

Respuesta comportamental y electrofisiológica de *Rhynchophorus palmarum* (L., 1764) (Coleoptera: Curculionidae) a compuestos volátiles de hongos entomopatógenos nativos

Viviane Araujo-Dalbon¹, Thyago Fernando Lisboa-Ribeiro¹, Juan Pablo Molina-Acevedo², Joao Manoel Silva¹, Anderson Bruno Anacleto-Andrade¹, Bruna da Silva Granja¹, Karlos Antônio Lisboa Ribeiro-Júnior¹, Henrique Fonseca-Goulart¹ & Antônio Euzébio Goulart-Santana¹

1 Campus de Ingenierías y Ciencias Agrarias, Universidad Federal de Alagoas, Alagoas, Brazil.

2 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Agrosavia C. I. Turipaná, Córdoba, Colombia.

Resumen

Rhynchophorus palmarum es plaga relevante en palmeras (Arecaceae) en Brasil. Su respuesta comportamental (olfatometría) y electrofisiológica (electroantennografía, sola y acoplada a cromatografía) se estudió frente a compuestos orgánicos volátiles emitidos por hongos entomopatógenos nativos aislados en Coruripe (Alagoas, Brasil) mediante aireación durante 24 horas. El aislado CVAD01 no originó respuesta comportamental significativa, pero el CVAD02 originó atracción significativa en machos. Los bioensayos electrofisiológicos mostraron actividad antenal en los dos sexos de *R. palmarum* frente a los componentes volátiles de los extractos de los dos hongos identificados. Los análisis cromatográficos de los extractos indicaron perfiles de compuestos orgánicos volátiles con la presencia de dos alcoholes, tres hidrocarburos aromáticos, dos monoterpenos, tres cetonas y tres hidrocarburos lineales.

Palabras clave: Arecaceae; Olfatometría; Aireación; electroantennografía; Perfil cromatográfico

Abstract

Behavioral and electrophysiological response of Rhynchophorus palmarum (L., 1764) (Coleoptera: Curculionidae) to volatile compounds of natives entomopathogenic fungi

Rhynchophorus palmarum is a major pest of palms (Arecaceae) in Brasil. Both the behavioral (olfactometry) and electrophysiological (electroantennography, both alone and coupled to chromatography) was studied against volatile organic compounds emitted by native entomopathogenic fungi isolated from Coruripe (Alagoas, Brazil). Fungal isolates were identified by aeration system for 24 hours. CVAD01 did not cause a significant behavioral response; however, males were significantly attracted to CVAD02 extracts. Electrophysiological bioassays showed antennal activity, in both sexes, to volatile components of the two identified native fungi. The chromatographic analysis of the extracts indicated profiles of volatile organic compounds with the presence of three alcohol, three aromatics, three ketones, and four hydrocarbons.

Key words: Arecaceae; Olfactometry; Aeration; Electroantennography; Chromatographic profil.

Correspondencia

V. Araujo-Dalbon

E-mail: vida-molina@hotmail.com

Recibido: 21 octubre 2020

Aceptado: 12 abril 2021

Publicado on-line: 6 mayo 2021



Introducción

El género *Rhynchophorus* Herbst, 1795 pertenece a la familia Curculionidae. Tiene diez especies, siete de las cuales se cuentan entre las principales plagas para la familia Arecaceae (Wattanapongsiri 1966) como son: *Rhynchophorus bilineatus* (Moutrouzier, 1857), *Rhynchophorus cruentatus* (Fabricius, 1775), *Rhynchophorus distinctus* Wattanapongsiri, 1966, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790), *Rhynchophorus labatus* Ritsema, 1882, *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus, 1764), *Rhynchophorus phoenicis* (Fabricius, 1801), *Rhynchophorus ritcheri* Wattanapongsiri, 1966 and *Rhynchophorus vulneratus* (Panzer, 1798). Entre estas especies, *R. cruentatus*, *R. palmarum* y *R. ritcheri* se encuentran en América del Norte (Estados Unidos), América Central, desde México hasta Panamá, y América del Sur, en países como Colombia, Brasil, Ecuador, Perú y las Antillas del Sur (Giblin-Davis *et al.* 2013). En América Central, el picudo rojo de las palmas, *R. ferrugineus*, se encuentra presente en las antillas de Aruba y Curazao (Fiaboe *et al.* 2012), y es considerado como una plaga cuarentenaria A1 en Brasil (MAPA 2018).

En Brasil, el picudo suramericano de la palma, *R. palmarum*, se considera el principal insecto plaga presente en agroecosistemas y bosques nativos, infestando palmeras de la familia Arecaceae y especies de gran importancia comercial. Es la plaga principal en plantaciones de coco (*Cocos nucifera* L.) y palma (*Elaeis guineensis* Jacq) en América del Sur. También causan daños considerables en especies de otros cultivos como la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), el plátano (*Musa paradisiaca* L), la papaya (*Carica papaya* L.), la piña (*Ananas comosus* L.) y otras plantas cultivadas (Wattanapongsiri 1966).

El aumento en las poblaciones de *R. palmarum* se ve favorecido por el hábito críptico de las larvas, que se alimentan en el interior del tronco de la palma donde encuentran protección frente a posibles enemigos naturales. *Rhynchophorus palmarum* es el vector responsable de la transmisión del nematodo *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb, 1919), agente causante de la enfermedad denominada anillo rojo, determinando un complejo picudo-nematodo que causa grandes daños en palmas de Latinoamérica (Ferreira 2002).

Para el control de *R. palmarum* se ha utilizado una combinación de métodos de control

como el uso de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) y *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin (Sordariomycetes: Hypocreales) (Ferreira 2002, León *et al.* 2019), o el uso de la feromona de agregación rincoforol® combinada con pedazos de caña de azúcar (Moura *et al.* 1990, Ferreira 2002, Duarte *et al.* 2003, Cysne *et al.* 2013). También Ferreira *et al.* (2002) emplearon trampas cebadas con la combinación de caña de azúcar y la feromona de agregación rincoforol®, observando el aumento en la atracción de machos y hembras de *R. palmarum*, lo que indicó la sinergia entre estas fuentes atractivas para la captura del insecto. Entre otras fuentes atractivas para *R. palmarum* se encuentra el uso de cebos de piña, plátano y coco verde (*C. nucifera*) (Landeró-Torres *et al.* 2015). Murguía-González *et al.* (2018) observaron también la eficiencia del uso de mezcla de cebos como plátano, piña, caña de azúcar y melaza de caña de azúcar en la captura de *R. palmarum*.

Para el caso específico de *R. ferrugineus*, el monitoreo y captura masiva de adultos se ha realizado con éxito mediante el uso de la feromona de agregación ferrugineol® en combinación con el uso de cairomonas de palmas de *Phoenix canariensis* Hort. Ex Chabaud, como el acetato de etilo (Rochat *et al.* 2017). De acuerdo con Vacas *et al.* (2017), las trampas con feromonas y cairomonas (acetato de etilo/etanol 1:3) capturan más insectos que el uso de la feromona ferruginol® en solitario y se consideró ineficiente la mezcla sintética de feromona con material vegetal y melaza para atraer adultos de *R. ferrugineus*.

Entre las estrategias de control de insectos, el uso de feromonas de agregación asociadas con compuestos orgánicos volátiles (COVs) de plantas hospedantes, combinados con medidas de control biológico como el empleo de parasitoides, depredadores y patógenos, pueden regular la población de plagas importantes en el campo. Los COVs generalmente comprenden moléculas de menos de 20 átomos de carbono, ya que son moléculas de bajo peso molecular, y se liberan fácilmente a la atmósfera o al suelo, propagándose rápidamente por el movimiento de la solución acuosa y el flujo de agua en el suelo (Wheatley *et al.* 2002, Dudareva *et al.* 2006). Son compuestos que pertenecen a diferentes clases químicas, como hidrocarburos simples, aldehídos, cetonas, alcoholes, fenoles y sus derivados, incluidos los derivados de benceno

y ciclohexano (Campos *et al.* 2010, Morath *et al.* 2012), pueden ser letales para otros microorganismos patógenos (Strobel 2007, Bojke *et al.* 2018). Los hongos producen compuestos volátiles a través de sus vías metabólicas y aparecen como productos intermedios y finales del metabolismo primario y secundario (Muller *et al.* 2013).

