13, pp. 50-53.

388

389 Chiaradia, L.A., Milanez, J.M. e Zidko, A. (2002) Estimativa das gerações anuais de  
390 *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer, 1917) em função de sua exigência térmica. Ciência  
391 Rural 32, pp. 385-39.

392

393 Eben, A., Mühlethaler, R., Gross, J. e Hoch, H. (2015) First evidence of acoustic  
394 communication in the pear psyllid *Cacopsylla pyri* L. (Hemiptera: Psyllidae). Journal of  
395 Pest Science 88, pp. 87-95.

396

397 Formentini, M.A., Alves, L.F.A., Schapovaloff, M.E., Mamprim, A.P., Bonini, A.K. e  
398 Pinto, F.G.S. (2015) Characterization and activity of entomopathogenic fungi isolates  
399 against “Paraguay tea ampul” (*Gyropsylla spegazziniana*) (Lizer & Trelles) (Hemiptera:  
400 Psyllidae). Semina: Ciências Agrárias 36, pp. 3553-3566.

401

402 Guédot, C., Horton, D.R. e Landolt, P.J. (2010) Sex Attraction in *Bactericera cockerelli*  
403 (Hemiptera: Triozidae). Environmental Entomology 39, pp. 1302-1308.

404

405 Guédot, C., Horton, D.R. e Landolt, P.J. (2011) Response of summerform pear psylla  
406 (Hemiptera:Psyllidae) to male- and female-produced odors. The Canadian Entomologist  
407 143, pp. 245-253.

408

409 Guédot, C., Horton, D.R. e Landolt, P.J. (2012) Age at reproductive maturity and effect  
410 of age and time of day on sex attraction in the potato psyllid *Bactericera cockerelli*.  
411 Insect Science 00, pp. 1-10.

412

413 Guédot, C., Horton, D.R., Landolt, P.J. e Munyaneza, J.E. (2013) Effect of mating on  
414 sex attraction in *Bactericera cockerelli* with evidence of refractoriness. *Entomologia*  
415 *Experimentalis et Applicata* 149, pp. 27–35.

416  
417 Guédot, C., Horton, D.R. e Landolt, P.J. (2009b) Attraction of male winterform pear  
418 psylla to female produced volatiles and to female extracts and evidence of male-male  
419 repellency. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 130, pp. 191–197.

420  
421 Guédot, C., Millar, J.G., Horton, D.R. e Landolt, P.J. (2009a) Identification of a sex  
422 attractant pheromone for male winterform pear psylla, *Cacopsylla pyricola*. *Journal of*  
423 *Chemical Ecology* 35, pp.1437–1447.

424  
425 Horas, V.R. (2009) *Crociosema aporema* (Walsingham, 1914) (Lepidoptera:  
426 Tortricidae): Resposta olfativa aos voláteis da soja e comportamento de acasalamento.  
427 Dissertação, Universidade Federal do Paraná, Brasil.

428  
429 Horton, D.R. e Landolt, P.J. (2007) Attraction of male pear psylla, *Cacopsylla pyricola*,  
430 to female-infested pear shoots. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 123, pp. 177–  
431 183.

432  
433 Horton, D.R., Guédot, C. e Landolt, P.J. (2008) Attraction of male summerform pear  
434 psylla to volatiles from female pear psylla: effects of female age mating status and  
435 presence of host plants. *The Canadian Entomologist* 140, pp. 184-191.

436  
437 Krysan, J.L. (1990) Laboratory Study of mating behavior as related to diapause in  
438 overwintering *Cacopsylla pyricola* (Homoptera: Psyllidae). *Environmental Entomology*  
439 19, pp. 551-557.

440  
441 Leite, M.S.P. e Zanol, K.M.R. (2001) Biologia e morfologia de *Gyropsylla*  
442 *spgazziniana* (Lizer y Trelles) (Hemiptera, Psyllidae). *Acta Biológica Paranaense* 30,  
443 pp.19-34.

