

**Influența vîrstei adulților asupra comportamentului feromonal la  
*Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae)  
în condiții de laborator**

Gheorghe STAN, Sergiu MIHUT, Viorica CHIȘ, Lidia Maria POP

**Summary**

**Influence of the male and female age of *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae), on pheromonal behaviour under laboratory conditions**

Male response behaviour of the *Mamestra brassicae* L. to both, natural (virgin females and crude extracts) and synthetic sex pheromone (Z11-16:Ac) was tested in laboratory conditions by means of olfactometric bioassays. An olfactometer with two glass tubes (diameter - D = 40 cm; length - L = 60 cm) and a coupling tube (D = 3 cm) with reverse cone was used. In the beginning, a positive response in olfactometer (%R) relied on the number of male moths which passed through coupling tube (%R<sub>i</sub>).

In the present studies the male response was characterized by four behavioural steps (I-II = raising antennae and abdomen, wing fanning and vibrating, short bursts of movements or rotations; III = walking or/and flying towards source while wings fanning; VI = passing through coupling tube towards attractant source; VII = a characteristic courtship behaviour near the source: A - for the passed males; B - for the all tested males/repetition). In this case %R<sub>i</sub> was substituted by %R<sub>a</sub> (the mean response from VI and VIIIB behavioural steps) and male response was characterised by a new parameter - R<sub>t</sub> (the moment when the male response behaviour was recorded for the time at which the pheromone was released in olfactometer; at least three periods, each of 60 seconds were used).

The greatest %R was obtained at synthetic sex pheromone but indifferent of attractant quality the male age for an optimum response was of 2-5 days (maximum at age of 2-4 days). With male age increase, the percent response gradually decreased. In the other hand %R was influenced by female age. An original model - the quality response to sex attractant (MOCAR) with a mathematic all data processing was used for a complex characterization of male response to different semiochemicals in dependent on age and behaviour.

**Key words:** natural sex pheromone, crude extract, synthetic sex pheromone, olfactometer, bioassays, response behaviour, new behavioural steps, model of quality response, *Mamestra brassicae*.

Studiul comportamentului feromonal (răspunsul masculilor la feromonul sexual eliberat de feinile sau la feromonul sexual sintetic) reprezintă o modalitate eficientă de analiză a rolului feromonului sexual în reproducere, dar și posibilitatea folosirii lui în practica de monitoring, management și combatere directă. O serie de aspecte privind atracțivitatea și specificitatea feromonului sexual sunt analizate prin testări olfactometrice. Biotezăriile (testele comportamentale) sunt studii derulate în condiții experimentale controlate și cu o aparatură adecvată, pentru a evidenția prezența (aspect calitativ) sau măsurarea (aspect cantitativ) a proprietăților unor substanțe biologic active, cu rol și funcții deosebite, detectorul fiind un organism viu sau chiar părți ale acestuia (BAKER & CARDE, 1984).

Factori externi (temperatura, lumina, umiditatea) sau interni (vârstă, hrana, statutul reproductiv, ritmul circadian, hormonii) influențează modelul comportamental de răspuns al masculilor. Influența vîrstei adulților asupra răspunsului la feromonul sexual (natural și sintetic) a fost studiată la diferite specii de lepidoptere (GRANT 1975, HINDENLANG et al. 1975, KANO & SATO 1978, BAKER & CARDE, 1979, den OTTER & THOMAS 1980). Reacția de răspuns la

feromonul sexual natural implică prezența femelelor virgine și a extractului crud de feromon.

Studiul comportamentului feromonal la *Mamestra brassicae* L. a abordat o serie de aspecte (STAN 1991, STAN 1996b, STAN et al. 1996), dar nu există studii comportamentale dependente de influența vârstei adulților, cu excepția reacției de răspuns la extractul crud (STAN & TOMESCU 1986) și parțial la feromonul sexual natural eliberat de femele virgine (TOMESCU et al. 1981).

In lucrare sunt prezentate datele obținute asupra studiului influenței vârstei masculilor și femelelor asupra răspunsului masculilor de *M. brassicae* la feromonul sexual natural și sintetic, analizat prin testări olfactometrice. Rezultatele au la bază cercetările efectuate în perioada 1981-1989.

### Material și metode

**Material biologic.** Pentru testări s-au folosit adulți proveniți din diferite linii de creștere ale speciei *M. brassicae* pe diete artificiale (STAN 1993, STAN & CHIŞ 1995). Emergența a fost înregistrată zilnic sau de mai multe ori pe zi (pentru o corectă evaluare a vârstei indivizilor).

**Conditionarea adulților pentru testare.** Adulții, separați pe sexe, au fost puși în vase de sticlă sau cuști speciale și păstrați în aceleși condiții, până la vârsta de experimentare, în funcție de experiment.

Femelele (pentru teste cu femele virgine) în număr de 3-5, s-au pus în vase de sticlă ( $V=500$  cmc) prevăzute cu ieșire-intrare. În interior s-au introdus benzi din hârtie de filtru, ca suport și o soluție nutritivă (glucoză 10%, fructoză 10%, zaharoză 10%; în fiecare s-a adăugat 0,01% acid ascorbic). Vasele astfel pregătite s-au păstrat în condițiile laboratorului de creștere ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ; 16:8 ore, lumină:întuneric; UR > 65%; intensitatea luminii în scotofază de 0,3-0,5 lx). În fotofaza premergătoare testării, la vârsta maturității reproductive (1-3 zile) vasele au fost dusе în laboratorul de testare și atașate la instalația de testare.

Masculii, imediat la emergență, au fost puși în vase de sticlă ( $V=300-1000$  cmc) sau cuști cu pereți din plasă de sărmă și sticlă (20 x 20 x 25 cm) și păstrați separat de femele pentru a evita contaminarea. În ambele categorii de cuști s-a introdus hârtie de filtru ca suport și soluție nutritivă. Pentru testare, masculii s-au dus în laborator, în fotofaza premergătoare testării. În multe cazuri în această perioadă masculii au fost introdusi direct în cușca masculilor a olfactometrului cu tuburi folosit în testare. În celelalte situații, trecerea în această cușcă s-a făcut cu 30 min înaintea testării.

**Biotestarea olfactometrică.** Pentru obținerea unui răspuns maxim biotestările au fost făcute la sfârșitul scotofazei, perioadă care coincide cu un optim al comportamentului de chemare al femelelor și răspuns maxim al masculilor (STAN 1991). Condițiile de testare au fost următoarele: temperatura =  $19 \pm 1^\circ\text{C}$ ; intensitatea luminii în scotofază = 0,3-0,5 lx, UR > 60%, viteza curentului de aer în olfactometru = 0,7 m/s. Masculii au fost folosiți în serii de 8-10/testare, iar pentru fiecare variantă s-au testat minim 200 masculi (proveniți din mai multe linii și generații).

