



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós Graduação em Ecologia

**INFLUÊNCIA DOS VOLÁTEIS DO ALGODOEIRO INDUZIDOS POR HERBIVORIA NA
QUIMIOTAXIA DE *ANTHONOMUS GRANDIS* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)**

DIEGO MARTINS MAGALHÃES

Brasília – DF
Março de 2012



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós Graduação em Ecologia

**INFLUÊNCIA DOS VOLÁTEIS DO ALGODOEIRO INDUZIDOS POR HERBIVORIA NA
QUIMIOTAXIA DE *ANTHONOMUS GRANDIS* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)**

DIEGO MARTINS MAGALHÃES

Orientador: Prof. Dr. Edison Ryoiti Sujii

Co-Orientadora: Dra. Maria Carolina Blassioli Moraes

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ecologia da
Universidade de Brasília, como
requisito para obtenção do título de
Mestre em Ecologia.

Brasília – DF
Março de 2012



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

Dissertação de Mestrado

DIEGO MARTINS MAGALHÃES

Título:

“Influência dos voláteis do algodoeiro induzidos por herbivoria na quimiotaxia de *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae)”.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Edison Ryoiti Sujii
Presidente / Orientador
UnB

Profa. Dra. Ivone Rezende Diniz
Membro Titular
ZOO/UnB

Prof. Dr. Josué Sant'ana
Membro Titular
UFRGS

Profa. Dra. Cristina Schetino Bastos
Membro Suplente
FAV/UnB

Brasília, 02 de março de 2012.

Aos meus pais,
com amor e admiração.

"A gente não pode ser aquele garoto tímido toda a vida. Tem que se dar um pouco mais [...]"

Tom Jobim

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho é fruto de muita dedicação e esforço e, seguramente, não teria sido possível sem o apoio e carinho de todas as pessoas que participaram dessa trajetória de desafios. Portanto, seguem meus mais sinceros agradecimentos a todos que me acompanharam neste caminho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade de Brasília pela oportunidade de realização do mestrado.

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

À EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo suporte técnico e financeiro para o desenvolvimento do trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Edison Ryoiti Sujii pela orientação e por ser um profissional tão competente e dedicado. Agradeço ainda pela presteza e valiosas sugestões ao longo de todo o mestrado e pelo entusiasmo com que compartilha seus conhecimentos visando o crescimento de seus alunos.

À minha co-orientadora Dra. Maria Carolina Blassioli Moraes minha dívida intelectual, minha eterna admiração e estima não poderiam ser descritas em poucas linhas. Agradeço pelo entusiasmo, ajuda constante e generosidade de sua orientação. Sua orientação sempre presente e carinhosa tornou o trabalho muito mais agradável.

Aos professores Josué Sant'ana (UFRGS), Ivone Rezende Diniz (UnB) e Cristina Schetino Bastos (UnB) pelo aceite em participar da banca e pelas contribuições dada ao trabalho.

Aos pesquisadores Dr. Miguel Borges e Dr. Raúl Alberto Laumann pela atenciosa colaboração, apoio e profissionalismo durante a realização dos experimentos.

Aos professores do PPG Ecologia pelas aulas ministradas que, de algum modo, têm sua participação neste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Semioquímicos, Aline Dias, Amanda Viana, Ana Carolina “Dolores Barrios”, Ana Paula Lopes, Helio Moreira, Isabella Grisi, Jonatas Ferreira, Karen Lima, Márcio Wandré, Michely Aquino, Mirian Michereff, Priscila Sousa, Samantha da Silveira, Valdeci Gomes e Warley Dias pelo convívio diário e por tornarem nosso ambiente de trabalho o mais agradável que se poderia esperar.

À Isabella Grisi, Priscila Sousa e Warley Dias pelo fornecimento e manutenção da colônia de insetos que foi imprescindível para a realização deste trabalho.

Especialmente agradeço a Márcio Wandré, Michely Aquino e Mirian Michereff pelas sugestões, discussões e ensinamentos durante a execução do trabalho.

À Dra. Carmen Pires e aos colaboradores do Laboratório de Ecologia e Biossegurança pelo apoio, incentivo e ajuda nas coletas quando necessário.

À Dra. Débora Paula pela disponibilidade de sempre ajudar e indicações de literatura.

Aos meus amigos de mestrado Elisa Alvim, Érica Sevilha, Fernanda Bezerra, Francisco Diogo Sousa e José Maurício Quintão que compartilharam comigo esses momentos de aprendizagem. Agradeço-lhes pela companhia nas intermináveis noites de leitura de artigos, pelos finais de semana de estudo grupal, pelas horas de distração (dias temáticos) e inesquecíveis momentos de felicidade!

A todos os meus amigos pela compreensão de que a ausência muitas vezes foi necessária. Agradeço pelo incentivo, por não se esquecerem de mim durante esta etapa importante da minha vida e pela amizade extremamente importante.

À minha família agradeço por todo amor e compreensão nos momentos de ausência. Agradeço pelo incentivo ao estudo e por infundirem-me a confiança necessária para

realizar os meus sonhos. Agradeço pelo amor incondicional e por apoiarem as decisões que tomamos juntos. Agradeço pela presença, pela palavra amiga e por nosso refúgio que é o nosso lar. Obrigado pai, mãe e irmão!

A Deus por permanecer junto a mim e eu junto a Ti.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. A CULTURA DO ALGODÃO	15
2.2. O BICUDO-DO-ALGODOEIRO	17
2.3. A LAGARTA-MILITAR.....	20
2.4. O PERCEVEJO-MARROM.....	22
2.5. INTERAÇÃO INSETO-PLANTA MEDIADA POR VOLÁTEIS	23
2.6. INTERAÇÃO BICUDO-ALGODOEIRO	29
3. OBJETIVO GERAL	31
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4. HIPÓTESES	32
5. MATERIAL E MÉTODOS	33
5.1. LOCAL	33
5.2. CRIAÇÃO DOS INSETOS	33
5.2.1. <i>Anthonomus grandis</i>	33
5.2.2. <i>Euschistus heros</i>	33
5.2.3. <i>Spodoptera frugiperda</i>	34
5.3. PLANTAS	34
5.4. COLETA DE VOLÁTEIS	35
5.5. ANÁLISES QUÍMICAS DOS COVs.....	36
5.6. BIOENSAIOS COM ADULTOS DE <i>A. grandis</i>	37
5.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	41
5.8. ORIGEM DOS COMPOSTOS	42
6. RESULTADOS	43
6.1. BIOENSAIOS COM ADULTOS DE <i>A. grandis</i>	43

6.2. ANÁLISES QUÍMICAS DOS COVs.....	51
7. DISCUSSÃO	63
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
APÊNDICES	93

RESUMO

O bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), é considerado uma das pragas-chave da cotonicultura brasileira devido ao prejuízo econômico causado por sua infestação, ausência de inimigos naturais eficientes e difícil controle por inseticidas. Uma das formas de monitoramento dessa praga tem sido feita através de armadilhas contendo feromônio de agregação e tem mostrado relativo sucesso. No entanto, estudos de campo revelaram que durante o período de floração do algodoeiro o número de insetos capturados nestas armadilhas diminuiu consideravelmente, sugerindo que voláteis produzidos pela planta neste estágio fenológico podem estar envolvidos na atração do bicudo. Os objetivos do trabalho foram avaliar o perfil químico dos compostos orgânicos voláteis do algodoeiro nos diferentes estágios fenológicos e sob diferentes condições de herbivoria, bem como a atratividade destes para os adultos de *A. grandis*. Além disso, verificou-se a existência de sinergismo entre os voláteis liberados pelo algodoeiro e o feromônio de agregação emitido por machos de *A. grandis*. Assim, foram conduzidas coletas de voláteis de plantas de algodão, nos estágios vegetativo e reprodutivo, quando danificadas por insetos de diferentes guildas alimentares: o percevejo *Euschistus heros* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae), a lagarta *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) e o besouro *A. grandis*. Os extratos contendo os voláteis do algodoeiro obtidos das aerações foram usados em bioensaios em olfatômetro em “Y” para avaliar a resposta de adultos de *A. grandis* e para análises químicas, por cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. Os dados de olfatometria mostraram que os adultos de *A. grandis* foram atraídos pelos voláteis emitidos por plantas de algodão no estágio reprodutivo danificadas por co-específicos. Os voláteis induzidos por herbivoria do bicudo-do-algodoeiro em plantas no estágio reprodutivo apresentaram efeito sinérgico com o feromônio de agregação, aumentando o potencial de atração deste. Os voláteis induzidos por herbivoria de heteroespecíficos não foram atrativos para os adultos de *A. grandis*. As análises químicas mostraram que o algodoeiro produz diferentes perfis de liberação de voláteis de acordo com seu estágio fenológico e inseto que o ataca. Esse perfil foi qualitativamente semelhante, contudo apresentou diferenças quantitativas entre os tratamentos. O algodão no estágio vegetativo liberou voláteis em maior concentração quando comparado com o estágio reprodutivo. Em ambos os estágios, as maiores taxas de liberação de voláteis foram observadas nos tratamentos de herbivoria por *A. grandis*. Dessa forma, os resultados mostram que *A. grandis* usa os voláteis emitidos pelo algodoeiro danificado por co-específicos para a localização de hospedeiros e que compostos de origem terpênica estariam envolvidos em sua atratividade.

Palavras-chaves: bicudo-do-algodoeiro, compostos orgânicos voláteis, planta hospedeira.

ABSTRACT

The boll weevil, *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), is considered the major pest in cotton fields in Brazil, due to the economic losses caused by its infestation, absence of effective natural enemies and difficult to control through the insecticides usage. This pest has been successfully monitored throughout traps baited with aggregation pheromone with relative success. However, field studies showed that the number of insects caught in these traps was significantly reduced during the cotton blooming, suggesting that volatiles produced by plants in this phenological stage may be involved in the boll weevil's attraction. The objectives of this study were evaluate the chemical profile of volatile organic compounds emitted by cotton plants at different phenological stages and under different infestation conditions, as well as the attractiveness of these volatiles to adults of *A. grandis*. In addition, we verified if there is synergism between the volatiles released by cotton plants and the aggregation pheromone emitted by male boll weevils. Thus, headspace volatile were collected from cotton plants, in the vegetative and reproductive stages, and damaged by insects of different feeding guilds: the brown-stink bug *Euschistus heros* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae), the fall-armyworm *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) and the boll weevil *A. grandis*. The cotton plant extracts obtained from headspace collections were used in "Y" tube olfactometer bioassays to evaluate the boll weevil's response and for chemical analysis using gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. Olfactometry data showed that adults of *A. grandis* were attracted by volatiles emitted from cotton reproductive plants damaged by conspecific. Boll weevil's herbivore-induced volatiles in cotton reproductive plants presented a synergistic effect with the aggregation pheromone, increasing its attracting potential. Volatiles induced by heterospecific herbivores were not attractive to adults of *A. grandis*. Chemical analysis showed that cotton plants produced different volatile profiles, based on their phenological stage and attacking insects. These profiles were qualitatively similar, but showed significant quantitative differences between treatments. Vegetative cotton plants released higher volatile concentrations compared to reproductive cotton plants. In both stages, the highest released volatile rates were observed in *A. grandis* herbivore treatments. Thus, the results showed that *A. grandis* uses conspecific herbivore induced volatiles to localize hosts plants and terpenic compounds may be involved in its attractiveness.

Keywords: boll weevil, volatile organic compounds, host plant.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estruturas químicas dos quatro componentes do feromônio de agregação liberados pelos machos de *Anthonomus grandis*. **A.** (+)-*cis*-2-isopropenil-1-metilciclobutano-etanol (Grandisol). **B.** (*Z*)-3,3-dimetilcicloexilideno-etanol (Grandlure II). **C.** (*E*)-3,3-dimetilcicloexilideno-acetaldeído (Grandlure III). **D.** (*Z*)-3,3-dimetilcicloexilideno-acetaldeído (Grandlure IV).12
- Figura 2.** Fases de desenvolvimento do curculionídeo *Anthonomus grandis*. **A.** Botão com sinal de oviposição. **B.** Larva. **C.** Pupa. **D.** Adulto.....18
- Figura 3.** Lagarta-militar *Spodoptera frugiperda*.21
- Figura 4.** Adulto do percevejo-marrom *Euschistus heros*.22
- Figura 5.** Estrutura química do gossipol.24
- Figura 6.** Desenho esquemático mostrando a indução provocada pela secreção oral da lagarta *Spodoptera exigua*, que ingere ácido linolênico e no intestino médio conjuga-o ao aminoácido glutamina formando a volicitina, que quando regurgitada na planta, induz a defesa indireta.26
- Figura 7.** Estrutura química de importantes compostos voláteis de plantas envolvidos na defesa indireta. **A.** Compostos derivados do ácido shiquímico (compostos aromáticos). **B.** Voláteis verdes de planta com cadeias curtas (seis carbonos) derivados da rota da lipoxigenase. **C.** Compostos de origem terpênica. .28
- Figura 8.** Sistema *push-pull* de coleta de voláteis de plantas de algodão no estágio vegetativo. **A.** Visão geral. **B.** Detalhe para os tubos de vidro contendo o polímero adsorvente Super Q.36

Figura 9. Diagrama do sistema *push-pull* de coleta de voláteis. A planta era colocada no interior de câmaras de vidro e um filtro de carvão ativado permitia a passagem de ar bombeado e controlado por fluxômetro para dentro da câmara. Uma bomba de vácuo conectada ao tubo adsorvente permitia a circulação de ar dentro do sistema.36

Figura 10. Diagrama do sistema de bioensaios em olfatômetro em “Y”. O ar que entrava no sistema era regulado por um fluxômetro (0,6 L/min), filtrado por carvão ativado e umidificado. O fluxo era então dividido em dois, cada um se direcionava para as seringas contendo o papel filtro impregnado com os extratos de plantas de algodão. No extremo oposto, uma bomba de vácuo conectada a um fluxômetro (0,2 L/min) permitia a formação de um gradiente de odor dentro do sistema.39

Figura 11. Resposta da primeira escolha de adultos de *Anthonomus grandis* procedentes de campo e colônia para os extratos de plantas de algodão no estágio vegetativo sem injúria (controle) *versus* hexano (Hx) no olfatômetro em “Y”. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Qui-quadrado (χ^2), onde: *, 0,05 > p > 0,01. Números entre parênteses representam os bioensaios com insetos que não responderam aos estímulos odoríferos.....43

Figura 12. Porcentagem média do tempo de residência de adultos de *Anthonomus grandis* procedentes de campo e colônia no olfatômetro em “Y” para os extratos de plantas de algodão no estágio vegetativo sem injúria (controle) *versus* hexano (Hx). NS: não significativo para o teste *t* pareado.44

Figura 13. Resposta da primeira escolha de adultos de *Anthonomus grandis* para extratos de algodão no estágio vegetativo submetidos a diferentes tratamentos no olfatômetro em “Y”. Controle: planta sem injúria, Hx: hexano, HAg: injúria de herbivoria provocada por *Anthonomus grandis*, HEh: injúria de herbivoria provocada por *Euschistus heros*, HSf: injúria de herbivoria provocada por *Spodoptera frugiperda*. **A.** Respostas de machos. **B.** Respostas de fêmeas. 24 e 96 h = tempo após o início da injúria. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Qui-quadrado (χ^2), onde *, 0,05 > p > 0,01; **, 0,01 > p > 0,001, ***, p

<0,001. Números entre parênteses representam os bioensaios com insetos que não responderam aos estímulos odoríferos.45

Figura 14. Porcentagem média do tempo de residência de adultos de *Anthonomus grandis* no olfatômetro em “Y” para extratos de algodão no estágio vegetativo submetidos a diferentes tratamentos. Controle: planta sem injúria, Hx: hexano, HA_g: injúria de herbivoria provocada por *Anthonomus grandis*, HE_h: injúria de herbivoria provocada por *Euschistus heros*, HS_f: injúria de herbivoria provocada por *Spodoptera frugiperda*. **A.** Respostas de machos. **B.** Respostas de fêmeas. 24 e 96 h = tempo após o início da injúria. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste *t* pareado, onde: *, 0,05 > p >0,01; **, 0,01 > p >0,001, ***, p <0,001.46

Figura 15. Resposta da primeira escolha de adultos de *Anthonomus grandis* para extratos de algodão no estágio reprodutivo submetidos a diferentes tratamentos no olfatômetro em “Y”. Controle: planta sem injúria, Hx: hexano, HA_g: injúria de herbivoria provocada por *Anthonomus grandis*, HE_h: injúria de herbivoria provocada por *Euschistus heros*, HS_f: injúria de herbivoria provocada por *Spodoptera frugiperda*. **A.** Respostas de machos. **B.** Respostas de fêmeas. 24 e 96 h = tempo após o início da injúria. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Qui-quadrado (χ^2), onde *, 0,05 > p >0,01; **, 0,01 > p >0,001, ***, p <0,001. Números entre parênteses representam os bioensaios com insetos que não responderam aos estímulos odoríferos.47

Figura 16. Porcentagem média do tempo de residência de adultos de *Anthonomus grandis* no olfatômetro em “Y” para extratos de algodão no estágio reprodutivo submetidos a diferentes tratamentos. Controle: planta sem injúria, Hx: hexano, HA_g: injúria de herbivoria provocada por *Anthonomus grandis*, HE_h: injúria de herbivoria provocada por *Euschistus heros*, HS_f: injúria de herbivoria provocada por *Spodoptera frugiperda*. **A.** Respostas de machos. **B.** Respostas de fêmeas. 24 e 96 h = tempo após o início do dano. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste *t* pareado, onde: *, 0,05 > p >0,01; **, 0,01 > p >0,001, ***, p <0,001.48

Figura 17. Resposta da primeira escolha de adultos de *Anthonomus grandis* para extratos de algodão com injúria de herbivoria por co-específicos no estágio vegetativo (HAg Vegetativo) *versus* estágio reprodutivo (HAg Reprodutivo) no olfatômetro em “Y”. 24 e 96 h = tempo após o início da injúria. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Qui-quadrado (χ^2), onde *, $0,05 > p > 0,01$; **, $0,01 > p > 0,001$, ***, $p < 0,001$. Números entre parênteses representam os bioensaios com insetos que não responderam aos estímulos odoríferos.....**49**

Figura 18. Porcentagem média do tempo de residência de adultos de *Anthonomus grandis* no olfatômetro em “Y” para extratos de algodão com injúria de herbivoria por co-específicos no estágio vegetativo (HAg Vegetativo) *versus* estágio reprodutivo (HAg Reprodutivo). 24 e 96 h = tempo após o início da injúria. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Wilcoxon, onde: *, $0,05 > p > 0,01$; **, $0,01 > p > 0,001$, ***, $p < 0,001$**49**

Figura 19. Resposta da primeira escolha de adultos de *Anthonomus grandis* para feromônio de agregação (Feromônio) *versus* feromônio de agregação + extratos de algodão no estágio reprodutivo com injúria de herbivoria por co-específicos (Feromônio + HAg Reprodutivo) no olfatômetro em “Y”. 24 e 96 h = tempo após o início da injúria. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Qui-quadrado (χ^2), onde *, $0,05 > p > 0,01$; **, $0,01 > p > 0,001$, ***, $p < 0,001$. Números entre parênteses representam os bioensaios com insetos que não responderam aos estímulos odoríferos.**50**

Figura 20. Porcentagem média do tempo de residência de adultos de *Anthonomus grandis* no olfatômetro em “Y” para o feromônio de agregação (Feromônio) *versus* feromônio de agregação + extratos de algodão no estágio reprodutivo com injúria de herbivoria por co-específicos (Feromônio + HAg Reprodutivo). 24 e 96 h = tempo após o início da injúria. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Wilcoxon, onde: *, $0,05 > p > 0,01$; **, $0,01 > p > 0,001$, ***, $p < 0,001$**51**

Figura 21. Voláteis totais (média \pm EP) liberados por plantas de algodão nos estágios vegetativo (**A**) e reprodutivo (**B**), submetidas a diferentes tratamentos ao longo de quatro dias consecutivos. Ctrl: planta sem injúria; HAg: injúria de herbivoria provocada por *Anthonomus grandis*; HEh: injúria de herbivoria provocada por *Euschistus heros*; HSf: injúria de herbivoria provocada por *Spodoptera frugiperda*; DMec: dano mecânico. No estágio vegetativo houve diferença significativa entre os tratamentos e sua interação com o tempo (ANOVA para medidas repetidas, $P < 0,05$). Para o estágio reprodutivo, houve diferença significativa entre os tratamentos, mas não em sua interação com o tempo (ANOVA para medidas repetidas, $P < 0,05$). Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada hora não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.53

Figura 22. Perfis cromatográficos de plantas de algodão no estágio vegetativo submetidas a diferentes tratamentos: Ctrl: planta sem injúria; HAg: injúria de herbivoria provocada por *Anthonomus grandis*; HEh: injúria de herbivoria provocada por *Euschistus heros*; HSf: injúria de herbivoria provocada por *Spodoptera frugiperda*; DMec: dano mecânico. PI: padrão interno. Os cromatogramas mostram a eluição dos compostos na coluna ao longo do tempo de análise (min) e a resposta do detector (pA). Números correspondem aos compostos da **Tabela 1**.54

Figura 23. Perfis cromatográficos de plantas de algodão no estágio reprodutivo submetidas a diferentes tratamentos: Ctrl: planta sem injúria; HAg: injúria de herbivoria provocada por *Anthonomus grandis*; HEh: injúria de herbivoria provocada por *Euschistus heros*; HSf: injúria de herbivoria provocada por *Spodoptera frugiperda*; DMec: dano mecânico. PI: padrão interno. Os cromatogramas mostram a eluição dos compostos na coluna ao longo do tempo de análise (min) e a resposta do detector (pA). Números correspondem aos compostos da **Tabela 2**.55

Figura 24. Análise de Variáveis Canônicas (AVC) indicando as diferenças na composição dos voláteis de plantas de algodão em diferentes estágios fenológicos e sob diferentes tratamentos ao longo de quatro dias consecutivos. Os símbolos representam os scores individuais para cada amostra, calculados a partir da AVC

que maximiza as diferenças entre os tratamentos nas duas dimensões consideradas (CV1 e CV2). As linhas azuis representam os diferentes compostos presentes nas amostras e seu comprimento, a importância (magnitude relativa) da contribuição de cada composto para a diferenciação dos tratamentos. Veg: estágio vegetativo; Rep: estágio reprodutivo; Ctrl: planta sem injúria; HAg: injúria de herbivoria provocada por *Anthonomus grandis*; HEh: injúria de herbivoria provocada por *Euschistus heros*; HSf: injúria de herbivoria provocada por *Spodoptera frugiperda*; DMec: dano mecânico. As letras “C” acompanhadas de números representam os compostos α -Pineno (C1), Canfeno (C2), Benzaldeído (C3), β -Pineno (C4), β -Mirceno (C5), (Z)-3-Acetato de hexenila (C6), Limoneno (C7), β -Ocimeno (C8), Linalol (C9), DMNT (C10), *trans*-3-Butirato de hexenila (C11), Salicilato de metila (C12), Benzotiazol (C13), Indol (C14), *cis*-Jasmone (C15), α -Copaeno (C16), β -Cariofileno (C17), α -Guaiene (C18), Geranil acetona (C19), α -Cariofileno (C20), Aloaromadendreno (C21), Sesquiterpeno (C22), δ -Guaiene (C23), δ -Cadineno (C24) e TMTT (C25).59

Figura 25. Diagrama PRC da PRC da mistura de voláteis liberados por plantas de algodão no estágio vegetativo, submetidas a diferentes tratamentos ao longo de quatro dias consecutivos. Ctrl: planta sem injúria; HAg: injúria de herbivoria provocada por *Anthonomus grandis*; HEh: injúria de herbivoria provocada por *Euschistus heros*; HSf: injúria de herbivoria provocada por *Spodoptera frugiperda*; DMec: dano mecânico. As linhas representam o padrão de resposta das plantas de algodão aos diferentes tratamentos no tempo. Quanto maior o valor em módulo do “efeito”, maior a contribuição dos compostos no padrão de resposta dos tratamentos que divergem em relação ao controle. O valor de p indica a significância do primeiro eixo da PRC sobre o tempo, baseando-se no teste de permutação de Monte Carlo.61

Figura 26. Diagrama PRC da PRC da mistura de voláteis liberados por plantas de algodão no estágio vegetativo, submetidas a diferentes tratamentos ao longo de quatro dias consecutivos. Ctrl: planta sem injúria; HAg: injúria de herbivoria provocada por *Anthonomus grandis*; HEh: injúria de herbivoria provocada por *Euschistus heros*; HSf: injúria de herbivoria provocada por *Spodoptera frugiperda*;

DMec: dano mecânico. As linhas representam o padrão de resposta das plantas de algodão aos diferentes tratamentos no tempo. Quanto maior o valor em módulo do “efeito”, maior a contribuição dos compostos no padrão de resposta dos tratamentos que divergem em relação ao controle. O valor de p indica a significância do primeiro eixo da PRC sobre o tempo, baseando-se no teste de permutação de Monte Carlo.62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos voláteis coletados de plantas de algodão no estágio vegetativo (média \pm erro padrão da média em ng no intervalo de 24 e 96 h) submetidas a diferentes tratamentos. Ctrl: planta sem injúria; HAg: injúria de herbivoria provocada por *Anthonomus grandis*; HEh: injúria de herbivoria provocada por *Euschistus heros*; HSf: injúria de herbivoria provocada por *Spodoptera frugiperda*; DMec: dano mecânico.56

Tabela 2. Compostos voláteis coletados de plantas de algodão no estágio reprodutivo (média \pm erro padrão da média em ng no intervalo de 24 e 96 h) submetidas a diferentes tratamentos. Ctrl: planta sem injúria; HAg: injúria de herbivoria provocada por *Anthonomus grandis*; HEh: injúria de herbivoria provocada por *Euschistus heros*; HSf: injúria de herbivoria provocada por *Spodoptera frugiperda*; DMec: dano mecânico.....57

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: análise de variância	L: litro
AVC: análise de variáveis canônicas	MANOVA: análise de variância multivariada
CG: cromatografia gasosa	mg: miligrama
CG-EM: cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas	MIP: manejo integrado de pragas
cm: centímetro	mm: milímetro
COVs: compostos orgânicos voláteis	N₂: Nitrogênio
Ctrl: controle	PI: padrão interno
°C: graus Celsius	p: valor da probabilidade de uma dada distribuição
DIC: detector por ionização de chamas	pA: pico-Âmpere
DMec: dano mecânico	PRC: curvas de respostas principais
DMNT: (<i>E</i>)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno	PTFE: politetrafluoretileno
eV: elétron-volt	Rep: estágio reprodutivo
gl: graus de liberdade	s: segundo
h: hora	TMTT: (<i>E,E</i>)-4,8,12-trimetiltrideca-1,3,7,11-tetraeno
HAg: injúria provocada pela herbivoria por <i>A. grandis</i>	TDO: teoria da Defesa Ótima
HEh: injúria provocada pela herbivoria por <i>E. heros</i>	Veg: estágio vegetativo
HSf: injúria provocada pela herbivoria por <i>S. frugiperda</i>	W: Watt
Hx: hexano	µL: microlitro
IR: índice de retenção	µm: micrômetro

1. INTRODUÇÃO

O método convencional mais amplamente utilizado no controle de pragas agrícolas é o emprego de inseticidas sintéticos que, além de prejudicar a saúde humana, causa impactos ao meio ambiente, como a poluição dos solos, água e efeitos tóxicos em organismos não-alvo (BELTRÃO & AZEVEDO, 2008; GALLO et al., 2002). O uso indiscriminado de inseticidas pode também ocasionar uma série de efeitos indesejáveis, tais como a ressurgência de pragas primárias, resistência e a erupção de pragas secundárias (DEBACH & ROSEN, 1991). Alguns métodos alternativos de controle podem ser empregados no contexto do Manejo Integrado de Pragas (MIP) visando a redução do uso de produtos sintéticos na agricultura e, conseqüentemente, minimizando os impactos ambientais decorrentes da adoção exclusiva de inseticidas para controle dos surtos populacionais e seus efeitos sobre organismos benéficos (VILELA & PALLINI, 2002).

O bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), é um dos mais importantes insetos-praga da cotonicultura no Brasil, pois gera sérios prejuízos ao atacar as estruturas reprodutivas da planta, reduzindo assim a produção de fibras comercializadas. Na fase larval, o inseto se desenvolve no interior destas estruturas, onde fica protegido da ação de inseticidas de contato, atingindo, assim, apenas os adultos (ALMEIDA et al., 2008; SANTOS, 2007; BARBOSA et al., 1983). Dessa forma, as larvas induzem a queda dos botões florais e destroem as maçãs, impedindo, por fim, a formação dos capulhos (SANTOS, 2007; SILVIE et al., 2007; RAMALHO & SILVA, 1993). Além disso, a baixa porcentagem de ocorrência do controle biológico natural, aliada à alta capacidade de reprodução e a dificuldade de constatação da praga na lavoura, são obstáculos que precisam ser vencidos para minimizar os prejuízos econômicos causados por este inseto nas safras de algodão (ALMEIDA et al., 2008).