Los hongos entomopatógenos, como *B. bassiana* y *M. anisopliae*, son ampliamente utilizados en estas estrategias de control. Son microorganismos que pueden inducir una enfermedad específica, infectar insectos en varios nichos, causar epizootias y también, durante el proceso de infección, producen compuestos orgánicos volátiles que resultan prometedores para el biocontrol de plagas. Estos compuestos presentan características antifúngicas, insecticidas, atractivas, nematocidas y repelentes de artrópodos (Xu *et al.* 2015, Guarino *et al.* 2015, Stenberg *et al.* 2015, Kandasamy *et al.* 2016, Werner *et al.* 2016). La mayoría de estos hongos viven en simbiosis en el suelo, siendo responsables de aproximadamente el 80% de las enfermedades causadas en insectos. Esta clase de hongos tiene una peculiaridad sobre los demás, ya que no necesitan ser ingeridos por el huésped (Fernandes *et al.* 2011). Según Dudareva *et al.* (2006) los COVs de hongos entomopatógenos, cuando se asocian con partículas del suelo, pueden actuar además en el control de fitonematodos de importancia agrícola. Sin embargo, la aplicación en la forma esporulada de *B. bassiana* en cultivos agrícolas ha causado repelencia en el parasitoide *Anthocoris nemorum* (L., 1761) (Heteroptera: Anthocoridae) (Meyling & Pell 2006). De esta forma, los parasitoides tienen una selectividad olfativa en la evaluación de señales químicas de cara a la búsqueda de alimentos y lugares para la oviposición, relacionados con el riesgo de depredación tanto de los imagos (Grostal & Dicke 2000, Venzon *et al.* 2000) como de su progenie (Nakashima & Senoo 2003; Eitam & Blaustein 2004).

La selección del hábitat de oviposición tiene una gran influencia en la supervivencia de la descendencia y, por lo tanto, en el éxito de la reproducción (Dolumbia *et al.* 1998). Otros hongos entomopatógenos han provocado similar actividad de repelencia. Rännback *et al.* (2015) observaron esta actitud en la avispa *Trybliographa rapae* (Westw.) (Hymenoptera: Figitidae), un parasitoide larval de la mosca de la raíz del repollo *Delia radicum* (L.) (Diptera: Anthomyiidae), ante hospede-

dores infectados por hongos. Las hembras de *T. rapae* pusieron más huevos en larvas sanas que en larvas infectadas con el hongo *Metarhizium brunneum* Petch sp. KVL 04-57.

Myles (2002) aisló el hongo entomopatógeno *M. anisopliae*, que parasita a la termita subterránea oriental *Reticulitermes flavipes* (Kollar, 1837) (Isoptera: Rhinotermitidae), y observó que los individuos no infectados exhibían una combinación de comportamiento de alarma, agregación y reacciones de defensa contra individuos infectados con *M. anisopliae*. Estas observaciones sugirieron que puede ser necesario evitar las actitudes de defensa de los insectos para mejorar el control biológico de estas termitas con *M. anisopliae*. Este comportamiento defensivo se puede eludir de varias maneras, como enmascarar la repelencia de *M. anisopliae*, superar la repelencia con atracciones, reducir los niveles de dosificación por debajo de los límites de alarma, o en la selección de aislados o formulaciones menos detectables por el insecto.

El presente trabajo pretende profundizar en el estudio de alternativas de manejo para el control de picudos en palmeras, en particular la influencia sobre *R. palmarum* de compuestos orgánicos volátiles derivados de hongos entomopatógenos. Los objetivos del trabajo fueron: a) estudiar la respuesta comportamental, mediante olfatómetro, de *R. palmarum* frente a los extractos volátiles de hongos entomopatógenos nativos de alta virulencia aislados en Brasil; b) analizar la respuesta antenal (electroantenografía, sola y acoplada a cromatografía) de *R. palmarum* frente a COVs procedentes de hongos entomopatógenos; y c) caracterizar el perfil cromatográfico de los extractos volátiles de hongos entomopatógenos nativos.

Material y métodos

Captura de insectos y obtención de hongos entomopatógenos nativos

Se recogieron ejemplares de *R. palmarum* y muestras de hongos entomopatógenos (HEs) de la hacienda San José (10°08'30.5"S, 36°12'00.7" W) en la localidad de Areas, municipio de Coruripe (Estado de Alagoas, Brasil) (Fig. 1), área de gran producción de cultivos de coco de la región. Para la captura de insectos se utilizaron trampas fabricadas por los autores, compuestas por un balde plástico de 3 l con una tapa perforada en el centro para

encajar un embudo plástico de 15 cm de diámetro. Las paredes laterales de la trampa tenían orificios de 2 mm de diámetro que permitían el drenaje del exceso de agua de lluvia. Se instalaron veinte trampas en las márgenes limítrofes de la zona de estudio, a una altura de 1 metro del suelo, con espacio de 100 metros entre cada trampa (Ferreira *et al.* 2002). Las trampas contenían cápsulas con la feromona rincoforol® (Interacta Ltda, Brazil) y se les agregaron también pedazos de caña de azúcar, de 10 cm de largo, cambiados cada semana para evitar fermentación. Las colectas se llevaron a cabo semanalmente durante el periodo de estudio, que fue desde 1 de agosto de 2018 a 31 de diciembre de 2019. Los adultos de picudos capturados se colocaron en contenedores de plástico y se transportaron al Laboratorio de Investigación en Recursos Naturales de la Universidad Federal de Alagoas. En total 100 insectos (50 hembras y 50 machos) de *R. palmarum* se mantuvieron individualizados en potes de plástico estériles de 14 cm diámetro y 9,4 cm de altura, con suministro de alimento a base de trozos de caña de azúcar, y se mantuvieron en incubación por aproximadamente 20 días, a una temperatura de 25 ± 2 °C para analizar el crecimiento de hongos. Los insectos parasitados con hongos entomopatógenos se separaron y se cultivaron en medio a base de Papa Dextrosa Agar (PDA). Igualmente, los insectos recolectados muertos y parasitados en el campo fueron analizados a lo largo de 10 días para ver si presentaban crecimiento micelial, en cuyo caso fueron esterilizados y aislados en medio PDA. Los hongos entomopatógenos fueron identificados por la técnica de microcultivo y separados en dos grupos



Figura 1. Localización geográfica del municipio de Coruripe (Alagoas, Brasil). Coordenadas del área de estudio: $10^{\circ}08'30.5''S$, $36^{\circ}12'00.7''O$.

Figure 1. Geographical location of the municipality of Coruripe (Alagoas, Brazil). Coordinates of the study area: $10^{\circ}08'30.5''S$, $36^{\circ}12'00.7''W$.

descritos como CVAD01 y CVAD02, de acuerdo con el protocolo descrito por Alves *et al.* (1998) y las claves morfológicas de hongos de De Hoog (1972), Fernandes *et al.* (2011), Rehner *et al.* (2011) y Kepler *et al.* (2017). Después de la purificación, todos los aislamientos se mantuvieron en DBO y se incubaron a 25 ± 1 °C en un fotoperíodo de 12 horas para los bioensayos.

Extracción de los compuestos orgánicos volátiles de hongos entomopatógenos nativos en medio PDA

Los hongos entomopatógenos nativos, denominados tratamiento CVAD01 y CVAD02, utilizados para recolectar COVs, tuvieron quince días de crecimiento en medio PDA. La captura de los COVs se realizó utilizando el adsorbente Porapak Q (USA, Estados Unidos) con una malla 50/80 (Supelco Inc. Bellefonte, PA 16823 Estados Unidos). Las extracciones se realizaron de acuerdo con la metodología descrita por Toll *et al.* (2006), técnica adaptada para aireación de hongos entomopatógenos llamada "capilla biológica", registrada en la Institución Nacional de Propiedad Intelectual (INPI, Brazil, patente BR1020190125659). El aire filtrado con carbón activo se inyectó a través de un compresor con un flujo de entrada de 500 ml min^{-1} , mientras otra bomba aspiraba el aire a través de la trampa adsorbente a un caudal de 400 ml min^{-1} . Todas las conexiones del sistema de aireación se realizaron con tubos flexibles de politetrafluoroetileno (PTFE), creando un sistema de presión positiva, como lo describen Moraes *et al.* (2008). Las extracciones se realizaron durante 24 horas, con tres repeticiones por tratamiento. También se realizó extracción de COVs a partir de cuatro testigos (el mismo medio de cultivo usado anteriormente, pero desprovisto de siembra de los hongos estudiados), para comprobar la eventual actividad sobre el insecto de emisiones volátiles procedentes del medio de cultivo. Al final de las aireaciones, la desorción de los compuestos se realizó utilizando $500 \mu\text{L}$ de hexano bidestilado HPLC (SigmaAldrich, San Luis, Missouri, USA). Los extractos obtenidos se colocaron en viales (vidrio de borosilicato, 2 ml) y se almacenaron en un congelador a -20 °C.

