Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Respostas olfativas de *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) aos voláteis do algodoeiro *Gossypium hirsutum* L.

Milton Fernando Cabezas Guerrero

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2017

Milton Fernando Cabezas Guerrero
Engenheiro Agrônomo

Respostas olfativas de *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) aos voláteis do algodoeiro *Gossypium hirsutum* L.

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ MAURÍCIO SIMÕES BENTO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Cabezas Guerrero, Milton Fernando

Respostas olfativas de *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) aos voláteis do algodoeiro *Gossypium hirsutum* L. / Milton Fernando Cabezas Guerrero. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

66 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Ecologia química 2. Semioquímicos 3. Curculionidae 4. Compostos orgânicos voláteis 5. Bicudo-do-algodoeiro I. Título

Aos meus pais, Piedad e Milton, a meus queridos irmãos Mario e María Fernanda e a minha esposa Tânia pelo amor incondicional, educação, valores e apoio durante minha vida.

Dedico e Ofereço

AGRADECIMENTOS

Ao professor José Maurício Simões Bento, pela orientação, ensinamentos, confiança e apoio na condução dos trabalhos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo pela oportunidade da realização do curso.

Aos professores e colaboradores do Departamento de Entomologia e Acarologia pelos ensinamentos e atenção dispensada.

Ao programa de Estudantes-Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos para estrangeiros.

À amiga Daniela Okuma, do Laboratório de Monitoramento de Resistência de Insetos, da Estação Agrícola Experimental da Bayer em Paulínia, SP, pelo fornecimento dos insetos e material para criação do bicudo-do-algodoeiro.

A todos os colegas do Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos, Amanda, Aline, Camila Colepicolo, Camila Costa, Lucila, Talita, Patrícia, Rafaela, Fernando Sujimoto, Franciele, Davi, Felipe, Diego, Guilherme pelo convívio. Ao Weliton pelas dicas no desenvolvimento dos trabalhos e as conversas sobre análises de dados.

Agradeço, especialmente, a Mariana pela força no desdobramento dos experimentos deste trabalho. A Luiza pela incondicional ajuda no desenvolvimento de parte dos trabalhos, e pela amizade.

À Arodi Prado, Técnica do Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos pelo auxilio nas análises químicas.

A los amigos del alma, Osmar e Hugo, mis panas, pelos momentos alegres e descontraídos, pela força transmitida, e principalmente pela grande amizade que construímos durante este tempo, a qual permanecerá para sempre.

Ao Ignácio pelas conversas sobre esportes e outras ciências, ao Danilo e Daniel, pelo convívio.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Entomologia, em especial a Rogério Machado, Douglas Amado, Anderson Bolzan, e aos irmãos Daniel e Oderlei Bernardi.

Ao Bonifácio pela sua silenciosa companhia durante a escrita da tese.

A todos meus familiares pelo apoio e incentivos nas horas difíceis, em especial os meus pais e irmãos.

Aos meus amigos de sempre Johnny, Alfonso e Fernando.

Muitíssimo obrigado

SUMÁRIO

RESUMO 7
ABSTRACT 8
LISTA DE FIGURAS 9
1 INTRODUÇÃO 11
2 REVISÃO DE LITERATURA 13
2.1 Interação inseto-planta mediada por composto orgânicos voláteis 13
2.2 O bicudo-do-algodoeiro 17
2.3 Interação *Anthonomus grandis*-algodoeiro 21
3 MATERIAL E MÉTODOS 23
3.1 Criação de *A. grandis* 23
3.2 Material vegetal 24
3.3 Comportamento de adultos de *A. grandis* aos voláteis do algodoeiro 25
3.4 Extração de compostos voláteis de plantas e estruturas do algodoeiro 28
3.5 Identificação dos compostos voláteis 29
3.6 Respostas eletrofisiológicas de *A. grandis* aos voláteis do algodoeiro 31
3.7 Comportamento de fêmeas de *A. grandis* aos compostos sintéticos 32
3.8 Análises estatísticas 33
4 RESULTADOS 35
4.1 Comportamento de adultos de *A. grandis* aos voláteis do algodoeiro 35
4.2 Respostas eletrofisiológicas de *A. grandis* aos voláteis do algodoeiro 35
4.3 Voláteis emitidos pelas plantas do algodoeiro 38
4.4 Comportamento de fêmeas de *A. grandis* aos compostos sintéticos 42
5. DISCUSSÃO 45
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 51
REFERÊNCIAS 53

RESUMO

Respostas olfativas de *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) aos voláteis do algodoeiro *Gossypium hirsutum* L.

As respostas comportamentais do bicudo-do-algodoeiro aos compostos orgânicos voláteis de plantas em fase vegetativa, plantas com botão floral, botão floral, flor, maçã e plantas em floração do algodoeiro, e a presença dos semioquímicos que responsáveis pela interação inseto-planta foram investigadas neste trabalho. Todos os experimentos foram realizados em condições de laboratório usando insetos criados em dieta artificial e planta cultivadas em casa de vegetação. Bioensaios usando olfatômetro em ípsilon demonstraram que machos são atraídos pelos voláteis das plantas em fase vegetativa e flores, e as fêmeas pelos voláteis das flores e plantas em floração. Ambos os sexos do bicudo-do-algodoeiro não foram atraídos pelos voláteis de planta com botão floral, botão floral e maçã. Compostos voláteis destes tratamentos foram coletados por oito horas e analisados por GC-MS, revelando 13 compostos liberados pelas plantas em floração e 11 nas flores e plantas em fase vegetativa. As plantas em suas respectivas fases de desenvolvimento liberam maiores quantidades de compostos do que as flores. As antenas de machos e fêmeas foram eletrofisiologicamente responsivas aos extratos voláteis destes tratamentos, confirmando o mesmo padrão de resposta observado nos bioensaios de olfatometria. Os compostos sintéticos β-caryophyllene e *cis*-3-hexenyl-acetate presentes em maiores quantidades em plantas em floração não foram atrativos para as fêmeas na concentração utilizada nos bioensaios de olfatometria. Os resultados encontrados neste trabalho demonstram que machos e fêmeas exploram os compostos orgânicos voláteis liberados pelas diferentes fases de desenvolvimento da planta e pelas flores, aportando assim, com novas evidências sobre a interação entre *A. grandis* e seu principal hospedeiro, *G. hirsutum*, abrindo a possibilidade de realizar novos estudos visando a aplicabilidade de estes semioquímicos no monitoramento e controle deste importante inseto-praga.

Palavras-chave: Ecologia química; Semioquímicos; Compostos orgânicos voláteis; Bicudo-do-algodoeiro

ABSTRACT

Olfactory responses of *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) to the volatiles of cotton *Gossypium hirsutum* L.

The behavioral responses of the cotton boll weevil to the volatile organic compounds of plants in the vegetative stage, plants with square, squares, flower, boll and flowering plants of cotton, and the presence of semiochemicals responsible for the insect-plant interaction were investigated in this work. All experiments were carried out in laboratory conditions using insects raised in artificial diet and plant grown under greenhouse conditions. Y-tube olfactometer bioassays showed that male were attracted by volatiles of plants in vegetative phase and flowers, and the females by flowers and flowering plants volatiles. Both sexes of the cotton boll weevil were not attracted by plant with squares, squares and boll volatiles. Volatile compounds of these treatments were collected for eight hours and analyzed by GC-MS, revealing 13 compounds released by flowering plants and 11 by flowers and plants in the vegetative stage. Plants in their respective stages of development release larger amounts of compounds than flowers. Male and female antennae were electrophysiologically responsive to the volatile extracts of these treatments, confirming the same response pattern observed in the olfactory bioassays. The synthetic compounds *β*-caryophyllene and *cis*-3-hexenyl-acetate present in larger quantities at flowering plants were not attractive for females at the concentration used in Y-tube olfactometer bioassays. The results obtained in this work demonstrate that males and females exploit the volatile organic compounds released by cotton plant at different development stages and by the flowers, thus contributing with new evidence about the interaction between *A. grandis* and their major host plant, *G. hirsutum*, which will serve as support for studies aiming at the applicability of these semiochemicals in the monitoring and control of the cotton boll weevil.

Keywords: Chemical ecology; Semiochemicals; Volatile organic compounds; Cotton boll weevil

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fases de desenvolvimento do bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis*. A) ovos, a seta vermelha indica o lugar de oviposição no botão; B) larva; C) pupa; D) adulto. 19

Figura 2 - Técnica de criação e diferenciação do sexo. A) Adultos de *Anthonomus grandis* mantidos em gaiola de criação; B) Larvas do bicudo em dieta artificial (B); Detalhe do último tergito do macho (C) e fêmea (D) usado para identificação do sexo. 24

Figura 3 – Materiais utilizados nos bioensaios com *Anthonomus grandis* e para coleta de voláteis de plantas. A) Olfatômetro de vidro do tipo 'Y'; B) Politereftalato de etileno (PET) (Qualitá®) utilizado para isolar partes da planta de algodoeiro; C) seladora de plástico para o acabamento dos sacos PET. 25

Figura 4 – Equipamentos utilizados na coleta de voláteis e nos bioensaios com *Anthonomus grandis*. A) Sistema de controle de ar (ARS) para condução dos voláteis da planta de algodoeiro para o olfatômetro 'Y'; B) bomba de vácuo utilizada para garantir a passagem dos voláteis dentro do olfatômetro; C) adulto de A. grandis, na área de liberação do braço principal do olfatômetro. 26

Figura 5 - Plantas e estruturas reprodutivas do algodoeiro avaliadas em bioensaios de olfatometria para *Anthonomus grandis*. A) planta em fase vegetativa; B) botão floral; C) flor; D) maçã; E) planta em floração. 28

Figura 6 - Plantas de algodoeiro ensacadas e sendo aeradas. A) plantas em fase vegetativa; B) flor. 29

Figura 7 - Equipamentos utilizados para análises químicas dos voláteis de plantas e estruturas reprodutivas do algodoeiro. A) Cromatógrafo a gás acoplado a um detector por ionização de chama (GC-FID); B) Cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS). 30

Figura 8 - Instrumentos utilizados para o registro de eletroantenografia em *Anthonomus grandis* (EAG) (A); Vista superior dos instrumentos, a seta vermelha indica a posição da antena (B); e ampliação da antena de A. grandis montado nos eletrodos (C). 32

Figura 9 - Respostas de fêmeas e machos de *Anthonomus grandis* em olfatômetro 'Y' aos voláteis de plantas na fase vegetativa, plantas em floração, plantas com

botão floral, flor, maçã, botão floral vs o controle (ar limpo). Asteriscos indicam diferenças significativas entre tratamentos de acordo com o teste χ^2 da razão de verossimilhança (*P < 0,05; ** P < 0,01; ns = não significativo). *Números dentro das barras indicam o valor absoluto de insetos e entre parênteses indicam insetos que não responderam a nenhum tratamento e número de insetos utilizados.* 36

Figura 10 - Eletroantenograma (EAG) de antenas de fêmeas e machos de *Anthonomus grandis* aos voláteis de plantas de algodoeiro em fase vegetativa, plantas em floração e flor isoladamente. Tratamentos com letras igual não diferem significativamente (Tukey, P < 0,05). 37

Figura 11 - Compostos voláteis liberados por plantas de algodoeiro, na fase vegetativa, flores e plantas em floração (fase reprodutiva). 40

Figura 12 - Total de compostos voláteis liberados por planta de algodoeiro, na fase vegetativa, flores e em plantas em floração (fase reprodutiva). 41

Figura 13 - Análise de componentes principais (ACP) (P < 0,05) dos compostos voláteis liberados por plantas de algodoeiro, na fase vegetativa, flores e em plantas em floração (fase reprodutiva). (x1) '*unknown* 1', (x2) '*unknown* 2', (x3) *β*-myercene, (x4) *cis*-3-hexenyl-acetate, (x5) '*unknown* 3', (x6) '*unknown* 4', (x5) R-(+)-limonene, (x8) '*unknown* 5', (x9) '*unknown* 6', (x10) D-camphor, (x11) '*unknown* 7', (x12) '*unknown* 8', (x13) *β*-caryophyllene. 42

Figura 14 - Respostas de fêmeas de *Anthonomus grandis* em olfatômetro 'Y', aos compostos voláteis sintéticos *β*–caryophyllene e *cis*-3-hexenyl-acetate vs o controle (ar limpo). ns = não significativo de acordo com o teste χ^2 da razão de verossimilhança (P < 0,05). *Números entre parênteses indicam insetos que não responderam a nenhum tratamento, e número de insetos utilizados.* 43

1 INTRODUÇÃO

A localização de uma planta hospedeira é crucial para que um inseto herbívoro satisfaça suas necessidades nutricionais e encontre locais de oviposição adequados (BRUCE; WADHAMS; WOODCOCK, 2005). Devido à grande diversidade de hospedeiros no ambiente, há insetos herbívoros altamente especializados – que se alimentam de apenas uma, ou de um número limitado de espécies de plantas – e há também os generalistas, que se alimentam de uma ampla gama de plantas de diferentes famílias (BERNAYS; CHAPMAN, 1994).

Determinar a presença e localizar plantas hospedeiras adequadas é uma tarefa que requer um sofisticado mecanismo de detecção (BRUCE; WADHAMS; WOODCOCK, 2005). Este mecanismo é mediado pela integração de diversos estímulos sensoriais, que agem sobre o sistema nervoso central do inseto, incluindo pistas químicas olfativas ou gustativas, e físicas como a cor, a forma e a textura das plantas (BRUCE; WADHAMS; WOODCOCK, 2005). Portanto, um inseto herbívoro deve identificar corretamente os voláteis produzidos pelas plantas no ambiente, para distinguir aqueles produzidos por seus hospedeiros dos não hospedeiros (SCHOONHOVEN; VAN LOON; DICKE, 2005; BRUCE; PICKETT, 2011; BEYAERT; HILKER, 2014).

Estruturas reprodutivas como flores possuem sinais visuais e olfativos que as tornam altamente evidentes para os polinizadores, mas isto pode também incrementar sua atratividade para os herbívoros (RÖSE; TUMLINSON, 2004; KNOLHOFF; HECKEL, 2014). A exploração de compostos voláteis de flores já tem sido constatada para insetos fitófagos generalistas (BRUCE; CORK, 2001a; PAN et al., 2015; ONDIAKA et al., 2016) e especialistas (RIFFELL et al., 2008) para localização de hospedeiros. Voláteis liberados pelos frutos também são descritos como atrativos para insetos fitófagos (ADDESSO; MCAUSLANE; ALBORN, 2011).

O bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), uma das principais pragas do algodoeiro, pode ser monitorado usando armadilhas com o seu feromônio sintético, comercialmente disponível, constituindo uma importante estratégia para determinar o momento apropriado de aplicação química (FONTES et al., 2006). No entanto, quando o algodoeiro atinge seu estado reprodutivo, o número de insetos capturados nas armadilhas iscadas com o feromônio é drasticamente reduzido (RUMMEL; CURRY, 1986).

Compostos orgânicos voláteis (COVs) de plantas de algodoeiro, como os compostos de folhas verdes, e da planta em estados vegetativo e reprodutivo têm sido relatados como atraentes para *A. grandis* (DICKENS et al., 1990; MAGALHÃES et al., 2012, 2016; SILVA et al., 2015). Entretanto, os resultados não foram conclusivos sobre quais são as pistas químicas que o inseto utiliza para localizar seu hospedeiro, ficando evidente a necessidade de explorar os voláteis liberados pelas estruturas vegetativas e reprodutivas da planta de algodoeiro e com isso abrindo novas perspectivas para compreender a sincronia da chegada do bicudo ao cultivo.

Assim, este trabalho visou investigar as respostas comportamentais de machos e fêmeas do bicudo-do-algodoeiro, aos compostos orgânicos voláteis das plantas de algodoeiro nas fases vegetativa e em floração, além de suas estruturas reprodutivas, buscando compreender estas interações.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Interação inseto-planta mediada por compostos orgânicos voláteis

Em geral, plantas liberam uma quantidade de compostos orgânicos voláteis (COVs) que influenciam o comportamento dos insetos, como no caso de partes jovens das plantas que são ricas em nutrientes, o que é interessante para os insetos (PARÉ; TUMLINSON, 1999). Assim, plantas podem produzir voláteis que interferem nas relações ecológicas, tanto dos organismos que os emitem, quanto dos organismos que os recebem, mediando assim complexas interações tróficas (DICKE; VAN LOON, 2000; VAN POECKE; DICKE, 2004).

Para os insetos, a percepção de sinais químicos a longas distâncias é de extrema importância no processo de localização hospedeira, uma vez que pode proporcionar informações precisas sobre o hospedeiro, como por exemplo, sua localização, estágio de desenvolvimento e condição fisiológica (BENTO et al., 2008; BENTO; NARDI, 2009). A eficiência em responder a esses sinais é um fator importante e pode ocorrer em consequência desses sinais, porque além de proporcionar o acesso ao alimento e o suprimento das necessidades nutricionais, pode favorecer o encontro de um sitio de acasalamento, oviposição e sobrevivência para a sua progênie (DICKE, 2000).

Ao longo do processo evolutivo, as plantas desenvolveram a habilidade de identificar e responder ao ataque de insetos herbívoros, usando vários mecanismos de defesa e estabelecendo relações interespecíficas de mutualismo (HANDLEY; EKBOM; ÅGREN, 2005; HANLEY et al., 2007; WAR et al., 2012; NEILSON et al., 2013; HEIL et al., 2014). Na luta das plantas contra herbívoros, as características morfológicas como tricomas (não-glandulares e glandulares), espinhos e superfícies cerosas podem ser consideradas barreiras de defesa física das plantas (GATEHOUSE, 2002; FIGUEIREDO et al., 2013; HOUTEN et al., 2013). Características químicas vegetais como a produção de metabólitos secundários ou proteínas defensivas especializadas (inibidores de proteinase), representam componentes importantes para sua defesa direta contra herbívoros, provocando ação repelente, supressora de alimentação e oviposição ou redutora de digestibilidade (DICKE, 1994). Essas características morfológicas e químicas são consideradas

defesas constitutivas ou “estáticas” das plantas (HARBORNE, 1994; KARBAN; BALDWIN, 1997; GATEHOUSE, 2002; WITTSTOCK; GERSHENZON, 2002).

Outro tipo de defesa das plantas são as defesas induzidas, as quais são ativadas após o ataque de insetos, provocados por elicitores presentes nas secreções orais e/ou fluido de oviposição de herbívoros (HARBORNE, 1994; KARBAN; BALDWIN, 1997; GATEHOUSE, 2002; WITTSTOCK; GERSHENZON, 2002). As defesas induzidas além de estarem envolvidas na atração de inimigos naturais (predadores e parasitoides) de herbívoros que atacam as plantas, como por exemplo, a produção de COVs e voláteis de plantas induzidos pela herbivoria (VPIHs) (PRICE et al., 1980; VET; DICKE, 1992; DE MORAES et al., 1998; HARE, 2011; PEÑAFLOR et al., 2011; PEÑAFLOR; BENTO, 2013; HEIL, 2014; ERB et al., 2015; GISH; MORAES; MESCHER, 2015) ou atraindo outros insetos fitófagos (MAGALHÃES et al., 2012).

No entanto, ao longo do tempo alguns insetos passaram por adaptações que lhes permitiram ultrapassar tais barreiras e explorar aqueles compostos, incrementando seu sucesso adaptativo (RHOADES, 1979). Nesse contexto, o reconhecimento dos voláteis de plantas constitutivos ou induzidos, dependendo das interações envolvidas e dos sinais disponíveis no ambiente, é significativamente importante, pois pode evitar o contato com plantas não adequadas para suas exigências e assim determinar o sucesso da busca hospedeira (BENTO; NARDI, 2009). Insetos herbívoros podem identificar os sinais químicos da planta hospedeira por meio dos compostos isolados ou em mistura ou em proporções particulares de diferentes compostos comuns.