Nos últimos anos, vários estudos têm sido feitos com o intuito de compreender a comunicação química existente entre plantas e insetos herbívoros, sendo que as substâncias envolvidas na comunicação entre estes organismos, por mediarem as interações intra e inter-específicas, possuem inúmeras possibilidades

de uso no MIP. Nesse sentido, o uso de semioquímicos é um substituto potencial ou auxiliar dos métodos convencionais de controle e monitoramento populacional (BASTOS et al., 2008; VILELA & PALLINI, 2002).

Os machos de *A. grandis* produzem quatro compostos específicos, que não são sintetizados pelas fêmeas da espécie: dois alcoóis, (+)-*cis*-2-isopropenil-1-metil-ciclobutano-etanol, (*Z*)-3,3-dimetilcicloexilideno-etanol, e dois aldeídos, (*E*)-3,3-dimetilcicloexilideno-acetaldeído e (*Z*)-3,3-dimetilcicloexilideno-acetaldeído (Figura 1) (TUMLIMSON et al., 1969). Esses compostos atraem tanto fêmeas quanto machos, agindo como feromônio de agregação.

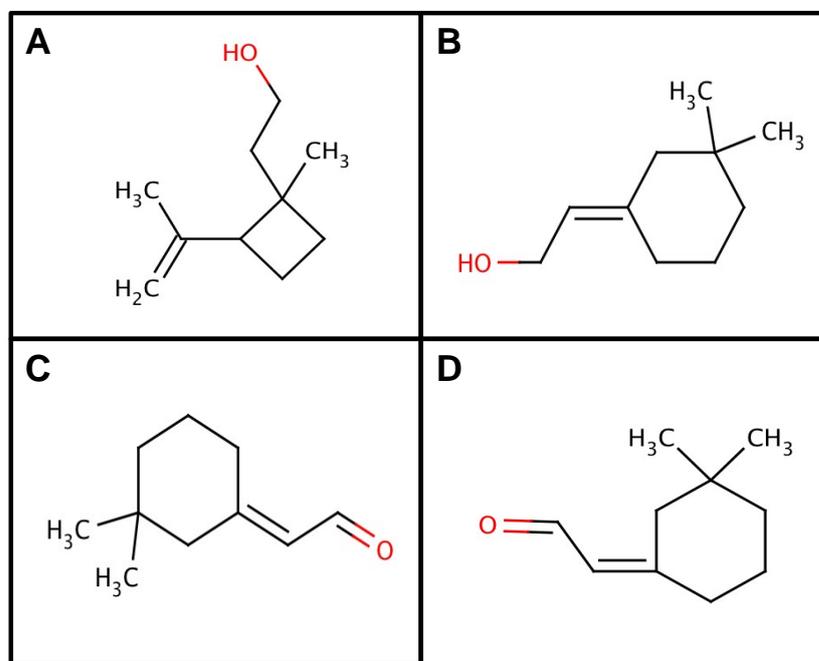


Figura 1. Estruturas químicas dos quatro componentes do feromônio de agregação liberados pelos machos de *Anthonomus grandis*. **A.** (+)-*cis*-2-isopropenil-1-metil-ciclobutano-etanol (Grandisol). **B.** (*Z*)-3,3-dimetilcicloexilideno-etanol (Grandlure II). **C.** (*E*)-3,3-dimetilcicloexilideno-acetaldeído (Grandlure III). **D.** (*Z*)-3,3-dimetilcicloexilideno-acetaldeído (Grandlure IV).

Os programas de erradicação do bicudo-do-algodoeiro nos Estados Unidos foram baseados no monitoramento sistemático das populações de adultos com armadilhas de feromônio (semioquímicos intra-específicos) associadas a aplicações de inseticidas em diferentes períodos da safra e entressafra (KNIPLING, 1986; LEGGETT, 1986). No Brasil, o controle populacional do bicudo é realizado

principalmente através de inseticidas sintéticos, necessitando uma média de 12 a 17 aplicações para seu controle (BASTOS et al., 2008; SANTOS, 2007; BARBOSA et al., 1983). Além desta prática, existem alguns programas de manejo usando armadilhas com o feromônio de agregação e Tubos Mata-Bicudo® (TMB), contendo uma mistura de feromônio e inseticidas sintéticos (PAPA, 2006; DEGRANDE, 1998a).

A formulação comercial contendo os quatro componentes do feromônio de agregação de *A. grandis* vem sendo usada com relativo sucesso para seu monitoramento populacional (SANTOS, 2007). No entanto, estudos de campo demonstraram que durante a época da floração do algodoeiro, o número de insetos capturados nas armadilhas diminui consideravelmente, já que os botões são a estrutura preferida pelo bicudo e também devido à competição com a emissão natural do feromônio (insetos infestando a lavoura) (LLOYD, 1986; RUMMEL & CURRY 1986).

Desde a década de 80 há relatos mostrando que a colonização do bicudo no algodoeiro ocorre principalmente após a formação dos primeiros botões florais, com baixa ocorrência da praga antes de seu surgimento, indicando que provavelmente alguns sinais produzidos pelo algodoeiro podem estar envolvidos na sua atração, competindo com o feromônio de agregação usado nas armadilhas no campo. Dickens (1985) e Dickens e colaboradores (1990) mostraram que a eficiência do feromônio de agregação do bicudo aumenta consideravelmente com a adição de β -bisabolol e (*E*)-2-hexan-1-ol, componentes dos voláteis do algodoeiro, sugerindo que os insetos adultos utilizam compostos orgânicos voláteis (COVs) de plantas durante a procura por hospedeiros.

O perfil dos voláteis produzido por plantas cultivadas pode mudar dependendo da variedade e estágio fenológico (HARE, 2011; ZHU & PARK, 2005). Além disso, vários estudos têm mostrado que a injúria provocada pela herbivoria ativa os sistemas de defesa direta e indireta das plantas (MORAES et al., 2008a, 2005; DE MORAES et al., 2001, 1998), mas a ação biológica destes voláteis sob co-específicos dos herbívoros atacantes ainda é pouco entendida (CARROLL et al., 2006). Dessa forma, a injúria ocasionada pela chegada dos primeiros insetos herbívoros pode induzir mudanças na produção dos metabólitos secundários –

defesa induzida –, alterando o perfil de voláteis que podem ser usados como sinais químicos pelas pragas emigrantes (ADDESSO & McAUSLANE, 2009; BICHÃO et al., 2005; KALINOVA et al., 2000). No caso do algodoeiro, foi relatado que após a chegada dos primeiros indivíduos de *A. grandis* à cultura, o recrutamento de novos indivíduos parece ser estimulado por um sinergismo entre o feromônio de agregação e os voláteis florais (LLOYD, 1986; RUMMEL & CURRY 1986).

O tipo de injúria exercida pelo herbívoro é outro fator que influencia na composição dos compostos orgânicos voláteis (HEIL, 2008). Insetos mastigadores, como a lagarta *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae), e sugadores, como o percevejo-marrom, *Euschistus heros* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae), são pragas importantes que emigram do milho e soja, respectivamente, para os algodoads. Ao colonizarem as lavouras de algodão, podem alterar o perfil de voláteis induzidos pela herbivoria e modificar o comportamento da entomofauna associada à cotonicultura. Assim, os compostos orgânicos voláteis apresentam grande importância ecológica, principalmente, no que diz respeito à dinâmica populacional e cadeias tróficas das comunidades (KESSLER & HALITSCHKE, 2007).

O conhecimento da ecologia química do curculionídeo *A. grandis* infestando o algodoeiro, *Gossypium hirsutum* Linnaeus (Malvales: Malvaceae), constitui um importante subsídio à melhoria dos métodos de monitoramento populacional e de coleta massal, possibilitando a inserção ou aprimoramento de uma alternativa ao manejo integrado desta praga. Dessa forma, este trabalho teve por objetivo avaliar o perfil químico dos COVs do algodoeiro em diferentes estágios fenológicos (vegetativo e reprodutivo) e sob diferentes condições de infestação (por co-específicos e heteroespecíficos), bem como a atratividade destes para os adultos de *A. grandis*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A CULTURA DO ALGODÃO

O algodoeiro é uma oleaginosa de hábito herbáceo-arbustivo da família Malvaceae que apresenta ampla distribuição e tem como centro de dispersão as regiões tropicais (JOLY, 1983). O gênero *Gossypium*, ao qual pertence o algodoeiro, reúne 52 espécies, contudo, apenas quatro são cultivadas e apresentam importância econômica: *G. hirsutum* L. que é uma espécie originária do México, responsável por 90% da produção mundial de fibras; *G. barbadense* L. proveniente do Peru, respondendo a pouco mais de 5% da produção mundial; *G. arboreum* L. e *G. herbaceum* L, de origem africana e asiática, correspondem juntas aos 5% restantes da produção (BOLEK et al., 2005; BARROSO & FREIRE, 2003).

Mundialmente, a espécie *G. hirsutum* é uma das dez principais culturas cultivadas, sendo plantada economicamente em mais de 60 países. No entanto, outros 150 produzem ou consomem o algodão que é destinado primariamente à indústria têxtil e alimentícia na produção de óleo e farelo para alimentação animal (BELTRÃO & AZEVEDO, 2008; CARDOSO, 2001). Atualmente são plantados mais de 33 milhões de hectares de algodão, com produção girando em torno de 25 milhões de toneladas. Os maiores países produtores de algodão são Estados Unidos, China, Índia, Paquistão, Brasil, Uzbequistão, Turquia e Austrália, em ordem crescente de produtividade (USDA/FAS, 2011).

O Brasil tem se destacado no mercado mundial como grande produtor, consumidor e exportador de algodão (USDA/FAZ, 2011). O cultivo do algodoeiro em território nacional ocorre em três regiões que diferem em características topográficas, climáticas e sócio-econômicas (BELTRÃO & AZEVEDO, 2008; CAPALBO & FONTES, 2004). A região do semi-árido no nordeste, detentora de 2,5% da produção nacional; a região Meridional (SP e PR com 10,2%) e a região Centro-Oeste, a maior produtora nacional (FONTES et al., 2006). A variedade de algodão Delta Opal (Delta & Pine) é uma cultivar recomendada para o plantio em todas as regiões do Brasil por apresentar sementes de alta qualidade e com rendimento de pluma de até 42% em um pequeno volume de sementes por hectare,

conferindo, assim, grande economia ao produtor. Além disso, possui resistência múltipla a doenças, principalmente àquelas transmitidas por pulgões (MONSANTO, 2001).

O agronegócio é uma das principais atividades econômicas para a geração de renda e ocupação de mão-de-obra no país. A cadeia do algodão movimentou um valor estimado de 120 bilhões de reais. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), na safra brasileira de 2010/2011, plantou-se 1.400,3 mil hectares, correspondendo a um aumento de 67,6% quando comparado com a safra do ano anterior. A produtividade média do algodão está prevista para 3.701 kg/ha e 1.957,9 mil toneladas, respectivamente, para o caroço e a pluma. A região que mais contribuiu para o aumento observado foi a Centro-Oeste, destacando-se os estados de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. A alta no preço e a forte redução dos estoques mundiais são fatores que ajudam a explicar o aumento observado na área plantada (CONAB, 2011).

O algodoeiro é uma planta perene de crescimento indeterminado e possui uma das mais complexas morfologias entre as plantas cultivadas (BELTRÃO & AZEVEDO, 2008). Os estágios fenológicos, vegetativo e reprodutivo, podem ocorrer simultaneamente, destacando-se quatro fases de desenvolvimento: (I) germinação e estabelecimento dos cotilédones; (II) área foliar e desenvolvimento da copa; (III) florescimento e surgimento dos botões e (IV) maturação (FONTES et al., 2006). Dependendo das condições ambientais e da cultivar, o algodoeiro apresenta ciclos com variação de 100 a 190 dias, no qual o florescimento começa aproximadamente 50 dias após a emergência das plântulas (BELTRÃO & AZEVEDO, 2008; FUZATTO, 1999).

A cultura do algodão atrai, fornece alimento e abrigo para um grupo significativo de insetos-praga que atacam as raízes, caules, folhas, botões florais, maçãs e capulhos, causando sérios prejuízos econômicos aos produtores. No Brasil, há registros de que cerca de 260 espécies de artrópodes estejam associadas à cotonicultura e destes, 20 têm potencial de infestar o algodoeiro (PAPA, 2006; SILVA et al., 1995). Destacam-se entre os insetos da parte aérea da fase inicial do ciclo de desenvolvimento do algodão, os pulgões *Aphis gossypii* Glover e *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae), devido aos danos diretos como vetores de doenças. Durante o estágio vegetativo e início do reprodutivo, lagartas

desfolhadoras como a lagarta-militar *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith e o curuquerê do algodoeiro *Alabama argillacea* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) são as principais pragas. Já no estágio reprodutivo, as pragas dominantes são o bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), a lagarta-rosada *Pectinophora gossypiella* Saunders (Lepidoptera: Gelechiidae) e a lagarta da maçã *Heliothis virescens* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) (GONDIM et al., 1999). Além destas, uma série de percevejos migrantes da soja como *Euschistus heros* Fabricius, *Nezara viridula* Linnaeus e *Piezodorus guildinii* Westwood (Hemiptera: Pentatomidae) vem causando sérios prejuízos ao atacarem as maçãs, comprometendo a qualidade das fibras produzidas (DEGENHARDT et al., 2011; RIBEIRO et al., 2000).

2.2. O BICUDO-DO-ALGODOEIRO

O bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), pertence ao gênero *Anthonomus* o qual possui mais de 350 espécies catalogadas (BURKE, 1986). Este inseto foi descrito em meados do século XIX, com base em material proveniente da cidade de Vera Cruz no México e, a princípio, sem associação a hospedeiro algum (GABRIEL, 2002; BRAGA-SOBRINHO & LUKEFAHR, 1983). Estudos filogenéticos posteriores, revelaram que o possível hospedeiro original de *A. grandis* consistia em espécies do gênero *Hampea* (Malvales: Malvaceae) e com o tempo transferiu-se para o gênero *Gossypium* (JONES, 2001; MANESSI, 1997).

O bicudo foi registrado pela primeira vez nos Estados Unidos em 1892, posteriormente disseminou-se para Venezuela em 1949 e, a partir daí, para Colômbia em 1950 (BURKE, 1986). No Brasil, os primeiros registros de *A. grandis* datam de 1983, no estado de São Paulo (BARBOSA et al., 1983). Em 1985, o bicudo já havia se dispersado por mais de 350 mil hectares de algodão em São Paulo e em vários estados do Nordeste (SILVA et al., 1995). Na região Centro-Oeste a primeira ocorrência foi detectada no Mato Grosso, em 1993 (BASTOS et al., 2005).

A metamorfose do bicudo-do-algodoeiro é do tipo holometábola, passando, portanto, pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto (Figura 2) (ALMEIDA et al., 2008). O ciclo biológico é relativamente curto, aproximadamente 25 dias, o que permite a

ocorrência de quatro a seis gerações durante uma safra, dependendo das condições de umidade e temperatura (SANTOS, 2001; TEIXEIRA & ALVES, 1996). O processo de infestação se inicia quando os botões florais do algodoeiro atingem cerca de 6 mm de diâmetro. Os ovos são depositados isoladamente no interior destes botões e das maçãs, a uma taxa de sete a 11 ovos por fêmea por dia, podendo atingir um montante final de até 300 ovos por fêmea durante seu ciclo de vida (ALMEIDA et al., 2008; TEIXEIRA & ALVES, 1996).

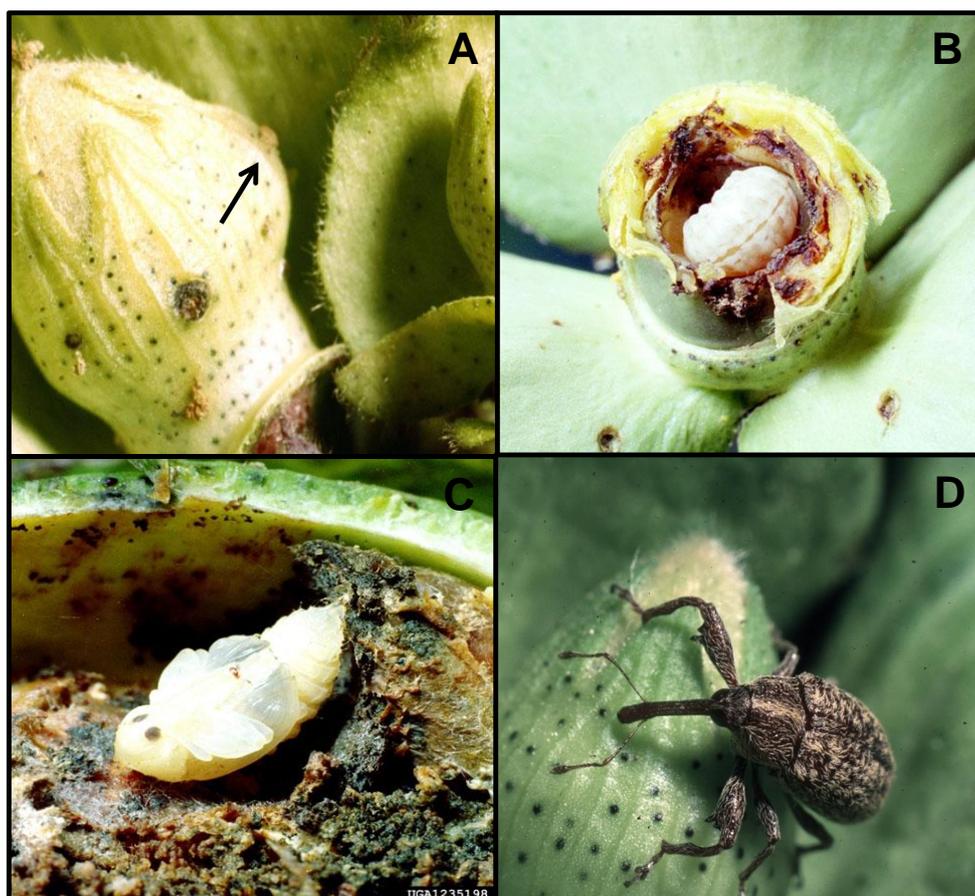


Figura 2. Fases de desenvolvimento do curculionídeo *Anthonomus grandis*. **A.** Botão com sinal de oviposição. **B.** Larva. **C.** Pupa. **D.** Adulto.

O período de incubação dos ovos varia de dois a quatro dias, eclodindo então as larvas. Estas se alimentam no interior das maçãs e botões, passando por três ínstares com duração média total de oito dias. O período pupal que se segue, dura de quatro a seis dias. Os adultos apresentam longevidade média de 40 dias, dependendo das condições ambientais, e precisam se alimentar por sete dias para, enfim, copular e produzir mais ovos, dando início a um novo ciclo (ALVAREZ, 1990).

O bicudo-do-algodoeiro é encontrado geralmente nos botões florais, sendo os adultos ativos das 6 h às 18 h, com pico de atividade das 9 h às 12 h (AQUINO et al., 1986). A presença do bicudo nos campos de algodão pode ser inferida a partir da observação da abertura das brácteas dos botões florais (BRAGA-SOBRINHO & LUKEFAHR, 1983). Após a alimentação e/ou oviposição, os botões podem permanecer fixados à planta por até nove dias, quando sofrem abscisão e caem no solo (ALMEIDA et al., 2008). Na ausência de estruturas reprodutivas do algodoeiro, o bicudo pode ainda se alimentar de folhas jovens, do pecíolo e da parte terminal dos caules (DEGRANDE, 1998a; 1991). No Brasil, o período mais crítico para a cultura do algodão é entre 50 e 90 dias após a emergência das plantas, quando se define cerca de 80% da produção (GONDIM et al., 1999). Há registros de perdas provocadas por *A. grandis* de até 84% da área total plantada (DEGRANDE, 1998b; RAMALHO, 1994).

Anthonomus grandis apresenta cerca de 40 espécies de inimigos naturais, quer sejam parasitas ou predadores (BRAGA-SOBRINHO & LUKEFHAR, 1983). Contudo, estes inimigos naturais não funcionam efetivamente no controle das populações de *A. grandis*, mesmo na área considerada como centro de origem do inseto. Pode-se destacar: as formigas do gênero *Solenopsis* (Hymenoptera: Formicidae) como predadores dos estágios imaturos do bicudo; o ectoparasitoide *Catolaccus grandis* Burk (Hymenoptera: Pteromalidae) cujas taxas de parasitismos foram consideradas altas, porém este parasitoide apresentou ineficiência de estabelecimento nos locais de liberação nas regiões do Mississippi nos Estados Unidos; e os parasitoides do gênero *Bracon* (Hymenoptera: Braconidae) que são capazes de colonizar a fase larval e pupal do bicudo, contudo com baixo índice de parasitismo (média de 5% de controle) (MIRANDA, 2006; BASTOS et al., 2005; DEGRANDE, 1991).

A cotonicultura demanda um alto investimento em agrotóxicos devido ao complexo de pragas que a ataca. O uso de produtos sintéticos para o controle de insetos-praga pode chegar a 25% do custo da produção de algodão (ALMEIDA et al., 2008; GALLO et al., 2002). No Brasil, o controle efetivo do bicudo-do-algodoeiro é feito mediante o uso intensivo de inseticidas sintéticos, requerendo uma média de 17 aplicações por ciclo de cultivo (ALMEIDA et al., 2008; FONTES et al., 2006). De maneira geral, os agricultores brasileiros não levam em consideração os efeitos

colaterais que o uso indiscriminado de agrotóxicos pode causar aos artrópodes benéficos, ao agroecossistema e à própria saúde dos trabalhadores rurais (ALMEIDA et al, 2008). Dentre estes efeitos, a ressurgência de pragas-chave, a erupção de pragas secundárias, o aparecimento de populações resistentes e a elevação das doses e frequência de pulverização de agrotóxicos são fatores que contribuem para o aumento no custo de medidas de controle de pragas (BELTRÃO & AZEVEDO, 2008).

O feromônio do bicudo-do-algodeiro é produzido pelos machos e tem potencial de atração a ambos os sexos, sendo, portanto, classificado como feromônio de agregação (TUMLINSON et al., 1969). Ele é produzido após se alimentarem de botões florais e maçãs, e expelido junto às fezes (LEGGETT, 1986). A formulação sintética do feromônio de agregação já é comercializada e amplamente empregada nas culturas de algodão. Dessa forma, o uso de armadilhas contendo feromônio constitui-se em uma ferramenta importante para determinar o momento certo e a quantidade de aplicações de agrotóxicos a serem usados (FONTES et al., 2006). Essas armadilhas têm sido utilizadas com relativa eficiência para monitorar infestações e determinar a distribuição de bicudos no campo. No estado de Goiás, tem sido usado Tubos Mata-Bicudo® (TMB), uma armadilha impregnada com o inseticida Malathion e o feromônio sintético, para supressão da população remanescente no período da entressafra (FERREIRA & ECHER, 2003).

Nos Estados Unidos, a erradicação de *A. grandis* se deu através do uso combinado de produtos químicos e métodos de manejo cultural e legislativo – uso de cultivares de ciclo curto e cumprimento das datas limites de plantio e destruição de soqueiras da safra anterior (BARBOSA et al., 1986). Um amplo programa de erradicação do bicudo-do-algodeiro foi instalado no oeste do país no final da década de 90. Atualmente, o bicudo é considerado um problema apenas em regiões específicas dos estados do Texas, Arkansas e Louisiana (TORRES & RUBERSON, 2009).

2.3. A LAGARTA-MILITAR

A lagarta-militar, *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) é a praga-chave da cultura do milho no Brasil. No entanto, trata-se de uma espécie

polífaga capaz de atacar outras culturas economicamente importantes, como: sorgo, trigo, arroz, algodão, tomate, amendoim, batata, repolho, abóbora e couve (Figura 3) (CRUZ et al., 1999). Nos últimos anos, *S. frugiperda* tem se destacado como importante praga na cotonicultura brasileira, principalmente nas regiões produtoras do Centro-Oeste (FITT et al., 2006).



Figura 3. Lagarta-militar *Spodoptera frugiperda*.

A cultura do milho é plantada durante o ano inteiro no Brasil (safra/safrinha/inverno) e o período de colheita da primeira safra e plantio da safrinha coincidem com o ciclo de cultivo do algodão. Dessa forma, *S. frugiperda* encontra condições favoráveis para o seu desenvolvimento, migrando de uma cultura para outra, tornando-se bastante frequente nas lavouras de algodão (PAPA, 2005).

No algodoeiro, a lagarta-militar pode causar injúrias durante todo o ciclo de desenvolvimento da planta (SANTOS, 2001). Em sistemas de plantio direto, as lagartas danificam as plântulas, cortando-as acima do coleto ou raspando as folhas, as quais ficam necrosadas e com aspecto translúcido. Ao longo do desenvolvimento do algodoeiro, a lagarta-militar apresenta preferência por danificar as estruturas reprodutivas da planta (GALLO et al., 2002; SANTOS, 2001). Ainda não existem dados confiáveis sobre o percentual de perda provocado por *S. frugiperda* nas culturas de algodão do Brasil (FONTES et al., 2006).

2.4. O PERCEVEJO-MARROM

O percevejo-marrom, *Euschistus heros* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae), é considerado uma das mais importantes pragas da cultura da soja no Brasil, ocorrendo desde o norte do estado do Paraná até a região Centro-Oeste (Figura 4) (BORGES et al., 2011; CORRÊA-FERREIRA & PANIZZI, 1999). Nas últimas safras, a incidência de percevejos da família Pentatomidae tem aumentado nas culturas de algodão, principalmente onde há o plantio de variedades de ciclo tardio (PAPA, 2006). Nos Estados Unidos, o complexo de percevejos pentatomídeos provocou a perda de 24 mil toneladas de algodão, tornando-se o terceiro grupo de pragas que mais causou danos à cotonicultura em 2009 (WILLIAMS, 2009).



Foto: Raül A. Laumann

Figura 4: Adulto do percevejo-marrom *Euschistus heros*.

No período de colheita da soja, de fevereiro a maio, o algodoeiro está na fase de transição do estágio vegetativo para o reprodutivo, surgindo os primeiros botões florais. É durante este período que a cultura do algodão sofre o ataque dos percevejos migrantes da soja, destacando-se o percevejo-marrom (SORIA et al., 2010a; SANTOS, 2001). Estes percevejos migrantes podem provocar a abscisão dos botões florais e destruição das maçãs (MARUR & RUANO, 2002).

Estudos realizados em campos de algodão *Bt* (NuOpal) e não-*Bt* (DeltaOpal), em Dourados-MS, evidenciaram a presença de três espécies de percevejos migrantes das culturas de soja: *E. heros*, *N. viridula* e *Edessa meditabunda* Fabricius

(Hemiptera: Pentatomidae). Destes, *E. heros* foi a espécie mais abundante, em ambos os campos, inclusive com incidência de ninfas (SORIA et al., 2010b). As lavouras com cultivos de algodão *Bt* costumam receber menores quantidades de defensivos químicos, aumentando a susceptibilidade de invasão por percevejos migrantes da soja. (FITT et al., 2006).

2.5. INTERAÇÃO INSETO-PLANTA MEDIADA POR VOLÁTEIS

Evolutivamente, as plantas desenvolveram a habilidade de reconhecer e responder ao ataque de insetos herbívoros. Dentre as estratégias defensivas utilizadas pelas plantas, tem-se as defesas direta e indireta. Na defesa direta, as características morfológicas, tais como tricomas, espinhos e superfícies cerosas, no geral, agem negativamente sobre os insetos. Além disso, características químicas, através da produção de metabólitos secundários ou via proteínas defensivas especializadas (inibidores de proteinase), provocam ação repelente, supressora de alimentação e oviposição ou redutora de digestibilidade (ARIMURA et al., 2005; CORTESERO et al., 2000; DICKE, 1994). Assim, os mecanismos de defesa direta podem alterar a biologia ou o comportamento de insetos herbívoros.

No algodão, a principal causa física da resistência a insetos está relacionada à radiação emitida pelas folhas, flores e maçãs (BASTOS et al., 2008). Com relação aos caracteres morfológicos, já foi avaliado que a bráctea frego, folhas do tipo *okra*, alta pilosidade, plantas glabras e a ausência de nectários extraflorais são estruturas que conferem resistência a diversos insetos (ZARPAS et al., 2006; VIDAL-NETO et al., 2005; RAUGHUMARAN et al 2004). Além dessas características, existe uma série de substâncias provenientes do metabolismo secundário do algodoeiro que atuam na defesa direta, como os ácidos fenólicos e os flavonóides que podem ser encontrados em estruturas especializadas, como as glândulas que armazenam o gossipol, um aldeído polifenólico de origem terpênica tóxico a muitos insetos e plantas (Figura 5) (BASTOS et. al 2008; HEDIN & MACCARTY, 1995). O gossipol é um composto de grande interesse medicinal devido às propriedades anticancerígenas e efeito tóxico em humanos e não-ruminantes. Seu efeito em insetos é bastante diversificado, mas, no geral, pode levar a uma redução do peso e do tempo de desenvolvimento dos primeiros estágios de vida, como observado nas

lagartas *Pectinophora gossypiella* Saunders (Lepidoptera: Gelechiidae) (WILLIAMS et al., 2011; CARRIÈRE et al., 2004) e *Heliothis armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) (KONG & ZHU, 2010). No entanto, o gossipol não apresenta efeitos significativos na sobrevivência de insetos e vários herbívoros como *Heliothis virescens* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) e *A. grandis* parecem não ser afetados pelas quantidades deste composto no algodoeiro (HEDIN et al., 1992). Estudos com *A. grandis* mostraram que as fêmeas preferem ovipositar em cultivares de algodão que apresentam maiores concentrações de gossipol quando comparado com cultivares com pouco ou sem gossipol (HEDIN & MACCARTY, 1995).