Bioensayo comportamental

La respuesta comportamental de los adultos de *R. palmarum* a los compuestos volátiles presentes en los HEs nativos se evaluó en bioensayos utilizan-

do un olfatómetro “Y”. Este modelo de olfatómetro bidireccional es similar al utilizado en otras pruebas olfativas para el orden Coleoptera (Ruiz-Montiel *et al.* 2003, Lopez-Llorca *et al.* 2017). Cada brazo del tubo de vidrio posee 30 cm de longitud con 5 cm de diámetro, estando separados por un ángulo de 75°, operando con un flujo de aire continuo de 200 ml min⁻¹ previamente humidificado y filtrado con carbón activado (Ruiz-Montiel *et al.* 2003).

Fueron realizados dos bioensayos distintos: el primero a partir de extractos hexánicos obtenidos de cultivos fúngicos de HEs aislados procedentes de ejemplares de *R. palmarum* infectados; el segundo, utilizando directamente placas de PDA inoculadas con esporas de los hongos entomopatógenos de interés. Estos aislados puros se obtuvieron raspando los HEs de la placa matriz e inoculándolos otra vez en nuevas placas con medio PDA, con tiempo total de incubación de 15 días. Las fuentes de olores utilizadas para testar los extractos hexánicos fueron un pedazo de papel de filtro (2x2 cm, Whatman N° 1) impregnado con 10 µL del extracto hexánico, así como con hexano en la misma concentración (que actuó como control). Los tratamientos y bioensayos analizados fueron:

- i. Respuestas de los machos al extracto de CVAD01 *versus* control.
- ii. Respuestas de las hembras al extracto de CVAD01 *versus* control
- iii. Respuestas de los machos al extracto de CVAD02 *versus* control
- iv. Respuestas de las hembras al extracto CVAD02 *versus* control
- v. Respuestas de los machos a cultivos en PDA de CVAD01 *versus* control
- vi. respuestas de las hembras a cultivos en PDA de CVAD01 *versus* control
- vii. Respuestas de los machos a cultivos en PDA de CVD02 *versus* control
- viii. Respuesta de las hembras a cultivos en PDA de CVD02 *versus* control.

La respuesta se registró por un tiempo de 10 minutos, considerándose finalizada cuando el insecto caminó contra el flujo de aire filtrado hasta el final del brazo del olfatómetro que contenía la fuente de olor testada o bien hacia el brazo que contenía el control. Ambos bioensayos de olfatometría “Y” se realizaron de las 8:00 a.m. a la 1:00 p.m. en una habitación mantenida a 28 ± 2

°C y 75 ± 5% de humedad relativa. Se emplearon 20 insectos distintos de cada sexo por tratamiento cada día.

Bioensayo electrofisiológico

Las respuestas de las antenas de *R. palmarum* a los extractos obtenidos en este trabajo fueron analizadas mediante electroantenografía (EAG) y mediante cromatografía acoplada a electroantenografía (CG-EAG). Los especímenes de *R. palmarum* fueron anestesiados a baja temperatura (-10 °C) por un minuto y, en seguida, una antena fue cortada cuidadosamente por su base. Las antenas se fijaron en electrodos de plata provistos de gel conductor (Spectra 360. Parker Laboratories Inc., Hellendoorn, Holanda). El flujo de aire portador de los estímulos hacia la antena fue de 30 ml s⁻¹. Se realizaron dos bioensayos: el primero tuvo como objetivo verificar la bioactividad de los extractos en la antena del insecto, realizando mediciones de EAG directas sobre antenas de machos y hembras de *R. palmarum* sometidas a pulsos de aire filtrado de muestras de extractos hexánicos de los hongos entomopatógenos estudiados (en adelante se denominará este bioensayo “respuesta EAG”). Como control se utilizaron pulsos de aire con hexano. La preparación de los aromas a testar se realizó añadiendo 10 µl de las muestras analizadas en un papel de filtro (Whatman N° 1, 1,0 cm por 1,0 cm), el cual se insertó en una pipeta de vidrio Pasteur. Esta pipeta se conectó al sistema generador de impulsos (controlador de estímulo, tipo CS-55, Syntech, Hilversum, Países Bajos); el impulso se mantuvo durante 0,3 s y sobre cada antena se aplicaron sucesivamente 3 estímulos de cada aroma testado. Se emplearon cinco antenas de cada sexo procedentes de insectos distintos.

Para analizar la respuesta CG-EAG se inyectó una alícuota de 4 µl de las muestras en un cromatógrafo de gases (Shimadzu, GC-2010, Kyoto, Japan) acoplado a detector de ionización de llama (FID) (Shimadzu QP-2010), operado en el modo "splitless" y provisto de una columna capilar RTX-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Las condiciones de análisis fueron las siguientes: temperatura del detector FID, 280 °C; rampa de temperaturas del CG comenzando a 40 °C durante 7 minutos, seguido de un gradiente de calentamiento de 4 °C min⁻¹ hasta alcanzar 150 °C, que se mantuvo durante 20 minutos. La duración total del programa fue de 41 minutos. Se utilizó nitró-

geno como gas portador con un caudal de 1 l min^{-1} . Las respuestas de las antenas se registraron mediante un amplificador de alta impedancia (IDAC4, Syntech 2004, Hilversum, Países Bajos). Las salidas del amplificador EAG y el FID se monitorearon simultáneamente y se analizaron utilizando el software Data Aquisicion System for Spike Analysis (AutoSpike 3.10, versión 2018). Se consideró que los compuestos que eluían del cromatógrafo eran activos si producían actividad electroantenográfica similar en varias señales CG-EAG. Se realizaron al menos cinco repeticiones de cada muestra analizada.

Análisis por cromatografía

Los extractos obtenidos en este trabajo fueron analizados por Cromatografía de Gases acoplada al Detector por Ionización de Llama (CG-FID) y Espectrometría de Masas (CG-EM). Para realizar los análisis cromatográficos, los extractos obtenidos en las aireaciones se sacaron del congelador y se mantuvieron a temperatura ambiente por un período de aproximadamente 5 minutos. Luego, se introdujo una alícuota de $1 \mu\text{L}$ de cada extracto en el cromatógrafo de gases acoplado al Detector de Ionización de Llama (FID) (Shimadzu QP-2010) con una columna Nist-05 ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$). Las condiciones para el análisis de CG fueron: inyector con temperatura $280 \text{ }^\circ\text{C}$ en modo Splitless (sin división de flujo), la columna partiendo a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 7 minutos, seguido de un gradiente de $4 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ hasta llegar a $150 \text{ }^\circ\text{C}$, que se mantuvo durante 20 minutos, con un tiempo de ejecución total de 41 minutos, siendo el gas portador nitrógeno. Los espectros de masas se obtuvieron con el CG-EM operando en modo de ionización por impacto de electrones a 70 eV , con el mismo modo de operación que el CG-FID, y teniendo helio como gas portador.

Los compuestos se identificaron comparando sus tiempos de retención (RT), y sus índices de retención lineal (LRI) se determinaron relativamente y se calcularon inyectando una solución estándar saturada de n-alcano ($\text{C}_7\text{-C}_{30}$) a $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ en hexano de grado HPLC (Supelco, Bélgica), siguiendo la definición de Van Den Dool & Kratz (1963). Los espectros de masas se compararon por similitud con los de las bibliotecas del dispositivo (Nist National Institute of Standards and Technology) y con los disponibles en referencias bibliográficas (El-Sayed 2019).

Análisis estadístico

Las respuestas de los adultos de *R. palmarum* a los bioensayos olfatométricos se analizaron mediante la prueba de Chi-cuadrado. Los insectos que no eligieron ninguno de los brazos que contenían los aromas testados fueron excluidos del análisis estadístico. Con el fin de dilucidar diferencias significativas en las respuestas máximas electroantenoográficas de las antenas de *R. palmarum* frente a los extractos de hongos entomopatógenos (respuesta EAG), la intensidad de los impulsos electroantenoográficos detectados se sometió a análisis de varianza (ANOVA), con las medias comparadas por la prueba de Tukey, con una probabilidad del 5%. Para los análisis estadísticos se usó el programa SISVAR versión 5.6 (Ferreira 2014).