Órgãos reprodutivos como flores apresentam sinais visuais e olfativas que as tornam altamente evidente para insetos polinizadores, mas isto pode também incrementar sua atratividade para os herbívoros (RÖSE; TUMLINSON, 2004; KNOLHOFF; HECKEL, 2014). Bruce e Cork (2001b) observaram por meio de bioensaios de GC-EAG e túnel de vento, que os compostos benzaldehyde, (*S*)-(−)-limonene, (*R,S*)-(±)-linalool, (*E*)-myroxide, (*Z*)-*β*-ocimene, phenylacetaldehyde, and (*R*)-(−)-piperitonedas, presentes nas flores de *Tagetes erecta* L. (Asteraceae), são atrativos para as fêmeas de *Helicoverpa armigera* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). Esta planta tem sido utilizada com sucesso como cultura armadilha. Silveira et al. (2009) constataram que esta espécie aumenta a riqueza e diversidade de artrópodes,

bem como incrementa o número de inimigos naturais, resultando em menor presença de insetos fitófagos no plantio orgânico da cebola.

Machos e fêmeas de *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür) (Hemiptera: Miridae), uma importante praga do algodoeiro e de árvores frutíferas na China, preferem os voláteis de plantas em floração do que as plantas em fase vegetativa de 18 hospedeiros (PAN et al., 2015). Experimentos de olfatômetro determinaram que *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae) é fortemente atraído pelos voláteis de plantas de pimenta em floração e frutificação danificados pela herviboria de seus co-específicos (ADDESSO; MCAUSLANE; ALBORN, 2011).

Os insetos frugívoros como *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae), *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) e *Anastrepha obliqua* (Macquart) (Diptera: Tephritidae) são atraídos pelos COVs emitidos pelos frutos maduros de seus hospedeiros (VALLAT; DORN, 2005; PAPADOPOULOS et al., 2006; MALO et al., 2012).

Apesar da grande quantidade de compostos voláteis constitutivos ou induzidos pela herviboria liberados pelas plantas e usados pelos insetos para localizar, identificar e aceitar algum hospedeiro, ainda é difícil associar compostos individuais com atividade para polinizadores, herbívoros ou inimigos naturais (CLAVIJO MCCORMICK; GERSHENZON; UNSICKER, 2014). Enquanto uma amostra de voláteis de plantas pode conter mais de 200 compostos, registros comportamentais e eletrofisiológicos com antenas de insetos mostraram que apenas uma parte é detectado pelo inseto (BRUCE; WADHAMS; WOODCOCK, 2005; PAN et al., 2015). Frequentemente, os compostos relevantes para o inseto incluem componentes minoritários do perfil de voláteis. Experimentos em que insetos foram expostos a voláteis de plantas isoladamente e em combinação revelaram que respostas de comportamento mais fortes são obtidas com misturas ou combinações de substâncias voláteis apropriadas do que com compostos individuais (BRUCE; PICKETT, 2011).

Voláteis da batata foram atrativos para *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae), porém, quando testados individualmente nenhum dos componentes ((*E*)-3-hexen-1-ol, (*Z*)-2-hexen-1-ol, (*E*)-2- hexen-1-ol e (*E*)-2-hexenal) foi atrativo para o inseto (VISSER; AVÉ, 1978). Por outro lado, respostas comportamentais opostas podem ocorrer quando os compostos são testados individualmente. Webster et al. (2010) observaram que 10 dos 15 compostos voláteis

de *Vivia faba* L. provocaram respostas comportamentais negativas em *Aphis fabae* Scop. (Hemiptera: Aphididae), sugerindo efeito repelente.

Muitas vezes, certos compostos numa mistura de voláteis de plantas utilizados para o reconhecimento do hospedeiro são mais importantes do que outros, e omiti-los de uma mistura resulta numa redução substancial da atividade, enquanto outros menos importantes podem ser omitidos sem qualquer perda significativa no nível de atração provocada (BRUCE; PICKETT, 2011).

Compostos como os isotiocianatos, caraterísticos de Brassicaceae, estão tipicamente presentes em pequenas quantidades no perfil de voláteis de plantas sadias. Em *Ceutorhynchus assimilis* Payk. (Coleoptera: Curculionidae) estes compostos provocaram respostas antenais muito mais elevadas do que a maioria dos voláteis de folhas verdes e terpenos testados nas antenas deste inseto (EVANS; ALLEN-WILLIAMS, 1992).

Os voláteis de plantas também podem influenciar a recepção e emissão dos feromônios pelos insetos; consequentemente, a ação conjunta desses semioquímicos voláteis produzem uma resposta comportamental diferenciada daquela desencadeada por componentes isolados (DICKE, 2000; REDDY; GUERRERO, 2004).

Dentre os semioquímicos, os feromônios têm sido integrados às técnicas tradicionais de controle e usados frequentemente no monitoramento e controle de centenas de insetos-praga de importância agrícola (RIDGWAY; INSCOE; DICKERSON, 1990). No entanto, um dos principais desafios na pesquisa de feromônios é a maneira pela qual os comportamentos estimulados por este semioquímico intraespecífico são observados e analisados (BORGES; ALDRICH, 2001). Sem a compreensão completa e precisa do comportamento, a aplicação prática de feromônios nunca poderá ser totalmente realizada.

De modo geral, os feromônios de agregação estão entre os mais importantes sinais para a busca hospedeira de herbívoros, devido a que estão associados à localização de sítios de alimentação, acasalamento e oviposição (LANDOLT, 1997; LANDOLT; PHILLIPS, 1997). *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae), por exemplo, são estimulados a liberar feromônios de agregação somente quando entram em contato com sua planta hospedeira, *Elaeis guineenses* (Jacq.) (Arecaceae) (JAFFÉ et al., 1993). Em espécies de Scolytinae, o feromônio de agregação é liberado nas fezes após a alimentação da planta hospedeira

(SILVERSTEIN; RODIN; WOOD, 1966). Em outras espécies, o feromônio de agregação e de voláteis induzidos de plantas incrementa as possibilidades de sucesso na localização hospedeira por herbívoros (RUTHER et al., 2000; MAGALHÃES et al., 2016).

Aumento na atratividade de machos e fêmeas em resposta à ação conjunta de voláteis induzidos do algodoeiro e do feromônio de agregação, foi constatada em *A. grandis* (DICKENS, 1989). Em *Melolontha melolontha* L. (Coleoptera: Scarabaeidae), também foi evidenciado aumento da atratividade produzida pela associação do feromônio de agregação e de voláteis induzidos das plantas (REINECKE; RUTHER; HILKER, 2002). Em estudos realizados por Ruther et al. (2000, 2001), foi observado que machos do besouro *M. hippocastani* Fab. (Coleoptera: Scarabaeidae) são atraídos por voláteis induzidos em plantas por danos mecânicos e por herbivoria. Nesta espécie, a atração pelos voláteis da planta induzidos por alimentação de fêmeas da mesma espécie é parte do processo de encontro dos insetos para acasalamento. Esse incremento da atratividade de co-específicos pode ser adaptativamente vantajoso para os herbívoros, uma vez que aumenta a eficiência para localização do alimento e do encontro de indivíduos do sexo oposto, reduzindo o dispêndio de recursos energéticos para tais atividades (BENTO; NARDI, 2009).

A utilização de voláteis de plantas no manejo integrado de pragas é uma estratégia adicional e ecologicamente sustentável no controle de pragas. Essa técnica envolve a possibilidade de utilização de iscas como atraentes de organismos benéficos, e a manipulação dos processos bioquímicos que induzem e regulam as defesas em plantas (ARAB; BENTO, 2006).

2.2 O bicudo-do-algodoeiro

Anthonomus grandis Boheman, 1843 (Coleoptera: Curculionidae) conhecido como bicudo-do-algodoeiro é considerado a maior praga da cotonicultura brasileira (RAMALHO; GONZAGA, 1991; RAMALHO; SILVA, 1993; LIMA Jr et al., 2013). A tribo Anthonomini subfamília Curculioninae a qual pertence o bicudo-do-algodoeiro, é uma das mais diversas e complexas da família Curculionidae, agrupando mais de 800 espécies descritas com 43 gêneros, 24 dos quais são da América (ALONSO-ZARAZAGA; LYAL, 1999). O bicudo-do-algodoeiro chega a causar até 75% de perdas na produção total de fibras da cultura (AZAMBUJA; DEGRANDE, 2014), e por isso o

Departamento de Sanidade Vegetal do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento incluiu o bicudo dentro das oito pragas de maior risco fitossanitário das principais culturas agrícolas nacionais (DEPARTAMENTO DE SANIDADE VEGETAL, 2015). Esse inseto é uma praga introduzida no Brasil, constatado pela primeira vez em fevereiro de 1983 em algodoais de Sorocaba e Campinas no estado de São Paulo, próximos ao aeroporto de Viracopos (NAKANO, 1983). Nessa região o bicudo foi encontrado em altas densidades populacionais, danificando botões florais e atingindo níveis de aproximadamente 90% de infestação (HABIB; FERNANDES, 1983), em 30 anos a praga se disseminou com sucesso em diversas regiões do país sendo então descrito como a principal praga do algodoeiro (PAULA et al., 2013).

O inseto possui metamorfose do tipo holometábola, que inclui as fases de ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1A-C) (ALMEIDA; SILVA; RAMALHO, 2008). Os ovos são brilhantes e medem cerca de 0,8 mm de comprimento por 0,5 mm de largura, depositados pela fêmea, preferencialmente nos botões florais e maçãs, em número de 7 a 11 por dia, podendo chegar em condições favoráveis a 400 ovos. A incubação varia de 3 a 4 dias quando então eclodem as larvas, as quais são de coloração branca, ápodas e se alimentam no interior das maçãs e botões florais. As larvas passam por três ínstares com duração de sete a 12 dias, dependendo da temperatura. Transcorrido esse período, inicia-se a fase de pupa, de tipo livre, na qual podem ser visualizados o rostro e outros apêndices ligados ao corpo através de uma membrana transparente. De três a cinco dias após o período pupal emergem os adultos, que medem em média 7 mm, variando entre 4 e 9 mm. Os adultos possuem longevidade de 20 a 40 dias (BRAGA-SOBRINHO; LUKEFAHR, 1983; GABRIEL et al., 1986), podendo as fêmeas e machos sobreviver em gaiolas de campo por 81 e 82 dias, respectivamente, após o aparecimento dos primeiros botões florais (FENTON; DUNNAM, 1929), e quando coletados em maçãs podem ultrapassar os 115 dias de longevidade (CHANDLER; WRIGHT, 1991). Os adultos são ativos das 6 h às 18 h, tendo pico de atividade das 9 às 12h (BRAGA-SOBRINHO; LUKEFAHR, 1983; AQUINO et al., 1986) e os seus danos são constatados principalmente nos botões florais através de orifícios deixados pelos insetos depois da alimentação e oviposição.

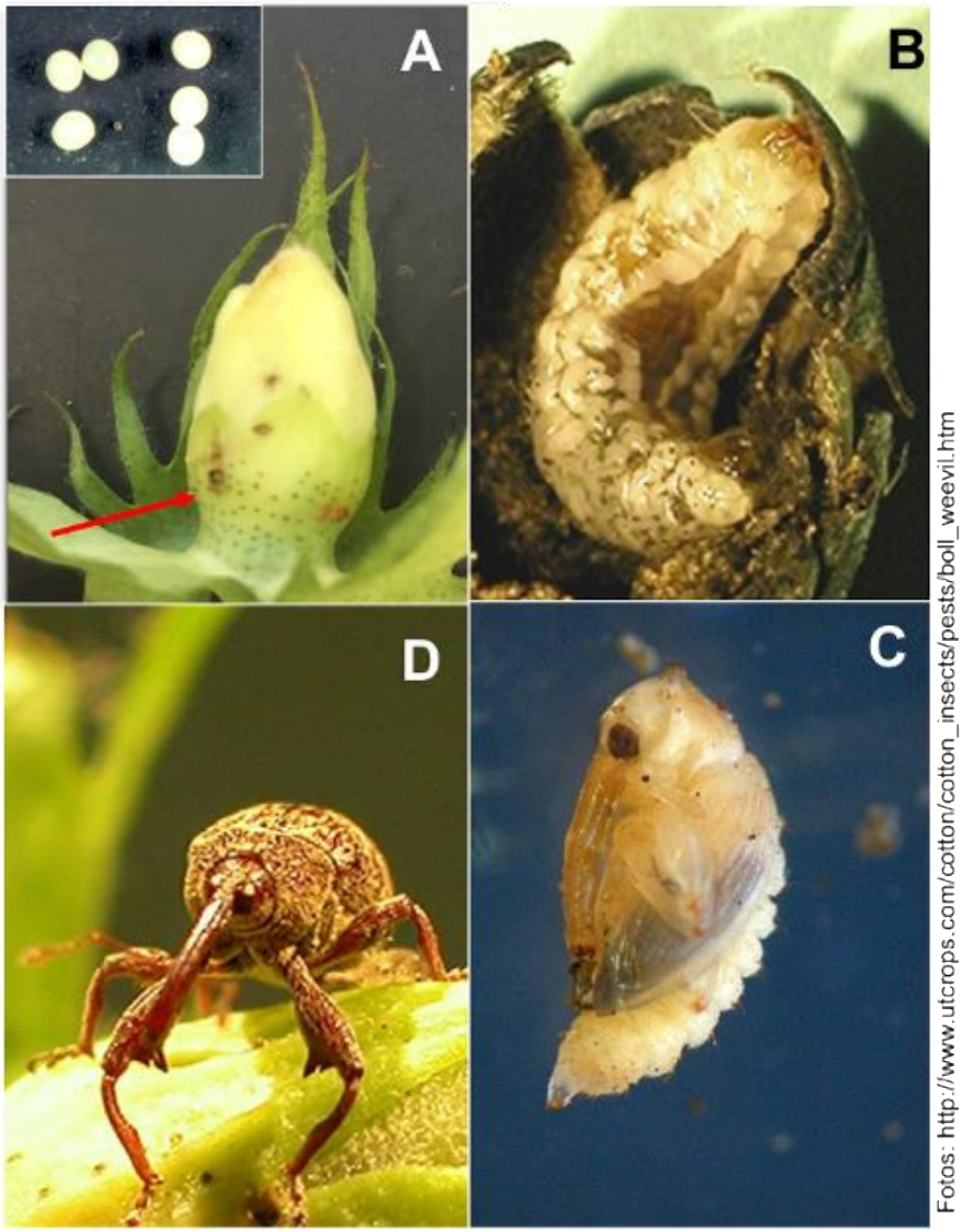

Figura 1 - Fases de desenvolvimento do bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis*. A) ovos (seta vermelha indica o lugar de oviposição no botão); B) larva; C) pupa; D) adulto.

A presença do bicudo na lavoura pode ser reconhecida pela constância de botões florais com orifícios provocados pela alimentação e oviposição. As fêmeas do bicudo não discriminam botões previamente ovipositados e o aumento do nível de infestação resulta no aumento do número de orifícios de oviposição/botão e,

eventualmente, na emergência de mais de um adulto/botão (SOARES; YAMAMOTO, 1993).

O grande potencial de destruição do bicudo deve-se a sua alta capacidade reprodutiva, a qual permite a coexistência de várias gerações do inseto em um único ciclo da cultura, ao expressivo dano por indivíduo, grande capacidade de proliferação e disseminação no campo (BRAGA-SOBRINHO; LUKEFAHR, 1983; BRUGNERA, 2009). Em apenas um ciclo, o inseto é capaz de produzir até 9,6 gerações (LLOYD; LASTER; MERKL, 1964), o que pode significar uma população de 500 mil indivíduos no final da seguinte safra a partir de uma população inicial de 50 bicudos que entram em diapausa, denotando a eficiência reprodutiva desse inseto (BRAGA-SOBRINHO; LUKEFAHR, 1983).

O bicudo-do-algodoeiro é uma praga de difícil controle, e no Brasil o seu controle é realizado principalmente mediante o uso intensivo de inseticidas sintéticos, requerendo uma média de 17 pulverizações por ciclo de cultivo (ALMEIDA; SILVA; RAMALHO, 2008), sendo a eficácia reduzida devido ao desenvolvimento das fases imaturas do inseto dentro dos botões florais e maçãs (LIMA Jr. et al., 2013). Outras estratégias de controle incluem métodos culturais, legislativos e comportamentais (FONSECA et al., 2011).

O feromônio do bicudo, classificado como de agregação por atrair ambos os sexos é produzido pelos machos (TUMLINSON et al., 1969) e a formulação sintética (grandlure) é amplamente utilizada para monitorar e determinar o tempo certo de aplicação de algum método de controle, principalmente químico (RODRIGUES; MIRANDA, 2015). A utilização de tubos-mata-bicudo (TMB®) junto com o feromônio sintético tem sido eficientes para controlar o bicudo em pequenas áreas (MIRANDA; DA SILVA, 2005). O uso de desfolhantes com inseticidas e a eliminação de restos da cultura e plantas voluntárias são importantes métodos culturais para reduzir a população de insetos que sobreviverá durante a entressafra (TORRES et al., 2015).

Outra vantagem ecológica que apresenta o bicudo-do-algodoeiro e que contribui à difícil tarefa do seu controle é a capacidade de se alimentar de plantas das famílias Lamiaceae, Myrtaceae, Rutaceae, Solanaceae, Malvaceae, o que lhe permite sobreviver durante entressafra de cultivos do algodoeiro (MACÊDO et al., 2015; PIMENTA et al., 2016).

Devido à importância e à ameaça do bicudo-do-algodoeiro para cotonicultura mundial, países como EUA, México e Brasil tem implementado programas de

erradicação do inseto, fundamentado nas estratégias do manejo integrado de pragas (SMITH, 1998; ALLEN, 2008; LIMA Jr. et al., 2013). No estado de Goiás o programa para supressão em grande escala mostrou-se eficiente em suprimir as populações do bicudo e com benefícios econômicos e ambientais a longo prazo (LIMA Jr. et al., 2013).

2.3 Interação *Anthonomus grandis*-algodoeiro

A preferência do bicudo pelas plantas do algodoeiro já despertava o interesse de agrônomos e entomologistas no início do século XX para compreender e melhor entender o alto grau de especificidade deste inseto e os mecanismos envolvidos na atração pelo seu principal hospedeiro (MCINDOO, 1926).

Experimentos de laboratório e campo demonstraram que a cor e substâncias orgânicas voláteis extraídas de mudas de algodoeiro, botões florais e maçãs recém formadas são importantes estímulos que afetam a seleção hospedeira de bicudo-do-algodoeiro (KELLER et al., 1963; NEFF; VANDERZANT, 1963; HOLLINGSWORTH; WRIGHT; LINDQUIST, 1964; TUMLINSON et al., 1969; THOMPSON et al., 1970; HEDIN, 1976; MCKIBBEN et al., 1977).

Testes de campo também demonstraram uma significativa maior atração de *A. grandis* pelas plantas em fase de frutificação (PARENCIA; DAVIS; COWAN, 1964; MITCHELL; TAFT, 1966). O alto grau de especificidade do bicudo-do-algodoeiro, que prefere se alimentar e reproduzir em botões florais de algodoeiros é outra característica importante da família Curculionidae (CROSS, 1983).

Testando extrato de óleo do algodoeiro obtido de plantas com três folhas verdadeiras, McKibben et al. (1977) observaram que os machos foram atraídos pelo extrato, mas não as fêmeas, chegando a sugerir que os voláteis contidos no extrato poderiam ter um efeito de repelência nas fêmeas.