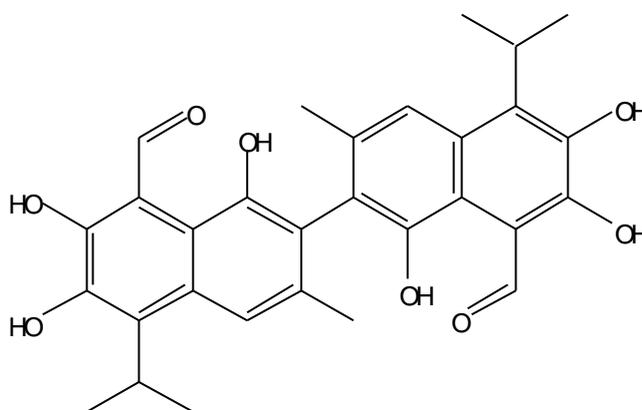


Figura 5. Estrutura química do gossipol.

A defesa indireta envolve a atração de inimigos naturais dos herbívoros que atacam a planta, por meio da produção de nectários extraflorais, domáceas e COVs (CHEN, 2008; HEIL, 2008). Estudos mostraram que algodoeiros danificados por herbivoria das lagartas *S. frugiperda* e *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) liberam uma mistura de voláteis diferente daquela liberada pelas plantas sem injúria, sendo que esses voláteis induzidos por herbivoria atraíram os parasitóides *Microplitis croceipes* Cresson e *Cotesia marginiventris* Cresson (Hymenoptera: Braconidae) (RÖSE et al., 1998). Um estudo mais recente mostrou que duas cultivares de algodão, uma *Bt* e sua variedade parental, quando danificadas pela lagarta *S. frugiperda*, também emitiram COVs induzidos por herbivoria com propriedades atrativas para o parasitoide *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (MORAES et al., 2011).

As defesas nas plantas podem ser constitutivas – continuamente expressas e não-dependentes da ação de agentes agressores – ou induzidas, expressas somente após a ocorrência de eventos de herbivoria, como nos exemplos

supracitados, onde o algodoeiro teve sua defesa indireta induzida (PIETERSE & DICKE, 2007).

Quando herbívoros se alimentam de uma planta, há a liberação de COVs a partir do local da injúria, como resultado de danos provocados aos tecidos celulares (DUDAREVA et al., 2006). Entretanto, a emissão destes voláteis não se restringe apenas ao local do dano, podendo ocorrer uma resposta sistêmica da planta (RÖSE et al., 2005; 1996; TURLINGS & TUMLINSON, 1992). A função primária dos COVs induzidos por herbivoria é defender as plantas contra os herbívoros, quer seja através de suas propriedades tóxica, repelente ou deterrente, quer seja atraindo os inimigos naturais dos herbívoros em ataque (DUDAREVA et al., 2006). A resposta da planta depende do nível de indução e das habilidades dos inimigos naturais em discriminar os odores emitidos. Tais respostas podem ser consideradas adaptativas, uma vez que levam à redução na densidade de insetos herbívoros (DICKE, 1995).

A maioria dos estudos acerca da emissão de voláteis induzidos por herbivoria tem se concentrado nos efeitos destes sobre o comportamento do terceiro nível trófico, mostrando um efeito positivo para a planta ao atrair os inimigos naturais. Contudo, o aumento na produção de voláteis observado em plantas que sofreram herbivoria pode destacá-las das plantas vizinhas, representando, assim, um risco, já que insetos herbívoros utilizam sinais emitidos pelas plantas para localizar alimento (ADDESSO et al., 2011; ADDESSO & MCAUSLANE, 2009; SZENDREI et al., 2009; KALINOVÁ et al., 2000; BOLTER et al., 1997; MECHABER, 1992). Logo, nem sempre os COVs induzidos por herbivoria podem ser benéficos às plantas, havendo casos de atração de herbívoros por estes voláteis, resultando em maior ataque (DUDAREVA et al., 2006). Os sinais emitidos podem representar uma fonte de alimento com competidores ou elevado risco de potenciais inimigos naturais. Neste sentido, não é possível prever quando os herbívoros serão atraídos por estes voláteis ou se eles se utilizarão destes para evitar plantas infestadas (BOLTER et al., 1997). Há registros na literatura da ocorrência de ambos os casos: o pulgão *A. gossypii* evitou os voláteis emitidos por plantas de algodão infestadas por co-específicos (HEGDE et al., 2011). Alternativamente, lagartas de *S. frugiperda* foram atraídas por voláteis de milho com e sem herbivoria, entretanto, observou-se maior preferência por plantas infestadas por co-específicos (CARROLL et al., 2006).

Plantas sem injúria ou danificadas mecanicamente apresentam um perfil de voláteis diferente daquele observado em plantas que sofreram ataque de insetos herbívoros. Elas podem emitir em pequenas quantidades ou simplesmente não emitir aqueles voláteis induzidos pela herbivoria (RÖSE et al., 1998; DICKE et al., 1990; TURLINGS et al., 1990). Os voláteis emitidos devido à ação de herbívoros são induzidos por substâncias indutoras presentes na saliva dos insetos ou produzidos durante a alimentação. Estes compostos são liberados nas secreções orais destes herbívoros, podendo, portanto, ser definidos como espécie-específicos (DE MORAES et al., 1998; PARÉ & TUMLINSON, 1998). Um exemplo é a volicitina um conjugado do ácido linolênico (obtido das plantas) e da glutamina (aminoácido do inseto) que é produzida por lagartas de *S. exigua* durante a sua alimentação e quando regurgitada, induz a defesa indireta da planta (Figura 6) (ALBORN et al., 1997).

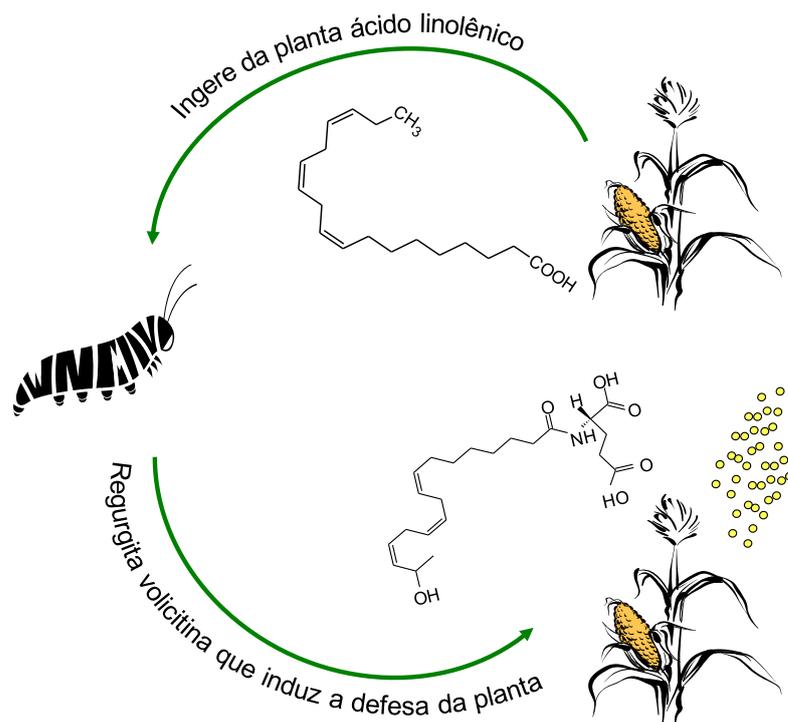


Figura 6. Desenho esquemático mostrando a indução provocada pela secreção oral da lagarta *Spodoptera exigua*, que ingere ácido linolênico e no intestino médio conjuga-o ao aminoácido glutamina formando a volicitina que, quando regurgitada na planta, induz a defesa indireta.

O tipo de dano exercido pelo herbívoro é outro fator que influencia na composição dos COVs. Os insetos de hábito mastigador induzem principalmente a

produção de voláteis através da rota do ácido jasmônico, enquanto os sugadores induzem principalmente a rota do ácido chiquímico (MICHEREFF et al, 2011; HEIL, 2008; SMITH & BOIKO, 2007). Além disso, o estágio fenológico da planta, bem como as diferentes variedades de uma mesma espécie, permitem variações na composição qualitativa e quantitativa destes voláteis (HARE, 2011; ZHU & PARK, 2005). Trabalhos com diferentes variedades de algodão infestadas por lagartas de *S. exigua* apresentaram composição qualitativa diferenciada. Os compostos (*E*)-2-hexenal, (*Z*)-3-hexen-1-ol, α -pineno, β -pineno, mirceno, (*Z*)-3-acetato de hexenila, (*E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (DMNT), indol, β -cariofileno, α -humuleno, β -farneseno, α -farneseno, nerolidol e (*E,E*)-4,8,12-trimetiltrideca-1,3,7,11-tetraeno (TMTT) foram induzidos após o ataque de herbivoria de *S. exigua* na cultivar de algodão Delta Pine 5415 (RODRIGUEZ-SAONA et al., 2003). Já a cultivar Delta Pine Acala 90, quando submetida ao mesmo tratamento de herbivoria, emitiu os compostos (*E*)-2-hexenal, (*Z*)-3-hexen-1-ol, α -pineno, β -pineno, mirceno, (*Z*)-3-acetato de hexenila, (*Z*)-3-isobutirato de hexenila, (*Z*)-3-butirato de hexenila, (*E*)-2-butirato de hexenila, limoneno, β -ocimento, linalol, DMNT, indol, jasmona, β -cariofileno, α -humuleno, β -farneseno, α -farneseno e TMTT (PARÉ & TUMLINSON, 1998). Nestes casos, a variedade Delta Pine Acala 90 apresentou algumas variações quanto à liberação de terpenoides (cíclicos e acíclicos) e butiratos de hexenila.

Os compostos induzidos pela herbivoria geralmente são formados por alcoóis, ésteres, aldeídos e terpenoides (DUDAREVA et al., 2006). Dentre estes, os voláteis verdes de planta (*green-leaf-volatiles*), derivados da rota da lipoxigenase, são geralmente emitidos imediatamente após a indução (DUDAREVA et al., 2006; GATEHOUSE, 2002). Diferentemente de alguns ésteres e terpenoides, que não são armazenados na planta, sendo produzidos *de novo* quando induzidos pela herbivoria tendo, assim, sua liberação tardia (Figura 7) (MORAES et al., 2009; DUDAREVA et al, 2006; PARÉ & TUMLINSON, 1998).

Estudos relacionados à comunicação química entre insetos e plantas constituem um importante passo para o desenvolvimento de ferramentas que podem ser aplicadas no MIP. A identificação dos compostos orgânicos voláteis emitidos pela herbivoria e suas interações com os insetos, sejam eles herbívoros ou inimigos naturais, pode gerar o estabelecimento de medidas alternativas ao uso de

agrotóxicos. Um exemplo de sucesso do uso de voláteis de plantas no manejo de pragas é o sistema *push-pull* do milho, implementado no Quênia (COOK et al., 2007). Este sistema consiste na manipulação do comportamento de insetos-pragas, bem como de seus inimigos naturais, por meio da integração de estímulos que mascarem ou protejam a cultura de interesse (*push*), enquanto outra fonte de estímulos os atraem para uma cultura armadilha (*pull*) (MILLER & COWLES, 1990). Em plantações de milho na África, tem sido utilizado as espécies *Melinis minutiflora* Beauv. (Poaceae), *Desmodium uncinatum* Jacq. (Fabaceae) e *Desmodium intortum* Mill. (Fabaceae) como o fator *push* e as gramíneas *Pennisetum purpureum* Schum (Poaceae) e *Sorghum vulgare sudanense* L. (Poaceae) como cultura armadilha (*pull*) (COOK et al., 2007).

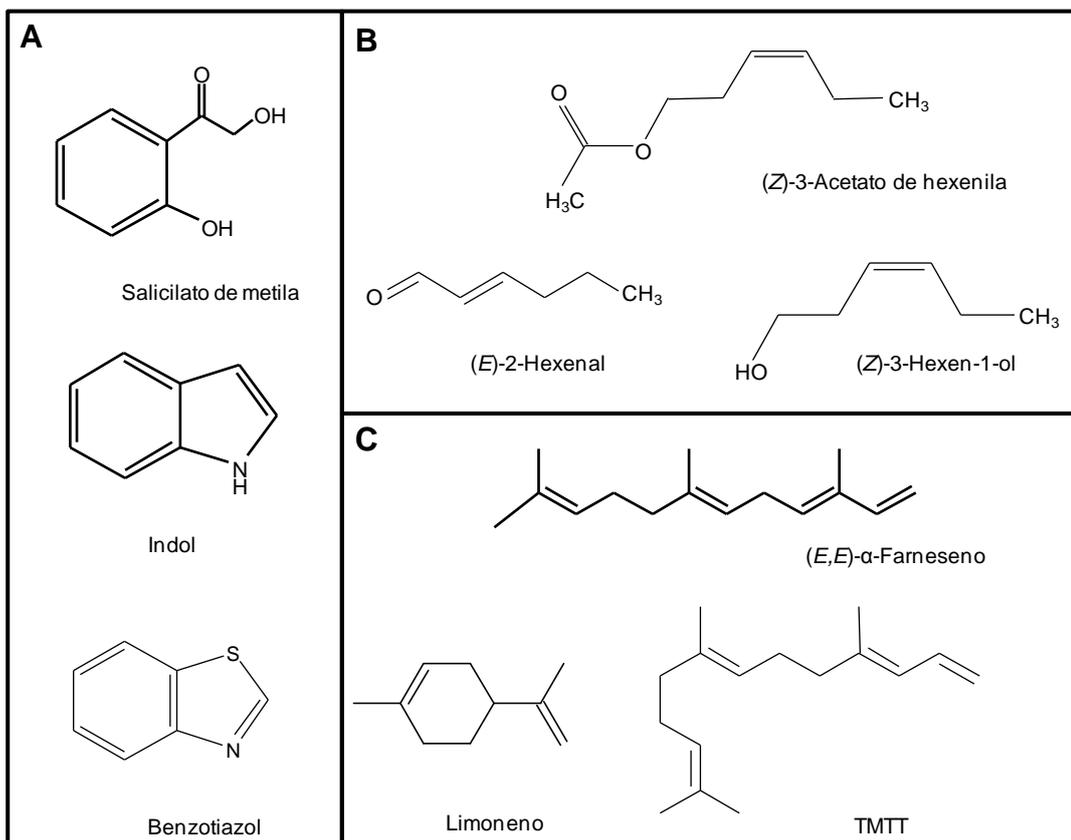


Figura 7. Estrutura química de importantes compostos voláteis de plantas envolvidos na defesa indireta. **A.** Compostos derivados do ácido shiquímico (compostos aromáticos). **B.** Voláteis verdes de planta com cadeias curtas (seis carbonos) derivados da rota da lipoxigenase. **C.** Compostos de origem terpênica.

2.6. INTERAÇÃO BICUDO-ALGODOEIRO

Algumas espécies de coleópteros têm sua orientação para buscar hospedeiros ou encontrar parceiros sexuais exercida pela liberação do feromônio de agregação em suas fezes, a exemplo do curculionídeo *A. grandis* (DICKENS, 1984). Outra característica importante de coleópteros da família Curculionidae é o alto grau de especificidade para hospedeiros, como o observado no bicudo-do-algodoeiro, que apresenta preferência para se alimentar e reproduzir em botões florais de algodoeiros (LLOYD, 1986).

Há indicações de que os machos do bicudo-do-algodoeiro sejam os responsáveis pela busca de um hospedeiro ideal (TUMLINSON et al., 1969; HARDEE et al., 1969). Durante o período da entressafra, o bicudo-do-algodoeiro permanece em áreas de refúgio próximas aos campos de plantio e se alimenta de pólen, principalmente, de plantas da família Smilacaceae, característica de áreas degradadas (RIBEIRO et al., 2010). Os algodoads exercem um papel importante na atração dos primeiros insetos que iniciam o processo de colonização. A migração dos bicudos para as lavouras de algodão tem início com a produção dos primeiros botões florais (RUMMEL & CURRY, 1986). Os machos migrantes se alimentam dos primórdios de estruturas reprodutivas do algodoeiro e, então, começam a produção do feromônio de agregação, intensificando a chegada de novos indivíduos à cultura (TUMLINSON et al., 1969). No entanto, existem bicudos que podem chegar antes do surgimento dos botões florais. De acordo com Cross e Mitchell (1966), somente os machos que se alimentam de botões florais são capazes de atrair fêmeas. Assim, após o surgimento dessas estruturas reprodutivas, a resposta das fêmeas ao feromônio de agregação liberado pelos machos é principalmente sexual (LLOYD, 1986).

Dessa forma, um dos fatores que mais influencia a dinâmica populacional do bicudo é a fenologia do algodoeiro, já que o surgimento dos botões florais estabelece o início da chegada destes organismos à cultura (RUMMEL & CURRY, 1986). Logo, substâncias voláteis produzidas pelo algodoeiro podem estar envolvidas no processo de atração do bicudo e o recrutamento de novos indivíduos parece ser estimulado por um sinergismo entre o feromônio de agregação e os

voláteis emitidos pela cultura do algodão (LLOYD, 1986; RUMMEL & CURRY, 1986).

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação biológica dos compostos orgânicos voláteis liberados por plantas de algodão em diferentes estágios fenológicos (vegetativo e reprodutivo) e sob diferentes condições de infestação (por co-específicos e heteroespecíficos) no comportamento quimiotático do curculionídeo *Anthonomus grandis*.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar o perfil químico dos COVs emitidos pelo algodoeiro nos diferentes estágios fenológicos e sob diferentes condições de infestação.
- b) Avaliar se o algodoeiro responde diferentemente, através da produção de voláteis, a insetos herbívoros de diferentes guildas alimentares.
- c) Avaliar por meio de bioensaios comportamentais a atividade biológica dos voláteis induzidos pela herbivoria no comportamento de adultos de *A. grandis*.
- d) Avaliar se o bicudo é capaz de discriminar os voláteis produzidos por algodoeiros em diferentes estágios fenológicos.
- e) Avaliar se o bicudo é capaz de discriminar os voláteis que são produzidos pelo algodoeiro quando danificado por co-específicos e heteroespecíficos.
- f) Avaliar a ação dos voláteis liberados por plantas de algodão em conjunto com o feromônio de agregação na atratividade de adultos de *A. grandis*.

4. HIPÓTESES

O algodoeiro apresenta diferenças no perfil de voláteis liberados por plantas de estágios fenológicos diferentes, onde plantas no estágio vegetativo liberam mais voláteis do que aquelas no reprodutivo.

A injúria provocada pela herbivoria exercida por co-específicos e heteroespecíficos modifica o perfil de voláteis liberados por plantas de algodão. Esta alteração na composição destes COVs influencia o comportamento de localização de hospedeiros do bicudo-do-algodoeiro.

A. grandis discrimina algodoeiros no estágio vegetativo daquelas no reprodutivo por meio das diferenças no perfil de voláteis emitidos por plantas de diferentes estágios fenológicos.

O recrutamento de novos indivíduos de *A. grandis* à cultura de algodão é estimulado pelo sinergismo do feromônio de agregação com os voláteis induzidos pela herbivoria de co-específicos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. LOCAL

Todos os experimentos, bem como as colônias de insetos e cultivos de plantas, foram conduzidos no laboratório de Semioquímicos da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), Brasília, DF, Brasil (15°47' S, 47°55' W).

5.2. CRIAÇÃO DOS INSETOS

5.2.1. *Anthonomus grandis*

Diariamente, durante os meses de dezembro/2010 a junho/2011, botões com sinal de ataque do bicudo-do-algodoeiro foram coletados em lavouras de algodão cultivadas no campo experimental da EMBRAPA CENARGEN e acondicionados em gaiolas plásticas (14 cm de diâmetro e 15 cm de altura) com tampa voal, até a emergência dos adultos. Estas foram mantidas em sala climatizada sob temperatura de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h. Após emergência, os adultos foram sexados e transferidos para gaiolas plásticas (10 cm de diâmetro e 11 cm de altura), onde receberam como alimento botões de algodão frescos e água. As gaiolas, a água e o alimento foram substituídos três vezes por semana.

Alternativamente, durante o período da entressafra foram usados adultos de *A. grandis* provenientes de colônia de laboratório, mantidos seguindo a metodologia descrita por Monnerat et al. (2000). Após emergência dos adultos, foram adotados os mesmos procedimentos descritos anteriormente. Em todos os experimentos foram usados adultos virgens em maturidade sexual (média de dez dias de idade) (SPURGEON, 2003).

5.2.2. *Euschistus heros*

Os insetos foram provenientes de colônia de laboratório, mantidos em salas climatizadas sob temperatura de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65 \pm 10\%$ e fotofase

de 14 h. Os percevejos foram mantidos seguindo a metodologia descrita por Borges et al. (1999). Em todos os experimentos foram usadas fêmeas adultas em maturidade sexual (média de 15 dias de idade) (MORAES et al., 2008b).

5.2.3. *Spodoptera frugiperda*

Os insetos foram provenientes de criação estoque de laboratório, mantidos em salas climatizadas sob temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $65 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h. As lagartas foram mantidas segundo metodologia descrita por Schmidt et al. (2001). Em todos os experimentos foram usadas lagartas de terceiro ínstar.

5.3. PLANTAS

Sementes de algodão da variedade Delta Opal foram obtidas da MDM Sementes de Algodão Ltda, sediada em Uberlândia, MG. A semeadura foi feita 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 orgânico (Bioplant® Condicionador de Solo Classe F, Nova Ponte, MG), na proporção de 1:1 e mantidos em casa de vegetação sob condições ambientais controladas (temperatura de 27°C e luz complementar para 14 h de fotofase). A irrigação das plantas foi realizada diariamente durante o período matutino. Em todos os experimentos foram utilizadas plantas com idade de seis semanas, para o estágio vegetativo, e 12 semanas, para o reprodutivo.

As plantas foram submetidas a cinco tratamentos: plantas sem injúria, isoladas do ataque de insetos (controle); plantas submetidas à herbivoria de *A. grandis* (HA_g) (dois machos adultos com dez dias de idade por planta); plantas submetidas à herbivoria de *E. heros* (HE_h) (duas fêmeas adultas com 15 dias de idade por planta); plantas submetidas à herbivoria por *S. frugiperda* (HS_f) (duas lagartas de terceiro ínstar por planta); e plantas submetidas a dano mecânico (DMec), realizado com auxílio de perfurador de papel (três perfurações por folha em três diferentes folhas) realizado apenas uma vez, na montagem das aerações. Estas plantas, individualmente, tiveram seus voláteis coletados por 24 h, durante quatro

dias consecutivos. Cada tratamento teve oito replicatas por dia, totalizando 32 replicatas por tratamento ao longo de todo o tempo de amostragem. Nos tratamentos com injúria de herbivoria, os insetos permaneceram nas plantas durante todo o período de coleta e caso eventualmente morressem, eram substituídos por novos indivíduos. Todos os tratamentos foram aplicados a algodoeiros nos dois estágios fenológicos: vegetativo (seis semanas de idade, com no mínimo seis folhas verdadeiras expandidas) e reprodutivo (12 semanas de idade, com o primeiro botão floral presente).

5.4. COLETA DE VOLÁTEIS

A coleta de voláteis das plantas de algodão, nos estágios fenológicos e tratamentos descritos, foi realizada em câmaras de vidro individuais (com volume interno de 10 L). A fim de minimizar possíveis contaminações pelos voláteis do solo, os vasos tiveram sua superfície recoberta por papel alumínio.

No sistema de aeração, o ar entrava nas câmaras de vidro por meio de um compressor com corrente de 1,0 L/min conectado a um filtro de carvão ativado, garantindo a entrada de ar purificado. A retirada do ar foi feita através de uma bomba de vácuo com vazão de 0,6 L/min, conectada a um tubo de vidro com polímero adsorvente, via conexões de politetrafluoretileno (PTFE), criando um sistema de pressão positiva, conforme descrito por Moraes et al. (2008a) (Figura 8A e 9).

Os voláteis foram coletados a cada 24 h, durante quatro dias consecutivos, em tubos de vidro contendo 60 mg do polímero adsorvente Super Q® (80-100 mesh, Alltech PA, EUA) (Figura 8B e 9). Estes foram eluídos dos tubos adsorventes usando 500 µL do solvente orgânico *n*-hexano e pré-concentrados para 100 µL com fluxo de N₂. Após o processo de eluição, os tubos foram pré-condicionados usando 2 mL de *n*-hexano e aquecidos à 134°C sob fluxo constante de nitrogênio por trinta minutos antes de serem colocados novamente nas câmaras de aeração. Os extratos obtidos foram armazenados a -20°C até sua utilização em cromatógrafo gasoso (CG), CG acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM) e em bioensaios comportamentais.



Figura 8. Sistema *push-pull* de coleta de voláteis de plantas de algodão no estágio vegetativo. **A.** Visão geral. **B.** Detalhe para os tubos de vidro contendo o polímero adsorvente Super Q.

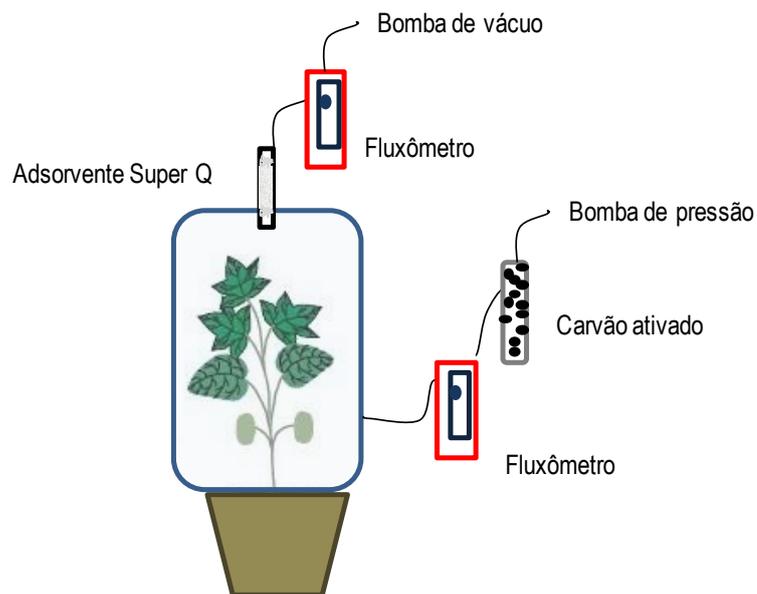


Figura 9. Diagrama do sistema *push-pull* de coleta de voláteis. A planta era colocada no interior de câmaras de vidro e um filtro de carvão ativado permitia a passagem de ar bombeado e controlado por fluxômetro para dentro da câmara. Uma bomba de vácuo conectada ao tubo adsorvente permitia a circulação do ar dentro do sistema.

5.5. ANÁLISES QUÍMICAS DOS COVs

Para a análise quantitativa dos compostos, uma alíquota de 50 μL de cada extrato foi separada e acrescida de 1 μL do composto 16-hexadecanolactona, como

padrão interno (PI). Posteriormente, 1µL de cada solução foi injetado no CG (Agilent 7890, coluna apolar DB-5, 0,32 mm de diâmetro x 60 m de comprimento, filme 1,0 µm, Supelco, Bellefonte, PA, EUA), com detector de ionização por chama (DIC) a 250°C, usando o modo *splitless* e tendo o Hélio como gás de arraste. A temperatura inicial da rampa foi de 50°C por 2 min, aumentando gradualmente 5°C/min até 180°C por 0,1 min, seguida de um segundo aumento gradual de 10°C/min até 250°C por 20 min. A temperatura do detector foi de 270°C e a do injetor, 250°C. A quantificação dos compostos liberados pelas plantas a cada 24 h foi realizada por meio de comparação das áreas de cada composto em relação à área do PI utilizado. Desta forma, considerou-se o fator de resposta do detector para todos os compostos igual a 1. Os dados foram coletados com o *software* EZChrom Elite e analisados com o Excel (Microsoft Office 2007, Microsoft Corporation, EUA).

Na análise qualitativa, amostras selecionadas foram injetadas em CG-EM (Agilent 5975 C) equipado com analisador quadrupolar, em coluna apolar DB-5 (0,25 mm de diâmetro x 30 m de comprimento, com filme 0,25 µm, Supelco, Bellefonte, PA, EUA), com ionização de impacto de elétrons (70-eV, temperatura 200°C) e injetor no modo *splitless*. O gás Hélio foi usado como gás de arraste. Os dados foram coletados e analisados com o *software* ChemStation. A identificação dos compostos foi realizada por comparação do padrão de fragmentação dos compostos da amostra com o de dados catalogados em bibliotecas espectrais (NIST 2008) e também pelo cálculo do índice de retenção (IR). Para o cálculo do IR, uma mistura de padrões de alcanos (C7-C21) foi injetada, nas mesmas condições descritas anteriormente. Para a confirmação final, o padrão de fragmentação e o IR dos compostos foram comparados com os dados obtidos da injeção de padrões autênticos, quando havia o padrão disponível.