444  
445 Lubanga, U.K., Guédot, C., Percy, D.M. e Steinbauer, M.J. (2014) Semiochemical and  
446 vibrational cues and signals mediating mate finding and courtship in Psylloidea  
447 (Hemiptera): A synthesis. *Insects* 5, pp. 577-595.

448  
449 Lubanga, U.K., Peters, R.A. e Steinbauer, M.J. (2016a) Substrate-borne vibrations of  
450 male psyllids vary with body size and age but females are indifferent. *Animal*  
451 *Behaviour* 120, pp. 173-182.

452  
453 Lubanga, U.K., Drijfhout, F.P., Farnier, K. e Steinbauer, M.J. (2016b) The long and the  
454 short of mate attraction in a Psylloid: do semiochemicals mediate mating in  
455 *Aacanthocnema dobsoni* Froggatt? *Journal Chemical Ecology* 42, pp.163–172.

456  
457 Mann, R.S., Rouseff, R.L., Smott, J., Rao, N., Meyer, W.L., Lapointe, S.L., Robbins,  
458 P.S., Cha, D., Linn, C.E., Webster, F.X., Tiwari, S. e Stelinski, L.L. (2013) Chemical  
459 and behavioral analysis of the cuticular hydrocarbons from Asian citrus psyllid,  
460 *Diaphorina citri* *Insect Science* 20, pp. 367–378.

461

462 Parra-pedrazzoli, A.L. (2006) Isolamento, identificação, síntese e avaliação de campo  
463 do feromônio sexual do minador-do-citrus, *Phyllocnistis citrella* Stainton, 1856  
464 (Lepidoptera: Gracillariidae). Tese. Universidade de São Paulo, Escola superior de  
465 agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, Brasil.

466

467 R Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing.  
468 Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org/>.

469

470 Rohde, B., Paris, T.M., Heatherington, E.M., Hall, D.G. e Mankin, R.W. (2013)  
471 Responses of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) to conspecific vibrational signals  
472 and synthetic mimics. *Annals of the Entomological Society of America* 106, pp. 392-  
473 399.

474

475 Shimomura, K., Matsui, S., Ohsawa, K. e Shunsuke, Y. (2016) Saltational evolution of  
476 contact sex pheromone compounds of *Callosobruchus rhodesianus* (Pic).  
477 *Chemoecology* 26, pp. 15–23.

478

479 Soroker, V., Talebaev, S., Harari, A.R. e Wesley, D.S. (2004) The role of chemical cues  
480 in host and mate location in the pear psylla *Cacopsylla bidens* (Homoptera: Psyllidae).  
481 *Journal Insect Behavior* 17, pp. 613-626.

482

483 Vilela, E.F. (1992) Adoção de feromônios no manejo integrado de pragas. *Pesquisa*  
484 *Agropecuária Brasileira* 27, pp. 315-318

485

486 Vilela, E.F. e Della Lucia, T.M.C. (2001) Feromônios de insetos - biologia, química e  
487 emprego no manejo de pragas. *Holos, Ribeirão Preto, Brasil*

488

489 Wenninger, E.J. e Hall, D.G. (2007) Daily timing of mating and age at reproductive  
490 maturity in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Florida Entomologist* 90, pp. 715-  
491 722.

492

493 Wenninger, E.J., Stelinski, L.L. e Hall, D.G. (2008) Behavioral evidence for a female-  
494 produced sex attractant in *Diaphorina citri*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*  
495 128, pp. 450–459.

496

497 Wenninger, E.J., Hall, D.G. e Mankin, R.W. (2009a) Vibrational communication  
498 between the sexes in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Annals of the*  
499 *Entomological Society of America* 102, pp. 547-555.