De acordo com Tumlinson et al. (1969), Hardee et al. (1969) e Dickens (1986) são os machos de *A. grandis* os responsáveis pela busca do hospedeiro apropriado. Com o aparecimento dos primeiros botões florais começa também a migração dos bicudos para o algodoal (SMITH; CLEVELAND; CLARK, 1965; WHITE; RUMMEL, 1978; RUMMEL; CURRY, 1986). Os primeiros machos colonizadores se alimentam das estruturas reprodutivas da planta, para depois começar a produzir o feromônio de agregação o qual é liberado com as fezes (HARDEE, 1970) e atrair seus co-

específicos, as fêmeas (CROSS; MITCHELL, 1966; TUMLINSON et al., 1969; WHITE; RUMMEL, 1978; DICKENS, 1984; BARTELT, 1999). Assim, a fenologia do algodoeiro é um dos fatores que mais influencia a dinâmica populacional do bicudo (WHITE; RUMMEL, 1978; MAGALHÃES et al., 2016).

Os compostos voláteis produzidos pelo algodoeiro poderiam estar envolvidos na atração do bicudo (DICKENS, 1989), que prefere os voláteis emitidos por plantas danificadas pela herbivoria aos emitidos por plantas sadias (SILVA et al., 2015) possivelmente regulando a chegada dos seus co-especificos pelo efeito sinérgico do feromônio de agregação e os compostos voláteis liberados pela planta de algodoeiro (DICKENS, 1989; DICKENS et al., 1990).

O β-bisabolol é um dos primeiros compostos que demonstrou ser altamente atrativo para adultos do bicudo-do-algodoeiro, sendo observado em grandes quantidades em extratos de botões florais, flores e maçãs do algodoeiro (MINYARD et al., 1969; THOMPSON et al., 1971).

Insetos da subfamília Anthonominae (Curculionidade) como *A. eugenii* Cano, *A. musculus* Cano, *A. rubi* Herbst e *A. pomorum* L., respondem aos VOCs constitutivos e induzidos dos seus hospedeiros (KALINOVÁ et al., 2000; BICHÃO et al., 2005; ADDESSO; MCAUSLANE, 2009; SZENDREI et al., 2009; ADDESSO; MCAUSLANE; ALBORN, 2011; WIBE et al., 2014). No caso da espécie *A. grandis*, os adultos, aparentemente, são atraídos por voláteis de folhas verdes de plantas de algodoeiro (DICKENS et al., 1990), sadias e induzidas pela herbivoria, preferindo a mistura dos voláteis emitidos pelas plantas em estado reprodutivo em detrimento ao vegetativo. Neste caso, a principal diferença no perfil químico entre plantas da variedade Delta Opal foram os monoterpenos acíclicos, (*E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (DMNT) e (*E,E*)-4,8,12-trimetiltrideca-1,3,7,11-tetraene (TMTT), com maiores quantidades sendo liberados no estado vegetativo. Porém, os compostos usados pelo bicudo-do-algodoeiro para diferenciar o estado fenológico específico da planta, até o momento, não foram elucidados (MAGALHÃES et al., 2012). Ambos os sexos de *A. grandis* responderam eletrofisiologicamente aos monoterpenos acíclicos DMNT e TMTT e ao seus respectivos compostos sintéticos. Contudo, quando estes compostos foram testados em bioensaio de olfatometria não foram encontrados resultados consistentes, sendo incerta a influência destes monoterpenos na localização do hospedeiro pelo bicudo (MAGALHÃES et al., 2016).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos, bem como a criação de insetos e cultivos de plantas foram conduzidos no Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP.

3.1 Criação de *A. grandis*

A criação de *A. grandis* foi iniciada com ovos, pupas e adultos provenientes do Laboratório de Entomologia da Bayer em Paulínia, SP. Os adultos foram mantidos em gaiolas plásticas (10 x 18,5 x 29,5 cm) com fundo e tampa telados (Figura 2A). Os ovos, larvas, pupas e adultos obtidos foram mantidos em salas climatizadas com temperatura de 27±1 ºC, umidade relativa de 65±10% e fotofase de 14 h. Larvas e adultos foram alimentados com dieta artificial (Figura 2B) elaborada com ágar 28 g, gérmen de trigo 60 g, levedura de cerveja 60 g, proteína de soja 100 g, sacorose 60 g, Pharmamedia® 40 g (ADM, Chicago Illinois, USA), sais de Wesson 10 g (21% $CaCO_4$, 0,039% Cu_2SO_4, 9% $MgSO_4$, 0,009% K_2SO_4, 12% KCl, 31% KH_2PO_4, 0,057% NaF, 14,9% Ca_3PO, 1,47% $FePO_4$, 0,02% $MnSO_4$, 0,009% Al_2 $(SO_4)_3$, 0,005 KI, 10,5% NaCl), ácido ascórbico 20 g, ácido sórbico 2,4 g, Parahidroxibenzoato de metilo 2 g (nipagin), solução vitamínica 10 mL (niaciamida 1 g, pantotenato de cálcio 1 g, riboflavina 0,5 g, tiamina 0,25 g, piridoxina 0,25g, ácido fólico 0,25 g, biotina 0,02 mL, vitamina B_{12} 1 g diluído em 1000 mL de água destilada) e 1,5 L de água destilada. A criação e manutenção da colônia foi mantida de acordo com a metodologia descrita por Schmmidt et al. (2001).

Em todos os experimentos foram utilizados insetos adultos virgens com 5±1 dia de idade, considerando a maturação fisiológica do seu sistema olfativo (DICKENS; MOORMAN, 1990). Os adultos recém emergidos foram separados por sexo (SAPPINGTON; SPURGEON, 2000) (Figura 2C-D), mantidos em recipientes plásticos de 250 mL em grupos de 30 indivíduos, e alimentados com dieta artificial. Antes de cada bioensaio, os insetos foram privados de alimento por 24 h.

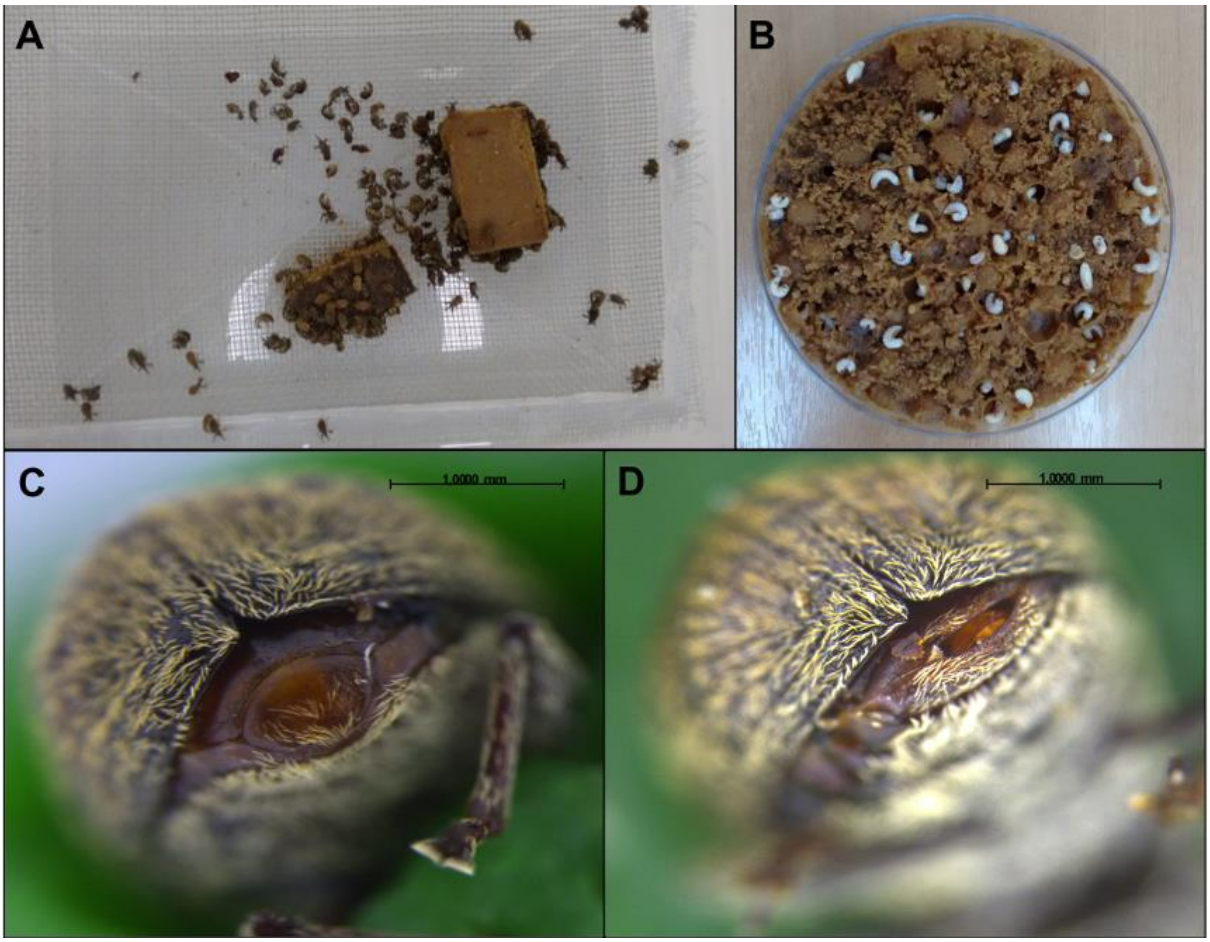

Figura 2 - Técnica de criação e diferenciação dos sexos. A) Adultos de *Anthonomus grandis* mantidos em gaiola de criação; B) Larvas do bicudo em dieta artificial (B); Detalhe do último tergito do macho (C) e fêmea (D) usado para identificação dos sexos.

3.2 Material vegetal

Sementes de algodão da variedade FiberMax® FM993 da Bayer foram plantadas em vasos de plástico de 15 cm de altura, com diâmetro externo de 20 cm na parte superior e 13 cm na parte inferior, preenchidos com uma mistura de solo e substrato (Basaplant®), na proporção de 3:1, previamente esterilizado em autoclave. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, com temperatura de 26±12 ºC, umidade relativa de 60±10%, luz ambiente e irrigadas quando necessário. No momento da semeadura foi aplicado 9,4 g por vaso por planta de fertilizante formulado na proporção de 4-14-8 (nitrogênio, fósforo e potássio), da empresa Heringer. A cada quinze dias as plantas foram adubadas com 1,8 g por vaso do fertilizante Greenleaf®, da empresa Biolchim, diluídos em 125 mL de água.

3.3 Comportamento de adultos de *A. grandis* aos voláteis do algodoeiro

As respostas olfativas de machos e fêmeas de *A. grandis* aos voláteis emitidos por plantas do algodoeiro em fase vegetativa e reprodutiva e de diferentes estruturas reprodutivas foram avaliadas utilizando um olfatômetro de vidro do tipo 'Y' com 3 cm de diâmetro interno, com tubo principal de 20 cm e os braços com 15 cm de comprimento, formando um ângulo de 120° entre eles (Figura 3A).

As partes da planta testadas foram isoladas por meio de sacos plásticos de diferentes tamanhos confeccionados de Politereftalato de etileno (PET) (Qualitá®, Brasil) (Figura 3B). Os sacos foram elaborados a partir de uma seladora de plástico convencional (modelo SP 400TE G2, Sulpack®, Brasil) (Figura 3C).

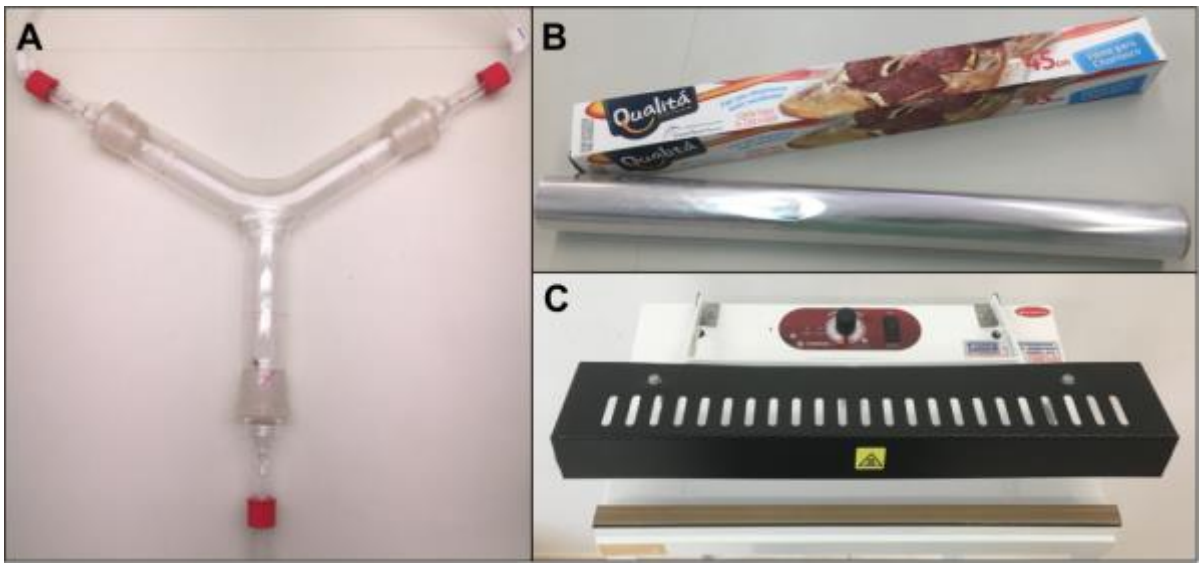

Figura 3 – Materiais utilizados nos bioensaios com *Anthonomus grandis* e para coleta de voláteis de plantas. A) Olfatômetro de vidro do tipo 'Y'; B) Politereftalato de etileno (PET) (Qualitá®) utilizado para isolar partes da planta de algodoeiro; C) seladora de plástico para o acabamento dos sacos PET.

Os sacos foram cuidadosamente amarrados com fita teflon a fim de evitar danos físicos que poderiam induzir a produção de voláteis na planta de algodoeiro. Em uma das extremidades do saco PET foi colocado um pequeno filtro de carvão ativado acoplado a uma mangueira de teflon pela qual entrou o ar purificado e umidificado pelo sistema de controle de ar (Air Delivery System - Analytical Research Systems®, Gainesville-FL, EUA) (Figura 4A), e na outra extremidade do saco, uma

mangueira de teflon foi conectada a um dos braços do olfatômetro a fim de direcionar os voláteis liberados pela planta para o olfatômetro.

Um fluxo constante de ar purificado fornecido pelo ARS carregando os voláteis da estrutura vegetal ensacada, foi calibrado a uma taxa de 0,6 $L \cdot min^{-1}$ para cada um dos braços do olfatômetro. Para garantir a passagem dos voláteis dentro do olfatômetro, um fluxo de 0,4 $L \cdot min^{-1}$ foi usado com ajuda de uma bomba de vácuo Tecnal® (TE-0582, 85W) (Figura 4B).

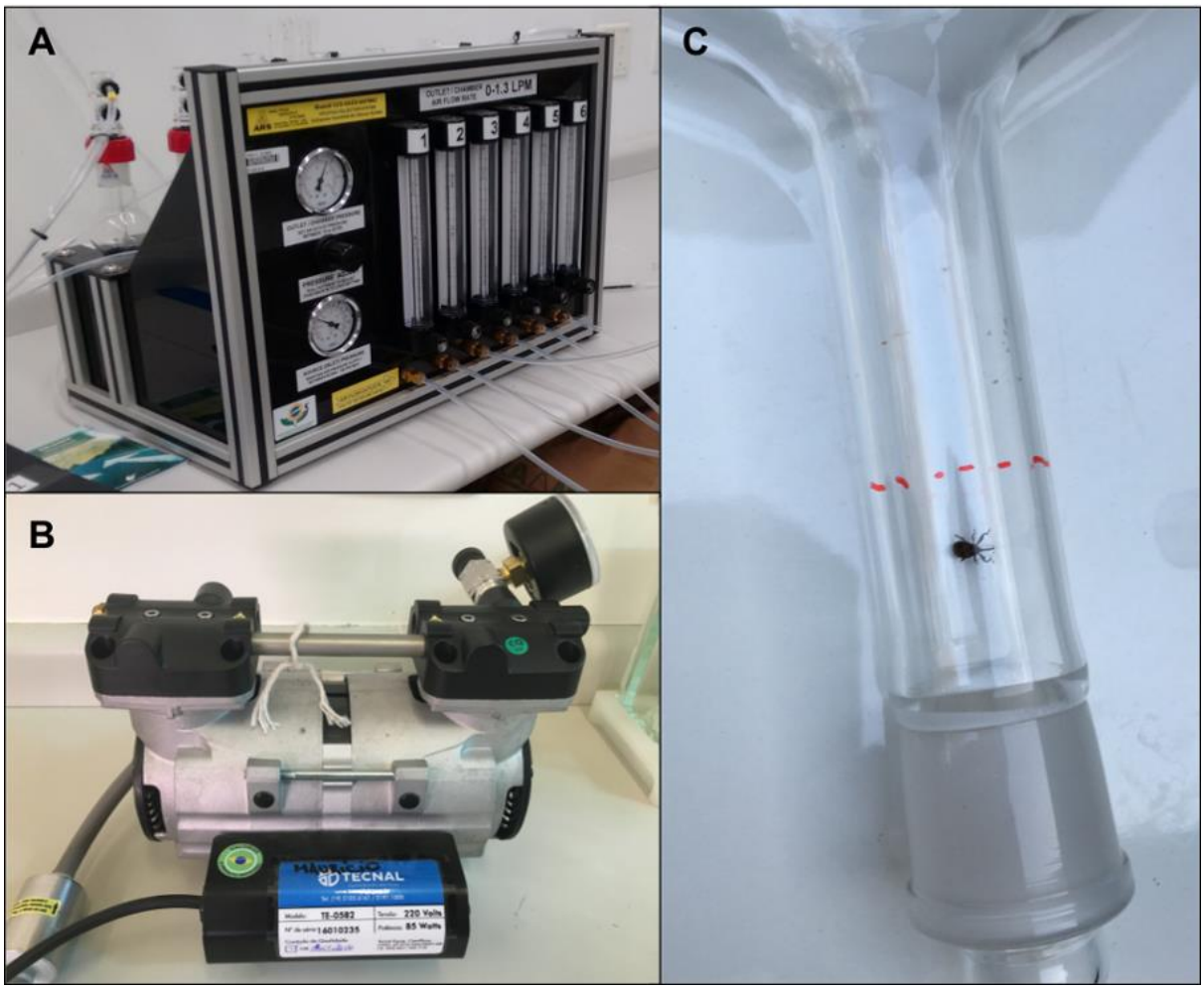

Figura 4 – Equipamentos utilizados na coleta de voláteis e nos bioensaios com *Anthonomus grandis.* A) Sistema de controle de ar (ARS) para condução dos voláteis da planta de algodoeiro para o olfatômetro 'Y'; B) bomba de vácuo utilizada para garantir a passagem dos voláteis dentro do olfatômetro; C) adulto de *A. grandis*, na área de liberação do braço principal do olfatômetro.

Um único inseto adulto, macho ou fêmea, foi introduzido na área de liberação do braço principal do olfatômetro, permitindo-lhe 5 min para adaptação (Figura 4C). O

inseto foi observado durante 10 min, após cruzar a linha demarcada na área de liberação. Foi considerado como escolha por um dos tratamentos quando o inseto permaneceu por pelo menos 1 min na seção terminal do braço do olfatômetro, identificada por uma linha tracejada a 5 cm da entrada do ar. Os insetos que não saíram da área de liberação após 5 min, e aqueles que não escolheram nenhum dos tratamentos durante o tempo de avaliação foram descartados da análise estatística. Os bioensaios foram realizados até se obter pelo menos 50 respostas de ambos sexos.