Testele au fost efectuate cu un olfactometru original, tip clasic, din tuburi de sticlă ( $L=40$  cm; diametru = 40 cm; cu tub de legătură cu con-invers) (STAN 1991, 1996a,b, STAN et al. 1996). În cadrul operațiunilor de lucru, aerul (pur sau cu feromon) a fost administrat în reprez de 60 sec. La un olfactometru s-a efectuat un singur experiment pe zi, iar fiecare serie de masculi (respectiv femele, în cazul testărilor cu femele virgine) a fost testată o singură dată. După testare, instalația s-a curățat cu clorură de metilen sau acetonă, apoi a fost supusă unui curent puternic de aer și în final părțile care s-au contaminat cu feromon au fost expuse radiațiilor UV.

**Metoda de biotestare.** Pentru studiul comportamentului de răspuns al masculilor la feromonul sexual, metoda a fost cea utilizată frecvent în acest fel de cercetări (BAKER & CARDE 1984).

a. **Testări cu femele virgine (FV).** S-au experimentat două categorii de teste: cu femele de 0-12 zile (și masculi de 1-3 zile); cu masculi de 0-10 zile (și femele de 1-3 zile). Înainte de testare, după asigurarea condițiilor experimentale atât femelele cât și masculii au fost precondiționați timp de 15-30 minute, perioadă în care s-a observat comportamentul individual (postura de chemare a femelelor, activitatea locomotoare a masculilor, tipul de reacție comportamentală la stimulul luminos, etc). Apoi a fost conectată sursa de aer pur (3-5 min) și s-a

observat în continuare comportamentul masculilor. Dacă în acest interval de timp a fost observat un comportament caracterizat de elemente caracteristice ale secvenței de răspuns la feromon în condițiile în care testările au fost efectuate cu acest tip de olfactometru (elementele I-VIII; (STAN 1991, 1996a,b), seria a fost înălțată din experiment. În condițiile unui comportament normal, s-a conectat sursa de feromon, în 2-3 reprezente de 60 secunde, separate prin reprezente de aceeași durată în care s-a administrat aer pur, iar olfactometrul s-a aerisit.

b. *Testări cu extract crud de feromon sexual (ECFS)*. Aceeași metodologie ca la punctul a. dar în locul vasului cu femele virgine s-a folosit un dispozitiv special în care s-a introdus o rondea de hârtie de filtru pe care s-a aplicat ECFS cu concentrația în EF (echivalent-femelă). S-au făcut extrageri de la femele de 0-10 zile. Testările au fost făcute cu 3-4 EF, în două variante: cu masculi maturi sexual (2-4 zile) și cu masculi de diferite vîrste (cu extract de la femele de 2-4 zile). Extractul fost obținut prin tăierea ultimelor segmente abdominale de la femele în chemare, macerare în solvent organic, filtrare și concentrarea extractului (BARTELL & SHOREY 1969, GRANT 1975).

c. *Testări cu Z11-16:Ac*. În dispozitivul special conectat la olfactometru, componentul principal al feromonului sexual (Z11-16:Ac; folosit pentru testările a căror rezultate sunt publicate în această lucrare) a fost aplicat tot pe rondele din hârtie de filtru cu porozitate mare (la fel ca și ECFS). Componentul principal a fost sintetizat la I. Chimie Cluj-Napoca (Lab. Producții Naturali) și au avut puritatea  $> 98\%$ . Doza = 100 ug. Alte date sunt prezentate în figurile din text.

**Aprecierea comportamentului de răspuns.** Conform datelor publicate anterior (STAN 1991, 1996a,b STAN et al. 2000), comportamentul de răspuns al masculilor în testările olfactometriche a fost apreciat după 7 metode. În cercetări efectuate în a doua parte a intervalului, pentru a surprinde diferențe între atraktivitatea compușilor sau combinațiilor ale acestora, s-a folosit o nouă metodologie de studiu (STAN et al. 1998a, b).

In cadrul comportamentului de răspuns al masculilor de *M. brassicae* la feromonul sexual au fost definite 8 elemente comportamentale (E<sub>c</sub>; I - VIII) (STAN 1991, 1996a,b). Cele 4 elemente cheie, parțial modificate în concordanță cu metoda de testare, sunt:

- I-II = activarea (vibrarea aripilor, mișcarea antenelor, ridicarea abdomenului de pe substrat, stare de agitație pe loc sau deplasări scurte) și luarea zborului;
- III = activitate locomotorie (mers și zbor împotriva curentului de aer, spre peretele dinspre care se eliberează atractantul, la nivelul tubului de legătură al olfactometrului);
- VI = răspunsul pozitiv (%R1) a fost marcat de trecerea prin tubul de legătură;
- VII = răspuns caracterizat de stare de excitație și comportament caracteristic activității de curtare [s-a înregistrat numai pentru masculii care au trecut prin tubul de legătură (A) sau pentru toți masculii din seria testată (B)];

**Răspunsul pozitiv (%R).** A fost evaluat prin două modalități:

- %R2 = masculi care au avut un răspuns tipic fiecărui element comportamental;
- %R3 = media răspunsului pentru elementele VI și VII<sub>n</sub> (relația a înlocuit vechiul mod de apreciere numai după numărul de masculi care au trecut prin tubul de legătură al olfactometrului = %R1). De asemenea, s-a introdus un nou parametru - eficiența mediatorului chimic (EMC). Este pusă în evidență calitatea substanței testate, dar și vigurozitatea răspunsului prin luarea în considerare a duratei de timp scursă din momentul administrării substanței și până la înregistrarea răspunsului comportamental caracteristic. În cadrul figurilor sunt marcate cele 3 reprezente de testare ( $R_t$ ) de câte 60 sec (1, 2, 3), iar pentru fiecare reprezintă s-au delimitat 3 perioade: sec 1-10 (a); sec 10-20 (b); > 20 secunde (c). Valoarea medie a  $R_t$  este considerată pentru intervalul dintre momentul conectării sursei atractive și realizarea comportamentului din elementul VI.

**Prelucrarea datelor.** Diferențele dintre variante au fost puse în evidență prin Duncan's New Multiple Range Test (D'sNMRT; P = 0,05).

### Rezultate și discuții

**Biotestări cu femele virgine (FV).** Datele obținute în studiul influenței vîrstei masculilor asupra răspunsului la feromonul sexual eliberat de femele virgine mature sexual sunt prezentate

În Fig. 1. Un răspuns optim a fost obținut pentru masculii de 2-5 zile, cu un maxim pentru masculii de 2-3 zile. Un comportament feromonal evident au prezentat și masculii de o zi. Prin noua metodă propusă se compară răspunsul la nivelul elementelor comportamentale VI (numărul de masculi trecuți prin tubul de legătură al olfactometrului =  $\%R_1$ ) și VII<sub>B</sub> (evaluarea răspunsului care jine cont și de elementele caracteristice comportamentului de răspuns =  $\%R_3$ ). Pentru masculii de 1-5 zile valorile  $\%R_3$  au fost cuprinse pe intervalul 67,5-80,4%, cu un maxim pentru masculii de 2-3 zile (pentru aceeași categorie,  $\%R_1$  a fost cuprins pe intervalul 60,0-73,5%). Creșterea vârstei a determinat o diminuare progresivă a răspunsului, dar s-a constatat că o diminuare a activității locomotoare la adulții bătrâni pare a fi compensată de o intensificare a comportamentului la nivelul celorlalte elemente comportamentale (stare de excitare crescută, capacitate mai mare de discriminare a calității stimулului atracțional). În felul acesta  $\%R_3$  devine aproape egal cu  $\%R_1$  (Fig. 1,c). Pe de altă parte, ca reacție de răspuns la feromonul sexual natural chiar dacă cel mai mare procentaj de răspuns s-a înregistrat în primele secunde ale primului minut de testare, activitatea comportamentală s-a prelungit și în următoarele două reprezente de testare ( $R_t$ ). Noi am asociat acest model comportamental cu prezența și implicit, cu rolul compușilor secundari ai feromonului sexual.