5.6. BIOENSAIOS COM ADULTOS DE *A. grandis*

Para avaliar se os voláteis liberados por plantas de algodão, em diferentes estágios fenológicos e sob diferentes condições de infestação, tinham efeito sob o comportamento de adultos de *A. grandis*, foram conduzidos experimentos comportamentais em olfatômetro em “Y” utilizando os extratos obtidos na aeração como estímulos odoríferos. O olfatômetro em “Y” é uma placa manufaturada de

acrílico (26 x 23 cm), com uma cavidade em forma de “Y” (corpo 12 cm e braços 10,5 cm), mantida entre dois vidros de mesmas dimensões, um translúcido na parte inferior e o outro transparente na parte superior, prensados por cliques de papel (MORAES et al., 2005). Seringas de vidro (5 mL), contendo papel de filtro impregnado com 5 µL dos extratos, foram conectadas a cada braço do olfatômetro através de mangueiras de silicone (Figura 10). Esperava-se 60 s para que o solvente evaporasse e somente então, era inserido o papel filtro nas seringas. No interior do olfatômetro, uma corrente de ar foi formada utilizando uma bomba de aquário com fluxo de 0,6 L/min. O ar conduzido para o interior do olfatômetro foi filtrado em carvão ativado, umidificado e regulado por fluxômetros. Para o escoamento do ar, uma bomba de sucção foi posicionada no extremo oposto à entrada de ar e regulada com fluxo de 0,2 L/min. Os testes foram conduzidos em sala climatizada ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $60 \pm 10\%$ UR) e o olfatômetro era iluminado na parte superior por lâmpadas fluorescentes (60 W), com uma intensidade luminosa de 514 lux.

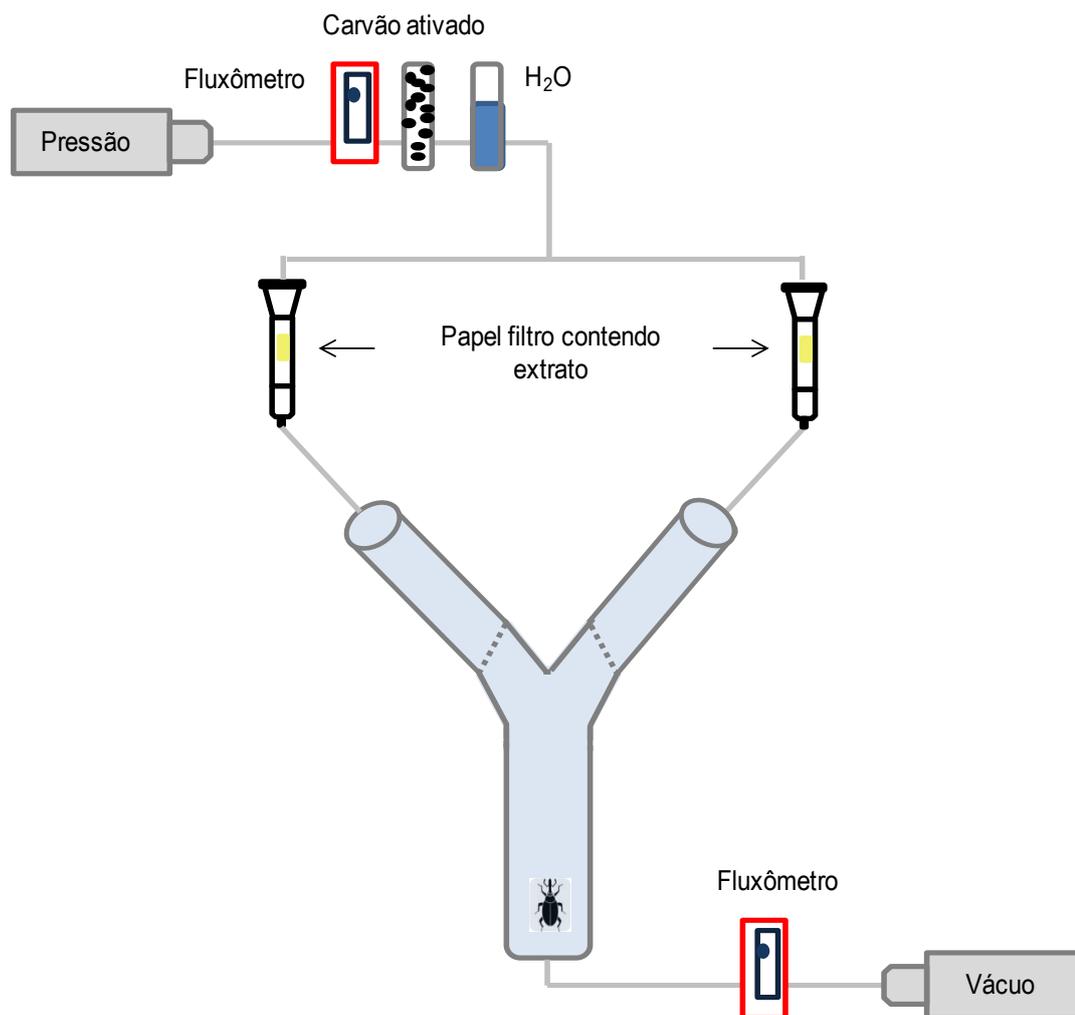


Figura 10. Diagrama do sistema de bioensaios em olfatômetro em “Y”. O ar que entrava no sistema era regulado por um fluxômetro (0,6 L/min), filtrado por carvão ativado e umidificado. O fluxo era então dividido em dois, cada um se direcionava para as seringas contendo o papel filtro impregnado com os extratos de plantas de algodão. No extremo oposto, uma bomba de vácuo conectada a um fluxômetro (0,2 L/min) permitia a formação de um gradiente de odor dentro do sistema.

Um único adulto, macho ou fêmea, de bicudo-do-algodoeiro era introduzido na área de liberação do olfatômetro, no extremo oposto à corrente de ar, e seu padrão de procura foi registrado durante dez minutos. Foram considerados como não responsivos os insetos que não se movimentavam nos primeiros 5 min de observação. Foram avaliados a primeira escolha (considerada quando o inseto entrou e permaneceu em um dos braços por pelo menos 20 s) e o tempo de residência (tempo de permanência total do inseto em um dos braços). Cada adulto foi usado apenas uma vez e os filtros de papel contendo os extratos foram trocados a cada cinco repetições, quando a posição dos braços era invertida entre tratamento

e controle, para eliminar os efeitos de posição da fonte sobre a escolha dos adultos. Os tratamentos eram trocados a cada cinco bioensaios, ocasião essa onde o olfatômetro era lavado com água e sabão, secado e limpo com acetona. Foram avaliadas as respostas de machos e fêmeas virgens, provenientes do campo e da criação em laboratório, com idade adulta de 10 dias. Antes do início dos experimentos os insetos foram mantidos sem alimentação por 24 horas. Todos os bioensaios foram conduzidos entre 10:00 e 16:00 h.

O primeiro grupo de bioensaios visou avaliar se os adultos de *A. grandis*, machos e fêmeas, provenientes do campo apresentavam o mesmo padrão de resposta daqueles provenientes da criação em laboratório. Para tanto, foram contrastados extratos de planta sem injúria no estágio vegetativo (Ctrl) *versus* hexano (Hx). Foram realizadas 30 repetições com resposta, para machos e para fêmeas.

No segundo grupo de bioensaios, as respostas dos adultos de *A. grandis*, machos e fêmeas, foram testadas para as seguintes combinações de extratos: (1) Ctrl vs. herbivoria de *A. grandis* (HAg); (2) Ctrl vs. herbivoria de *E. heros* (HEh), e (3) Ctrl vs. herbivoria de *S. frugiperda* (HSf), com 60 repetições para cada tratamento. Os bioensaios foram conduzidos para cada estágio fenológico do algodoeiro, com extratos de 24 e 96 h.

A partir dos resultados obtidos, as respostas com diferenças significativas foram contrastadas. Portanto, para machos e fêmeas de *A. grandis* foram avaliados: (4) HAg Vegetativo vs. HAg Reprodutivo, após 24 e 96 h do início da injúria, e com 60 repetições com resposta.

Para avaliar a existência de sinergismo entre os voláteis do algodoeiro danificado por *A. grandis* e o feromônio de agregação deste besouro, foi conduzida a seguinte combinação: (5) feromônio de agregação vs. Feromônio + HAg Reprodutivo para machos e fêmeas, após 24 e 96 h do início da injúria, e com 60 repetições. O feromônio de agregação usado foi o Luretape BW-10 da Biocontrole Métodos de Controle de Pragas Ltda. Foram utilizados fragmentos da pastilha de feromônio com peso médio de 0,05 g, correspondendo a 751 µg da mistura dos quatro componentes do Grandlure em sua proporção comercial.

5.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A escolha inicial do bicudo-do-algodoeiro, para os voláteis de algodão nos diferentes estágios fenológicos avaliados e submetidos aos diferentes tratamentos, foi testada com o teste *qui-quadrado* e o tempo de residência foi calculado e submetido aos testes *t pareado* e *Wilcoxon*.

Uma vez que as coletas de voláteis foram realizadas utilizando-se a mesma planta durante os quatro dias consecutivos de amostragem, foi aplicada a análise de variância para medidas repetidas a fim de se evitar o problema de pseudo-repetição provocado pela dependência no tempo. A quantidade total de voláteis emitidos em cada tratamento ao longo do tempo foi, portanto, analisada via ANOVA para medidas repetidas. O contraste entre os tratamentos foi realizado efetuando-se a comparação das médias pelo teste de *Tukey*, a 5% de probabilidade.

A composição relativa de cada composto nas misturas de voláteis para os diferentes tratamentos aplicados foi avaliada pela análise composicional (AITCHISON, 1986). Esta análise foi desenvolvida para utilização em métodos estatísticos multivariados, criando-se uma composição a partir da mistura de compostos presentes em uma dada amostra. Assim, a contribuição de cada composto para o perfil resultante foi considerada em relação ao restante dos componentes. Para isso, a concentração de cada composto foi convertida para uma proporção total e os valores zero foram corrigidos e convertidos em logaritmo (AITCHISON, 1986). Dessa forma os dados foram avaliados via análise de variância multivariada (MANOVA), onde cada composto foi considerado como uma variável, e a significância entre os tratamentos foi avaliada pelo teste *F*. Para determinar a contribuição de cada composto para o perfil de separação dos tratamentos em cada tempo avaliado, foram realizadas análises de Variáveis Canônicas (AVC). Esta análise discriminante fornece uma representação gráfica das variáveis que mais contribuíram para os níveis de agrupamento dos compostos.

A mudança no perfil químico das plantas de algodão danificadas e não danificadas ao longo do tempo foi avaliada através da análise de Curvas de Respostas Principais (PRC) (MICHEREFF et al., 2011; VAN DEN BRINK & TER BRAAK, 1999). A PRC é uma técnica multivariada que permite a avaliação de medidas repetidas no tempo, focando na proporção da variância explicada pelos

tratamentos e pelo tempo em comparação ao controle. A análise PRC foi aplicada separadamente para cada estágio fenológico das plantas de algodão. Em cada conjunto de análises, a significância foi determinada pelo teste de permutação de Monte Carlo. A vantagem da análise de PRC em relação a AVC é que é possível observar o padrão dos compostos e o efeito dos tratamentos ao longo do tempo, mas somente em comparação ao controle. Já a análise AVC permite observar diferenças entre os tratamentos, mas com perda da informação ao longo do tempo. Por isso as duas análises são complementares.

Todos os dados foram analisados com o programa R 2.14.0 (R Development Core Team, 2009).

5.8. ORIGEM DOS COMPOSTOS

Os compostos α -pineno (98%), canfeno (75%), benzotiazol (96%), β -pineno (99%), β -mirceno (90%), (*Z*)-3-acetato de hexenila (98%), limoneno (97%), β -ocimeno, benzaldeído, indol (98,5%), salicilato de metila, α -copaeno (90%), α -cariofileno e aloaromadendreno (90%) foram obtidos da Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha). Linalol e β -cariofileno foram adquiridos da TCI-América (Portland, EUA). Geranil acetona e *cis*-jasmona da TCI-Japão (Tóquio, Japão). Os compostos DMNT e TMTT foram sintetizados a partir do geraniol e (*E,E*)-farnesol, respectivamente, por oxidação de seus aldeídos correspondentes, seguida por metilação de Wittig (Leopold, 1990) e fornecidos pelo Dr. Michael Birkett do Rothamsted Research (UK), bem como o composto *trans*-3-butirato de hexenila. O hexano foi obtido da Fischer Scientific (Loughborough, Leicestershire, UK) e re-destilado antes do uso.

6. RESULTADOS

6.1. BIOENSAIOS COM ADULTOS DE *A. grandis*

Adultos, machos e fêmeas, de *A. grandis* foram atraídos por voláteis de plantas de algodão. Os insetos provenientes do campo e da colônia estabelecida em laboratório apresentaram o mesmo padrão de resposta tanto para a primeira escolha quanto para o tempo de residência, quando contrastados os odores de extratos de plantas de algodão sem injúria no estágio vegetativo *versus* hexano (Figuras 11 e 12). Dessa forma, a utilização de insetos originados em colônia de laboratório durante o período da entressafra do algodão não compromete os resultados das análises comportamentais. Portanto, os resultados descritos neste item são relativos à junção das respostas de insetos de originados do campo e de laboratório.

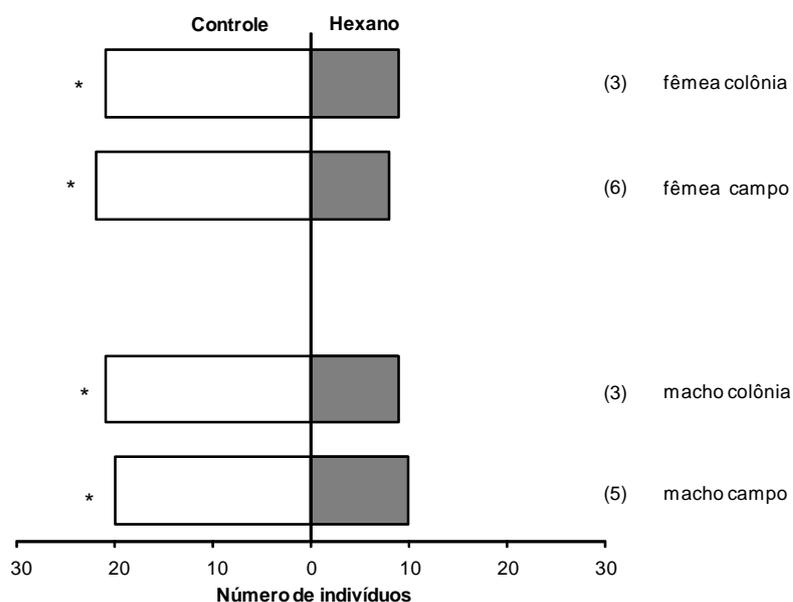


Figura 11. Resposta da primeira escolha de adultos de *Anthonomus grandis* procedentes de campo e colônia para os extratos de plantas de algodão no estágio vegetativo sem injúria (controle) *versus* hexano (Hx) no olfatômetro em "Y". Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Qui-quadrado (χ^2), onde: *, $0,05 > p > 0,01$. Números entre parentes representam os bioensaios com insetos que não responderam aos estímulos odoríferos.

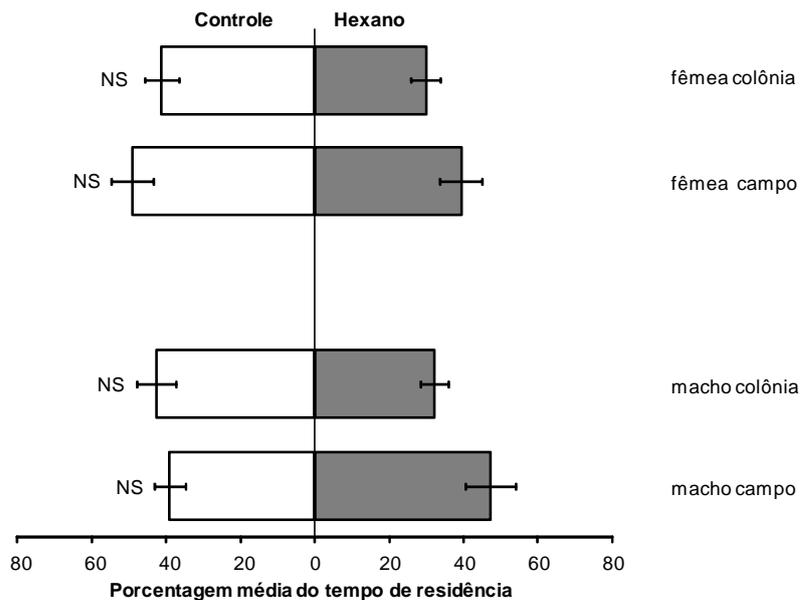


Figura 12. Porcentagem média do tempo de residência de adultos de *Anthonomus grandis* procedentes de campo e colônia no olfatômetro em “Y” para os extratos de plantas de algodão no estágio vegetativo sem injúria (controle) versus hexano (Hx). NS: não significativo para o teste *t* pareado.

Os bioensaios com plantas submetidas à injúria por herbivoria foram conduzidos somente com os extratos dos voláteis obtidos da aeração de plantas após 24 e 96 h de injúria, uma vez que as maiores diferenças no perfil de voláteis foram observadas nesses períodos.

Os machos de *A. grandis* responderam preferencialmente aos odores liberados pelo algodoeiro no estágio vegetativo quando submetido à herbivoria por co-específicos (HA_g) em relação às plantas controle (plantas sem injúria), para 24 h ($\chi^2=5,4$, *gl* =1, *p*=0,02) e 96 h ($\chi^2=11,26$, *gl* =1, *p*=0,0007) após o início da herbivoria. No entanto, não foi observada preferência para os odores de plantas quando atacadas por heteroespecíficos (HE_h e HS_f), nos dois períodos avaliados (Figura 13A). Obteve-se o mesmo padrão de resposta quando se analisou o comportamento de fêmeas de *A. grandis*, mostrando preferência por odores de plantas atacadas por co-específicos ($\chi^2=4,26$, *gl* =1, *p*=0,03; $\chi^2=21,6$, *gl* =1, *p*<0,001) e ausência de preferência entre os odores dos demais tratamentos (Figura 13B).

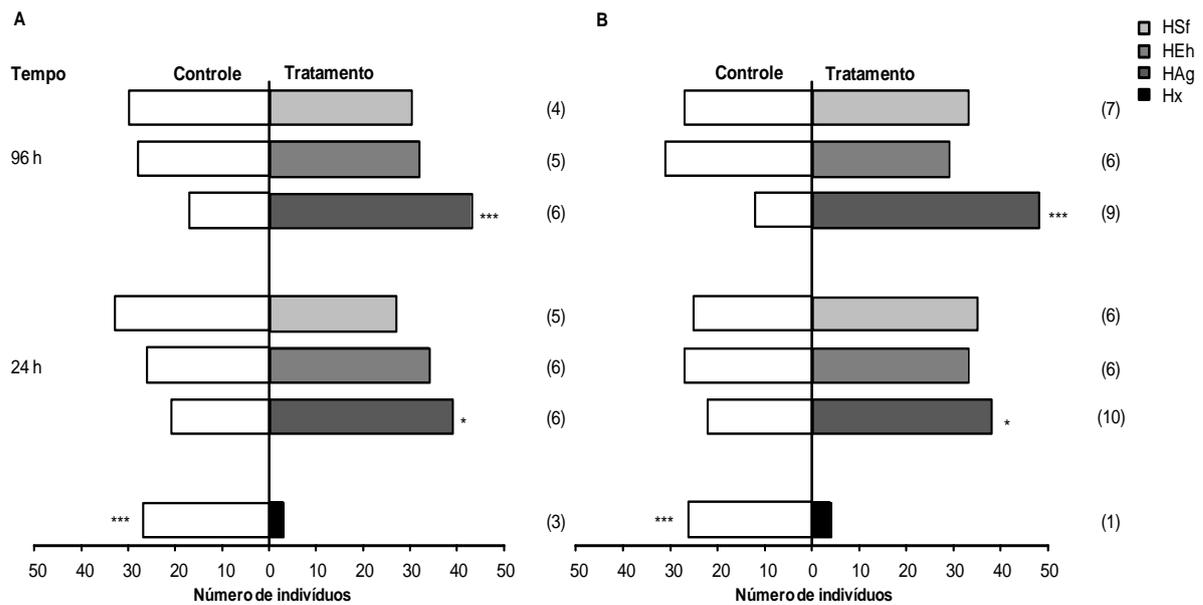


Figura 13. Resposta da primeira escolha de adultos de *Anthonomus grandis* para extratos de algodão no estágio vegetativo submetidos a diferentes tratamentos no olfatômetro em “Y”. Controle: planta sem injúria, Hx: hexano, HAg: injúria de herbivoria provocada por *Anthonomus grandis*, HEh: injúria de herbivoria provocada por *Euschistus heros*, HSf: injúria de herbivoria provocada por *Spodoptera frugiperda*. **A.** Respostas de machos. **B.** Respostas de fêmeas. 24 e 96 h = tempo após o início da injúria. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Qui-quadrado (χ^2), onde: *, $0,05 > p > 0,01$; **, $0,01 > p > 0,001$; ***, $p < 0,001$. Números entre parenteses representam os bioensaios com insetos que não responderam aos estímulos odoríferos.

No mesmo grupo de bioensaios, houve diferença significativa no tempo de residência para adultos de *A. grandis*, os quais permaneceram mais tempo nos braços do olfatômetro contendo os extratos de plantas submetidas à herbivoria por co-específicos, tanto para machos quanto para fêmeas (Teste *t* pareado $t=2,415$, $gl=1$, $p=0,019$; $t=3,715$, $gl=1$, $p<0,001$; $t=2,405$, $gl=1$, $p=0,008$; $t=3,802$, $gl=1$, $p<0,001$) em 24 e 96 h, respectivamente (Figura 14). Para os tratamentos com heteroespecíficos, não houve diferença significativa no tempo de residência nos braços do olfatômetro.

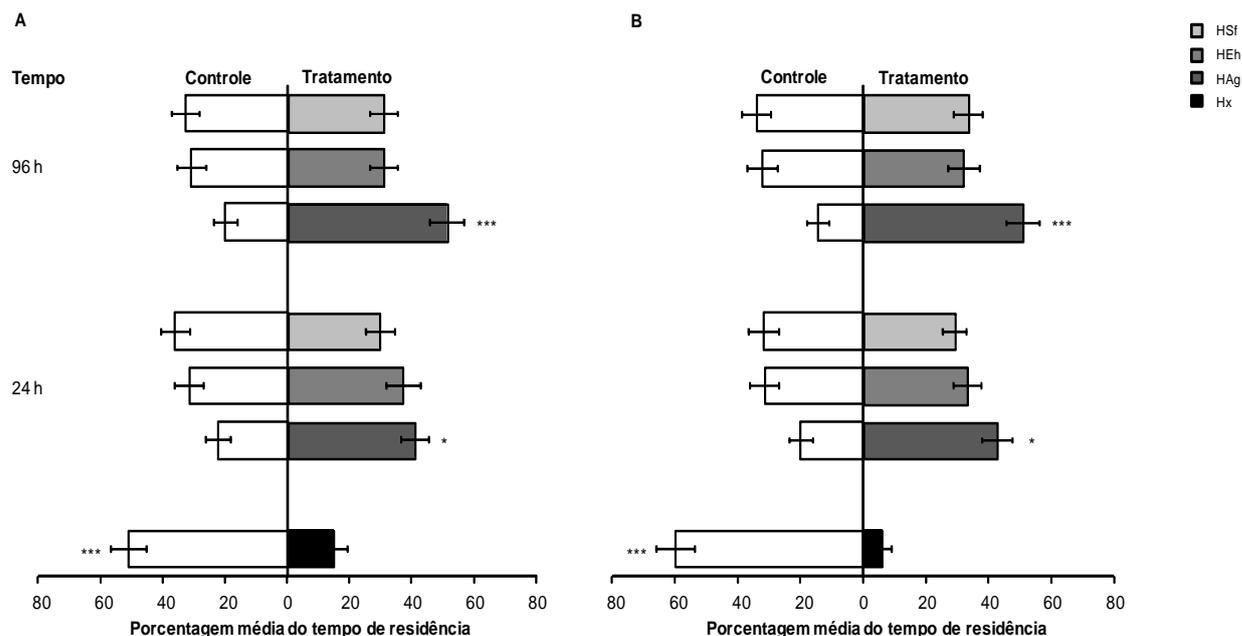


Figura 14. Porcentagem média do tempo de residência de adultos de *Anthonomus grandis* no olfatômetro em “Y” para extratos de algodão no estágio vegetativo submetidos a diferentes tratamentos. Controle: planta sem injúria, Hx: hexano, HAg: injúria de herbivoria provocada por *Anthonomus grandis*, HEh: injúria de herbivoria provocada por *Euschistus heros*, HSt: injúria de herbivoria provocada por *Spodoptera frugiperda*. **A.** Respostas de machos. **B.** Respostas de fêmeas. 24 e 96 h = tempo após o início da injúria. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste *t* pareado, onde: *, 0,05 > *p* > 0,01; **, 0,01 > *p* > 0,001; ***, *p* < 0,001.

Nos bioensaios realizados com extratos de algodão no estágio reprodutivo, novamente os machos de *A. grandis* responderam preferencialmente aos odores liberados pelas plantas de algodão quando submetidas à herbivoria por co-específicos em relação às plantas controle, para 24 h ($\chi^2=15$, *gl* = 1, *p* < 0,001) e 96 h ($\chi^2=9,6$, *gl* = 1, *p* = 0,002) após o início da injúria (Figura 15A). As fêmeas também apresentaram o mesmo padrão de preferência, sendo atraídas pelos odores de plantas atacadas pelo bicudo-do-algodoeiro ($\chi^2=5,4$, *gl* = 1, *p* = 0,02; $\chi^2=9,6$, *gl* = 1, *p* = 0,002) (Figura 15B). Além disso, não houve, para machos e fêmeas de *A. grandis*, preferência para os voláteis liberados por algodoeiros danificados por outros insetos herbívoros (Figura 15). No entanto, apenas para os bicudos machos houve diferença significativa no tempo de residência para os braços que continham extratos de plantas de algodão submetidos à herbivoria por co-específicos (Teste *t* pareado *t* = 2,155, *gl* = 1, *p* = 0,035; *t* = 2,535, *gl* = 1, *p* = 0,012), nos dois períodos avaliados, respectivamente (Figura 16).

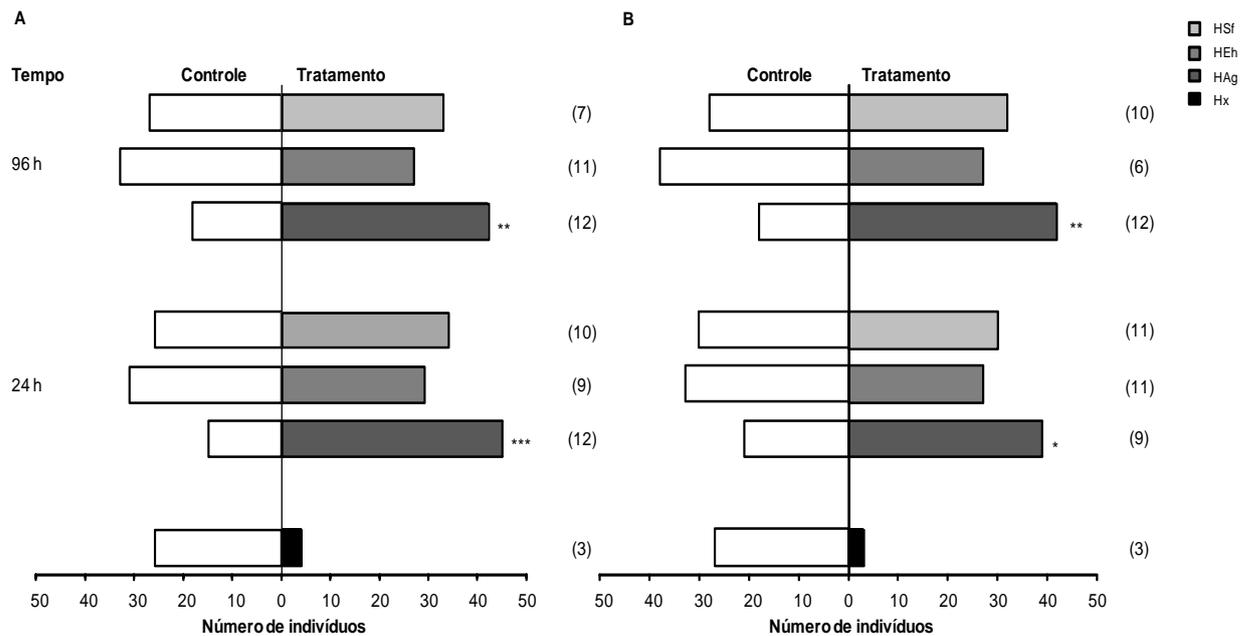


Figura 15. Resposta da primeira escolha de adultos de *Anthonomus grandis* para extratos de algodão no estágio reprodutivo submetidos a diferentes tratamentos no olfatômetro em “Y”. Controle: planta sem injúria, Hx: hexano, HAg: injúria de herbivoria provocada por *Anthonomus grandis*, HEh: injúria de herbivoria provocada por *Euschistus heros*, HSf: injúria de herbivoria provocada por *Spodoptera frugiperda*. **A.** Respostas de machos. **B.** Respostas de fêmeas. 24 e 96 h = tempo após o início da injúria. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Qui-quadrado (χ^2), onde: *, $0,05 > p > 0,01$; **, $0,01 > p > 0,001$; ***, $p < 0,001$. Números entre parentes representam os bioensaios com insetos que não responderam aos estímulos odoríferos.