As fases fenológicas e as estruturas vegetativas e reprodutivas do algodoeiro testadas foram: (i) plantas em fase vegetativa, (ii) planta com botão floral, (iii) botão floral, (iv) flores, (v) maçãs e (vi) plantas em floração (Figura 5A-F). Como controle foi utilizado ar limpo. Foram utilizados botões florais com 9-10 mm e maçãs com 10-15 mm de diâmetro, considerando-se ser o tamanho mais adequado para oviposição e alimentação de *A. grandis* (GREENBERG et al., 2004). Todos os insetos foram utilizados uma única vez, e a cada cinco repetições os olfatômetros e as plantas e/ou estruturas vegetativas e reprodutivas utilizadas foram trocados. Para evitar a influência da posição na resposta observada, após cada repetição o olfatômetro foi girado.

Todos os testes foram realizados em salas climatizadas com temperatura de 27±1 ºC, umidade relativa de 65±10%, e sempre entre as 09h00 e 17h00, considerado o período de maior atividade do inseto (BRAGA-SOBRINHO; LUKEFAHR, 1983; AQUINO et al., 1986). Durante os bioensaios, um suporte contendo lâmpadas led Philips® (Green Power TLED 18 W MB 220-240 V 50/60 Hz) fornecendo uma intensidade luminosa de 2000 lux foi colocado sobre o olfatômetro a uma altura de 0,70 m.

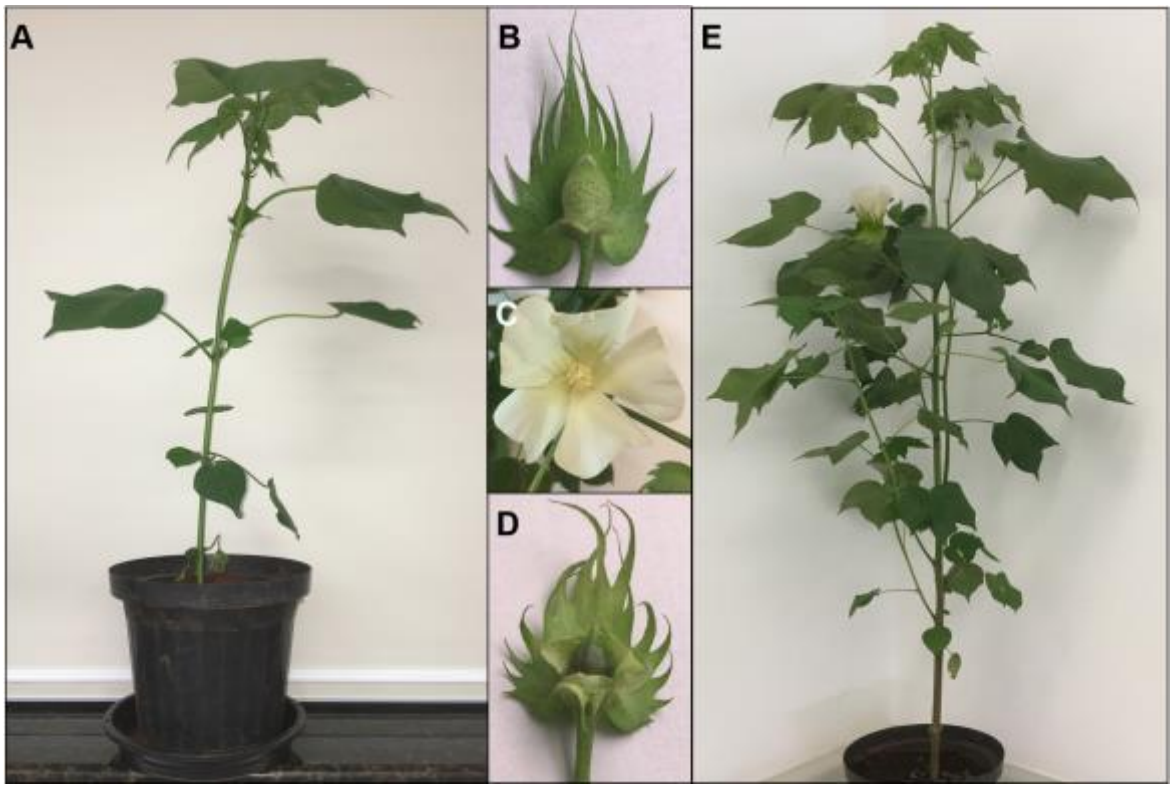

Figura 5 - Plantas e estruturas reprodutivas do algodoeiro avaliadas em bioensaios de olfatometria para *Anthonomus grandis*. A) planta em fase vegetativa; B) botão floral; C) flor; D) maçã; E) planta em floração. (Obs.: as estruturas B, C e D não foram destacadas nas plantas para os bioensaios – vide metodologia).

3.4 Extração de compostos voláteis de plantas e estruturas do algodoeiro

Plantas e estruturas reprodutivas do algodoeiro que apresentaram diferenças significativas no bioensaio de comportamento foram aeradas por meio do sistema push-pull (THOLL et al., 2006) (Figura 6A-B). Foram usados sacos de tamanhos adequados para cada estrutura vegetal confeccionados de PET (item 3.3), que é livre de quantidades detectáveis de compostos voláteis (KIGATHI et al., 2009). Previamente a sua utilização, o material plástico foi limpo seguindo-se uma metodologia adaptada de Stewart-Jones e Poppy (2006). Antes de selar, o interior dos sacos PET foram limpos com hexano, levados a estufa a 160 °C por 2 h, e logo após, preenchidos com ar limpo 3 vezes para remover qualquer resíduo de contaminante. Um fluxo de ar de 0,3 $L \cdot min^{-1}$ para plantas em fase vegetativa e em floração, e 0,1 $L \cdot min^{-1}$ para flores, foi empurrado para o interior do saco plástico por meio do sistema de controle de ar (ARS). O ar do interior foi puxado com uma bomba de vácuo a uma

taxa de 0,1 L·min^{-1} e 0,05 L·min^{-1} para plantas em fase vegetativa e em floração e flores do algodoeiro, respectivamente. Seis plantas e/ou flores foram aeradas por 8 h, entre as 09h00 e 17h00, considerando o período de maior atividade de *A. grandis* (BRAGA-SOBRINHO; LUKEFAHR, 1983; AQUINO et al., 1986).

Os voláteis foram coletados em um filtro com 30 mg de polímero absorvente HayeSep® (80-100 mesh) (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Os filtros foram eluídos com 200 µL de hexano e imediatamente armazenado a -30 °C até seu uso.

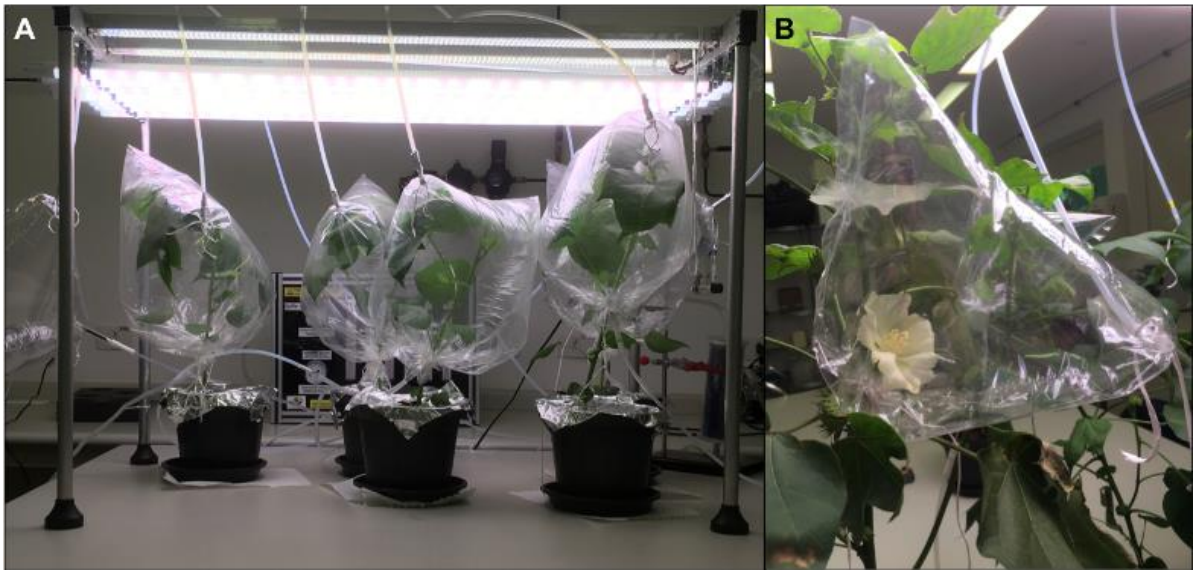

Figura 6 - Plantas de algodoeiro ensacadas e sendo aeradas. A) plantas em fase vegetativa; B) flor.

3.5 Identificação dos compostos voláteis

Para cada amostra dos extratos obtidos na aeração foram adicionados 2 µL de nonil acetato (como solução de Padrão Interno a 10 ng.µL^{-1}) e concentrada a 40 µL usando um fluxo leve de nitrogênio. Uma alíquota de 2 µL de cada amostra foi analisada no modo “splitless” em cromatógrafo a gás acoplado a um detector por ionização de chama (GC-FID) Shimadzu GC-2010 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan), contendo uma coluna capilar Rtx-1 (Restek, Bellefonte, PA, EUA; 30 m x 0,25 mm D.I. x 0,25 µm), usando hélio como gás de arraste (Figura 7A). A temperatura inicial do programa foi de 40 °C mantido por 5 min, com aumento de 7 °C·min^{-1} até 250 °C mantido por 10 min. Os perfis cromatográficos obtidos foram avaliados e comparados entre si para a detecção das possíveis diferenças qualitativas e quantitativas entre os

compostos. Os voláteis detectados foram quantificados comparando a área dos picos com o Padrão Interno (D'ALESSANDRO; TURLINGS, 2005).

Para identificação dos compostos, uma alíquota de 2 µL de cada amostra foi injetada no modo "splitless" em um cromatógrafo a gás (Shimadzu GC-2010 Plus) acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS-QP2010 Ultra, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) equipado com uma coluna Rtx-1MS (Restek, Bellefonte, PA, EUA; 30 m x 0,25 mm D.I. x 0,25 µm) usando hélio como gás de arraste (Figura 7B). O programa de temperatura utilizado foi o mesmo descrito no parágrafo anterior.

Figura 7 - Equipamentos utilizados para análises químicas dos voláteis de plantas e estruturas reprodutivas do algodoeiro. A) Cromatógrafo a gás acoplado a um detector por ionização de chama (GC-FID); B) Cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS).

Os compostos foram identificados comparando-se os espectros de cada pico com os da biblioteca da 'National Institute of Standards and Technology' (NIST) e mediante o cálculo do índice de retenção com programação linear de temperatura (Linear Temperature Programmed Retention Indexes, LTPRI) (Van den DOOL; KRATZ, 1963), por meio do tempo de retenção do composto de interesse e a sua relação com o tempo de retenção dos padrões de referência (*n*-alcanos C7-C30) quando submetidos as mesmas condições de análise. A equação de Van den Dool e Kratz é descrita a seguir:

$$IR = 100n + 100\,\frac{t_x - t_n}{t_{n+1} - t_n}$$

Onde:

IR = índice de retenção;

n = número do hidrocarboneto de referência

t_x = Tempo de retenção do composto de interesse;

t_n = Tempo de retenção do hidrocarboneto de referência eluido imediatamente antes do composto de interesse;

t_{n+1} = Tempo de retenção do hidrocarboneto de referência eluido imediatamente depois do composto de interesse

3.6 Respostas eletrofisiológicas de *A. grandis* aos voláteis do algodoeiro

Os registros eletroantenográficos (EAG) foram realizados com os instrumentos EAG Syntech (Ockenfels Syntech GmbH, GER), compostos por um controlador de aquisição de dados de interface (IDAC-2), um controlador de estímulo (CS-55) e uma sonda de terminação única universal. Uma antena excisada, cortada nos extremos (para garantir um bom contato) foi montada em um suporte do eletrodo com fio de tungstênio usando gel condutor de eletricidade (Spectra 360, Parker Lab. Inc., Orange, NJ, USA), sendo colocado o flagelo no eletrodo de referência e o escapo no eletrodo de gravação. O suporte de eletrodo, inserido na sonda foi acoplado a um Joystick Micromanipulador (MN-151, Narishige International, NY, USA (Figura 8A-C).

Como estímulos foram usados 5 µL dos extratos da planta de algodoeiro na fase vegetativa, flor, planta com flor, hexano (controle positivo), e ar limpo (controle negativo), coletados como descrito no item 3.4. Os estímulos foram aplicados em papel filtro (0,5 x 1,0 cm), permitindo a evaporação por 30 s antes de serem inseridos numa pipeta Pasteur descartável de 15 cm de comprimento. A ponta da pipeta foi introduzida no tubo de fluxo de ar principal, no qual uma corrente de ar umedecido (0,1 $L \cdot min^{-1}$) fluía continuamente em direção à antena. Os estímulos foram fornecidos à antena ao soprar (‘puff’) o ar umidificado durante 2 s da pipeta Pasteur a um fluxo de 0,5 $L \cdot min^{-1}$.

Para cada sexo foram testadas oito antenas, estimuladas por uma única fonte de odor, realizando seis ‘puffs’ a um intervalo de 30 s entre eles. As respostas do EAG foram normalizadas a 1 mV e medidas como a máxima amplitude de despolarização

provocadas pelo ‘puff’, usando o software GC-EAD32, versão 4.6 (Ockenfels Syntech GmbH, GER). Todos os testes de EAG foram realizados durante as 09h00 e 17h00, como descrito anteriormente.

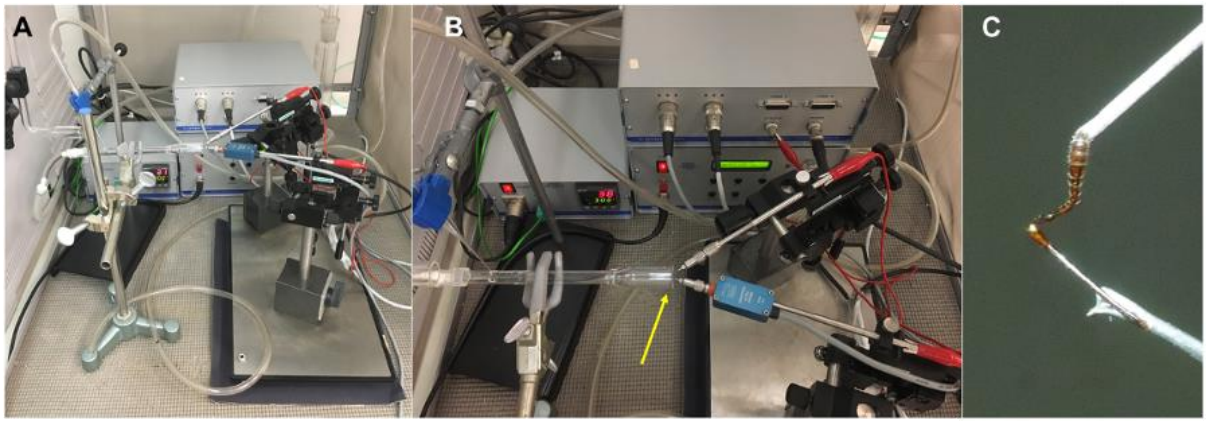

Figura 8 - Instrumentos utilizados para o registro de eletroantenografia em *Anthonomus grandis* (EAG) (A); Vista superior dos instrumentos, a seta vermelha indica a posição da antena (B); e ampliação da antena de *A. grandis* montado nos eletrodos (C).

3.7 Comportamento de fêmeas de *A. grandis* aos compostos sintéticos

As respostas comportamentais de fêmeas de *A. grandis* aos compostos voláteis sintéticos majoritários da planta em floração foram avaliadas utilizando-se um olfatômetro de vidro do tipo ‘Y’, como descrito no item 3.3. Os compostos sintéticos *β*-caryophyllene e *cis*-3-hexenyl-acetate foram testados individualmente, diluindo-se 1 µL em 1 mL de óleo vegetal. Foram aplicados 10 µL da diluição sobre papel filtro (5 cm x 0,5 cm) e colocado dentro de um dos braços do olfatômetro. A fêmeas virgens de 5±1 dia de idade foi oferecido escolher entre o tratamento e o controle (10 µL de óleo vegetal). Novos papeis filtro foram usados para cada inseto. Neste bioensaio foi usado o mesmo tempo de adaptação e avaliação dos insetos e as condições de temperatura, luminosidade e umidade descritas no item 3.3. Um fluxo constante de ar purificado fornecido pelo ARS foi calibrado a uma taxa de 0,8 $L \cdot min^{-1}$ para cada um dos braços do olfatômetro. Foram avaliadas pelo menos 45 respostas das fêmeas.

3.8 Análises estatísticas

Modelos Lineares Generalizados Mistos (MLGM) com uma distribuição binomial e link logístico foram usados para analisar os dados da primeira escolha de machos e fêmeas do bicudo nos bioensaios de olfatometria e o teste qui-quadrado χ^2 da razão de verossimilhança foi usado para determinar a significância ($P < 0,05$). As médias dos compostos voláteis e das respostas do EAG foram primeiramente analisadas com o teste de Shapiro-Wilks e Levene para testar a normalidade dos resíduos e homogeneidade de variâncias, respectivamente (SOKAL; ROHLF, 2012). As médias dos compostos voláteis foram transformadas usando logaritmo natural (x + 1). O efeito do tratamento na emissão de todos os voláteis foi analisado usando a análise multivariada de variância (MANOVA). Após observar o efeito significativo da MANOVA, uma análise de variância de uma via (ANOVA) foi usada para determinar o efeito dos tratamentos sobre cada composto. A comparação entre as médias dos tratamentos foi realizada pelo teste *post hoc* de Tukey ($P < 0,05$). Uma análise de componentes principais (ACP) com base na matriz de covariância, foi utilizado para a definição de componentes principais que mais contribui para a variabilidade dos dados. Todas as análises foram realizadas com o software R 3.3.2 (R CORE TEAM, 2016).

4 RESULTADOS

4.1 Comportamento de adultos de *A. grandis* aos voláteis do algodoeiro

Fêmeas de *A. grandis* foram atraídas pelos voláteis de plantas de algodoeiro em floração (fase reprodutiva) (Gl = 1; χ^2 = 5,82; P = 0,0158) e pelos voláteis das flores isoladamente (Gl = 1; χ^2 = 7,95; P = 0,0048) (Figura 9A). Entretanto, não foram atraídas pelos voláteis das plantas na fase vegetativa (Gl = 1; χ^2 = 0,64; P = 0,4235), plantas com botão floral (Gl = 1; χ^2 = 1,44; P = 0,2296), botão floral (Gl = 1; χ^2 = 0,64; P = 0,4235) e maçã isoladamente (Gl = 1; χ^2 = 2,57; P =0,1088) (Figura 9A).

Os machos, por sua vez, foram atraídos pelos voláteis das plantas de algodoeiro na fase vegetativa (Gl = 1; χ^2 = 4,03; P = 0,0447) e das flores isoladamente (Gl = 1; χ^2 = 4,03; P = 0,0448) (Figura 9B). Porém, não foram atraídos pelos odores das plantas com botão floral (Gl = 1; χ^2 = 0,64; P = 0,4235), botão floral (Gl = 1; χ^2 = 0; P = 1,000), maçã (Gl = 1; χ^2 = 1,44; P = 0,2296) e plantas em floração (fase reprodutiva) (Gl = 1; χ^2 = 0,16; P = 0,6891) (Figura 9B).

4.2 Respostas eletrofisiológicas de *A. grandis* aos voláteis do algodoeiro

Os extratos voláteis de plantas de algodoeiro, na fase vegetativa e de plantas em floração (fase reprodutiva), além das flores isoladamente, afetaram de modo diferente as respostas eletrofisiológicas das antenas de machos e fêmeas de *A. grandis*.