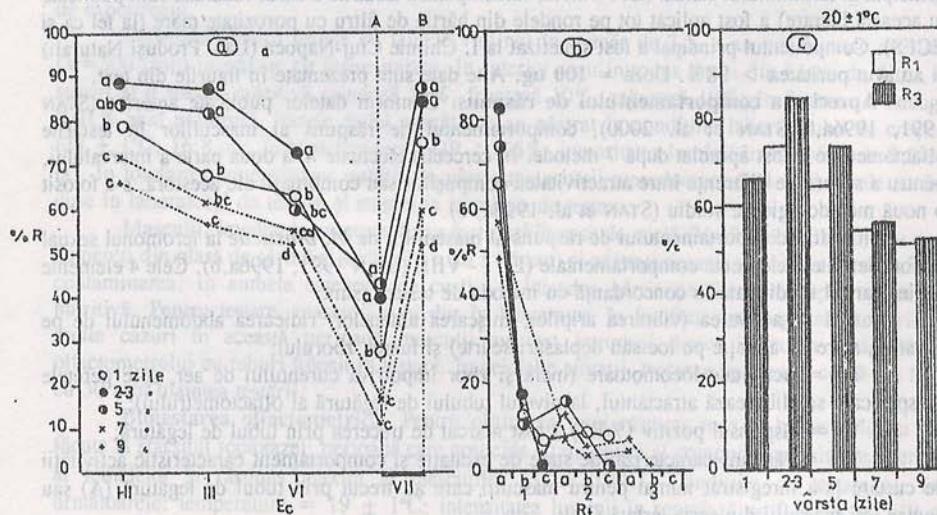


Fig. 1. Influența vîrstei asupra comportamentului de răspuns al masculilor de *Mamestra brassicae* la feromonul sexual natural eliberat de femele virgine, evaluat prin biotestări olfactometrici. a. - elementele comportamentale ( $E_c$ ) de apreciere a răspunsului; A - procentul de răspuns la nivelul elementului comportamental VII, numai pentru masculii trecuți prin tubul de legătură al olfactometrului; B - răspuns comportamental pentru toți masculii experimentați/serie; Aceeași literă indică diferențe nesemnificative între variante, la nivelul același element comportamental (D'sNMRT;  $P=0,05$ ); b - nivelul de răspuns pe reprezente de testare (detaliu în text); c - reprezentarea comparativă a răspunsului evaluat cu ajutorul  $\%R_1$  (procentul de răspuns numai pentru masculii trecuți prin tubul de legătură al olfactometrului) și  $\%R_3$  (media dintre răspunsuri pentru  $E_cVI$  și  $E_cVIIIB$ ).

Influence of age on the response behaviour of males of *M. brassicae* to the natural sex pheromone released from virgin females, evidenced by means of olfactometer bioassays. a. Behavioural steps I-II, III, VI, VII ( $E_c$ ); A - percent behavioural response in the step VII only for males passed through olfactometer coupling tube; B - the response for all tested males/repetition. In the comparison, for each behavioural step, means with different letters are significantly different (D'sNMRT;  $P=0,05$ ). b - Response depending of moment of pheromone released in olfactometer ( $R_t$ ); three (a, b, c) releasing bouts/min and 3 minutes (1, 2, 3) of bioassay. c - Relation between the percent response and male age. The response was evaluated relied on  $\%R_1$  (the number of male moths passed through olfactometer coupling tube) and  $\%R_3$  (the mean for two behavioural steps -  $E_cVI$  and  $E_cVIIIB$ ).

Compararea acestora cu valorile  $\%R_1$ , scoate în evidență unele deosebiri datorate în primul rând tehnicii de experimentare. Pe baza unui număr mare de testări efectuate în timp cu ajutorul acestui tip de olfactometru s-a afirmat (STAN 1991, STAN et al. 1996, STAN et al. 1998a, b) că este o metodă corectă și apropiată de situația existentă în natură, unde masculul trebuie să se remарce prin capacitate de percepere a stimulului, orientare spre sursă, deplasare anemotactică optomotoare spre aceasta cu evitarea obstacolelor întâlnite pe traseu și contactarea sursei. Pornind de la aceste prime aspecte s-a observat că în foarte multe situații nu toți masculii viguroși și cu un comportament tipic de răspuns sunt și capabili de a trece prin tubul de legătură al olfactometrului. În aceste situații s-au luat în considerare și indivizii acestia (caracterizați de elemente caracteristice de răspuns și care au aterizat pe peretele olfactometrului și au prezentat o activitate locomotoră intensă chiar în dreptul orificiului tubului de legătură). Incapacitatea de trecere poate fi asociată cu un fenomen de inhibiție (fie la nivelul receptorilor olfactivi, fie la nivelul sistemului nervos central). Administrarea stimulului atracțional în reprise (fenomen similar cu un model de chemare ritmică) separate de alte reprise de aerisire, înălțătură sau diminuează acest fenomen.

O serie de factori interni sau externi, inclusiv cei asociați cu tehnica de experimentare pot modifica valorile  $\%R_1$ . Astfel, în condițiile în care s-a modificat regimul termic (la preconditionare sau testare), s-a modificat și vîrstă la care s-a înregistrat un maxim al răspunsului masculilor de *M. brassicae* (Fig. 2). Fenomenul este similar cu cel semnalat la nivelul comportamentului de reproducere (STAN et al. 2000). Apoi, în situația în care se modifică unii parametri privind creșterea populațiilor în generații succesive, se schimbă și comportamentul de răspuns la feromonul sexual (STAN & CHIȘ 1995).

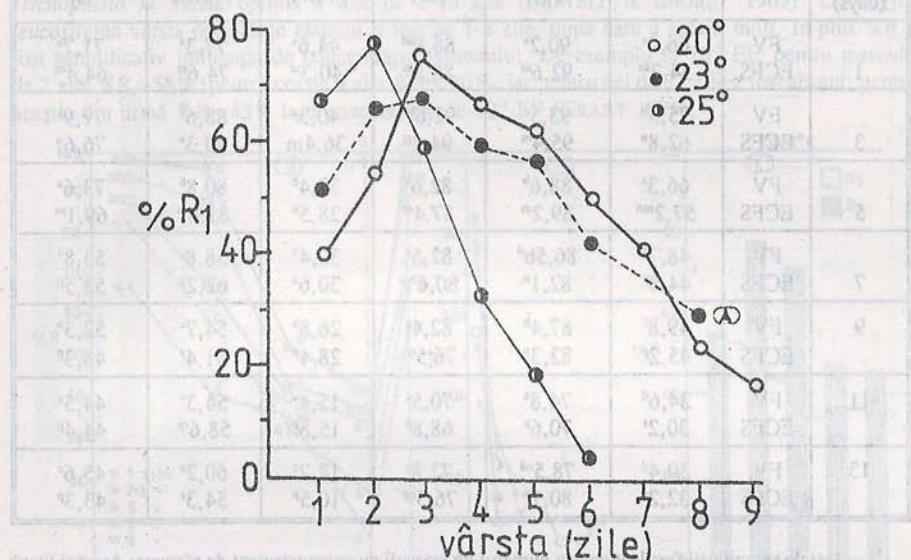


Fig. 2. Modificări în trendul curbei de răspuns a masculilor de *Mamestra brassicae* la feromonul sexual natural eliberat de femele virgine, în funcție de acțiunea combinată a vîrstei și temperaturii. Răspunsul a fost evaluat cu ajutorul parametrului  $\%R_1$ .