500

501 Wenninger, E.J., Stelinski, L.L. e Hall, D.G. (2009b) Roles of olfactory cues, visual  
502 cues, and mating status in orientation of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera:  
503 Psyllidae) to four different host plants. *Environmental Entomology* 38, pp. 225-234.

504

505

506

507

508

509

510

## Anexos

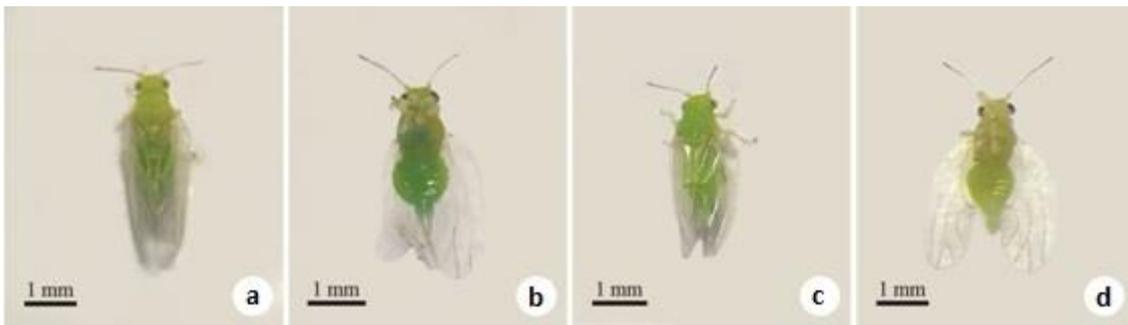


Figura 1 Indivíduos adultos de *G. spegazziniana*. a - fêmea, vista dorsal; b - fêmea, vista ventral; c - macho, vista dorsal; d - macho, vista ventral. Foto: Adriana H Walerius

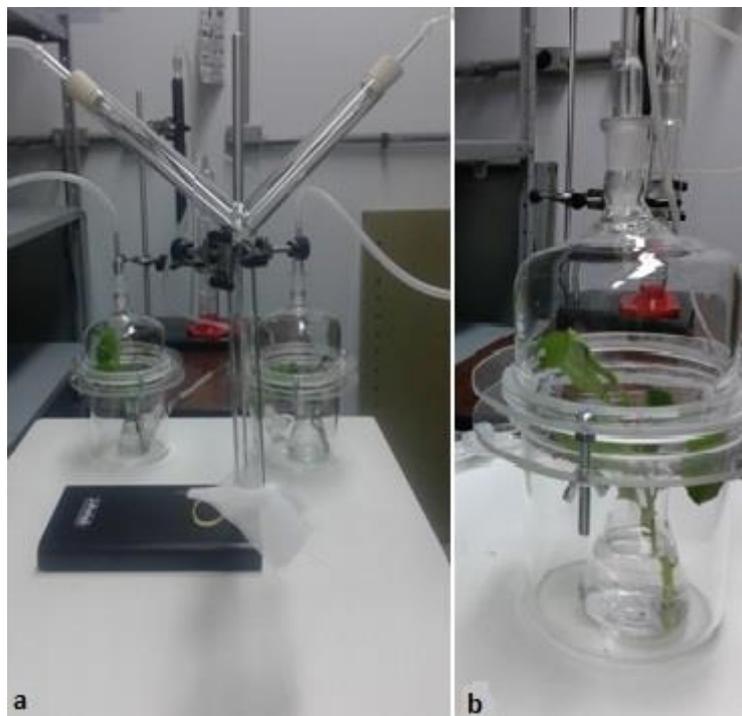


Figura 2 a) Olfatômetro em Y utilizado para os testes olfativos de *G. spegazziniana*. b) Detalhe da cuba contendo as fontes de odor.