Nas fêmeas, a maior amplitude de resposta foi registrada com o extrato de flores (F = 33,98; Gl = 4, 35; P < 0,0001), seguido pelos voláteis de plantas em floração. Ambas, no entanto, diferiram da planta em fase vegetativa, hexano e controle (Figura 10). Nos machos, os extratos de plantas de algodoeiro na fase vegetativa, e de flores isoladamente, promoveram as maiores respostas eletrofisiológicaS das antenas (F = 9,93; Gl = 4, 35; P < 0,0001), superior às amplitudes observadas com os extratos de planta em floração (fase reprodutiva), hexano e controle (Figura 10).

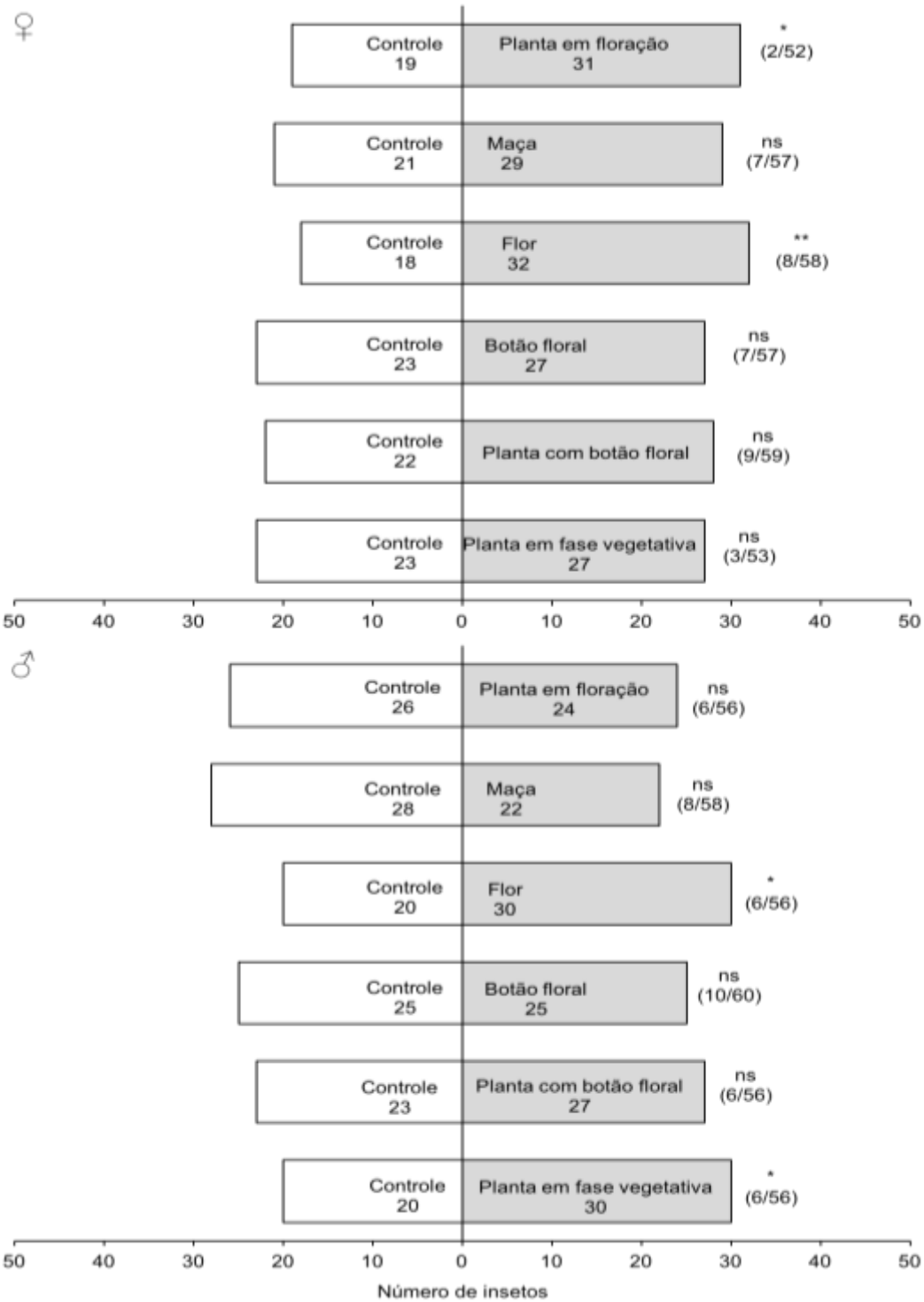

Figura 9 - Respostas de fêmeas e machos de *Anthonomus grandis* em olfatômetro 'Y' aos voláteis de plantas na fase vegetativa, plantas em floração, plantas com botão floral, flor, maçã, botão floral vs o controle (ar limpo). Asteriscos indicam diferenças significativas entre tratamentos de acordo com o teste χ^2 da razão de verossimilhança (*P < 0,05; ** P < 0,01; ns = não significativo). *Números dentro das barras indicam o valor absoluto de insetos e entre parênteses indicam insetos que não responderam a nenhum tratamento e número de insetos utilizados.*

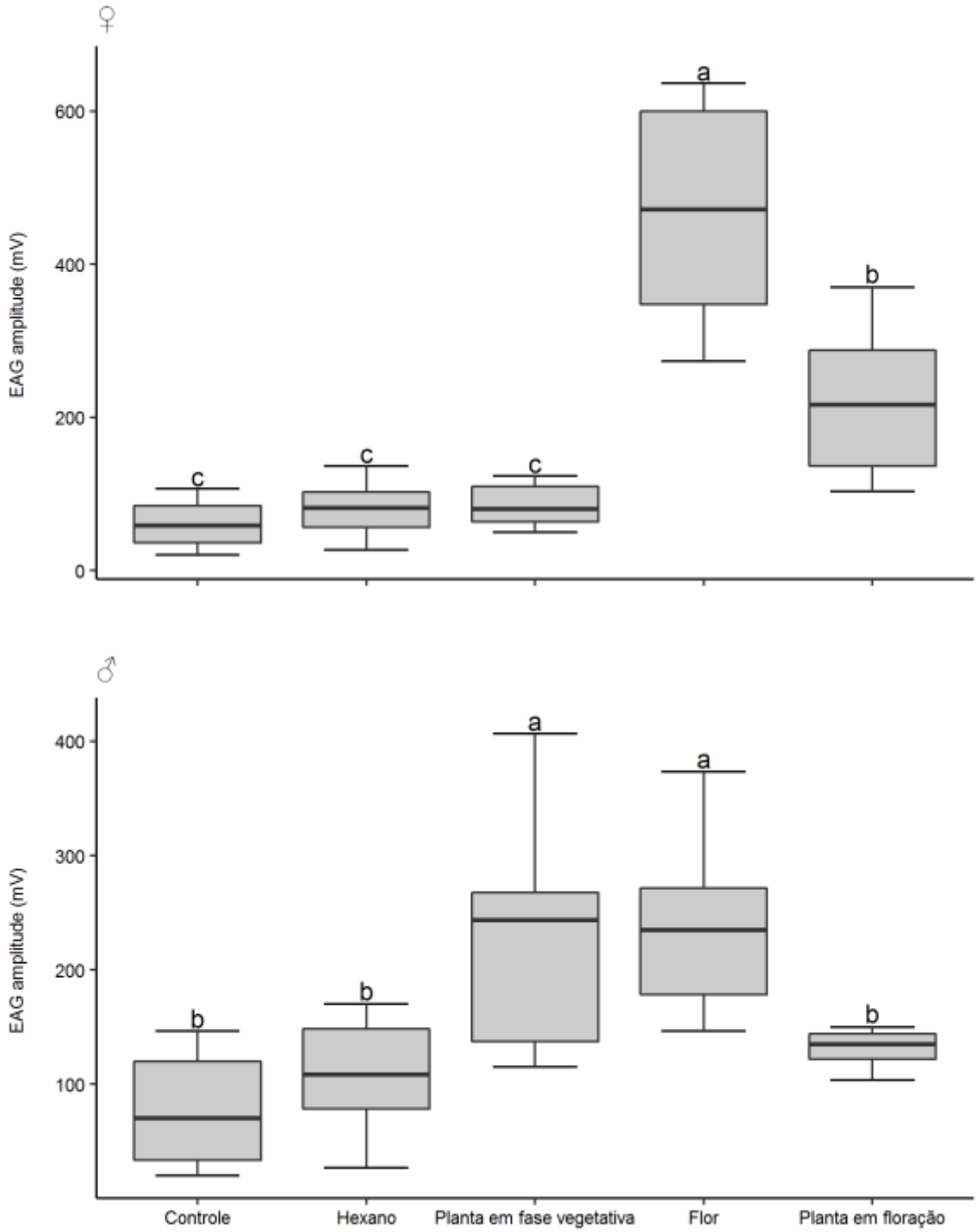

Figura 10 - Eletroantenograma (EAG) de antenas de fêmeas e machos de *Anthonomus grandis* aos voláteis de plantas de algodoeiro em fase vegetativa, plantas em floração e flor isoladamente. Tratamentos com letras igual não diferem significativamente (Tukey, $P < 0,05$).

4.3 Voláteis emitidos pelas plantas do algodoeiro

Dos compostos químicos voláteis observados em plantas de algodoeiro, 11 estavam presentes nas plantas em fase vegetativa e nas flores, e outros 13 nas plantas em floração (fase reprodutiva) (Tabela 1). Dos compostos analisados, cinco foram identificados mediante o padrão sintético e a biblioteca NIST. A análise multivariada de variância (MANOVA) mostrou efeito significativo dos tratamentos sobre a emissão de todos os voláteis (Wilks' λ = 0,00004; *Gl* = 2, 15; *F* = 34,75; *P* < 0,001).

Dentre os compostos identificados, houve efeito significativo entre os tratamentos na liberação dos compostos *β*-myrcene, *cis*-3-hexenyl-acetate, D-camphor e *β*-cariophyllene, e não para R-(+)-limonene (Figura 11). Plantas em floração e plantas em fase vegetativa produziram maiores quantidades de *β*-myrcene do que as flores (*Gl* = 2, 15; *F* = 27,02; *P* < 0,001). Plantas em floração também liberaram maiores quantidades de cis-3-hexenyl-acetate (*Gl* = 2, 15; *F* = 65,49; *P* < 0,0001) e *β*-cariophyllene (*Gl* = 2, 15; *F* = 16,59; *P* < 0,001), comparado com as plantas em fase vegetativa e flores. A produção do D-camphor não diferiu entre plantas em floração e plantas em fase vegetativa, mas ambas foram superiores as flores isoladamente (*Gl* = 2, 15; *F* = 11,79; *P* < 0,001). Para o composto R-(+)-limonene, não foi observada diferença entre os tratamentos (*Gl* = 2, 15; *F* = 2,56; *P* = 0,1105) (Figura 11).

Em relação aos demais compostos ainda não identificados (*unknown*), plantas em floração (fase reprodutiva) e plantas em fase vegetativa não diferiram na produção dos compostos '*unknown* 1' (*Gl* = 2, 15; *F* = 4,56; *P* = 0,0284), '*unknown* 3' (*Gl* = 2, 15; *F* = 4,77; *P* = 0,0249), '*unknown* 4' (*Gl* = 2, 15; *F* = 30,11; *P* < 0,0001), e '*unknown* 5' (*Gl* = 2, 15; *F* = 20,64; *P* < 0,0001). Plantas em fase vegetativa apresentaram quantidades superiores dos compostos '*unknown* 2' (*Gl* = 2, 15; *F* = 13,48; *P* < 0,001) e '*unknown* 8' (*Gl* = 2, 15; *F* = 16,30; *P* < 0,001), comparativamente as plantas em floração (fase reprodutiva) e flores isoladamente. Por sua vez, plantas em floração apresentaram quantidades maiores dos compostos '*unknown* 6' (*Gl* = 2, 15; *F* = 15,47; *P* < 0,001) e '*unknown* 7' (*Gl* = 2, 15; *F* = 23,70; *P* < 0,0001) em relação aos demais tratamentos (Figura 11).

A análise total de compostos voláteis revelou diferenças entre os tratamentos. Plantas em floração e plantas em fase vegetativa produziram quantidades de maiores que as flores (*Gl* = 2, 15; *F* = 23,37; *P* < 0,0001) (Figura 12).

A análise de componentes principais mostrou que os dois primeiros componentes, PC1 e PC2 representaram 69,4% do total da variância (39,1 e 30,4%, respectivamente) (Figura 13). Todas as variáveis (x) foram positivamente correlacionados com o PC1. Já com o PC2 as variáveis x1, x2, x6, x8, x10 e x12 foram correlacionados positivamente, e as demais negativamente. As variáveis x2 e x12 presentes em maiores quantidades na planta na fase vegetativa contribuíram na separação do tratamento.

Tabela 1 - Tempo e índice de retenção dos compostos voláteis de plantas do algodoeiro, na fase vegetativa (PV), flores (FL) e planta em floração (fase reprodutiva) (PR), e seus respectivos nomes de acordo com a biblioteca NIST 2011.

Composto	Presença			Tempo de retenção (min)	*IR**	Nome do composto
1	PV	-	PR	6,795	823	*unknown* 1
2	PV	FL	PR	7,085	832	*unknown* 2
3	PV	FL	PR	11,605	984	*β*-myrcene
4	-	FL	PR	11,750	989	*cis*-3-hexenyl acetate
5	PV	FL	PR	12,350	1011	*unknown* 3
6	PV	FL	PR	12,405	1014	*unknown* 4
7	PV	FL	PR	12,520	1018	R-(+)-limonene
8	PV	FL	PR	13,585	1061	*unknown* 5
9	PV	FL	PR	14,645	1104	*unknown* 6
10	PV	FL	PR	14,895	1116	D-camphor
11	-	-	PR	15,115	1125	*unknown* 7
12	PV	FL	PR	16,345	1181	*unknown* 8
13	PV	FL	PR	20,910	1409	*β*-caryophyllene

**IR* = Índice de retenção

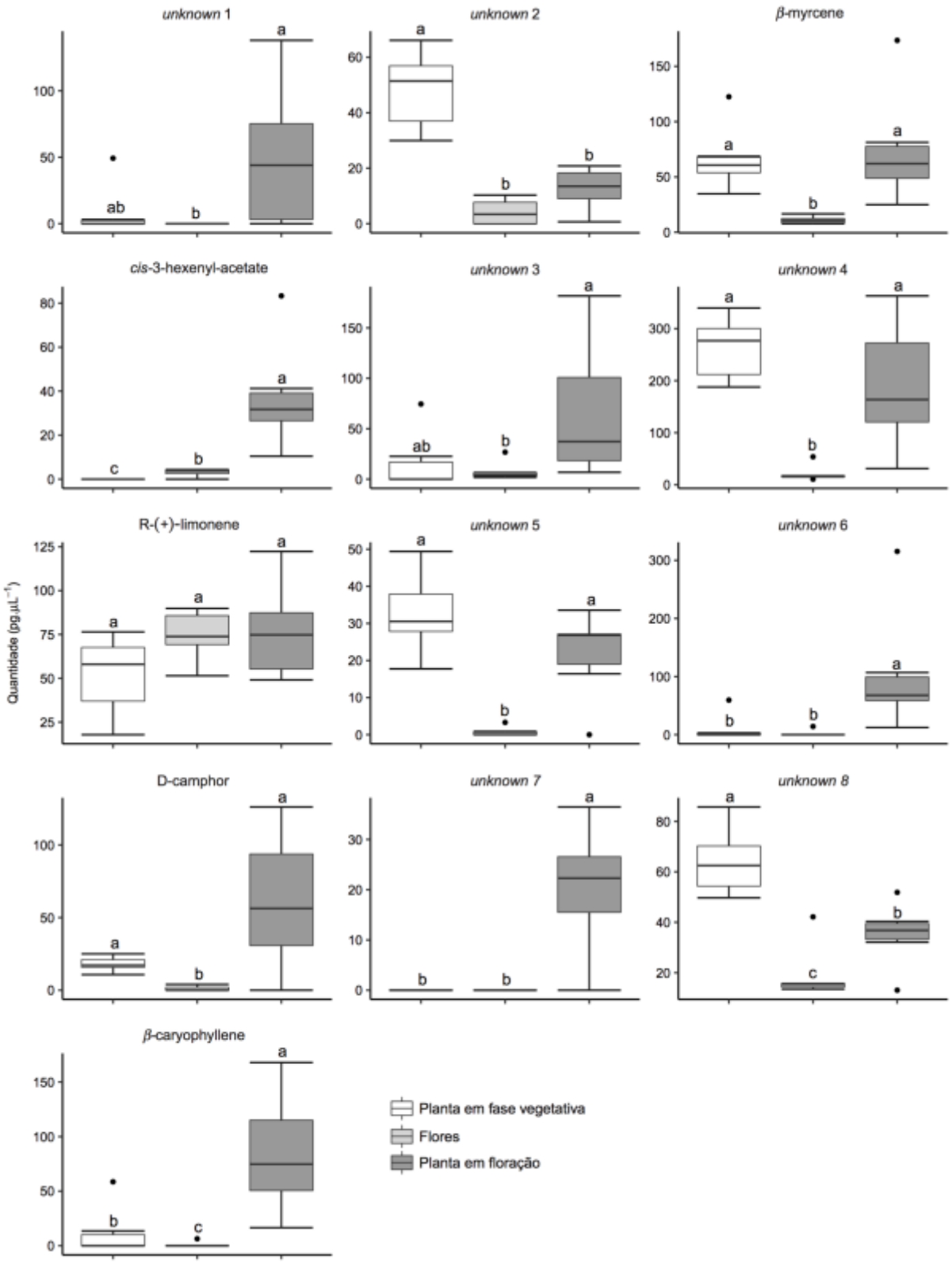

Figura 11 - Compostos voláteis liberados por plantas de algodoeiro, na fase vegetativa, flores e plantas em floração (fase reprodutiva).

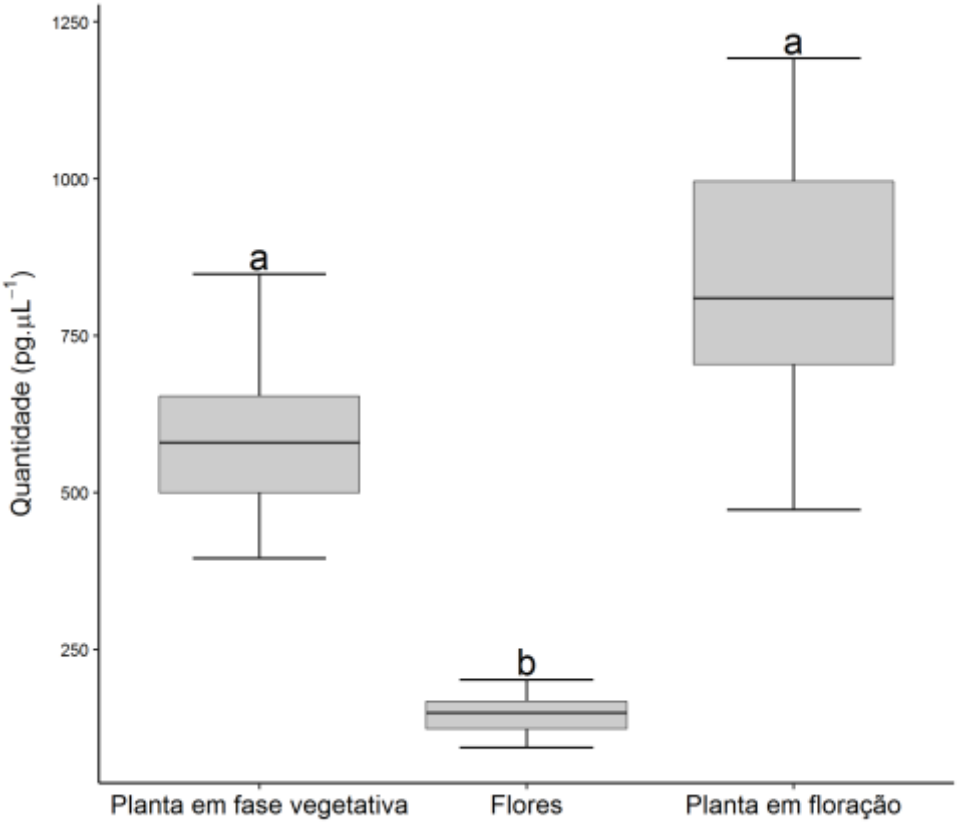

Figura 12 - Total de compostos voláteis liberados por planta de algodoeiro, na fase vegetativa, flores e em plantas em floração (fase reprodutiva).