The curve trends of the *Mamestra brassicae* male moths response to the natural sex pheromone released from virgin females depending on age and temperature. Response evaluated by means of the male number passed through the olfactometer coupling tube ( $\%R_1$ ).

Cercetările au dovedit că și vîrsta femeelor, ca sursă care eliberează atracționalul sexual, a avut un rol la fel de important. Răspunsul, estimat prin cele trei modalități, evidențiază clar acest aspect (Tab. 1). Înregistrarea unui  $\%R$  ridicat la femeile de 1 zi dovedește prezența feromonului și la această vîrstă (fenomen semnalat și în teste de împerechere). Datele concordă

cu studii citologice făcute la *M. brassicae* (MOLNAR & ROMAN 1983) deși anterior s-a afirmat că la această specie nu s-a pus în evidență existența feromonului sexual la femelele de această vîrstă. Datele diferă de la autor la autor în funcție de condițiile de creștere și de experimentare.

Tabelul 1

Influența vîrstei femelelor de *Mamestra brassicae* asupra comportamentului de răspuns al masculilor la feromonul sexual natural. Evaluare prin biotestări olfactometrice ca răspuns la feromonul sexual (FS) eliberat de femele virgine (FV) și extract crud de feromon sexual (ECFS). Procentajul de răspuns (%R) este prezentat la nivelul elementelor comportamentale (E<sub>c</sub>I - VII), cu ajutorul celor 3 parametrii: %R<sub>1</sub> (număr de masculi care au trecut prin tubul de legătură al olfactometrului), %R<sub>2</sub> (răspuns caracteristic comportamentului de curteare tipică) și %R<sub>3</sub> (media dintre răspunsul pentru E<sub>c</sub>VI și E<sub>c</sub>VIIIB)

Influence of female age on the response behaviour of *M. brassicae* male moths to the natural sex pheromone, released from virgin females (FV) and crude extract of sex pheromone (ECFS). The percent of response (%R) was evaluated for all behavioural steps (E<sub>c</sub>I-VII) by means of three modalities: %R<sub>1</sub> (the number of male moths which passed through the olfactometer coupling tube), %R<sub>2</sub> (response which characterised the courtship behaviour) and %R<sub>3</sub> (the mean response for E<sub>c</sub>VI and E<sub>c</sub>VIIIB)

Vîrstă ♀ ♀ (zile) Age (days)	FS	Răspunsul comportamental / Behavioural male response (%R)*					%R <sub>3</sub> (xVI+VII B)	
		%R <sub>1</sub> (VI)	%R <sub>2</sub>					
			(I-II)	(III)	(VIIA)	(VIIIB)		
1	FV	66,0 <sup>a</sup>	90,2 <sup>a</sup>	86,8 <sup>ad</sup>	44,6 <sup>a</sup>	77,3 <sup>a</sup>	71,7 <sup>a</sup>	
	ECFS	54,2 <sup>m</sup>	92,6 <sup>m</sup>	88,5 <sup>m</sup>	40,3 <sup>m</sup>	74,6 <sup>m</sup>	64,4 <sup>m</sup>	
3	FV	75,5 <sup>b</sup>	93,5 <sup>a</sup>	92,6 <sup>bd</sup>	40,3 <sup>a</sup>	88,6 <sup>b</sup>	77,9 <sup>a</sup>	
	ECFS	62,8 <sup>n</sup>	95,4 <sup>m</sup>	94,8 <sup>n</sup>	36,4 <sup>m</sup>	90,3 <sup>a</sup>	76,6 <sup>n</sup>	
5	FV	66,3 <sup>a</sup>	88,6 <sup>b</sup>	82,6 <sup>a</sup>	32,4 <sup>b</sup>	80,8 <sup>b</sup>	73,6 <sup>a</sup>	
	ECFS	57,2 <sup>mn</sup>	89,2 <sup>m</sup>	87,4 <sup>m</sup>	28,5 <sup>n</sup>	81,0 <sup>m</sup>	69,1 <sup>m</sup>	
7	FV	48,7 <sup>c</sup>	86,5 <sup>b</sup>	82,5 <sup>a</sup>	30,4 <sup>b</sup>	58,8 <sup>c</sup>	53,8 <sup>b</sup>	
	ECFS	44,8 <sup>p</sup>	82,1 <sup>n</sup>	80,6 <sup>mn</sup>	30,6 <sup>n</sup>	62,2 <sup>p</sup>	53,5 <sup>p</sup>	
9	FV	49,8 <sup>c</sup>	87,4 <sup>b</sup>	82,4 <sup>a</sup>	26,8 <sup>b</sup>	54,7 <sup>c</sup>	52,3 <sup>b</sup>	
	ECFS	45,2 <sup>p</sup>	82,3 <sup>n</sup>	76,5 <sup>np</sup>	28,4 <sup>n</sup>	51,4 <sup>r</sup>	48,3 <sup>p</sup>	
11	FV	34,6 <sup>d</sup>	74,8 <sup>c</sup>	70,5 <sup>e</sup>	15,4 <sup>c</sup>	54,3 <sup>c</sup>	44,5 <sup>c</sup>	
	ECFS	30,2 <sup>r</sup>	70,6 <sup>p</sup>	68,8 <sup>p</sup>	15,8 <sup>p</sup>	58,6 <sup>rp</sup>	44,4 <sup>p</sup>	
13	FV	30,4 <sup>d</sup>	78,5 <sup>sd</sup>	72,8 <sup>e</sup>	12,2 <sup>c</sup>	60,2 <sup>c</sup>	45,6 <sup>c</sup>	
	ECFS	32,2 <sup>r</sup>	80,1 <sup>a</sup>	76,5 <sup>np</sup>	10,5 <sup>p</sup>	54,3 <sup>r</sup>	43,3 <sup>p</sup>	

Test de semnificație evaluat pentru numărul de masculi cu comportament de răspuns; Aceeași literă (grup: a, b, c, d) indică diferențe nesemnificative în cadrul aceluiași tip de răspuns în funcție de vîrstă, pentru femele virgine, iar aceeași literă (grup: m, n, p, r) indică diferențe nesemnificative pentru același tip de răspuns în funcție de vîrstă, pentru ECFS (D'sNMRT; P=0,05).