Resultados

Bioensayo comportamental

En el primer bioensayo en olfatometría “Y”, en el que se analizó el comportamiento de *R. palmarum* frente a extractos hexánicos de CVAD01 (Fig. 2A), no hubo diferencias de respuesta significativas entre el extracto y el control (hexano) ni en hembras ($p = 0,53$; $\chi^2 = 0,41$; $gl = 1$) ni en machos ($p = 0,34$; $\chi^2 = 0,91$; $gl = 1$). En relación con el extracto CVAD02 (Fig. 2B), los machos de *R. palmarum* mostraron atracción significativamente mayor hacia el extracto que hacia el control ($gl = 1$; $p = 0,04$; $\chi^2 = 3,95$); en contraste, las hembras no respondieron significativamente frente al extracto ($gl = 1$; $p = 0,19$; $\chi^2 = 1,62$).

En el segundo bioensayo (Fig. 2C), cuando se expusieron machos y hembras de *R. palmarum* a placas de PDA con cultivos de CVAD01 versus control, el 67,5% de los machos mostraron preferencia por el control ($p = 0,01$; $\chi^2 = 5,52$; $gl = 1$); en cambio las hembras no mostraron diferencias de preferencia significativas ($p = 0,53$; $\chi^2 = 0,41$; $gl = 1$). Para el hongo CVAD02 cultivado en medio PDA no se observó respuesta significativa de *R. palmarum* por parte de las hembras ($p = 0,13$; $\chi^2 = 0,12$; $gl = 1$) ni de los machos ($p = 0,72$; $\chi^2 = 0,12$; $gl = 1$) (Fig. 2D).

Bioensayo eletrofisiológico

Las respuestas de EAG de *R. palmarum* frente a los extractos hexánicos de los dos hongos entomopatógenos testados resultaron significativas

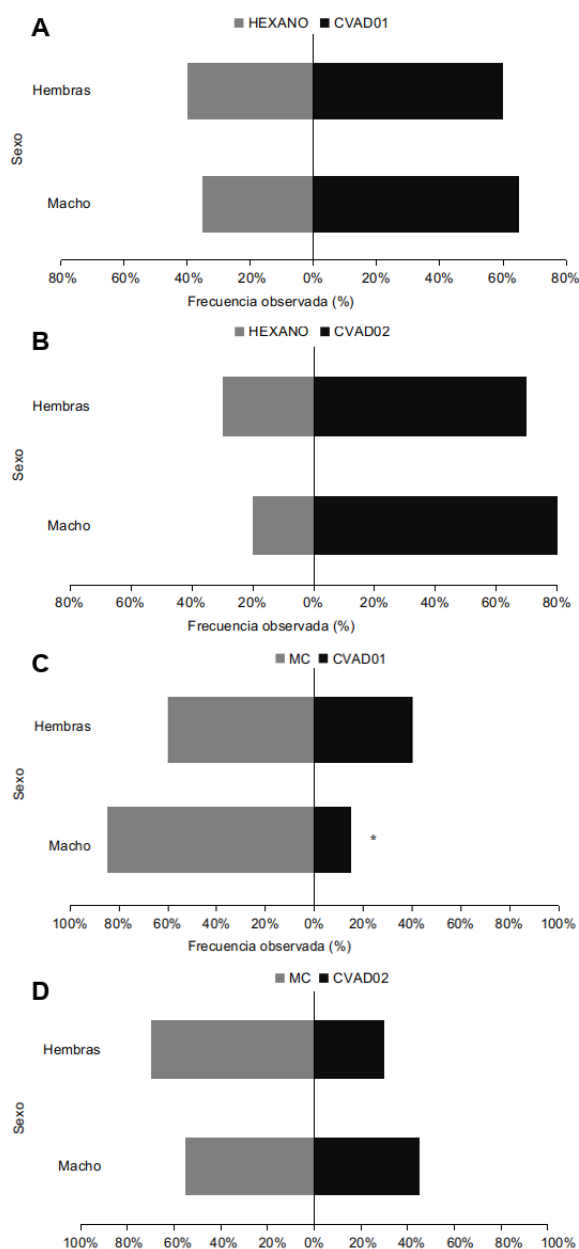


Figura 2. Respuesta porcentual de *R. palmarum* al extracto procedente del hongos entomopatógenos. **A:** CVAD01 (Hembras: $p=0,53$; $\chi^2=0,41$; Machos: $p=0,34$; $\chi^2=0,91$); **B:** CVAD02 (Hembras: $p=0,19$; $\chi^2=1,62$; Machos: $p=0,04$; $\chi^2=3,95$); **C:** CVAD01 en medio PDA, y frente al control (medio PDA sin inocular, "MC") (Hembras: $p=0,53$; $\chi^2=0,41$; Machos: $p=0,01$; $\chi^2=5,52$); **D:** CVAD02 en medio PDA, y frente al control (medio PDA sin inocular, "MC") (Hembras: $gl=1$; $p=0,13$; $\chi^2=0,12$; Machos: $p=0,72$; $\chi^2=0,12$). Para todos los ensayos $n=20$; $gl=1$. El asterisco indica diferencia significativa entre tratamientos, para el sexo indicado.

Figure 2: Response rate of *R. palmarum* to the entomopathogenic fungal extracts. **A:** CVAD01 (Females: $p=0,53$; $\chi^2=0,41$; Males: $p=0,34$; $\chi^2=0,91$); **B:** CVAD02 (Females: $p=0,19$; $\chi^2=1,62$; Males: $p=0,04$; $\chi^2=3,95$); **C:** CVAD01 grown in PDA media, and that to the control treatment (PDA media without inoculum, "MC") (Females: $p=0,53$; $\chi^2=0,41$; Males: $p=0,01$; $\chi^2=5,52$); **D:** CVAD02 grown in PDA media, and that to the control treatment (PDA media without inoculum, "MC") (Females: $gl=1$; $p=0,13$; $\chi^2=0,12$; Males: $p=0,72$; $\chi^2=0,12$). For all tests $n=20$; $fd=1$. For each sex, an asterisk indicates significant difference between treatments.

a los extractos hexánicos de los dos hongos entomopatógenos testados resultaron significativas comparadas con la provocada por el hexano (control), tanto en hembras, CVAD01 ($1,89\pm0,79$ mV) y CVAD02 ($1,83\pm0,84$ mV), (Fig. 3A), como en machos, CVAD01 ($0,68\pm0,88$ mV) y CVAD02 ($0,69\pm0,88$ mV) (Fig. 3B).

La figura 4 muestran las señales de CG-EAG representativas, donde se resaltan los picos de EAG que se repitieron en el mismo tiempo de retención en las 5 señales de CG-EAG analizadas en cada, para extractos de los hongos estudiados. Los resultados sugirieron la existencia de respuesta antenal, para machos y hembras, frente a tres componentes del extracto de CVAD01 (tiempos de retención en minutos: 16,83; 24,48 y 35,33) y frente a cuatro componentes del extracto de CVAD02 (tiempos de retención en minutos: 16,83; 18,66; 24,48 y 35,33).

Análisis por cromatografía

Los análisis cromatográficos obtenidos de las muestras de los extractos CVAD01 y CVAD02 permitieron identificar los mismos compuestos. Los compuestos identificados, cada uno con su respectivo tiempo de retención (TR), índice de retención lineal (IRL), tipo funcional y fórmula molecular se enumeran en la tabla (1). Se identificaron dos alcoholes, tres hidrocarburos aromáticos, dos monoterpenos, tres cetonas y tres hidrocarburos lineales.

Discusión

En el presente trabajo, la técnica de aireación realizada en la "capilla biológica" ha mostrado eficiencia para la captura de COVs de hongos entomopatógenos. De acuerdo con Ormond *et al.* (2011), los insectos de los órdenes Coleoptera, Isoptera, Hemiptera y Orthoptera, al detectar los COVs de los hongos entomopatógenos del orden Hypocreales, cambian su comportamiento para evitar que los parasiten. Los resultados obtenidos en olfatómetro "Y" sugieren que los COVs liberados por cultivos PDA de CVAD01 podrían tener actividad repelente para machos de *R. palmarum*; el cultivo CVAD02 no pareció actuar en el mismo sentido, incluso hubo una selección significativa de los machos por el ramal del olfatómetro que contenía extractos hexánicos de este hongo. Res