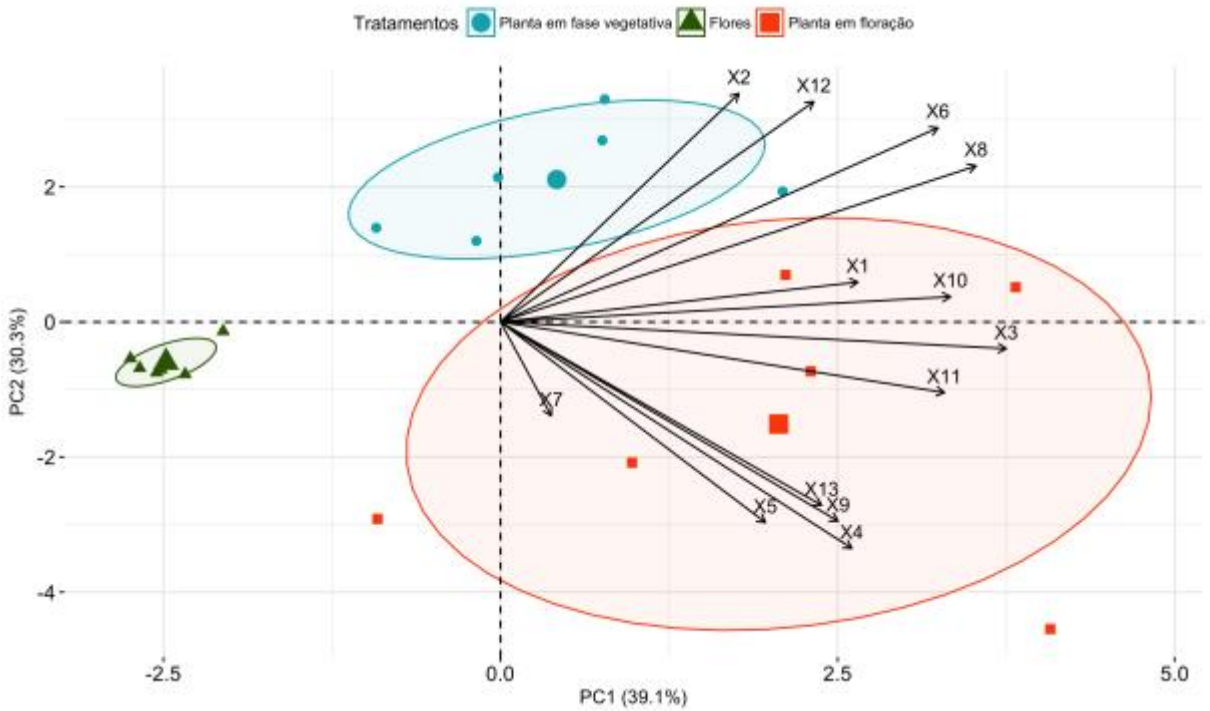

Figura 13 - Análise de componentes principais (ACP) (P < 0,05) dos compostos voláteis liberados por plantas de algodoeiro, na fase vegetativa, flores e em plantas em floração (fase reprodutiva). (x1) '*unknown* 1', (x2) '*unknown* 2', (x3) *β*-myercene, (x4) *cis*-3-hexenyl-acetate, (x5) '*unknown* 3', (x6) '*unknown* 4', (x5) R-(+)-limonene, (x8) '*unknown* 5', (x9) '*unknown* 6', (x10) D-camphor, (x11) '*unknown* 7', (x12) '*unknown* 8', (x13) *β*-caryophyllene.

4.4 Comportamento de fêmeas de *A. grandis* aos compostos sintéticos

Fêmeas de *A. grandis* não foram atraídas pelos compostos voláteis sintéticos *cis*-3-hexenyl-acetate (Gl = 1; χ^2 = 1,11; P = 0,2913,) e *β*-caryophyllene (Gl = 1; χ^2 = 0,40; P = 0,5269) quando utilizados isoladamente e contrastados com o controle (ar limpo) (Figura 14).

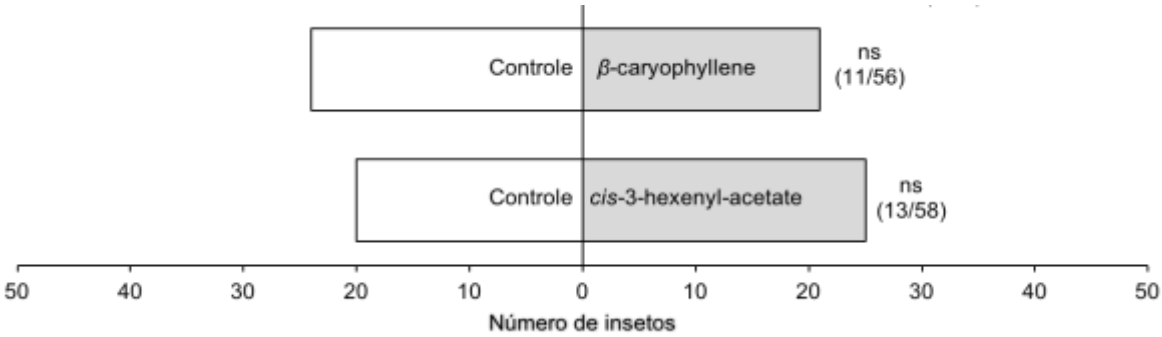

Figura 14 - Respostas de fêmeas de *Anthonomus grandis* em olfatômetro 'Y', aos compostos voláteis sintéticos β–caryophyllene e *cis*-3-hexenyl-acetate vs o controle (ar limpo). ns = não significativo de acordo com o teste χ^2 da razão de verossimilhança (P < 0,05). *Números entre parênteses indicam insetos que não responderam a nenhum tratamento, e número de insetos utilizados.*

5. DISCUSSÃO

Este trabalho demonstrou que machos e fêmeas de *A. grandis*, foram atraídos por voláteis de plantas de algodoeiro na fase vegetativa, e por plantas em floração, respectivamente. Além disso, ambos os sexos também responderam positivamente aos voláteis das flores.

A preferência dos machos por voláteis de plantas de algodoeiro ainda na fase vegetativa (Figura 9) parece ter uma implicação biológica de suma importância na vida deste inseto. Isto porque, os machos estão entre os primeiros a emergir (DICKENS, 1986), e sendo assim, colonizam as novas plantas hospedeiras, e poderão se alimentar, produzir o feromônio de agregação, e atrair as fêmeas para o acasalamento (CROSS; MITCHELL, 1966; HARDEE; CROSS; MITCHELL, 1969; TUMLINSON et al., 1969; WHITE; RUMMEL, 1978).

As fêmeas não foram atraídas pelos voláteis de plantas em fase vegetativa, e sim por plantas em floração (fase reprodutiva) (Figura 9). Do ponto de vista biológico é nesta fase da cultura, que as fêmeas possuem uma maior garantia para realizar a oviposição e assegurar a sobrevivência de seus descendentes.

Magalhães et al. (2012) demonstraram a preferência tanto de machos quanto de fêmeas de *A. grandis*, pelos extratos voláteis de plantas de algodoeiro na fase vegetativa danificada pelos co-específicos. Esta preferência pode ter sido influenciada, principalmente, pela liberação de voláteis induzidos pela herbivoria, o que não foi investigado neste trabalho. Por outro lado, Silva et al. (2015) mencionaram que machos e fêmeas não responderam aos extratos voláteis de plantas de algodoeiro em fase vegetativa e reprodutiva. A ausência de resposta neste caso, pode ser devido ao uso exclusivo de extratos das plantas nos bioensaios, e não das plantas como fonte de odor, considerando que no processo de extração e concentração das amostras podem ser perdidos alguns compostos voláteis minoritários que podem ser importantes pistas químicas para a localização hospedeira (BRUCE; WADHAMS; WOODCOCK, 2005; CLAVIJO MCCORMICK; GERSHENZON; UNSICKER, 2014).

A não-preferência pelos voláteis da planta de algodoeiro com botão floral, botão floral e maçã tanto por machos quanto fêmeas (Figura 9) observado neste trabalho, não condiz com os outros trabalhos da literatura que relatam a atração de *A. grandis* pelos voláteis destas estruturas reprodutivas como sinais para a localização hospedeira, alimentação e reprodução (KELLER et al., 1963; NEFF; VANDERZANT,

1963; MITCHELL; TAFT, 1966; THOMPSON et al., 1970; MCKIBBEN et al., 1977; SHOWLER, 2004; SILVA et al., 2015). Essa diferença poderia ser devido, principalmente, aos métodos empregados, já que os autores citados realizaram seus experimentos em campo e em laboratório, utilizando insetos com experiência prévia em relação as plantas ou estruturas testadas, o que não ocorreu em nosso trabalho, já que os insetos foram criados em dieta artificial, e não tiveram contato com o algodoeiro. Neste sentido, o condicionamento pre-imaginal dos insetos já demonstrou afetar a seleção do hospedeiro, como por exemplo em *Dendroctonus monticolae* (Coleoptera: Scolytidae) Hopk. (HOPKINS, 1916), *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae) (PRAGER; ESQUIVEL; TRUMBLE, 2014), *Busseola nairobica* Le Ru (Lepidoptera: Noctuidae), *Busseola fusca* (Fuller 1901) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Sesamia nonagrioides* Lefebvre (Lepidoptera: Noctuidae) (PETIT et al., 2015).

Adultos do bicudo-do-algodoeiro provenientes do campo e de colônia estabelecida em laboratório apresentaram o mesmo padrão de resposta na primeira escolha quando contrastados os odores de extratos de plantas de algodão sem injúria no estágio vegetativo versus hexano (MAGALHÃES 2012). Porém, nesse caso, esses autores não utilizaram as plantas ou as estruturas das plantas, e sim extratos obtidos destas plantas ou suas estruturas. Do mesmo modo, em experimentos de olfatometria usando grupos de 20 machos de *A. grandis,* Chang et al. (1986) observaram alta percentagem de bicudos respondendo aos extratos de voláteis dos botões florais.

Em nosso trabalho, foram usadas plantas intactas sem danos, e as estruturas reprodutivas foram cuidadosamente isoladas e ensacadas ainda na planta para evitar danos físicos que poderiam induzi-las. Showler (2004), utilizou botões florais e maçãs excisadas nos experimentos, e o simples fato de destacar estas estruturas pode ter alterado a quantidade e proporção dos compostos voláteis liberados (ROSE et al., 1996; DE MORAES et al., 1998).

A não preferência de *A. grandis* pelos voláteis dos botões florais e maçãs em nosso estudo, sugere que estas estruturas poderiam liberar poucas quantidades de voláteis e/ou os voláteis liberados não constituiriam pistas químicas importantes para os insetos. Os compostos voláteis liberados por estas estruturas reprodutivas não foram coletados por não terem atraído os insetos quando comparados ao controle. De modo semelhante, como já relatado por Röse e Tumlinson (2004), os voláteis dos

botões florais do algodoeiro sadios e induzidos pela herbivoria de *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae) não são liberados em quantidades significativas.

A ausência de resposta de machos e fêmeas de *A. grandis* pelos voláteis do botão floral e da maçã poderiam ser explicados pela 'Teoria da Otimização de Defesas', segundo a qual as partes reprodutivas das plantas são altamente defendidas pela liberação de compostos contra herbivoria, considerando que estas partes contribuem grandemente no desempenho reprodutivo da planta (MCKEY, 1974). Essa teoria foi demonstrada por Sharma e Agarwal (1982), que observaram que os extratos de botões florais e maçãs do algodoeiro contêm altas concentrações de taninos, gossipol e antocianinas que afetaram o desenvolvimento e sobrevivência de *Earias vittella* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). A diminuição na oviposição de fêmeas de *A. grandis* foi observado em algumas linhagens de *G. hirsutum* com baixos níveis de açúcares e de gossipol nas anteras (HEDIN; MCCARTY, 1995). No entanto, com os cultivares modernos de *G. hirsutum* essa teoria não tem se adequado para *A. grandis*, já que a alimentação, oviposição e o desenvolvimento larval não parece serem afetados por alguns compostos que possam estar presentes nestas estruturas.

Por outro lado, o hábitat natural de insetos herbívoros representa um mosaico altamente diverso de plantas onde eles devem reconhecer os sinais emitidos pelos seus potenciais hospedeiros e, para encontrar e identificar as plantas hospedeiras, os insetos podem usar vários sistemas sensoriais (HEISSWOLF et al., 2007). No caso de *A. grandis*, o inseto pode reconhecer os voláteis da planta a longas distancias (MISTRIC; MITCHELL, 1966) e, uma vez localizado o hospedeiro, as estruturas reprodutivas do algodoeiro das quais o inseto se alimenta e oviposita podem ser reconhecidas por meio de quimiorrecepção de contato, o que fornece informações mais precisas e confiáveis sobre a adequação do hospedeiro (HARRISON, 1987). Sobre a superfície da planta uma mistura de compostos voláteis, tricomas ou ceras cuticulares podem dar informação sobre a aceitação do hospedeiro e estimular a sua alimentação (VAN LOON et al., 2002; MÜLLER; RIEDERER, 2005; HEISSWOLF et al., 2007).

Os resultados deste trabalho sugerem que a resposta de machos e fêmeas de *A. grandis* aos voláteis do algodoeiro podem ocorrer a longas distâncias, e que aparentemente, existe uma sequência temporal de atração de acordo com o sexo e o estado fenológico da planta.

Diversos estudos demonstram que a composição e emissão de compostos orgânicos voláteis (COVs) é um processo regulado pelo desenvolvimento vegetativo da planta (ZHANG et al., 2008; BRACHO-NUNEZ et al., 2011) e a ontogenia foliar influencia a taxa de emissão e a importância relativa de diferentes COVs (BRACHO-NUNEZ et al., 2011).

Tanto machos quanto fêmeas de *A. grandis* responderam significativamente aos voláteis das flores, e somente as fêmeas aos voláteis das plantas em floração nos bioensaios de olfatometria (Figura 9). Os adultos do bicudo além de se alimentarem dos botões florais, podem também consumir grãos de pólen e pétalas, e realizar posturas nas anteras. Para as fêmeas, os voláteis das flores poderiam indicar um hospedeiro apropriado para alimentação e oviposição, e essa preferência poderia estar intimamente associada às caraterísticas inatas dos insetos em escolher um hospedeiro adequado para garantir a sobrevivência da sua progênie. Fenologicamente, a flor dará origem a um fruto, aumentando assim as chances de a fêmea encontrar locais para se alimentar e ovipositar numa mesma planta, reduzindo o custo energético em buscas por estes locais em hospedeiros diferentes. Para os machos, os voláteis das plantas em floração poderiam indicar que esse hospedeiro já se encontra colonizado por outros machos, e possivelmente fêmeas acasaladas que se encontrariam em oviposição. Este comportamento sugere também a preferência dos machos pelos voláteis da planta em fase vegetativa observado neste experimento.

Flores frequentemente possuem sinais visuais e olfativos que as tornam altamente evidente para os polinizadores, mas isto pode também incrementar sua presença para os herbívoros (RÖSE; TUMLINSON, 2004). A exploração de compostos voláteis de flores já tem sido constatado para insetos fitófagos generalistas (PAN et al., 2015) e especialistas (RIFFELL et al., 2008). Por exemplo, em *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae) foi observado que tanto machos quanto fêmeas preferem os voláteis da planta em floração danificadas pela herbivoria da fêmea (ADDESSO; MCAUSLANE; ALBORN, 2011). Extratos voláteis de flores de girassol são muito mais atrativos do que os voláteis da flor da planta hospedeira de *Lygus rugulipennis* Poppius (Heteroptera: Miridae) (ONDIAKA et al., 2016). A preferência de insetos pelas flores pode estar associada à presença do néctar, fonte rica em açúcares, o qual provê benefícios diretos para insetos adultos e poderia influenciar a escolha por oviposição (KNOLHOFF; HECKEL, 2014). Mudanças na resposta olfativa do alimento para locais de oviposição foram observadas em

fêmeas de *Spodoptera litoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) que antes do acasalamento foram atraídas pelos voláteis das flores de *Syringa vulgaris,* da qual se alimentam; e logo após o a acasalamento foram fortemente atraídas pelos voláteis de folhas verdes de plantas do algodoeiro onde ovipositam (SAVEER et al., 2012). Do ponto de vista evolutivo, o uso de voláteis de plantas que ocorrem frequentemente para reconhecer um grande número de espécies de plantas, pode também facilitar o comportamento de aprendizagem e preferência pelo hospedeiro que é mais abundante no ambiente (PAN et al., 2015).

Neste estudo os extratos voláteis da planta de algodoeiro na fase vegetativa e em floração (fase reprodutiva) estimularam respostas das antenas de machos e fêmeas (Figura 10), respectivamente. Do mesmo modo, para ambos os sexos houve resposta das antenas para os voláteis das flores (Figura 10). O padrão de respostas das antenas corrobora os resultados obtidos no bioensaios de olfatometria para ambos os sexos.

Neste trabalho foram observados 13 compostos voláteis coletados durante oito horas, dos quais cinco foram identificados (Tabela 1). Os compostos *β*-caryophyllene e *cis*-3-hexenyl-acetate estão presentes em maiores quantidades nas plantas em floração, *β*-myrcene e D-camphor em plantas em fase vegetativa e plantas em floração, e o R-(+)-limonene além de estar presente nas duas fases fenológicas das plantas também foi observado nas flores (Figura 11). O *cis*-3-hexenyl-acetate não foi constatado em plantas na fase vegetativa, e nas flores foi observado em pequenas quantidades o que permite especular que seria um composto importante para as plantas em floração. Estes compostos, exceto D-camphor já foram relados em plantas de algodoeiro sadias e induzidas pela herbivoria (RODRIGUEZ-SAONA; CRAFTS-BRANDNER; CAÑAS, 2003; RÖSE; TUMLINSON, 2004; MAGALHÃES et al., 2012; SILVA et al., 2015).

Como era esperado, plantas em fase vegetativa e em floração liberaram maiores quantidades de voláteis do que as flores (Figura 12), sendo evidente esta diferença devido à maior área foliar das plantas. Hedin (1976) coletou diariamente durante oito horas voláteis de algodoeiro cultivados em campo e observou um aumento gradativo na produção de voláteis com o desenvolvimento fenológico da planta, obtendo o máximo de compostos quando as plantas atingiram a maior quantidades de botões florais.

A análise de componentes principais (ACP) evidenciou a separação dos tratamentos (Figura 13), que foi influenciada principalmente pelas quantidades dos compostos voláteis, tanto que as flores ficaram isoladas dos demais tratamentos, devido à baixa quantidade de voláteis produzidos. Os compostos *β*-caryophyllene e *cis*-3-hexenyl-acetate estiveram presentes em maiores quantidades nas plantas em floração do que na fase vegetativa, o que contribuiu para a separação deste tratamento dos demais.

Os compostos sintéticos *β*-caryophyllene e *cis*-3-hexenyl-acetate na diluição de 10 µL (1µL.1mL^{-1}) não foram atrativos para as fêmeas de *A. grandis* (Figura 14). Isto pode ser devido à baixa concentração usada, uma vez que neste trabalho somente foram testadas nessa concentração. Era esperado que as fêmeas respondessem para o cis-3-hexenyl-acetate por ser um composto presente nas flores. Entretanto, apesar de estar presente em maiores quantidades na planta em floração, não significa que sejam as pistas químicas mais importantes, já que a mistura de todos compostos voláteis ou até os minoritários podem ser necessários para a localização do hospedeiro. Dada a sensibilidade sofisticada dos sistemas olfativos dos insetos para certas substâncias, não seria surpreendente que eles possam responder positivamente a compostos voláteis minoritários (CLAVIJO MCCORMICK; GERSHENZON; UNSICKER, 2014).