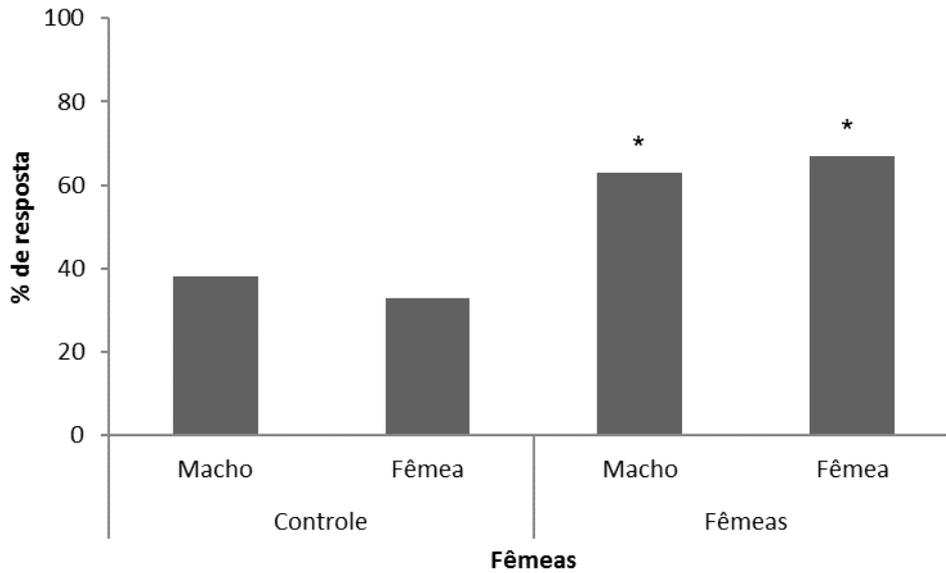


Figura 3 Porcentagem de resposta de fêmeas e machos virgens de *G. spegazziniana* aos voláteis de fêmeas virgens em olfatômetro em Y. \* indica diferença estatística significativa (Teste  $\chi^2$ ,  $p < 0,05$ ).

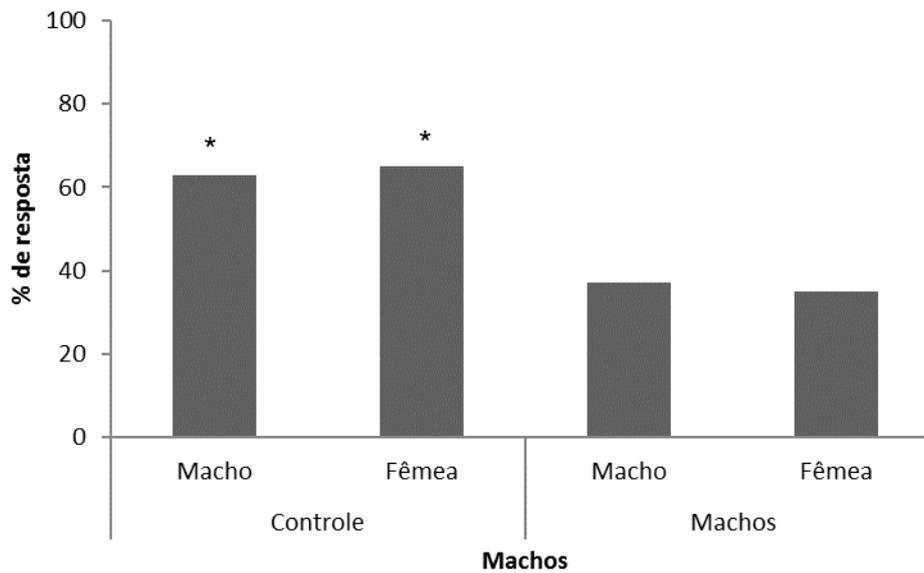


Figura 4 Porcentagem de resposta de fêmeas e machos virgens de *G. spegazziniana* aos voláteis de machos virgens em olfatômetro em Y. \* indica diferença estatística significativa (Teste  $\chi^2$ ,  $p < 005$ ).