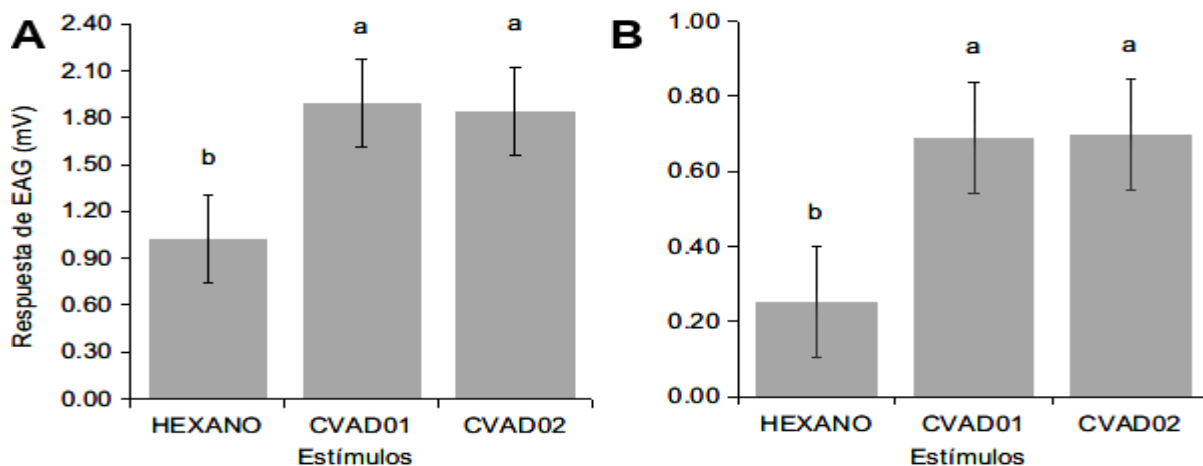


Figura 3. Respuesta de EAG (medias±error estándar) de las antenas de *R. palmarum* frente a extractos de los hongos entomopatógenos y al hexano (control). **A:** Hembras, CVAD01 (1,89±0,79 mV), CVAD02 (1,83±0,84 mV) y control (1,02±0,49 mV) (n=5), prueba de Tukey (gl= 2; p<0,01; CV%= 15,27); **B:** Machos, CVAD01 (0,68±0,88 mV), CVAD02 (0,69±0,88 mV) y control (0,25±0,38 mV), prueba de Tukey (gl= 2; p< 0,01; CV%= 12,99; Datos transformados por \sqrt{x}). Letras distintas indican diferencias significativas. Para ambos sexos n=5.

Figure 3. Electroantennographic (EAG) response (mean±standard error) of *R. palmarum* to extracts of entomopathogenic fungi and hexane (control). **A:** Females, CVAD01 (1,89±0,79 mV), CVAD02 (1,83±0,84 mV) and control (1,02±0,49 mV) (n=5), Tukey's test (df= 2; p<0,01; CV%= 15,27); **B:** Males, CVAD01 (0,68±0,88 mV), CVAD02 (0,69±0,88 mV) and control (0,25±0,38 mV), Tukey's test (df= 2; p< 0,01; CV%= 12,99; Data transformed into \sqrt{x}). Different letters represent significant difference. For both sexes n=5.

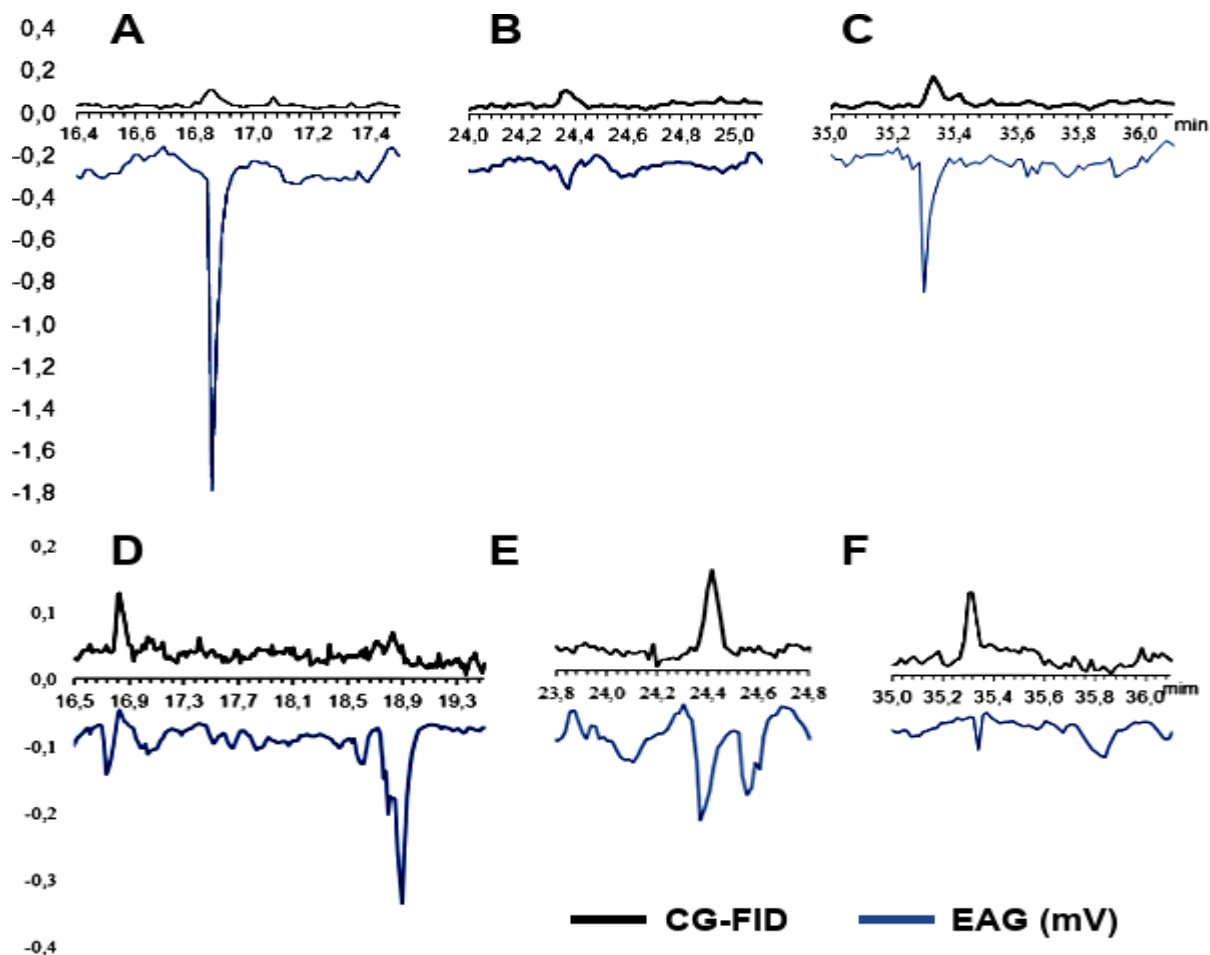


Figura 4. Respuesta electroantenográfica (GC-EAG) representativa para machos y hembras de *R. palmarum* expuestos a extractos de hongos entomopatógenos nativos (n=5). **A-C:** CVAD01, tiempos de retención (minutos) de los componentes antenalmente activos: 16,83 (A), 24,48 (B) y 35,33 (C); **D-F:** CVAD02, tiempos de retención: 16,83 y 18,66 (D), 24,48 (E) y 35,33 (F).

Figure 4. Representative GC-EAG response from males and females of *R. palmarum* to native entomopathogen extracts (n=5). **A-C:** CVAD01, retention times (minutes) of active components: 16,83 (A), 24,48 (B) y 35,33 (C). **D-F:** CVAD02, retention times: 16,83 and 18,66 (D), 24,48 (E) and 35,33 (F).

Nº	TR _{MIN}	Componente	IRL _c	Tipo funcional	Fórmula Molecular
1	10,72	1,3 Dimetil benzeno	870	Hidrocarburo aromático	C ₈ H ₁₀
2	11,87	1,2 Dimetil benzeno	891	Hidrocarburo aromático	C ₈ H ₁₀
3	14,95	2-Octen-4-ol	953	Alcohol	C ₈ H ₁₆ O
4	15,65	2-metiloctan-3-ona	968	cetona	C ₉ H ₁₈ O
5	15,67	2,5-Octanediona	968	cetona	C ₈ H ₁₄ O ₂
6	16,62	3-Isopropil-5-metil-hexan-2-ona	988	cetona	C ₁₀ H ₂₀ O
7	16,78	Mirceno	991	Monoterpeno	C ₁₀ H ₁₆
8	18,42	Limoneno	1028	Monoterpeno	C ₁₀ H ₁₆
9	18,50	2-Etil-1-hexanol	1030	Alcohol	C ₈ H ₁₈ O
10	24,67	Naftaleno	1180	Hidrocarburo aromático	C ₁₀ H ₈
11	32,49	Tetradecano	1400	Hidrocarburo lineal	C ₁₄ H ₃₀
12	35,46	Pentadecano	1499	Hidrocarburo lineal	C ₁₅ H ₃₂
13	37,03	Hexadecano	1600	Hidrocarburo lineal	C ₁₆ H ₃₄

Tabla 1. Compuestos orgánicos volátiles comunes a los extractos de los dos hongos entomopatógenos nativos, caracterizados por el método CG-EM, y sus respectivos IRL. Biblioteca de referencia (CG-EM) - (Nist- National Institute of Standards and Technology). TR_{min}: Tiempo de Retención en minutos; IRL_c - Índice de Retención Linear calculado a partir de una ecuación linear basada en los tiempos de retención de los compuestos identificados en relación con una serie homóloga de n-alcenos (C₇-C₃₀/C₁₃) (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, USA) inyectados en las mismas condiciones que las muestras.