Avaliando o efeito dos voláteis presentes nos locais de hibernação na atratividade do bicudo-do-algodoeiro, Hedin, McKibben e Dollar (2000) observaram que a mistura do feromônio Grandlure mais o composto *β*-caryophyllene captura o maior número de insetos, e atribuíram essa alta captura a uma alta resposta inicial dos machos ao *β*-caryophyllene, composto anteriormente identificado nas fezes das fêmeas por Hedin et al. (1979). Em nosso estudo os machos não responderam ao *β*-caryophyllene e *cis*-3-hexenyl-acetate razão pela qual não foram analisados e consequentemente não apresentados. De qualquer modo, a falta de resposta dos machos a estes compostos sintéticos majoritários presentes nas plantas em floração confirma em parte, os resultados obtidos no bioensaios de olfatometria e eletroantenografia.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Machos de *A. grandis* responderam positivamente aos compostos orgânicos voláteis das plantas de algodoeiro em fase vegetativa e flores, seguindo o padrão de forrageamento já descrito na literatura. Por sua vez, as fêmeas foram atraídas pelos voláteis das flores e das plantas em floração (fase reprodutiva). Estas respostas indicam que estes insetos podem encontrar seus hospedeiros a longas distâncias, que existe uma sequência temporal de atração de acordo com o sexo, e que os voláteis correspondentes ao estado fenológico da planta contribuem de modo significativo nesta resposta.

Neste sentido, houve diferença no perfil de voláteis entre as plantas de algodoeiro nas diferentes fases de desenvolvimento e nas flores. No total foram observados 13 compostos na planta em floração, e 11 na planta em fase vegetativa e também nas flores.

A busca por uma melhor compreensão dos compostos envolvidos na atração de ambos os sexos de *A. grandis* poderá representar um avanço para novas alternativas de monitoramento e controle deste inseto no campo. Assim, será possível, por exemplo, detectar a chegada dos primeiros machos na área, ainda na fase vegetativa da cultura, ou mesmo a remoção de fêmeas durante a fase reprodutiva evitando maiores perdas para o algodoeiro.

A indicação de que os voláteis presentes nas flores do algodoeiro exercem atração aos machos e fêmeas de *A. grandis* representa um novo conhecimento ainda inexplorado na literatura para este inseto, e isso também poderá estimular uma nova linha de investigação para o entendimento da bioecologia e manejo desta praga.

REFERÊNCIAS

ADDESSO, K. M.; MCAUSLANE, H. J. Pepper weevil attraction to volatiles from host and nonhost plants. **Environmental Entomology**, v. 38, n. 1, p. 216–224, 2009.

ADDESSO, K. M.; MCAUSLANE, H. J.; ALBORN, H. T. Attraction of pepper weevil to volatiles from damaged pepper plants. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 138, n. 1, p. 1–11, 2011.

AGELOPOULOS, N.; BIRKETT, M. A.; HICK, A. J.; HOOPER, A. M.; PICKETT, J. A.; POW, E. M.; SMART, L. E.; SMILEY, D. W. M.; WADHAMS, L. J.; WOODCOCK, C. M. Exploiting semiochemicals in insect control. **Pesticide Science**, v. 55, n. 3, p. 225–235, 1999.

ALLEN, C. T. Boll weevil eradication: An areawide pest management effort. In: KOUL, O.; CUPERUS, G.; ELLIOTT, N. (Ed.). **Areawide pest management: Theory and implementation**. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2008. p. 467–559.

ALMEIDA, R. P.; SILVA, C. A. D.; RAMALHO, F. S. Manejo integrado de pragas do algodoeiro no Brasil. In: BELTRÃO, N. E. M.; AZEVEDO, D. M. O. (Ed.). **O agronegócio do algodão no Brasil**. Brasília: Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p. 1035–1098.

ALONSO-ZARAZAGA, M.; LYAL, C. **A world catalogue of families and genera of Curculionoidea (Insecta: Coleoptera) (Excepting Scolytidae and Platypodidae)**. Barcelona, España: Entomopraxis SCP, 1999.

AQUINO, I. S.; RAMALHO, F. S.; NETO, J. M.; JESUS, F. M. M. Período de captura do bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis* Boheman por armadilhas de feromônio. **Ciência e Cultura**, v. 38, n. 6, p. 1038–1040, 1986.

ARAB, A.; BENTO, J. M. S. Plant volatiles: new perspectives for research in Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 2, p. 151–158, 2006.

AZAMBUJA, R.; DEGRANDE, P. E. Trinta anos do bicudo-do-algodoeiro no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 4, p. 377–410, 2014.

BARTELT, R. J. Weevils. In: HARDIE, J.; MINKS, A. K. (Ed.). **Pheromones of non-lepidopteran insects associated with agricultural plants**. Wallingford, UK: CABI Publishing, 1999. p. 91–112.

BENTO, J. M. S.; ARAB, A.; ZACARIN, G. G.; SIGNORETTI, A. G. C.; DA SILVA, J. W. P.; SILVA, J. W. P. da. Attraction of *Bucephalogonia xanthophis* (Hemiptera: Cicadellidae) to volatiles of its natural host *Vernonia condensata* (Asteraceae). **Scientia Agricola**, v. 65, p. 634–638, 2008.

BENTO, J. M. S.; NARDI, C. Bioecologia e nutrição vs. ecologia química: as interações muiltitróficas mediadas por sinais quimicos. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Ed.). **Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas**. Brasília, DF: Embrapa Infromação Tecnológica, 2009. p. 277–296.

BERNAYS, E. A.; CHAPMAN, R. F. **Host-plant selection by phytophagous insects**. New York, NY: Chapman & Hall, 1994.

BEYAERT, I.; HILKER, M. Plant odour plumes as mediators of plant-insect interactions. **Biological Reviews**, v. 89, n. 1, p. 68–81, 2014.

BICHÃO, H.; BORG-KARLSON, A.-K.; ARAÚJO, J.; MUSTAPARTA, H. Five types of olfactory receptor neurons in the strawberry blossom weevil *Anthonomus rubi*: selective responses to inducible host-plant volatiles. **Chemical senses**, v. 30, n. 2, p. 153–70, 2005.

BORGES, M.; ALDRICH, J. R. Feromônio de Heteroptera: oportunidades para o manejo de insetos benéficos. In: VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas**. 2. ed. Ribeirão Preto, SP: Holos Editora, 2001. p. 93–98.

BRACHO-NUNEZ, A.; WELTER, S.; STAUDT, M.; KESSELMEIER, J. Plant-specific volatile organic compound emission rates from young and mature leaves of Mediterranean vegetation. **Journal of Geophysical Research Atmospheres**, v. 116, n. 16, p. 1–13, 2011.

BRAGA-SOBRINHO, R.; LUKEFAHR, M. J. **Bicudo (*Anthonomus grandis* Boheman): nova ameaça à cotonicultura brasileira; biologia e controle**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, Documentos. 22, 1983.

BRUCE, T. J. A.; PICKETT, J. A. Perception of plant volatile blends by herbivorous insects – Finding the right mix. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1605–1611, 2011.

BRUCE, T. J. A.; WADHAMS, L. J.; WOODCOCK, C. M. Insect host location: a volatile situation. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 6, p. 269–274, 2005.

BRUCE, T. J.; CORK, A. Electrophysiological and behavioral responses of female *Helicoverpa armigera* to compounds identified in flowers of african marigold, *Tagetes erecta*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 27, n. 6, p. 1119–1131, 2001a.

BRUCE, T. J.; CORK, A. Electrophysiological and behavioral responses of female *Helicoverpa armigera* to compounds identified in flowers of african marigold, *Tagetes erecta*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 27, n. 6, p. 1119–1131, 2001b.

BRUGNERA, P. Eterno desafio. **Cultivar Grandes Culturas**, v. 124, p. 28–29, 2009.

CHANDLER, L. D.; WRIGHT, J. E. Longevity of the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) on cotton and alternate feeding sources under various temperature regimes in the laboratory. **Journal of Economic Entomology**, v. 84, n. 6, p. 1699–1704, 1991.

CHANG, J. F.; BENEDICT, J. H.; PAYNE, T. L.; CAMP, B. J. Methods for collection and identification of volatile terpenes from cotton and evaluation of their attractiveness to boll-weevils (Coleoptera, Curculionidae). **Southwestern Entomologist**, v. 11, n. 4, p. 233–241, 1986.

CLAVIJO MCCORMICK, A.; GERSHENZON, J.; UNSICKER, S. B. Little peaks with big effects: Establishing the role of minor plant volatiles in plant-insect interactions. **Plant, Cell and Environment**, v. 37, n. 8, p. 1836–1844, 2014.

CROSS, W. H. Ecology of cotton insects with special reference to the boll weevil. In: RIDGWAY, R. L.; LLOYD, E. P.; CROSS, W. H. (Ed.). **Cotton insect management with special reference to the boll weevil**. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook No. 589, 1983. p. 53–70.

CROSS, W. H.; MITCHELL, H. C. Mating behavior of the female boll weevil. **Journal of Economic Entomology**, v. 59, n. 6, p. 1503–1507, 1966.

D'ALESSANDRO, M.; TURLINGS, T. C. J. In situ modification of herbivore-induced plant odors: A novel approach to study the attractiveness of volatile organic compounds to parasitic wasps. **Chemical Senses**, v. 30, n. 9, p. 739–753, 2005.

DA FONSECA, P. R. B.; DE LIMA JUNIOR, I. S.; SORIA, M. F.; KODAMA, C.; DEGRANDE, P. E. Inseticidas neonicotinoides no controle do bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis* (Boheman, 1843) (Coleoptera: Curculionidae) e a falha de controle do endosulfan. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 4, p. 545–551, 2011.

DE MORAES, C. M.; LEWIS, W. J.; PARE, P. W.; ALBORN, H. T.; TUMLINSON, J. H. Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 570–573, 1998.

DEPARTAMENTO DE SANIDADE VEGETAL. Portaria No-5, de 21 de agosto de 2015. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 ago. 2015. Seção 1, p. 13.

DICKE, M. Local and systemic production of volatile herbivore-induced terpenoids: Their role in plant-carnivore mutualism. **Journal of Plant Physiology**, v. 143, n. 4, p. 465–472, 1994.

DICKE, M. Chemical ecology of host-plant selection by herbivorous arthropods: a multitrophic perspective. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, n. 7, p. 601–617, 2000.

DICKE, M.; VAN LOON, J. J. A. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 97, n. 3, p. 237–249, 2000.

DICKENS, J. C. Olfaction in the boll weevil, *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera: Curculionidae): Electroantennogram studies. **Journal of Chemical Ecology**, v. 10, n. 12, p. 1759–1785, 1984.

DICKENS, J. C. Orientation of boll weevil, *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera: Curculionidae), to pheromone and volatile host compound in the laboratory. **Journal of Chemical Ecology**, v. 12, n. 1, p. 91–98, 1986.

DICKENS, J. C. Green leaf volatiles enhance aggregation pheromone of boll weevil, *Anthonomus grandis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 52, n. 3, p. 191–203, 1989.

DICKENS, J. C.; JANG, E. B.; LIGHT, D. M.; ALFORD, A. R. Enhancement of insect pheromone responses by green leaf volatiles. **Naturwissenschaften**, v. 77, n. 1, p. 29–31, 1990.

DICKENS, J. C.; MOORMAN, E. E. Maturation and maintenance of electroantennogram responses to pheromone and host odors in boll weevils, *Anthonomus grandis* Boh. (Col., Curculionidae) fed their host plant or an artificial diet. **Journal of Applied Entomology**, v. 109, n. 1–5, p. 470–480, 1990.

ERB, M.; VEYRAT, N.; ROBERT, C. a M.; XU, H.; FREY, M.; TON, J.; TURLINGS, T. C. J. Indole is an essential herbivore-induced volatile priming signal in maize. **Nature communications**, v. 6, p. 6273, 2015.

EVANS, K. A.; ALLEN-WILLIAMS, L. J. Electroantennogram responses of the cabbage seed weevil, *Ceutorhynchus assimilis*, to oilseed rape, *Brassica napus* ssp. Oleifera, volatiles. **Journal of Chemical Ecology**, v. 18, n. 9, p. 1641–1659, 1992.

FENTON, F. A.; DUNNAM, E. W. Biology of the cotton boll weevil at Florence. **Technical Bulletin**, v. 112, p. 1–77, 1929.

FIGUEIREDO, A. S.; RESENDE, J. T. V.; MORALES, R. G. F.; GONÇALVES, A. P. S.; SILVA, P. R. The Role of glandular and non-glandular trichomes in the negative interactions between strawberry cultivars and spider mite. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 7, n. 1, p. 53–58, 2013.

FONTES, E. M. G.; RAMALHO, F. S.; UNDERWOOD, E.; BARROSO, P. A. V.; SIMON, M. F.; SUJII, E. R.; PIRES, C. S. S.; BELTRÃO, N.; LUCENA, W. A.; FREIRE, E. C. The cotton agricultural context in Brazil. In: HILBECK, A.; ANDOW, D.; FONTES, E. M. G. (Ed.). **Environmental risk assessment of genetically modified organisms. Volume 2: methodologies for assessing Bt cotton in Brazil**. Wallingford, UK.: CABI Publishing, 2006. p. 21–26.

GABRIEL, D.; CALCAGNOLO, G.; TANCINI, R. S.; DIAS NETTO, N. Estudos de biologia do *Anthonomus grandis* Boheman, 1843 (Coleoptera, Curculionidae), em condições de laboratório. **O Biológico**, v. 50, n. 10, p. 83–89, 1986.

GATEHOUSE, J. A. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. **New Phytologist**, v. 156, n. 2, p. 145–169, 2002.

GISH, M.; MORAES, C. M. De; MESCHER, M. C. Herbivore-induced plant volatiles in natural and agricultural ecosystems: open questions and future prospects. **Current Opinion in Insect Science**, v. 9, p. 1–6, 2015.

GREENBERG, S. M.; SAPPINGTON, T. W.; SETAMOU, M.; COLEMAN, R. J. Influence of different cotton fruit sizes on boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) oviposition and survival to adulthood. **Environmental Entomology**, v. 33, n. 2, p. 443–449, 2004.

HABIB, M. E. M.; FERNANDES, W. D. *Anthonomus grandis* Boheman (Curculionidae) já está na lavoura algodoeira do Brasil. **Revista de Agricultura**, v. 58, n. 1–2, p. 74, 1983.

HANDLEY, R.; EKBOM, B.; ÅGREN, J. Variation in trichome density and resistance against a specialist insect herbivore in natural populations of *Arabidopsis thaliana*. **Ecological Entomology**, v. 30, n. 3, p. 284–292, 2005.

HANLEY, M. E.; LAMONT, B. B.; FAIRBANKS, M. M.; RAFFERTY, C. M. Plant structural traits and their role in anti-herbivore defence. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 8, n. 4, p. 157–178, 2007.

HARBORNE, J. B. **Introduction to Ecological Biochemistry**. Fourth ed. London, UK: Academic Press, 1994.

HARDEE, D. D. Pheromone production by male boll weevils as affected by food and host factors. **Contributions. Boyce Thompson Institute for Plant Research**, v. 24, n. 13, p. 315–321, 1970.

HARDEE, D. D.; CROSS, W. H.; MITCHELL, E. B. Male boll weevils are more attractive than cotton plants to boll weevils. **Journal of Economic Entomology**, v. 62, n. 1, p. 165–169, 1969.

HARE, J. D. Ecological role of volatiles produced by plants in response to damage by herbivorous insects. **Annual Review of Entomology**, v. 56, n. 1, p. 161–180, 2011.

HARRISON, G. D. Host-plant discrimination and evolution of feeding preference in the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. **Physiological Entomology**, v. 12, n. 4, p. 407–415, 1987.

HEDIN, P. A. Seasonal variations in the emission of volatiles by cotton plants growing in the field. **Environmental Entomology**, v. 5, n. 6, p. 1234–1238, 1976.

HEDIN, P. A.; MCCARTY, J. C. Boll weevil *Anthonomus grandis* Boh. oviposition is decreased in cotton *Gossypium hirsutum* L. lines lower in anther monosaccharides and gossypol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 10, p. 2735–2739, 1995.

HEDIN, P. A.; MCKIBBEN, G. H.; DOLLAR, D. A. Role of ground trash volatiles in the selection of hibernation sites by boll weevils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3673–3676, 2000.

HEDIN, P. A.; MCKIBBEN, G. H.; MITCHELL, E. B.; JOHNSON, W. L. Identification and field evaluation of the compounds comprising the sex pheromone of the female boll weevil. **Journal of Chemical Ecology**, v. 5, n. 4, p. 617–627, 1979.

HEIL, M. Herbivore-induced plant volatiles: Targets, perception and unanswered questions. **Journal of Physiology**, v. 204, n. 2, p. 297–306, 2014.

HEIL, M.; BARAJAS-BARRON, A.; ORONA-TAMAYO, D.; WIELSCH, N.; SVATOS, A. Partner manipulation stabilises a horizontally transmitted mutualism. **Ecology Letters**, v. 17, n. 2, p. 185–192, 2014.

HEISSWOLF, A.; GABLER, D.; OBERMAIER, E.; MÜLLER, C. Olfactory versus contact cues in host plant recognition of a monophagous chrysomelid beetle. **Journal of Insect Behavior**, v. 20, n. 2, p. 247–266, 2007.

HOLLINGSWORTH, J. P.; WRIGHT, R. L.; LINDQUIST, D. A. Spectral response characteristics of the boll weevil. **Journal of Economic Entomology**, v. 57, n. 1, p. 38–41, 1964.

HOPKINS, A. D. **Economic investigations of the scolytid bark and timber beetles of North AmericaU.S. Department of Agriculture Program of Work for 1917**, p. 353, 1916.

HOUTEN, Y. M.; GLAS, J. J.; HOOGERBRUGGE, H.; ROTHE, J.; BOLCKMANS, K. J. F.; SIMONI, S.; ARKEL, J.; ALBA, J. M.; KANT, M. R.; SABELIS, M. W. Herbivory-associated degradation of tomato trichomes and its impact on biological control of *Aculops lycopersici*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 60, n. 2, p. 127–138, 2013.

JAFFÉ, K.; SÁNCHEZ, P.; CERDA, H.; HERNÁNDEZ, J. V; JAFFÉ, R.; URDANETA, N.; GUERRA, G.; MARTÍNEZ, R.; MIRAS, B.; MART'\INEZ, R.; MIRAS, B. Chemical Ecology of the Palm Weevil *Rhynchophorus Palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae): Attraction to Host Plants and to a Male-Produced Aggregation Pheromone. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, n. 8, p. 1703–1720, 1993.

KALINOVÁ, B.; STRÁNSKÝ, K.; HARMATHA, J.; ČTVRTEČKA, R.; ŽD'ÁREK, J. Can chemical cues from blossom buds influence cultivar preference in the apple blossom weevil (*Anthonomus pomorum*)? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 95, n. 1, p. 47–52, 2000.

KARBAN, R.; BALDWIN, I. T. **Induced responses to herbivory**. Chicago & London: The University of Chicago Press, 1997.

KELLER, J. C.; MAXWELL, F. G.; JENKINS, J. N.; DAVICH, T. B. A boll weevil attractant from cotton. **Journal of Economic Entomology**, v. 56, n. 1, p. 110–111, 1963.

KIGATHI, R. N.; UNSICKER, S. B.; REICHELT, M.; KESSELMEIER, J.; GERSHENZON, J.; WEISSER, W. W. Emission of Volatile organic compounds after herbivory from *Trifolium pratense* (L.) under laboratory and field conditions. **Journal of Chemical Ecology**, v. 35, n. 11, p. 1335–1348, 2009.