Tabela 1. Tempo médio (min) de escolha por machos e fêmeas de *G. spegazziniana* para os estímulos olfativos

| <b>Estímulo olfativo</b> | <b>Indivíduo testado</b> | <b>Tempo médio (min)</b> | <b>Valor p</b> |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------|
| 25 fêmeas                | macho                    | Controle= 06:26          | 0,13           |
|                          |                          | Estímulo= 08:07          |                |
|                          | fêmea                    | Controle=08:08           | 0,86           |
|                          |                          | Estímulo=06:44           |                |
| 25 machos                | macho                    | Controle=06:35           | 0,60           |
|                          |                          | Estímulo=07:24           |                |
|                          | fêmea                    | Controle=07:30           | 0,60           |
|                          |                          | Estímulo=06:40           |                |

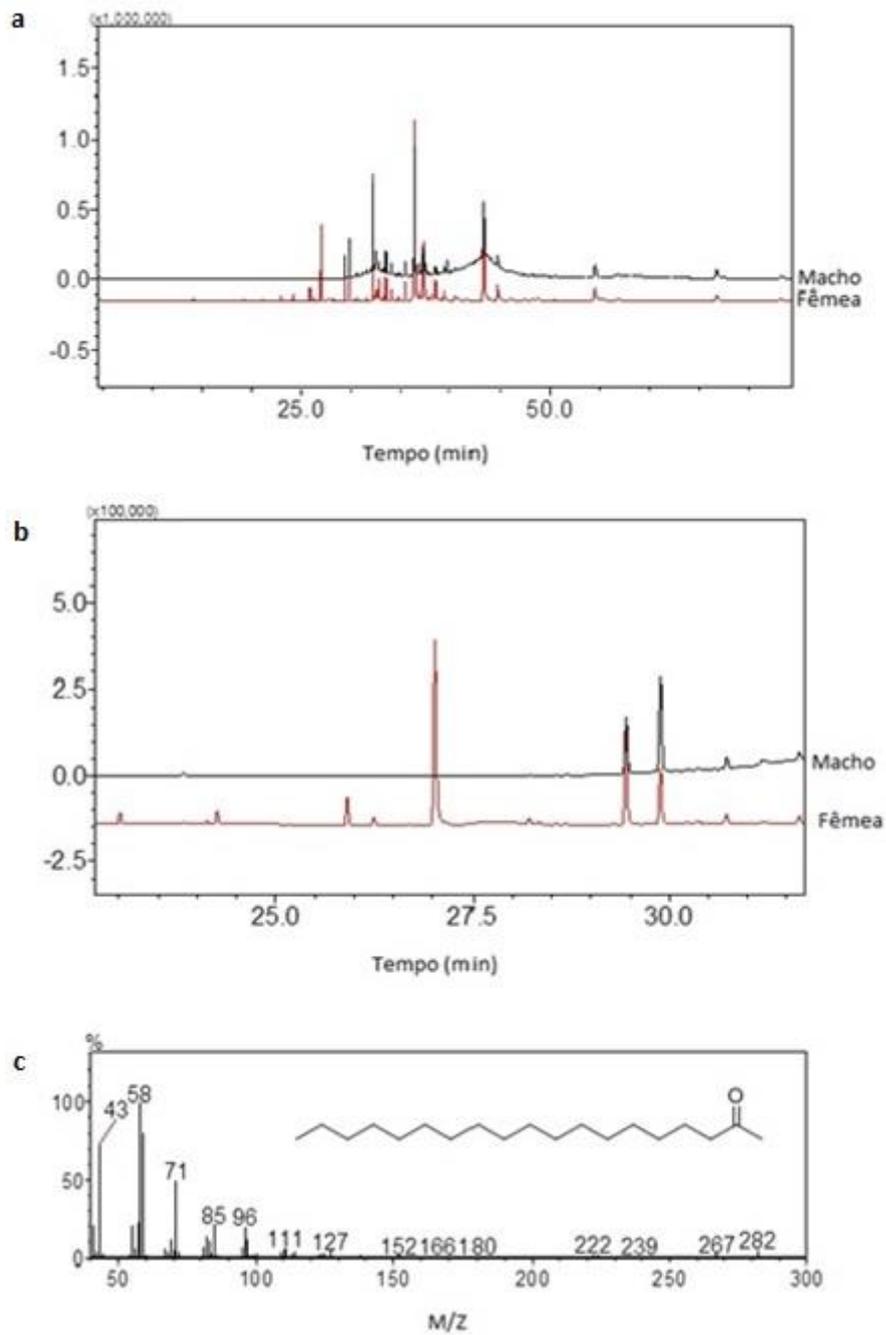


Figura 5. Comparação das cromatografias e espectrômetro de massas dos voláteis obtidos de machos e fêmeas de *G. spegazziniana*. A - picos encontrados em ambos os sexos. B - picos encontrados em ambos, salientando um pico fêmea-específico. C - espectro de massas do composto do feromônio sexual da fêmea.

## **Anexo 1 - Normas da Revista do Cap. 1**

### **Neotropical Entomology**

#### Instructions for Authors

#### Manuscript Submission

#### Legal Requirements

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all coauthors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

#### Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

#### Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen. Upon submission, the e-mail addresses of all authors will be requested. At the end of the submission process, the corresponding author will receive an acknowledgement e-mail and all co-authors will be contacted automatically to confirm their affiliation to the submitted work.

#### Sections

Submissions to the following sections will be taken into consideration: ‘Forum’, ‘Ecology, Behavior and Bionomics’, ‘Systematics, Morphology and Physiology’, ‘Biological Control’, ‘Pest Management’, ‘Public Health’, ‘Scientific Notes’.

### English Language

Editing Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to ask a native speaker to help you or arrange for your manuscript to be checked by a professional language editor prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in medicine, biomedical and life sciences, chemistry, physics, engineering, business/economics, and humanities. Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