Table 1. Volatile organic compounds from extracts of both native entomopathogenic fungi, characterized by the CG-EM method, and their respective calculated IRL. Reference library (CG-EM) - (Nist- National Institute of Standards and Technology). TR_{min}: Retention time, minutes; IRL_c - Linear Retention Index, calculated from a Linear equation based on the retention times of the components identified in relation to a homologous series of n-alkanes (C₇-C₃₀/C₁₃) (SigmaAldrich, San Luis, Missouri, USA) injected into the same conditions than the samples.

puestas de repelencia de *R. ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) fueron observadas en pruebas de olfatometría donde se utilizaron hongos entomopatógenos en esporulación versus control (Lopez-Llorca *et al.* 2017). Meyling & Pell (2006) observaron el mismo comportamiento repelente causado por *B. bassiana*, pero esta vez sobre insectos parasitoides. Concluyeron que los machos y las hembras de *Anthocoris nemorum* (L., 1760) (Heteroptera: Anthocoridae) evitaban el contacto con las superficies de las hojas inoculadas con *B. bassiana*. Este tipo de comportamiento evidencia que los artrópodos, especialmente los parasitoides, que buscan alimentos y lugares para la oviposición, evalúan su entorno mediante signos químicos relacionados con el riesgo de depredación, ya sea para sí mismos (Grostal & Dicke 2000, Venzon *et al.* 2000) o sus descendientes (Nakashima & Senoo 2003, Eitam & Blaustein 2004). Lopes *et al.* (2014) analizaron la combinación del hongo *B. bassiana* y feromona en bioensayos de olfatometría en “Y”, mediante una formulación granular en capsulas gelatinosas como estrategia de atracción y muerte contra el picudo del plátano *Cosmopolites sordidus* (Germar, 1824) (Coleoptera: Curculionidae). Concluyeron que el sistema atrayente capsular estudiado garantizó la integridad tanto del componente feromonal como de las es-

poras, sin causar repelencia de *B. bassiana* hacia *C. sordidus*. El desarrollo de una formulación atrayente considerada aceptable para el insecto diana, con una concentración adecuada del agente entomopatógeno, puede ser la clave para aumentar la eficiencia del agente de control y, además, minimizar un eventual efecto de repelencia no beneficioso en las poblaciones de enemigos naturales.

Triana *et al.* (2020) proponen realizar bioensayos electroantenográficos acoplado a cromatografía (CG-EAG) para analizar la respuesta antenal de los insectos frente a mezclas de aromas, ya que la antena del insecto responde de forma gradual y dinámica a las moléculas bioactivas presente en el extracto analizado. También Vickers *et al.* (2001) y Riffell *et al.* (2008), describen que la respuesta de la antena en relación con las plumas de olores se puede visualizar con la técnica de la electroantenografía (EAG), ya que la antena del insecto responde gradual y dinámicamente a las moléculas bioactivas presentes en el extracto analizado. Basado en esas premisas, para este trabajo el bioensayo de CG-EAG mostró la existencia de varios componentes antenalmente activos para *R. palmarum* en los extractos hexánicos de los dos hongos entomopatógenos nativos testados; las propias pruebas de EAG revelaron respuestas de baja intensidad, pero significativas, comparadas

con el control, frente a COVs de extractos hexánicos de los dos HEs nativos identificados estudiados. La eficiencia de la respuesta de los insectos está intrínsecamente correlacionada con las estructuras sensoriales en las antenas (denominadas sensilas). En *R. palmarum* las sensilas se distribuyen en una organización funcional de mosaico a lo largo de la estructura de la antena (Said *et al.* 2003). Los insectos utilizan los penachos de olores para la localización de sitios adecuados de alimentación u oviposición, para buscar huéspedes, aparearse y escapar de depredadores (Fleischer *et al.* 2017, Antony *et al.* 2018). Da Silva *et al.* (2019) describieron que las estructuras olfativas sensilares son importantes para la detección de moléculas de olores. Al entrar en los poros de la pared cuticular del sensila olfatoria, se transportan a la linfa sensilar a través de proteínas que se unen al olor (OBPs), receptores olfativos (ORs) hasta que llegan a las neuronas sensoriales olfativas que permitirá en el reconocimiento molecular e indujo una respuesta de comportamiento de insectos.

En relación con los análisis cromatográficos de los extractos CVAD01 y CVAD02, fue caracterizado un perfil común constituido por trece compuestos orgánicos volátiles, que podrían tener uso potencial para el manejo integrado de plagas de perforadores. En el mismo sentido, Lozano-Soria *et al.* (2020) caracterizaron noventa y siete compuestos orgánicos volátiles fúngicos de *B. bassiana* (Bb1TS11), *Metarhizium robertsii* J.F. Bisch., Rehner & Humber (Mr4TS04) y *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare & W. Gams (Pc123); los compuestos 3-ciclohepten-1-ona y 1,3-dimetoxibenceno presentaron repelencia para *C. sordidus*. Polezel (2017) identificó compuestos orgánicos volátiles en tres hongos filamentosos, con potencial para varias aplicaciones, ya sea en la industria farmacéutica, para la producción de antifúngicos, antimicrobianos, así como en el área agrícola, algunas de las cuales pueden usarse para controlar nematodos. Oliveira *et al.* (2017) también describieron la presencia de cuarenta y cuatro componentes volátiles producidos por *Albonectria Albonectria rigidiuscula* (Berkeley & Broome) Rossmann & Samuels obtenidos por microextracción en fase sólida (SPME). La mayoría de los componentes identificados pertenecieron a las clases de sesquiterpenos, monoterpenos, otros hidrocarburos lineales, alcoholes aldehídos, cetonas, ésteres y compuestos aromáticos. Según Silva *et*

al. (2019), entre las funciones ecológicas que desempeñan los microorganismos, se destaca la capacidad de inhibir el crecimiento de agentes fitopatógenos, ejerciendo la función de biocontroladores de enfermedades al actuar como antagonistas a través de diversos mecanismos, entre ellos la producción de compuestos orgánicos volátiles. La presencia de compuestos orgánicos volátiles en hongos entomopatógenos también ha sido descrita por Bojke *et al.* (2018). Al realizar un análisis por CG-EM, encontraron que los 63 los compuestos volátiles detectados se clasificaron en los siguientes grupos: aldehídos, cetonas, alcoholes, ésteres, ácidos, terpenos y otros. Los resultados muestran que los hongos entomopatógenos producen un perfil amplio de COVs y que estos median las interacciones entre organismos dentro y a través de diferentes nichos ecológicos (Hung *et al.* 2015). Según Holighaus & Rohlf (2016), el estudio de las interacciones entre insectos y hongos puede revelar nuevos aleloquímicos de particular beneficio para el desarrollo de estrategias innovadoras de manejo de plagas, aunque la forma con que la diversidad de COVs de hongos actúa sobre el comportamiento de los insectos es aún poco conocida.

Conclusión

La extracción de compuestos orgánicos volátiles de hongos entomopatógenos nativos mediante aireación por el sistema capilla biológica es una técnica sencilla de realizar, pero es necesario realizarla correctamente para que se obtenga el máximo rendimiento. Con las extracciones y análisis realizados se puede apreciar que es posible determinar una cantidad considerable de componentes presentes en los extractos de hongos entomopatógenos nativos. Los bioensayos por electroantografía evidenciaron respuestas antenales para los extractos. Los análisis cromatográficos obtenidos de las muestras de los extractos CVAD01 y CVAD02 permitieron la caracterización de dos alcoholes, tres hidrocarburos aromáticos, dos monoterpenos, tres cetonas y tres hidrocarburos lineales. Los resultados aquí descritos proporcionan la caracterización de perfiles de compuestos orgánicos volátiles para dos hongos entomopatógenos nativos que parasitan *R. palmarum*, que podrían tener un uso potencial en el control de plagas de insectos perforadores. Se necesita continuar con estudios más específicos en relación con el com-

portamiento de atracción y/o repelencia de picudos de las palmeras, tanto para la elección de los sistemas óptimos de control de estos insectos como para evitar una potencial actividad repelente tanto en los propios insectos diana como en sus enemigos naturales.