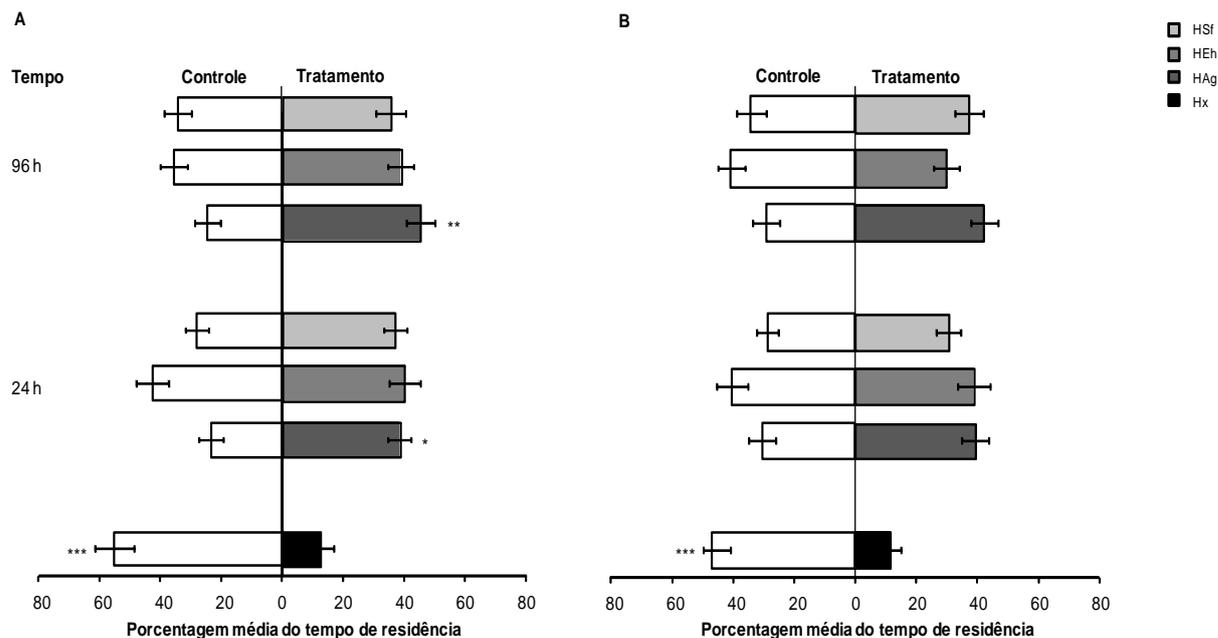


Figura 16. Porcentagem média do tempo de residência de adultos de *Anthonomus grandis* no olfatômetro em “Y” para extratos de algodão no estágio reprodutivo submetidos a diferentes tratamentos. Controle: planta sem injúria, Hx: hexano, HA_g: injúria de herbivoria provocada por *Anthonomus grandis*, HE_h: injúria de herbivoria provocada por *Euschistus heros*, HS_f: injúria de herbivoria provocada por *Spodoptera frugiperda*. **A.** Respostas de machos. **B.** Respostas de fêmeas. 24 e 96 h = tempo após o início da injúria. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste *t* pareado, onde: *, 0,05 > *p* > 0,01; **, 0,01 > *p* > 0,001; ***, *p* < 0,001.

Uma vez que os adultos de *A. grandis* apresentaram preferência por algodoeiros atacados por co-específicos tanto no estágio vegetativo quanto no reprodutivo, contrastaram-se estes odores a fim de se avaliar a preferência deste inseto em relação ao estágio fenológico da planta. Dessa forma, observou-se que tanto machos quanto fêmeas mostraram uma forte preferência pelos odores emitidos por plantas atacadas no estágio reprodutivo ($\chi^2=5,4$, *gl* =1, *p*=0,02; $\chi^2=9,6$, *gl* =1, *p*=0,002; $\chi^2=8,06$, *gl* =1, *P*=0,004; $\chi^2=6,66$, *gl* =1, *p*=0,0098), para 24 e 96 h, respectivamente (Figura 17). Constatou-se o mesmo para o tempo de residência nestes braços do olfatômetro, tanto para machos quanto para fêmeas (Teste de Wilcoxon *W*=-580,0, *gl* =1, *p*=0,033; *W*=-676,0, *gl* =1, *p*=0,013; *W*=-700,0, *gl* =1, *p*=0,001; *W*=-660,0, *gl* =1, *p*=0,015), em 24 e 96 h após início da injúria, respectivamente (Figura 18). Além desta preferência pelos voláteis induzidos pela herbivoria de co-específicos, é importante ressaltar que a resposta, de machos e fêmeas de *A. grandis* para plantas sem injúria, quando contrastadas com hexano

(Hx), mostra que estes insetos reconhecem a planta mesmo sem ativação da defesa induzida.

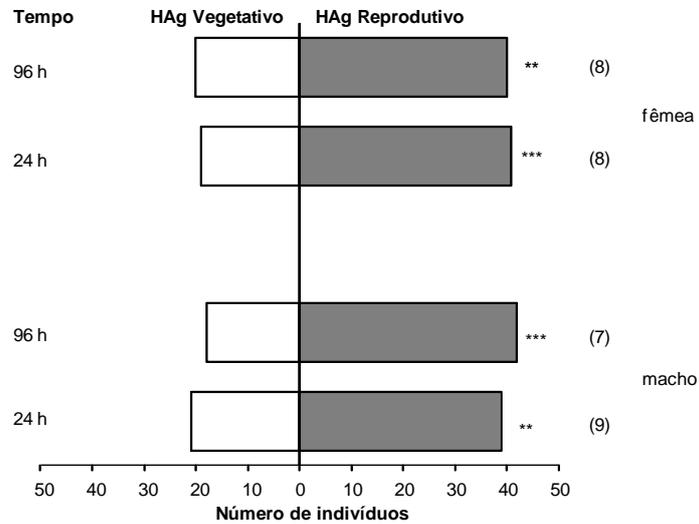


Figura 17. Resposta da primeira escolha de adultos de *Anthonomus grandis* para extratos de algodão com injúria de herbivoria por co-específicos no estágio vegetativo (HAg Vegetativo) versus estágio reprodutivo (HAg Reprodutivo) no olfatômetro em “Y”. 24 e 96 h = tempo após o início da injúria. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Qui-quadrado (χ^2), onde: *, $0,05 > p > 0,01$; **, $0,01 > p > 0,001$; ***, $p < 0,001$. Números entre parentes representam os bioensaios com insetos que não responderam aos estímulos odoríferos.

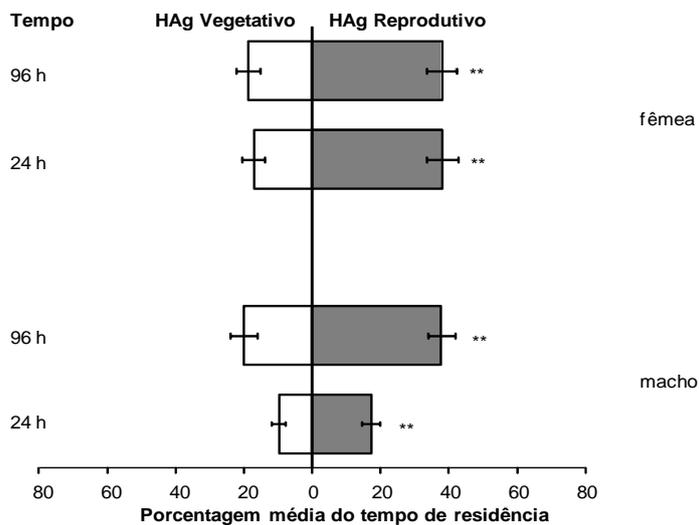


Figura 18. Porcentagem média do tempo de residência de adultos de *Anthonomus grandis* no olfatômetro em “Y” para extratos de algodão com injúria de herbivoria por co-específicos no estágio vegetativo (HAg Vegetativo) versus estágio reprodutivo (HAg Reprodutivo). 24 e 96 h = tempo após o início da injúria. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste Wilcoxon, onde: *, $0,05 > p > 0,01$; **, $0,01 > p > 0,001$; ***, $p < 0,001$.

Nos bioensaios realizados com o feromônio de agregação de *A. grandis* + extrato de plantas de algodão no estágio reprodutivo submetidas à herbivoria por co-específicos (Feromônio+HAg Reprodutivo) versus feromônio de agregação, tanto machos quanto fêmeas do bicudo-do-algodoeiro mostraram preferência para os odores da mistura F+HAg Reprodutivo ($\chi^2=17,06$, $gl =1$, $p<0,001$; $\chi^2=6,66$, $gl =1$, $p=0,009$; $\chi^2=13,03$, $gl =1$, $p<0,001$; $\chi^2=9,6$, $gl =1$, $p=0,002$), para 24 e 96 h após início da injúria, respectivamente (Figura 19). Para o tempo de residência, foi observado que os adultos de *A. grandis* passaram mais tempo nos braços do olfatômetro que continham a mistura F+HAg Reprodutivo (Teste de Wilcoxon $W=-760$, $gl =1$, $p=0,004$; $W=-557$, $gl =1$, $p=0,041$; $W=-749$, $gl =1$, $p=0,006$; $W=-690$, $gl =1$, $p=0,011$) para machos e fêmeas, em 24 e 96 h após início da injúria, respectivamente (Figura 20).

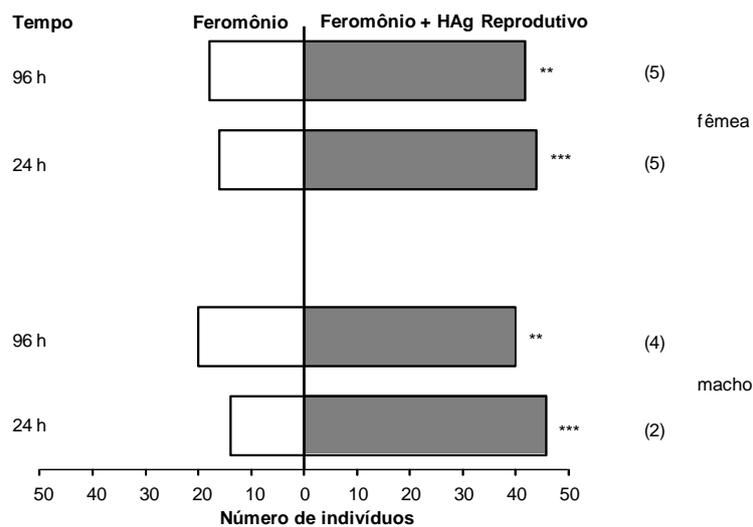


Figura 19. Resposta da primeira escolha de adultos de *Anthonomus grandis* para feromônio de agregação (Feromônio) versus feromônio de agregação + extratos de plantas de algodão no estágio reprodutivo com injúria de herbivoria por co-específicos (Feromônio + HAg Reprodutivo) no olfatômetro em “Y”. 24 e 96 h = tempo após o início da injúria. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Qui-quadrado (χ^2), onde: *, $0,05 > p > 0,01$; **, $0,01 > p > 0,001$; ***, $p < 0,001$. Números entre parentes representam os bioensaios com insetos que não responderam aos estímulos odoríferos.

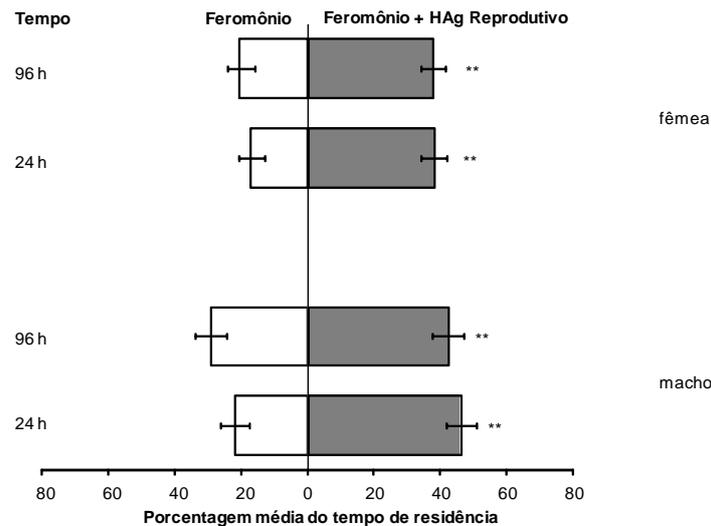


Figura 20. Porcentagem média do tempo de residência de adultos de *Anthonomus grandis* no olfatômetro em “Y” para feromônio de agregação (Feromônio) versus feromônio de agregação + extratos de plantas de algodão no estágio reprodutivo com injúria de herbivoria por co-específicos (Feromônio + HAq Reprodutivo). 24 e 96 h = tempo após o início da injúria. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Wilcoxon, onde: *, $0,05 > p > 0,01$; **, $0,01 > p > 0,001$; ***, $p < 0,001$.

6.2. ANÁLISE QUÍMICA DOS COVs

Foi identificado um total de 24 compostos orgânicos voláteis liberados pelo algodoeiro com e sem dano. O montante final de voláteis emitidos pelas plantas diferiu entre os tratamentos e estágios fenológicos (teste Tukey $p < 0,05$). A quantidade total de voláteis liberados por plantas de algodão no estágio vegetativo apresentou diferença entre os tratamentos ($F=18,188$, $gl=4$, $p < 0,001$) e houve uma interação significativa entre os tratamentos e o tempo ($F=4,671$, $gl=4$, $p=0,0014$). Não houve diferença significativa para o tempo quando avaliado sozinho ($F=2,054$, $gl=3$, $p=0,154$). Em contrapartida, para as plantas de algodão no estágio reprodutivo, observaram-se apenas diferenças entre os tratamentos ($F=15,565$, $gl=4$, $p < 0,001$), não havendo efeito significativo da interação destes com o tempo ($F=1,657$, $gl=4$, $p=0,163$) e para o tempo sozinho ($F=1,717$, $gl=3$, $p=0,1692$). Em ambos os estágios fenológicos, a maior quantidade de voláteis totais liberados foi atribuída aos tratamentos com injúria provocada pela herbivoria (Figura 21). Além disso, plantas

no estágio vegetativo tiveram maiores taxas de liberação de compostos do que as do estágio reprodutivo (Figura 22, Figura 23, Tabela 1, Tabela 2).

Qualitativamente a composição dos compostos não diferiu entre os tratamentos com e sem dano. Dentre os voláteis liberados, o grupo dos terpenoides foi o dominante. Os perfis cromatográficos das plantas mostram que o algodoeiro produz diferentes perfis de liberação de voláteis de acordo com seu estágio fenológico e tratamento, apontando diferenças quantitativas dos compostos voláteis produzidos (Figura 22, Figura 23, Tabela 1, Tabela 2). No estágio vegetativo, os tratamentos de herbivoria com *A. grandis* e *S. frugiperda* liberaram maiores quantidades de voláteis a partir de 48 h de dano, quando comparado com as plantas controles, i.e., sem injúria (Figura 21A). Nestes tratamentos, os seguintes compostos foram liberados em maiores quantidades: α -pineno ($F=18,249$, $p<0,001$), β -pineno ($F=25,47$, $p<0,001$), β -mirceno ($F=16,99$, $p<0,001$), (Z)-3-acetato de hexenila ($F=3,537$, $p=0,031$), β -ocimeno ($F=7,766$, $p=0,001$), linalol ($F=4,531$, $p=0,013$), DMNT ($F=27,094$, $p<0,001$), α -copaeno ($F=27,094$, $p<0,001$), geranil acetona ($F=3,189$, $p=0,043$), δ -guaieno ($F=8,551$, $p<0,001$) e TMTT ($F=4,374$, $p=0,015$). No estágio reprodutivo, o mesmo padrão foi observado, porém, no quarto dia de coleta, o tratamento de herbivoria de *E. heros* liberou quantidades de voláteis semelhantes aos tratamentos com *A. grandis* e *S. frugiperda* (Figura 21 B). Nestes tratamentos os compostos com maiores taxas de liberação foram α -pineno ($F=7,089$, $p=0,002$), β -pineno ($F=8,774$, $p<0,001$), limoneno ($F=3,225$, $p=0,038$), β -ocimeno ($F=12,71$, $p<0,001$), DMNT ($F=6,943$, $p=0,002$), α -copaeno ($F=17,839$, $p<0,001$), geranil acetona ($F=11,184$, $p<0,001$), e um sesquiterpeno não identificado ($F=11,810$, $p<0,001$).

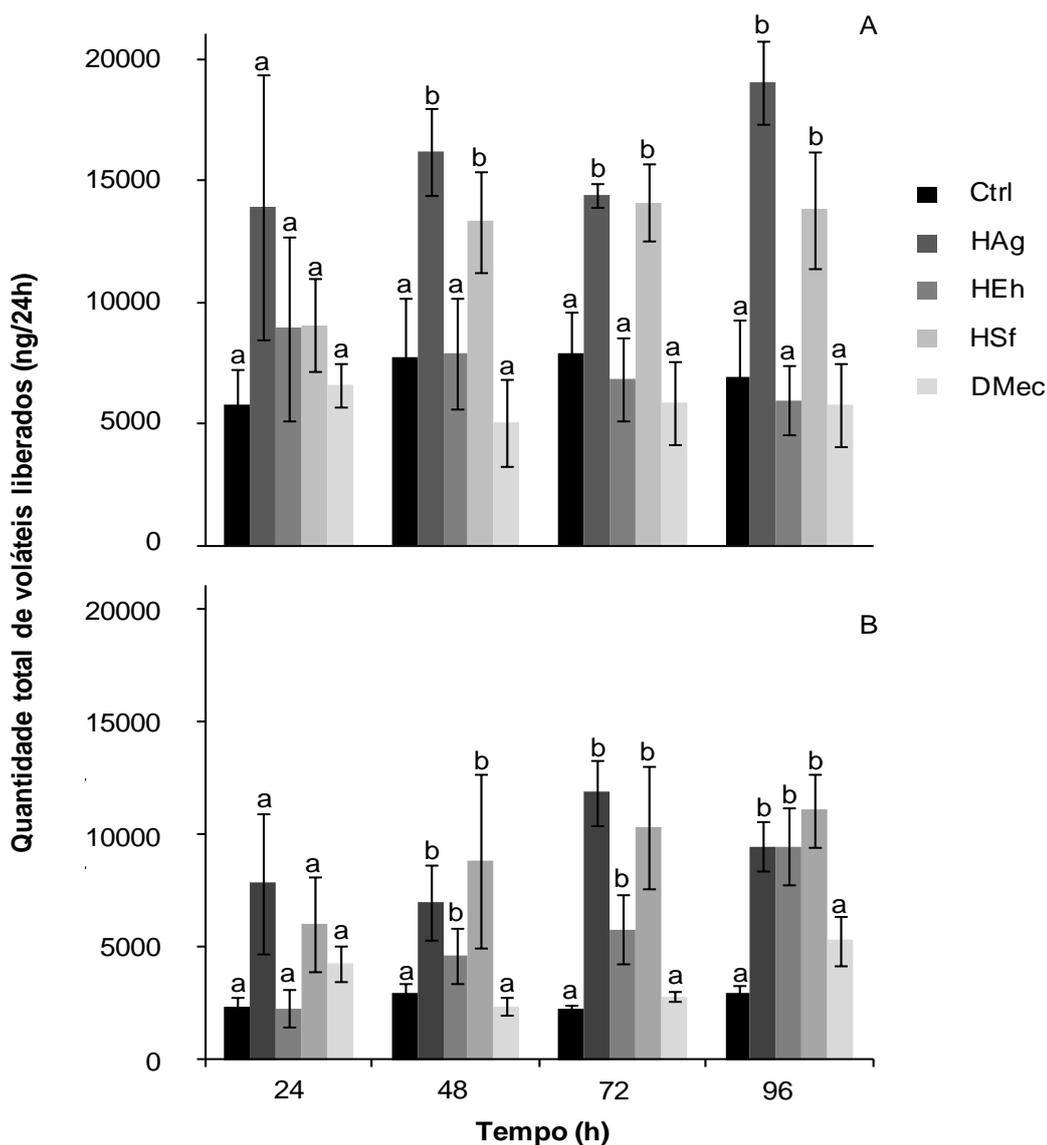


Figura 21. Voláteis totais (média \pm EP) liberados por plantas de algodão nos estágios vegetativo (A) e reprodutivo (B), submetidas a diferentes tratamentos ao longo de quatro dias consecutivos. Ctrl: planta sem injúria; HAg: injúria de herbivoria provocada por *Anthonomus grandis*; HEh: injúria de herbivoria provocada por *Euschistus heros*; HSf: injúria de herbivoria provocada por *Spodoptera frugiperda*; DMec: dano mecânico. No estágio vegetativo houve diferença significativa entre os tratamentos e sua interação com o tempo (ANOVA para medidas repetidas, $P < 0,05$). Para o estágio reprodutivo, houve diferença significativa entre os tratamentos, mas não em sua interação com o tempo (ANOVA para medidas repetidas, $P < 0,05$). Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada hora não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

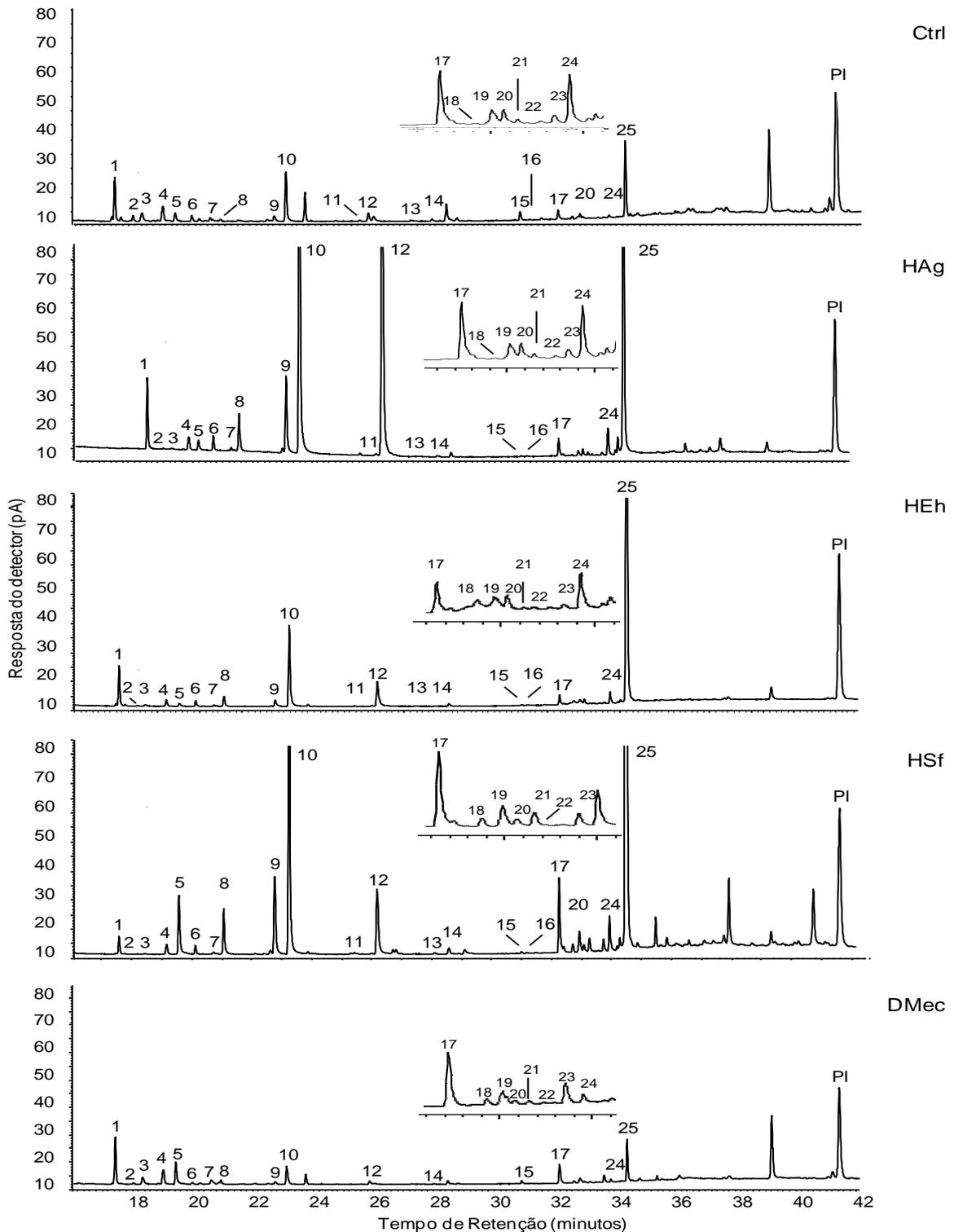


Figura 22. Perfis cromatográficos de plantas de algodão no estágio vegetativo submetidas a diferentes tratamentos: Ctrl: planta sem injúria; HAg: injúria de herbivoria provocada por *Anthonomus grandis*; HEh: injúria de herbivoria provocada por *Euschistus heros*; HSf: injúria de herbivoria provocada por *Spodoptera frugiperda*; DMec: dano mecânico. PI: padrão interno. Os cromatogramas mostram a eluição dos compostos na coluna ao longo do tempo de análise (min) e a resposta do detector (pA). Números correspondem aos compostos da **Tabela 1**.

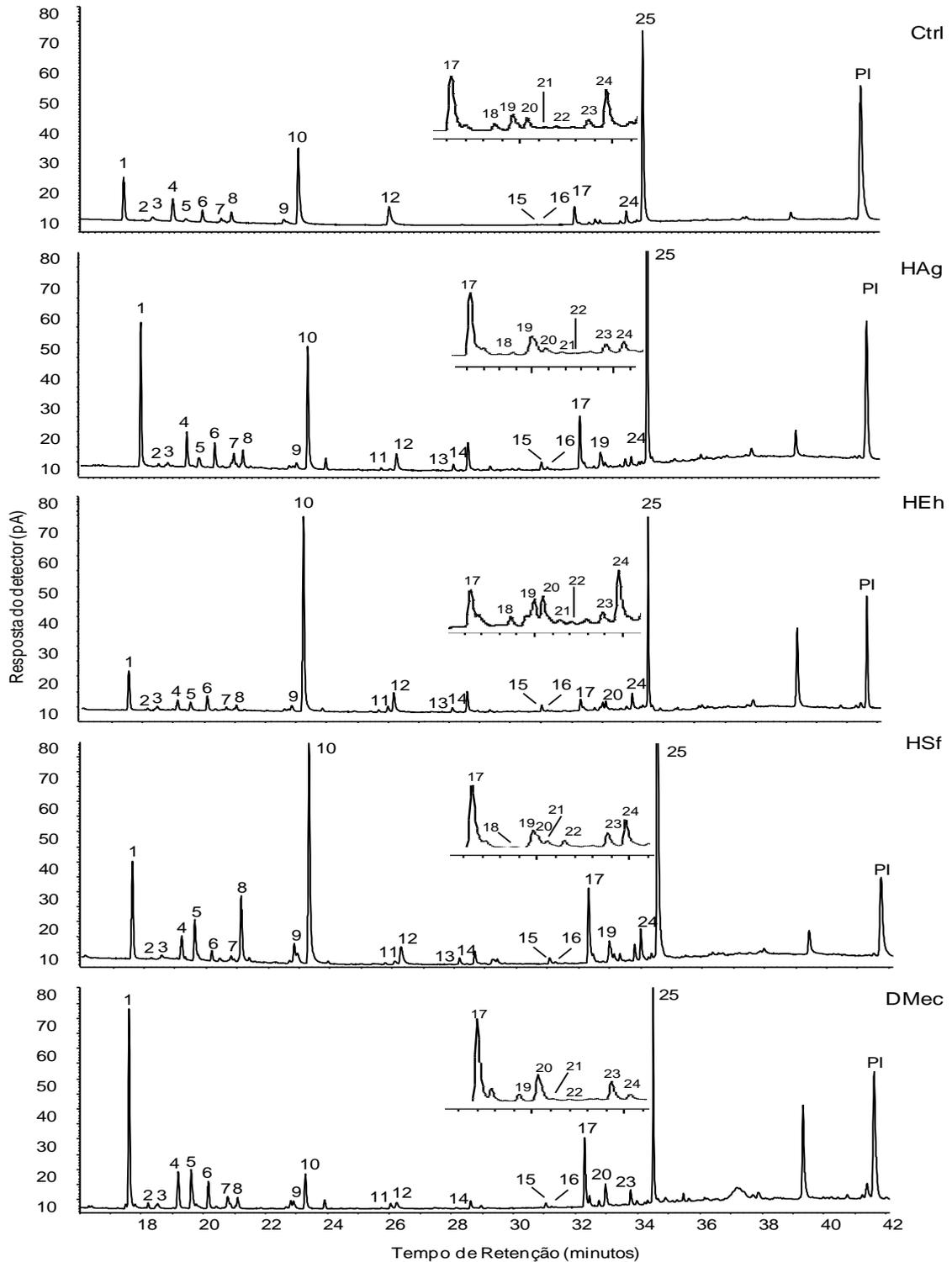


Figura 23. Perfis cromatográficos de plantas de algodão no estágio reprodutivo submetidas a diferentes tratamentos: Ctrl: planta sem injúria; HAg: injúria de herbivoria provocada por *Anthonomus grandis*; HEh: injúria de herbivoria provocada por *Euschistus heros*; HSf: injúria de herbivoria provocada por *Spodoptera frugiperda*; DMec: dano mecânico. PI: padrão interno. Os cromatogramas mostram a eluição dos compostos na coluna ao longo do tempo de análise (min) e a resposta do detector (pA). Números correspondem aos compostos da **Tabela 2**.