Edanz Editing Global: <http://www.edanzediting.com/springer>

Edanz will charge authors directly for these language polishing services.

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

### Title Page

The title page should include:

- The section to which your article belongs to.
- A concise and informative title.
- The name(s) of the author(s) – left-justified below the title; only initials of the first and middle names of authors are provided followed by their last names in full. Names of different authors are separated by a comma. Do not use “and” or “&” to separate different authors.
- The affiliation(s) of the author(s).
- The complete name, the regular and e-mail addresses, telephone and fax numbers of the corresponding author only.
- A running title no longer than 65 characters.

### Abstract

Please provide a one-paragraph long abstract of up to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

### Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

### Text

Text Formatting Manuscripts should be submitted in Word.

- Set page as A4 size and margins at 1 inch.
- Use a normal, plain font (e.g., 12-point Times Roman) for text.
- Lines must be double spaced.
- The name of insect and mite species must be written in full and followed by the species author when first mentioned in the Title, Abstract and Main Text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages. ○ Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead.
- Save your file in doc format. Do not submit docx files.

### Headings

Please use no more than three levels of displayed headings. Headings in bold, sub-headings of the second level in roman, and level 3 sub-headings in italic font type.

### Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter. Scientific Names Write scientific names in full, followed by the author's name (for insect and mite species), whenever they first appear in the Abstract and Main text. Names should also be listed in full at the beginning of a paragraph or sentence. E.g., *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Use the abbreviated generic name (e.g., *S. Frugiperda*) in the rest of the paper, except in tables and figures, where the name should be in full.

## Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables. Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.

## Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

## References

### Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. References to more than one publication are chronologically ordered, separated by commas. Use ‘&’ for two authors and italicized ‘et al’ for more than two authors. Some examples:

Negotiation research spans many disciplines (Panizzi 1990).

This result was later contradicted by Parra & Zucchi (2006).