The significance test was estimated for *M. brassicae* male moths, with typical response behaviour. Means with the different letter (from the group a, b, c, d) are significantly different among behavioural steps within the same age, and means with the different letter (from the group m, n, p, r) are significantly different among age within the same behavioural step. Data for ECFS (D'sNMRT; P=0,05).

**Biotestări cu extract crud de feromon sexual (ECFS).** Vîrstă masculilor de *M. brassicae* a influențat și comportamentul de răspuns la ECFS (Fig. 3) după un model similar cu cel obținut pentru femelele virgine, dar au existat și diferențe evidente. Astfel, pentru masculii de 1-5 zile, comparativ,

valorile procentuale ale răspunsului au fost mult mai scăzute la nivelul celor doi parametrii ( $\%R_3 = 56,1\%$ ,  $75,6\%$ ;  $\%R_1 = 40,0\text{--}53,4\%$ ). Se observă că odată cu creșterea vârstei s-a diminuat decalajul între  $\%R_1$  și  $\%R_3$  (Fig. 3.c) dar pentru masculii bătrâni nu au mai existat valori apropiate ca în cazul răspunsului la feromonul sexual eliberat de femele virgine. Comportamental (VII<sub>B</sub>), au existat valori mari ale răspunsului, dar valorile medii ale  $\%R_1$  au fost scăzute datorită valorilor mici obținute pentru la nivelul E<sub>c</sub> VI (%R<sub>1</sub>). Aceste diferențe sunt extrem de interesante iar numărul redus de masculi care au trecut prin tubul de legătură al olfactometrului este în contrast cu nivelul mare al răspunsului obținut la nivelul E<sub>c</sub> I-II și III. O eventuală explicație trebuie căutată în calitatea și cantitatea ECFS. Pe de o parte concentrația ECFS a fost mai mare comparativ cu cantitatea echivalentă eliberată de femelele virgine testate, iar pe de altă parte, este posibilă existența unor modificări la nivelul compoziției minori ceea ce a afectat specificitatea. Nu este exclusă nici o alterare a compoziției extractului, cauzată de tehnica de prelucrare. Deși studiile noastre s-au bazat pe un număr foarte mare de testări a fost dificil să se stabilească o echivalență corectă între cele 3 categorii de atracțion sexual (femele virgine, extract crud și feromon sintetic) (STAN ET AL. 1998 a, b).

Concentrația ECFS (exprimată în echivalent-femelă) a influențat semnificativ răspunsul în testările noastre (STAN & TOMESCU 1986), dar o variație mare a existat și pentru o aceeași concentrație.

Fenomenul este valabil, fiind și semnalat, la multe alte specii studiate, dar există și specii la care s-a înregistrat același %R la concentrații foarte diferite. Astfel, la *Heliothis virescens* nu au fost diferențe între concentrațiile de 2,5 și 10 EF.

In funcție de specie și de durata de viață există un model caracteristic al comportamentului de răspuns în relație directă cu vârsta masculilor. Chiar la *M. brassicae* (OTTO et al. 1976) s-a evidențiat un răspuns optim până la vârstă de 7 zile. La diferite specii de noctuide din SUA răspunsul optim la ECFS a fost obținut pentru masculi de 1-5-8 zile (SHOREY et al. 1968); la *Trichoplusia ni* vârsta optimă de răspuns a fost de 2-10 zile (BARTELL & SHOREY 1969). La *Orgyia leucostigma* vârsta optimă de răspuns a fost de 1-3 zile, după care a scăzut mult. În plus %R a fost semnificativ influențat de concentrația extractului. De exemplu la  $10^{-5}$  EF, pentru masculii de 2 zile  $\%R=58\%$ , pentru cei de 9 zile  $\%R<10\%$ , iar pentru cei de 21 zile a fost absent; pentru aceștia din urmă  $\%R=45\%$  la o concentrație de  $10^{-3}$  EF (GRANT 1975).

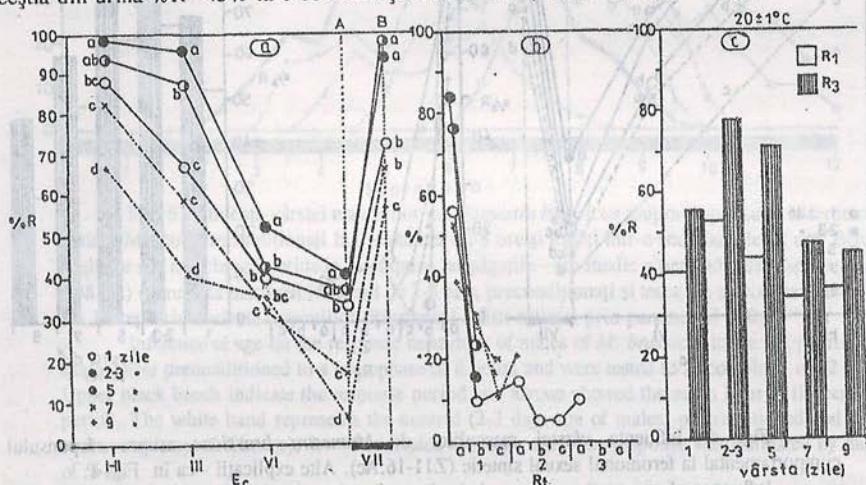


Fig. 3. Influența vârstei masculilor de *Mamestra brassicae* asupra răspunsului comportamental la extractul crud de feromon sexual natural, evaluat prin biotestări olfactometric. Alte explicații - ca în Fig. 1.

Influence of age on the response behaviour of males of *M. brassicae* to the crude extract of the sex pheromone, evidenced by means of olfactometer bioassays. Another explanations - as in Fig. 1.

Dependent de concentrație și vârstă, un aspect similar a fost evidențiat și la *T. ni* (SHOREY & GASTON 1964). Pe intervalul vârstei de 1-6 zile %R a crescut progresiv. O creștere similară a fost asociată și cu creșterea concentrației pe intervalul  $10^{-5}$  -  $10^{-1}$  EF dar acestă creștere a fost nesemnificativă pentru

vârstă de 1 și chiar 2 zile, dar puternic semnificativă la masculii de 5-6 zile. Pentru specia *Phthorimaea operculella* un răspuns optim a fost obținut pentru masculii de 1,5 - 5,5 zile la o concentrație a extractului de  $10^{-1}$  EF (HINDENLANG et al. 1975).

Vârstă femeelor în extract a influențat și la *M. brassicae* răspunsul masculilor (Tab. 1). Nu au existat diferențe mari între aceste valori și cele obținute anterior cu testări cu femele virgine de diferite vârste.

In funcție de durata de viajă, la fiecare specie există și pentru femele un interval al vârstei optimă în care răspunsul are valorile cele mai mari. Aceasta este de 2-6 zile la *T. ni* (SHOREY & GASTON 1964), 0,5-4 zile la *Cadra cautella*, 2-7 zile la *Phthorimaea operculella* (HINDENLANG et al. 1975) și 2-9 zile chiar la *M. brassicae* (OTTO et al. 1976).