Tabela 1. Compostos voláteis coletados de plantas de algodão no estágio vegetativo (média \pm erro padrão da média em ng no intervalo de 24 a 96 h) submetidas a diferentes tratamentos. Ctrl: planta sem injúria; HAg: injúria de herbivoria provocada por *Anthonomus grandis*; HEh: injúria de herbivoria provocada por *Euschistus heros*; HSf: injúria de herbivoria provocada por *Spodoptera frugiperda*; DMec: dano mecânico.

Compostos	ng/96 h ¹				
	Ctrl	HAg	HEh	HSf	DMec
1. α -pineno	179,65 \pm 62,90	1191,80 \pm 318,34*	394,36 \pm 163,84	432,30 \pm 102,88	363,39 \pm 108,48
2. Canfeno	33,15 \pm 13,30	25,93 \pm 8,15	33,47 \pm 23,81	19,97 \pm 5,70	23,54 \pm 11,04
3. Benzaldeído	46,10 \pm 19,19	51,04 \pm 17,87	62,58 \pm 25,18	48,31 \pm 10,64	37,93 \pm 14,15
4. β -pineno	86,42 \pm 29,23	754,11 \pm 233,68*	151,22 \pm 54,82	175,72 \pm 40,24	110,95 \pm 42,06
5. β -mirceneno	167,07 \pm 67,22	1043,05 \pm 346,64*	162,77 \pm 56,19	525,68 \pm 167,70*	113,70 \pm 36,26
6. (Z)-3-acetato de hexenila	86,33 \pm 36,91	421,50 \pm 97,58*	203,33 \pm 86,78	165,08 \pm 57,83	93,47 \pm 43,14
7. Limoneno	47,18 \pm 23,11	71,02 \pm 16,72	42,39 \pm 15,25	45,84 \pm 8,00	35,38 \pm 11,29
8. β -ocimeno	106,55 \pm 45,00	1493,74 \pm 433,99*	157,26 \pm 60,02	232,42 \pm 67,37	69,20 \pm 27,91
9. Linalol	29,42 \pm 10,24	211,85 \pm 120,23*	29,75 \pm 10,12	63,03 \pm 24,04	17,59 \pm 5,47
10. DMNT	1687,28 \pm 644,69	3263,84 \pm 904,20*	1186,75 \pm 371,56	2691,79 \pm 726,69	1136,21 \pm 457,80
11. <i>trans</i> -3-butilato de hexenila	33,62 \pm 8,23	26,47 \pm 8,70	24,29 \pm 9,09	27,56 \pm 5,13	13,96 \pm 5,99
12. Salicilato de metila	111,14 \pm 44,67	48,82 \pm 13,89	35,95 \pm 17,13	50,71 \pm 8,44	33,21 \pm 11,73
13. Benzotiazol	48,55 \pm 17,51	64,04 \pm 16,82	76,79 \pm 42,64	93,75 \pm 26,81	19,90 \pm 6,90
14. Indol	65,27 \pm 28,33	69,88 \pm 27,40	89,92 \pm 40,59	106,70 \pm 24,00	46,15 \pm 15,57
15. <i>cis</i> -jasmona	82,13 \pm 36,01	37,82 \pm 11,55	17,04 \pm 5,57	29,63 \pm 5,68	21,04 \pm 8,23
16. α -copaeno	63,41 \pm 19,49	905,73 \pm 177,78*	224,56 \pm 74,16	482,31 \pm 91,78	186,14 \pm 62,59
17. β -cariofileno	50,14 \pm 21,29	53,71 \pm 40,31	21,92 \pm 9,74	29,44 \pm 8,07	21,35 \pm 8,25
18. α -guaiano	54,17 \pm 14,33	52,20 \pm 12,87	37,00 \pm 13,15	61,26 \pm 9,50	31,24 \pm 8,54
19. Geranil acetona	85,75 \pm 33,26	224,64 \pm 55,44*	140,58 \pm 71,83	186,60 \pm 49,06	48,27 \pm 10,52
20. α -cariofileno	56,36 \pm 18,44	103,97 \pm 28,41	59,16 \pm 30,12	74,09 \pm 16,91	60,50 \pm 16,62
21. Aloaromadendreno	62,27 \pm 19,33	190,73 \pm 64,55	208,73 \pm 152,95	155,67 \pm 66,23	62,04 \pm 20,74
22. Sesquiterpeno †	101,83 \pm 35,69	162,01 \pm 36,43	108,37 \pm 47,44	172,76 \pm 30,14	51,98 \pm 15,24
23. δ -guaiano†	139,81 \pm 30,49	424,43 \pm 107,63*	212,75 \pm 82,77	307,11 \pm 60,11*	139,41 \pm 42,39
24. δ -cadineno †	106,67 \pm 44,91	146,60 \pm 35,15	89,70 \pm 29,39	140,81 \pm 30,21	112,93 \pm 59,35
25. TMTT	1366,07 \pm 569,71	4833,80 \pm 1412,68	3643,84 \pm 1355,71	6246,19 \pm 1091,46*	2979,37 \pm 1006,52

¹ Valores médios (\pm EPM) calculados a partir de 32 amostras obtidas na aeração das plantas de algodão no intervalo de 24-96 h depois do início da injúria.

* na linha, indica diferença estatística pela ANOVA com $P > 0,05$. †Tentativa de identificação dos compostos.

Tabela 2. Compostos voláteis coletados em plantas de algodão no estágio reprodutivo (média \pm erro padrão da média em ng no intervalo de 24 a 96 h) submetidas a diferentes tratamentos. Ctrl: planta sem injúria; HAg: injúria de herbivoria provocada por *Anthonomus grandis*; HEh: injúria de herbivoria provocada por *Euschistus heros*; HSf: injúria de herbivoria provocada por *Spodoptera frugiperda*; DMec: dano mecânico.

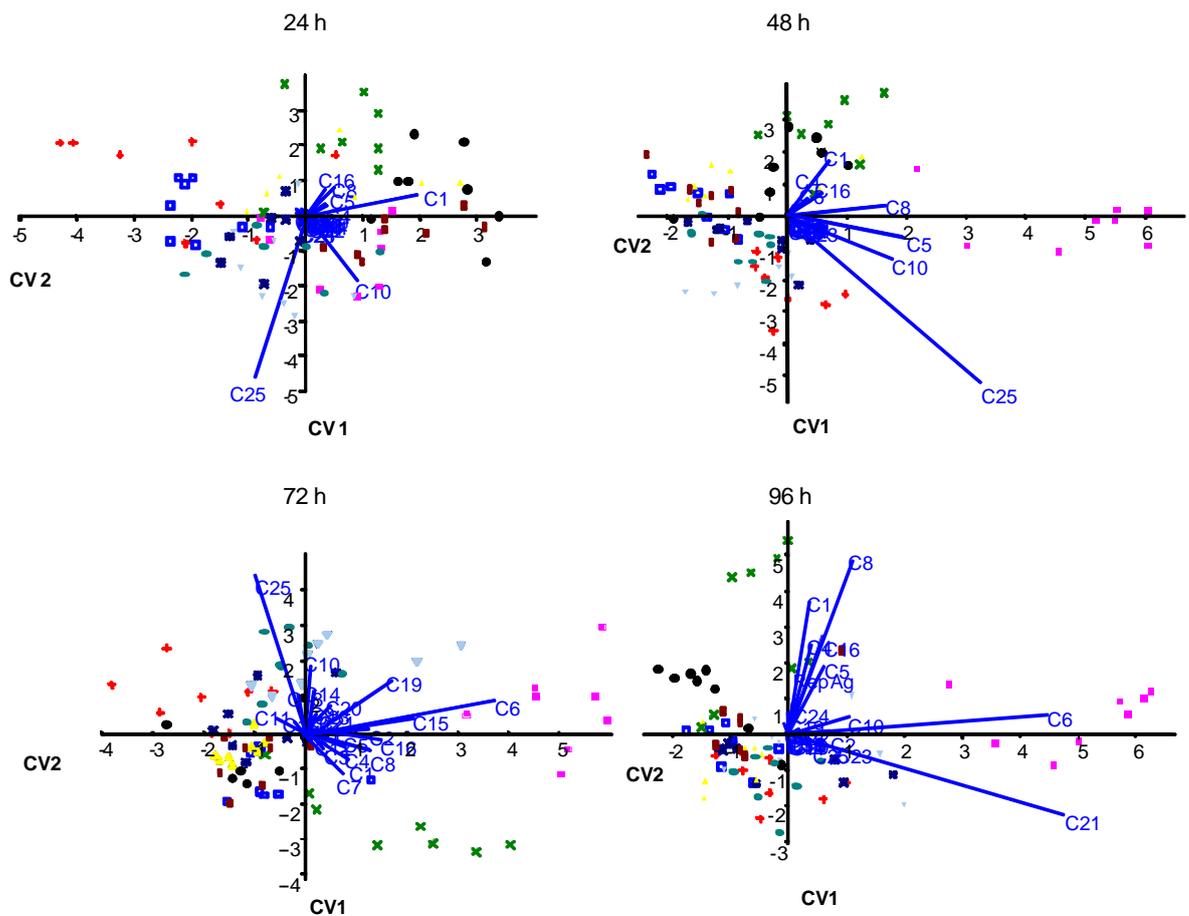
Compostos	ng/96 h ¹				
	Ctrl	HAg	HEh	HSf	DMec
1. α -pineno	359,41 \pm 96,46	1668,35 \pm 370,64*	713,07 \pm 293,61	1325,21 \pm 402,01*	622,07 \pm 214,66
2. Canfeno	63,47 \pm 38,29	86,10 \pm 42,82	41,44 \pm 14,16	38,90 \pm 9,48	32,62 \pm 9,94
3. Benzaldeído	51,78 \pm 15,50	57,92 \pm 21,93	47,36 \pm 13,55	58,24 \pm 18,05	53,39 \pm 13,20
4. β -pineno	140,43 \pm 34,33	742,55 \pm 324,42*	184,30 \pm 78,24	321,53 \pm 100,52	201,75 \pm 67,82
5. β -mirceneno	106,38 \pm 35,95	738,09 \pm 356,58	215,36 \pm 80,36	424,20 \pm 125,92	223,63 \pm 73,66
6. (Z)-3-acetato de hexenila	109,94 \pm 36,21	236,34 \pm 70,37	110,05 \pm 30,13	173,65 \pm 58,71	131,52 \pm 34,87
7. Limoneno	80,50 \pm 25,22	159,35 \pm 61,67*	76,44 \pm 29,42	85,10 \pm 25,55	91,34 \pm 29,14
8. β -Ocimeno	68,60 \pm 24,83	1495,70 \pm 565,59*	114,32 \pm 38,84	425,50 \pm 138,12	91,32 \pm 27,73
9. Linalol	37,01 \pm 15,75	39,10 \pm 11,54	31,93 \pm 12,83	38,66 \pm 11,31	24,47 \pm 7,02
10. DMNT	295,16 \pm 101,28	741,46 \pm 239,64	1061,89 \pm 371,62*	1835,73 \pm 781,20*	272,41 \pm 80,91
11. <i>trans</i> -3-butilato de hexenila	23,65 \pm 9,40	18,86 \pm 7,61	13,61 \pm 5,09	33,09 \pm 10,65	12,78 \pm 4,66
12. Salicilato de metila	80,69 \pm 33,26	57,41 \pm 23,53	56,06 \pm 24,23	78,25 \pm 20,75	51,17 \pm 23,01
13. Benzotiazol	20,40 \pm 9,50	53,73 \pm 26,86	31,84 \pm 13,76	63,73 \pm 33,41	14,40 \pm 6,02
14. Indol	37,52 \pm 19,13	58,66 \pm 18,08	46,49 \pm 16,60	93,22 \pm 36,58	47,01 \pm 17,97
15. <i>cis</i> -jasmona	42,54 \pm 19,65	29,15 \pm 7,82	15,96 \pm 5,12	33,48 \pm 8,87	20,98 \pm 7,75
16. α -copaeno	77,45 \pm 18,71	1022,81 \pm 390,21*	181,85 \pm 78,40	683,18 \pm 235,53*	192,03 \pm 46,88
17. β -cariofileno	68,68 \pm 25,85	29,02 \pm 7,21	21,12 \pm 8,21	49,11 \pm 16,05	29,90 \pm 10,49
18. α -guaiano	33,35 \pm 12,21	27,82 \pm 6,86	61,70 \pm 35,35	63,08 \pm 27,69	29,13 \pm 11,52
19. Geranil acetona	48,28 \pm 15,24	245,90 \pm 71,18*	73,35 \pm 30,18	260,73 \pm 82,21*	80,13 \pm 29,42
20. α -cariofileno	54,88 \pm 19,90	46,83 \pm 11,21	42,47 \pm 13,74	63,67 \pm 22,28	66,46 \pm 22,52
21. Aloaromadendreno	29,81 \pm 11,07	30,21 \pm 7,94	30,21 \pm 10,37	49,47 \pm 13,36	28,34 \pm 10,19
22. Sesquiterpeno †	38,65 \pm 16,88	70,40 \pm 22,99	51,54 \pm 19,05	159,73 \pm 51,86*	68,97 \pm 18,03
23. δ -guaiano†	111,48 \pm 30,68	99,57 \pm 31,67	105,56 \pm 41,98	198,80 \pm 72,06	124,91 \pm 45,89
24. δ -cadineno †	37,39 \pm 12,80	57,06 \pm 21,52	41,82 \pm 11,74	518,83 \pm 390,25	27,73 \pm 10,08
25. TMTT	592,63 \pm 182,69	1203,93 \pm 404,84	2160,92 \pm 678,21	1973,59 \pm 682,77	1136,26 \pm 355,46

¹ Valores médios (\pm EPM) calculados a partir de 32 amostras obtidas na aeração das plantas de algodão no intervalo de 24-96 h depois do início da injúria.

* na linha indica diferença estatística pela ANOVA com $P > 0,05$. †Tentativa de identificação dos compostos.

A análise de Variáveis Canônicas (AVC) mostrou diferenças no padrão de agrupamento dos voláteis de plantas de algodão ao longo dos quatro dias de amostragem (MANOVA teste de Pillai-Bartlett: (24 h) $F=1,5783$, $p=0,001$; (48 h) $F=1,3071$, $p=0,001$; (72 h) $F=1,7709$, $p<0,001$; (96 h) $F=1,387$, $p=0,002$) (Figura 24). Nas primeiras 24 h é possível observar dois grupos: o primeiro formado pelos tratamentos controle dos dois estágios fenológicos do algodoeiro e o segundo com o restante dos tratamentos – plantas com injúria de herbivoria e dano mecânico (Figura 24). A partir de 48 h, nota-se a formação de três agrupamentos distintos, a saber: o primeiro formado pelo tratamento HA_g Vegetativo, o segundo pelo tratamento HA_g Reprodutivo e o terceiro pelos demais tratamentos (Figura 24). Ao longo do tempo é possível observar mudanças na produção dos voláteis pelas plantas atacadas e isso explica as mudanças dos compostos observadas nos eixos. Pelos gráficos da AVC de 48, 72 e 96 h pode-se inferir que a partir da proporção relativa dos compostos α -pineno (1), β -pineno (4), β -mirceno (5), (*Z*)-3-acetato de hexenila (6), β -ocimeno (8), DMNT (10), α -copaeno (16) e TMTT (25) que estes estão associados à separação dos tratamentos de herbivoria provocada por *A. grandis* com relação aos demais.

A AVC mostrou ainda que foi possível separar os tratamentos de herbivoria por *A. grandis* de acordo com os estágios fenológicos das plantas de algodão. De acordo com os gráficos da AVC de 48, 72 e 96 h os compostos α -pineno (C1), β -pineno (C4), β -ocimeno (C8) e α -copaeno (C16) parecem estar correlacionados com o tratamento HA_g reprodutivo. Já para o tratamento HA_g vegetativo, os compostos (*Z*)-3-acetato de hexenila e aloaromadendreno (Figura 24. 72 e 96 h), DMNT, TMTT e β -mirceno (Figura 24. 48 h) parecem estar fortemente correlacionados com este tratamento.



+ Ctrl Veg □ Ctrl Rep ■ HAg Veg × HAg Rep * HEh Veg ▲ HEh Rep ▲ HSf Veg ● HSf Rep ○ DMec Veg □ DMec Rep

Figura 24. Análise de Variáveis Canônicas (AVC) indicando as diferenças na composição dos voláteis de plantas de algodão em diferentes estágios fenológicos e sob diferentes tratamentos ao longo de quatro dias consecutivos. Os símbolos representam os *scores* individuais para cada amostra, calculados a partir da AVC que maximiza as diferenças entre os tratamentos nas duas dimensões consideradas (CV1 e CV2). As linhas azuis representam os diferentes compostos presentes nas amostras e seu comprimento, a importância (magnitude relativa) da contribuição de cada composto para a diferenciação dos tratamentos. Veg: estágio vegetativo; Rep: estágio reprodutivo; Ctrl: controle; HAg: injúria de herbivoria provocada por *Anthonomus grandis*, HEh: injúria de herbivoria provocada por *Euschistus heros*, HSf: injúria de herbivoria provocada por *Spodoptera frugiperda*; DMec: dano mecânico. As letras “C” acompanhadas de números representam os compostos α -pineno (C1), Canfeno (C2), Benzaldeído (C3), β -pineno (C4), β -mirceno (C5), (*Z*)-3-acetato de hexenila (C6), Limoneno (C7), β -Ocimeno (C8), Linalol (C9), DMNT (C10), *trans*-3-butilato de hexenila (C11), Salicilato de metila (C12), Benzotiazol (C13), Indol (C14), *cis*-jasmona (C15), α -copaeno (C16), β -cariofileno (C17), α -guaiano (C18), geranyl acetona (C19), α -Cariofileno (C20), Aloaromadendreno (C21), Sesquiterpeno (C22), δ -guaiano (C23), δ -cadineno (C24) e TMTT (C25).

A análise PRC dos voláteis de algodão apontou diferenças entre os tratamentos ao longo do tempo de amostragem (Figura 25 e 26). Para as plantas no estágio vegetativo, 27,1% da variância total existente na mistura dos voláteis coletados foi explicada pelo tempo e 9,2% foi explicada pela indução dos tratamentos. A variância da primeira variável canônica apresentada no diagrama PRC foi significativa (teste de Permutação de Monte Carlo $F=35,487$, $p=0,005$) e explicou 74,38% da variação na composição da mistura de voláteis devido à interação tratamento e tempo. Para as plantas no estágio reprodutivo, a porcentagem da variância explicada pelo tempo foi 47,67%, pelos tratamentos 7,24% e 54,50% pela primeira variável canônica, a qual também foi significativa para a interação tratamento e tempo ($F=11,51$, $p=0,038$). Para ambos os estágios fenológicos, as curvas dos tratamentos de herbivoria por *A. grandis* e *S. frugiperda* foram as que mais divergiram da curva controle. Nos gráficos das figuras 25 e 26, o eixo y representa os valores de efeito e indicam a importância que cada composto teve no perfil das curvas. Somente os valores em módulo com pesos acima de 0,5 contribuíram efetivamente para o perfil observado no diagrama PRC. Logo, os compostos α -pineno, β -pineno, β -mirceno, β -ocimeno, linalol, DMNT e α -copaeno foram os principais compostos que contribuíram para as diferenças entre o tratamento de herbivoria por *A. grandis* e controle (valor em módulo > 1,5), para ambos os estágios fenológicos. Além destes compostos em comum, houve a contribuição do (Z)-3-acetato de hexenila no estágio vegetativo e geranil acetona, no reprodutivo, corroborando os resultados obtidos pela AVC.

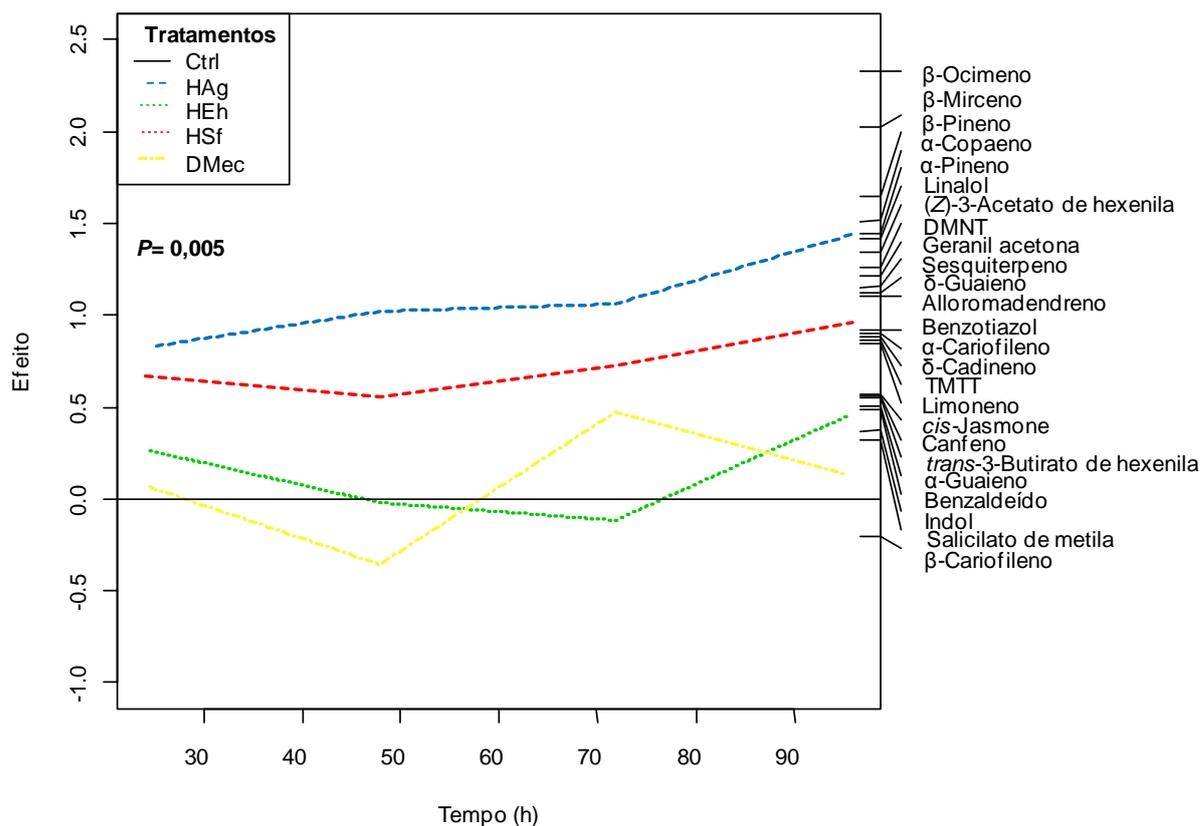


Figura 25. Diagrama PRC da mistura de voláteis liberados por plantas de algodão no estágio vegetativo, submetidas a diferentes tratamentos ao longo de quatro dias consecutivos. Ctrl: planta sem injúria; HAgi: injúria de herbivoria provocada por *Anthonomus grandis*; HEh: injúria de herbivoria provocada por *Euschistus heros*; HSf: injúria de herbivoria provocada por *Spodoptera frugiperda*; DMec: dano mecânico. As linhas representam o padrão de resposta das plantas de algodão aos diferentes tratamentos no tempo. Quanto maior o valor em módulo do “efeito”, maior a contribuição dos compostos no padrão de resposta dos tratamentos que divergem em relação ao controle. O valor de p indica a significância do primeiro eixo da PRC sobre o tempo, baseando-se no teste de permutação de Monte Carlo.

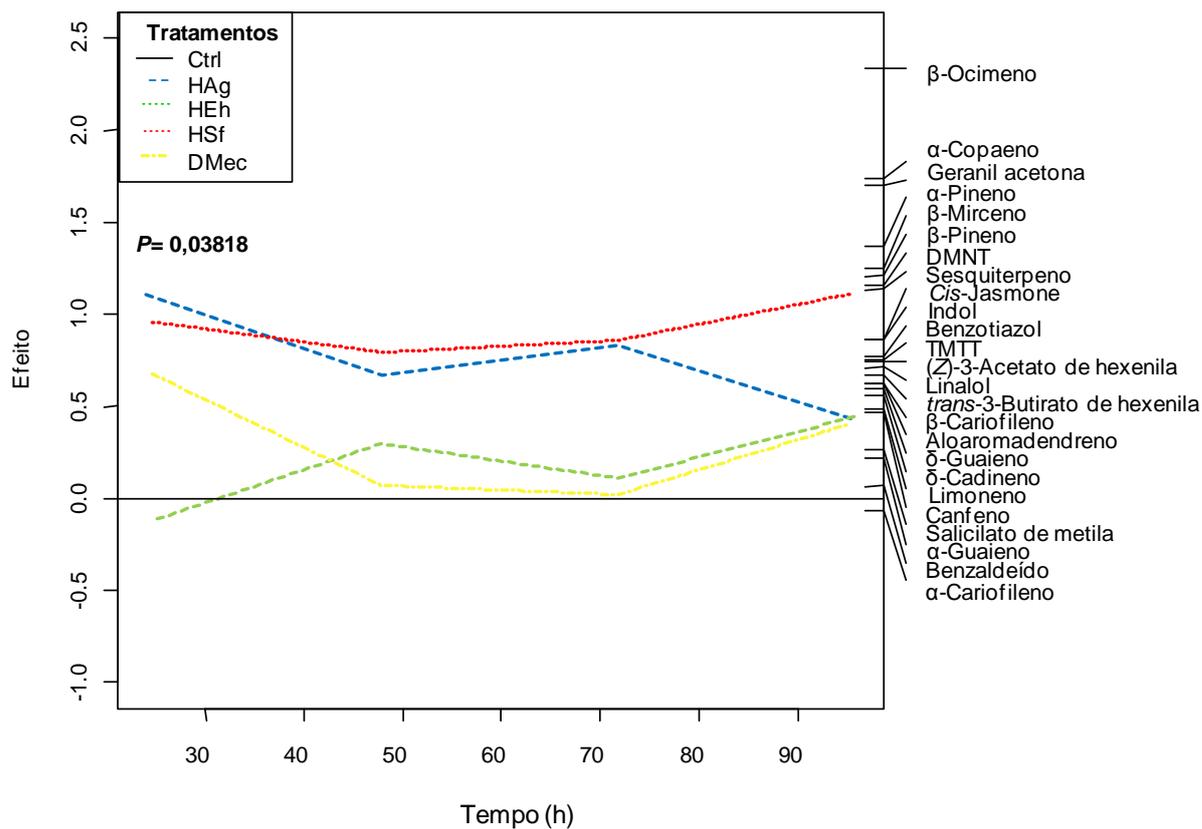


Figura 26. Diagrama PRC da mistura de voláteis liberados por plantas de algodão no estágio reprodutivo, submetidas a diferentes tratamentos ao longo de quatro dias consecutivos. Ctrl: planta sem injúria; HAg: injúria de herbivoria provocada por *Anthonomus grandis*; HEh: injúria de herbivoria provocada por *Euschistus heros*; HSf: injúria de herbivoria provocada por *Spodoptera frugiperda*; DMec: dano mecânico. As linhas representam o padrão de resposta das plantas de algodão aos diferentes tratamentos no tempo. Quanto maior o valor em módulo do “efeito”, maior a contribuição dos compostos no padrão de resposta dos tratamentos que divergem em relação ao controle. O valor de p indica a significância do primeiro eixo da PRC sobre o tempo, baseando-se no teste de permutação de Monte Carlo.