Agradecimientos

Agradecemos a CAPES, FAPEAL, INCT-Semioquímicos en la Agricultura y Embrapa Tabuleiros Costeiros UEP Rio Largo por el apoyo en la investigación. Al programa Renorbio/UFAL y a los amigos del LPqRN por el crecimiento profesional. Nuestro agradecimiento, también, al zootecnista y productor de coco, el señor Rogério José do Carmo da Silva y a los funcionarios Carlos André dos Santos y José Heleno de Oliveira, de la Hacienda San José, en Coruripe-AL, por el profesionalismo y gran auxilio durante las colectas, colaborando comprometidamente del principio al fin, para la concretización de este trabajo e, *in memoria*, al investigador Dr. Alessandro Riffel, profesor y amigo, que se fue dejando eternos recuerdos.

Referencias

- Alves SB. 1998. Controle microbiano de insetos. Piracicaba, SP: FEALQ, pp. 1163.
- Antony BA, Johnny J & Aldosari SA. 2018. Silencing the Odorant Binding Protein RferOBP1768 Reduces the Strong Preference of Palm Weevil for the Major Aggregation Pheromone Compound Ferrugineol. *Frontiers in Physiology* 9(252): 1-17. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00252>
- Arimura G, Ozawa R, Horiuchi JI, Nishioka T & Takabayashi J. 2001. Plant-plant interactions mediated by volatiles emitted from plants infested by spider mites. *Biochemical Systematics and Ecology* 29(10): 1049-1061. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(01\)00049-7](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(01)00049-7)
- Bojke A, Tkaczuk C, Stepnowski P & Gołębowski M. 2018. Comparison of volatile compounds released by entomopathogenic fungi. *Microbiological Research* 214: 129-136. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.06.011>
- Campos VP, Pinho RSC & Freire ES. 2010. Volatiles produced by interacting microorganisms potentially useful for the control of plant pathogens. *Ciência e Agrotecnologia* 34(3): 525-535. <https://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542010000300001>
- Cysne AQ, Cruz BA, Cunha RNV & Rocha RNC. 2013. Flutuação populacional de *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) em palmeiras oleíferas no Amazonas. *Acta Amazonica* 43(2): 197-202. <https://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672013000200010>
- Cobb NA. 1919. A new discovered nematode *Aphelenchus cocophilus* n. sp. Connected with a serious disease of the coconut palm. *West Indian Bulletin* 17 (4): 203-210
- Da Silva KB, da Silva CB, Lisboa-Ribeiro-Júnior KA, de Freitas JMD, de Freitas JD, Sanchez-Chia G, . . . Goulart Santana AE. 2019. Morphology and distribution of antennal sensilla of *Automeris liberia* (Lepidoptera: Saturniidae). *Micron* 123: 102682. <https://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2019.102682>
- De Hoog GS. 1972. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium*, *Paecilomyces* and *Acrodontium* gen. nov. *Studies in Mycology* 1: 1-41.
- Duarte AG, Lima IS, Navarro DMF & Sant'ana, AEG. 2003. Captura de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: curculionidae) em armadilhas iscadas com o feromônio de agregação e compostos voláteis de frutos do abacaxi. *Revista Brasileira de Fruticultura* 25 (1): 81-84. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452003000100024>
- Doumbia M & Hemptinne JL, D. 1998. Assessment of patch quality by ladybirds: Role of larval tracks. *Oecologia* 113: 197-202. <https://doi.org/10.1007/s004420050368>
- Dudareva N, Florence N, Dinesh NA & Orlova I. 2006. Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25(5): 417-440. <https://doi.org/10.1080/07352680600899973>
- Eitam A & Blaustein L. 2004. Oviposition habitat selection by mosquitoes in response to predator (*Notonecta maculata*) density. *Physiological Entomology* 29: 188-191. <https://doi.org/10.1111/j.0307-6962.2004.0372.x>
- El-Sayed AM. 2019. The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. Disponible en <http://www.pherobase.com> (accedido el 19-VI-2020)
- Ferreira JMS, Araújo RPC & Sarro FB. 2002. Táticas de manejo das pragas. En: *Coco, fitossanidade*. (Ferreira JMS, ed.) Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, pp. 83.
- Ferreira DF. 2014. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciencia e Agrotecnologia* 38(2): 109-112. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>
- Fernandes EKK, Angelo IC, Rangel DEN, Bahiense TC, Moraes AML, Roberts DW & Bittencourt VREP. 2011. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology* 182: 307-318. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.046>
- Fiaboe KKM & Roda AL. 2012. Predicting the potential worldwide distribution of the Red Palm Weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) using ecological niche modeling. *Florida Entomologist* 95: 659-673. <https://doi.org/10.1653/024.095.0317>
- Fleischer J, Pregitzer P, Breer H & Krieger J. 2018. Access to the odor world: olfactory receptors and their role for signal transduction in insects. *Cellular and Molecular Life Sciences* 75: 485-508. <https://doi.org/10.1007/s00033-018-1400-4>

- [10.1007/s00018-017-2627-5](https://doi.org/10.1007/s00018-017-2627-5)
- Giblin-Davis RM, Gries R, Gries G, Peña-Rojas E, Pinzón I, Peña JE, . . . Oehlschlager AC. 1997. Aggregation Pheromone of Palm Weevil, *Dynamis borassi*. *Journal of Chemical Ecology* 23: 2287-2297. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000006674.64858.f2>
- Grostal P & Dicke M. 2000. Recognising one's enemies: a functional approach to risk assessment by prey. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 47: 258-264. <https://doi.org/10.1007/s002650050663>
- Guarino S, Colazza S, Peri E, Bue PL, Germanà MP, Kuznetsova T & Soroker V. 2015. Behaviour-modifying compounds for management of the red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus* Oliver). *Pest Management Science* 71(12):1605-1610. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ps.3966>
- Holighaus G & Rohlf M. 2016. Fungal allelochemicals in insect pest management. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100(13): 5681-5689. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7573-x>
- Hung R, Lee S & Bennett J. 2015. Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(8): 3395-3405. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6494-4>
- Kandasamy D, Gershenzon J & Hammerbacher A. 2016. Volatile Organic Compounds Emitted by Fungal Associates of Conifer Bark Beetles and their Potential in Bark Beetle Control. *Journal of Chemical Ecology* 42(9): 952-969. <https://doi.org/10.1007/s10886-016-0768-x>
- Kepler RM, Luangsa-Ard JJ, Hywel-Jones NL, Alisha-Quandt C, Sung GH, Rehner SA, . . . Shrestha B. 2017. A phylogenetically-based nomenclature for Cordycipitaceae (Hypocreales). *IMA Fungus* 8(2): 335-353. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2017.08.02.08>
- Landero-torres I, Galindo-Tovar ME, Leyva-Ovalle OR, Murguía-González J, Presa-Parra E & García-Martínez MA. 2015. Evaluación de cebos para el control de *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae) en cultivos de palmas ornamentales. *Entomologia Mexico* 2: 112-118
- Leon-Martínez GA, Campos-Pinzon JC & Arguelles-Cardenas JH. 2019. Patogenicidad y autodiseminación de cepas promisorias de hongos entomopatógenos sobre *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Dryophthoridae). *Agronomía Mesoamericana* 30(3): 631-646.
- Lopes RB, Laumann R, Dave-Moore MWMO & Faria M. 2014. Combination of the fungus *Beauveria bassiana* and pheromone in an attract-and-kill strategy against the banana weevil, *Cosmopolites sordidus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 151: 75-85. <https://doi.org/10.1111/eea.12171>
- Lopez-Llorca LV, Jalinas J & Marhuenda Egea FC. 2017. Compuestos orgánicos volátiles del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* como repelentes de insectos. España, Patente de Invención, P201631534, 9 February 2017.
- Lozano-Soria A, Picciotti U, Lopez-Moya F, Lopez-Cepero J, Porcelli F & Lopez-Llorca LV. 2020. Volatile Organic Compounds from Entomopathogenic and Nematophagous Fungi, Repel Banana Black Weevil (*Cosmopolites sordidus*). *Insects* 11(8): 509. <https://doi.org/10.3390/insects11080509>
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). 2018. Pragas Quarentenárias Presentes e Ausentes no Brasil. Instrução Normativa nº 39, publicado no Diário Oficial da União, n. 190, p. 11.
- Meyling NV & Pell JK. 2006. Detection and avoidance of an entomopathogenic fungus by a generalist insect predator. *Ecological Entomology* 31(2): 162-171. <https://doi.org/10.1111/j.0307-6946.2006.00781.x>
- Myles T. 2002. Alarm, aggregation, and defense by *Reticulitermes flavipes* in response to a naturally occurring isolate of *Metarhizium anisopliae*. *Sociobiology* 40: 243-255.
- Moraes MCB, Laumann RA, Paula DP, Pareja M, Silva CC, Viera HG, . . . Borges M. 2008. Eletroantografia: a antena do inseto como um biossensor. *Boletim Técnico Embrapa* N. 270. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.
- Morath S, Hung R, Bennett J. 2012. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews* 26: 73-83. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.07.001>
- Moura JIL, Resende MLV, Sgrillo R., Nascimento LA, Romano R. 1990. Diferente tipos de armadilhas de iscas no controle de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae). *Agrotropica* 2(3): 165-169.
- Müller A, Faubert P, Hagen, M, Castell W, Polle A, Schnitzler JP & Rosenkranz M. 2013. Volatile profiles of fungi—chemotyping of species and ecological functions. *Fungal Genetics and Biology* 54: 25-33. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.02.005>
- Murguía-González J, Landero-Torres I, Leyva-Ovalle OR, Galindo-Tovar ME, Llerena-Hernandez RC & García-Martínez MA. 2018. Efficacy and Cost of Trap-Bait Combinations for Capturing *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) in Ornamental Palm Polycultures. *Neotropical Entomologic* 47: 302-310. <https://doi.org/10.1007/s13744-017-0545-8>
- Nakashima Y & Senoo N. 2003. Avoidance of ladybird trails by an aphid parasitoid *Aphidius ervi*: active period and effects of prior oviposition experience. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 109: 163-166. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2003.00094.x>
- Oliveira FC, Barbosa F, Mafezolia J, Oliveira CF, Gonçalves FJT & Freire FCO. 2017. Perfil dos componentes voláteis produzidos pelo fungo fitopatogênico *albonectria rigidiuscula* em diferentes condições de cultivo. *Química Nova* 40(8): 890-894. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170064>
- Ormond EL, Thomas AP, Pell JK, Freeman SN & Roy HE. 2011. Avoidance of a generalist entomopathogenic fungus by the ladybird, *Coccinella septempunctata*. *FEMS Microbiol Ecology* 77(2): 229-237. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01100.x>
- Polezel DR. 2017. Fungos isolados de ninhos iniciais da formiga *Atta sexdens rubropilosa*: análise do potencial para biocontrole de formigas-cortadeiras. Rio Claro, San Pablo, Brasil: Universidad Estadual