**Biotestări cu feromon sexual sintetic (FSS).** Datele obținute sunt prezentate în Fig. 4. Pentru elementele comportamentale I-II, III și VII<sub>b</sub> rezultatele evidențiază un model foarte apropiat de cel obținut în cazul testărilor cu ECFS. În schimb, pentru E<sub>c</sub> VI, nivelul răspunsului a fost mult mai mare (pentru masculii de 1-5 zile  $\%R_1 = 52,1-68,4\%$ ). Pentru E<sub>c</sub> VII<sub>b</sub>, s-a înregistrat cel mai mare nivel de răspuns ( $\%R = 86,4-97,5\%$ ) astfel că și valorile  $\%R_3$  au fost mari (69,3-82,9%). În cazul testărilor cu FSS răspunsul a fost dominant în primele secunde ale primei reprezente de testare și s-a redus progresiv cu creșterea vârstei (Fig. 4,b). Datele obținute au evidențiat că răspunsul cel mai mare a fost obținut în cadrul testărilor cu Z11-16:Ac, componentul principal al feromonului sexual, iar între  $\%R_1$  și  $\%R_3$  s-a menținut același decalaj, indiferent de vârstă (Fig. 4,c).

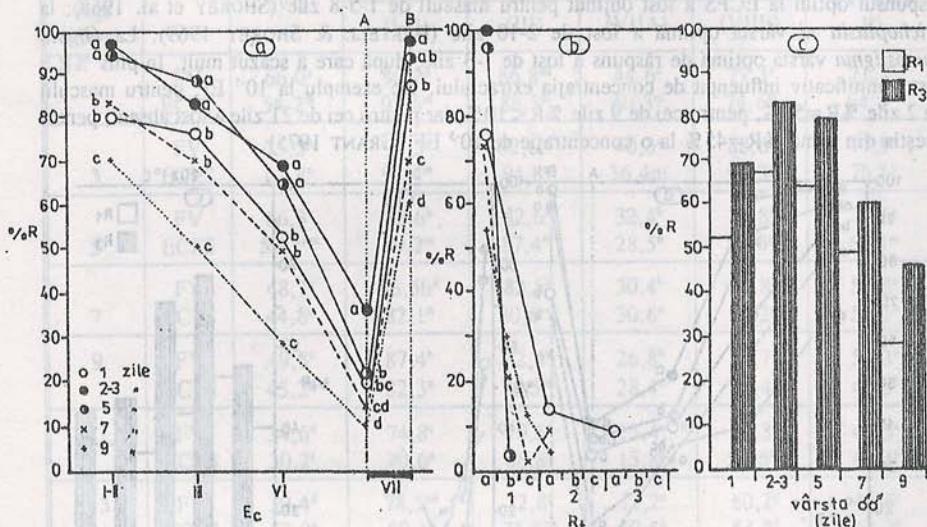


Fig. 4. Influența vârstei masculilor de *Mamestra brassicae* asupra răspunsului comportamental la feromonul sexual sintetic (Z11-16:Ac). Alte explicații - ca în Fig. 1.

Influence of age on the response behaviour of males of *M. brassicae* to the synthetic sex pheromone (Z11-16:Ac) evidenced by means of olfactometer bioassays. Another explanations -as in Fig. 1.

Date publicate anterior au pus în evidență faptul că Z11-16:Ac este implicat în special în atragerea masculilor de la distanță în timp ce compoziția secundară are rol în comportamentul de curtere, chiar dacă numărul și rolul lor nu a fost încă stabilit, fiind chiar sugerat un rol redundant al acestora (15, 16, 18, 19). De fapt și în studiile de captură efectuate în câmp, Z11-16:Ac se dovedită a fi atraktivă și specifică.

Capacitatea de răspuns la feromonul sexual sintetic dependent de vârsta masculilor este dependență de specie. La *Adoxophyes orana* pe intervalul optim al vârstei de 4-9 zile răspunsul maxim a variat

nesemnificativ (den OTTER & THOMAS 1980), la *Grapholitha molesta* pe intervalul 1-4 zile, răspunsul maxim a fost înregistrat la masculii de 4 zile (BAKER & CARDE 1979) și la masculii de 5 zile, pentru intervalul 3-5 zile, la specia *Chilo suppressalis* (KANNO & SATO 1978). Influența simultană a altor factori modifică însă modelul comportamental. În condițiile în care masculii de *T. ni* au fost ținuți la o temperatură constantă de 25°C sau o termoperioadă de 25:15°C, totafază:scotofază, iar testarea s-a făcut la 25°C, un răspuns maxim a fost obținut pentru masculii de 5 zile. În condițiile în care precondiționarea s-a făcut la o temperatură constantă de 15°C, iar testarea s-a făcut tot la 25°C, răspunsul maxim s-a înregistrat pentru masculii de 9 zile (BOLLINGER et al. 1977).

Pentru testările cu feromon, sexual sintetic s-a analizat și periodicitatea comportamentului de răspuns corelat cu vârsta masculilor de *M. brassicae*. Datele arată că odată cu creșterea vîrstei răspunsul s-a inițiat mai timpuriu în scotofază (Fig. 5).

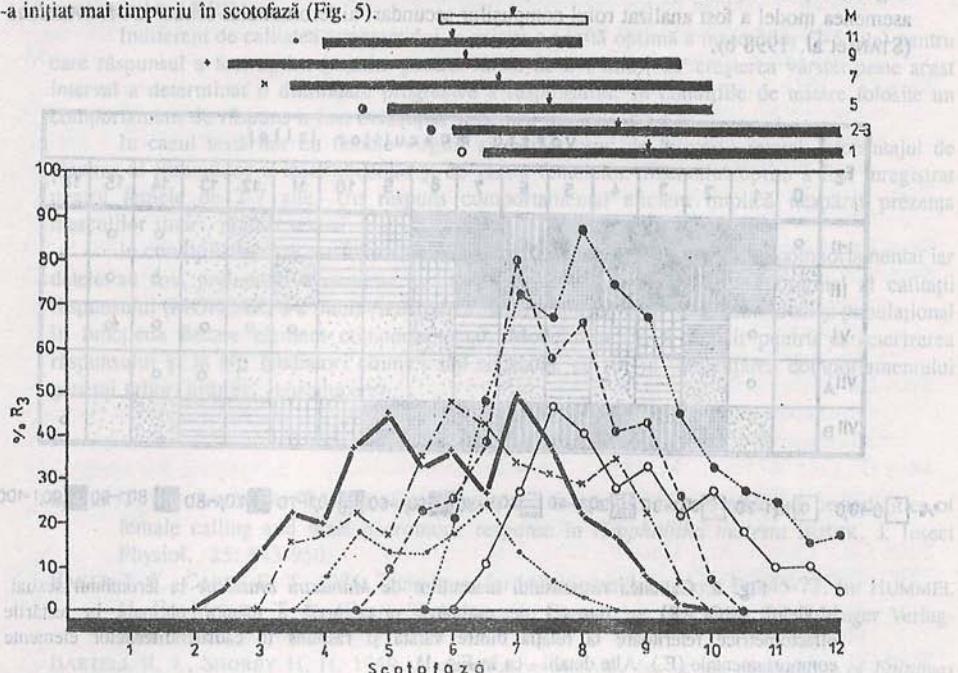


Fig. 5. Influența vîrstei masculilor de *Mamestra brassicae* asupra răspunsului la feromonul sexual. Masculi precondiționați la o scotofază de 8 ore și testați într-o scotofază de 12 ore. Benzile negre de sus marchează perioada de răspuns iar săgețile - ora medie a perioadei de răspuns; banda albă (M) reprezintă martorul (masculi de 2-3 zile, precondiționați și testați la o scotofază de 8 ore); 1 - 11 reprezintă vîrsta masculilor. Răspunsul a fost estimat prin parametru  $\%R_3$ .