7. DISCUSSÃO

Neste trabalho, avaliou-se como o comportamento do bicudo-do-algodoeiro é afetado pelos voláteis emitidos por plantas de algodão, em diferentes estágios fenológicos, quando danificadas por co-específicos e heteroespecíficos. Os resultados dos bioensaios em olfatômetro em “Y” confirmaram que adultos de *A. grandis* são atraídos por voláteis liberados por sua planta hospedeira, *G. hirsutum*, como observado por McKibben et al. (1977). Nesta ocasião, McKibben e colaboradores testaram o potencial de atração do óleo de algodão em estudos de campo com uma população americana do bicudo-do-algodoeiro. Questões como a influência do estágio fenológico da planta e a atração/repelência por voláteis induzidos por herbivoria não foram avaliadas, deixando grandes lacunas a respeito do mecanismo de comunicação química no sistema bicudo-algodoeiro. Nesse sentido, o presente estudo deu um passo a mais em direção à identificação dos semioquímicos envolvidos na atração do bicudo por sua planta hospedeira. Os ensaios em olfatiometria mostraram que além de ser atraído pelos voláteis do algodoeiro, o bicudo prefere os voláteis liberados por plantas danificadas por co-específicos em relação àqueles liberados por plantas sem injúria e/ou por herbivoria de heteroespecíficos.

A atração por voláteis constitutivos ou induzidos por herbivoria por co-específicos em plantas hospedeiras já foi demonstrada para outros besouros do gênero *Anthonomus*. O curculionídeo *Anthonomus pomorum* L. mostrou resposta eletrofisiológica a voláteis constitutivos liberados por diferentes variedades de macieira (KALINOVÁ et al., 2000). *Anthonomus eugenii* Cano foi mais atraído por voláteis dos frutos de Jalapeño (*Caspicum* sp.) quando danificados por herbivoria do que por frutos sem dano (ADDESSO et al., 2011; ADDESSO & MCAUSLANE, 2009). *Anthonomus rubi* Herbst responde aos voláteis constitutivos liberados tanto por morangueiros quanto por framboeseiras. Já *Anthonomus musculus* Say, inseto-praga de culturas de *cranberry* e mirtilo, é atraído por voláteis liberados a partir de botões de *cranberry* atacados (MECHABER, 1992), mas não pelos voláteis de botões de mirtilo, quando atacados (SZENDREI et al., 2009). A maior atração de bicudos por voláteis do algodoeiro com injúria provocada pela herbivoria parece estar diretamente ligada à maior produção de voláteis observada por este conjunto

de plantas, uma vez que as análises químicas dos perfis de voláteis das plantas não mostraram diferenças qualitativas, mas sim quantitativas. Portanto, o bicudo parece diferenciar os voláteis das plantas induzidas por herbivoria das não induzidas e das danificadas por heteroespecíficos, pela quantidade dos compostos liberados ou pela diferente proporção destes componentes. É sabido que as plantas respondem à herbivoria através de mudanças no perfil de voláteis liberados (LOUGHRIN et al., 1995; BOLTER et al., 1997). Tais alterações podem ser de ordem quantitativa ou qualitativa, a depender da espécie da planta e do herbívoro que a ataca (PARÉ & TUMLINSON, 1998; TURLINGS et al., 1993).

A emissão de compostos voláteis induzidos pela herbivoria pode ser utilizada como pista olfativa para a localização de plantas hospedeiras, com menor tempo de busca e, conseqüentemente, menores gastos energéticos (STAMPS & KRISHNAN, 2005; KALBERER et al., 2001). Insetos que conseguem reconhecer e discriminar plantas infestadas por co-específicos podem apresentar maior valor adaptativo na localização de parceiros sexuais e sítios de oviposição (LOUGHRIN et al., 1996). Além disso, a partir da interpretação destas pistas químicas, os voláteis induzidos podem alterar o recrutamento de novos herbívoros ao fornecer informações sobre a intensidade de herbivoria deste hospedeiro (BERNASCONI et al., 1998). No entanto, principalmente para herbívoros que tem como hospedeiro preferencial plantas efêmeras, a escolha por odores mais detectáveis é priorizada em detrimento da qualidade do alimento (STAMPS & KRISHNAN, 2005). É importante ressaltar, contudo, que a primazia mostrada pelo bicudo por voláteis de plantas de algodão danificadas por herbivoria de co-específicos, pode ser simplesmente um mecanismo de localização de plantas hospedeiras, onde não necessariamente ocorrerá a alimentação dos tecidos destas. A orientação à distância para localização de um hospedeiro primeiramente está relacionada a estímulos sensoriais olfativos, não requerendo contato. Em contrapartida, para o estabelecimento de um sítio de alimentação outros estímulos são necessários, tais como os gustativos e tácteis, para se avaliar a qualidade nutricional da planta em questão (SCHOONHOVEN & VAN LOON, 2002).

O efeito que os processos de co-evolução exercem sobre insetos e plantas gera uma “corrida armamentista” entre estes dois grupos. Dessa forma, as plantas utilizam os voláteis induzidos pela herbivoria como mecanismo de defesa. Ser

atraído por um hospedeiro induzido a liberar tais substâncias, implica em ir ao encontro de uma fonte com possíveis competidores e elevado risco de influxo de inimigos naturais (HEIL, 2008). Conseqüentemente, torna-se difícil prever qual será o comportamento adotado pelo herbívoro. A própria biologia do inseto determinará quando este será atraído ou quando evitará estes voláteis. Para o bicudo-do-algodoeiro, aspectos comportamentais, como o hábito gregário, podem ter influenciado na determinação de sua escolha final.

Um aspecto interessante observado no comportamento do bicudo-do-algodoeiro é a não-atração por voláteis induzidos pela herbivoria de heteroespecíficos (lagarta-militar e percevejo-marrom), sugerindo que os adultos de *A. grandis* reconhecem a mistura de compostos liberada por plantas com dano efetuado por outros bicudos. As respostas das plantas frente aos danos de herbivoria podem ser espécie-específicas e, desse modo, compostos induzidos pela herbivoria podem fornecer informações acerca da presença de possíveis competidores em uma planta hospedeira (ROCHAT et al., 2000; YANG et al., 2004). Logo, infere-se que as diferenças quantitativas nas proporções dos compostos liberados nos tratamentos de herbivoria por *S. frugiperda* e *E. heros* foram suficientes para que o bicudo-do-algodoeiro as percebesse. Antagonicamente, o besouro-da-batata (*Leptinotarsa decemlineata* Say) além de ser atraído por compostos voláteis de plantas de batata danificadas por co-específicos, apresentou atratividade equivalente para solanáceas infestadas por lagartas de *S. exigua* (BOLTER et al., 1997).

O estágio fenológico da planta parece influenciar diretamente as respostas de insetos herbívoros. O bicudo-do-algodoeiro apresentou preferência por voláteis de *G. hirsutum* no estágio reprodutivo – caracterizado pela presença de botões florais, pequenas maçãs e flores – quando contrastados com àqueles do estágio vegetativo. Esse comportamento já era esperado para os adultos de *A. grandis*, uma vez que os primeiros indivíduos iniciam o processo de migração para os algodoads quando começam a surgir os primórdios de botões florais (RUMMEL & CURRY, 1986). O comportamento de preferência por determinados estágios fenológicos já foi reportado anteriormente na literatura. Experimentos com *A. eugenii* revelaram preferência por piperáceas em estágio de florescimento e frutificação, mostrando que estes besouros são capazes de identificar a fenologia da planta a partir do perfil

de voláteis emitido, sem que haja necessidade de pistas visuais ou mesmo gustativas (ADDESSO et al., 2011). Kalinová e colaboradores (2000) também propuseram que diferenças fenológicas podem resultar em mudanças na emissão de voláteis, influenciando, assim, o comportamento de forrageio. Uma maior quantidade de voláteis emitidos não implica, necessariamente, em maior atração. O algodoeiro no estágio vegetativo liberou determinados compostos em maior quantidade do que no estágio reprodutivo, o que não garantiu maior atração para o bicudo. Dessa forma, mesmo liberando uma mistura de compostos voláteis em menor quantidade, *G. hirsutum*, quando reprodutivo, atraiu mais o bicudo. Resultados semelhantes foram observados para *A. pomorum*, onde botões florais do primeiro estágio fenológico da variedade de macieira mais atrativa apresentaram menores quantidades de compostos voláteis do que a variedade menos atrativa (KALINOVÁ et al., 2000).

Tanto machos quanto fêmeas de *A. grandis* tiveram o mesmo padrão de resposta aos voláteis de *G. hirsutum*. Em todos os bioensaios foram utilizados extratos de plantas de algodão com e sem dano, provenientes das aerações e previamente analisados via CG; garantindo, assim, que o feromônio de agregação não estivesse presente nas amostras usadas nos testes comportamentais. Portanto, não houve interferência do feromônio nas respostas observadas em olfâmetro. Além disso, os ensaios foram feitos excluindo-se qualquer pista visual e permitindo focar apenas na importância dos voláteis de plantas para avaliar a habilidade de localização de hospedeiros pelo bicudo-do-algodoeiro. Adesso & McAuslane (2009) também não encontraram diferenças nas respostas entre machos e fêmeas de *A. eugeni*, previamente acasalados. Os autores sugerem que fêmeas virgens gastam mais tempo procurando parceiros sexuais e locais para alimentação, respondendo tanto a voláteis de plantas hospedeiras quanto a voláteis de plantas não-hospedeiras. Se o mesmo for verdadeiro para *A. grandis*, justifica o fato de as fêmeas virgens responderem para os voláteis de plantas no estágio vegetativo (resposta em busca de alimento) e reprodutivo (resposta em busca de parceiros sexuais e alimento).

Os machos de *A. grandis* que chegam à cultura e se alimentam das estruturas de algodão, iniciam a produção e liberação do feromônio de agregação, favorecendo a chegada de bicudos migrantes. Já foi elucidado na literatura que a atratividade dos

feromônios pode ser aumentada a partir da incorporação de voláteis de plantas em sua composição (DICKENS, 2006; YANG et al., 2004; PIÑERO & PROKOPY, 2003; LIGHT et al., 2001). No presente estudo, os resultados revelaram um aumento no potencial de atração do feromônio de agregação de *A. grandis* quando enriquecido com os compostos voláteis de *G. hirsutum* danificado por herbivoria. Nos bioensaios comportamentais, machos e fêmeas preferiram os braços do olfatômetro com fontes de odores da mistura de feromônio + voláteis de algodão no estágio reprodutivo danificado por *A. grandis*, quando comparado com o feromônio sozinho. Estes resultados estão de acordo com as observações feitas por McKibben e colaboradores no final da década de 70, ao perceberem um aumento na captura de bicudos em armadilhas iscadas com o feromônio + voláteis do óleo de algodão. Dickens (1985) e Dickens e colaboradores (1990) identificaram como possíveis responsáveis por este aumento na atração, os compostos β -bisabolol e (*E*)-2-hexan-1-ol. Entretanto, no presente estudo, tais compostos não foram encontrados na mistura de voláteis liberadas pelo algodoeiro, com e sem dano e em ambos os estágios fenológicos avaliados (Tabelas 1 e 2), sugerindo que outros compostos sejam os responsáveis pela atratividade observada em machos e fêmeas de *A. grandis* para a variedade de algodão DeltaOpal.

A identidade dos voláteis está de acordo com os compostos previamente encontrados em outros estudos com algodão (MORAES et al., 2011; HEDGE et al., 2011; RODRIGUEZ-SAONA et al., 2003; RÖSE et al., 1998; PARÉ & TUMLINSON, 1998; LOUGHRIN et al., 1995; MCCALL et al., 1994). Neste trabalho, foram encontrados alguns compostos anteriormente não citados (canfeno, aloaromadendreno e δ -cadineno), mas que são comuns em várias plantas. Estas diferenças podem ter sido devido ao uso de outras variedades de algodão, do estágio fenológico avaliado ou até mesmo do método de coleta empregado.

Os tratamentos com injúria de herbivoria liberaram maiores quantidades de voláteis que os demais. Estes resultados estão de acordo com a literatura, a qual afirma que injúrias provocadas por insetos herbívoros aumentam a emissão de voláteis (PARÉ & TUMLINSON, 1996; RÖSE ET AL., 1996, DICKE, 1998) Os tratamentos de herbivoria com *A. grandis*, *E. heros* e *S. frugiperda* apresentaram a mesma composição de voláteis, mas com diferenças quantitativas significativas. Semelhante ao algodão, plantas de tabaco da espécie *Nicotiana attenuata*

(Solanaceae) atacadas por insetos herbívoros de diferentes guildas alimentares – a lagarta *Manduca quinquemaculata* Haworth (Lepidoptera: Sphingidae), o besouro-saltador *Epitrix hirtipennis* Melsheimer (Coleoptera: Chrysomelidae) e o mirídeo *Tupiocoris notatus* Distant (Hemiptera: Miridae) – emitiram a mesma composição qualitativa de voláteis, mas em diferentes proporções (ROOT, 1973). A similaridade na liberação de compostos voláteis induzidos por herbivoria por diferentes espécies de insetos pode ser considerada um mecanismo de defesa indireta da planta, atuando como sinais universais para inimigos naturais generalistas (KESSLER & BALDWING, 2001).

Quantitativamente, algodoeiros danificados por *A. grandis* liberaram mais voláteis, seguidos por *S. frugiperda* e *E. heros*, que apresentou a menor taxa de liberação entre os três tratamentos. O tipo de dano afeta diretamente na produção de compostos voláteis, como mostrado nos resultados. Tais modificações podem ser explicadas pelo fato de insetos mastigadores induzirem a rota biosintética do ácido jasmônico, enquanto que insetos sugadores tendem a induzir a rota do ácido shiquímico (MICHEREFF et al., 2011; HILKER & MEINERS, 2006). Insetos mastigadores, como o bicudo e a lagarta-militar, que provocam injúrias severas aos tecidos vegetais, podem induzir reações mais fortes nas plantas do que herbívoros sugadores, como o percevejo-marrom. Baixas taxas de liberação de voláteis induzidos por herbivoria de insetos sugadores já foram registradas anteriormente em algodoeiros. Infestações de mosca-branca *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) não induziram plantas de algodão a liberarem voláteis (RODRIGUEZ-SAONA et al., 2003). Da mesma forma, Turlings et al. (1998) observaram altas taxas de emissão de voláteis induzidos por herbivoria da lagarta *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lepidoptera: Noctuidae), mas diminutas quantidades em plantas de milho infestadas pelo afídeo *Rhopalosiphum maidis* Fitch (Homoptera: Aphididae).

No presente trabalho com algodão e o percevejo *E. heros*, não se observou a indução dos compostos originados da rota do ácido shiquímico, como seria esperado de acordo com a literatura. Isso poderia ser explicado pelo não reconhecimento ao ataque desse inseto pelo algodoeiro. Os resultados da análise quantitativa, AVC e PRC mostram que o perfil químico da planta danificada por este inseto assemelhou-se muito mais com o da planta sem dano do que todos os outros tratamentos. Nos tratamentos com os insetos mastigadores, como era esperado, os

principais compostos induzidos foram de origem terpênica e da rota das lipoxigenases.

A capacidade de resposta das plantas de algodão apresentou variação de acordo com seu estágio de desenvolvimento. Algodoeiros no estágio vegetativo (com e sem dano) liberaram maiores quantidades de compostos voláteis quando comparados com algodoeiros no estágio reprodutivo. Em soja, *Glycine max* L. (Fabaceae), injúrias provocadas pela herbivoria de *S. frugiperda* induziram dez vezes mais a emissão de voláteis totais em plantas no estágio vegetativo que em plantas no estágio reprodutivo (presença de flores) (ROSTÁS & EGGERT, 2008). A Teoria da Defesa Ótima (TDO) prediz que as plantas devem alocar os compostos de defesa de forma a maximizar sua adaptabilidade reprodutiva (MCKEY, 1974). De acordo com a TDO, a produção de tais compostos defensivos apresenta um custo, seja ecológico ou fisiológico e, portanto, a alocação destas substâncias na planta revela o valor adaptativo de cada órgão (MCKEY, 1974). Assim, tecidos mais “valiosos” apresentam maiores concentrações de substâncias que agem como defensivos químicos. Em um trabalho utilizando a meta-análise, McCall e Fordyce (2010) mostraram que folhas jovens apresentavam maiores concentrações de compostos de defesa do que folhas velhas, e não encontraram evidências de que flores fossem mais defendidas do que folhas. O mesmo foi observado para o feijão *Phaseolus lunatus* L. (Fabaceae), onde a quantidade de voláteis total emitida por folhas jovens foi significativamente maior do que as quantidades liberadas por folhas velhas (RADHIKA et al., 2008).

Considerando que a planta no estágio vegetativo apresenta uma proporção de folhas jovens maior do que na fase reprodutiva, os resultados encontrados estão de acordo com a TDO. As folhas jovens geralmente são mais importantes para o *fitness* futuro da planta por serem fotossinteticamente mais ativas e, assim, contribuirão mais para a produção de fotoassimilados (WIEDEMUTH et al., 2005). As flores e frutos, por sua vez, são mais efêmeros e a composição (quantitativa e/ou qualitativa) de compostos defensivos deve também ser diferente. No algodão, a emissão de voláteis foi maior na fase vegetativa, mas a composição qualitativa não mudou. Já foi amplamente demonstrado que a emissão de voláteis varia quali- e quantitativamente, a depender de uma série de fatores que interagem entre si, como a própria fenologia da planta e a guilda alimentar dos insetos que a ataca.

As variações na composição quantitativa dos voláteis de plantas de algodão em diferentes estágios fenológicos e submetidas a diferentes tratamentos de herbivoria mostraram que partir de 48 h após o início da injúria se iniciou uma separação dos tratamentos HA_g dos demais. Apesar dessa distinção ficar clara somente após 48 h, os bicudos adultos apresentaram preferência para os voláteis de plantas danificadas por co-específicos a partir de 24 h após o início da injúria. Tais respostas sugerem que as diferenças nas proporções dos compostos liberados após 24 h já foram suficientes para que machos e fêmeas de *A. grandis* distinguissem os voláteis induzidos por herbivoria de seus co-específicos dos de outras espécies de insetos. Os compostos α -pineno, β -pineno, β -mirceno, (*Z*)-3-acetato de hexenila, β -ocimeno, DMNT, α -copaeno e TMTT foram os que mais contribuíram para o perfil de separação obtido entre os tratamentos de herbivoria por diferentes insetos e possivelmente, podem estar envolvidos na atração do bicudo-do-algodeiro.

Pela análise AVC foi possível identificar os principais compostos responsáveis pela separação das plantas danificadas por *A. grandis* nos diferentes estágios fenológicos. Essa separação dos estágios indica que existem diferenças nos perfis dos compostos liberados e que estes compostos podem ser os responsáveis pela percepção do estágio fenológico da planta pelos adultos de *A. grandis*. Os compostos α -pineno (C1), β -pineno (C4), β -ocimeno (C8) e α -copaeno (C16) parecem estar correlacionados às plantas de algodão no estágio reprodutivo e o volátil verde de planta (*Z*)-3-acetato de hexenila (C6) e o sesquiterpeno aloaromadendreno (21), com a planta no estágio vegetativo. Como foi discutido anteriormente, plantas no estágio vegetativo produzem uma quantidade maior de compostos e as proporções entre esses compostos parece ser crucial para o bicudo localizar o seu hospedeiro. O algodeiro no estágio vegetativo danificado por *A. grandis* produziu uma quantidade de voláteis significativamente superior aos outros tratamentos, incluindo as plantas danificadas por *A. grandis* no reprodutivo. Talvez a presença de (*Z*)-3-acetato de hexenila em grande quantidade seja a informação que o bicudo usa para saber se a planta está no estágio vegetativo ou não. No entanto, a função individual e/ou conjunta destes compostos ainda precisa ser avaliada.

Os resultados da PRC, que possibilita avaliar os compostos ao logo do tempo e a importância de cada composto da mistura de voláteis, mostraram um padrão semelhante ao encontrado pela AVC, elucidando a influência do mesmo grupo de

compostos na separação dos tratamentos ao longo do tempo. Para os tratamentos HAg, os compostos α -pineno, β -pineno, β -mirceno, β -ocimeno, linalol, DMNT e α -copaeno foram os grandes responsáveis pelo perfil observado, tanto para o estágio vegetativo quanto para o reprodutivo e as diferenças foram se intensificando ao longo do tempo. As análises químicas e estatísticas mostraram que a planta não responde imediatamente após o início da herbivoria. No entanto, os bioensaios revelaram que o bicudo é capaz de perceber diferenças entre os tratamentos nas primeiras 24 horas após a injúria, indicando, assim, que a antena do inseto é um biosensor muito mais eficiente e sensível que os equipamentos analíticos e técnicas estatísticas utilizadas.

Estudos envolvendo a liberação de voláteis em plantas infestadas por herbívoros têm focado preferencialmente nos efeitos destes compostos sobre o comportamento dos inimigos naturais. A emissão de voláteis é uma resposta adaptativa da planta que pode servir como defesa indireta, atraindo predadores ou parasitóides dos insetos que a atacam. Estudos eletrofisiológicos mostraram que o parasitóide *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) respondeu aos compostos (*Z*)-3-acetato de hexenila, (*E*)-ocimeno, linalol e DMNT emitidos por plantas de milho infestadas por lagartas de *Chilo partellus* Swinhoe (Lepidoptera: Crambidae) (NGI-SONG & OVERHOLT, 1997). Os parasitóides generalistas *Cotesia marginiventris* Cresson (Hymenoptera: Braconidae), *Campoletis sonorensis* Cameron (Hymenoptera: Ichneumonidae) e *Microplitis rufiventris* Kokujev (Hymenoptera: Braconidae) apresentaram respostas eletrofisiológicas para vários compostos emitidos por plantas de milho, algodão e feijão-de-corda infestados por *S. littoralis* mas, principalmente, para (*Z*)-3-acetato de hexenila, linalol e DNMT (GOUINGUENÉ et al., 2005). A maioria destes compostos foi atribuída a possíveis candidatos à atratividade observada por *A. grandis* pelos voláteis de sua planta hospedeira. É necessário avaliar se estes também têm atividade biológica sob os inimigos naturais do bicudo-do-algodoeiro. Apesar de compostos induzidos por herbivoria apresentarem potencial para atração de inimigos naturais, o aumento na emissão destes, observado após a injúria provocada pela herbivoria, também pode servir como sinal para atração de novos herbívoros em busca de hospedeiros, constituindo, assim, um risco para as plantas. Ao confirmar os compostos envolvidos

na atração do bicudo por seu hospedeiro, esses voláteis podem auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias para o controle de *A. grandis* na cotonicultura.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Gossypium hirsutum apresentou um perfil de voláteis quantitativamente diferente nos dois estágios fenológicos avaliados. Foi mostrado que o bicudo-do-algodoeiro utiliza os voláteis emitidos por plantas de algodão sem injúria ou infestadas por co-específicos para a localização de seu hospedeiro. Preferencialmente, o bicudo responde aos voláteis induzidos por herbivoria em plantas de algodão no estágio reprodutivo. O algodoeiro difere no modo como responde à herbivoria por insetos de diferentes guildas alimentares, o que pode influenciar no comportamento de forrageamento de insetos herbívoros.

A identificação dos compostos voláteis usados por herbívoros para a localização de hospedeiros – para alimentação, acasalamento e/ou oviposição – é crucial para uma melhor elucidação dos mecanismos de comunicação química entre insetos e plantas. Sinais químicos que desencadeiam atividade biológica em *A. grandis* oferecem uma alternativa ao uso de inseticidas sintéticos. Essa propriedade de atratividade pode ser usada como mecanismo de interrupção de encontro de parceiros sexuais; para o levantamento de populações incipientes, favorecendo o sincronismo na aplicação de inseticidas; ou mesmo para aumentar a atratividade de feromônios sintéticos. O uso de semioquímicos produzidos por plantas promove uma variedade de oportunidades para o desenvolvimento de métodos manipulativos para o controle de insetos-pragas.

Diante desse panorama, estudos adicionais ainda são necessários para se desvendar todos os aspectos da comunicação química entre *A. grandis* e *G. hirsutum*. Plantas atacadas simultaneamente por várias espécies de herbívoros podem emitir uma composição de voláteis em resposta ao dano de herbivoria, diferente de quando são atacadas por uma única espécie, como resultado de *cross-talk* entre as rotas metabólicas acionadas (RODRIGUEZ-SAONA et al., 2003). Nesse sentido, a avaliação da ação conjunta de *A. grandis*, *E. heros* e *S. frugiperda* se faz necessária. Além disso, é importante a apreciação individual dos compostos com potencial de atração do bicudo (α -pineno, β -pineno, β -mirceno, β -ocimeno, (Z)-3-acetato de hexenila, linalol, DMNT, α -copaeno, aloaromadendreno e geranil acetona). Ensaio comportamentais e testes eletrofisiológicos podem auxiliar na

caracterização do(s) composto(s) envolvido(s) na atração de *A. grandis* por sua planta hospedeira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addesso, K.M.; McAuslane, H.J.; Alborn, H.T. 2011. Attraction of pepper weevil to volatiles from damaged pepper plants. *Entomology Experimentalis et Applicata*, 138: 1-11.
- Addesso, K.M.; McAuslane, H.J. 2009. Pepper weevil attraction to volatiles from host and nonhost plants. *Environmental Entomology*, 38: 216-224.
- Aitchison, J. 1986. *The statistical analysis of compositional data*. Chapman & Hall Inc., Bristol, 416.
- Alborn, H.T.; Turlings, T.C.J.; Jones, T.H.; Stenhagen, G.; Loughrin, J.H.; Tumlinson, J.H. 1997. An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. *Science*, 276: 945-949.
- Almeida, R.P.; Silva, C.A.D.; Ramalho, F.S. 2008. Manejo integrado de pragas do algodoeiro no Brasil. In: Beltrão, N.E.M; Azevedo, D.M.O. (Editores). *O agronegócio do algodão no Brasil*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 1035-1098.
- Alvarez, G.A. 1990. *Bases técnicas para el cultivo del algodón en Colombia*. Bogotá: Guadalupe, 714.
- Aquino, I.S.; Ramalho, F.S.; Neto, J.M.; Jesus, F.M.M. 1986. Período de captura do bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis* Boheman por armadilhas de feromônio. *Ciência e Cultura*, 38: 1038-1040.
- Arimura, G.; Kost, C.; Boland, W. 2005. Herbivore-induced, indirect plant defense. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1734: 91-111.

- Barbosa, S.; Braga Sobrinho, R.; Lukefahr, M.J.; Beingolea, G.O. 1983. *Relatório sobre a ocorrência do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* Boheman, "Boll weevil", no Brasil e recomendações sobre sua erradicação*. Campina Grande, EMBRAPA-CNPA, 12.
- Barroso, P.A.V.; Freire, E.C. 2003. Fluxo gênico em algodão no Brasil. *In: Pires, C.S.S.; Fontes, E.M.G.; Sujii, E.R. (editores). Impacto ecológico de plantas geneticamente modificadas*. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 237.
- Bastos, C.S.; Suinaga, F.A.; Vieira, R.M.; Lima, E.F. 2008. Resistência do algodoeiro a artrópodes-praga. *In: Beltrão, N.E.M.; Azevedo, D.M.P. (Editores). O agronegócio do algodão no Brasil*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 357-411.
- Bastos, C.S.; Pereira, M.J.B.; Takizawa, E.K.; Ohl, G.; Aquino, V.R. 2005. *Bicudo do Algodoeiro: Identificação, biologia, amostragem e táticas de controle*. EMBRAPA-ALGODÃO, 31. (EMBRAPA-ALGODÃO. Circular Técnica, 79).
- Beltrão, N.E.M.; Azevedo, D.M.P. 2008. *O agronegócio do algodão no Brasil*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 12-17.
- Bernasconi, M.L.; Turlings, T.C.J.; Ambrosetti, L.; Bassetti, P.; Dorn, S. 1998. Herbivore-induced emissions of maize volatiles repel the corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis*. *Entomology Experimentalis et Applicata*, 87: 133-142.
- Bichão, H.; Borg-Karlson, A.K.; Araújo, J.; Mustaparta, H. 2005. Five types of olfactory receptor neurons in the strawberry blossom weevil *Anthonomus rubi*: selective responses to inducible host plants volatiles. *Chemical Senses*, 30: 153-170.