This effect has been widely studied (Vilela 1991, Moscardi et al 1995, Frey da Silva & Grazia 2006, Moscardi et al 2009).

### Reference List

Type references in alphabetical order, one per paragraph, with no space between them. The authors’ last names are typed in full, followed by capital initials. Use a comma to separate the names of authors. Add the reference year after the authors’ names, between parentheses. Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see [www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php](http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php). Please avoid citations of dissertations, theses and extension materials. Do not cite restricted-circulation materials (such as institutional documentation and research reports), partial research reports or abstracts of papers presented at scientific meetings.

- Journal article  
Warner KD (2012) Fighting pathophobia: how to construct constructive public engagement with biocontrol for nature without augmenting public fears. *BioControl* 57:307–317
- Article by DOI  
Grosman AH, Janssen A, Brito EF, Cordeiro EG, Colares F, Fonseca JO, Lima ER, Pallini A, Sabelis MW (2008) Parasitoid increases survival of its pupae by inducing hosts to fight predators. *PLoS ONE* 3(6):e2276. doi:10.1371/journal.pone.0002276
- Book  
Carey JR (1993) Applied demography for biologists with special emphasis on insects. Oxford University Press, New York, p 206
- Book chapter  
Datnoff LE, Seebold KW, Correa FJ (2001) The use of silicon for integrated disease management reducing fungicide applications and enhancing host plant resistance. In: Datnoff LE, Snyder GH, Korndorfer GH (eds) *Silicon in agriculture*. Elsevier Science, Amsterdam, pp 209–219
- Online document  
Monteiro RC, Lima EFB (2011) *Thysanoptera of Brazil*. <http://www.lea.esalq.usp.br/thysanoptera/> Accessed 25 Nov 2011
- Dissertation Nihei SS (2004) *Sistemática e biogeografia de Muscini (Diptera, Muscidae)*. PhD. Thesis, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, p 203

## Tables

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table. Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

## Artwork

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

#### Electronic Figure

Submission Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics (line art), the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts (Calibri type) embedded in the files. Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

#### Line Art

Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

#### Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

#### Combination Art

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

#### Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent. If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions. Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

#### Figure Lettering

To add lettering, please use Calibri font only.

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc. Do not include titles or captions within your illustrations.

#### Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

#### Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, **not in the figure file**.

Figure captions begin with the term Fig followed by a space and the figure number, both in roman type (e.g., Fig 1). No punctuation is to be included after the number.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

### Figure Placement and Size

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

Figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

### Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

### Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that:

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

### Electronic Supplementary

Material Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

### Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

### Audio, Video, and Animations

Always use MPEG-1 (.mpg) format.

### Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability. A collection of figures may also be combined in a PDF file.

### Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.

If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

### Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

### Collecting Multiple

Files It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

### Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4”.

Name the files consecutively, e.g. “ESM\_3.mpg”, “ESM\_4.pdf”.

### Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

### Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

## Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that:

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material.
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk).

## After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

## Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

## Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws. Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

## Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

## Color Illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

#### Proof Reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, no further changes can be made to the article. Scientific errors can be corrected by means of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

#### Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

## Anexo 2 - Normas da Revista do Cap. 2

### Revista International Journal of Development Research

#### Author Guidelines

##### Review Process:

All research papers submitted to Online International Journal of Development Research are reviewed by reviewers, editor and members of the editorial board. Decisions on the manuscripts will be taken as rapidly as possible.

**Manuscript submission:** The work which is neither published before nor under consideration for publication anywhere else can be submitted for publication to this journal. The publication must be approved by co-workers and authorities wherever applicable. The publisher shall not be held legally responsible for any claims for compensation, if arise.

**Online submission:** Authors are required to submit their manuscripts online. They can upload their manuscript files as per instructions given on the website.

**Permission:** Authors wishing to reproduce any figure, table or text of another source are required to obtain permission from the copyright owner(s). Such permission evidence should be included while submitting the research article to this journal.