Influence of age on the response behaviour of males of *M. brassicae* to the sex pheromone. Males were preconditioned to a scotophase of 8 hours and were tested to a scotophase of 12 hours. Upper black bands indicate the response period and arrows showed the mean hour of the response period. The white band represents the control (2-3 days age of males, preconditioned and tested to a scotophase of 8 hours); 1 - 11 indicated the male age. The response was estimated by means of  $\%R_3$ .

Testările efectuate pe durata unei scotofaze de 12 ore au pus în evidență un trend extrem de interesant al curbelor de răspuns. Se constată că în cazul masculilor tineri răspunsul s-a inițiat mai târziu fapt care sugerează că în acest caz o scotofază scurtă este inadecvată în cercetările de laborator, modelul obținut nefiind cel real. Odată cu creșterea vîrstei răspunsul s-a inițiat progresiv mai timpuriu, iar rezultatele sugerează existența unui comportament cu valoare adaptativă pentru specie. Pe de altă parte, perioada de răspuns la feromon a masculilor este mai largă decât perioada de chemare, în felul acesta masculii sunt pregătiți fizologic și comportamental pentru răspuns chiar înainte de intrarea femeierelor în chemare.

**Analiza modelului calității răspunsului la feromon (MOCAR) în relație cu vârsta.**  
 Datele sunt prezentate în Fig. 6. Acest model original reprezintă o posibilitate deosebit de rentabilă și corectă pentru caracterizarea răspunsului la un anumit mediator chimic, pe baza răspunsului în testarea olfactometrică (STAN 1991, 1996 b). Pentru a fi edificator este nevoie de un optim de informație obținut pe baza unui număr mare de teste. Se lucrează cu valori medii la nivel populațional pentru a diminua semnificativ variațiile individuale obținute într-o serie de testare să-u diferențele care apar de la o sușă la alta sau de la o generație la alta. Datele obținute în aceste biotestări, implicând o perioadă relativ lungă, cu multe linii de creștere și generații asigură obținerea unui model la care pot fi raportate rezultate ulterioare. Cu ajutorul unui asemenea model a fost analizat rolul compușilor secundari ai feromonului sexual la *M. brassicae* (STAN et al. 1998 b).

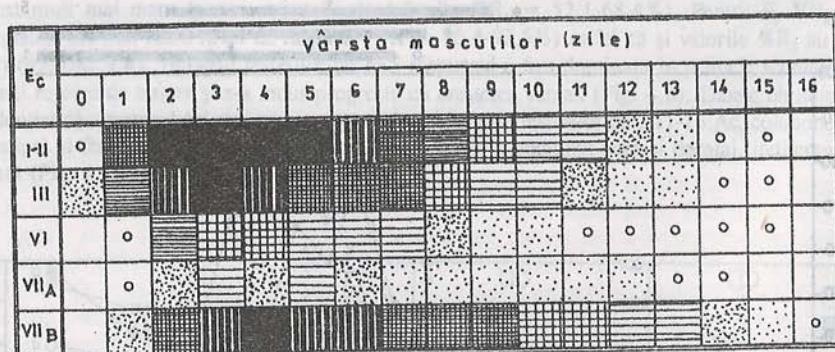


Fig. 6. Calitatea răspunsului masculilor de *Mamestra brassicae* la feromonul sexual. Modelul (MOCAR) se bazează pe evaluarea procentuală a datelor obținute în testările olfactometrice referitoare la relația dintre vârstă și răspuns în cadrul diferitelor elemente comportamentale ( $E_c$ ). Alte detalii - ca în Fig. 1.

The quality response of *M. brassicae* male moths to the sex pheromone. Model (MOCAR) was relied on all data obtained from laboratory bioassays within the framework of relation age-response for different behavioural steps ( $E_c$ ). Another explanations - as in Fig. 1.

Referitor la influența vîrstei masculilor asupra comportamentului de răspuns, analizată la nivelul celor 4 elemente comportamentale cheie, datele evidențiază 4 aspecte interesante: a). masculii de 0 zile nu prezintă un comportament sexual, dar manifestă activitate locomotoare; b). un răspuns optim a fost obținut pentru masculii de 1-7 zile (maxim la 2-4 zile); c). începând cu vîrstă de 8-9 zile s-a diminuat activitatea locomotoare, dar activitatea sexuală s-a menținut și la adulții de 12-13 zile; d). la adulți cu vîrstă mai mare de 13-14 zile activitatea locomotoare începează efectiv, dar comportamentul de reproducere se mai menține (se poate spune chiar până aproape de moartea indivizilor).

Se poate observa că începând cu vîrstă de 6-7 zile capacitatea masculilor de a trece prin tubul de legătură al olfactometrului ( $E_c$  VI) se reduce semnificativ și răspunsul a fost absent peste vîrstă de 10 zile. În schimb, comportamental ( $E_c$  VII<sub>B</sub>) a existat un răspuns și la vîrstă de 15 zile. Datele obținute sunt în favoarea folosirii metodei nou sugerate pentru aprecierea comportamentului de răspuns. În acest fel, o medie între cele două valori individuale este mult mai apropiată de un model comportamental real în natură. În plus, existența unui comportament feromonal al masculilor explică și nivelul împerecherilor pentru adulții bătrâni (chiar și pentru cei de 18 zile) (STAN & CHIȘ 1995; STAN et al. 2000).

## Concluzii

Prin metoda olfactometrică, în condiții de laborator a fost testat comportamentul feromonal al masculilor de *Mamestra brassicae* la feromonul sexual natural (femele virgine și extract crud) și sintetic (Z11-16:Ac, componentul principal).

Pentru aprecierea răspunsului s-a folosit o metodă originală nouă, dependentă de metoda originală de biotestare și s-a notat %R<sub>3</sub>. Aceasta reprezintă media dintre numărul masculilor care au trecut prin tubul de legătură al olfactometrului (%R<sub>1</sub>) și numărul total al masculilor testați care au prezentat un comportament caracteristic de răspuns evidențiat de 8 elemente comportamentale caracteristice (%R<sub>2</sub>).

Indiferent de calitatea atracțantului, a existat o vârstă optimă a masculilor (2-5 zile) pentru care răspunsul a fost optim (maxim pentru vârstă de 2-4 zile), iar creșterea vîrstei peste acest interval a determinat o diminuare progresivă a răspunsului. În condițiile de testare folositoare un comportament de răspuns a fost evidențiat și pentru masculii de 0 zile.