- Bolek, Y.; El-Zik, K.M.; Pepper, A.E.; Bell, A.A.; Magill, C.W.; Thanxton, P.M.; Reddy, O.U.K. 2005. Mapping of verticillium wilt resistance genes in cotton. *Journal of Plant Science*, 168: 1581-1590.
- Bolter, C.J.; Dicke, M.; Van-Loon, J.J.A.; Visser, J.H. Posthumus, M.A. 1997. Attraction of Colorado potato beetle to herbivore-damaged plants during herbivory and after its termination. *Journal of Chemical Ecology*, 23: 1003-1023.
- Borges, M.; Moraes, M.C.B.; Peixoto, M.F.; Pires, C.S.S.; Sujii, E.R.; Laumann, R.A. 2011. Monitoring the neotropical brown stink bug *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) with pheromone-baited traps in soybean fields. *Journal of Applied Entomology*, 135: 68-80.
- Borges, M.; Costa, M.L.M.; Sujii, E.R.; Cavalcanti, M. Das G.; Redígolo, G.F.; Resck, I.S.; Vilela, E.F. 1999. Semiochemical and physical stimuli involved in host recognition by *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae) toward *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). *Physiological Entomology*, 24: 227-233.
- Braga-Sobrinho, R.; Lukefahr, M.J. 1983. *Bicudo (Anthonomus grandis Boheman): nova ameaça à cotonicultura brasileira; biologia e controle*. Campina Grande, EMBRAPA-CNPA, 32. (EMBRAPA-CNPA, Documentos. 22)
- Burke, H.R. 1986. Situação taxonômica do bicudo-do-algodoeiro no Brasil e em outras áreas da América do Norte e do Sul. *In: Barbosa, S.; Lukefahr, M.J.; Braga-Sobrinho, R. O bicudo-do-algodoeiro*. Brasília: Embrapa DDT, 314.
- Capalbo, D.M.F.; Fontes, E.M.G. 2004. *GMO Guidelines Project – Algodão Bt*. Documentos 38. Jaguariúba: Embrapa Meio Ambiente, 56.
- Cardoso, E.G. 2001. Subprodutos do algodão como alimento animal. *In: Embrapa Agropecuária Oeste. Algodão: tecnologia de produção*. Dourados, Embrapa.

- Carrière, Y.; Ellers-Kirk, C.; Biggs, R.; Higginson, D.M.; Dennehy, T.J.; Tabashnik, B.E. 2004. Effects of gossypol on fitness costs associated with resistance to Bt cotton in pink bollworm. *Journal of Economic Entomology*, 97: 1710-1718.
- Carroll, M.J.; Schmelz, E.A.; Meagher, R.L.; Teal, P.E.A. 2006. Attraction of *Spodoptera frugiperda* larvae to volatiles from herbivore-damaged maize seedlings. *Journal of Chemical Ecology*, 32: 1911-1924.
- Chen, M.S. 2008. Inducible direct plant defense against insect herbivores: a review. *Insect Science*, 15: 101-114.
- Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). 2011. *Acompanhamento da safra agrícola brasileira 2010/2011: grãos, décimo segundo levantamento setembro/2011*. Brasília: CONAB, 41.
- Cook, M.S.; Zeyaur, R.K.; Pickett, J.A. 2007. The use of push-pull strategies in integrated pest management. *Annual Review of Entomology*, 52: 375-400.
- Corrêa-Ferreira, B.S.; Panizzi, A.R. 1999. *Percevejos da soja e seu manejo*. Londrina: Embrapa-CNPSo, 45. (Circular Técnica, 24).
- Cortesero, A.M.; Stapel, J.O.; Lewis, W.J. 2000. Understanding and manipulating plant attributes to enhance biological control. *Biological Control*, 17: 35-49.
- Cross, W.H.; Mitchell, H.C. 1966. Mating behavior of the female boll weevil. *Journal of Economic Entomology*, 59: 1503-1607.
- Cruz, I.; Figueiredo, M.L.C.; Matoso, M.J. 1999. *Controle biológico de Spodoptera frugiperda utilizando o parasitóide de ovos Trichogramma*. Sete Lagoas: Embrapa – CNPMS, 40. (Circular Técnica, 30).
- Debach, P.; Rosen, D. 1991. *Biological control by natural enemies*. 2th edition. Cambridge: University Press, 440.

- Degenhardt, D.C.; Greene, J.K.; Khalilian, A.; Reeves, R.B. 2011. Volatile emission from developing cotton bolls in response to hemipteran feeding damage. *Journal of Entomological Science*, 46: 179-190.
- Degrande, P.E. 1998a. Manejo integrado de pragas do algodoeiro. *In*: Embrapa, Centro de Pesquisa Agropecuária do Oeste. *Algodão: informações técnicas*. Dourados: Embrapa-CPAO; Campina Grande: Embrapa-CNPA, 154-191.
- Degrande, P.E. 1998b. *Guia prático de controle das pragas do algodoeiro*. UFMS. Dourados, 60.
- Degrande, P.E. 1991. Aspectos biológicos do bicudo. *In* Degrande, P.E. (ed.). *Bicudo do algodoeiro: Manejo integrado*. Campo Grande, UFMS, 141.
- De Moraes, C.M.; Mescheer, M.C.; Tumlinson, J.H. 2001. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel nonspecific females. *Nature*, 410: 577-580.
- De Moraes, C.M.; Lewis, W.J.; Paré, P.W.; Alborn, H.T.; Tumlinson, J.H. 1998. Herbivore-Infested plants selectively attract parasitoids. *Nature*, 393: 570-573.
- Dicke, M.; Takabayashi, J.; Posthumus, M.A.; Schutte, C.; Krips, E.O. 1998. Plant-phytoseiid interactions mediated by herbivore-induced plant volatiles: variation in production of cues and in responses of predatory mites. *Experimental and Applied Acarology*, 22: 311-333.
- Dicke, M. 1995. Why do plants “talk”? *Chemoecology*, 5/6: 159-165.
- Dicke, M. 1994. Local and systemic production of volatile herbivore-induced terpenoids: their role in plant-carnivore mutualism. *Journal of Plant Physiology*, 43: 465-472.
- Dicke, M.; van Beek, T.A.; Posthumus, M.A.; Ben-Don, N.; van Bokhoven, H.; De Groot, A.E. 1990. Isolation and identification of volatile kairomone that affects

- acarine predator-prey interactions: involvement in its host plant production. *Journal of Chemical Ecology*, 16: 381-396.
- Dickens, J.C. 2006. Plant volatiles moderate response to aggregation pheromone in Colorado potato beetle. *Journal of Applied Entomology*, 130: 26-31.
- Dickens, J.C.; Jang, E.B.; Light, D.M.; Alford, A.R. 1990. Enhancement of insect pheromone responses by green leaf volatiles. *Naturwissenschaften*, 77: 29-31.
- Dickens, J.C. 1985. Orientation of boll weevil, *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera: Curculionidae), to pheromone and volatile host compound in the laboratory. *Journal of Chemical Ecology*, 12: 91-98.
- Dickens, J.C. 1984. Olfaction in the boll weevil, *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera: Curculionidae): eletroantennogram studies. *Journal of Chemical Ecology*, 10: 1759-1785.
- Dudareva, N.; Negre, F.; Nadegowda, D.A.; Orlava, I. 2006. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Science*, 25: 417-440.
- Ferreira N.S.; Echer, C.R. 2003. Goiás mobilizado contra o bicudo. *Cultivar Especial*, 3-10.
- Fitt, G.P.; Omoto, C.; Maia, A.H.; Waquil, J.M.; Caprio, M.; Okech, M.A.; Cia, E.; Nguyen Huu Huan; Andow, D.A. 2006. Resistance risks of Bt cotton and their management in Brazil. In: Hilbeck, A.; Andow, D.; Fontes E.M.G. (Eds). *Environmental risk assessment of genetically modified organims. Volume 2: methodologies for assessing Bt cotton in Brazil*. CABI Publishing: Wallingford, UK. 400.
- 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. 2006. The cotton

- agricultural context in Brazil. *In*: Hilbeck, A.; Andow, D.; Fontes E.M.G. (Eds). *Environmental risk assessment of genetically modified organisms. Volume 2: methodologies for assessing Bt cotton in Brazil*. CABI Publishing: Wallingford, UK. 400.
- Fuzatto, M.G. 1999. Melhoramento genético do algodoeiro. *In*: Cia, E.; Freire, E.C.; Santos, W.J. (Eds). *Cultura do algodoeiro*. Piracicaba: Potafos. 15-34.
- Gabriel, D. 2002. Longevidade do bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis* Boh., criado em hospedeiras alternativas em laboratório. *Arquivos do Instituto de Biologia*, São Paulo, 69: 123-126,
- Gallo, D.; Nakano, O.; Silveira-Neto, S.; Carvalho, R.P.L.; Batista, G.C.; Berti-Filho, E.; Parra, J.R.P.; Zuchi, R.A.; Alves, S.B.; Vendramin, J.D. 2002. *Manual de entomologia agrícola*. Editora Ceres, São Paulo, SP. 486.
- Gatehouse, J.A. 2002. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytologist*, 156: 145-169.
- Gondim, D.M.C.; Belot, J.L.; Silvie, P.; Petit, N. 1999. *Manual de identificação das pragas, doenças, deficiências minerais e injúrias do algodoeiro no Brasil*. 3ª edição. COODETEC/CIRAD-CA, Cascavel, PR. 120.
- Gouinguéné, S.; Pickett, J.A.; Wadhams, L.J.; Birkett, M.A.; Turlings, T.C.J. 2005. Antennal electrophysiological responses of three parasitic wasps to caterpillar-induced volatiles from maize (*Zea mays mays*), cotton (*Gossypium herbaceum*), and cowpea (*Vigna unguiculata*). *Journal of Chemical Ecology*, 31: 1023-1038.
- Hardee, D.D.; Cross, W.H.; Mitchell, E.B. 1969. Male boll weevils are more attractive than cotton plants to boll weevils. *Journal of Economic Entomology*, 62: 165-169.

- Hare, J.D. 2011. Ecological role of volatiles produced by plants in response to damage by herbivorous insects. *Annual Review of Entomology*, 56: 161-180.
- Hedin, P.A.; MacCarty, J.C.J. 1995. Boll weevil *Anthonomus grandis* Boh. oviposition is decreased in cotton *Gossypium hirsutum* L. lines lower in Anther monosaccharides and Gossypol. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43: 2735-2739.
- Hedin, P.A.; Parrot, W.L.; Jenkins, J.N. 1992. Relationships of glands, cotton square terpenoid aldehydes, and other allelochemicals to larval growth of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of economic entomology*, 85: 359-364.
- Hegde, M.; Oliveira, J.N.; Costa, J.G.; Bleicher, E.; Santana, A.E.G.; Bruce, T.J.A.; Caulfield, J.; Dewhurst, S.Y.; Woodcock, C.M.; Pickett, J.A.; Birkett, M.A. 2011. Identification of semiochemical released by cotton, *Gossypium hirsutum*, upon infestation by the cotton aphid, *Aphis gossypii*. *Journal of Chemical Ecology*, 37: 741-750.
- Heil, M. 2008. Indirect defense via tritrophic interactions. *New Phytologist*, 178: 41-61
- Hilker, M.; Meiners, T. 2006. Early herbivore alert: insect eggs induce plant defense. *Journal of Chemical Ecology*, 32: 1379-1397.
- Jones, R.W. 2001. Evolution of the host plant associations of the *Anthonomus grandis* species group (Coleoptera: Curculionidae): phylogenetic tests of various hypotheses. *Annals of the Entomological Society of America*, 94: 51-58.
- Joly, A.B. 1983: *Introdução à taxonomia vegetal*. São Paulo: Editora Nacional, 777.
- Kalberer, N.M.; Turlings, T.C.J.; Rahier, M. 2001. Attraction of leaf beetle (*Oreina cacaliae*) to damaged host plants. *Journal of Chemical Ecology*, 27: 647-661.

- Kalinova, B.; Stransky, K.; Harmatha, J.; Ctvrticka, R.; Zd'arek, J. 2000. Can chemical cues from blossom buds influence cultivar preference in the apple blossom weevil (*Anthonomus pomorum*)? *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 95: 47-52.
- Kessler, A.; Halitschke, R. 2007. Specificity and complexity: the impact of herbivore-induced plant responses on arthropod community structure. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 409-414.
- Kessler, A.; Baldwin, I.T. 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emission in nature. *Science*, 291: 2141-2144.
- Knipling, E.F. 1986. Tecnologia disponível para a erradicação ou manejo do bicudo do algodoeiro. In: Barbosa, S.; Lukefarh, M.J.; Sobrinho, R.B. (Editores). *O Bicudo do Algodoeiro*. Embrapa: Departamento de Difusão Tecnológica Documentos 4, 201-220.
- Kong, G.; Daud, M.K.; Zhu, S. 2010. Effects of pigment glands and gossypol on growth, development and insecticide-resistance of cotton bollworm (*Heliothis armigera* (Hübner)). *Crop Protection*, 29: 813-819.
- Leggett, J.E. 1986. Uso de armadilhas de feromônio para levantamento, detecção e controle do bicudo. In: Barbosa, S.; Lukefarh, M.J.; Sobrinho, R.B. (Editores). *O Bicudo do Algodoeiro*. Embrapa: Departamento de Difusão Tecnológica Documentos 4, 201-220.
- Leopold, E.J. 1990. Selective hydroboration of a 1, 3, 7-triene: homogeneraniol. *Organic Synthesis*, 64: 164-171.
- Light, D.M.; Knight, A.L.; Henirick, C.A.; Rajapaska, D.; Lingren, B.; Dickens, J.C.; Reynolds, K.M.; Buttery, R.G.; Merrill, G.; Roitman, J.; Campbell, B.C. 2001. A pear derived kairomone with pheromonal potency that attracts male and female codling moth, *Cydia pomonella* (L.). *Naturwissenschaften*, 88: 333-338.

- Lloyd, E.P. 1986. Ecologia do bicudo do algodoeiro. *In*: Barbosa, S.; Lukefarh, M.J.; Sobrinho, R.B. (Editores). *O Bicudo do Algodoeiro*. Embrapa: Departamento de Difusão Tecnológica Documentos 4, 201-220.
- Loughrin, J.H.; Potter, D.A.; Hamilton-Kemp, T.R.; Byers, M.E. 1996. Role of feeding-induced plant volatiles in aggregative behavior of the Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae). *Environmental Entomology*, 25: 1188-1191.
- Loughrin, J.H.; Manukian, A.; Heath, R.R.; Tumlinson, J.H. 1995. Volatiles emitted by different cotton varieties damaged by feeding beet armyworm larvae. *Journal of Chemical Ecology*, 21: 1217-1222.
- McCall, A.C.; Fordyce, J.A. 2010. Can optimal defense theory be used to predict the distribution of plant chemical defense? *Journal of Ecology*, 98: 985-992.
- McCall, P.J.; Turlings, T.C.J.; Loughrin, J.; Proveaux, A.T.; Tumlinson, J.H. 1994. Herbivore-induced volatile emissions from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seedlings. *Journal of Chemical Ecology*, 20: 3039-3049.
- McKey, D. 1974. Adaptive patterns in alkaloid physiology. *American Naturalist*, 108: 305-320.
- McKibben, G.H.; Mitchell, E.B.; Scott, W.P.; Hedin, P.A. 1977. Boll weevils are attracted to volatile oils from cotton plants. *Environmental Entomology*, 6: 804-806.
- Manessi, G.O. 1997. Plantas hospedeiras de *Anthonomus grandis* Boh. *In*: Manessi, G.O. *Anthonomus grandis* Boh. El picudo mexicano del algodoeiro, la super plaga. Santa Fé, Argentina: FULCPA.
- Marur, C.J.; Ruano, O. 2002. Escala do algodão. *Revista Cultivar*, 4: 16-17.

- Mechaber, W.L. 1992. *Ecology of Anthonomus musculus*: host plant finding and exploitation by cranberry weevil. PhD Dissertation, Department of Biology, Tufts University, Medford, MA, USA.
- Michereff, M.F.F.; Lauman, R.A.; Borges, M.; Michereff-Filho, M.; Diniz, I.R.; Farias-Neto, A.L.; Moraes, M.C.B. 2011. Volatiles mediating a plant-herbivore-natural enemy interaction in resistant and susceptible soybean cultivars. *Journal of Chemical Ecology*, 37: 273-285.
- Miller, J.R.; Cowles, R.S. 1990. Stimulo-deterrent diversion: a concept and its possible application to onion maggot control. *Journal of Chemical Ecology*, 16: 3197- 3212.
- Miranda, J.E. 2006. *Manejo de pragas do algodoeiro no cerrado brasileiro*. Campina Grande: Embrapa Algodão, 22. (Circular Técnica, 98).
- Monnerat, R.G.; Dias, S.C.; Oliveira-Neto, O.B. de; Nobre, S.D.; Silva-Werneck, J. O.; Sá, M.F.G. 2000. *Criação massal do bicudo-do-algodoeiro Anthonomus grandis em laboratório*. Brasília: Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia, 1-4 (Circular Técnica, 46).
- Monsanto (Maeda DeltaPine Algodão). 2001. Guia técnico DeltaOpal. Uberlândia, 10.
- Moraes, M.C.B.; Laumann, R.A.; Aquino, M.F.S.; Paula, D.P.; Borges, M. 2011. Effect of Bt genetic engineering on indirect defense in cotton via a tritrophic interaction. *Transgenic Research*, 20: 99-107.
- Moraes, M.C.B.; Laumann, R.A.; Pareja, M.; Sereno, F.T.P.S.; Michereff, M.F.F.; Birkett, M.A.; Pickett, J.A.; Borges, M. 2009. Attraction of the stink bug egg parasitoid *Telenomus podisi* to defense signals from soybean activated by treatment with *cis*-jasmone. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 131: 178-188.

- Moraes, M.C.B.; Pareja, M.; Laumann, R.A.; Hoffmann-Campo, C.B.; Miguel, B. 2008a. Response of the parasitoid *Telenomus podisi* to induced volatiles from soybean damaged by stink bug herbivory and oviposition. *Journal of Plant Interactions*, 3: 1742-1756.
- Moraes, M.C.B.; Borges, M.; Pareja, M.; Vieira, H.G.; Sereno, F.T.P.S.; Laumann, R. A. 2008b. Food and humidity affect sex pheromone ratios in the stink bug, *Euschistus heros*. *Physiological Entomology*, 33: 43-50
- Moraes, M.C.B.; Laumann R.A.; Sujji, E.R.; Pires, C.; Borges, M. 2005. Induced volatiles in soybean and pigeon pea plants artificially infested with the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, and their effect on the egg parasitoid, *Telenomus podisi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 115: 227-237.
- Ngi-Song, A.J.; Overholt, W.A. 1997. Host location and acceptance by *Cotesia flavipes* (Cameron) and *C. sesamia* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), parasitoids of African gramineous stemborers: role of frass and other host cues. *Biology Contemporary*, 136-142.
- Papa, G. 2006. Pragas e seu controle. In: Fundo de Apoio à Cultura do Algodão (Organizador); Moresco, E. (Editor). *Algodão: pesquisas e resultados para o campo*. Cuiabá: Facual, 206-239.
- Papa, G. 2005. Adaptação constante: saiba porque é tão difícil o controle completo da lagarta-do-cartucho do milho. *Revista Cultivar*, 79: 8-11.
- Paré, P.W.; Tumlinson, J.H. 1998. Cotton volatiles synthesized and released distal to the site of insect damage. *Phytochemistry*, 47: 521-526.
- Paré, P.W.; Tumlinson, J.H. 1996. Volatile signals in response to herbivore feeding. *Florida Entomologist*, 79: 93-103.

- Pieterse, C.M.J.; Dicke, M. 2007. Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology. *Trends Plant Science*, 12: 564-569.
- Piñero, J.C.; Prokopy, R.J. 2003. Field evaluation of plant odor and pheromonal combinations for attracting plum curculios. *Journal of Chemical Ecology*, 29: 2735-2748.
- R Development Core Team. 2009. *R: a language and environment for statistical computing*. Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Radhika, V.; Kost, C.; Bartram, S.; Heil, M.; Boland, W. 2008. Testing the optimal defence hypothesis for two indirect defences: extrafloral nectar and volatile organic compounds. *Planta*, 228: 449-457.
- Raghuraman, M.; Gupta, G.P.; Singh, R.P. 2004. Impact of certain leaf morphological characters of cotton on population of whitefly, *Bemisia tabaci* Genn. *Journal of Cotton Research and Development*, 18: 81-84.
- Ramalho, F.S. 1994. Cotton pest management. Part 4. A Brazilian perspective. *Annual Review of Entomology*, 34, 563-578.
- Ramalho, F.S.; Silva, J.R.B. 1993. Período de emergência e mortalidade natural do bicudo-do-algodoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 28: 1221-1231.
- Ribeiro, J.S.F.; Bacchi, L.M.A.; Degrande, P.E. 2000. Apodrecimento prematuro. *Revista Cultivar*, 2: 8-9.
- Ribeiro, P.A.; Sujii, E.R.; Diniz, I.R.; Medeiros, M.A.; Salgado-Labouriau, M.L.; Branco, M.C.; Pires, C.S.S.; Fontes, E.M.G. 2010. Alternative food sources and overwintering feeding behavior of the boll weevil, *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) under the tropical conditions of Central Brazil. *Neotropical Entomology*, 39: 28-34.

- Rochat, D.; Meillour, P.N.; Esteban-Duran, J.R.; Malosse, C.; Perthuis, B.; Morin, J.P.; Descoins, C. 2000. Identification of pheromone synergists in the American palm weevil, *Rhynchophorus palmarum*, and attraction of related *Dynamis borassi*. *Journal of Chemical Ecology*, 26: 155-187.
- Rodriguez-Saona, C.; Crafts-Brandner, S.J.; Cañas, L.A. 2003. Volatile emissions triggered by multiple herbivore damage: beet armyworm and whitefly feeding on cotton plants. *Journal of Chemical Ecology*, 29: 2539-2550.
- Root, R.B. 1973. Organization of a plant-arthropode association in simple and diverse habitats: the fauna of collards (*Brassica oleracea*). *Ecological Monographs*, 43: 95-124.
- Röse U.R.S.; Tumlinson, J.H. 2005. Systemic induction of volatile release in cotton: how specific is the signal to herbivory? *Planta*, 222: 237-335.
- Röse, U.R.S.; Lewis, W.J.; Tumlinson, J.H. 1998. Specificity of systemically released cotton volatiles as attractants for specialist and generalist parasitoid wasps. *Journal of Chemical Ecology*, 24: 303-319
- Röse U.R.S.; Manukian, A.; Heath, R.R.; Tumlinson, J.H. 1996. Volatile semiochemicals released from undamaged cotton leaves (a systemic response of living plants to caterpillar damage). *Plant Physiology*, 111: 487-495.
- Rostás, M.; Eggert, K. 2008. Ontogenetic and spatio-temporal patterns of induced volatiles in *Glycine max* in the light of optimal defense hypothesis. *Chemoecology*, 18: 29-38.
- Rummel, D.R.; Curry, G.L. 1986. Dinâmica populacional e níveis de dano econômico. In: Barbosa, S.; Lukefarh, M.J.; Sobrinho, R.B. (Editores). *O Bicudo do Algodoeiro*. Embrapa: Departamento de Difusão Tecnológica Documentos 4, 201-220.

- Santos, W.J. 2007. Manejo das pragas do algodão com destaque para o cerrado brasileiro. *In: Freire, C.E. (Editores). Algodão no cerrado do Brasil*. Brasília: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, 403-478.
- Santos, W.J. 2001. Identificação, biologia, amostragem e controle das pragas do algodoeiro. *In: Embrapa Agropecuária Oeste (Dourados) (Ed). Algodão tecnologia de produção*. Embrapa Agropecuária Oeste/Embrapa Algodão, Dourados, MS, 181-226.
- Schmidt, F.G.V.; Monnerat, R.; Borges, M.; Carvalho, R. 2001. *Criação de insetos para avaliação de agentes entomopatogênicos e semioquímicos*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1-20. (Circular Técnica, 11).
- Schoonhoven, L.M.; Van Loon, J.J.A. 2002. An inventory of taste in caterpillars: each species its own key. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 48: 215-263.
- Silva, N.M.; Carvalho, L.H; Cia, E.; Fuzatto, M.G.; Chiavegato, E.J.; Alleoni, L.R.F. 1995. *Seja o doutor do seu algodoeiro*. Piracicaba, Potafos, 26.
- Silvie, P.; Bélot, J.L.; Michel, B. 2007. *Manual de identificação das pragas e seus danos no cultivo do algodão*. Cascavel: COODETEC/CIRAD-CA, 11-120.
- Smith, C.M.; Boyko, E.V. 2007. The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: current status. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 122: 1-16.
- Soria, M.F.; Degrande, P.E.; Panizzi, A.R. 2010a. Algodoeiro invadido. *Cultivar Grandes Culturas*, 131: 18-20.
- Soria, M.F.; Degrande, P.E.; Panizzi, A.R; Thomazoni, D. ; Kodama, E. ; Azambuja, T.M. 2010b. Neotropical brown stink bug *Euschistus heros* (Fabr., 1798) attack on Bt-cotton bolls cultivated in Brazilian savannah. *In: Beltwide Cotton*

Conferences 2010, New Orleans, Louisiana, EUA. Beltwide Cotton Conferences Proceedings.

Spurgeon, D. W. 2003. Age dependence of pheromone production by the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology*, 32: 31-38.

Stamps, J.; Krishnan, V.V. 2005. Nonintuitive cue use in habitat selection. *Ecology*, 86: 2860-2867.

Szendrei, Z.; Malo, E.; Stelinski, L.; Rodriguez-Saona, C. 2009. Response of cranberry weevil (Coleoptera: Curculionidae) to host plant volatiles. *Entomological Society of America*, 38: 861-869.

Teixeira C.A.D.; Alves, P.M.P. 1996. *Bicudo-do-algodoeiro: conhecer, prevenir, controlar*. Porto Velho, RO: Embrapa CPAF, 17. (Circular Técnica 26).

Torres, J.B.; Ruberson, J.R. 2009. Manejo de pragas do algodoeiro na América do Norte em relação ao Brasil. *V Congresso Brasileiro do Algodão*.

Tumlinson J.H.; Hardee D.D.; Gueldner, R.C.; Thompson, A.C.; Hedin, P.A.; Minyard, J.P. 1969. Sex pheromone produced by the male boll weevil: isolation, identification, and synthesis. *Science*, 166, 1010-1012.

Turlings, T.C.J.; Bernasconi, M.; Bertossa, R.; Bigler, F.; Caloz, G.; Dorn, S. 1998. The induction of volatile emissions in maize by three herbivore species with different feeding habits: possible consequences for their natural enemies. *Biological Control*, 11: 122-129.

Turlings, T.C.J.; Tumlinson, J.H.; Lewis, W.J. 1993. An elicitor in caterpillar oral secretion that induces corn seedlings to emit chemical signals attractive to parasitic wasps. *Journal of Chemical Ecology*, 19: 411-425.

- Turlings, T.C.J.; Tumlinson, J.H. 1992. Systemic chemical signaling by herbivore-injured corn. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*, New York, 89: 8399-8402.
- Turlings, T.C.J.; Tumlinson, J.H.; Lewis, W.J. 1990. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host seeking parasitic wasps. *Science*, 250: 1251-1253.
- United States Department of Agriculture/ Foreign Agriculture Service (USDA/FAS). 2011. *Cotton: world markets and trade*. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/cotton.pdf>. Acesso em: 06/10/2011.
- Van den Brink, P.J.; Ter Braak, C.J.F. 1999. Principal response curves: analysis of time dependent multivariate responses of a biological community to stress. *Environmental, Toxicology and Chemistry*, 18: 138-148.
- Vidal-Neto, F.C.; Silva, F.P.; Bleicher, E.; Melo, F.I.O. 2005. Mutantes morfológicos de algodoeiro herbáceo como fonte de resistência ao bicudo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40: 123-128.
- Vilela, E.F.; Pallini, A. 2002. Uso de semioquímico no controle biológico de pragas. *In: Parra, J.R. et al. Controle biológico no Brasil: predadores e parasitóides*. São Paulo: Manole.
- Wiedemuth, K.; Muller, J.; Kahlau, A.; Amme, S.; Mock, H.P.; Grzam, A.; Hell, R.; Egle, K.; Beschow, H. Hmbeck, K. 2005. Successive maturation and senescence of individual leaves during barley whole plant ontogeny reveals temporal and spatial regulation of photosynthetic function in conjunction with C and N metabolism. *Journal of Plant Physiology*, 162, 1226-1236.
- Williams, MR. 2009. *Cotton insect losses 2009*. Disponível em: <http://www.entomology.msstate.edu/resources/tips/cotton-losses/data/2009/2009loss.php>. Acesso em: 14/10/2011.

Williams, J.L.; Ellers-Kirk, C.; Orth, R.G.; Gassmann, A.J.; Head, G.; Tabashnik, B.E.; Carrière, Y. 2011. Fitness cost of resistance to *Bt* cotton linked with increased gossypol content in pink bollworm larvae. *PLoS-One*. 6: e21863.

Yang, Z.; Bengtsson, M.; Witzgall, P. 2004. Host plant volatiles synergize response to sex pheromone in codling moth, *Cydia pomonella*. *Journal of Chemical Ecology*, 30: 619-629.

Zarpas, K.D.; Margaritopoulos, J.T.; Stahtl, L.; Tsitsipis, J.A. 2006. Performance of cotton aphid *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) lineages on cotton varieties. *International Journal of Pest Management*, 52: 225-232.

Zhu, J.; Park, K.C. 2005. Methyl salicylate, a soybean aphid-induced plant volatile attractive to the predator *Coccinella septempunctata*. *Journal of Economic Entomology*, 31: 1733-1746.

APÊNDICES

1. Espectros de massa dos compostos identificados nos voláteis emitidos por plantas de algodão.

A. Espectro de massa do composto na amostra.

B. Espectro de massa do composto na biblioteca.