- Paulista. Disertación de Maestria.
- Rännbäck LM, Cotes B, Anderson P, Rämert B & Meyling NV. 2015. Mortality risk from entomopathogenic fungi affects oviposition behavior in the parasitoid wasp *Trybliographa rapae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 124: 78-86. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.11.003>
- Rehner SA, Minnis AM, Sung GH, Luangsa-ard JJ, Devotto L & Humber RA. 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia* 103(5): 1055-1073. <https://doi.org/10.3852/10-302>
- Rochat D, Dembilio O, Jacas J, Suma P, La Pergola A, Hamidi R, Kontodimas D & Soroker V. 2017. *Rhynchophorus ferrugineus*: Taxonomy, Distribution, Biology, and Life Cycle. En *Handbook of Major Palm Pests* (Soroker V & Colazza S, eds.), Hoboken (NJ): John Wiley & Sons Ltd, pp. 69-104. <https://doi.org/10.1002/9781119057468.ch4>
- Ruiz-Montiel C, González-Hernández H, Leyva J, Llanderal-Cazares C, Cruz-López L & Rojas JC. 2003. Evidence for a male-produced aggregation pheromone in *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology* 96(4): 1126-1131. <https://doi.org/10.1093/jee/96.4.1126>
- Riffell JA, Abrell L & Hildebrand JG. 2008. Physical processes and real-time chemical measurement of the insect olfactory environment. *Journal of Chemical Ecology* 34(7): 837-853. <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9490-7>
- Said I, Tauban D, Renou M, Mori K & Rochat D. 2003. Structure and function of the antennal sensilla of the palm weevil *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera, Curculionidae). *Journal of Insect Physiology* 49(9): 857-872. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(03\)00137-9](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(03)00137-9)
- Seiedy M, Heydari S, & Tork M. 2015. Orientation of *Hippodamia variegata* (Coleoptera: Coccinellidae) to healthy and *Beauveria bassiana*-infected *Aphis fabae* (Hemiptera: Aphididae) in an olfactometer system. *Turkish Journal of Zoology* 39: 53-58.
- Silva JM, Nascimento MS, Cristo CCN, Silva CE, Silva CS & Santos TMC. 2019. Capítulo 10. Antagonismo de *Thielaviopsis paradoxa* e *Fusarium oxysporum* por fungos rizosféricos associados à cactáceas do semiárido alagoano e eficiência de duas técnicas de avaliação. En *Impactos das Tecnologias nas Ciências Agrárias 3* (dos Santos CA & Ribeiro JC, eds.). Ponta Grossa, Brasil: Atena Editora, pp. 77-85. <http://doi.org/10.22533/at.ed.61419300910>
- Stenberg JA, Heil M, Åhman I & Björkman C. 2015. Optimizing Crops for Biocontrol of Pests and Disease. *Trends Plant Science* 20(11): 698-712. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.08.007>
- Strobel GA, Kluck K., Hess WM, Sears J, Ezra D & Vargas PN. 2007. *Muscodor albus* E-6, an endophyte of *Guazuma ulmifolia* making volatile antibiotics: isolation, characterization and experimental establishment in the host plant. *Microbiology* 153(8): 2613-2620. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/008912-0>
- Tafoya F, Whalon ME, Vandervoot C, Coombs AB & Cibrián-Tovar J. 2007. Aggregation pheromone of *Metamasius spinolae* (Coleoptera: Curculionidae): chemical analysis and field test. *Environmental Entomology* 36(1): 53-57. [https://doi.org/10.1603/0046-225x\(2007\)36\[53:apomsc\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0046-225x(2007)36[53:apomsc]2.0.co;2)
- Triana MF, França PHB, Queiroz AFO, Santos JM, Goulart HF & Santana AEG. 2020. The giant sugarcane borer (*Telchin licus*). *Plos One* 15(4): e0231689 [17]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231689>
- Tholl D, Boland W, Hansel A, Loreto F, Rose UR & Schnitzler JP. 2006. Practical approaches to plant volatile analysis. *The Plant Journal* 45(4): 540-560. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2005.02612.x>
- Vacas S, Melita O, Michaelakis A, Milonas P, Minuz R, Riolo P, . . . Navarro-LLopis V. 2017. Lures for red palm weevil trapping systems: aggregation pheromone and synthetic kairomone. *Pest Management Science* 73(1): 223-231. <https://doi.org/10.1002/ps.4289>
- Van Den Dool H & Kratz PD. 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography* 11: 463-71. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)80947-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)80947-x)
- Venzon M, Janssen A, Pallini AE, Sabelis MW. 2000. A dieta de um predador de artrópodes polífago afeta a busca de refúgio de suas presas tripes. *Comportamento Animal* 60: 369 – 375.
- Vickers NJ, Christensen TA, Baker TC & Hildebrand JG. 2001. Odour-plume dynamics influence the brain's olfactory code. *Nature* 410(6827): 466-470. <https://doi.org/10.1038/35068559>
- Wattanapongsiri A. 1966. A revision of the genera *Rhynchophorus* and *Dynamis* (Coleoptera: Curculionidae). Corvallis, Oregon, USA: Oregon State University. Tesis Doctoral. Disponible en https://ir.library.oregonstate.edu/concern/file_sets/5h73q005b (accedido el 19-VI-2020)
- Werner S, Polle A & Brinkmann N. 2016. Belowground communication: impacts of volatile organic compounds (VOCs) from soil fungi on other soil-inhabiting organisms. *Applied Microbiological Biotechnology* 100(20): 8651-8665. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7792-1>
- Wheatley RE. 2002. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81(1-4): 357-364. <https://doi.org/10.1023/a:1020592802234>
- Xu YJ, Luo F, Gao Q, Shang Y & Wang C. 2015. Metabolomics reveals insect metabolic responses associated with fungal infection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (16): 4815-4821. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8648-8>