In cazul testărilor cu femele virgine și extract crud de feromon sexual, procentajul de răspuns al masculilor a fost influențat și de vîrstă femeilor. Intervalul optim a fost înregistrat pentru femele de 2-7 zile. Un răspuns comportamental eficient implică neapărat prezența masculilor tineri, maturi sexual.

In condițiile în care s-a folosit noua metodă de apreciere a răspunsului comportamental iar datele au fost prelucrate matematic și interpretate cu ajutorul modelului original al calității răspunsului (MORCAR) s-a putut vizualiza calitatea răspunsului la nivel individual și populațional în funcție de fiecare element comportamental. Modelul poate fi folosit pentru caracterizarea răspunsului și la alți mediatori chimici sau substanțe cu rol în influențarea comportamentului general (zbor, hrănire, reproducere).

## BIBLIOGRAFIE

- BAKER T. C., CARDE R. T. 1979. Endogenous and exogenous factors affecting periodicities of female calling and male pheromone response in *Grapholita molesta* BUSCK. J. Insect Physiol., 25: 943-950.
- BAKER T. C., CARDE R. T. 1984. Techniques for behavioural bioassays. Pp. 45-73. In: HUMMEL H. E., MILLER T. A. (Eds.). Techniques in Pheromone Research, Ed. Springer Verlag-New York.
- BARTELL R. J., SHOREY H. H. 1969. A quantitative bioassay for the sex pheromone of *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera) and factors limiting male responsiveness. J. Insect Physiol., 15: 33-40.
- BOLLINGER J. F., SHOREY H. H., GASTON L. K. 1977. Effect of several temperature regimes on the development and timing of responsiveness of males of *Trichoplusia ni* to the female sex pheromone. Environ. Entomol., 6: 311-314.
- GRANT G. 1975. Extraction and bioassay of female sex pheromone of white-marked tussock moth, *Orgyia leucostigma* (Lepidoptera: Lymantriidae). Can. Entomol., 107: 303-309.
- HINDENLANG D. M., MC LAUGHLIN J. R., GIULIANO R. M., HENDRY L. B. 1975. A sex pheromone in the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (ZELL.): biological assay and preliminary chemical investigation. J. Chem. Ecol., 1 (4): 465-473.
- KANNO H., SATO A. 1978. Mating behaviour of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* WALKER (Lepidoptera: Pyralidae). I. Effects of moth age on mating activity. Appl. Entomol. Zool., 13: 215-221.
- MOLNAR B., ROMAN M. C. 1983. Glanda feromonală la *mamestra (Barathra) brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae) și modificările ei structurale în raport cu vîrstă. St. Cerc. Biol., Seria Biol. Anim., 35 (1): 28-31.
- OTTER C. J. DEN, THOMAS G. 1980. Behaviour of male summer fruit tortrix moths, *Adoxophyes orana* (Lepidoptera: Tortricidae) to synthetic and natural female sex pheromone. Entomol. Exp. Appl., 28: 15-21.
- OTTO D., PILZ R., BENNISCH I. 1976. Sexual Pheromon Nachweis bei den beiden Noctuiden

- Agrotis (Scotia) segetum* DEN. & SCHIFF. und *Mamestra (Barathra) brassicae* L. Arch. Phytopathol. u. Pflanzenschutz., 12 (3): 197-212.
- SHOREY H. H., GASTON L. K. 1964. Sex pheromone of noctuid moths. III. Inhibition of male responses to the sex pheromones in *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). Ann. Entomol. Soc. Amer., 57 (6): 775-779.
- SHOREY H. H., MORIN K. L., GASTON L. K. 1968. Sex pheromones of noctuid moths. XV. Timing of development of pheromone-responsiveness and other indicators of reproductive age in males of eight species. Ann. Entomol. Soc. Amer., 61 (4): 857-861.
- STAN GH. 1991. Reproductive biology, mating behaviour and sex pheromones in pest Lepidoptera species. 1. Studies on the pheromonal behaviour under laboratory and field conditions in *Mamestra brassicae* L and *Xestia c-nigrum* L. (Lepidoptera: Noctuidae). Bul. Inf. Soc. Lepid. Rom., Suppl. 1: 87-133 (in romanian).
- STAN GH. 1993. Mass-production and rearing procedures on artificial diets of the phytophagous insects used as basis support for entomophagous. Pp. 193-237. In: CIOCHIA V., ISAC G., STAN GH. Technologies of industrial mass-production in the some auxiliary insect species used in biological control of the pests. Ed. Ceres, Bucureşti (in romanian).
- STAN GH. 1996 a. Sex pheromones and mating behaviour in Lepidoptera. An. Univ. Oradea, Biologia, III: 63-74 (in romanian).
- STAN GH. 1996 b. Pheromon-Forschungen in Siebenbürgen. Stämpfia, 45: 221-258.
- STAN GH., CHIŞ V. Studies on reproductive capacity in *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae): Evaluation of spermatophores and the egg numbers for different laboratory strains and generations, and for females collected in light trap during 1986-1991. Bul. Inf. Soc. Lepid. Rom., 6 (3-4): 247-266 (in romanian).
- STAN GH., CHIŞ V., POP L. M. 1998 a. The male response behaviour of the *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae) to natural and synthetic sex pheromone. An. Univ. Oradea, Biologia, 5: (in romanian) (in press).
- STAN G., CHIŞ V., POP L. M. 1998 b. The olfactometric bioassay of the synthetic sex pheromone attractivity of the *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae). An. Univ. Oradea, Biologia, 5: (in romanian) (in press).
- STAN GH., CRIŞAN AL., CHIŞ V. 1996. The reproduction and pheromonal behaviour of the *Ostrinia nubilalis* (HBN.) (Lepidoptera: Crambidae), under laboratory conditions. 4. The male response behaviour to natural and synthetic sex pheromone as related to age and the period of bioassay. Bul. Inf. Soc. Lepid. Rom., 7 (1-2): 23-39 (in romanian).
- STAN GH., MIHUT S., CHIŞ V., COROIU I., CRIŞAN AL. Influence of age on mating behaviour and reproductive capacity of *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory conditions. Studia Univ. Babeş-Bolyai, Biologia, XLV (1): 65-84 (in romanian).
- STAN GH., TOMESCU N. 1986. Studies on natural sex pheromone attractivity in *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae, Hadeninae) under laboratory conditions. Pp., 227-232. In: Lucr. A III-a Conf. Entomol., Iaşi, 1983 (in romanian).
- TOMESCU N., STAN GH., CHIŞ V., JELERIU S., PĂŞTINARU C. Influence of light and age on the response of males of *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae) to the sexual pheromone. Studia Univ. Babeş-Bolyai, Biologia, 26 (1): 43-48.

Gh. STAN, S. MIHUT  
Institutul de Cercetări Biologice  
Gh. Republiei, 48  
3400 CLUJ-NAPOCA

Viorica CHIŞ, Lidia M. POP  
Institutul de Chimie "Rafta Ripan"  
Fântânele, 30  
3400 CLUJ-NAPOCA

Primit în redacție / Received: 12.02.1999

Acceptată / Accepted: 20.06.1999

Apărut / Printed: 28.04.2000