Types of manuscripts :

\* **Full length research papers:** Full length research papers : These research papers should not contain more than 08-10 type written pages including figures, tables and references.

\* **Short communications:** These communications should not contain more than 04-06 type written pages including figures, tables and references.

\* **Case studies:** These case studies should not contain more than 06-08 type written pages including abstract, keywords, figures, tables and references.

##### Preparation of manuscript :

Manuscript submitted to **International Journal of Development Research** should be structured in the following manner.

**Title page:** It should include

a) Concise and informative title (Size 14 in Times New Roman, Words- No exceeding 40) .

b) Name(s) of the author(s) represented by superscripts with affiliation and addresses of all author(s).

e.g. Indu A. George<sup>a</sup>, Bindu S. Maurya<sup>a</sup> and Ramjan M. Mulani<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Life Science, University of Mumbai, Santacruz (E), Mumbai 400098.

<sup>b</sup>Department of Botany, Seth LU and MV College, Andheri (E), Mumbai 416 810.

The email address, telephone and fax numbers of the corresponding author should be given.

**Abstract:** The abstract should not contain more than 200 words for a full length paper and 100 words for a short communication. Also, the abstract should not contain any undefined abbreviations. The text should be in Times New Roman type with 12 font.

**Keywords:** Please provide 4-5 keywords which can be used for indexing purpose.

**Text:** For full length papers, text should be divided into following sections Introduction, Materials and Methods, Results , Discussion , Acknowledgements and References (Use normal plain font of 10-point Times New Roman for text). Automatic page numbering should be used.

For short communication, there should not be any heading except Abstract, Keywords, Acknowledgements and References.

**Acknowledgements:** Acknowledgements of people for any technical assistance and funding agencies for financial support should be in separate section before references. The names of funding agencies should be given in full.

**References:** Only works actually cited in the text should be included in the references. Reference list should be alphabetized in the last names of the first author of each research paper.

**Journal article:** Kumar, R. , Sharma, K., and Agarwal, V. ( 2005) In vitro clonal propagation of *Holarrhena antidysentrica* (L) Wall. through nodal explants from mature trees. *In vitro Cell Dev Biol -Plant*. 41, pp.137-144

**Book:** Naik, V.N. (1998) *Flora of Marathwada*, Vol.I, Amrut Publication, Aurangabad, India.

**Dissertation/thesis:** Zore, G. B.(2005) Pharmacological studies of *Taverniera cuneifolia* (Roth) Arn.; a substitute for commercial liquorice. Ph. D. Thesis in Biotechnology. Faculty of Science, Swami Ramanand Teerth Marathwada University, Nanded (MS) India.

**Journal article on internet:** Dwiwedi, R. S. (2004) Un-nurtured and untapped super sweet non-sacchariferous plant species in India. Available online at <http://www.ias.ac.in/currsci/jun10/articles19.htm>

**Conference proceedings:** Zore, G.B., Kulkarni, S.S, Surwase, B.,S., Meshram, Nisha and S. Mohan Karuppayil (2006) Quality control of commercial liquorice samples by chemical finger printing. Proceedings of National Conference on Bioactive compounds; New frontiers and therapeutic usage (BCNFTO), held at School of Life Sciences, SRTM University,Nanded. Feb 12-14; pp 213-224.

**Book Chapter**

**Webpage**

**Figures and tables**

**Tables:** Tables numbered using Arabic numerals should be given on separate page at the end of manuscript.

**Figures :**

- Each figure should be given in separate file.
- All figures should be cited in the text in consecutive numerical order.
- Figure parts must be denoted by lowercase letters (a, b, c.... etc)
- Each figure should have concise and informative caption.
- The captions for the figures should be placed at the end of the text in the manuscript file.

**Copyright transfer:** After acceptance of the research article, it is necessary for authors to transfer copyright to the publisher.