KNOLHOFF, L. M.; HECKEL, D. G. Behavioral assays for studies of host plant choice and adaptation in herbivorous insects. **Annual Review of Entomology**, v. 59, n. 1, p. 263–278, 2014.

LANDOLT, P. J. Sex attractant and aggregation pheromones of male phytophagous insects. **American Entomologist**, v. 43, n. 1, p. 12–22, 1997.

LANDOLT, P. J.; PHILLIPS, T. W. Host plant influences on sex pheromone behavior of phytophagous insects. **Annual Review of Entomology**, v. 42, n. 1, p. 371–391, 1997.

LIMA JR., I. S.; DEGRANDE, P. E.; MIRANDA, J. E.; DOS SANTOS, W. J. Evaluation of the boll weevil *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) suppression program in the state of Goiás, Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 42, n. 1, p. 82–88, 2013.

LLOYD, E. P.; LASTER, M. L.; MERKL, M. E. A field study of diapause, diapause control, and population dynamics of the boll weevil. **Journal of Economic Entomology**, v. 57, n. 4, p. 433–436, 1964.

MACÊDO, J. A. de; CASTELLANI, M. A.; SANTOS, F. de A. R. dos; OLIVEIRA, P. P.; MALUF, R. P. Fontes alternativas de pólen utilizadas pelo bicudo-do-algodoeiro em duas regiões produtoras de algodão na Bahia. **Revista Caatinga**, v. 28, n. 3, p. 255–262, 2015.

MAGALHÃES, D. M. **Influência dos voláteis do algodoeiro induzidos por herbivoria na quimiotaxia de *Anthonomus grandis* Coleoptera: Curculionidae)**. 2012. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

MAGALHÃES, D. M.; BORGES, M.; LAUMANN, R. A.; SUJII, E. R.; MAYON, P.; CAULFIELD, J. C.; MIDEGA, C. A. O.; KHAN, Z. R.; PICKETT, J. A.; BIRKETT, M. A.; BLASSIOLI-MORAES, M. C. Semiochemicals from herbivory induced cotton plants enhance the foraging behavior of the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, n. 12, p. 1528–1538, 2012.

MAGALHÃES, D. M.; BORGES, M.; LAUMANN, R. A.; WOODCOCK, C. M.; PICKETT, J. A.; BIRKETT, M. A.; BLASSIOLI-MORAES, M. C. Influence of two acyclic homoterpenes (tetranorterpenes) on the foraging behavior of *Anthonomus grandis* Boh. **Journal of Chemical Ecology**, v. 42, n. 4, p. 305–313, 2016.

MALO, E. A.; GALLEGOS-TORRES, I.; TOLEDO, J.; VALLE-MORA, J.; ROJAS, J. C. Attraction of the West indian fruit fly to mango fruit volatiles. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 142, n. 1, p. 45–52, 2012.

MCINDOO, N. E. Senses of the cotton boll weevil - An attempt to explain how plant attract insect by smell. **Journal of Agricultural Research**, v. 33, n. 12, p. 1095–1141, 1926.

MCKEY, D. Adaptive patterns in alkaloid physiology. **The American Naturalist**, v. 108, n. 961, p. 305–320, 1974.

MCKIBBEN, G. H.; MITCHELL, E. B.; SCOTT, W. P.; HEDIN, P. A. Boll weevils are attracted to volatile oils from cotton plants. **Environmental Entomology**, v. 6, n. 6, p. 804–806, 1977.

MINYARD, J. P.; HARDEE, D. D.; GUELDNER, R. C.; THOMPSON, A. C.; WIYGUL, G.; HEDIN, P. A. Constituents of the cotton bud compounds attractive to the boll weevil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 17, n. 5, p. 1093–1097, 1969.

MIRANDA, J. E.; DA SILVA, C. A. D. Behavioural control of the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*. **Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas**, v. 31, n. 4, p. 509–515, 2005.

MISTRIC, W. J.; MITCHELL, E. R. Attractiveness of isolated groups of cotton plants to migrating boll weevils. **Journal of Economic Entomology**, v. 59, n. 1, p. 39–41, 1966.

MITCHELL, E.; TAFT, H. Host-plant selection by migrating boll weevils. **Journal of Economic Entomology**, v. 59, n. 2, p. 390–392, 1966.

MÜLLER, C.; RIEDERER, M. Plant surface properties in chemical ecology. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 11, p. 2621–2651, 2005.

NAKANO, O. O Bicudo: a praga mais importante do algodão. **Agroquímica**, v. 21, p. 10–14, 1983.

NEFF, D. L.; VANDERZANT, E. S. Methods of evaluating the chemotropic response of boll weevils to extracts of the cotton plant and various other substances. **Journal of Economic Entomology**, v. 56, n. 6, p. 761–766, 1963.

NEILSON, E. H.; GOODGER, J. Q. D.; WOODROW, I. E.; MØLLER, B. L. Plant chemical defense: at what cost? **Trends in Plant Science**, v. 18, n. 5, p. 250–258, 2013.

ONDIAKA, S.; MIGIRO, L.; RUR, M.; BIRGERSSON, G.; PORCEL, M.; RÄMERT, B.; TASIN, M. Sunflower as a trap crop for the European tarnished plant bug (*Lygus rugulipennis*). **Journal of Applied Entomology**, v. 140, n. 6, p. 453–461, 2016.

PAN, H.; LU, Y.; XIU, C.; GENG, H.; CAI, X.; SUN, X.; ZHANG, Y.; III, L. W.; WYCKHUYS, K. A. G.; WU, K. Volatile fragrances associated with flowers mediate host plant alternation of a polyphagous mirid bug. **Scientific Reports**, v. 5, n. 14805, p. 1–11, 2015.

PAPADOPOULOS, N. T.; SHELLY, T. E.; NIYAZI, N.; JANG, E. Olfactory and behavioral mechanisms underlying enhanced mating competitiveness following exposure to ginger root oil and orange oil in males of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Insect Behavior**, v. 19, n. 3, p. 403–418, 2006.

PARÉ, P. W.; TUMLINSON, J. H. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. **Plant Physiology**, v. 121, n. 2, p. 325–331, 1999.

PARENCIA, C. R. J.; DAVIS, J. W.; COWAN, C. B. J. Studies on the ability of overwintered boll weevils to find fruiting cotton plants. **Journal of Economic Entomology**, v. 57, n. 1, p. 162, 1964.

PAULA, A. D. P.; CLAUDINO, D.; TIMBÓ, R. V; MIRANDA, J. E.; RIBEIRO, A. C. J.; SUJII, E. R.; FONTES, E. M. G.; PIRES, C. S. S.; MIRANDA, J. E.; BEMQUERER, M. P. Reproductive dormancy in boll-weevil from populations of the midwest of Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 106, n. 1, p. 86–96, 2013.

PEÑAFLOR, M. F. G. V.; ERB, M.; ROBERT, C. A. M.; MIRANDA, L. A.; WERNEBURG, A. G.; DOSSI, F. C. A.; TURLINGS, T. C. J.; BENTO, J. M. S. Oviposition by a moth suppresses constitutive and herbivore-induced plant volatiles in maize. **Planta**, v. 234, n. 1, p. 207–215, 2011.

PEÑAFLOR, M. F. G. V; BENTO, J. M. S. Herbivore-induced plant volatiles to enhance eiological control in agriculture. **Neotropical Entomology**, v. 42, n. 4, p. 331–343, 2013.

PETIT, C.; RU, B. Le; DUPAS, S.; FRÉROT, B.; AHUYA, P.; KAISER-ARNAULD, L.; HARRY, M.; CALATAYUD, P. A. Influence of dietary experience on the induction of preference of adult moths and larvae for a new olfactory cue. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–11, 2015.

PIMENTA, M.; MATA, R. A.; VENZON, M.; CUNHA, D. N. C.; FONTES, E. M. G.; PIRES, C. S. S. Survival and preference of cotton boll weevil adults for alternative food sources. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 2, p. 387–395, 2016.

PRAGER, S. M.; ESQUIVEL, I.; TRUMBLE, J. T. Factors influencing host plant choice and larval performance in *Bactericera cockerelli*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

PRICE, P. W.; BOUTON, C. E.; GROSS, P.; MCPHERON, B. A.; THOMPSON, J. N.; WEIS, A. E. Interactions among three trophic levels: Influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 11, n. 1, p. 41–65, 1980.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing.**Vienna, Austria. R Foundation for Statistical Computing, 2016.

RAMALHO, F. de S.; SILVA, J. R. B. Período de emergência e mortalidade natural do bicudo-do-algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, n. 11, p. 1221–1231, 1993.

RAMALHO, F. S.; GONZAGA, J. V. Methodology of the application of pyrethroids against cotton boll weevil and pink bollworm. **Tropical Pest Management**, v. 37, n. 4, p. 324–328, 1991.

REDDY, G. V. P.; GUERRERO, A. Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 5, p. 253–261, 2004.

REINECKE, A.; RUTHER, J.; HILKER, M. The scent of food and defence: green leaf volatiles and toluquinone as sex attractant mediate mate finding in the European cockchafer *Melolontha melolontha*. **Ecology Letters**, v. 5, n. 2, p. 257–263, 2002.

RHOADES, D. F. Evolution of plant chemical defense against herbivores. In: ROZENTHAL, G. A.; JANZEN, D. H. (Ed.). **Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites**. New York: Academic Press, 1979. p. 4–48.

RIDGWAY, R. L.; INSCOE, M. N.; DICKERSON, W. A. Role of the boll weevil pheromone in pest management. In: RIDGWAY, R. L.; SILVERSTEIN, R. M.; INSCOE, M. N. (Ed.). **Behavior-Modifying Chemicals for Insect Managements**. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 453–471.

RIFFELL, J. A.; ALARCON, R.; ABRELL, L.; DAVIDOWITZ, G.; BRONSTEIN, J. L.; HILDEBRAND, J. G. Behavioral consequences of innate preferences and olfactory learning in hawkmoth – flower interactions. **Proceedings of the National Academy**

of Sciences of the United States of America, v. 105, n. 9, 2008.

RODRIGUES, S. M. M.; MIRANDA, J. E. Métodos usados no manejo integrado do bicudo-do-algodoeiro: Controle etológico do bicudo-do-algodoeiro. In: BELOT, J. L. (Ed.). **O bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* BOH., 1843) nos cerrados brasileiros: biologia e medidas de controle**. Cuibá, MT: Instituto Mato-grossense do Algodão - IMAmt, 2015. p. 91–113.

RODRIGUEZ-SAONA, C.; CRAFTS-BRANDNER, S. J.; CAÑAS, L. A. Volatile emissions triggered by multiple herbivore damage: Beet armyworm and whitefly feeding on cotton plants. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, n. 11, p. 2539–2550, 2003.

ROSE, U.; MANUKIAN, A.; HEATH, R. R.; TUMLINSON, J. H. Volatile semiochemicals released from undamaged cotton leaves (A systemic response of living plants to caterpillar damage). **Plant physiology**, v. 111, n. 1 996, p. 487–495, 1996.

RÖSE, U. S. R.; TUMLINSON, J. H. Volatiles released from cotton plants in response to Helicoverpa zea feeding damage on cotton flower buds. **Planta**, v. 218, n. 5, p. 824–832, 2004.

RUMMEL, D. R.; CURRY, G. L. Dinâmica populacional e níveis de dano econômico. In: BARBOSA, S.; LUKEFARH, M. J.; SOBRINHO, R. B. (Ed.). **O Bicudo do Algodoeiro**. Brasília, DF: EMBRAPA DDT, (Documentos, 4), 1986. p. 201–220.

RUTHER, J.; REINECKE, A.; THIEMANN, K.; TOLASCH, T.; FRANCKE, W.; HILKER, M. Mate finding in the forest cockchafer, *Melolontha hippocastani*, mediated by volatiles from plants and females. **Physiological Entomology**, v. 25, n. 2, p. 172–179, 2000.

RUTHER, J.; REINECKE, A.; TOLASCH, T.; HILKER, M. Make Love Not War: A Common Arthropod Defence Compound as Sex Pheromone in the Forest Cockchafer *Melolontha Hippocastani*. **Oecologia**, v. 128, n. 1, p. 44–47, 2001.

SAPPINGTON, T. W.; SPURGEON, D. W. Preferred technique for adult sex determination of the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 93, n. 3, p. 610–615, 2000.

SAVEER, A. M.; KROMANN, S. H.; BIRGERSSON, G.; BENGTSSON, M.; LINDBLOM, T.; BALKENIUS, A.; HANSSON, B. S.; WITZGALL, P.; BECHER, P. G.; IGNELL, R. Floral to green: mating switches moth olfactory coding and preference. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 279, n. 1737, p. 2314–2322, 2012.

SCHMIDT, F. G. V.; MONNERAT, R.; BORGES, M.; CARVALHO, R. **Criação de insetos para avaliação de agentes entomopatogênicos e semioquímicos**.

Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Circular Técnica, 11), 2001.

SCHOONHOVEN, L. M.; VAN LOON, J. J. A.; DICKE, M. **Insect-Plant Biology**. 2nd. ed. Oxford, UK: Oxford University Press, 2005.

SHARMA, H. C.; AGARWAL, R. A. Effect of some antibiotic compounds in *Gossypium* on the post-embryonic development of spotted bollworm (*Earias vittella*). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 31, n. 2–3, p. 225–228, 1982.

SHOWLER, A. T. Influence of cotton fruit stages as food sources on boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) fecundity and oviposition. **Journal of Economic Entomology**, v. 97, n. 4, p. 1330–1334, 2004.

SILVA, J. B.; SILVA-TORRES, C. S. A. A.; MORAES, M. C. B.; TORRES, J. B.; LAUMANN, R. A.; BORGES, M. Interaction of *Anthonomus grandis* and cotton genotypes: biological and behavioral responses. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 156, n. 3, p. 238–253, 2015.

SILVEIRA, L. C. P.; BERTI FILHO, E.; PIERRE, L. S. R.; PERES, F. S. C.; LOUZADA, J. N. C. Marigold (*Tagetes erecta* L.) as an attractive crop to natural enemies in onion fields. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 6, p. 780–787, 2009.

SILVERSTEIN, R. M.; RODIN, J. O.; WOOD, D. L. Sex attractants in frass produced by male *Ips confusus* in *Ponderosa Pine*. **Science**, v. 154, n. 3748, p. 509 LP-510, 1966.

SMITH, G. L.; CLEVELAND, T. C.; CLARK, J. C. Boll weevil movement from hibernation sites to fruiting cotton. **Journal of Economic Entomology**, v. 58, n. 2, p. 357–358, 1965.

SMITH, J. W. Boll weevil eradication: Area-wide pest management. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 91, n. 3, p. 239–247, 1998.

SOARES, J.; YAMAMOTO, P. T. Comportamento de oviposição de *Anthonomus grandis* Boheman, 1843 (Coleoptera, Curculionidae) em diferentes níveis de infestação natural. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 22, n. 2, p. 333–339, 1993.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry: the principles and practice of statistics in biological research**. 4th. ed. New York, NY: W. H. Freeman, 2012.

STEWART-JONES, A.; POPPY, G. M. Comparison of glass vessels and plastic bags for enclosing living plant parts for headspace analysis. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, n. 4, p. 845–864, 2006.

SZENDREI, Z.; MALO, E.; STELINSKI, L.; RODRIGUEZ-SAONA, C. Response of

cranberry weevil (Coleoptera: Curculionidae) to host plant volatiles. **Environmental Entomology**, v. 38, n. 3, p. 861–869, 2009.

THOLL, D.; BOLAND, W.; HANSEL, A.; LORETO, F.; RÖSE, U. S. R.; SCHNITZLER, J.-P. Practical approaches to plant volatile analysis. **The Plant Journal**, v. 45, n. 4, p. 540–560, 2006.

THOMPSON, A. C.; HANNY, B. W.; HEDIN, P. A.; GUELDNER, R. C. Phytochemical studies in the family Malvaceae. I. Comparison of essential oils of six species by sas-liquid chromatography. **American Journal of Botany**, v. 58, n. 9, p. 803–807, 1971.

THOMPSON, A. C.; WRIGHT, B. J.; HARDEE, D. D.; GUELDNER, R. C.; HEDIN, P. A. Constituents of the cotton bud. XVI. The attractancy response of the boll weevil to the essential oils of a group of host and nonhost plants. **Journal of Economic Entomology**, v. 63, n. 3, p. 751–753, 1970.

TORRES, J. B.; VIVAN, L. M.; BASTOS, C. S.; BARROS, E. M. Métodos usados no manejo integrado do bicudo-do-algodoeiro: Controle cultural como método de convivência com as pragas do algodoeiro. In: BELOT, J. L. (Ed.). **O bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* BOH., 1843) nos cerrados brasileiros: biologia e medidas de controle**. Cuibá, MT: Instituto Mato-grossense do Algodão - IMAmt, 2015. p. 114–139.

TUMLINSON, J. H.; HARDEE, D. D.; GUELDNER, R. C.; THOMPSON, A. C.; HEDIN, P. A.; MINYARD, J. P. Sex pheromones produced by male boll weevil: Isolation, identification, and synthesis. **Science**, v. 166, n. 3908, p. 1010–1012, 1969.

VALLAT, A.; DORN, S. Changes in volatile emissions from apple trees and associated response of adult female codling moths over the fruit-growing season. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4083–4090, 2005.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition. **Journal of Chromatography**, v. 11, n. 3, p. 463–471, 1963.

VAN LOON, J. J. A.; WANG, C. Z.; NIELSEN, J. K.; GOLS, R.; QIU, Y. T. Flavonoids from cabbage are feeding stimulants for diamondback moth larvae additional to glucosinolates: Chemoreception and behaviour. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 104, n. 1, p. 27–34, 2002.

VAN POECKE, R. M. P.; DICKE, M. Indirect defence of plants against herbivores: Using *Arabidopsis thaliana* as a model plant. **Plant Biology**, v. 6, n. 4, p. 387–401, 2004.

VET, L. E. M.; DICKE, M. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. **Annual Review of Entomology**, v. 37, n. 1, p. 141–172, 1992.

VISSER, J. H.; AVÉ, D. A. General green leaf volatiles in the olfactory orientation of the colorado beetle, Leptinotarsa decemlineata. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 24, n. 3, p. 738–749, 1978.

WAR, A. R.; PAULRAJ, M. G.; AHMAD, T.; BUHROO, A. A.; HUSSAIN, B.; IGNACIMUTHU, S.; SHARMA, H. C. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n. 10, p. 1306–1320, 2012.

WEBSTER, B.; BRUCE, T.; PICKETT, J.; HARDIE, J. Volatiles functioning as host cues in a blend become nonhost cues when presented alone to the black bean aphid. **Animal Behaviour**, v. 79, n. 2, p. 451–457, 2010.

WHITE, J. R.; RUMMEL, D. R. Emergence profile of overwintered boll weevils and entry into cotton. **Environmental Entomology**, v. 7, n. 1, p. 7–14, 1978.

WIBE, A.; BORG-KARLSON, A.-K.; CROSS, J.; BICHÃO, H.; FOUNTAIN, M.; LIBLIKAS, I.; SIGSGAARD, L. Combining 1,4-dimethoxybenzene, the major flower volatile of wild strawberry *Fragaria vesca*, with the aggregation pheromone of the strawberry blossom weevil *Anthonomus rubi* improves attraction. **Crop Protection**, v. 64, p. 122–128, 2014.

WITTSTOCK, U.; GERSHENZON, J. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 4, p. 300–307, 2002.

ZHANG, P. Y.; CHEN, K. S.; HE, P. Q.; LIU, S. H.; JIANG, W. F. Effects of crop development on the emission of volatiles in leaves of *Lycopersicon esculentum* and its inhibitory activity to *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum*. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 1, p. 84–91, 2008.